



## 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- <i>terc</i> -butilfenol	1 - 100 µg/L
• 4- <i>terc</i> -butilfenol	1 - 100 µg/L
• 6-metil-2- <i>terc</i> -butilfenol	1 - 100 µg/L
• 4-metil-2- <i>terc</i> -butilfenol	1 - 100 µg/L
• 5-metil-2- <i>terc</i> -butilfenol	1 - 100 µg/L
• 4,6-dimetil-2- <i>terc</i> -butilfenol	1 - 100 µg/L
• 2,6-di- <i>terc</i> -butilfenol	1 - 100 µg/L
• 2,4-di- <i>terc</i> -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.

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



### 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 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.

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



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 tandem
- 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
- 5.7. Material volumétrico de vidrio

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

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-*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.

## 7.4. Adquisición

Temperatura de la fuente: 250 °C.  
Temperatura del cuadrupolo: 150 °C.  
Adquisición: SIM

	Tiempo de desarrollo (min)	Iones (cuantit.)	Iones (cualit.)
2- <i>terc</i> -butilfenol	8,9	135	107 - 150
4- <i>terc</i> -butilfenol D13 (PI)	9,1	145	113 - 163
4- <i>terc</i> -butilfenol	9,2	135	107 - 150
6-metil-2- <i>terc</i> -butilfenol	9,4	149	164 - 121
4-metil-2- <i>terc</i> -butilfenol	10,0	149	164 - 121
5-metil-2- <i>terc</i> -butilfenol	10,2	149	164 - 121
4,6-dimetil-2- <i>terc</i> -butilfenol	10,5	163	135 - 178
2,6-di- <i>terc</i> -butilfenol	11,2	191	206 - 192
2,4-di- <i>terc</i> -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 x 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.

	Tiempo de desarrollo (min)	Transiciones de cuantificación	Transiciones de cualificación
2- <i>terc</i> -butilfenol	5,0	135>107	150>107 y 150>135
4- <i>terc</i> -butilfenol D13 (PI)	5,1	145>113	163>113 y 163>145
4- <i>terc</i> -butilfenol	5,2	135>107	150>107 y 150>135
6-metil-2- <i>terc</i> -butilfenol	5,3	149>121	164>121 y 164>149
4-metil-2- <i>terc</i> -butilfenol	5,7	149>121	164>121 y 164>149
5-metil-2- <i>terc</i> -butilfenol	5,8	149>121	164>121 y 164>149
4,6-dimetil-2- <i>terc</i> -butilfenol	6,1	163>135	178>135 y 178>163
2,6-di- <i>terc</i> -butilfenol	6,6	206>191	191>163 y 191>57
2,4-di- <i>terc</i> -butilfenol	7,2	191>57	191>163 y 206>191

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

## 9. Expresión de los resultados

Los resultados se expresan en µg/L.

## 10. 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).

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



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	CV <sub>r</sub> (%) (k = 2) Repetibilidad	L <sub>Q</sub> validado
2- <i>terc</i> -butilfenol	6,7 %	4,3 %	1 µg/L
4- <i>terc</i> -butilfenol	7,3 %	5,1 %	1 µg/L
6-metil-2- <i>terc</i> -butilfenol	12,1 %	10,2 %	1 µg/L
4-metil-2- <i>terc</i> -butilfenol	6,0 %	4,6 %	1 µg/L
5-metil-2- <i>terc</i> -butilfenol	6,4 %	4,9 %	1 µg/L
4,6-dimetil-2- <i>terc</i> - butilfenol	12,7 %	10,5 %	1 µg/L
2,6-di- <i>terc</i> -butilfenol	19,5 %	14,6 %	1 µg/L
2,4-di- <i>terc</i> -butilfenol	11,9 %	9,9 %	1 µg/L

Tabla 3. Resultados de precisión de la espectrometría de masas

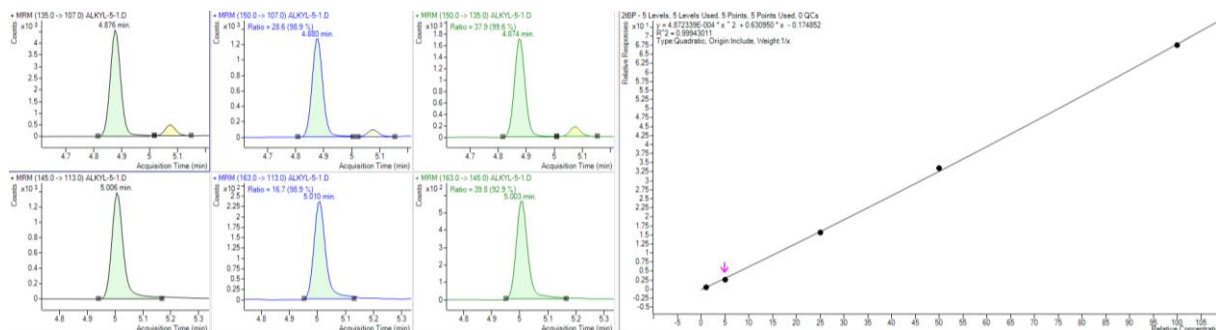
GC-MS/MS	CV % (k = 2) Precisión intermedia	CV <sub>r</sub> (%) (k = 2) Repetibilidad	L <sub>Q</sub> validado
2- <i>terc</i> -butilfenol	11,3 %	10,1%	1 µg/L
4- <i>terc</i> -butilfenol	10,4 %	11,0 %	1 µg/L
6-metil-2- <i>terc</i> -butilfenol	13,9 %	13,5 %	1 µg/L
4-metil-2- <i>terc</i> -butilfenol	11,1 %	9,6 %	1 µg/L
5-metil-2- <i>terc</i> -butilfenol	12,3 %	10,3 %	1 µg/L
4,6-dimetil-2- <i>terc</i> - butilfenol	13,4 %	12,6 %	1 µg/L
2,6-di- <i>terc</i> -butilfenol	16,6 %	16,8 %	1 µg/L
2,4-di- <i>terc</i> -butilfenol	14,5 %	12,4 %	1 µg/L

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

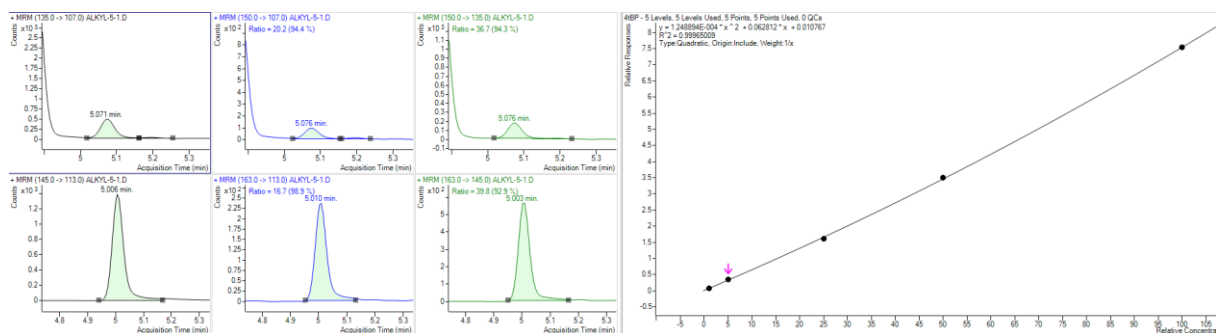


## 11. Anexo 2: Ejemplos de cromatogramas y curvas de calibración

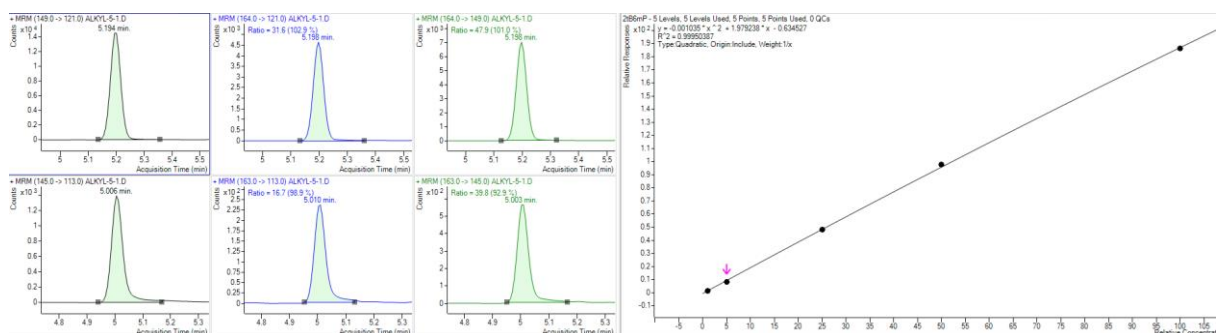
### 11.1. 2-*terc*-Butilfenol



### 11.2. 4-*terc*-Butilfenol

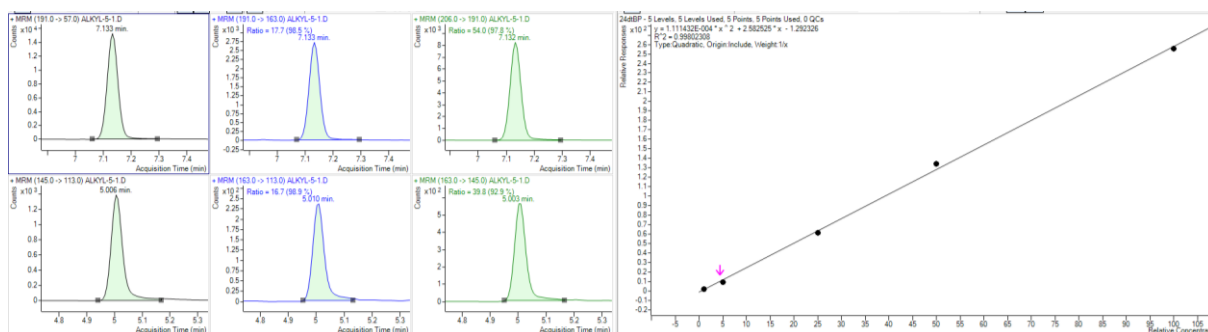


### 11.3. 6-Metil-2-*terc*-butilfenol

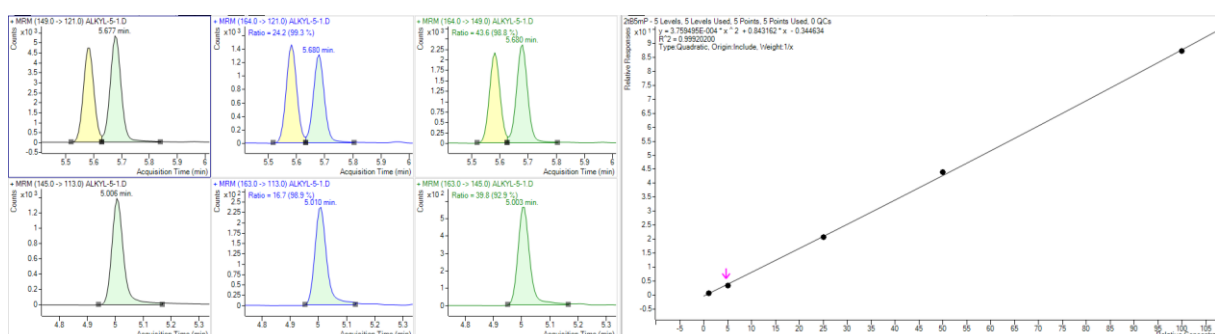




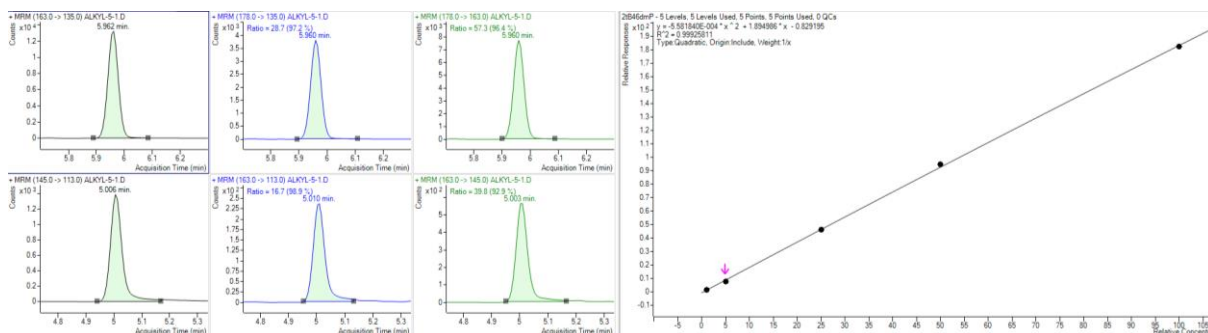
#### 11.4. 4-Metil-2-*terc*-butilfenol



#### 11.5. 5-Metil-2-*terc*-butilfenol



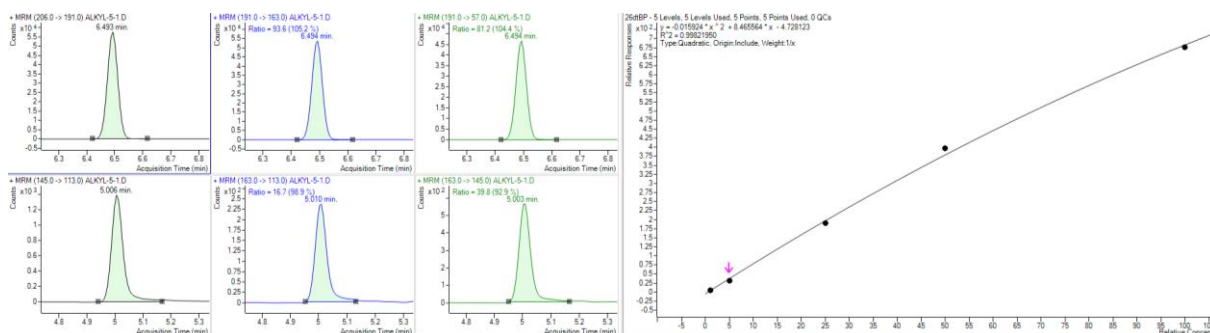
#### 11.6. 4,6-Dimetil-2-*terc*-butilfenol







## 11.7. 2,6-Di-*terc*-butilfenol



## 11.8. 2,4-Di-*terc*-butilfenol

