



## RISOLUZIONE OIV-OENO 620-2020

DOSAGGIO DEGLI ALCHILFENOLI NEI VINI MEDIANTE GASCROMATOGRAFIA E SPETTROMETRIA DI MASSA (GC-MS oppure GC-MS/MS)

L'ASSEMBLEA GENERALE,

VISTO L'ARTICOLO 2, paragrafo 2 b) iv dell'Accordo del 3 aprile 2001 che istituisce l'Organizzazione internazionale della vigna e del vino,

SU PROPOSTA della Sottocommissione "Metodi di analisi",

DECIDE di completare la *Raccolta dei metodi internazionali di analisi dei vini e dei mosti* con il metodo seguente:

DOSAGGIO DEGLI ALCHILFENOLI NEI VINI MEDIANTE GASCROMATOGRAFIA E SPETTROMETRIA DI MASSA (GC-MS oppure GC-MS/MS)

**(Metodo di Tipo IV)**

### 1. Campo d'applicazione

Il metodo qui descritto consente il dosaggio delle molecole seguenti:

	Intervallo studiato
• 2-terz-butilfenolo	1 - 100 µg/L
• 4-terz-butilfenolo	1 - 100 µg/L
• 6-metil-2-terz-butilfenolo	1 - 100 µg/L
• 4-metil-2-terz-butilfenolo	1 - 100 µg/L
• 5-metil-2-terz-butilfenolo	1 - 100 µg/L
• 4,6-di-metil-2-terz-butilfenolo	1 - 100 µg/L
• 2,6-di-terz-butilfenolo	1 - 100 µg/L
• 2,4-di-terz-butilfenolo	1 - 100 µg/L

### 2. Riferimenti normativi

- ISO 78-2: Chimica – Standard,
- ISO 3696: Acqua per uso analitico in laboratorio,
- risoluzione OIV OENO 418-2013.

Esemplare certificato conforme Parigi-videoconferenza, il 26 novembre 2020  
Il Direttore Generale dell'OIV  
Segretario dell'Assemblea Generale  
Pau ROCA



### 3. Principio del metodo

Il metodo descrive da un lato l'analisi mediante gascromatografia accoppiata con uno spettrometro di massa (GC-MS) mentre, dall'altro, l'analisi mediante gascromatografia accoppiata con uno spettrometro di massa in tandem (GC-MS/MS).

Il campione viene estratto nello spazio di testa utilizzando la tecnica di microestrazione in fase solida (SPME).

### 4. Reagenti e soluzioni di lavoro

Nel corso dell'analisi, salvo indicazione contraria, utilizzare unicamente reagenti di qualità analitica riconosciuta e acqua distillata o demineralizzata (oppure acqua di purezza equivalente).

#### 4.1. Reagenti

- 4.1.1. Acqua per uso analitico (norma ISO 3696), di qualità I o II
- 4.1.2. Etanolo assoluto (N. CAS 64-17-5)
- 4.1.3. Cloruro di sodio (N. CAS 7647-14-5)
- 4.1.4. 4-terz-butilfenolo D13 (N. CAS 225386-58-3)
- 4.1.5. 4-terz-butilfenolo (N. CAS 98-54-4)
- 4.1.6. 2-terz-butilfenolo (N. CAS 88-18-6)
- 4.1.7. 4-metil-2-terz-butilfenolo (N. CAS 2409-55-4)
- 4.1.8. 5-metil-2-terz-butilfenolo (N. CAS 88-60-8)
- 4.1.9. 6-metil-2-terz-butilfenolo (N. CAS 2219-82-1)
- 4.1.10. 4,6-di-metil-2-terz-butilfenolo (N. CAS 1879-09-0)
- 4.1.11. 2,4-di-terz-butilfenolo (N. CAS 96-76-4)
- 4.1.12. 2,6-di-terz-butilfenolo (N. CAS 128-39-2)

#### 4.2. Soluzioni madre

Per ogni alchilfenolo e per lo standard interno (ad esempio: 4-terz-butilfenolo D13) si preparano singole soluzioni madre a 1 g/L in etanolo.

A partire dalle singole soluzioni madre, si preparano delle soluzioni figlie miscelate in etanolo alle concentrazioni desiderate, in modo da coprire l'intero intervallo di misura.

#### 4.3. Soluzioni di calibrazione

Al fine di assicurare la massima tracciabilità rispetto al Sistema internazionale di unità di misura (SI), l'intervallo di calibrazione deve essere realizzato con soluzioni e polveri pure (elevato grado di purezza) dei diversi alchilfenoli, preparate per pesata o volumetria con tracciabilità metrologica rispetto al SI.



L'intervallo di calibrazione è realizzato con soluzioni al 12% (v/v) di etanolo (4.1.2) nell'intervallo di misura (da 1 a 100  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), ad esempio in 5 punti. Queste soluzioni vengono preparate al momento dell'analisi e devono essere utilizzate subito dopo la preparazione (entro qualche ora).

L'equazione di calibrazione che si ottiene è in genere una funzione quadratica.

## 5. Strumentazione

- 5.1. Sistema GC-MS dotato di iniettore "split-splitless" e rivelatore a spettrometria di massa o a spettrometria di massa in tandem
- 5.2. Colonna capillare con fase stazionaria apolare, 5% di fenilmetilpolisilossano (ad es. 5MS, 30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$  di film) o equivalente
- 5.3. Micropipette da 100  $\mu\text{L}$ , 1 mL e 10 mL graduate
- 5.4. Vial per SPME da 20 mL, richiudibili con capsula a vite forata e setto in teflon
- 5.5. Sistema di microestrazione in fase solida (SPME), con fibra rivestita con un film in polidimetilsilossano dello spessore di 100  $\mu\text{m}$  o equivalente
- 5.6. Bilancia

Questa deve essere tracciabile rispetto al SI e avere una precisione di 0,1 mg.

- 5.7. Vetreria da laboratorio

La vetreria per la preparazione dei reagenti e delle soluzioni di calibrazione deve essere di classe A.

## 6. Preparazione dei campioni

Nell'ambito del presente documento lo standard interno 4-terz-butilfenolo D13 è utilizzato a titolo esemplificativo; è possibile usare altri standard interni.

Porre 10 mL di vino in un vial per SPME in vetro da 20 mL (5.4) con 2 g circa di NaCl (4.1.3) e 50  $\mu\text{L}$  di soluzione di 4-terz-butilfenolo D13 (standard interno) a una concentrazione di 5 mg/L (4.1.4).

Chiudere bene il vial con una capsula a vite forata e setto in teflon (5.4).

## 7. Procedimento GC-MS

*Il procedimento fornito è solo a titolo esemplificativo. La tecnica GC-MS utilizzata consente infatti varianti oppure ottimizzazioni necessarie per ogni configurazione della strumentazione.*

- 7.1. Estrazione

Estrazione nello spazio di testa; effettuare la SPME per 20 minuti a 40 °C.



## 7.2. Iniezione

Effettuare il desorbimento della fibra per 10 minuti nell'iniettore.  
Iniettore a 260 °C in modalità splitless.  
Flusso di elio: 1 mL/min.

## 7.3. Parametri del gascromatografo

Colonna: 5MS UI 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm  
Temperatura della linea di trasferimento: 300 °C  
Forno: 50 °C  
Poi 10 °C/min fino a 300 °C  
E quindi a 300 °C per 3 minuti  
Durata della corsa: 28,0 minuti

## 7.4. Acquisizione

Temperatura sorgente: 250 °C  
Temperatura Quad: 150 °C  
Acquisizione: SIM

	Durata della corsa (min)	Ioni (Quant.)	Ioni (Qual.)
2-terz-butilfenolo	8,9	135	107 - 150
4-terz-butilfenolo D13 (IS)	9,1	145	113 - 163
4-terz-butilfenolo	9,2	135	107 - 150
6-metil-2-terz-butilfenolo	9,4	149	164 - 121
4-metil-2-terz-butilfenolo	10,0	149	164 - 121
5-metil-2-terz-butilfenolo	10,2	149	164 - 121
4,6-dimetil-2-terz-butilfenolo	10,5	163	135 - 178
2,6-di-terz-butilfenolo	11,2	191	206 - 192
2,4-di-terz-butilfenolo	12,0	191	206 - 192

Tabella 1: Ioni utilizzati nella spettrometria di massa

## 8. Procedimento GC-MS/MS

*Il procedimento fornito è solo a titolo esemplificativo. La tecnica GC-MS/MS utilizzata consente infatti varianti oppure ottimizzazioni necessarie per ogni configurazione della strumentazione.*

### 8.1. Estrazione

Estrazione nello spazio di testa; effettuare la SPME per 5 minuti a 40 °C.

### 8.2. Iniezione

Effettuare il desorbimento della fibra per 8 minuti nell'iniettore.  
Iniettore a 250 °C in modalità pulsed-split con un rapporto 2:1.

Esemplare certificato conforme Parigi-videoconferenza, il 26 novembre 2020  
Il Direttore Generale dell'OIV  
Segretario dell'Assemblea Generale  
Pau ROCA



Flusso di elio: 2 mL/min.

### 8.3. Parametri del gascromatografo

Colonna: 5MS UI 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm o equivalente

Temperatura della linea di trasferimento: 300 °C

Forno: 50 °C

Poi a 25 °C/min fino a 130 °C

Segue a 10 °C/min fino a 170 °C

Successivamente a 25 °C/min fino a 300 °C

E quindi a 300 °C per 3 min

Durata della corsa: 15,4 min

### 8.4. Acquisizione

Temperatura sorgente: 250 °C

Temperatura Quad: 150 °C

Acquisizione: MRM

	Durata della corsa (min)	Transizioni di quantificazione	Transizioni di qualificazione
2-terz-butilfenolo	5,0	135>107	150>107 & 150>135
4-terz-butilfenolo D13 (IS)	5,1	145>113	163>113 & 163>145
4-terz-butilfenolo	5,2	135>107	150>107 & 150>135
6-metil-2-terz-butilfenolo	5,3	149>121	164>121 & 164>149
4-metil-2-terz-butilfenolo	5,7	149>121	164>121 & 164>149
5-metil-2-terz-butilfenolo	5,8	149>121	164>121 & 164>149
4,6-dimetil-2-terz-butilfenolo	6,1	163>135	178>135 & 178>163
2,6-di-terz-butilfenolo	6,6	206>191	191>163 & 191>57
2,4-di-terz-butilfenolo	7,2	191>57	191>163 & 206>191

Tabella 2: Ioni utilizzati nella spettrometria di massa in tandem

## 9. Espressione dei risultati

I risultati sono espressi in µg/L.

## 10. Allegato 1: Risultati di validazione interna

Le prestazioni sono state misurate con un piano sperimentale intra-laboratorio: 5 materiali che coprono il campo d'applicazione del metodo (1; 5; 25; 50; 100 µg/L) sono stati costituiti mediante preparazione in una matrice di vino sintetica (soluzione idroalcolica al 12% (v/v), acido tartarico 6 g/L, portata a pH 3,5 con NaOH 1M).

Ogni materiale è stato analizzato 5 volte in condizioni di precisione intermedia con 2 ripetizioni per ogni analisi. Le analisi sono state effettuate in settembre e ottobre 2018.



I calcoli sono stati realizzati conformemente alla risoluzione OIV-OENO 418-2013: “Guida pratica per la convalida, il controllo qualità e lo studio delle incertezze di un metodo di analisi enologico”.

<b>GC-MS</b>	CV % (k=2) Precisione intermedia	CVr (%) (k=2) Ripetibilità	LOQ validato
2-terz-butilfenolo	6,7%	4,3%	1 µg/L
4-terz-butilfenolo	7,3%	5,1%	1 µg/L
6-metil-2-terz-butilfenolo	12,1%	10,2%	1 µg/L
4-metil-2-terz-butilfenolo	6,0%	4,6%	1 µg/L
5-metil-2-terz-butilfenolo	6,4%	4,9%	1 µg/L
4,6-dimetil-2-terz-butilfenolo	12,7%	10,5%	1 µg/L
2,6-di-terz-butilfenolo	19,5%	14,6%	1 µg/L
2,4-di-terz-butilfenolo	11,9%	9,9%	1 µg/L

Tabella 3: Dati prestazionali ottenuti con la spettrometria di massa

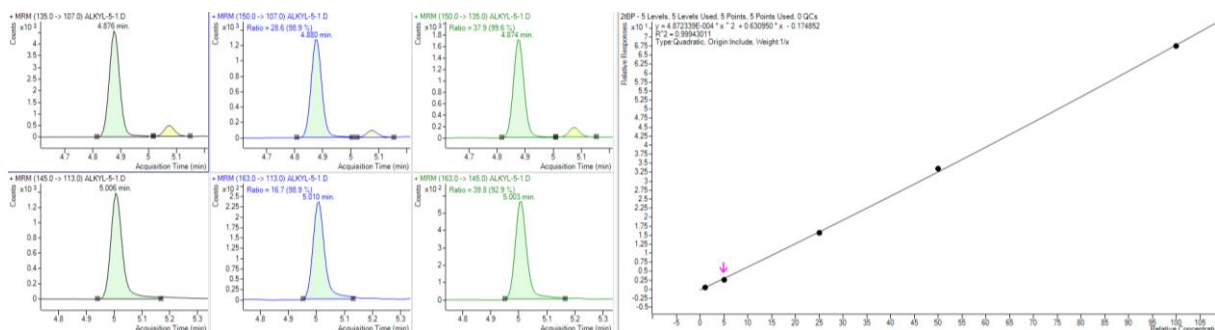
<b>GC-MS/MS</b>	CV % (k=2) Precisione intermedia	CVr (%) (k=2) Ripetibilità	LOQ validato
2-terz-butilfenolo	11,3%	10,1%	1 µg/L
4-terz-butilfenolo	10,4%	11,0%	1 µg/L
6-metil-2-terz-butilfenolo	13,9%	13,5%	1 µg/L
4-metil-2-terz-butilfenolo	11,1%	9,6%	1 µg/L
5-metil-2-terz-butilfenolo	12,3%	10,3%	1 µg/L
4,6-dimetil-2-terz-butilfenolo	13,4%	12,6%	1 µg/L
2,6-di-terz-butilfenolo	16,6%	16,8%	1 µg/L
2,4-di-terz-butilfenolo	14,5%	12,4%	1 µg/L

Tabella 4: Dati prestazionali ottenuti con la spettrometria di massa in tandem

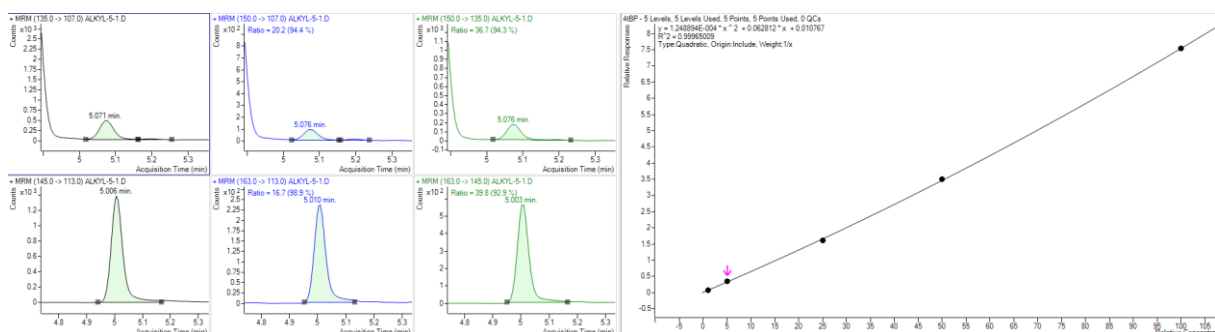


## 11. Allegato 2: Esempi di cromatogrammi e curve di calibrazione

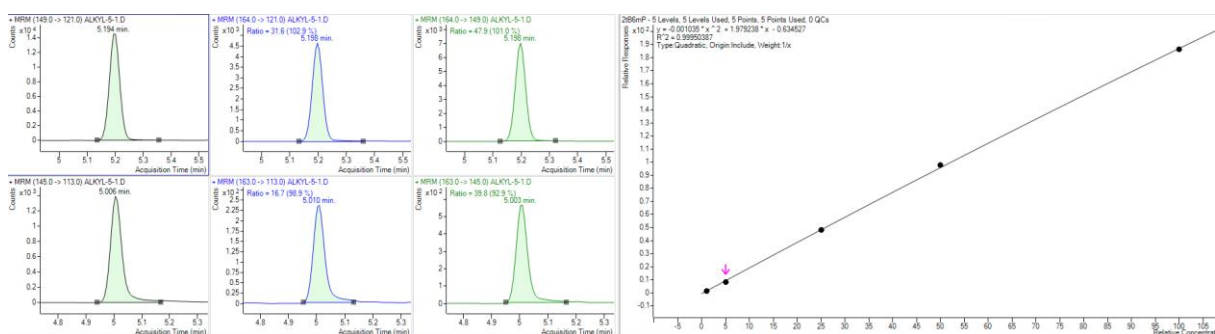
### 11.1. 2-terz-butilfenolo



### 11.2. 4-terz-butilfenolo



### 11.3. 6-metil-2-terz-butilfenolo

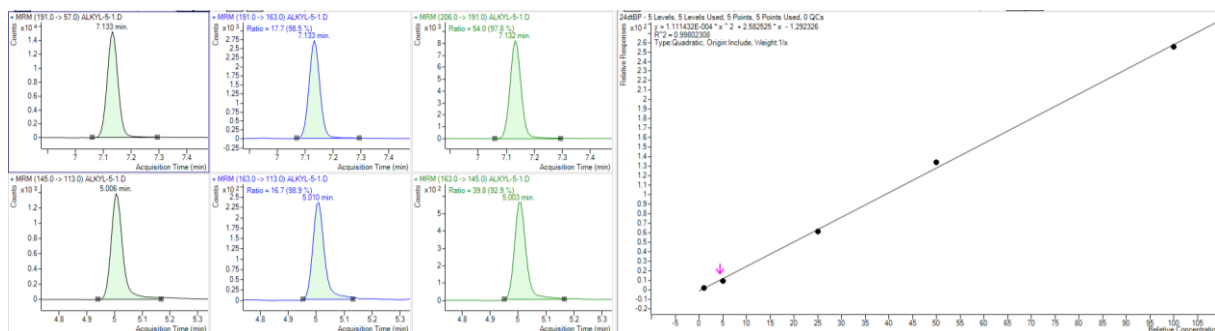


Esemplare certificato conforme Parigi-videoconferenza, il 26 novembre 2020

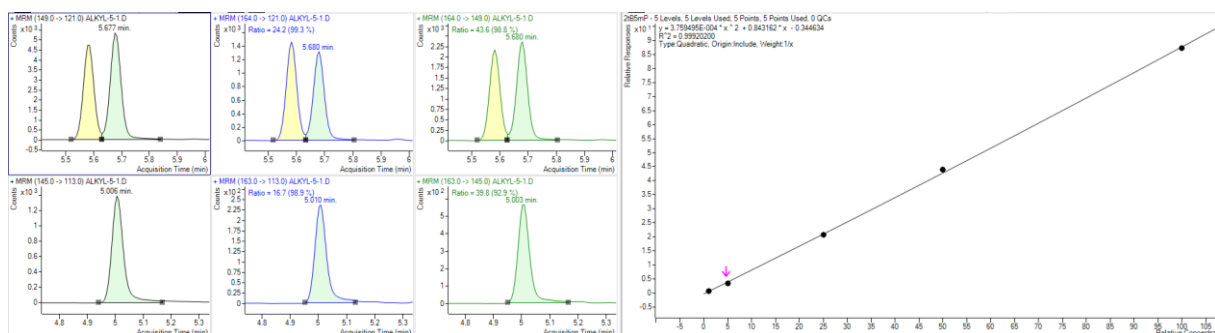
Il Direttore Generale dell'OIV  
Segretario dell'Assemblea Generale  
Pau ROCA



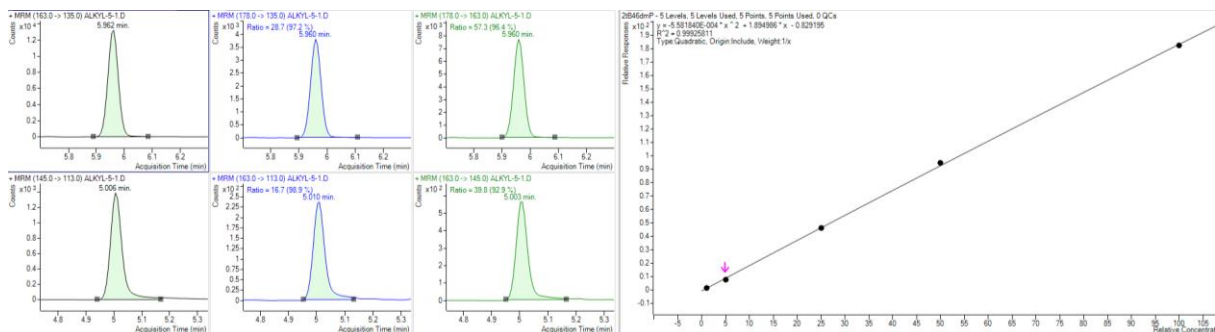
#### 11.4. 4-metil-2-terz-butilfenolo



#### 11.5. 5-metil-2-terz-butilfenolo



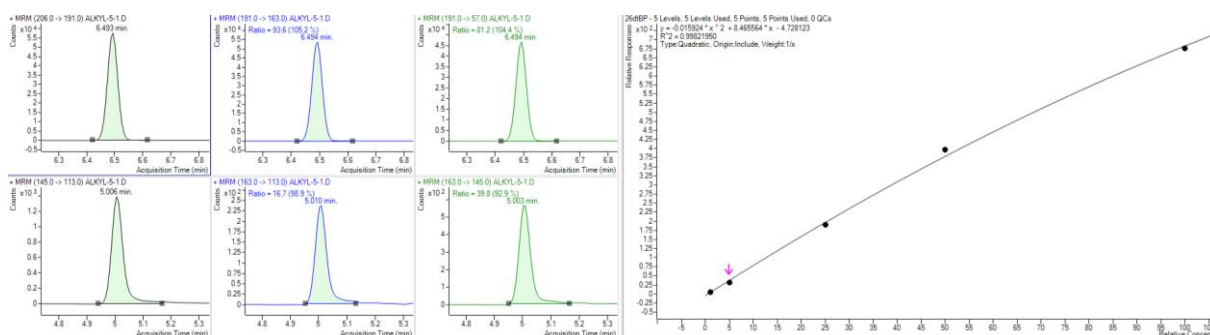
#### 11.6. 4,6-dimetil-2-terz-butilfenolo







## 11.7. 2,6-di-terz-butilfenolo



## 11.8. 2,4-di-terz-butilfenolo

