



TRABAJO FIN DE GRADO

Validación y aplicación de un método de análisis para
la determinación de compuestos carbonílicos traza del
vino usando SBSE-TD-GC-MS

Autor/es

Javier Galindo Cortés

Directores

Alexis Marsol Vall

Mónica Bueno Fernández

Facultad de Ciencias

2023

ÍNDICE

RESUMEN	3
ABSTRACT	4
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. Importancia del Vino en la Química	5
1.2. Compuestos Carbonílicos Traza del Vino	6
1.3. Análisis de Compuestos Carbonílicos Traza	7
2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO	9
3. PARTE EXPERIMENTAL	10
3.1. Instrumentos y Equipos	10
3.2. Materiales, Disolventes y Reactivos	13
3.2.1. Cartuchos para la SPE	13
3.2.2. Disolventes	13
3.2.3. Reactivos.....	13
3.2.4. Estándares	13
3.2.5. Disoluciones Realizadas	13
3.3. Muestras	14
3.4. Estudio de la Pureza de los Estándares químicos	15
3.5. Procedimiento de Extracción-Derivatización en Fase Sólida	15
3.6. Extracción SBSE de las oximas	16
3.7. Condiciones de Desorción Térmica	16
3.8. Cromatografía de gases-espectrometría de masas.....	17
3.9. Validación del método	18
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
4.1. Cualificación: Identificación de los compuestos	19
4.2. Cálculo de la Pureza de los Estándares	19
4.3. Linealidad en matriz de Vino Sintético	20
4.4. Estudio de los Blancos: Límite de Detección y Límite de Cuantificación	21
4.5. Estudio Efecto Matriz	22
4.6. Estudio de la Precisión	23

4.7. Muestras Reales	26
5. CONCLUSIONES	26
6. BIBLIOGRAFÍA.....	27
7. ANEXOS.....	30
Anexo 1: Concentraciones exactas de la mezcla realizada para obtener parámetros cualitativos.....	30
Anexo 2: Concentraciones exactas de las disoluciones madres.	31
Anexo 3: Concentraciones exactas de las disoluciones Intermedias.	32
Anexo 4: Concentraciones exactas utilizadas en la recta de calibrado y añadidas en los estudios de repetibilidad, reproducibilidad y efecto matriz.....	33
Anexo 5: Purezas obtenidas para cada analito.	34

RESUMEN

Este estudio presenta la validación y la aplicación de un método de análisis para la determinación de compuestos carbonílicos traza relevantes en el aroma del vino, concretamente, los alquenales. El método se basa en la combinación de diferentes técnicas analíticas, como son la Extracción en Fase Sólida (SPE) con derivatización en cartucho utilizando PFBHA, y la posterior Extracción por Sorción sobre Barra Agitadora (SBSE) de las oximas generadas. Estas oximas permiten alcanzar una elevada sensibilidad al detectarse por cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) utilizando ionización química negativa (NCI) como fuente de ionización. Para la realización de este estudio, se hace uso de unas condiciones optimizadas en un trabajo anterior, pero adaptadas a las necesidades actuales. Antes de llevar a cabo el estudio se examinaron otras características del método, como la correcta identificación de los compuestos, ajustando sus tiempos de retención y sus relaciones de masas, o el cálculo de la pureza de los estándares. Los parámetros de calidad del método fueron en general satisfactorios: linealidad, con rangos de lineales que cubrían desde los 0,16 hasta los 16 $\mu\text{g/L}$ ($r^2 > 0,992$); límites de detección inferiores a 2 $\mu\text{g/L}$, incluso con la presencia de los analitos en los blancos (debido a factores externos); el casi nulo efecto matriz que presentaban los distintos vinos ($p > 0,05$); precisión adecuada en términos de repetibilidad y reproducibilidad (en general, inferiores al 14%). Además, este método se ha empleado para la cuantificación de los alquenales en distintas muestras comerciales. En conclusión, estos resultados tienen potencial para ampliar este método a otras familias de compuestos carbonílicos traza relevantes del vino, como son los alquenales o las cetonas.

Palabras Clave: Validación, alquenales, oximas, vino, SPE, SBSE.

ABSTRACT

This study presents the validation and application of an analytical method for the determination of trace carbonyl compounds relevant in wine aroma, specifically, alkenals. The method is based on the combination of different analytical techniques, such as Solid Phase Extraction (SPE) with cartridge derivatization using PFBHA, and subsequent Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE) of the generated oximes. These oximes enable achieving high sensitivity when detected by Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) using Negative Chemical Ionization (NCI) as ionization source. For the execution of this study, optimized conditions from a previous work were used, but adapted to current needs. Before conducting the study, other method characteristics were examined, such as the correct identification of the compounds, adjusting their retention times and mass ratios, or the calculation of the purity of the standards. The method quality parameters generally satisfactory: linearity, with linear ranges that covers from 0.16 to 17 $\mu\text{g/L}$ ($r^2 > 0.992$); detection limits lower than 2 $\mu\text{g/L}$, even with the presence of analytes in the blanks (due to external factors); the almost null matrix effect exhibited by the different wines ($p > 0,05$); adequate in terms of repeatability and reproducibility (in general, lower than 14%). Furthermore, This method has been used for the quantification of alkenals in different commercial samples. In conclusion, these results have the potential to expand this method to other families of relevant trace carbonyl compounds in wine, such as alkenals or ketones.

Keywords: Validation, alkenals, oximes, wine, SPE, SBSE.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Importancia del Vino en la Química

El vino es uno de los alimentos que más se consume de manera mundial, siendo una parte integral de la cultura y de la tradición de muchos países. Sin ir más lejos, en España hay multitud de fiestas relacionadas con éste, como puede ser la Fiesta de la Vendimia de Rueda de Jerez, o el Festival Vino del Somontano realizado cada año en Barbastro.

Cada vino es un mundo, donde sus propiedades y características distan mucho entre sí. Sin embargo, pese a la diferencia entre ellos, todos los vinos pasan un proceso de elaboración más o menos similar, donde la química juega un papel fundamental. Entre estos procesos cabe destacar la fermentación alcohólica, donde los azúcares se transforman en alcoholes; la fermentación maloláctica, en la que el ácido málico se transforma en ácido láctico, reduciendo así la acidez del vino; o el sulfitado, donde la adición de sulfitos sirve para evitar la oxidación del vino.

Además, el aroma del vino está considerado como uno de los más complejos, debido a la alta cantidad de odorantes que posee, provenientes de distintas familias químicas y que está implicado directamente en su sabor. La principal composición química del vino es la siguiente:

- Agua: Procede de la propia uva. Entre un 75-90%.
- Etanol: Surge de la fermentación alcohólica de glucosa y fructosa, y sirve como soporte de los compuestos aromáticos presentes en el vino. Entre un 10-15%.
- Glicerina: Contribuye al cuerpo del vino, aportando cierto dulzor.
- Otros alcoholes: Como metanol o propanol, que se encuentran por debajo de 1 g/L pero que participan en la formación de aromas.
- Ácidos: Ácido tartárico, málico, cítrico, succínico o acético, entre otros. Son los encargados de asegurar tanto la acidez volátil como la no volátil.
- Azúcares residuales: La glucosa y fructosa que queda después de la fermentación y que amortiguan la acidez del vino.
- Polifenoles: Antocianos y taninos, que marcarán el color de vino y su estructura.
- Compuestos volátiles aromáticos mayoritarios: Principalmente ésteres, alcoholes y compuestos carbonílicos mayoritarios como el acetaldehído que se encuentran en concentraciones de mg/L.
- Otros: Aminoácidos, sales minerales o vitaminas, que son indispensables para las levaduras.
- Compuestos volátiles aromáticos traza: Se llaman así por las concentraciones en las que se encuentran (mg/L o µg/L). Dentro de este grupo se engloban familias químicas muy diversas como pueden ser los compuestos carbonílicos traza, fenoles, terpenos, norisoprenoides, metoxipirazinas y lactonas.

1.2. Compuestos Carbonílicos Traza del Vino

De entre todos los compuestos presentes en el vino, los aldehídos y las cetonas son el grupo más variados desde el punto de vista sensorial, como se muestra en la *Tabla 1*, y por lo tanto influyen en su calidad¹.

Tabla 1. Compuestos carbonílicos traza y sus descriptores de olor detectados por cromatografía de gases-olfatometría (GC-O) en extractos de vino		
Familia	Compuestos	Olor
Aldehídos de Strecker	<i>Fenilacetaldehído</i>	<i>Floral, verde</i>
	<i>2-Metilbutanal</i>	<i>Corteza de pan, cerrado</i>
	<i>Metional</i>	<i>Verduras cocidas</i>
Aldehídos saturados	<i>Pentanal</i>	<i>Aldehído</i>
	<i>Hexanal</i>	<i>Herbáceo</i>
	<i>Octanal</i>	<i>Cítrico, rancio</i>
	<i>Nonanal</i>	<i>Aldehído, jabón</i>
Alquenales	<i>(Z)-3-hexenal</i>	<i>Verde, hierba</i>
	<i>(E)-2-Hexenal</i>	<i>Tostado</i>
	<i>(E)-2-Heptenal</i>	<i>Verde</i>
	<i>(Z)-2-Heptenal</i>	<i>Frito, rancio</i>
	<i>(E)-2-Octenal</i>	<i>Cítrico, amargo</i>
	<i>(Z)-2-Nonenal</i>	<i>Cloro, rancio, aldehído</i>
	<i>(E)-2-Nonenal</i>	<i>Melón, papel</i>
	<i>(Z)-2-Decenal</i>	<i>Cloro, carne</i>
Alcadienales	<i>(E, E)-2,4-Heptadienal</i>	<i>Rancio, pepino</i>
	<i>(E, Z)-2,6-Nonadienal</i>	<i>Verde, pepino</i>
	<i>(E, E)-2,4-Nonadienal</i>	<i>Rancio, tostado</i>
	<i>(E, E)-2,4-Decadienal</i>	<i>Grasa, aldehído</i>
Cetonas	<i>2,3-Butandiona</i>	<i>Mantequilla</i>
	<i>2,3-Pentanediona</i>	<i>Mantequilla, nata</i>
	<i>1-Hexen-3-ona</i>	<i>Almendra, tostado</i>
	<i>4-Metil-3-penten-2-ona</i>	<i>Floral, verde</i>
	<i>1-Hepten-3-ona</i>	<i>Setas</i>
	<i>1-Octen-3-ona</i>	<i>Setas</i>
	<i>2-Octanona</i>	<i>Rancio</i>
	<i>(Z)-1,5-Octadien-3-ona</i>	<i>Geranio, metálico</i>
	<i>1-Nonen-3-ona</i>	<i>Setas</i>
	<i>3-Nonen-2-ona</i>	<i>Patata frita, rancio y húmedo</i>
<i>3-Metil-2,4-nonanediona</i>	<i>Miel, fuerte</i>	
Otros	<i>Furfural</i>	<i>Madera dulce, nuez</i>
	<i>2-metilbenzaldehído</i>	<i>Pelo quemado</i>

Estos compuestos carbonílicos se pueden formar durante el proceso de fermentación alcohólica, pero también hay una pequeña parte que puede provenir de la uva². Entre los compuestos carbonílicos traza más importantes se encuentran las cetonas,

alquenales, alacadienales y los conocidos como aldehídos de Strecker. Los tres primeros grupos, de los cuales los alquenales han sido estudiados en este trabajo, se obtienen principalmente por oxidación lipídica de ácidos grasos, aunque también pueden provenir directamente de la fermentación de uvas poco maduras. Por otra parte, los aldehídos de Strecker se forman durante la fermentación en la conocida como Ruta de Ehrlich, o posteriormente en el envejecimiento a través de la degradación de Strecker, donde un aminoácido reacciona con un compuesto α -dicarbonílico.

Además, alguno de estos aldehídos y cetonas desempeñan un papel crucial en la longevidad del vino, debido a su estrecha relación con el consumo de oxígeno durante el envejecimiento y sus bajos umbrales de olfacción³. Algunos se empiezan a percibir a través del olfato antes de que el pardeamiento del vino debido al alto consumo de oxígeno sea apreciable⁴. Por el contrario, otros disminuyen su intensidad de olor con la microoxigenación de los vinos⁵. Por lo tanto, su relación con el oxígeno no queda del todo clara y se necesitan métodos cuantitativos para poder esclarecer la relación del O₂ con estos compuestos.

Los aldehídos de 6 átomos de carbono, conocidos como aldehídos C6, son populares junto con los alcoholes C6 y las metoxipirazinas por ser responsables de aromas vegetales, herbáceos, verdes e inmaduros de las uvas, mostos y vinos. Las metoxipirazinas son típicos de algunas variedades de uva como *Cabernet Sauvignon*, *Sauvignon Blanc*, *Merlot*, *Cabernet Franc* y *Camenere*, mientras que el resto pueden llegar a arruinar el aroma de vinos de variedades consideradas neutras⁶. Cabe señalar que algunos de los olores verdes generalmente atribuidos a los aldehídos C6 podrían ser causados por los aldehídos C9, ya que poseen umbrales aún más bajos. Los casos más conocidos son el (E)-2-Nonenal⁷ o (E, Z)-2,6-Nonadienal⁸.

1.3. Análisis de Compuestos Carbonílicos Traza

El análisis de los compuestos carbonílicos es altamente dificultoso, debido a que son compuestos altamente reactivos, polares, lábiles y extremadamente volátiles, además de poseer unas propiedades cromatográficas bastante malas (picos con colas) y espectros de masa inespecíficos. Todo esto supone dificultades para su cuantificación.

Hay que añadir también que, cuando se trabaja con muestras reales de vino, la presencia de otros compuestos carbonílicos mayoritarios, como es el caso del ácido pirúvico o del acetaldehído puede incrementar los problemas debidos al efecto matriz, dificultando todavía más la cuantificación de estos analitos.

La solución más sencilla a los problemas cromatográficos y espectroscópicos se basa en realizar una etapa previa de derivatización de los compuestos carbonílicos traza a cuantificar. Para ello, se pueden emplear diversos agentes derivatizantes para su análisis

en cromatografía de gases como 2-aminoetanol, TCPC (2,4,6-triclorofenilhidarina), PFPH (pentafluorobencilhidracina)⁹ y el más común, el PFBHA ((2,3,4,5,6-pentafluorobencil)hidroxilamina)^{10,11}. Al añadir este agente se consiguen obtener oximas por adición nucleófila de la amina al grupo carbonílico, produciendo la formación de dos isómeros (E y Z) para aquellos carbonilos que no sean simétricos (*Figura 1*).

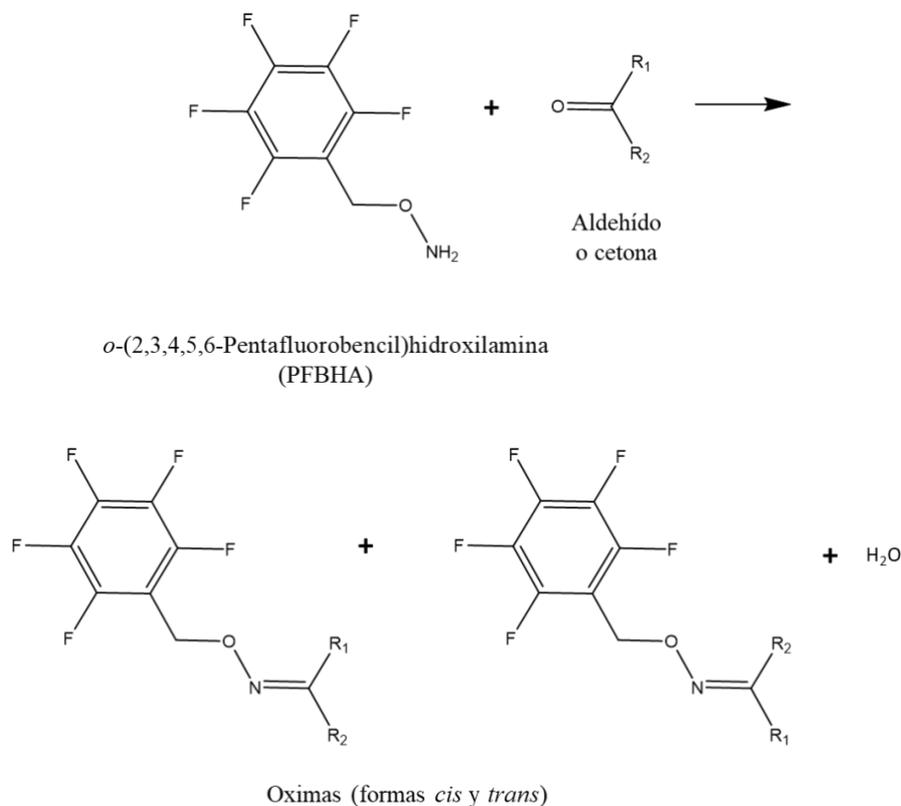


Figura 1: Reacción del compuesto carbonílico con PFBHA a través de una adición nucleófila, produciendo la formación de oximas

Los compuestos que se han estudiado en este trabajo, los alquenes, han sido objeto de estudio en numerosas ocasiones, buscando su cuantificación con metodologías muy diversas. Se han conseguido obtener buenos resultados con metodologías que van desde la Cromatografía de Gases (GC) con detección de Captura de Electrones (ECD)¹¹ hasta con Cromatografía Líquida acoplada a Espectroscopia de Masas con Triple cuadrupolo (LC-QQQ-MS)¹².

En cuanto a las técnicas de extracción-concentración que podrían usarse para mejorar los límites de detección de estos compuestos en muestras de vino, las más usadas son la Extracción en Fase Sólida (SPE)^{11,13} o la Microextracción en Fase Sólida (SPME)^{13,14}. Por otro lado, existe una técnica menos explotada en este campo como es la Extracción por Sorción sobre Barra Agitadora (SBSE), comercialmente conocida como Twister (única marca comercial por el momento). Aunque existen diversos recubrimientos para estas barras agitadoras, el más común es el Polidimetilsiloxano (PDMS), lo cual hace que sea una técnica adecuada para extraer compuestos con polaridad baja, como pueden

ser las oximas¹⁵. Además, su mayor proporción de sorbente en relación a la cantidad de muestra respecto a las técnicas mencionadas anteriormente, hace que la SBSE posea una mayor eficiencia de extracción y reduzca el efecto matriz, pudiéndose obtener teóricamente mejores límites de detección de una forma más sencilla.

Se ha utilizado la técnica SBSE para analizar el aroma del vino (generalmente cetonas y aldehídos, pero principalmente ésteres, alcoholes y ácidos)^{16,17}, obteniendo resultados precisos y límites de detección bajos. No obstante, un estudio previo que buscaba la determinación directa de aldehídos de Strecker de vino con SBSE (sin derivatización) no tuvo éxito al no llegar a los límites de detección necesarios¹⁸. Por ello, en un trabajo anterior se propuso la estrategia combinada de SPE con derivatización en el propio cartucho de los compuestos carbonílicos traza con PFBHA seguida de la extracción por SBSE de las oximas producidas¹⁹. Sin embargo, sólo se llegó a realizar la optimización de los parámetros de extracción, quedando el método sin validar. Además, se han planteado varios cambios en la cuantificación por cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS), como especificar los cortes cromatográficos de la primera a la segunda dimensión, creación de ventanas de adquisición y el uso de ionización química negativa (NCI) como fuente de ionización en lugar de impacto electrónico (EI)¹³. Con esto se esperaba conseguir una mejora en la sensibilidad, obteniendo unos límites de detección menores. Por ello, en este trabajo se propuso validar la técnica SBSE para la extracción y cuantificación de oximas previamente producidas y cuantificadas por GC-MS usando una fuente NCI.

2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO

El objetivo de este estudio fue validar y aplicar un método de análisis para la determinación de compuestos carbonílicos traza presentes en el vino, cuyas etapas de SPE y SBSE fueron optimizadas en un estudio previo, en 2021¹⁹.

Se han estudiado los compuestos carbonílicos traza indicados a continuación:

(Z)-3-hexenal, *(E)*-2-hexenal, *(E)*-2-octenal, *(E)*-2-nonenal y *(E)*-2-decenal.

Para llevar a cabo la validación de este método, hubo que estudiar diversas características analíticas típicas, entre las que se encuentran²⁰:

- Selectividad: Capacidad del método analítico para detectar y medir el analito de interés en presencia de otros componentes en la muestra.
- Linealidad: Capacidad para obtener una respuesta proporcional al aumento de la concentración del analito en la muestra.
- Límite de detección (LD): Concentración más baja del analito que se puede detectar con una señal que se distingue del ruido del fondo.

- Límite de cuantificación (LQ): Concentración más baja del analito que se puede medir con una exactitud y precisión adecuadas.
- Precisión: Grado de coincidencia entre los resultados de las muestras individuales a partir de una misma muestra homogénea.
- Robustez: Capacidad del método para producir resultados precisos y exactos en diferentes condiciones experimentales. Es de principal interés el efecto matriz en el análisis del vino.

Además de los objetivos científicos, también se marcaron unos objetivos didácticos como son:

- Identificar y seleccionar fuentes bibliográficas relevantes relacionadas con el tema del estudio, analizándolas y evaluándolas para lograr una comprensión profunda del tema.
- Planificar la metodología y pasos experimentales, adecuándolos a nuestros objetivos.
- Realizar los procedimientos experimentales de acuerdo con el diseño experimental previamente establecido, registrando de manera precisa los datos y observaciones obtenidas durante la experimentación y haciendo uso de las medidas de seguridad y de buenas prácticas de laboratorio.
- Familiarizarse con nuevas técnicas de extracción, que no se han visto de manera experimental durante la carrera, como es el caso de la SBSE.
- Adquirir y poner en práctica los conocimientos sobre técnicas cromatográficas.
- Obtener y registrar los datos analíticos, para posteriormente realizar análisis de éstos usando métodos estadísticos.
- Interpretar correctamente los resultados, analizando y evaluando los datos obtenidos en relación con nuestro objetivo de estudio.
- Extraer conclusiones, sintetizando de manera clara y concisa los resultados obtenidos.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Instrumentos y Equipos

Para la realización de este estudio, se han empleado varios instrumentos y aparatos propios del laboratorio, entre los que destacan:

- **Barras agitadoras magnéticas de sorción** (*Figura 2*). Conocidos como Twister, ya que es la única marca comercial registrada por la casa Gerstel. Las barras agitadoras utilizadas están recubiertas por 126 μL de PDMS (polidimetilsiloxano). Tienen un tamaño de 20 mm de longitud x 1,0 mm de espesor.



Figura 2: Barras Twister agitándose a 400 rpm

- **Acondicionador de tubos Modelo TC-20** (Figura 3). Permite el acondicionamiento simultáneo y secado de hasta 20 tubos de desorción térmica, utilizando un flujo continuo de nitrógeno y sometiéndolos a alta temperatura que permite eliminar todas las impurezas que hayan podido quedarse en el Twister previamente introducido en el tubo.



Figura 3: Acondicionador de Tubos de Sorción, Modelo TC-20

- **Sistema de vacío para la realización de la SPE modelo Vac Elut 20**, de la marca Varian (Figura 4). Este sistema se conecta a una bomba de vacío, y posee adaptadores para colocar hasta 20 cartuchos.



Figura 4: Sistema de Vacío para la SBE, modelo Vac Elut 20

- **Cromatógrafo de Gases multidimensional acoplado a Espectrometría de Masas (MD-GC-MS) (Figura 5).** El cromatógrafo de gases que se ha empleado ha sido el modelo 7890A, y el espectrómetro de masas, el modelo 5975C, ambos de Agilent Technologies, que contiene dos columnas de fases ortogonales en el interior de un mismo horno.



Figura 5. Cromatógrafo de Gases acoplado a Espectrómetro de Masas (MD-GC-MS)

3.2. Materiales, Disolventes y Reactivos

3.2.1. Cartuchos para la SPE

Se han utilizado cartuchos comerciales de la marca Isolute. Son cartuchos de 100 mg de resinas ENV+ (copolímero de poliestireno-divinilbenceno hidroxilado hiperentrecruzado). Para la realización de la SPE, se unieron a reservorios de 1 mL. Estas resinas fueron seleccionadas debido a su gran retención para moléculas neutras de diferentes polaridades²¹.

3.2.2. Disolventes

El etanol, metanol y hexano de calidad de cromatografía de gases se compraron en Merck (Dramstadt, Alemania). El agua Mili-Q se obtuvo de la purificación del agua destilada a través de un sistema de purificación de Milipore.

3.2.3. Reactivos

- PFBHA ((2,3,4,5,6-pentafluorobencil)hidroxilamina clorhidrato) \geq 98% de Merck, empleado como agente derivatizante para los compuestos carbonílicos.
- NaHCO₃ al 97% de la casa comercial Panreac (Barcelona, España).
- Ácido tartárico al 99% de Panreac.
- Glicerina al 99,5% de Panreac.
- Ácido sulfúrico al 96% de la casa comercial Scharlau (Barcelona, España).
- Hidróxido de sodio al 99% de Scharlau.

3.2.4. Estándares

Los estándares químicos utilizados en este trabajo fueron el (*Z*)-3-hexenal 98%, (*E*)-2-hexenal 98%, (*E*)-2-octenal 95%, (*E*)-2-nonenal 97%, (*E*)-2-decenal 95%, que se compraron en Aldrich (Madrid, España).

El estándar interno para la SPE fue el (*E*)-2-undecenal 95%, que se compró en Aldrich (Madrid, España). También se empleó el 2,3,4-TCA (2,3,4-tricloroanisol) (99% Aldrich) como estándar interno para la SBSE. Se utilizó el octanoato de metilo como estándar interno (99% Aldrich) para el estudio de pureza de los reactivos.

3.2.5. Disoluciones Realizadas

Se han realizado las siguientes disoluciones:

- Disolución de PFBHA de 5 mg/L realizada diariamente.
- Disolución acuosa al 60% en metanol (v/v) con NaHCO₃ al 1% (w/w). Se preparó pesando 10 g de NaHCO₃ disueltos en 600mL de MeOH y 400mL de agua Mili-Q.

- Disolución de H₂SO₄ 0,05M. Se preparó disolviendo 2,8 mL de H₂SO₄ 96% en 1L de agua Mili-Q.
- Disolución de etanol con hexano al 20% (v/v) preparada diariamente.
- Disolución de vino sintético: Disolución acuosa al 12% de etanol (v/v) que contiene 5 g/L de glicerina y 5 g/L de ácido tartárico, pH ajustado a 3,5 con NaOH.
- Una mezcla que contiene los compuestos carbonílicos a analizar. Esta mezcla sirve exclusivamente para la cualificación, buscando ajustar los tiempos de retención y las relaciones de masas para cada compuesto. En esta mezcla cada analito tiene una concentración aproximada de 15 mg/L en etanol (*Anexo 1*).
- Disoluciones madres, donde cada analito tiene una concentración aproximada de 600 mg/L en etanol (*Anexo 2*).
- Disoluciones conjuntas intermedias, las cuales poseen todos los compuestos carbonílicos que se van a analizar preparadas a partir de las disoluciones madres correspondientes. Sus concentraciones aproximadas son de 5 mg/L y de 80 µg/L en etanol, aproximadamente. El (*E*)-2-undecenal (Estándar interno), se preparó por separado en una una concentración de 3 mg/L en etanol aproximadamente (*Anexo 3*).
- Las disoluciones intermedias se utilizafon para la preparación de las rectas de calibrado y para el estudio de la repetibilidad y la reproducibilidad. Las concentraciones aproximadas de los puntos de calibrado fueron las que se muestran en la *Tabla 2*. (Las concentraciones exactas se encuentran en el *Anexo 4*).

Tabla 2. Concentraciones aproximadas de estas disoluciones					
Conc. P0 (µg/L)	Conc. P1 (µg/L)	Conc. P2 (µg/L)	Conc. P3 (µg/L)	Conc. P4 (µg/L)	Conc. P5 (µg/L)
0	0,2	0,8	1,8	4,3	15,0

3.3. Muestras

Para la validación del método se han empleado 4 muestras de vino comerciales diferentes:

- Vino Tinto Joven: *Viña Amate de Cosecha 2021*, elaborado con uvas tempranillo, D.O. Rioja.
- Vino Tinto Crianza: *Ordate Crianza 2019*, elaborado con una mezcla de uvas tempranillo, garnacha y graciano. D.O. Rioja.
- Vino Blanco: *El Coto 2022*, elaborado con uvas cuidadosamente vendimiadas, D.O. Rioja.
- Vino Rosado: *Bach, Viña Extrísima 2020*, D.O. Cataluña.

El método propuesto se ha empleado para la cuantificación de los analitos en 4 muestras de vino tinto de variedad tempranillo de Ribera del Duero. Los análisis se llevaron a cabo por triplicado.

3.4. Estudio de la Pureza de los Estándares químicos

Como algunos de los reactivos disponibles en el laboratorio llevaban tiempo abiertos, se analizó su pureza por cromatografía de gases con detector de ionización en llama (FID), siguiendo un método propuesto en el año 2012²². Para este análisis, hay que comparar los valores de RFF (Factor Relativo de Respuesta) teórico y experimental. Estos se calculan haciendo uso de las *Ecuaciones 1-3*:

$$RFF \text{ teórico: } 10^3 \frac{PM_{comp}}{PM_{SI}} X (-61,5 + 88,8n_C + 18,7n_H - 41,3n_O + 3,8n_N + 64,0n_S - 20,2n_F - 23,5n_{Cl} - 10,2n_{Br} - 1,07n_I + 127n_{Benz})^{-1} \text{ Eq.1}$$

$$RFF \text{ exp: } \frac{masa_{comp} \times \text{Área}_{SI}}{masa_{SI} \times \text{Área}_{comp}} \text{ Eq.2}$$

$$\text{Pureza: } \frac{RFF_{teórico}}{RFF_{exp}} \text{ Eq.3}$$

Donde PM es el Peso Molecular. n_C , n_H , n_O , n_N , n_S , n_F , n_{Cl} , n_{Br} , n_I , n_{Benz} son el número de átomos de carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, azufre, flúor, cloro, bromo, yodo y el número de anillos bencílicos, respectivamente.

3.5. Procedimiento de Extracción-Derivatización en Fase Sólida

El proceso de extracción-derivatización por SPE se basa en el realizado en el estudio previo¹⁹ con alguna pequeña modificación. En resumen, se comienza con el acondicionamiento de los cartuchos de 100 mg de Isolut ENV+, añadiendo 2mL de hexano, metanol y agua/etanol al 12% (v/v). Tras esto, se pasan a través del cartucho 5 mL de vino. Se lava el cartucho con 1 mL de agua Mili-Q y se añade 5 mL de la disolución acuosa del 60% de metanol (v/v) al 1% de NaHCO₃ (w/w), para eliminar los compuestos carbonílicos mayoritarios¹⁰. Posteriormente se vuelve a lavar con 1 mL de agua Mili-Q.

A continuación, se adiciona 1 mL del agente derivatizante, una disolución preparada diariamente de PFBHA 5 mg/L, y se dejar reaccionar durante 15 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo, se añaden 5 mL de la disolución de H₂SO₄ 0,05M, para eliminar el exceso de reactivo derivatizante. Se lava con 1 mL de agua Mili-Q una vez más, y se secan los cartuchos a vacío.

Por último, se eluye con 1,5 mL de la disolución de etanol con un 20% (v/v) en hexano.

3.6. Extracción SBSE de las oximas

Primeramente, se acondicionaron los Twister, manteniéndolos 1 hora a 300°C en el acondicionador tal y como recomienda el fabricante.

Se añaden en un matraz que posee el Twister previamente acondicionado, 100 µL del extracto obtenido por SPE y 4,9 mL de agua Mili-Q. Se adicionan también 5 µL de 2,3,4-TCA de una concentración de 100 mg/L, como estándar interno para la extracción SBSE. Se realiza la extracción en SBSE agitando los Twister a 400 rpm durante dos horas. Una vez transcurrido el tiempo, se colocan los Twister en el cromatógrafo, listos para ser desorbidos.

3.7. Condiciones de Desorción Térmica

Para la desorción de los Twisters, se han empleado una Unidad de Desorción Térmica (TDU) y un Sistema de Inyección en Frío (CIS), con una entrada de Vaporización Programable y Termostatizada (PTV), del fabricante GERSTEL. Tienen una características fijas:

Los ajustes y el programa de temperatura de la Unidad de Desorción Térmica son los que se indican en las *Tablas 3-4*:

Tabla 3. Ajustes de la TDU	
Línea de Transferencia de Tª	<i>En rampa</i>
Modo de Desorción	<i>Splitless</i>
Modo de Muestreo	<i>Tubo de retención – Refrigeración en Standby</i>
Tª en Standby	<i>50 °C</i>

Tabla 4. Programa de Temperatura	
Tª Inicial	<i>30 °C</i>
Tiempo Inicial	<i>0,20 min</i>
Velocidad	<i>120 °C/min</i>
Tª Final	<i>300 °C</i>
Tiempo de Espera	<i>10 min</i>

En el caso del CIS, que usa N₂ líquido, los parámetros, junto a los de la PTV, son los mostrados en la *Tabla 5*:

Tabla 5. Parámetros del CIS - PTV					
Inicio		Primera Rampa		Segunda Rampa	
Tª Inicial	-10 °C	Velocidad	16 °C/s	Velocidad	12 °C/s
Tiempo de Equilibrio	0,20 min	Tª Final	150 °C	Tª Final	300 °C
Tiempo Inicial	0,10 min	Tiempo de Espera	0,00 min	Tiempo de Espera	30 min
Entrada de Vapor Programable y Termostatzada					
Modo PTV			<i>Venteo del Solvente mediante PTV</i>		
Tª			250 °C		
Flujo de Venteo			50 mL/min		
Presión de Venteo			36,01 psi hasta 0,1 min		
Flujo de Purga del Septum			3 mL/min		
Flujo de Purga a la Ventilación Split			L/min a los 3 min		

3.8. Cromatografía de gases-espectrometría de masas

El equipo de cromatografía de gases se compone por dos columnas colocadas en el interior de un mismo horno cromatográfico. En este equipo el gas que actúa como gas portador es Helio, y se trabaja a presión constante de 36,01 psi, (flujo total de 24,985 mL/min).

Para la correcta obtención de los resultados, el horno cromatográfico ha de tener un programa de temperaturas, que es el siguiente: Temperatura inicial 40 °C, la cual se mantiene durante 4 minutos. Trascurrido este tiempo, la temperatura empieza a aumentar a 15 °C/minuto, hasta llegar a los 100 °C, donde sigue aumentando 5 °C/minuto hasta alcanzar los 250 °C, temperatura que se mantiene durante 5 minutos.

La primera columna es una Agilent® J&W DB-5MS, de naturaleza apolar y compuesta por un 5% Fenilo y 95% Dimetilarileno siloxano. Sus dimensiones son 15 m de longitud, 250 µm de diámetro y 0,25 µm de espesor de fase.

La unión entre esta columna un FID se produce mediante una columna secundaria, que tiene unas dimensiones de 6,7 m de longitud y 180 µm de diámetro.

Respecto al detector FID, este trabaja con un flujo constante de 40 mL/min de H₂ y de 450 mL/min de Aire. Trabaja a 280 °C.

La primera columna se une a la segunda a través de una válvula Deans Switch, que permite la transferencia selectiva de cortes, que eluyen de una columna a la siguiente. Estos cortes han sido del minuto 17,98 al 22,60 y del minuto 23,50 al 34,00.

La segunda columna es una Agilent® DB-WAXETR, de naturaleza polar (polietilenglicol). Sus dimensiones son 35 m de longitud, 250 µm de diámetro y 0,5 µm de espesor de fase.

Esta segunda columna se encuentra conectada al espectrómetro de masas, el cuál posee un analizador de masas cuadrupolo, que detecta las relaciones m/z de los iones. Se uso el modo SCAN para la cualificación, y el modo SIM para la posterior cuantificación. Se empleo la Ionización Química Negativa (NCI) como fuente de ionización, usando metano como gas de reacción. La temperatura de la fuente y del cuadrupolo fue 150 °C y la línea de transferencia se mantuvo a 250 °C.

3.9. Validación del método

Como hemos nombrado con anterioridad, hubo ciertos parámetros que era necesario evaluar para la validación del método. Estos se determinaron de las siguientes maneras:

La repetibilidad se determinó evaluando la señal que se obtuvo en 9 determinaciones de un mismo vino tinto joven a dos niveles de concentración diferentes, una nula, y otra a unos 5 µg/L aproximadamente. Se analizó ese vino 3 días diferentes por triplicado. La reproducibilidad se evaluó a partir de los mismos extractos como la raíz cuadrada de la repetibilidad entre días²³.

La linealidad se calculó mediante el análisis de vino sintético que contenían cantidades conocidas de analitos a 5 niveles de concentración más blancos (*Tabla 2, Anexo 4*) y tres réplicas en cada nivel. Los gráficos de la calibración se realizaron usando áreas relativas, a los diferentes estándares internos.

Para la evaluación de los efectos matriz se estudiaron vinos con distinta matriz: vino blanco, tintos (joven y crianza) y rosado sin dopar y dopados a concentraciones P2 y P4 (*Anexo 4*), con concentraciones aproximadas de 0,8 y 4,3 µg/L, respectivamente. Las pendientes de las rectas obtenidas para estos vinos y el vino sintético se compararon mediante análisis de varianza (ANOVA) de 1 factor con el programa XLSTART de Excel, Versión 19.03.

Los límites de detección fueron estimados como la cantidad de analito presente en el vino, que causan una señal tres veces mayor a la desviación estándar promedio de los blancos. Los límites de cuantificación se definen de igual manera, siendo ahora aquella cantidad de analito que causa una señal diez veces mayor a la desviación estándar promedio de los blancos.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Cualificación: Identificación de los compuestos

Previamente a poder evaluar los parámetros de calidad del método, se tuvieron que optimizar los cortes para pasar los analitos de la primera a la segunda dimensión, junto a las relaciones m/z para la cuantificación y cualificación de los analitos al igual que las ventanas de adquisición.

El primer aspecto a considerar fue la correcta identificación de cada compuesto en GC-MS. Para ello, se realizaron una mezcla que contenía todos los compuestos a estudiar, en concentraciones altas (aproximadamente unos 15 mg/L en etanol), lo que aseguraba su detección en FID y MS. Primeramente se inyectó la mezcla de oximas, únicamente en la primera dimensión para establecer los cortes (del minuto 17,98 al 22,60 y del minuto 23,50 al 34,00). Para la identificación de cada compuesto, se emplearon los tiempos de retención y la relación de masas que fueron optimizadas en estudios previos^{13,24}. Los tiempos de retención fueron reajustados, debido a modificaciones de la longitud de la columna con el tiempo y por tanto del número de platos de la separación cromatográfica.

Se presentan a continuación los datos obtenidos de las masas que se van a emplear para la identificación de cada compuesto, junto al tiempo en el que se han detectado y su ventana de adquisición, en la *Tabla 6*:

Compuesto	m/z 1	m/z 2	m/z 3	Tiempo de Retención (min)	Ventana de Adquisición (min)
(Z)-3-hexenal	273	246	293	21,43	19,91-25,50
(E)-2-hexenal	243	273	274	23,39	19,91-25,50
(E)-2-octenal	301	271	285	28,09	27,70-29,70
(E)-2-nonenal	315	298	316	30,30	29,70-32,00
(E)-2-decenal	329	312	299	32,42	32,00-34,00
(E)-2-undecenal	343	313	326	34,45	34,00-36,00
2,3,4 - TCA	210	195		27,52	25,50-27,70

Donde la m/z 1 se empleó para la cuantificación del compuesto, mientras que la m/z 2 y la m/z 3 sirven para asegurar la correcta identificación del mismo.

4.2. Cálculo de la Pureza de los Estándares

Una vez identificados adecuadamente todos los compuestos, antes de comenzar la validación del método, hubo que conocer la concentración real de los estándar con los que se realizarían las disoluciones de trabajo. Para ello, se realizaron unas disoluciones aproximadamente de 10 mg/L para (E)-2-hexenal, (E)-2-octenal, (E)-2-nonenal, (E)-2-Decenal y de 15 mg/L para (Z)-3-hexenal y (E)-2-undecenal. A estas disoluciones se les añadió una concentración perfectamente conocida de octanoato de metilo como estándar interno (10,16 mg/L). Como hemos nombrado con anterioridad, hay que

calcular el RRF teórico y experimental para determinar la pureza. Para obtener el RRF experimental, entra el juego el valor obtenido de la señal de nuestro compuesto, así como su masa inyectada, y valorarlo frente a los resultados obtenidos del octanoato de metilo.

Se obtuvo que las purezas de nuestros compuestos tenían valores entre 19 y 107%. Las purezas que se obtuvieron fueron muy inferiores a las proporcionadas por las casas comerciales para (*Z*)-3-hexenal y para (*E*)-2-undecenal (Anexo 5). Pudo deberse a una mala estabilidad pese a ser guardadas en congeladores o sencillamente a la reactividad ocurrida con el tiempo. Se compraron botes nuevos para estos compuestos con tan baja pureza.

4.3. Linealidad en matriz de Vino Sintético

Para evaluar la linealidad del método se procedió a la realización de las rectas de calibrado en matriz de vino sintético. Para ello, se prepararon unas disoluciones conjuntas de cada familia de analitos en etanol, cuyas concentraciones exactas se encuentran en el *Anexo 3*, a partir de las cuales se dopó el vino sintético, siempre manteniendo la cantidad de etanol constante, consiguiendo las concentraciones mostradas en el *Anexo 4*. De este modo, los rangos de concentraciones cubrían desde 0,2 µg/L hasta los 16 µg/L aproximadamente.

Se realizó el ajuste utilizando unas rectas ponderadas (ponderación: $1/s_i^2$) debido a que la calibración cubría más de un orden de magnitud. Se representó la concentración de los analitos frente a la señal obtenida en relación a la señal obtenida por un estándar interno y teniendo en cuenta la desviación de los triplicados.

Para cada analito se llevaron a cabo dos rectas de calibrado. Una frente al (*E*)-2-undecenal añadido antes de la SPE y otra frente al 2,3,4-TCA. El 2,3,4-TCA se empleó con la intención de corregir posibles errores en la extracción con Twister, mientras que el (*E*)-2-undecenal fue añadido desde el comienzo del proceso y por tanto debía sufrir todo el proceso de extracción igual que el analito.

Como se esperaba que hubiera problemas con los blancos¹³ y que estos produjeran una señal notable, se introdujeron las señales obtenidas en el P0 (sin concentración añadida) a las rectas de calibrado.

Se obtuvieron resultados muy buenos y similares para los dos tipos de rectas de calibrado. Sin embargo, se decidió quedarse con la recta con el (*E*)-2-undecenal, ya que teóricamente corrige mejor los procesos que pueden sufrir nuestros compuestos. Los resultados obtenidos pueden verse en la *Tabla 7* y cubren los rangos de aparición de estos compuestos en el vino¹².

Tabla 7. Resultados obtenidos de las rectas de calibrado				
Vino Sintético				
Compuesto	Rango Lineal (µg/L)	Pendiente	s	r²
(Z)-3-hexenal	1,73 - 16,42	0,022	0,007	0,997
(E)-2-hexenal	0,71 - 16,73	0,087	0,006	0,999
(E)-2-octenal	0,16 - 16,17	0,337	0,006	0,997
(E)-2-nonenal	0,28 - 16,41	0,329	0,014	0,992
(E)-2-decenal	0,77 - 16,50	0,234	0,011	0,995

4.4. Estudio de los Blancos: Límite de Detección y Límite de Cuantificación

Para evaluar los límites inferiores de la linealidad de estos compuestos, se analizaron un total de 9 muestras de “blanco” (no contienen analitos), que poseen únicamente la matriz de vino sintético, el estándar interno ((E)-2-Undecenal), y el estándar interno para la SBSE (2,3,4-TCA). Estas muestras de “blanco” sufren ambos procesos de extracción como las muestras.

Los límites de detección fueron determinados por la presencia constante de señales del analito en los blancos. Se emplearon las Ecuaciones 4 y 5:

$$LD = 3s_{blancos} / \text{pendiente de la recta} \quad \text{Eq.4}$$

$$LQ = 10s_{blancos} / \text{pendiente de la recta} \quad \text{Eq.5}$$

Se obtuvieron los resultados presentes en la *Tabla 8*:

Tabla 8. Límites de detección y de cuantificación obtenidos						
Compuesto	Señal Media	S_{señal}	Pendiente	LD (µg/L)	LQ (µg/L)	Umbral Olfacción (µg/L)
(Z)-3-hexenal	0,0285	0,0154	0,0534	1,726	5,753	0,25
(E)-2-hexenal	0,0352	0,0243	0,1194	0,712	2,373	4,0
(E)-2-octenal	0,1277	0,0269	0,4199	0,162	0,540	3,0
(E)-2-nonenal	0,1218	0,0327	0,3553	0,277	0,922	0,6
(E)-2-decenal	0,1799	0,0627	0,2431	0,773	2,577	0,4

Los resultados obtenidos son satisfactorios para el (E)-2-hexenal, el (E)-2-octenal y el (E)-2-nonenal, porque sus límites de detección se encuentran por debajo de sus umbrales

de olfacción correspondientes. El umbral de olfacción es la concentración mínima a la que un compuesto puede ser detectado mediante el olfato. Sin embargo, para los compuestos (*Z*)-3-hexenal y (*E*)-2-decenal, sus límites de detección son mayores que sus umbrales de olfacción respectivamente, por lo que habría que buscar alguna solución.

Los blancos proporcionaron señales esperadas en principio, pues debido a sus propiedades odorantes, estos compuestos, están presentes en muchas otras matrices, como por ejemplo en la composición de ciertos productos de limpieza del hogar explicaría su origen. Por lo tanto, la simple exposición de los cartuchos de la SPE ya es una causa de contaminación, o incluso la apertura de los reactivos fuera de una ambiente aislado, ya causa su contaminación¹³. Se han intentado métodos de purificación de estos reactivos, pero no ha tenido el resultado esperado²⁵.

Comparando los resultados obtenidos para los límites de detección con un estudio previo¹³, en el que se obtuvieron con dos métodos de extracción diferentes (SPE y SPME) y con dos fuentes de ionización distintas (EI y NCI), podemos observar que, a excepción del (*E*)-2-octenal, nuestros límites de detección son mayores. Puede deberse principalmente al empleo de un método extra de extracción (SBSE), y por tanto existe mayor manipulación y se arrastran también los errores producidos por los blancos. La SBSE concentra tanto las oximas de los analitos en la muestra como las oximas de los analitos que se encuentran presentes en los blancos.

4.5. Estudio Efecto Matriz

Para el estudio del efecto matriz se evaluaron los valores obtenidos de las adiciones estándar de los diferentes vinos y de la calibración directa previamente realizada, en matriz de vino sintético. Estos resultados pueden verse en la *Tabla 9*. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para comprobar la posible existencia de efectos matriz. Con este test se verificó que, al 95% de confianza ($p > 0,05$), para ningún compuesto existen diferencias significativas entre las pendientes obtenidas en distintas matrices. No existen efectos matriz y se pueden usar las rectas de calibrado realizadas con anterioridad para la cuantificación de muestras.

Comparando con el mismo estudio¹³ que se ha usado para comparar los límites de detección, ahí sí se presenciaron efectos matriz al evaluaron cuatro vinos tintos y cuatro vinos blancos. En nuestro método, el efecto matriz se ve reducido al introducir un estándar interno de la misma familia química que los analitos, que no se encuentra presente en el vino, pero que sufre los mismos procesos de extracción (SPE y SBSE) e interacciones con la matriz al igual que los analitos, lo que permite independizar la señal de los analitos del volumen inyectado y reducir los efectos matriz.

Tabla 9. Estudio de los efectos matriz																				
Compuesto	Vino Sintético				Vino Blanco				Vino Crianza			Vino Rosado			Vino Joven			Resultados		
	Rango Lineal (µg/L)	Pendiente	s	r ²	Rango Lineal (µg/L)	Pendiente	s	r ²	Pendiente	s	r ²	Pendiente	s	r ²	Pendiente	s	r ²	p	Pendiente Media	DSR (%)
(Z)-3-hexenal	1,73-16,42	0,022	0,007	0,997	1,73-4,31	0,041	0,018	0,864	0,040	0,006	0,996	0,046	0,003	0,999	0,044	0,014	0,950	0,137	0,039	7
(E)-2-hexenal	0,71-16,73	0,087	0,006	0,999	0,71-4,39	0,169	0,046	0,995	0,112	0,014	0,999	0,100	0,045	0,996	0,129	0,028	0,991	0,074	0,119	25
(E)-2-octenal	0,16-16,17	0,337	0,006	0,997	0,16-4,25	0,517	0,176	0,993	0,381	0,003	1,000	0,398	0,111	0,994	0,467	0,006	1,000	0,212	0,420	15
(E)-2-nonenal	0,28-16,41	0,329	0,014	0,992	0,28-4,31	0,399	0,073	0,996	0,320	0,052	0,996	0,332	0,048	0,996	0,397	0,008	1,000	0,142	0,355	12
(E)-2-decenal	0,77-16,50	0,234	0,011	0,995	0,77-4,33	0,308	0,103	0,940	0,212	0,069	0,987	0,224	0,005	1,000	0,238	0,010	0,999	0,313	0,243	18

4.6. Estudio de la Precisión

Para el estudio de la precisión hay que evaluar dos parámetros²⁶: la repetibilidad y la reproducibilidad. La repetibilidad se estimó como la variabilidad dentro de un mismo lote y la reproducibilidad añade la variabilidad entre días.

La repetibilidad se estudió evaluando la señal obtenida en 9 determinaciones del Vino Tinto Joven, en grupos de 3 réplicas y en 3 días diferentes (variabilidad dentro de un mismo lote). Se evaluaron a dos concentraciones distintas. Se empleo la *Ecuación 6*:

$$DSR(\%)Repet: \sqrt{\frac{GL_1 \times DSR(\%)_1^2 + GL_2 \times DSR(\%)_2^2 + GL_3 \times DSR(\%)_3^2}{GL_1 + GL_2 + GL_3}} \quad \text{Eq.6}$$

La reproducibilidad se calculó teniendo en cuenta tanto la repetibilidad calculada anteriormente junto a la variabilidad entre días. Se usaron las *Ecuaciones 7-10*:

$$DSR(\%)Reprod: \sqrt{DSRRepet^2 + DSRentre\ días^2} \quad \text{Eq.7, donde:}$$

$$DSR \text{ entre días: } \sqrt{DSR_{mdm}^2 - \frac{DSR \text{ Repet}^2}{\frac{n_{total}}{\text{días totales}}}} \quad \text{Eq.8}$$

$$DSR \text{ } mdm: \frac{s_{mdm}}{\bar{x}_{mdm}} \times 100 \quad \text{Eq.9}$$

$$\bar{x}_{mdm} = \frac{\bar{x}_1 + \bar{x}_2 + \bar{x}_3}{3} \quad \text{Eq.10}$$

mdm: media de las medias

En un primer intento, se estudió con vinos en concentraciones P0 (sin concentración añadida), pero se obtuvieron concentraciones de los analitos inferiores a los límites de detección, y por tanto, no se pudo realizar el cálculo de la repetibilidad y reproducibilidad. Por esta razón, se optó por dopar el vino hasta P4 (*Anexo 4*), en concentraciones aproximadas a 4 µg/L.

Para la repetibilidad, se obtuvieron los resultados mostrados en las *Tablas 10-14*:

Tabla 10. Repetibilidad obtenida para (Z)-3-hexenal			
Muestra	Media	S_{señal}	DSR(%) Repetibilidad
V.Joven 1 ^{er} día P4	10,151	1,504	10
V.Joven 2 ^o día P4	7,381	0,629	
V.Joven 3 ^{er} día P4	8,912	0,253	

Tabla 11. Repetibilidad obtenida para (E)-2-hexenal			
Muestra	Media	S_{señal}	DSR(%) Repetibilidad
V.Joven 1 ^{er} día P4	7,220	1,021	10
V.Joven 2 ^o día P4	5,706	0,445	
V.Joven 3 ^{er} día P4	6,367	0,287	

Tabla 12. Repetibilidad obtenida para (E)-2-octenal			
Muestra	Media	S_{señal}	DSR(%) Repetibilidad
V.Joven 1 ^{er} día P4	6,905	1,249	18
V.Joven 2 ^o día P4	6,342	1,606	
V.Joven 3 ^{er} día P4	5,623	0,307	

Tabla 13. Repetibilidad obtenida para (E)-2-nonenal			
Muestra	Media	S_{señal}	DSR(%) Repetibilidad
V.Joven 1 ^{er} día P4	5,367	0,619	12
V.Joven 2 ^o día P4	4,948	0,729	
V.Joven 3 ^{er} día P4	4,719	0,481	

Tabla 14. Repetibilidad obtenida para (E)-2-decenal			
Muestra	Media	S_{señal}	DSR(%) Repetibilidad
V.Joven 1 ^{er} día P4	4,978	0,273	5
V.Joven 2 ^o día P4	4,559	0,221	
V.Joven 3 ^{er} día P4	4,906	0,223	

Para el estudio de la reproducibilidad, se obtuvieron los valores de la *Tabla 15*:

Tabla 15. Reproducibilidades obtenidas					
Compuestos	DSR(%) Repetibilidad	mdm	DSR(%) mdm	DSR(%) entre días	DSR(%) Reproducibilidad
(Z)-3-hexenal	10	8,815	16	15	18
(E)-2-hexenal	10	6,431	12	10	14
(E)-2-octenal	18	6,290	10		18
(E)-2-nonenal	12	5,011	7		12
(E)-2-decenal	5	4,814	5	4	5

Para el (E)-2-octenal y el (E)-2-nental, donde la variabilidad entre días no fue relevante, significa que la reproducibilidad y la repetibilidad tienen el mismo valor.

Los valores que se obtuvieron se consideran aceptables. Si comparamos con el estudio previamente nombrado¹³, estos resultados son más reproducibles que los obtenidos mediante el método SPME. Sin embargo, son resultados inferiores a los obtenidos empleando únicamente la SPE. Añadir una etapa más de extracción (SBSE) provoca mayor manipulación, y por tanto, mayor incertidumbre.

4.7. Muestras Reales

Se realizó la cuantificación de cuatro muestras de vino tinto real. Se procedió al cálculo de las concentraciones a través de la interpolación en las rectas de calibrado realizadas en matriz de vino sintético.

Las concentraciones obtenidas son las que están presentes en la *Tabla 16*:

Tabla 16. Concentraciones obtenidas para muestras reales								
Compuestos	Vino 1		Vino 2		Vino 3		Vino 4	
	Conc. (µg/L)	S _{conc} (µg/L)						
(Z)-3-hexenal	2,47*	0,59	1,84*	0,04	2,29*	0,57	1,74*	0,20
(E)-2-hexenal	<LD(0,71)	0,09	<LD(0,71)	0,01	<LD(0,71)	0,23	0,75*	0,11
(E)-2-octenal	0,74	0,05	0,56	0,03	0,96	0,19	0,45*	0,07
(E)-2-nonenal	0,72*	0,05	0,66*	0,09	1,03	0,22	0,56*	0,03
(E)-2-decenal	0,79*	0,11	<LD(0,77)	0,09	0,99*	0,40	0,79*	0,21

*significa que se encuentra por debajo del Límite de Cuantificación.

Estas muestras reales analizadas se tratan de unos vinos que han sido enviados por una bodega, donde opinan que tienen problemas con el verdor. Se ha podido observar que parte de estos compuestos se encuentran por debajo de los umbrales de olfacción (*Tabla 8*), y por lo tanto no tendrían relevancia sensorial. Por otra parte, muchas de estas concentraciones se encuentran en cantidades inferiores a las de los LQ (en algún caso, hasta por debajo de los LD), lo que sobre todo puede tener mayor relevancia para el (Z)-3-hexenal y (E)-2-decenal donde no se puede estimar su importancia sensorial puesto que el LQ está por encima del umbral de olfacción. Por lo tanto, no se puede confirmar que los posibles problemas de verdor de estos vinos depende de estos compuestos. Sería necesario el empleo de otro método, con una mayor sensibilidad, para que la determinación de estas concentraciones tan bajas (inferiores al µg/L) sea exitosa. Por ejemplo, una GC-O donde se combine la detección instrumental con una detección sensorial.

5. CONCLUSIONES

Se ha validado el método con el que poder evaluar posibles defectos de aroma de verdor o de oxidación en vinos debidos a la existencia de (Z)-3-hexenal, (E)-2-hexenal, (E)-2-octenal, (E)-2-nonenal y (E)-2-decenal.

Los resultados que se han obtenido no son perfectos pero sí son prometedores. Se trata de un método libre de efecto matriz, que por lo tanto, su calibración puede realizarse

en matriz sintética, donde la linealidad es satisfactoria ($r^2 > 0,992$). Además, posee una repetibilidad y una reproducibilidad adecuada (por lo general, inferior al 14%).

Sin embargo, en la cuantificación de muestras reales no se ha podido confirmar la relevancia de estos compuestos por dos motivos: los límites de detección por encima del umbral de olfacción para (*Z*)-3-hexenal y (*E*)-2-decenal y las bajas concentraciones encontradas para algunos analitos (inferiores al LQ). Por ello, surge la idea de que se podría mejorar la sensibilidad, para así poder tener datos más fiables de aquellas muestras que no hayan sufrido oxidación o no posean defectos aromáticos.

Para mejorar la sensibilidad, se plantea la opción de introducir una mayor cantidad de muestra en el sistema, por ejemplo, poniendo más cantidad de volumen de extracto en la extracción SBSE, si se consigue solucionar previamente los problemas de blancos. Otra idea para mejorar la sensibilidad sería secar los cartuchos de la SPE de manera que se encuentren protegidos del O₂ (bajo corriente de un gas inerte como el N₂), en lugar de secarse a vacío, pues como se ha comentado anteriormente, estos compuestos pueden oxidarse con facilidad. Surge la idea de añadir un cartucho extra a la SPE, usándolo como un filtro previo para las disoluciones de lavado.

Viendo que ha sido un método que ha dado resultados prometedores, sería adecuado ampliar este método a otras familias de compuestos carbonílicos que pueden ser interesantes, como son los alcadienales y las cetonas.

6. BIBLIOGRAFÍA

- (1) De-La-fuente-blanco, A.; Ferreira, V. Gas Chromatography Olfactometry (GC-O) for the (Semi)Quantitative Screening of Wine Aroma. *Foods* **2020**, *9* (12). <https://doi.org/10.3390/foods9121892>.
- (2) Gomez, E.; Martínez, A.; Laencina, J. Localization of Free and Bound Aromatic Compounds among Skin, Juice and Pulp Fractions of Some Grapes Varieties. **1994**.
- (3) Ferreira, V.; Bueno, M.; Franco-Luesma, E.; Culleré, L.; Fernández-Zurbano, P. Key Changes in Wine Aroma Active Compounds during Bottle Storage of Spanish Red Wines under Different Oxygen Levels. *J Agric Food Chem* **2014**, *62* (41), 10015–10027. <https://doi.org/10.1021/jf503089u>.
- (4) Marrufo-Curtido, A.; De-la-Fuente-Blanco, A.; Sáenz-Navajas, M. P.; Ferreira, V.; Bueno, M.; Escudero, A. Sensory Relevance of Strecker Aldehydes Inwines. Preliminary Studies of Its Removal with Different Type of Resins. *Foods* **2021**, *10* (8). <https://doi.org/10.3390/foods10081711>.
- (5) Mozzon, M.; Thorngate, J.; Mozzon, M.; Savini, S.; Boselli, E.; Thorngate, J. H. The Herbaceous Character of Wines. *Ital. J. Food Sci* **2016**, *28*, 190.

- (6) Arias, I.; Escudero, A.; Ferreira, V. Estudio Químico-Sensorial Del Verdor Aromático En Vinos Tintos. **2021**.
- (7) Wang, D.; Duan, C. Q.; Shi, Y.; Zhu, B. Q.; Javed, H. U.; Wang, J. Free and Glycosidically Bound Volatile Compounds in Sun-Dried Raisins Made from Different Fragrance Intensities Grape Varieties Using a Validated HS-SPME with GC–MS Method. *Food Chem* **2017**, *228*, 125–135. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2017.01.153>.
- (8) Fan, W.; Xu, Y.; Jiang, W.; Li, J. Identification and Quantification of Impact Aroma Compounds in 4 Nonfloral Vitis Vinifera Varieties Grapes. *J Food Sci* **2010**, *75* (1). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01436.x>.
- (9) Osório, V. M.; Cardeal, Z. L. Analytical Methods to Assess Carbonyl Compounds in Foods and Beverages. *J Braz Chem Soc* **2013**, *24* (11), 1711–1718. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20130236>.
- (10) Castejón-Musulén, O.; Manuel Aragón-Capone, A.; Ontañón, I.; Peña, C.; Ferreira, V.; Bueno, M. Accurate Quantitative Determination of the Total Amounts of Strecker Aldehydes Contained in Wine. Assessment of Their Presence in Table Wines. *Food Research International* **2022**, *162*. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112125>.
- (11) Ferreira, V.; Culleré, L.; Loscos, N.; Cacho, J. Critical Aspects of the Determination of Pentafluorobenzyl Derivatives of Aldehydes by Gas Chromatography with Electron-Capture or Mass Spectrometric Detection. Validation of an Optimized Strategy for the Determination of Oxygen-Related Odor-Active Aldehydes in Wine. *J Chromatogr A* **2006**, *1122* (1–2), 255–265. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.04.079>.
- (12) Zhang, X.; Kontoudakis, N.; Clark, A. C. Rapid Quantitation of 12 Volatile Aldehyde Compounds in Wine by LC-QQQ-MS: A Combined Measure of Free and Hydrogen-Sulfite-Bound Forms. *J Agric Food Chem* **2019**, *67* (12), 3502–3510. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b07021>.
- (13) Zapata, J.; Mateo-Vivaracho, L.; Cacho, J.; Ferreira, V. Comparison of Extraction Techniques and Mass Spectrometric Ionization Modes in the Analysis of Wine Volatile Carbonyls. *Anal Chim Acta* **2010**, *660* (1–2), 197–205. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.09.041>.
- (14) Schmarr, H. G.; Potouridis, T.; Ganß, S.; Sang, W.; Köpp, B.; Bokuz, U.; Fischer, U. Analysis of Carbonyl Compounds via Headspace Solid-Phase Microextraction with on-Fiber Derivatization and Gas Chromatographic-Ion Trap Tandem Mass Spectrometric Determination of Their O-(2,3,4,5,6-Pentafluorobenzyl)Oxime Derivatives. *Anal Chim Acta* **2008**, *617* (1–2), 119–131. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.02.002>.
- (15) Baltussen, E.; Sandra, P.; David, F.; Cramers, C. Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE), a Novel Extraction Technique for Aqueous Samples: Theory and Principles. *Journal of Microcolumn Separations* **1999**, *11* (10), 737–747.

- (16) Hayasaka, Y.; MacNamara, K.; Baldock, G. A.; Taylor, R. L.; Pollnitz, A. P. Application of Stir Bar Sorptive Extraction for Wine Analysis. *Anal Bioanal Chem* **2003**, *375* (7), 948–955. <https://doi.org/10.1007/s00216-003-1837-x>.
- (17) Zalacain, A.; Marín, J.; Alonso, G. L.; Salinas, M. R. Analysis of Wine Primary Aroma Compounds by Stir Bar Sorptive Extraction. *Talanta* **2007**, *71* (4), 1610–1615. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2006.07.051>.
- (18) Espada, L.; López, R. Desarrollo y Aplicación de Un Método de Análisis Para La Determinación de Aldehídos Volátiles En Vino. **2018**.
- (19) Lanzas, T.; Bueno, M.; Marsol, A. Adaptación de Un Método de Análisis Para La Determinación de Compuestos Carbonílicos Clave Del Aroma Del Vino Mediante Un Método de Desorción Térmica y GC-MS. **2021**.
- (20) Espejo, M.; Hernanz, M.; Herrador, M. Importancia de La Calibración En Los Laboratorios de Química Analítica. **2016**.
- (21) Culleré, L.; Bueno, M.; Cacho, J.; Ferreira, V. Selectivity and Efficiency of Different Reversed-Phase and Mixed-Mode Sorbents to Preconcentrate and Isolate Aroma Molecules. *J Chromatogr A* **2010**, *1217* (10), 1557–1566. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2010.01.002>.
- (22) Tissot, E.; Rochat, S.; Debonneville, C.; Chaintreau, A. Rapid GC-FID Quantification Technique without Authentic Samples Using Predicted Response Factors. *Flavour Fragr J* **2012**, *27* (4), 290–296. <https://doi.org/10.1002/ffj.3098>.
- (23) Bueno, M.; Zapata, J.; Ferreira, V. Simultaneous Determination of Free and Bonded Forms of Odor-Active Carbonyls in Wine Using a Headspace Solid Phase Microextraction Strategy. *J Chromatogr A* **2014**, *1369*, 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.10.004>.
- (24) Bueno, M.; Resconi, V. C.; Campo, M. M.; Cacho, J.; Ferreira, V.; Escudero, A. Effect of Freezing Method and Frozen Storage Duration on Odor-Active Compounds and Sensory Perception of Lamb. *Food Research International* **2013**, *54* (1), 772–780. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2013.08.003>.
- (25) Ferreira, V.; Culleré, L.; López, R.; Cacho, J. Determination of Important Odor-Active Aldehydes of Wine through Gas Chromatography–Mass Spectrometry of Their O-(2,3,4,5,6-Pentafluorobenzyl)Oximes Formed Directly in the Solid Phase Extraction Cartridge Used for Selective Isolation. *J Chromatogr A* **2004**, *1028* (2), 339–345. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2003.11.104>.
- (26) Ellison Secretary, U. S.; Bettencourt da Silva, R.; Poland Fodor, E. P.; Kaarls, R.; Germany Magnusson, E. B.; Robouch, I. P.; St Gallen, E.; van der Veen, S. A.; Walsh Eurachem IRE Wegscheider, M. W.; Yolci Omeroglu, P.; Representatives, E. *EURACHEM/CITAC Guide Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement Composition of the Working Group* EURACHEM Members A Williams Chairman A Brzyski R Kaus E Amico Di Meane M Rösslein A Fajgelj IAEA Vienna*; **2009**.

7. ANEXOS

Anexo 1: Concentraciones exactas de la mezcla realizada para obtener parámetros cualitativos.

MEZCLA	
Compuesto	Concentración Final (mg/L)
(Z)-3-hexenal	14,9
(E)-2-hexenal	14,9
(E)-2-octenal	15,1
(E)-2-nonenal	15,1
(E)-2-decenal	15,1
(E)-2-undecenal	15,0

Anexo 2: Concentraciones exactas de las disoluciones madres.

DISOLUCIONES MADRES	
Compuesto	Concentración (mg/L)
<i>(Z)</i> -3-hexenal	467
<i>(E)</i> -2-hexenal	747
<i>(E)</i> -2-octenal	722
<i>(E)</i> -2-nonenal	603
<i>(E)</i> -2-decenal	793
<i>(E)</i> -2-undecenal	1384

Anexo 3: Concentraciones exactas de las disoluciones intermedias.

DISOLUCIÓN INTERMEDIA	
Compuesto	Concentración (mg/L)
(Z)-3-hexenal	5,13
(E)-2-hexenal	5,22
(E)-2-octenal	5,05
(E)-2-nonenal	5,13
(E)-2-decenal	5,16
(E)-2-undecenal	5,13

DISOLUCIÓN DILUIDA	
Compuesto	Concentración (µg/L)
(Z)-3-hexenal	82,1
(E)-2-hexenal	83,6
(E)-2-octenal	80,8
(E)-2-nonenal	82,0
(E)-2-decenal	82,5
(E)-2-undecenal	82,1

DISOLUCIÓN (E)-2-UNDECENAL	
Compuesto	Concentración (mg/L)
(E)-2-Undecenal	3,46

Anexo 4: Concentraciones exactas utilizadas en la recta de calibrado y añadidas en los estudios de repetibilidad, reproducibilidad y efecto matriz.

Concentraciones en la recta de calibrado						
Compuesto	Concentración P0 (µg/L)	Concentración P1 (µg/L)	Concentración P2 (µg/L)	Concentración P3 (µg/L)	Concentración P4 (µg/L)	Concentración P5 (µg/L)
<i>(Z)</i> -3-hexenal	0	0,20	0,82	1,82	4,31	16,4
<i>(E)</i> -2-hexenal	0	0,20	0,84	1,86	4,39	16,7
<i>(E)</i> -2-octenal	0	0,19	0,81	1,79	4,24	16,2
<i>(E)</i> -2-nonenal	0	0,20	0,82	1,82	4,31	16,4
<i>(E)</i> -2-decenal	0	0,20	0,83	1,83	4,33	16,5
<i>(E)</i> -2-undecenal	17	17	17	17	17	17

Anexo 5: Purezas obtenidas para cada analito.

Compuesto	RFF_{teórico}	RFF_{exp}	Pureza
<i>(Z)</i> -3-hexenal	1,01	5,23	19%
<i>(E)</i> -2-hexenal	1,01	0,94	107%
<i>(E)</i> -2-octenal	0,92	1,05	87%
<i>(E)</i> -2-nonenal	0,90	1,08	83%
<i>(E)</i> -2-decenal	0,87	0,88	99%
<i>(E)</i> -2-undecenal	0,85	4,58	19%