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

Certificado conforme París videoconferencia 26 de noviembre de 2020
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea General
Pau ROCA

© OIV 2020

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)

Certificado conforme París videoconferencia 26 de noviembre de 2020
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea General
Pau ROCA

© OIV 2020

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 1□g/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

Certificado conforme París videoconferencia 26 de noviembre de 2020
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea General
Pau ROCA

© OIV 2020

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□□L, 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□mg.

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□mL (5.4), introducir 10□mL de vino, unos 2□g de NaCl (4.1.3) y 50□µL de una solución de 4-terc-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.

Certificado conforme París videoconferencia 26 de noviembre de 2020
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea General
Pau ROCA

© OIV 2020

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

Certificado conforme París videoconferencia 26 de noviembre de 2020
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea General
Pau ROCA

© OIV 2020

2,6-di-terc-butlfenol	11.2	191	206-192
2,4-di-terc-butilfenol	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 30□m□×□0,25□mm□x□0,25□µm 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.

Certificado conforme París videoconferencia 26 de noviembre de 2020
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea General
Pau ROCA

© OIV 2020

	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-methil-2-terc-butilfenol	5.8	149>121	164>121 & 164>149
4,6-dimethil-2-terc-butilfenol	6.1	163>135	178>135 & 178>163
2,6-di-terc-butyilfenol	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□g/L de ácido tartárico, NaOH 1□M 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,

Certificado conforme París videoconferencia 26 de noviembre de 2020
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea General
Pau ROCA

© OIV 2020

"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

Certificado conforme París videoconferencia 26 de noviembre de 2020
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea General
Pau ROCA

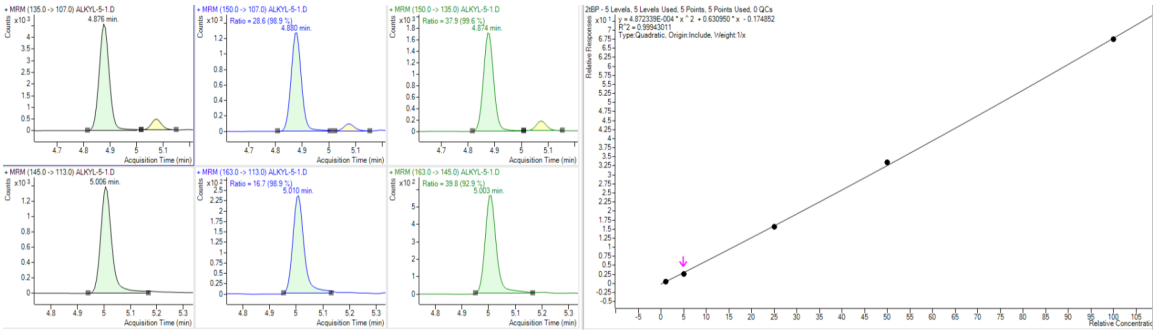
© OIV 2020

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

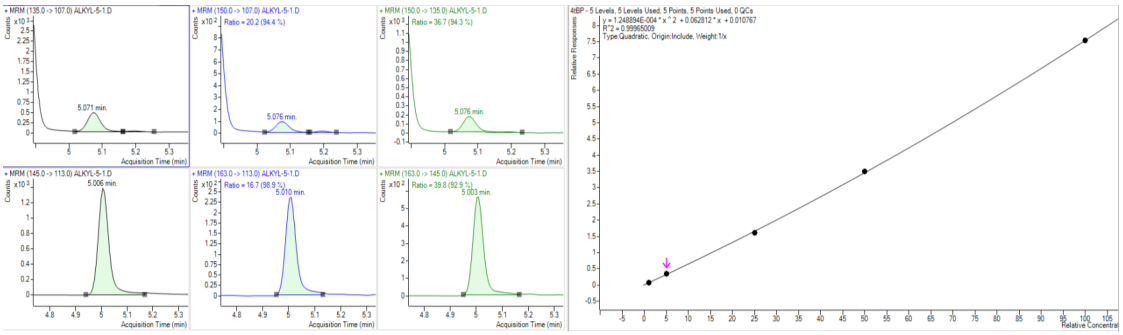
Tabla 4. Resultados de precisión de la espectrometría de masas en tándem

Anexo 2: Ejemplos de cromatogramas y curvas de calibración

2-terc-Butilfenol



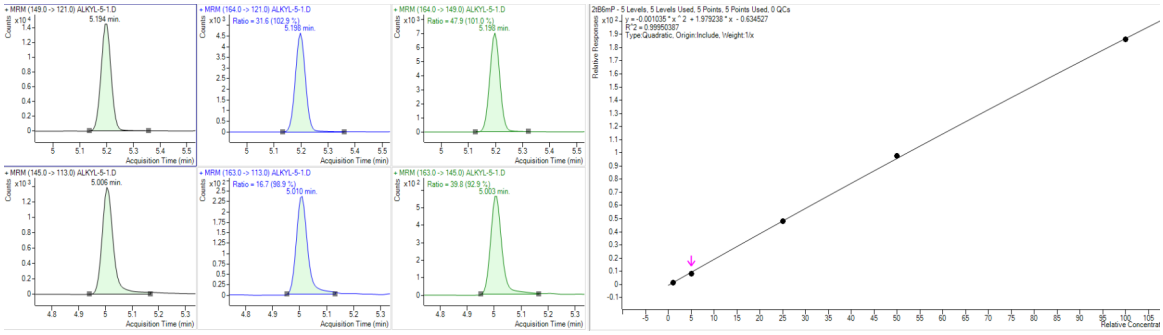
4-terc-Butilfenol



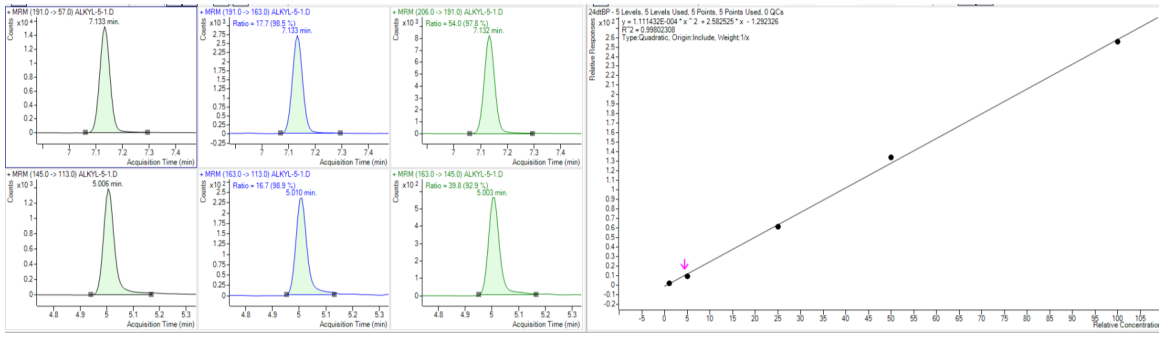
6-Metil-2-terc-butilfenol

© OIV 2020

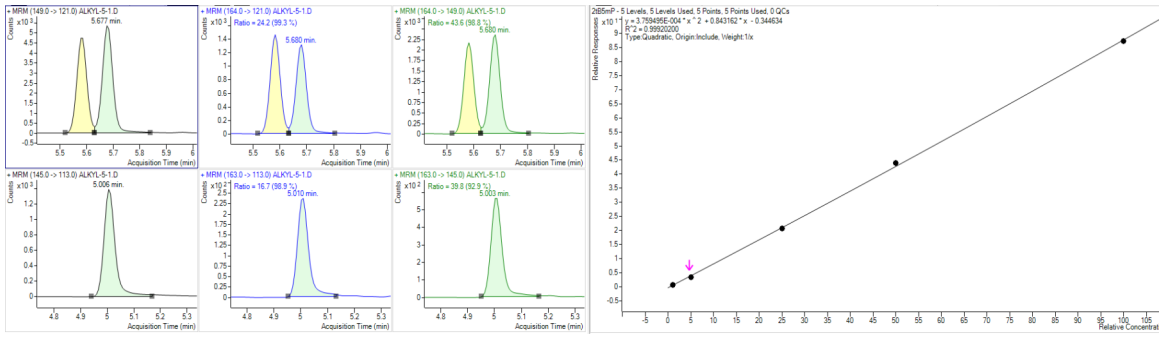
Certificado conforme París videoconferencia 26 de noviembre de 2020
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea General
Pau ROCA



4-Metil-2-terc-butilfenol



5-Metil-2-terc-butilfenol



4,6-Dimetil-2-terc-butilfenol

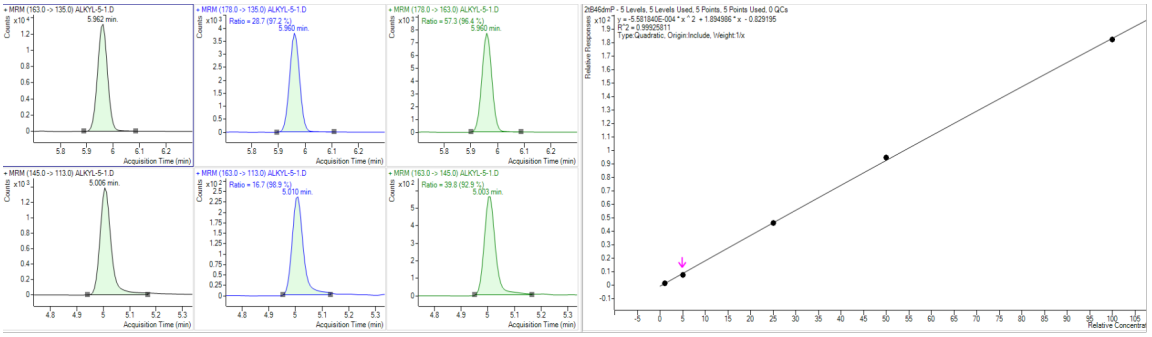
© OIV 2020

Certificado conforme París videoconferencia 26 de noviembre de 2020

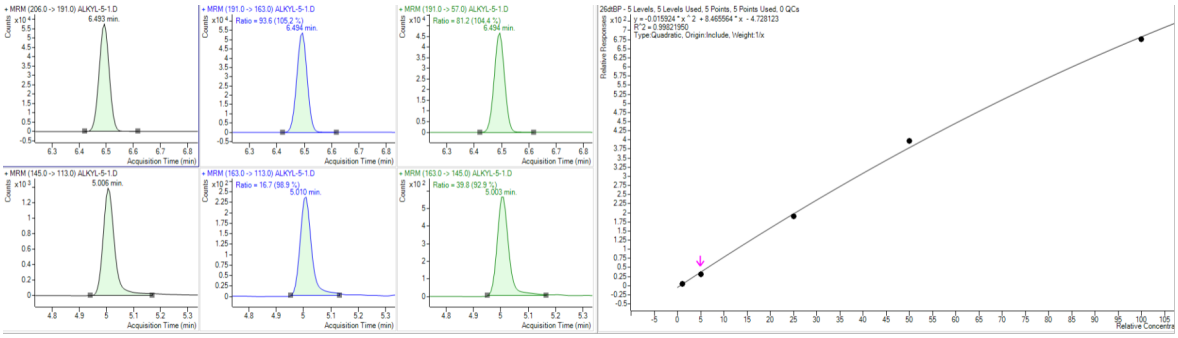
El Director General de la OIV

Secretario de la Asamblea General

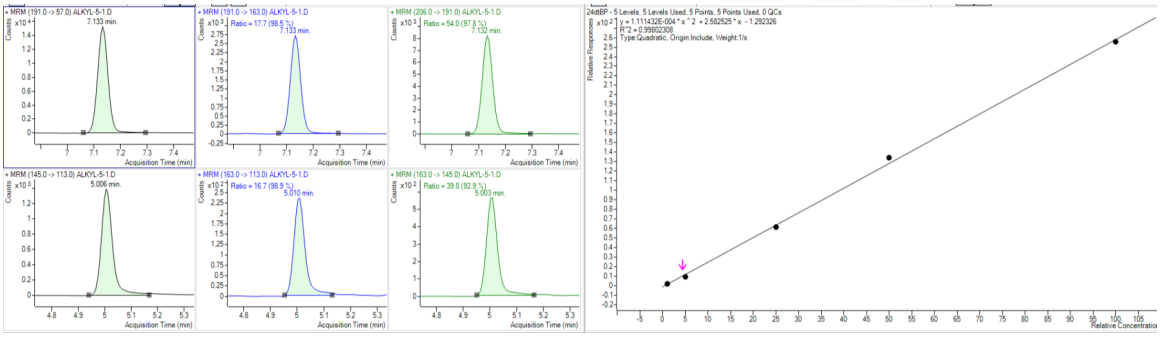
Pau ROCA



2,6-Di-terc-butilfenol



2,4-Di-terc-butilfenol



Certificado conforme París videoconferencia 26 de noviembre de 2020

El Director General de la OIV

Secretario de la Asamblea General

Pau ROCA

© OIV 2020