

**PROTOCOLIZACIÓN DEL ANÁLISIS DE ALDEHÍDOS DE
OXIDACIÓN PRESENTES EN VINOS ESPAÑOLES Y SU
RELACIÓN CON DIVERSOS PARÁMETROS
COMPOSICIONALES Y DE ALMACENAMIENTO**



Director: Dr. Vicente Ferreira

Javier Herrero Martín

Resumen

Los aldehídos y cetonas son los grupos de moléculas con mayor diversidad sensorial en el vino. La degradación oxidativa asociada a estos compuestos conlleva una rápida pérdida de las cualidades aromáticas del vino y la formación de otros aromas que se asocian al vino deteriorado, por lo que se puede afirmar que la vida útil de un vino termina cuando el aroma de ciertos carbonilos predomina sobre el resto.

El análisis de estos compuestos presenta un desafío, ya que son moléculas muy volátiles y reactivas, capaces de formar fuertes interacciones con otras moléculas, entre las que destaca el SO₂. Por eso es importante determinar las concentraciones de los compuestos libres y ligados de forma simultánea utilizando surrogados, moléculas cuyo comportamiento es muy similar al de los analitos, mediante un método de HS-SPME-GC-MS. Para que las estimaciones sean correctas, se deben conocer de forma precisa las concentraciones de los surrogados.

Por ello se ha llevado a cabo el estudio de la estabilidad de los compuestos carbonílicos (analitos y surrogados) y estándares internos presentes en las disoluciones utilizadas en este método, ya que nos consta que pueden degradarse a pesar de todas las precauciones tomadas en su conservación y manejo. Para ello se preparó una disolución con los compuestos de interés y se siguió su evolución durante 75 días, con un total de 32 mediciones. A partir de los datos obtenidos se representó la concentración de los mismos en relación con la inicial para conocer la tendencia que seguían. Se realizó un estudio estadístico de los compuestos carbonílicos y se consiguió clasificarlos en grupos según su tiempo de estabilidad.

Con los datos que se obtuvieron se propone modificar las dos disoluciones de trabajo habituales y dividir cada una de ellas en cuatro grupos atendiendo a los distintos tiempos de estabilidad de los compuestos (1 semana, 2 semanas, 1 mes, 2 meses).

Abstract

Aldehydes and ketones are molecular groups with greatest sensory diversity in wine. Oxidative degradation associated with these compounds leads to a rapid loss of the aromatic qualities of the wine and the formation of other flavors that are associated with spoiled wine. It can be stated that the life of a wine ends when the aroma of certain carbonyls predominates over the rest.

The analysis of these compounds presents a challenge, as they are very volatile and reactive, capable of forming strong interactions with other molecules, among which stands out SO₂. Because of that, the determination of both free and bound forms of these compounds is crucial. This is achieved by using surrogate molecules, whose behavior is very similar to the analytes, and by analysis using a HS-SPME-GC-MS method. In order to ensure that the estimations are right the concentrations of the surrogates should be known accurately.

As analytes, internal standards and surrogates can be degraded despite of the use of thorough preservation and manipulation measures, the shelf-life of working solutions with those families of compounds should be assessed.

Consequently a solution with the compounds of interest was prepared and stored and used following thorough standard procedures along 75 days. The stability of the compounds in the solution was assessed by its analytical control, with a total of 32 measurements evenly distributed along the 75 days. Different plots of absolute or relative areas versus time were made and different statistical techniques were applied in order to assess the degradation rate of the different compounds. Compounds could be satisfactorily classified into four different groups of similar stabilities.

The practical outcome of this work is the proposal of splitting mother solutions into the 4 different groups of stability (1 week, 2 weeks, 1 month, 2 months), minimizing experimental effort and preserving the method quality.

CONTENIDO	PÁGINAS
➤ INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	4
➤ MATERIALES Y MÉTODOS.....	5
• Reactivos y estándares.....	5
• Disoluciones.....	6
• Método de análisis de las muestras-.....	7
• Calibración.....	10
• Estudio de la estabilidad y determinación del tiempo de almacenaje.....	10
➤ RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	12
• Análisis de muestras sintéticas.....	12
• Preparación de las disoluciones.....	13
• Disolución de Grob.....	14
• Estabilidad de analitos y surrogados.....	15
➤ CONCLUSIONES.....	22
➤ AGRADECIMIENTOS.....	22
➤ REFERENCIAS.....	23
➤ ANEXOS.....	25

1.- Introducción y objetivos

El vino es una matriz aromática extremadamente compleja que contiene gran cantidad de moléculas odorantes pertenecientes a distintas familias químicas, como alcoholes, ésteres, aldehídos, terpenos, fenoles o cetonas. Los aldehídos y las cetonas no representan el mayor número de moléculas, ni siquiera las de aroma más intenso, pero sin duda son el conjunto de moléculas más diverso desde el punto de vista sensorial en el vino, jugando un papel relevante en la calidad del mismo. Podemos encontrar aromas descritos muy diferentes, desde cítricos, chucherías, miel [1], vainilla y mantequilla a patata cocida [2], rancio, pepino, manzana pasada [3], cartón y serrín [4,5].

Los cambios en las propiedades aromáticas ligadas a los procesos de oxidación están muchas veces relacionados con la formación de compuestos carbonílicos [6,7]. La formación de algunos de estos compuestos se debe a la oxidación directa de alcoholes [8-10], la degradación de Strecker a partir de sus respectivos aminoácidos [11] o de compuestos dicarbonílicos (como es el caso del diacetilo, gioxal y la 2,3-pantanodiona presentes en el vino) o por último como derivados de los α -cetoácidos [12]. De entre los aldehídos estudiados, hay dos que destacan como indicadores de oxidación en el vino: el metional y el fenilacetaldehído [1, 8, 13-15]. La degradación oxidativa asociada a estos aldehídos conlleva una rápida pérdida de las cualidades aromáticas, principalmente los aromas frutales y florales, y la formación de otros aromas, como verdura cocida y miel respectivamente, que se asocian al vino mal envejecido o al deterioro del mismo [2]. Y, por lo tanto, se puede afirmar que la vida útil de un vino termina cuando el aroma de ciertos carbonilos se percibe de manera predominante sobre el resto.

Estos compuestos presentan un desafío a la hora de realizar su análisis porque son altamente volátiles y reactivos. Por todo ello, para su análisis es necesaria una etapa de derivatización previa con o-(2,3,4,5,6-pentafluorobencil)hidroxilamina (PFBHA) para convertirlos en moléculas de peso molecular superior y menos polares, que posteriormente se separan y se detectan por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas con fuente de ionización química negativa (GC-NCI-MS). Esta etapa de derivatización puede llevarse a cabo en un cartucho de extracción en fase sólida SPE [16] o directamente sobre una fibra de microextracción en fase sólida (SPME) [17].

La microextracción en fase sólida es un método de extracción que consiste en exponer una superficie recubierta por una pequeña cantidad de material sorbente a una matriz de interés (ya sea directamente la fase líquida o el espacio de cabeza), de donde se extraen los analitos. Los compuestos extraídos se adsorben hasta alcanzar el equilibrio entre la muestra y el recubrimiento, y posteriormente se transfieren al instrumento de análisis. El dispositivo de extracción se compone de un “holder” o portafibras y una fibra de SPME. Cuando lo que interesa son los analitos volátiles de la muestra, el modo de extracción que se va a utilizar es el de espacio de cabeza. En este modo, la fibra se pone en contacto con la fase gaseosa en equilibrio con la disolución contenida en el vial, evitando así los posibles problemas que pueda causar la parte no volátil durante la determinación. Además la SPME tiene ciertas ventajas sobre la SPE: principalmente la concentración de los analitos es mayor, se puede automatizar

el proceso y además el ahorro en disolventes, beneficio tanto a nivel ecológico como económico.

Pero como ya se ha dicho anteriormente, estos compuestos carbonílicos son moléculas extremadamente reactivas y se ha demostrado que forman interacciones muy fuertes con otras moléculas [18], especialmente con el SO₂ [19], lo que puede afectar a su distribución real en el espacio de cabeza. Los compuestos carbonílicos en el vino pueden encontrarse en forma libre, responsables del aroma, o asociados formando complejos no volátiles, principalmente con SO₂, y por tanto inodoros. Estos complejos actúan como una reserva de carbonilos, desplazándose el equilibrio hacia la forma libre conforme el SO₂ desaparece por oxidación [20]. Debido a esta asociación, se debe diferenciar entre concentración libre y total de los analitos. Para la determinación simultánea de los carbonilos libres y acomplejados se ha desarrollado un método [21] libre de efectos matriz, basado en la microextracción en fase sólida del espacio de cabeza y su análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas con fuente de impacto electrónico (HS-SPME-GC-EI-MS) que utiliza estándares inertes al SO₂ y surrogados que se comportan de forma similar a los analitos. La segunda gran ventaja de esta metodología frente a las anteriores es que se evita la derivatización de estos compuestos, ahorrando tiempo y alargando la vida útil de las fibras. Además, estos surrogados carbonílicos, moléculas muy similares químicamente a los analitos, son también extremadamente reactivos. Debido a que los surrogados han de ser añadidos al vino, el estudio de la estabilidad de esta disolución que se usa en el método se consideró de suma importancia, ya que son muchas las decisiones que se toman en base a la respuesta de estos compuestos. Por otra parte, el poder proporcionar datos sobre la estabilidad de los analitos en disolución sintética a lo largo del tiempo es imprescindible para conocer cuándo y cómo calibrar y así poder cuantificar de forma correcta.

El objetivo general de este trabajo es desarrollar las cualidades propias de un investigador mediante la formación en el método científico, el aprendizaje en la utilización de recursos de búsqueda de información científica, la especialización en el uso de una técnica cromatográfica, el tratamiento de los datos obtenidos y el reflejo de todo lo aprendido mediante la escritura de la presente memoria. El objetivo específico es familiarizarse con un método de análisis de carbonilos, preparación de muestras, integración de los resultados, el estudio de la evolución de la disolución sintética de ciertos carbonilos y la determinación del tiempo que puede estar almacenada dicha disolución. Y así de este modo se podrá diseñar un control de calidad del método estudiado.

2.- Material y métodos

2.1 Reactivos y estándares

El etanol utilizado se compró a Merk (Darmstadt, Alemania), el ácido tartárico al 99%, glicerol 99,5%, 1,2-propanodiol 99,5% y el metabisulfito de sodio al 97% a Panreac (Barcelona, España). Scharlau (Barcelona, España) suministró el hidróxido de sodio al 99% y Aldrich (Madrid, España) el glicoxal al 40% en agua. El agua se purificó en un sistema Milli-Q de Millipore (Bedford, Alemania).

Los estándares usados para la cuantificación analítica, surrogados y patrones internos se obtuvieron de Aldrich, Fluka (Madrid, España), ChemService (West Chester, PA, USA) y Firmenich (Suiza). Los estándares químicos son: 2-metilpropanal (isobutiraldehído) 99%, 2-metilbutanal 95%, 3-metilbutanal (isovaleraldehído) 97%, fenilacetaldehído >90%, 3-(metiltio)propanal (metional) ≥ 97%, decanal 95%, 2,3-pantanodiona 97%, acetovanillona 98%, β-ionona ≥97%, 2,3-butanodiona (diacetilo) 99%, benzaldehído 99%, 5-metilfurfural 97%, furfural 99%, y β-damasconona >93%. Los surrogados son: 2-metilpentanal 98%, hidrocinamaldehído ≥95%, β-damascona ≥90%, 3,5,5-trimetilhexanal ≥95%, 3-(metiltio)butiraldehído ≥96%, 4,5-dimetilfurfural 97%, 3-octanona ≥98%. Los patrones internos son: 4-metilpentan-2-ol 99%, 2-metilbutirato de metilo ≥98% y 2,6-dicloroanisol >97%.

2.2 Disoluciones

2.2.1 Vino sintético

El vino sintético se preparó de la siguiente forma: 11% etanol, 5 g/L de ácido tartárico, 10 g/L de glicerina, 1,5% propanodiol y el resto agua destilada. El pH de la disolución se ajustó a 3,5 con hidróxido de sodio 1M.

2.2.2 Disolución de los patrones

Se prepararon disoluciones individuales de entre 3 a 20 g/L en etanol tanto de cada uno de los estándares internos, como de los surrogados, como de cada uno de los analitos. Algunos de los compuestos estaban demasiado concentrados para trabajar con ellos de forma cómoda, por lo que se realizó una primera dilución a 100 mg/L en etanol para el decanal, 2,3-pantanodiona y β-ionona y de 400 mg/L para la β-damasconona de forma individual.

2.2.3 Disoluciones para la calibración

Se realizaron diluciones conjuntamente de ciertos analitos en etanol. Las diluciones “A” estaban más concentradas (de 500 µg/L a 1000 mg/L) y las “B” menos concentradas (de 50 µg/L a 500 mg/L). Los analitos se agruparon de la siguiente manera:

- Grupo 1: decanal, 2,3-pantanodiona
- Grupo 2: β-ionona, β-damasconona, metional, benzaldehído
- Grupo 3: diacetilo
- Grupo 4: fenilacetaldehído, isobutiraldehído, 2-metilbutanal, 5-metilfurfural furfural
- Grupo 5: acetovanillona

2.2.4 Disoluciones de trabajo

Además fue necesaria la preparación de una disolución en etanol de todos los analitos de forma conjunta, de tal manera que cada uno de ellos presentara una concentración intermedia de los rangos encontrados normalmente en los vinos [9]. Del mismo modo se realizó una disolución conjunta en etanol de todos los surrogados y estándares internos, a la

que se denominó disolución SIS (Surrogates and Internal Standards), que contenía 500 mg/L de 4-metilpentan-2-ol, 5 mg/L de β -damascona y 3,5,5-trimetilhexanal y 50 mg/L del resto.

En la *Figura 1* se muestra un esquema-resumen de las disoluciones preparadas en este trabajo.

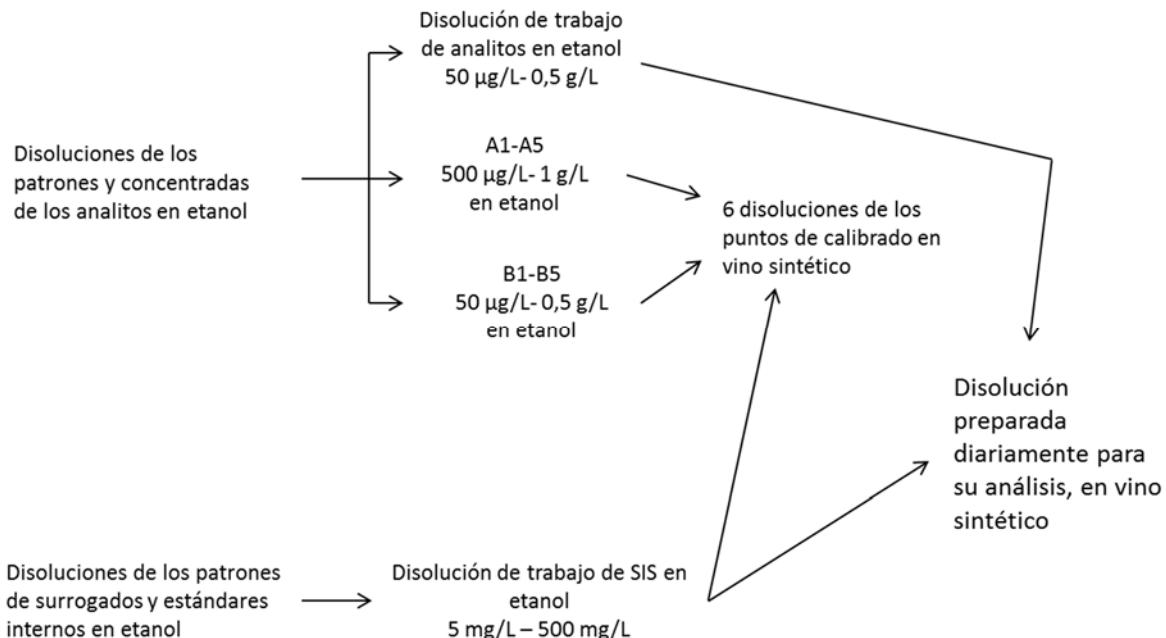


Figura 1: Esquema de las disoluciones preparadas

2.3 Método de análisis de las muestras

2.3.1 Preparación de la muestra

El primer paso es la adición de 100 μ L de la disolución SIS a un matraz que se enrasa con vino a un volumen final de 25 mL. La apertura de las botellas de vino y la adición se lleva a cabo en una cámara de Argón de Jacomex (Dagneux, Francia) con niveles de oxígeno por debajo de 0,002%, para evitar la oxidación de los analitos y del SO₂. Las muestras se dejan reposar en la cámara durante 8 horas, tiempo que se ha comprobado es suficiente para que se establezcan los equilibrios de los surrogados con el SO₂. Así, conociendo perfectamente la cantidad añadida de los éstos, se puede estimar el grado de acomplejamiento de cada uno de sus analitos análogos tras el análisis cromatográfico de los surrogados.

2.3.2 HS-SPME

Tras este período de estabilización en la cámara se trasvasan 10 mL de muestra a un vial de 20 mL de SPME y se sella. Los viales se sacan de la cámara, se llevan al cromatógrafo y se dejan el en carro de muestras. Se incuban a 45 °C durante 10 minutos antes de proceder a la extracción sin agitación del espacio de cabeza durante otros 10 min a 45 °C. La extracción se realiza con una fibra de SPME de polimetilsiloxano/divinilbenceno (PMDS/DVB) de 65 μ m de espesor proporcionadas por Supelco-Spain (Madrid, España). La automatización del

procedimiento de extracción se consiguió utilizando un automuestreador CTC CombiPal (Zwigen, Suiza) que se programó con el software de edición de macros CycleComposer equipado con un carro de muestras y carro de incubación de temperatura controlada.

2.3.3 GC-EI-MS

El análisis se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases Shimadzu QP-2010 Plus equipado con un sistema de detección mediante espectroscopía de masas con un cuadrupolo. La fibra se desorbió directamente en el inyector del GC-MS en modo splitless durante 2,5 min a 250°C. El gas portador fue helio a una velocidad lineal constante de 40 cm/s (\approx 1,23 mL/min). La separación se realizó en una columna capilar SPB-1 Sulfur (Supelco) 30 m x 0,32 mm d.i., con un espesor de fase de 4 μ m. La temperatura inicial del horno fue 40 °C durante 3 min, después se incrementó 10 °C/min hasta los 280 °C y finalmente se mantuvo esa temperatura durante 10 min. La temperatura de la fuente de iones fue de 220 °C y la interfase se mantuvo a 280 °C. Se trabajó con la fuente de impacto electrónico (EI) y con el analizador de masas operando en modo SIM (single ion monitoring). Los iones seleccionados para la caracterización y cuantificación de cada analito se muestran en la *Tabla 1*. El software utilizado para la integración de los cromatogramas fue el Lab Solutions de GCMS Solution Version 2.30 (Shimadzu Corporation). Además, en el *Anexo 1* se muestran las fórmulas y los espectros de masas de todos los compuestos.

2.3.4 Preparación del instrumento

Antes de comenzar hubo que asegurarse de que la configuración del equipo era la descrita anteriormente. Para ello, con el equipo totalmente apagado, se cambió la fuente de ionización a una de EI. Posteriormente se seleccionó el inyector de split/splitless y se instaló un “liner” de inyección líquida. Se instaló la columna al inyector para su purga y acondicionamiento. Una vez hecho esto, se conectó la columna al espectrómetro de masas y se comprobó la existencia de fugas. Cuando se alcanzó un vacío suficiente en el detector, se realizó el “tunning” de éste. En ese momento se comprobó el sistema con el test de Grob y finalmente se cambió a un “liner” de SPME.

2.3.5 Análisis de muestras sintéticas

Como se ha comentado previamente, el método no presenta efecto matriz, por lo que para el estudio de la estabilidad de las disoluciones se trabajó con muestras sintéticas, es decir, en vino sintético. Como en las muestras sintéticas no se añade SO₂, no fue necesario el uso de la cámara libre de O₂ para la adición de la disolución de SIS, ni esperar para que se alcanzara el equilibrio de los surrogados con el SO₂. Por lo demás, el método de análisis es el mismo que para las muestras de vino real.

Tabla 1: Relaciones masa/carga (m/z) seleccionadas para la determinación de los compuestos

Compuestos	<i>m/z</i>
<i>Analitos</i>	
decanal	70 ^a , 82
2,3-pantanodiona	100 ^a
β-inona	177 ^a
β-damascenona	190 ^a , 121
metional	48 ^a , 76, 104
benzaldehído	105 ^a , 106
diacetilo	86 ^a
fenilacetaldehído	91 ^a , 120
isobutiraldehído	72a
2-metilbutanal	58 ^a
isovaleraldehído	58 ^a
furfural	95 ^a , 96
5-metilfurfural	109, 110 ^a
acetovanillona	151, 166 ^a
<i>Surrogados</i>	
2-metilpentanal	58 ^a
3,5,5-trimetilhexanal	109 ^a
3-octanona	99, 128 ^a
4,5-dimetilfurfural	124 ^a
β-damascona	177 ^a
hidrocinamaldehído	91, 105, 134 ^a
3-(metiltio)butiraldehído	90 ^a
<i>Patrones internos</i>	
2-metilbutirato de metilo	88 ^a
2,6-dicloroanisol	176 ^a
4-metilpentan-2-ol	69 ^a , 87

^a m/z utilizada en la cuantificación

2.4 Calibración

Se utilizaron distintos volúmenes de las disoluciones A₁-A₅ y B₁-B₅ de tal forma que se obtuvieran en los diferentes puntos de calibración las concentraciones de los analitos, en µg/L, que se muestra en la *Tabla 2*. En cada uno de los puntos se añadió una cantidad fija de 200 µL de la disolución SIS (cuyas concentraciones finales en los puntos de calibración se muestran en la *Tabla 4*) y se enrasó a 50 mL con vino sintético.

Tabla 2: Concentraciones de los analitos en cada punto de calibración

Concentración (µg/L)	punto 0	punto 1	punto 2	punto 3	punto 4	punto 5
decanal	0	7,87	2,62	0,88	0,31	0,10
2,3-pantanodiona	0	7,68	2,56	0,86	0,31	0,10
β-ionona	0	5,46	1,40	0,35	0,09	0,02
β-damascenona	0	25,3	6,47	1,62	0,40	0,10
metional	0	117	29,9	7,48	1,87	0,47
benzaldehído	0	127	32,5	8,14	2,03	0,51
diacetilo	0	5675	2533	1013	456	203
fenilacetaldehído	0	1,00	4,01	16,1	64,2	251
isobutiraldehído	0	0,98	3,92	15,7	62,7	245
2-metilbutanal	0	0,96	3,84	15,4	61,5	240
isovaleraldehído	0	1,03	4,11	16,4	65,7	257
furfural	0	1,01	4,03	16,1	64,5	252
5-metilfurfural	0	1,02	4,08	16,3	65,4	255
acetovanillona	0	29,8	59,7	119	239	477

2.5 Estudio de la estabilidad y determinación del tiempo de almacenaje

Diariamente se preparó una disolución que contenía los analitos, los surrogados y los estándares internos y que se empleó como control, tomando una medición antes de las medidas de las muestras de vino real. Como se muestra en la *Figura 1*, se preparó añadiendo 125 µL de la disolución de trabajo de los analitos descrita anteriormente y 100 µL de la disolución de SIS, enrasando a 25 mL con vino sintético. Con esta disolución se siguió el protocolo descrito en el apartado 2.3.5. Las concentraciones finales de los compuestos de esta disolución vienen dadas en las *Tablas 3* y *4*. Excel 2013 (Microsoft) fue utilizado como herramienta estadística para trabajar con los datos obtenidos a partir de esta disolución.

Tabla 3: Concentraciones de los analitos en la disolución usada para el estudio de la estabilidad

Analitos	Concentración ($\mu\text{g/L}$)
decanal	0,75
2,3-pentanodiona	6,19
β -ionona	0,76
β -damascenona	4,42
metional	30,8
benzaldehido	35,8
fenilacetaldehido	49,6
isobutiraldehido	33,9
2-metilbutanal	42,2
isovaleraldehido	40,4
furfural	51,0
5-metilfurfural	41,4
acetovanillona	172
diacetilo	2044

Tabla 4: Concentraciones de los surrogados y estándares internos en la disolución usada para el estudio de la estabilidad y también en las disoluciones de calibración

SIS	Concentración ($\mu\text{g/L}$)
2-metilpentanal	194
3,5,5-trimetilhexanal	16,3
3-octanona	256
4,5-dimetilfurfural	183
β -damascona	20,3
hidrocinamaldehido	246
3-(metiltio)butiraldehido	205
2-metilbutirato de metilo	189
2,6-dicloroanisol	192
4-metilpentan-2-ol	2056

3.- Resultados y discusión

3.1 Análisis de muestras sintéticas

El método ha sido diseñado de forma que se pudiera determinar la cantidad de carbonilo libre y estimar su cantidad acomplejada, ya que durante el proceso de oxidación pueden ser liberados o formados a partir de sus precursores. Por eso tanto las temperaturas como los tiempos de incubación y extracción se eligieron de tal forma que se obtuviera buena sensibilidad y reproducibilidad evitando desplazamiento del equilibrio.

La detección de los compuestos se realizó en modo SIM y además con la ayuda de ventanas teniendo en cuenta los tiempos de retención de los analitos. De este modo, el espectrómetro de masas puede trabajar con pocas relaciones masa/carga (m/z) cada vez, aumentando así el tiempo de adquisición en cada m/z y por tanto la sensibilidad de la medida. En la *Figura 2* se muestra un ejemplo de los picos de los analitos obtenidos en una de las ventanas de trabajo para la muestra control. Las masas de trabajo seleccionadas para cada compuesto aparecen en la *Tabla 1* y sus concentraciones en las *Tablas 3* y *4*.

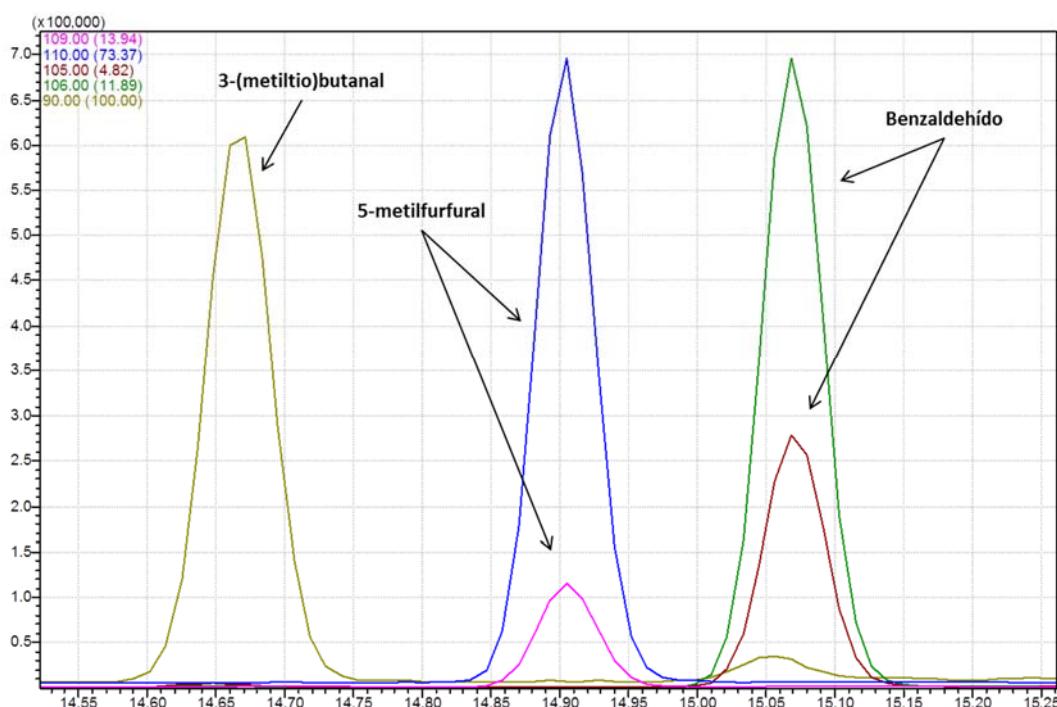


Figura 2: Picos de analitos y surrogados obtenidos en una ventana de trabajo

3.2 Preparación de las disoluciones

Para la preparación de los puntos de calibración, se debe simular el sistema químico del vino, por lo que se preparó un vino sintético que emula las condiciones de éste, permitiendo que el comportamiento de los analitos, surrogados, y el patrón interno sean lo más parecido posible al que tendrían en una muestra real. Este vino sintético presenta un pH, densidad, y contenido en los componentes de mayor concentración (etanol y 1,2-propanodiol) dentro de lo normal en un vino.

A partir de los patrones puros se preparó por doble pesada las disoluciones madre, que sirvieron de punto de partida para las disoluciones que se utilizaron. Con este método de preparación, no es necesario utilizar matraces aforados para conseguir concentraciones exactas, sino que se usan las masas añadidas y la densidades del disolvente para calcular la concentración en la disolución de cada una de las sustancias. La fórmula utilizada para el cálculo fue la presentada en la *Ecuación 1*, dando la concentración en mg/L.

Ecuación 1:

$$\text{Concentración madre} = \frac{mg \text{ compuesto}}{g \text{ disolución}} \times \text{densidad disolvente} \left(\frac{g}{mL} \right) \times 1000 \frac{mL}{L}$$

Algunas de estas disoluciones fueron demasiado concentradas para poder trabajar con comodidad dentro de los rangos de trabajo, por lo que se realizó una primera dilución de estas también por doble pesada, siendo esta vez el cálculo utilizado el mostrado en la *Ecuación 2*.

Ecuación 2:

$$\text{Conc. dilución} = \frac{\frac{g \text{ disolución madre}}{\text{densidad disolvente madre} \left(\frac{g}{mL} \right)} \times \text{Conc. madre} \left(\frac{mg}{L} \right)}{g \text{ disolución diluida}} \times \text{densidad disolvente diluida} \left(\frac{g}{mL} \right)$$

Estas disoluciones se guardaron en el congelador para evitar cualquier alteración que pudieran sufrir, ya que como disoluciones madre se utilizaron para preparar las disoluciones de calibrado y de control.

Como el rango lineal de los analitos cubría más de dos órdenes de magnitud, se prepararon disoluciones a dos niveles de concentración: A y B. Dentro de cada grupo, se agruparon analitos que tienen rangos de concentración similares en el vino para facilitar su preparación.

Para conseguir las concentraciones deseadas en los puntos de calibración hubo que añadir distintos volúmenes de las disoluciones A₁-A₅ y B₁-B₅ y además un volumen fijo de la disolución de SIS a todas ellas. También fue necesario añadir a cada una de las disoluciones de calibrado una cantidad diferente de etanol para conseguir que en todas ellas la concentración de éste fuera la misma y que así la matriz fuese constante en cada determinación. Además la preparación de las disoluciones de calibración hubo que realizarla de forma rápida, ya que este paso es crítico debido a la posible contaminación entre las disoluciones al tratarse de volátiles de muy baja concentración (del orden de los µg/L). Por otra parte, a la hora de diseñar los puntos de calibración, se tuvo en cuenta que la concentración de unos analitos fuese creciente y de otros decreciente (*Tabla 2*), para evitar efectos de masa o saturación de la fibra de SPME.

3.3 Disolución de Grob

La disolución de Grob es el test más conocido y utilizado para evaluar la calidad o idoneidad de la columna y de su cromatografía, que fue propuesto por los Grob [22,23]. Su objetivo es monitorizar la eficiencia de la columna y diagnosticar posibles problemas de adsorción y/o de carácter ácido/base. Esta disolución contiene compuestos de muy variada naturaleza que son capaces de interaccionar de maneras muy diferentes con las fases estacionarias. El cromatograma de la disolución de Grob obtenido se muestra en la *Figura 3*. Se inyectó 1 μ L en split 1/20 con el inyector a 250 °C. El gas portador (He) se fijó a una velocidad lineal de 40 cm/s. La temperatura inicial del horno era 40 °C, que trascurridos 3 minutos se aumentó a razón de 15 °C/min hasta una temperatura de 100 °C, y después a 8 °C/min hasta los 230 °C, que ya se mantuvieron durante 10 minutos.

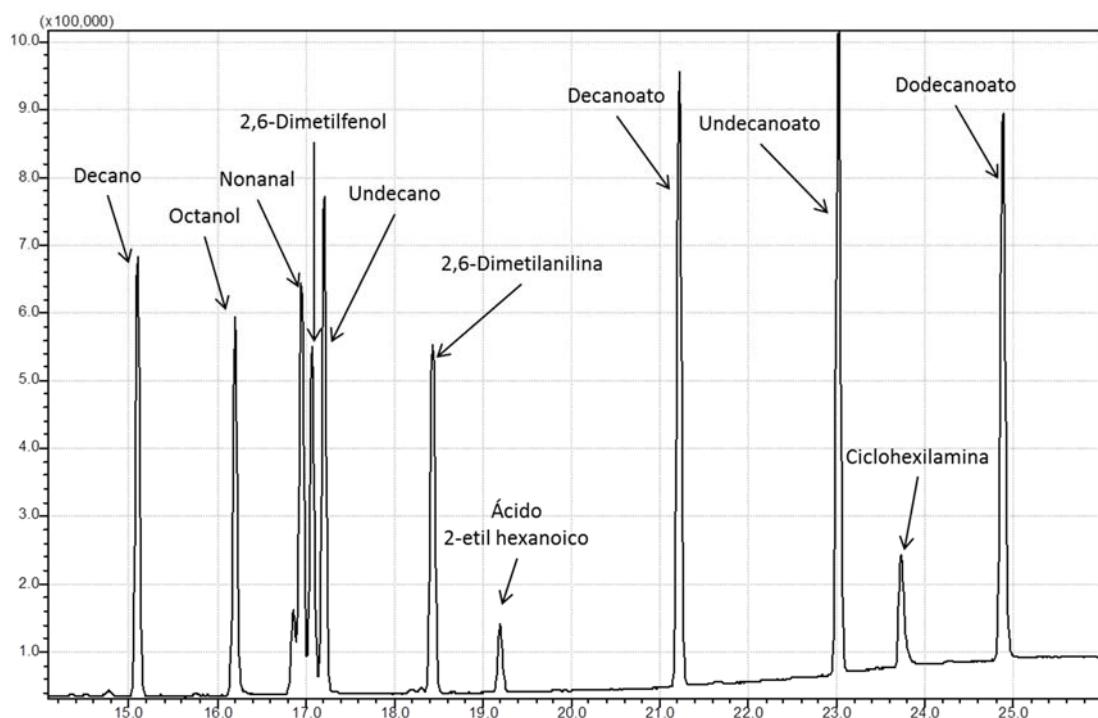


Figura 3: Cromatograma de la disolución de Grob obtenido

En primer lugar el perfil cromatográfico obtenido contiene todos los compuestos presentes en la muestra. Se puede apreciar que la columna no había desarrollado actividad ácida, ya que el pico de la ciclohexilamina no presentaba cola y el pico del ácido 2-etilhexanoico no había desaparecido. Además no se presentaron problemas de adsorción ya que no había picos anchos o con cola y los tiempos de retención se adecuaron a lo esperado.

3.4 Estabilidad de analitos y surrogados

Primero se llevó a cabo la integración de todos los cromatogramas obtenidos durante un periodo de 75 días. Las áreas integradas de los cromatogramas se normalizaron utilizando el patrón interno, 2-metilbutanoato de metilo, patrón que se usa para evitar efectos racha. Las áreas relativas se transformaron en concentración interpolando en las rectas de calibrado construidas para cada analito. Como para todos los analitos se calibró más de un orden de magnitud, se utilizaron rectas de calibración ponderadas. Este tipo de calibración otorga mayor influencia sobre la recta obtenida a los puntos de menor concentración, y por tanto, menor incertidumbre. Por este motivo las concentraciones buscadas en los puntos de calibración no son equidistantes (1, 60, 120, 180, 240 $\mu\text{g/L}$) sino que son múltiplos de distintos números según el rango que se quiera cubrir (1, 4, 16, 64, 256 $\mu\text{g/L}$). En el *Anexo 2* se muestran dos ejemplos de las rectas de calibración realizadas (benzaldehído y metional). Se han tomado como ejemplo porque para el benzaldehído no habría habido diferencias entre haber calibrado con una recta estándar o con la ponderada, mientras que para el metional si se hubiera calibrado normalmente se habría cometido un error en la interpolación. Los surrogados y estándares internos tenían siempre la misma concentración en todos los puntos de las rectas de calibración. Por lo tanto para saber la concentración de estos compuestos en las muestras con el paso del tiempo se dividió el área relativa obtenida entre un factor de respuesta (*Ecuación 3*) que se calculó teniendo en cuenta las concentraciones de la *Tabla 4*.

$$\text{Ecuación 3:} \quad \text{Factor de respuesta} = \frac{\text{señal}}{\text{concentración (Tabla 4)}}$$

Con las concentraciones se realizaron gráficos para cada compuesto con el objetivo de poder observar la tendencia que seguían sus comportamientos. En el gráfico se representó el porcentaje del compuesto detectado en el eje de ordenadas frente tiempo transcurrido expresado en días, desde la preparación de las disoluciones de trabajo conjuntas de analitos y SIS. Se tomó como referencia la concentración medida el primer día, siendo esta la considerada el 100%.

Se observó que existían compuestos cuya concentración se mantenía constante teniendo en cuenta la desviación propia del método de SPME. Como se puede observar en la *Figura 4*, a pesar de la desviación existente en los valores, la tendencia es a permanecer alrededor de la concentración inicial, lo cual indica que estos compuestos no se ven afectados por el tiempo que lleva preparada la disolución. Además del benzaldehído siguen el mismo comportamiento el 2-metilbutanal, 2-metilpentanal, furfural, 5-metilfurfural, diacetilo, 2,3-pantanodiona y 3-octanona.

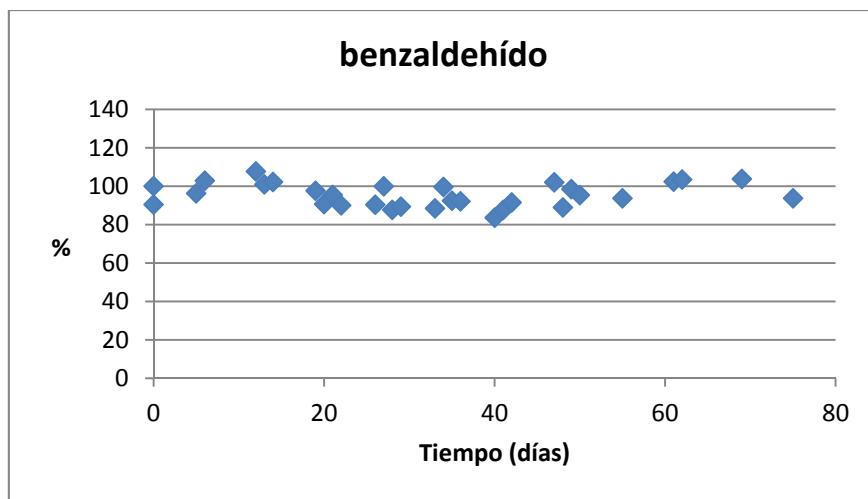


Figura 4: Gráfica del porcentaje de concentración obtenido respecto a la concentración inicial de benzaldehído frente al tiempo

Por otra parte, bastantes compuestos veían reducida su concentración en mayor o menor medida con el paso del tiempo, como se esperaba, teniendo en cuenta la volatilidad y reactividad que caracteriza a estos compuestos carbonílicos. La *Figura 5* muestra uno de los ejemplos de este grupo, el metional, el compuesto que presentó la disminución de la concentración más acusada. También en la *Figura 6* se observan los cromatogramas obtenidos del metional de tres días no consecutivos y se aprecia claramente esta disminución en al área del pico cromatográfico. Otros compuestos que evolucionaron de este modo fueron el 3-(metiltio)butiraldehído, 4,5-dimetilfurfural, fenilacetaldehído, hidrocinamaldehído, decanal, β -damascona, β -damascenona y 2,6-dicloroanisol. Viéndose claramente que la concentración de este grupo de compuestos disminuye, la siguiente pregunta que se tuvo que contestar fue a partir de cuándo esta disminución era significativamente relevante.

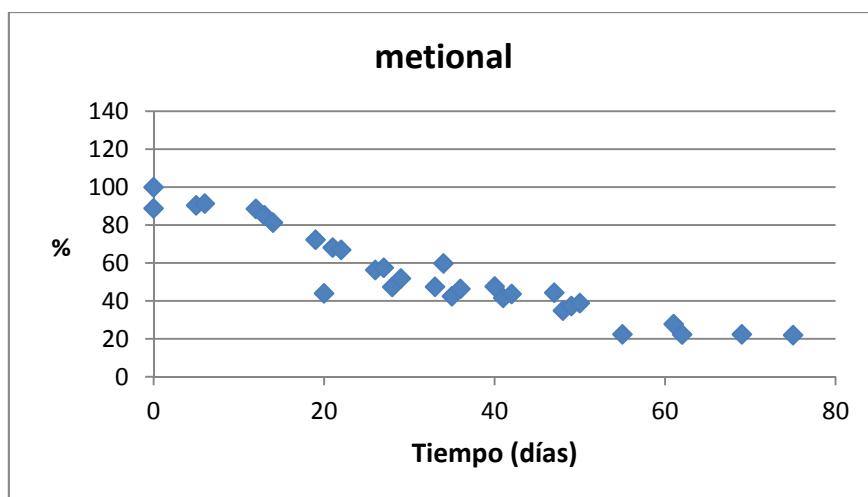


Figura 5: Gráfica del porcentaje de concentración obtenido respecto a la concentración inicial de metional frente al tiempo

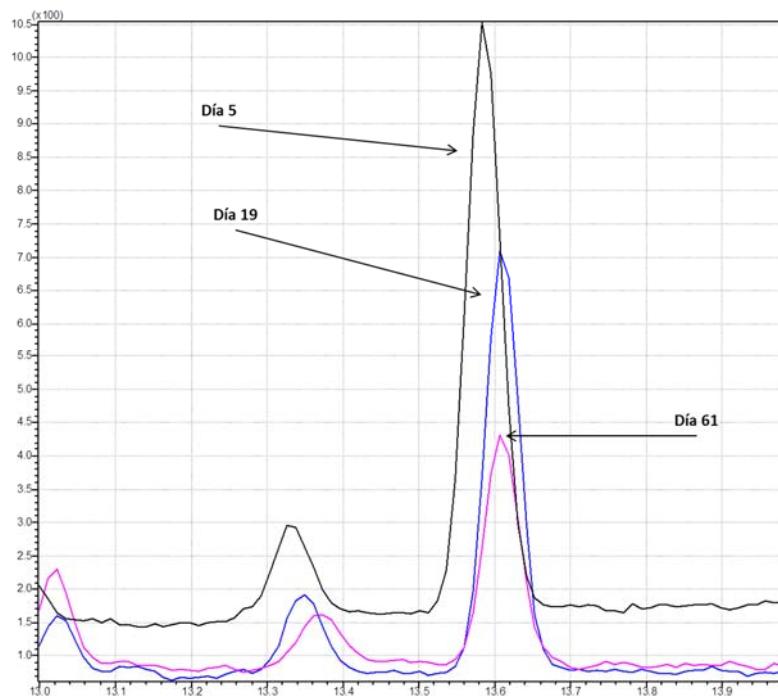


Figura 6: Picos cromatográficos del metional con el transcurso del tiempo

Pero hubo cuatro compuestos (isobutiraldehído, isovaleraldehído, 3,5,5-trimetilhexanal y 4-metilpentan-2-ol) en los que la concentración parecía aumentar con el paso del tiempo (*Figura 7*).

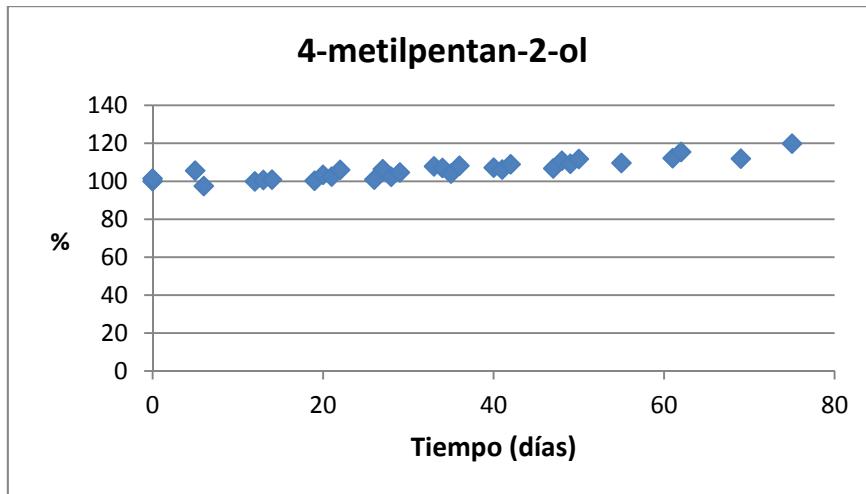


Figura 7: Gráfica del porcentaje de concentración obtenido respecto a la concentración inicial de 4-metilpentan-2-ol frente al tiempo

Este comportamiento requiere una explicación, ya que es opuesto al esperado. Una de las explicaciones posibles podría deberse a la diferencia de volatilidad. Si la volatilidad de estos cuatro compuestos fuese menor que la de los demás y/o que la del disolvente, los compuestos más volátiles verían reducida su concentración, mientras que estos cuatro compuestos se

concentrarían. Se comprobaron las volatilidades todos los compuestos y no se pudo establecer ningún tipo de correlación entre las volatilidades y la concentración de estos cuatro compuestos. Otra explicación sería que de la descomposición de alguno de los compuestos que se degradan en la disolución se formasen algunos de estos compuestos. Por ejemplo que a partir de la degradación del isovaleraldehído se formara isobutiraldehído aumentando la concentración del último con el paso del tiempo. Pero como ambos compuestos ven incrementadas sus concentraciones, esta opción se descartó.

La acetovanillona y la β -ionona no pudieron agruparse en ninguno de los grupos anteriores ya que tuvieron una dispersión de valores demasiado grande como para poder sacar alguna conclusión sobre su comportamiento.

El resto de las gráficas de los demás compuestos se adjuntan en al Anexo 3.

Dentro del segundo grupo, aquellos que desaparecen con el paso del tiempo, se observó una tendencia un tanto diferente, pues algunos de los compuestos, como el 4,5-dimetilfururaldehído, hidrocinamaldehído, fenilacetaldehído o el 2,6-dicloroanisol (*Figura 8*), parecían degradarse al principio y estabilizarse después.

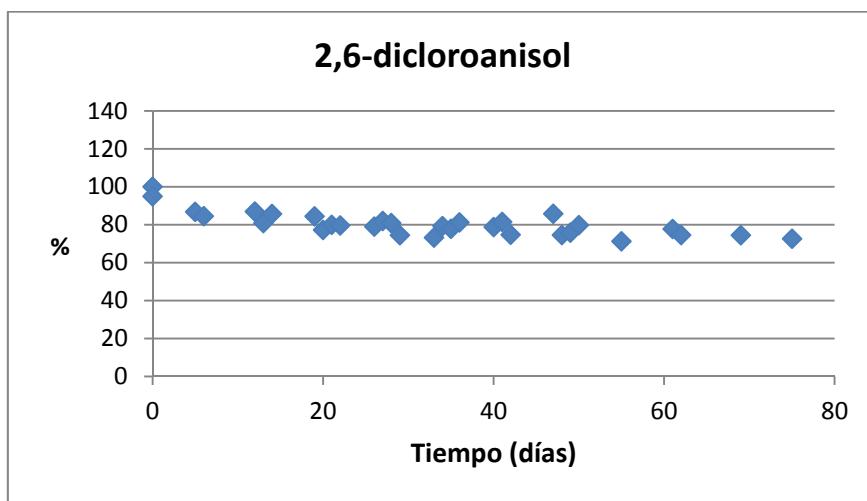


Figura 8: Gráfica del porcentaje de concentración obtenido respecto a la concentración inicial de 2,6-dicloroanisol frente al tiempo

Para comprobar si se debía al patrón interno, se representó en una gráfica el área bruta del 2-metilbutanoato de metilo (*Figura 9*). Para que los resultados pudiesen ser comparables, al estar trabajando con áreas brutas, se representaron los puntos en porcentaje respecto a la media de las áreas frente a los días transcurridos. En la gráfica se puede observar también una gran dispersión en los valores, provocada por el error aleatorio de trabajar con áreas brutas en este caso, y una variación sinusoidal, seguramente debida a la deriva del instrumento. Ambos son corregidos tanto en analitos como surrogados con el uso de áreas relativas al patrón interno. Pero se observa también que este patrón interno presenta una tendencia a aumentar su área. Este incremento corresponde a la pendiente, es decir, $0,43\% \pm 0,14\%$ por día. La hipótesis nula sería que la pendiente del patrón interno no es significativamente diferente de 0. Como la pendiente nula no entra dentro del intervalo de la pendiente obtenida \pm su desviación, se puede afirmar que la hipótesis nula no se cumple y la

pendiente es significativamente diferente de 0. Este hecho se ha asociado a que la fibra de adsorción en el espacio de cabeza se torna cada vez más sensible a ciertos analitos. Por lo tanto los compuestos que se comportan como el 4-metilpentan-2-ol, no se estaban concentrando en la disolución, sino que lo hacen en la fibra en mayor medida que lo hace el 2-metilbutanoato de metilo (hay que recordar que no se midieron las concentraciones de la disolución líquida, sino sólo la concentración en el espacio de cabeza). La solución para corregir esta deriva sería recalibrar la fibra de forma periódica. Los compuestos del grupo en el que se observa el aumento, se debe a que su concentración en la fibra es mayor que la del patrón interno, por lo que sus áreas relativas aumentan con el tiempo. Aunque este incremento del área del 2-metilbutanoato de metilo se produzca y sea importante en el estudio de la estabilidad, no lo es tanto en el estudio de muestras en vino real. En estas muestras de vino real que durante el almacenamiento consumen diversas cantidades de oxígeno la variación en la señal debida a este hecho es muy pequeña en comparación con el aumento de la señal producida por el consumo de oxígeno.

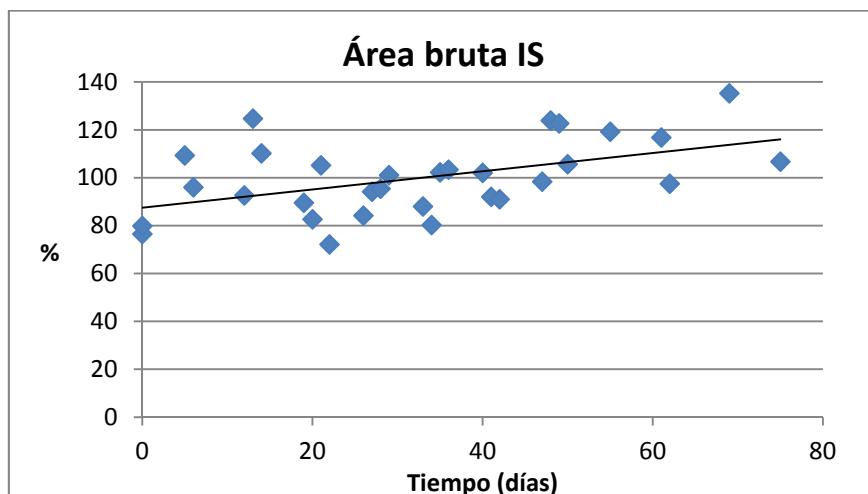


Figura 9: Gráfica del porcentaje respecto a la media de los valores de las áreas del 2-metilbutanoato de metilo frente al tiempo

El comportamiento del 2,6-dicloroanisol y similares, puede ser explicado por este hecho, ya que en áreas brutas su pendiente se mantiene mucho más cercana a 0 que la del patrón interno (la pendiente del 2,6-dicloroanisol es de $0,1\%\pm0,13\%$, es decir, no significativamente diferente de 0). Su área relativa no desciende debido a su degradación, sino debido al aumento del área del patrón interno. Otros decrecimientos más bruscos no pueden ser explicados por este motivo. Esos compuestos se degradan tal como se esperaba y de manera muy rápida.

Con el objetivo de conocer durante cuánto tiempo son estables los compuestos, se realizó una recta representando en el eje ordenadas el área relativa del compuesto respecto al 2-metilbutanoato de metilo, y en el de abscisas el tiempo transcurrido en días. Se calculó la t_{exp} según las *Ecuaciones 4-6*.

Ecuación 4: $t_{\text{exp}} = \frac{\text{pendiente}}{s \text{ de la pendiente}}$

Ecuación 5: $s_{\text{pendiente}} = \sqrt{\frac{\text{varianza de los residuales}}{\sum(x-\bar{X})^2}}$

Ecuación 6: varianza de los residuales = $\frac{\sum(y-y_{\text{est}})^2}{\text{grados de libertad}}$

\bar{X} = centroide de x

y_{est} = la y estimada para el punto utilizando la recta

grados de libertad = $n-2$

Se calculó la t_{crit} para el mismo número de grados de libertad al 95%. Si la t_{crit} era mayor que la t_{exp} , se puede decir que el compuesto en cuestión es estable significativamente durante el periodo de trabajo del estudio. Si era menor, el compuesto no es estable, y se debe averiguar a partir de que día se puede considerar que se ha degradado de forma significativa.. Para determinar el tiempo que los compuestos permanecen estables, se buscó el punto en el que la recta del área relativa se corta con la ordenada en el origen $\pm 1,67s$. Este valor viene dado por Z^* s, siendo la Z de una cola con una significatividad del 95%. La coordenada x de ese punto nos dio el tiempo que se buscaba. En las *Tablas 5 y 6* se muestran los compuestos agrupados según los resultados obtenidos.

Tabla 5: Analitos agrupados según su tiempo de estabilidad

Grupo	Compuesto	Tiempo (días)
Ana 1	metional	4
	β -damascenona	11
Ana 2	isobutiraldehido	12
	decanal	12
	isovaleraldehido	16
Ana 3	fenilacetaldehido	28
	acetovanillona	50
	diacetilo	61
	5-metilfurfural	67
Ana 4	furfural	72
	benzaldehido	+75
	2,3-pentanodiona	+75
	β -ionona	+75
	2-metilbutanal	+75

Tabla 6: Surrogados y patrones internos agrupados según su tiempo de estabilidad

Grupo	Compuesto	Tiempo (días)
S1	4-metilpentan-2-ol	6
S2	2,6-dicloroanisol	12
	β-damascona	14
	hidrocinamaldehído	22
S3	3,5,5-trimetilhexanal	27
	4,5-dimetilfurfural	27
	3-(metiltio)butiraldehído	33
S4	3-octanona	52
	2-metilpentanal	+75

Como se puede observar, se han agrupado según su estabilidad, siendo los grupos Ana1 y S1 aquellos cuyas disoluciones deberían renovarse cada semana, en los grupos Ana2 y S2 la renovación sería necesaria cada dos semanas, los de los grupos Ana3 y S3 aguantan alrededor de tres semanas y los del grupo Ana4 y S4 aguantan más de dos meses. Se ha hecho distinción entre surrogados y analitos de manera que puedan usarse de forma independiente, ya que hay que recordar que este estudio se ha realizado para mejorar la calidad de las determinaciones de las muestras reales de vinos donde sólo se deben añadir la disolución de SIS.

Con estos datos, se propone modificar la disolución de trabajo de SIS y la disolución conjunta de todos los analitos y dividirlas según los grupos propuestos. De esta forma la disolución preparada diariamente con todos los compuestos tendrá una composición estable y se usará para el control de calidad del método. Viendo este resultado también se plantea comprobar la estabilidad de las disoluciones madre a partir de las cuales se preparan las de trabajo de Ana1-Ana4 y S1-S4. La degradación de las disoluciones madre podría dar lugar a que cuando se renueven estos grupos de disoluciones, los compuestos carbonílicos ya estén degradados.

Por otra parte se propone el preparar las disoluciones de trabajo de los analitos y la disolución de SIS como hasta ahora y fraccionarlas en viales de pequeño volumen (2-5 mL) y así solo se usarán una vez. La degradación observada en las disoluciones sintéticas se debe principalmente al contacto de éstas con el oxígeno del aire. Al tener que preparar la disolución diariamente, los viales se abrieron 32 veces durante el transcurso de este estudio, permitiendo la entrada de aire y por tanto la degradación de los compuestos.

4.- Conclusiones

Los carbonilos con los que se trabaja se oxidan y degradan con el paso del tiempo en las disoluciones de trabajo, tal como se esperaba. Se han estudiado estas degradaciones de forma que se pueda conocer la degradación que experimentan y poder renovarlas cuando sea necesario. Finalmente, se han podido establecer grupos de compuestos de forma que se facilitase el trabajo con el método de análisis, ya que ahora no se deberá volver a preparar todas las disoluciones cada poco tiempo, sino que se podrán cambiar pequeños grupos de forma sencilla y precisa. De esta forma se consigue además una mejora en la calidad del método, ya que no se trabajará con surrogados degradados que podrían llevarnos a sacar conclusiones erróneas tras los análisis.

Tanto la disolución de metional como la de 4-metilpentan-2-ol deben prepararse por separado y cada semana, ya que son las que se degradan más rápidamente. Los demás compuestos carbonílicos se agruparán en tres grupos de analitos y otros tres de surrogados y estándares, de tal forma que se renuevan las disoluciones cada 2 semanas, 1 mes y 2 meses respectivamente cada grupo.

De forma general, los objetivos del trabajo de fin de grado se han cubierto desarrollándose las cualidades propias de un investigador formado en el método científico y especializado en el uso de técnicas cromatográficas del laboratorio.

Conclusions

The carbonyl compounds studied have been oxidized and degraded over time as it was expected. These degradations have been evaluated in order to know the degradation paths so the solutions can be renewed when are needed. Finally, compounds have been classified in groups, making easier to work with the method. Now just some of the solutions have to be prepared every few days. Working with the new groups of solutions proposed avoids wrong inferences increasing the quality of the method.

Both the methional and the 4-methylpentan-2-ol solutions must be prepared separately every week, since they are the ones that degrade faster. The remaining carbonyl compounds will be classified into three groups of analytes and another three of surrogates and internal standards, so the solutions can be renovated every 2 weeks, 1 month and 2 months respectively each group.

The objectives of this work have been reached, developing the qualities that can be expected from a researcher formed in the scientific method, and who has worked with chromatography techniques.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido posible gracias a los fondos recibidos por parte del Ministerio Español de Economía y Competitividad (Proyecto AGL2010 230183). Agradecer al Laboratorio de Análisis del Aroma y Enología (LAAE) toda la ayuda recibida, así como el trato que me ha sido brindado.

REFERENCIAS

- [1]→ Silva Ferreira, A. C.; de Pinho, P. G.; Rodrigues, P. & Hogg, T. (2002). Kinetics of oxidative degradation of white wines and how they are affected by selected technological parameters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, pp 5919–5924.
- [2]→ Escudero, A.; Cacho, J. & Ferreira, V. (2000). Isolation and identification of odorants generated in wine during its oxidation: A gas chromatography-olfactometry study. *European Food Research of Technology*, 211, pp 105–110.
- [3]→ Escudero, A.; Asensio, E.; Cacho, J. & Ferreira, V. (2002). Sensory and chemical changes of young white wines stored under oxygen. An assessment of the role played by aldehydes and some other important odorants. *Food Chemistry*, 77, pp 325–331.
- [4]→ Chatonnet, P. (1998). Volatile and odoriferous compounds in barrel-aged wines: Impact of cooperage techniques and aging conditions. En *Chemistry of wine flavor*, editado por A. L. Waterhouse & S. E. Ebeler. Washington DC: American Chemical Society, pp. 180–207.
- [5]→ Chatonnet, P. & Dubourdieu, D. (1998). Identification of substances responsible for the “sawdust” aroma in oak wood. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 76, pp 179–188.
- [6]→ Azzara, C. D. & Campbell, L. B. (1992). Off-flavors of dairy products. En *Off-flavors in foods and beverages*, editado por G. Charalambous. Amsterdam: Elsevier, pp. 329–374.
- [7]→ Jaime-Baró, A. L. & Quiros-Carrasco, J. A. (1977). Les conditions de formation des aldehydes dans les vins. Relation et importance en rapport avec les phénomènes d’oxydation et les caractéristiques organoleptiques. En el boletín de *l’Organisation Internationale de la Vigne et du Vin* (O.I.V.), 50, pp 253-267.
- [8]→ Escudero, A.; Hernandez-Orte, P.; Cacho, J. & Ferreira, V. (2000). Clues about the role of methional as character impact odorant of some oxidized wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, pp 4268–4272.
- [9]→ San Juan, F.; Cacho, J.; Ferreira, V. & Escudero, A. (2012). Aroma chemical composition of red wines from different price categories and its relationship to quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, pp 5045-5056.
- [10]→ Franco-Luesma, E.; Bueno, M.; Culleré, L.; Fernández-Zurbano, P. & Ferreira, V. (2013). Changes in “KEY” wine aroma compounds during oxidation. Relationship with polyphenol changes and with some potential precursors. *10th Wartburg Symposium on Flavour Chemistry & Biology*. Eisenach (Alemania).
- [11]→ Rizzi, P. (2006). Formation of strecker aldehydes from polyphenol-derived quinones and α-amino acids in a nonenzymic model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, pp 1893-1897.
- [12]→ Pripis Nicolau, L.; de Revel, G.; Bertrand, A. & Maujean, A. (2000). Formation of flavor components by the reaction of amino acid and carbonyl compounds in mild conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3761-3766

- [13]→ Silva Ferreira, A. C.; Hogg, T. & Guedes de Pinho, P. (2003). Identification of key odorants related to the typical aroma of oxidation-spoiled white wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, pp 1377–1381.
- [14]→ Silva Ferreira, A. C.; Oliveira, C.; Hogg, T. & Guedes De Pinho, P. (2003). Relationship between potentiometric measurements, sensorial analysis, and some substances responsible for aroma degradation of white wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, pp 4668–4672.
- [15]→ Bueno, M.; Culleré, L.; Cacho, J. & Ferreira, V. (2010). Chemical and sensory characterization of oxidative behavior in different wines. *Food Research International*, 43, pp 1423–1428.
- [16]→ Cullere, L.; Cacho, J. & Ferreira, V. (2004). Analysis for wine C5–C8 aldehydes through the determination of their O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)oximes formed directly in the solid phase extraction cartridge. *Analytica Chimica Acta*, 524, pp 201–206.
- [17]→ Zapata, J.; Mateo-Vivaracho, L.; Cacho, J. & Ferreira, V. (2010). Comparison of extraction techniques and mass spectrometric ionization modes in the analysis of wine volatile carbonyls. *Analytica Chimica Acta*, 660, pp 197–205.
- [18]→ Zapata, J.; Lopez, R.; Herrero, P. & Ferreira, V. (2012). Multiple automated headspace in-tube extraction for the accurate analysis of relevant wine aroma compounds and for the estimation of their relative liquid–gas transfer rates. *Journal of Chromatography A*, 1266, pp 1–9
- [19]→ Culleré, L.; Ferreira, V. & Cacho, J. (2011). Analysis, occurrence and potential sensory significance of aliphatic aldehydes in white wines. *Food Chemistry* 127, pp 1397–1403
- [20]→ Bueno, M.; Franco-Luesma, E.; Carrascón, V. & Ferreira, V. (2014). Oxidative behaviour in different wines using simultaneous determination of free and bonded volatile carbonyls. En *Wine Active Compounds 2014. Proceedings of the Third Edition of the International Conference Series on Wine Active Compounds*, editado por R. Gougeon. Bourgogne: Université de Bourgogne, pp 41-43.
- [21]→ Bueno, M.; Zapata, J. & Ferreira, V. (2013). Simultaneous determination of free and bonded volatile carbonyls in wine by solid phase microextraction: assessing wine shelf life and aroma changes in the glass. *XIII Reunión Científica de la Sociedad Española de Cromatografía y Técnicas Afines (SECyTA 2013)*. Tenerife, Islas Canarias (España)
- [22]→ Grob, K.; Grob, G & Grob, K Jr. (1978). Comprehensive, standardized quality test for glass capillary columns. *Journal of Chromatography*, 156, pp 1-20.
- [23]→ Grob, K. & Grob G. (1982). Capillary columns with immobilized stationary phases. *Journal of High Resolution Chromatography & Chromatography Communications*, 5, pp 349-354.