# RESOLUTION OIV-OENO 620-2020

# BESTIMMUNG VON ALKYLPHENOLEN IN WEINEN MITTELS GASCHROMATOGRAPHIE UND MASSENSPEKTROMETRIE (GC-MS oder GC-MS/MS)

DIE GENERALVERSAMMLUNG,

GESTÜTZT auf Artikel 2 Absatz 2 b) iv des Übereinkommens vom 3. April 2001 zur Gründung der Internationalen Organisation für Rebe und Wein,

AUF VORSCHLAG der Unterkommission „Analysemethoden“,

BESCHLIESST, die Sammlung internationaler Analysemethoden für Wein und Most durch die folgende Methode zu ergänzen:

# BESTIMMUNG VON ALKYLPHENOLEN IN WEINEN MITTELS GASCHROMATOGRAPHIE UND MASSENSPEKTROMETRIE (GC-MS oder GC-MS/MS)

**(Typ IV-Methode)**

## 1. Anwendungsgebiet

Die vorliegende Methode ermöglicht die Bestimmung folgender Verbindungen:

| | Untersuchter Konzentrationsbereich |
|---|---|
| 2-tert-Butylphenol | 1-100 µg/L |
| 4-tert-Butylphenol | 1-100 µg/L |
| 6-methyl-2-tert-Butylphenol | 1-100 µg/L |
| 4-methyl-2-tert-Butylphenol | 1-100 µg/L |
| 5-methyl-2-tert-Butylphenol | 1-100 µg/L |
| 4,6-di-methyl-2-tert-Butylphenol | 1-100 µg/L |



Beglaubigte Ausführung Paris-videokonferenz, 26 November 2020
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung
Pau ROCA

© OIV 2020

| | |
|---|---|
| 2,6-di-tert-Butylphenol | 1-100 µg/L |
| 2,4-di-tert-Butylphenol | 1-100 µg/L |

## 2. Normative Verweise

- ISO 78-2: Chemie – Gestaltung von Normen
- ISO 3696: Wasser für analytische Zwecke
- Resolution OIV OENO 418-2013

## 3. Prinzip der Methode

Die Methode beschreibt zum einen die Analyse mittels Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie (GC-MS) und zum anderen die Analyse mittels Gaschromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie (GC-MS/MS). Die Probe wird im Headspace durch Festphasen-Mikroextraktion (SPME) extrahiert

## 4. Reagenzien und Arbeitslösungen

Sofern nicht anders angegeben, sind für die Analyse nur Reagenzien von anerkannter Analysequalität sowie destilliertes oder demineralisiertes Wasser bzw. Wasser gleichwertiger Reinheit zu verwenden.

### 4.1. Reagenzien

4.1.1. Wasser für Analysezwecke (Norme ISO 3696), Qualität I oder II

4.1.2. Reines Ethanol (CAS-Nr. 64-17-5)

4.1.3. Natriumchlorid (CAS-Nr. 7647-14-5)

4.1.4. 4-tert-butylphenol D13 (CAS-Nr. 225386-58-3)

4.1.5. 4-tert-Butylphenol (CAS-Nr. 98-54-4)



© OIV 2020

4.1.6. 2-tert-Butylphenol (CAS-Nr. 88-18-6)

4.1.7. 4-methyl-2-tert-Butylphenol CAS-Nr. 2409-55-4)

4.1.8. 5-methyl-2-tert-Butylphenol CAS-Nr. 88-60-8)

4.1.9. 6-methyl-2-tert-Butylphenol (CAS-Nr. 2219-82-1)

4.1.10. 4,6-di-methyl-2-tert-Butylphenol (CAS-Nr. 1879-09-0)

4.1.11. 2,4-di-tert-Butylphenol (CAS-Nr. 96-76-4)

4.1.12. 2,6-di-tert-Butylphenol (CAS-Nr. 128-39-2)

### 4.2. Stammlösungen

Für jedes Alkylphenol und für den internen Standard (z.B. 4-tert-Butylphenol D13) wird eine Stammlösung in Ethanol (1 g/L) hergestellt.

Anhand der einzelnen Stammlösungen werden Arbeitslösungen in Ethanol in den Konzentrationen hergestellt, die es ermöglichen, den gesamten Messbereich abzudecken.

### 4.3. Kalibrierlösungen

Um die Rückführbarkeit auf das Internationale Einheitensystem (S.I.) zu gewährleisten, muss die Kalibrierreihe mit Lösungen und Pulvern der verschiedenen Alkylphenole erstellt werden, die einen hohen Reinheitsgrad aufweisen und durch Wägung oder Volumetrie hergestellt werden.

Die Kalibrierreihe wird mit Lösungen von 12 % vol. Ethanol (4.1.2) erstellt, die z.B. 5 Punkte des Messbereichs (1 - 100 µg·L-1) abdecken. Diese Lösungen sind vor der Analyse frisch herzustellen und dann rasch (innerhalb einiger Stunden) zu verwenden.

Die Kalibriergleichung ist in der Regel eine quadratische Gleichung.

## 5. Geräte

### 5.1. GC-MS mit Split/Splitless-Injektor und MS- oder Tandem-MS-Detektor



© OIV 2020

### 5.2. Kapillarsäule mit stationärer apolarer Phase, 5% Phenylmethylpolysiloxan (z.B. 5MS, 30m x 0,25 mm x 0,25 µm Schichtdicke) oder entsprechend

### 5.3. 100 µL-, 1 mL- und 10 mL-Mikropipetten, kalibriert

### 5.4. 20 mL-SPME-Flaschen, perforierte Verschlusskapsel mit teflonbeschichtetem Deckel

### 5.5. System für Festphasen-Mikroextraktion (SPME) mit 100 µm Polydimethylsiloxan-Faser oder gleichwertiges Material

### 5.6. Waage

Die Waage muss auf das SI rückgeführt sein und eine Genauigkeit von ± 0,1 mg aufweisen.

### 5.7. Messgefäße

Messgefäße zur Herstellung der Reagenzien und Kalibrierlösungen der Klasse A

## 6. Probenahme

Der hier verwendete Standard, 4-tert-Butylphenol D13, ist als Beispiel angeführt. Es können andere Standards verwendet werden.

In eine 20 mL-SPME-Flasche (5.4) 10 mL Wein, etwa 2 g NaCl (4.1.3) und 50 µl einer Lösung von 4-tert-Butylphenol D13 (interner Standard,5 mg/L) (4.1.4) geben.

Die Flasche wird mit einer perforierten Kapsel mit teflonbeschichtetem Deckel (5.4) verschlossen.

## 7. Durchführung (GC-MS)

Die nachstehend beschriebene Durchführung ist als Beispiel angegeben. Die angewendete GC/MS-Technik ermöglicht Varianten und Optimierungen, die bei jeder Hardwarekonfiguration erforderlich sein können.

### 7.1. Extraktion

Die Headspace-Festphasenmikroextraktion wird 20 Minuten bei 40 °C durchgeführt.



© OIV 2020

## 7.2. Einspritzung

Die Faser wird 10 Minuten im Injektor desorbiert.
Splitless-Injektor, 260 °C
Helium-Durchfluss: 1 mL/min

## 7.3. Einstellungen des Gaschromatographen

Säule: 5MS UI 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm
Transferlinie: 300 °C
Ofen: 50 °C
10 °C/min bis 300 °C
dann 300°C 3 Minuten
Gesamtdauer: 28,0 Minuten

## 7.4. Messbedingungen

Quellentemperatur: 250 °C
Quadrupoltemperatur: 150 °C
Erfassung: SIM

| | Tr (min) | Quantifizierungsionen | Qualifizierungsionen |
|---|---|---|---|
| 2-tert-Butylphenol | 8.9 | 135 | 107-150 |
| 4-tert-Butylphenol-D13 (IS) | 9.1 | 145 | 113-163 |
| 4-tert-Butylphenol | 9.2 | 135 | 107-150 |
| 6-methyl-2-tert-Butylphenol | 9.4 | 149 | 164-121 |
| 4-methyl-2-tert-Butylphenol | 10.0 | 149 | 164-121 |
| 5-methyl-2-tert-Butylphenol | 10.2 | 149 | 164-121 |
| 4,6-dimethyl-2-tert-Butylphenol | 10.5 | 163 | 135-178 |
| 2,6-di-tert-Butylphenol | 11.2 | 191 | 206-192 |
| 2,4-di-tert-Butylphenol | 12.0 | 191 | 206-192 |


© OIV 2020

*Tabelle 1: in der Massenspektrometrie verwendete Ionen*

# 8. Durchführung (GC-MS/MS)

Die nachstehend beschriebene Durchführung ist als Beispiel angegeben. Die angewendete GC-MS/MS-Technik ermöglicht Varianten oder Optimierungen, die bei jeder Hardwarekonfiguration notwendig sein können.

## 8.1. Extraktion

Die Headspace-Festphasenmikroextraktion (SPME) wird 5 Minuten bei 40 °C durchgeführt.

## 8.2. Einspritzung

Die Faser wird 8 Minuten im Injektor desorbiert

Pulsed Split-Injektor, 250 °C, Verhältnis 2:1

Helium-Durchfluss: 2 mL/min

## 8.3. Parametrierung des Gaschromatographen

Säule: HP-5MS UI 30mx0,25 mm x 0,25 µm oder entsprechend

Transferlinie: 300 °C

Ofen: 50 °C

25 °C/min bis 130 °C

dann 10 °C/min bis 170 °C

dann 25 °C/min bis 300 °C

dann 300 °C 3 Minuten

Gesamtdauer: 15,4 Minuten

## 8.4. Messbedingungen

Quellentemperatur: 250 °C

Quadrupoltemperatur: 150 °C

Erfassung: MRM

| | Tr (min) | Übergang Quanti | Übergänge Quali |
|---|---|---|---|



© OIV 2020

| | | | |
|---|---|---|---|
| 2-tert-Butylphenol | 5.0 | 135>107 | 150>107 & 150>135 |
| 4-tert-Butylphenol-D13 (IS) | 5.1 | 145>113 | 163>113 & 163>145 |
| 4-tert-Butylphenol | 5.2 | 135>107 | 150>107 & 150>135 |
| 6-methyl-2-tert-Butylphenol | 5.3 | 149>121 | 164>121 & 164>149 |
| 4-methyl-2-tert-Butylphenol | 5.7 | 149>121 | 164>121 & 164>149 |
| 5-methyl-2-tert-Butylphenol | 5.8 | 149>121 | 164>121 & 164>149 |
| 4,6-dimethyl-2-tert-Butylphenol | 6.1 | 163>135 | 178>135 & 178>163 |
| 2,6-di-tert-Butylphenol | 6.6 | 206>191 | 191>163 & 191>57 |
| 2,4-di-tert-Butylphenol | 7.2 | 191>57 | 191>163 & 206>191 |

*Tabelle 2: in der Tandem-Massenspektrometrie verwendete Ionen*

## 9. Angabe der Ergebnisse

Die Ergebnisse sind in µg/L angegeben

# Anhang 1: Ergebnisse der internen Validierung

Die Leistungsdaten wurden in einem Ringversuch ermittelt: 5 Alkylphenole, die den Anwendungsbereich der Methode abdecken (1 ; 5 ; 25 ; 50 ; 100 µg/L), wurden in einer synthetischen Weinmatrix (Wasser-Alkohol-Lösung (12 % v/v), 6 g/L Weinsäure, Einstellung des pH-Werts auf 3,5 mit 1 M NaOH) formuliert.

Jede Verbindung wurde unter Bedingungen der Laborpräzision 5 Mal analysiert, wobei für jede Analyse 2 Wiederholungen vorgenommen wurden. Die Analysen wurden im September und Oktober 2018 durchgeführt.

Die Berechnungen wurden entsprechend der Resolution OIV OENO 418/2013 „Leitfaden für die Bewertung, die Kontrolle und die Untersuchung der Messunsicherheit einer önologischen Analysemethode“ durchgeführt.



© OIV 2020

| GC-MS | VK% (k=2) Laborpräzision | VKr (%) (K=2) Wiederholbarkeit | Validierte LQ |
|---|---|---|---|
| 2-tert-Butylphenol | 6.7% | 4.3% | 1 µg/L |
| 4-tert-Butylphenol | 7.3% | 5.1% | 1 µg/L |
| 6-methyl-2-tert-Butylphenol | 12.1% | 10.2% | 1 µg/L |
| 4-methyl-2-tert-Butylphenol | 6.0% | 4.6% | 1 µg/L |
| 5-methyl-2-tert-Butylphenol | 6.4% | 4.9% | 1 µg/L |
| 4,6-dimethyl-2-tert-Butylphenol | 12.7% | 10.5% | 1 µg/L |
| 2,6-di-tert-Butylphenol | 19.5% | 14.6% | 1 µg/L |
| 2,4-di-tert-Butylphenol | 11.9% | 9.9% | 1 µg/L |

*Tabelle 3: mit Massenspektrometrie erhaltene Leistungsdaten*

| GC-MS/MS | VK% (k=2) Laborpräzision | VKr (%) Wiederholbarkeit | Validierte LQ |
|---|---|---|---|
| 2-tert-Butylphenol | 11.3% | 10.1% | 1 µg/L |
| 4-tert-Butylphenol | 10.4% | 11.0% | 1 µg/L |
| 6-methyl-2-tert-Butylphenol | 13.9% | 13.5% | 1 µg/L |
| 4-methyl-2-tert-Butylphenol | 11.1% | 9.6% | 1 µg/L |
| 5-methyl-2-tert-Butylphenol | 12.3% | 10.3% | 1 µg/L |
| 4,6-dimethyl-2-tert-Butylphenol | 13.4% | 12.6% | 1 µg/L |
| 2,6-di-tert-Butylphenol | 16.6% | 16.8% | 1 µg/L |



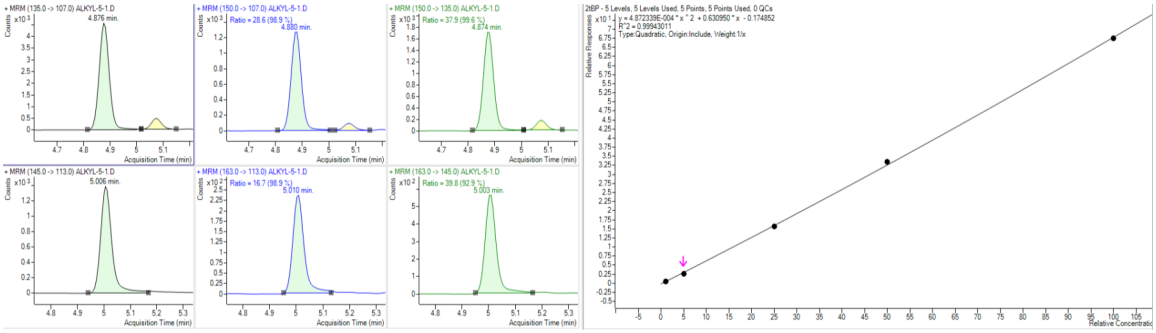
© OIV 2020

| | | | |
|---|---|---|---|
| 2,4-di-tert-Butylphenol | 14.5% | 12.4% | 1 µg/L |

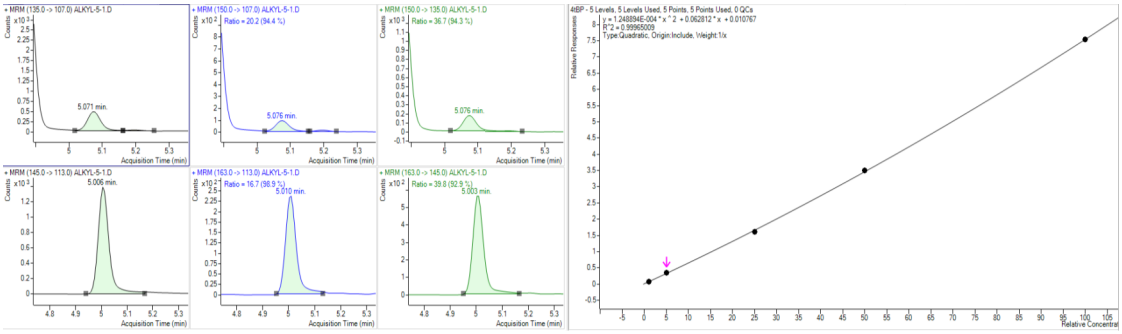
*Tabelle 4: mit Tandem-Massenspektrometrie erhaltene Leistungsdaten*

# Anhang 2: Beispiele für Chromatogramme und Kalibrierkurben

## 2-tert-Butylphenol



## 4-tert- Butylphenol



## 6-methyl-2-tert- Butylphenol



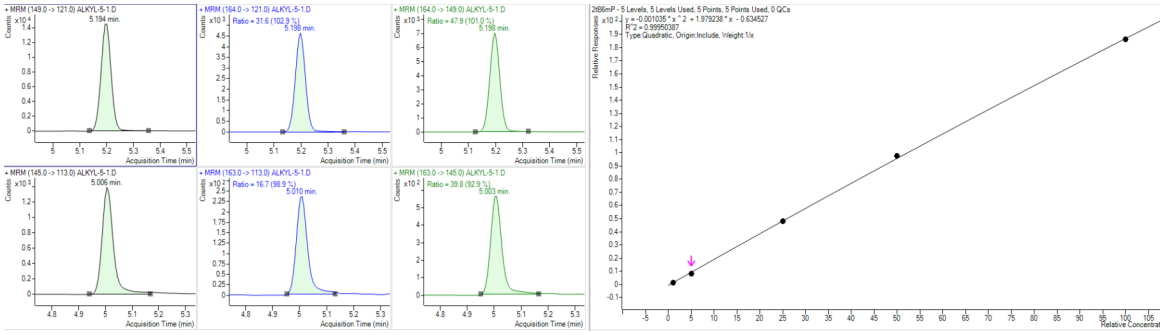
© OIV 2020

Beglaubigte Ausführung Paris-videokonferenz, 26 November 2020

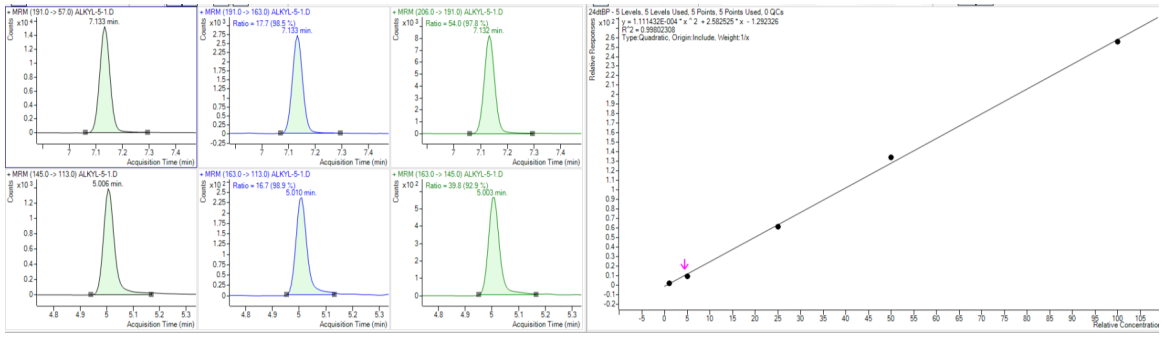
Der Generaldirektor der OIV

Sekretär der Generalversammlung

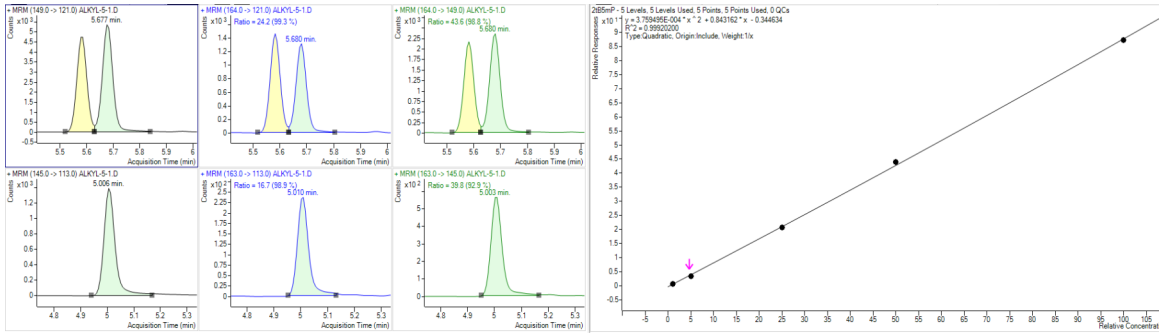
Pau ROCA



## 4-methyl-2-tert- Butylphenol



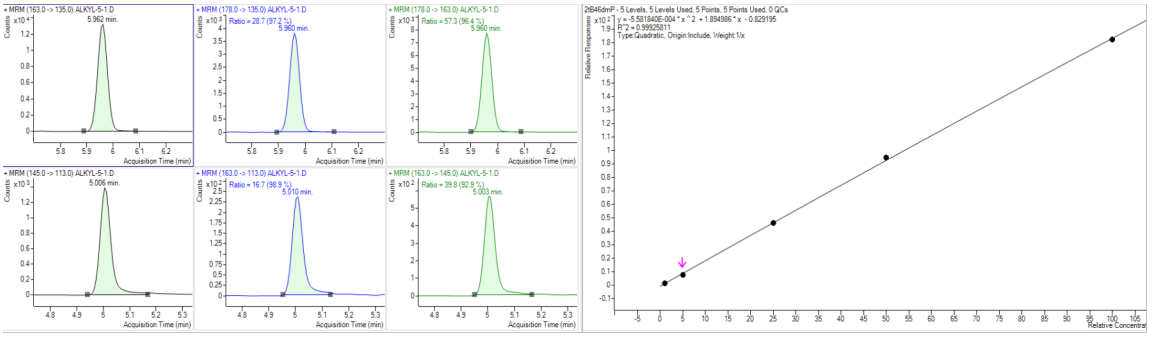
## 5-methyl-2-tert- Butylphenol



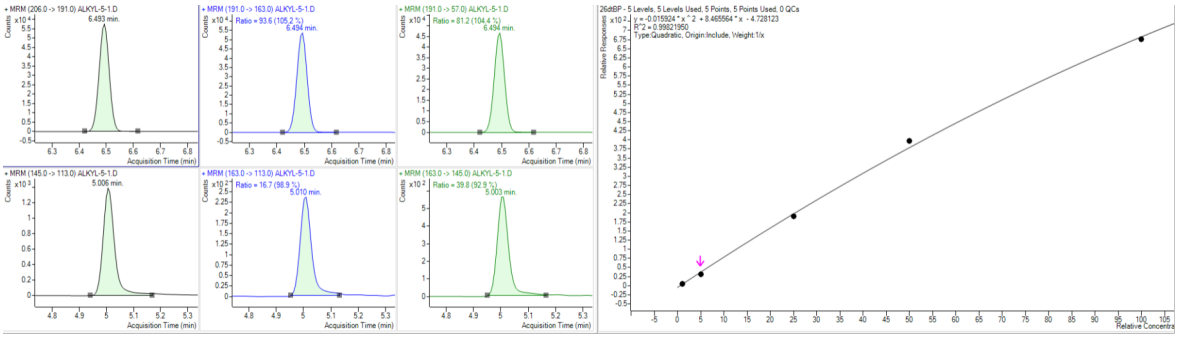
## 4,6-dimethyl-2-tert- Butylphenol



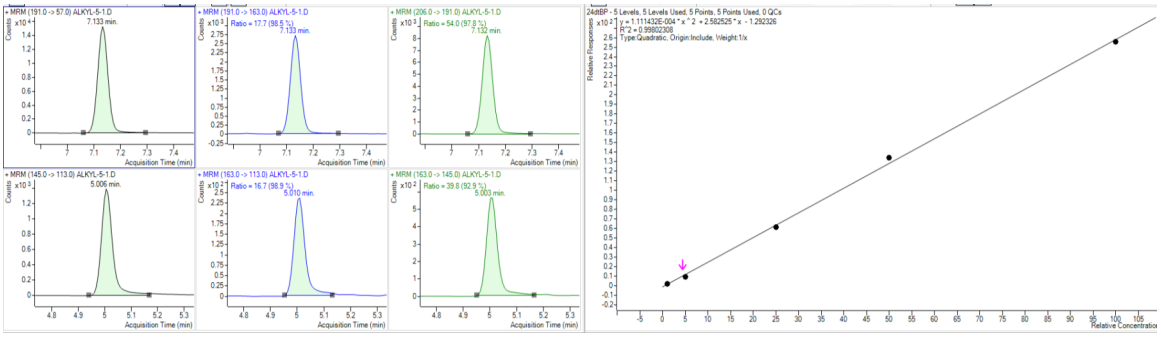
© OIV 2020



## 2,6-di-tert- Butylphenol



## 2,4-di-tert- Butylphenol







© OIV 2020