

## RESOLUCIÓN OIV-OENO 620-2020

### DETERMINACIÓN DE ALQUILFENOLES EN VINOS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC-MS o GC-MS/MS)

LA ASAMBLEA GENERAL,

VISTO EL ARTÍCULO 2, párrafo 2 b) iv del Acuerdo del 3 de abril de 2001 por el que se crea la Organización Internacional de la Viña y el Vino,

A PROPUESTA de la Subcomisión “Métodos de Análisis”,

DECIDE incorporar en el Compendio de Métodos Internacionales de Análisis de Vinos y Mostos el siguiente método:

### DETERMINACIÓN DE ALQUILFENOLES EN VINOS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC-MS o GC-MS/MS)

(método de tipo IV)

#### 1. **Ámbito de aplicación**

El método que figura a continuación permite determinar las siguientes moléculas:

	Intervalo de concentraciones
2-tert-butilfenol	1-100 µg/L
4-tert-butilfenol	1-100 µg/L
6-metil-2-terc-butilfenol	1-100 µg/L
4-metil-2-terc-butilfenol	1-100 µg/L
5-metil-2-terc-butilfenol	1-100 µg/L
4,6-di-metil-2-terc-butilfenol	1-100 µg/L

2,6-di-terc-butilfenol	1-100 µg/L
2,4-di-terc-butilfenol	1-100 µg/L

## 2. Referencias normativas

- ISO 78 2: Química. Diseños para normas,
- ISO 3696: Agua para uso en análisis de laboratorio,
- Resolución OIV OENO 418-2013.

## 3. Fundamento del método

En el método se describe la determinación por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) y la determinación por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en tándem (GC-MS/MS). La muestra se extrae en espacio de cabeza por microextracción en fase sólida (SPME).

## 4. Reactivos y soluciones de trabajo

A menos que se indique lo contrario, utilizar únicamente reactivos aptos para uso en análisis de laboratorio y agua destilada, desmineralizada o de un grado de pureza equivalente.

### 4.1. Reactivos

- 4.1.1. Agua para uso en análisis de laboratorio (tipos I y II de la norma ISO 3696)
- 4.1.2. Etanol puro (CAS 64-17-5)
- 4.1.3. Cloruro de sodio (CAS 7647-14-5)
- 4.1.4. 4-terc-Butilfenol D13 (CAS 225386-58-3)
- 4.1.5. 4-terc-Butilfenol (CAS 98-54-4)

- 4.1.6. 2-terc-Butilfenol (CAS 88-18-6)
- 4.1.7. 4-Metil-2-terc-butilfenol (CAS 2409-55-4)
- 4.1.8. 5-Metil-2-terc-butilfenol (CAS 88-60-8)
- 4.1.9. 6-Metil-2-terc-butilfenol (CAS 2219-82-1)
- 4.1.10. 4,6-Dimetil-2-terc-butilfenol (CAS 1879-09-0)
- 4.1.11. 2,4-Di-terc-butilfenol (CAS 96-76-4)
- 4.1.12. 2,6-Di-terc-butilfenol (CAS 128-39-2)

## 4.2. Soluciones madre

Preparar soluciones madre individuales de 100 µg/L de cada alquilfenol y del patrón interno (por ejemplo, 4-terc-butilfenol D13) en etanol.

A partir de las soluciones madre individuales, preparar con etanol soluciones de trabajo de distintas concentraciones que cubran todo el intervalo de medida.

## 4.3. Soluciones de calibración

Para garantizar una mejor trazabilidad con respecto al Sistema Internacional de Unidades (SI), la serie de soluciones de calibración se debe elaborar con soluciones o sustancias puras (alto grado de pureza) de los distintos alquilfenoles, preparadas mediante pesada o volumen con trazabilidad al SI.

La curva de calibración se realizará con soluciones de etanol (4.1.2) al 12 % (v/v) que cubran el intervalo de medida (de 1 a 100 µg/L), por ejemplo, con 5 puntos. Preparar estas soluciones justo antes del análisis y utilizarlas en un plazo breve de tiempo (unas horas).

La ecuación de la curva de calibración suele ser de segundo grado.

# 5. Equipo

## 5.1. Cromatógrafo de gases equipado con un inyector de tipo split-splitless y acoplado a un espectrómetro de masas o a un espectrómetro de masas en tándem

**5.2. Columna capilar de fase estacionaria apolar, 5 % fenilmetilpolisiloxano (p. ej., 5MS, 30 m × 0,25 mm × 0,25 µm de espesor de película) o similar**

**5.3. Micropipetas de 100 µL, 1 mL y 10 mL, calibradas**

**5.4. Vial de 20 mL para SPME con cápsula de cierre perforada con septum revestido de teflón**

**5.5. Sistema de SPME con fibra recubierta de una capa de dimetilpolisiloxano de 100 µm de espesor o similar**

**5.6. Balanza analítica**

Con trazabilidad al SI y una sensibilidad de 0,1 µg.

**5.7. Material volumétrico de vidrio**

El material volumétrico de vidrio para preparar los reactivos y las soluciones de calibración debe ser de clase A.

## **6. Preparación de las muestras**

El patrón interno (4-tert-butilfenol D13) se indica únicamente a modo de ejemplo; se pueden usar otros patrones internos.

En un vial de vidrio para SPME de 20 µL (5.4), introducir 10 µL de vino, unos 2 µg de NaCl (4.1.3) y 50 µL de una solución de 4-tert-butilfenol D13 (patrón interno) de 5 mg/L (4.1.4).

Cerrar el vial con una cápsula de cierre perforada con septum revestido de teflón (5.4).

## **7. Procedimiento GC-MS**

El siguiente procedimiento figura a modo de ejemplo. La técnica empleada (GC-MS) se puede ajustar y optimizar en función de la configuración del equipo.

### **7.1. Extracción**

Realizar una SPME en el espacio de cabeza durante 20 minutos a 40 °C.

## 7.2. Inyección

Llevar a cabo la desorción de la fibra en el inyector durante 10 minutos.

Inyector a 260 °C en modo splitless.

Flujo de helio: 1 mL/min.

## 7.3. Parámetros del cromatógrafo de gases

Columna: 5MS UI 30 m × 0,25 mm × 0,25 μm.

Temperatura de la línea de transferencia: 300 °C.

Temperatura del horno: 50 °C.

Después, 10 °C/min hasta alcanzar los 300 °C.

Por último, 300 °C durante 3 minutos.

Tiempo de desarrollo: 28,0 minutos.

Adquisición

Temperatura de la fuente: 250 °C.

Temperatura del cuadrupolo: 150 °C.

Adquisición: SIM

	Tiempo de desarrollo (min)	Iones (cuantit.)	Iones (cualit.)
2-terc-butilfenol	8.9	135	107-150
4-terc-butilfenol-d13 (IS)	9.1	145	113-163
4-terc-butilfenol	9.2	135	107-150
6-metil-2-terc-butylphenol	9.4	149	164-121
4-metil-2-terc-butilfenol	10.0	149	164-121
5-metil-2-terc-butilfenol	10.2	149	164-121
4,6-dimetil-2-terc-butilfenol	10.5	163	135-178

2,6-di-terc-butlfenol	11.2	191	206-192
2,4-di-terc-butlfenol	12.0	191	206-192

Tabla 1. Iones utilizados en la espectrometría de masas

## 8. Procedimiento GC-MS/MS

El siguiente procedimiento figura a modo de ejemplo. La técnica empleada (GC-MS/MS) se puede ajustar y optimizar en función de la configuración del equipo.

### 8.1. Extracción

Realizar una SPME en el espacio de cabeza durante 5 minutos a 40 °C.

### 8.2. Inyección

Llevar a cabo la desorción de la fibra en el inyector durante 8 minutos.

Inyector a 250 °C en modo pulsed-split con una relación de split de 2:1.

Flujo de helio: 2 mL/min.

### 8.3. Parámetros del cromatógrafo de gases

Columna: 5MS UI 30m x 0,25mm x 0,25µm o similar.

Temperatura de la línea de transferencia: 300 °C.

Temperatura del horno: 50 °C.

Después, 25 °C/min hasta alcanzar los 130 °C.

Después, 10 °C/min hasta alcanzar los 170 °C.

Después, 25 °C/min hasta alcanzar los 300 °C.

Por último, 300 °C durante 3 minutos.

Tiempo de desarrollo: 15,4 minutos.

### 8.4. Adquisición

Temperatura de la fuente: 250 °C.

Temperatura del cuadrupolo: 150 °C.

Adquisición: MRM.

	Tiempo de desarrollo (min)	Transiciones de cuantificación	Transiciones de cualificación
2-terc-butilfenol	5.0	135>107	150>107 & 150>135
4-terc-butilfenol-d13 (IS)	5.1	145>113	163>113 & 163>145
4-terc-butilfenol	5.2	135>107	150>107 & 150>135
6-metil-2-terc-butilfenol	5.3	149>121	164>121 & 164>149
4-metil-2-terc-butilfenol	5.7	149>121	164>121 & 164>149
5-metil-2-terc-butilfenol	5.8	149>121	164>121 & 164>149
4,6-dimetil-2-terc-butilfenol	6.1	163>135	178>135 & 178>163
2,6-di-terc-butylfenol	6.6	206>191	191>163 & 191>57
2,4-di-terc-butilfenol	7.2	191>57	191>163 & 206>191

Tabla 2. Iones utilizados en la espectrometría de masas en tándem

## 9. Expresión de los resultados

Los resultados se expresan en µg/L.

### Anexo 1: Resultados de la validación interna

La precisión se midió según un plan de ensayos intralaboratorio. Se prepararon 5 materiales para cubrir el ámbito de aplicación del método (1, 5, 25, 50 y 100 µg/L) con una matriz de vino sintética (solución hidroalcohólica al 12% (v/v), 6 µg/L de ácido tartárico, NaOH 1 mM para ajustar el pH a 3,5).

Cada uno de los materiales se analizó 5 veces en condiciones de precisión intermedia con 2 repeticiones por análisis. Los análisis se llevaron a cabo en septiembre y octubre de 2018.

Los cálculos se realizaron de conformidad con la Resolución OIV-OENO 418-2013,

“Guía práctica para la validación, el control de calidad y la estimación de la incertidumbre de un método de análisis enológico”.

GC-MS	% CV (k=2) Precisión intermedia	CVr (%) Repetibilidad	LQ validado
2-terc-butilfenol	6.7%	4.3%	1 µg/L
4-terc-butilfenol	7.3%	5.1%	1 µg/L
6-metil-2-terc-butilfenol	12.1%	10.2%	1 µg/L
4-metil-2-terc-butilfenol	6.0%	4.6%	1 µg/L
5-metil-2-terc-butilfenol	6.4%	4.9%	1 µg/L
4,6-dimetil-2-terc-butilfenol	12.7%	10.5%	1 µg/L
2,6-di-terc-butilfenol	19.5%	14.6%	1 µg/L
2,4-di-terc-butilfenol	11.9%	9.9%	1 µg/L

*Tabla 3. Resultados de precisión de la espectrometría de masas*

GC-MS/MS	% CV (k=2) Precisión intermedia	CVr (%) Repetibilidad	LQ validado
2-terc-butilfenol	11.3%	10.1%	1 µg/L
4-terc-butilfenol	10.4%	11.0%	1 µg/L
6-metil-2-terc-butilfenol	13.9%	13.5%	1 µg/L
4-metil-2-terc-butilfenol	11.1%	9.6%	1 µg/L
5-metil-2-terc-butilfenol	12.3%	10.3%	1 µg/L

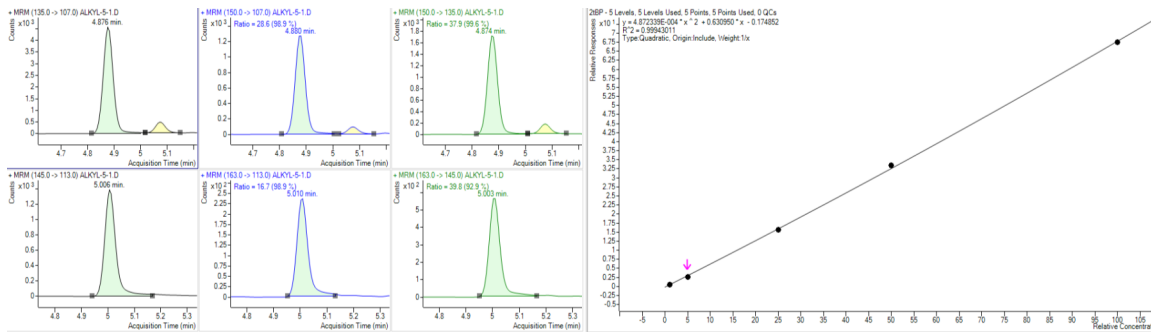


4,6-dimetil-2-terc-butilfenol	13.4%	12.6%	1 µg/L
2,6-di-terc-butilfenol	16.6%	16.8%	1 µg/L
2,4-di-terc-butilfenol	14.5%	12.4%	1 µg/L

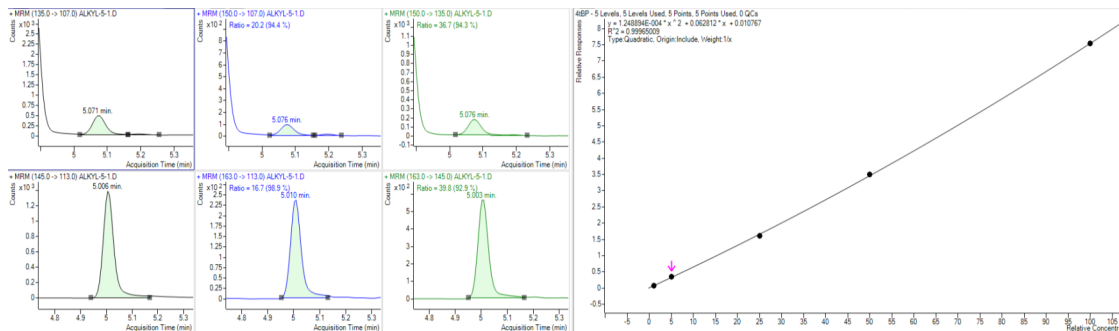
Tabla 4. Resultados de precisión de la espectrometría de masas en tándem

## Anexo 2: Ejemplos de cromatogramas y curvas de calibración

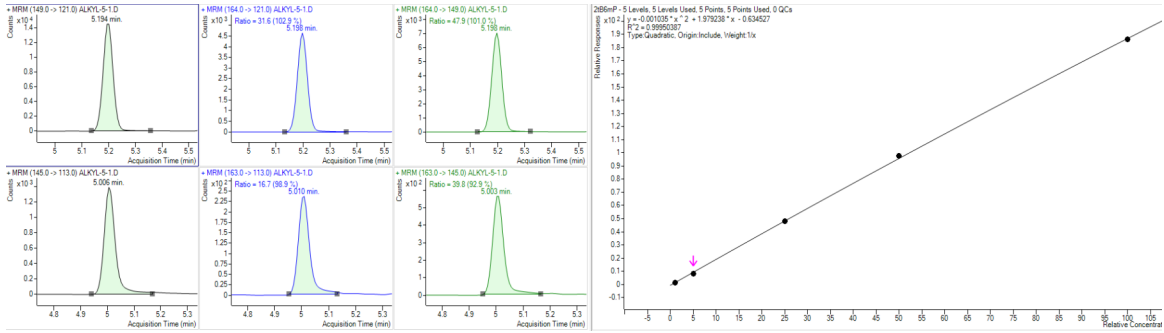
### 2-terc-Butilfenol



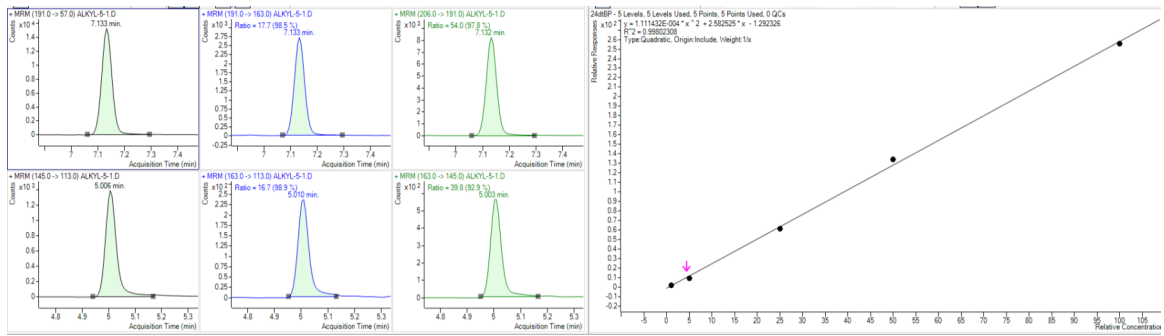
### 4-terc-Butilfenol



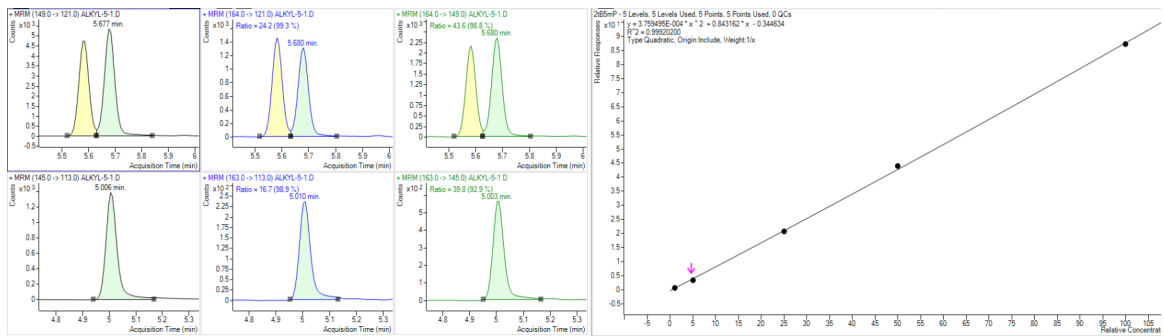
### 6-Metil-2-terc-butilfenol



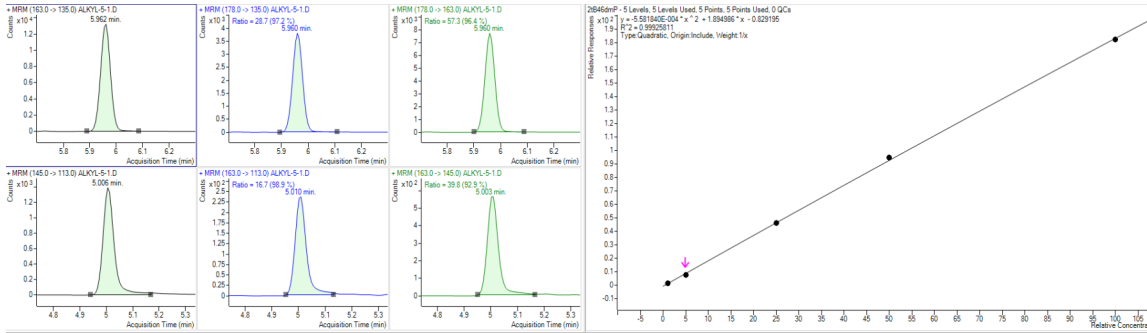
### 4-Metil-2-terc-butilfenol



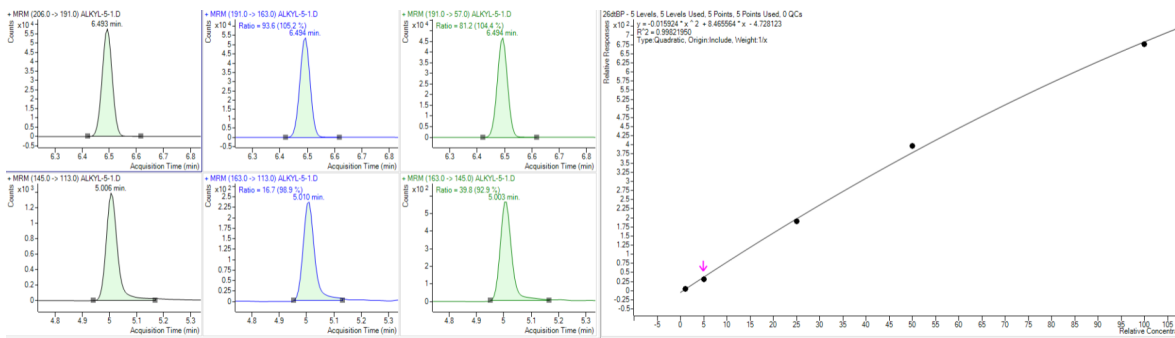
### 5-Metil-2-terc-butilfenol



### 4,6-Dimetil-2-terc-butilfenol



## 2,6-Di-terc-butilfenol



## 2,4-Di-terc-butilfenol

