

DETERMINACIÓN DE CONGÉNERES EN ALCOHOL EXTRA NEUTRO RECTIFICADO EMPLEADO EN LA ELABORACION DE BEBIDAS ALCOHÓLICAS

CONGENERS DETERMINATION IN EXTRA NEUTRAL RECTIFIED ALCOHOL USED IN THE ALCOHOLIC BEVERAGES ELABORATION

DETERMINAÇÃO DE CONGÉNERES EXTRANEUTRO ÁLCOOL RECTIFICADO UTILIZADAS NA FABRICAÇÃO DE BEBIDAS ALCOÓLICAS

FERNANDO JOSÉ HERNÁNDEZ¹, VICTORIA EUGENIA RECALDE², AYDA MARCELA ERAZO³

RESUMEN

La Norma Técnica Colombiana NTC 4118 establece la presencia de 19 congéneres en bebidas alcohólicas, donde se incluyen ácidos, aldehídos, ésteres y alcoholes superiores. La concentración de estos compuestos debe ser < 80 mg.L-1, para que el producto pueda ser distribuido comercialmente. El aumento en la concentración de éstos compuestos involucra cambios en el aroma, el gusto, y hasta problemas en la salud del consumidor. Se presenta la estandarización y validación de una técnica analítica cromatográfica (GC/FID) para la determinación de congéneres en alcohol extra neutro rectificado para la elaboración de bebidas alcohólicas, llevado a cabo en la Industria Licorera del Cauca (I.L.C.). La sensibilidad de la técnica con límites de detección (entre 0,2 y 0,9 mg.L-1) y cuantificación (0,7 y 2,8 mg.L-1), la repetibilidad y precisión intermedia (Shapiro Wilk W(5gl) < 0,986

Recibido para evaluación: 4 de Agosto de 2014. **Aprobado para publicación:** 17 de Abril de 2015.

- 1 Universidad del Cauca, Departamento de Química, Grupo de Investigación en Química de Compuestos Bioactivos. Magister en Ciencias Químicas. Popayán, Colombia.
- 2 Universidad del Cauca, Departamento de Química, Grupo de Investigación en Química de Compuestos Bioactivos. Química. Popayán, Colombia.
- 3 Universidad del Cauca, Departamento de Química, Grupo de Investigación en Química de Compuestos Bioactivos. Química. Popayán, Colombia

Correspondencia: fjhernandez@unicauca.edu.co.

y $W(12\text{gl}) < 0,979$ respectivamente), junto con la linealidad (correlación de Pearson $0,998_{N=40}$ y $0,977_{N=96}$) permitieron validar la metodología con alta exactitud y con ello obtener resultados con alta precisión sobre la ausencia de congêneres (concentración $< LOD$) y en el caso particular del sec-butil acetato ($< 80 \text{ mg.L}^{-1}$) el control de calidad y la certeza de un producto en excelentes condiciones.

ABSTRACT

The Colombian Technical Standard NTC 4118 establishes 19 congeners presents in alcoholic beverages such as acids, aldehydes, esters and higher alcohols are included. The compounds concentration must be $< 80 \text{ mg.L}^{-1}$, for the product can be commercially distributed. The increases of compounds concentration involve aroma changes, taste, and human health problems. Standardization and validation of an analytical chromatographic technique (GC/FID) for congeners determination in extra neutral alcohol for alcoholic beverages production, carry out in Industria Licorera del Cauca (I.L.C.) is presented in this article. The validation methodology was performed by determining of sensitivity with detection limit ($0,2$ to $0,9 \text{ mg.L}^{-1}$) and quantification limit ($0,7$ and $2,8 \text{ mg.L}^{-1}$), the intermediate precision and repeatability (Shapiro Wilk $W_{(g=5)} < 0,986$ and $W_{(g=12)} < 0,979$ respectively), in conjunction with linearity (Pearson correlation $0,977_{N=40}$, $0,998_{N=96}$) it yielded results with high accuracy and determine congeners absence (concentration $< LOD$) and sec-butyl acetate case ($< 80 \text{ mg.L}^{-1}$) ensuring quality control and product in excellent condition.

RESUMO

A Colombiana Norma Técnica NTC 4118 estabelece a presença de 19 congêneres em bebidas alcoólicas, onde ácidos, aldeídos, ésteres e álcoois superiores estão incluídos. A concentração destes compostos deve ser $< 80 \text{ mg.L}^{-1}$, de modo que o produto pode ser distribuído comercialmente. O aumento da concentração desses compostos envolvem alterações no aroma, sabor, e problemas com a saúde dos consumidores. É apresentado a validação de uma técnica cromatográfica analítica (GC/FID) para a determinação de congêneres na moagem para a produção de bebidas alcoólicas álcool extra neutro, realizado no Industria Licorera del Cauca (I.L.C.) é apresentada. Sensibilidade da técnica com limites de detecção ($0,2$ a $0,9 \text{ mg.L}^{-1}$) e de quantificação ($0,7$ e $2,8 \text{ mg.L}^{-1}$), precisão e repetibilidade intermediário (Shapiro Wilk $W(5\text{gl}) < 0,986$, e $W(12\text{gl}) < 0,979$, respectivamente), com a linearidade (correlação Pearson $0,977_{N=40}$ e $0,998_{N=96}$) permitiu metodologia de validação e obtendo resultados com alta precisão sobre a ausência de congêneres (concentração $< LOD$) eo caso particular de acetato de sec-butil ($< 80 \text{ mg L}^{-1}$) de controle de qualidade e garantia de um produto em excelente estado.

PALABRAS CLAVE:

Sustancias volátiles, Calidad en bebidas espirituosas, NTC 4118.

KEY WORDS:

Volatile substances, Quality spirituous beverages, NTC 4118.

PALAVRAS-CHAVE:

Substância volátil, Bebidas alcoólicas de qualidade, NTC 4118.

INTRODUCCIÓN

En Colombia se denomina “bebidas alcohólicas” a las sustancias que se obtienen por un proceso de destilación de productos fermentados y que pueden contener sustancias aromáticas en alcohol rectificado neutro con edulcorantes o colorantes permitidos. Para que las bebidas alcohólicas puedan ser distribuidas al consumo humano deben cumplir con la Norma Técnica Colombiana [1], que considera la concentración final de sustancias volátiles o congéneres permitidos, presentes en las bebidas alcohólicas destiladas: aldehídos, furfural, ésteres y alcoholes superiores excluyendo los alcoholes etílico y metílico. En el Cuadro 1, se presentan los métodos clásicos de la norma técnica colombiana para la determinación de congéneres [2].

En los últimos años el desarrollo de técnicas cromatográficas para el control de calidad de diferentes bebidas alcohólicas [3], han permitido realizar estudios por varias técnicas [4] encontrando por ejemplo que la Cromatografía de Gases acoplada a Masas (GC/MS) utilizando marcadores isotópicos ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) se presenta como un excelente método de referencia para el seguimiento de la adición de alcohol neutro como una forma de control de calidad [5,6].

Otros estudios desarrollados de han enfocado sobre análisis puntuales de algunos de los congéneres,

como el acetaldehído [6], metanol y etilenglicol [7], objeto de estudio debido a sus propiedades cancerígenas y de intoxicación para los seres humanos, respectivamente. De otra parte se ha demostrado que los métodos cuantitativos, para la determinación de 2-furfural en bebidas alcohólicas, empleando HPLC en fase reversa, GC-FID y GC-MS presentan una considerable precisión y sensibilidad [8].

Con respecto a los métodos volumétricos, algunos presentan problemas de contaminación de solventes y alta imprecisión, además de claramente requerir el empleo de reactivos es alto y debido a la posibilidad de inclusión de mayores fuentes de error como las humanas la repercusión principal es en la precisión.

Por lo tanto es necesario generar métodos instrumentales donde los niveles de respuesta sean altamente confiables, reproducibles y robustos. La necesidad de disminuir los niveles de cuantificación de estos compuestos con el fin de lograr niveles seguridad de la presencia de éstos compuestos, hace indispensable implementar nuevas técnicas analíticas para hacer más práctico y amigable ambientalmente el análisis.

Además, La necesidad de la Industria licorera del Cauca comprometida con la calidad de sus productos requiere generar confiabilidad y certeza en sus metodologías de análisis para garantizar la calidad de sus productos. Para ello, se estandarizó y validó una metodología para identificar y cuantificar los congéneres presentes en bebidas alcohólicas utilizando la cromatografía de gases aprovechando su gran reproducibilidad y sensibilidad, permitiendo obtener límites de detección y cuantificación que permiten con certeza el cumplimiento de la norma de calidad.

En el método se desarrolló sobre la base de la identificación y cuantificación de los diecinueve congéneres reportados en la NTC 4118. La evaluación de la metodología estandarizada, se realizó tomando muestras reales de alcohol extra neutro rectificado proveniente de Ecuador debido a que empleado por la empresa licorera del Cauca gracias a que posee buenas características tanto fisicoquímicas como organolépticas. Finalmente El análisis de los datos se efectuó empleando el paquete estadístico SPSS [9] utilizando pruebas de distribución normal, igualdad de varianzas, análisis de varianza, pruebas paramétricas de comparación de medias entre otros.

Cuadro 1. Métodos para determinación de congéneres en alcohol.

Sustancia	Método	Fundamento
Aldehídos	Volumetría Redox	Yodometría empleando bisulfito de sodio (Na_2SO_3)
Esteres	Volumetría ácido-base	Saponificación con hidróxido de sodio (NaOH)
Alcoholes superiores	Técnica Espectrofotométrica	Tratamiento con dimetilamino-benzaldehído en medio sulfúrico (538-543 nm)
Furfural	Técnica Espectrofotométrica	Tratamiento con anilina incolora en medio ácido 15°C

MÉTODO

Condiciones cromatográficas y calibración de material de vidrio

En el marco de control de medios de análisis según ISO IEC/17025 (estándar utilizado por los laboratorios de ensayo y calibración). Para la calibración de los balones aforados se utilizó un protocolo de estandarización certificado por la ISO 9001-14001 para un total de 25 balones aforados. Se verificó que el equipo (Cromatógrafo de Gases Shimadzu 17 A con auto inyector AOC - 20i) con columna cromatográfica ATM – 624 con fase estacionaria 6% de Cianopropilfenil - 94% Metilpolisiloxano y detección de ionización por llama, con el que cuenta el laboratorio de Control de Calidad, funciona en las condiciones adecuadas para obtener la correcta lectura de los estándares y muestras [1,10].

Preparación de soluciones estándar

Se prepararon 3 soluciones stock de 100 mg L⁻¹ de congéneres en alcohol rectificado al 30%. A partir de cada una de éstas, se prepararon 9 estándares en un rango de 2 a 50 mg L⁻¹ correspondientes a los niveles de concentración de la curva de calibración conteniendo la totalidad de los congéneres estudiados y que se presentan en el cuadro 2.

Estandarización y validación de los métodos analíticos

Se implementaron y estandarizaron dos métodos para la cuantificación de 16 congéneres (método 1) y Metanol, Isopropanol (IPA), Acetato de Metilo (AM) (método 2), para los dos métodos se realizó la determinación el flujo óptimo a través de la Curva de Golay y se establecieron los parámetros óptimos, Se determinaron los LOD, LOQ repetibilidad, precisión intermedia robustez y exactitud como criterios de confianza del método analítico. Finalmente, se evaluaron muestras como proceso de control de calidad de los insumos adquiridos por la I.L.C.

Parámetros estadísticos

Con el fin de analizar el grado de concordancia entre los datos individuales obtenidos cuando los métodos se aplican repetidamente a múltiples inyecciones de una muestra homogénea y la precisión intermedia, cada muestra y estándar se midió cinco veces, determinándose la desviación estándar (s) y la desviación

Cuadro 2. Lista de congéneres estudiados en alcohol rectificado.

Nombre IUPAC	Nombre común	Nombre IUPAC	Nombre común
Etanal	Aldehído Acetaldehído	Alcohol isobutílico	Isobutanol
Alcohol metílico	Metanol	2-Metilpropanoato de 1-metil etilo	Metilisobutirato
Alcohol isopropílico	Isopropanol	Alcohol 2-butílico	n-Butanol
Ester metílico	Acetato de metilo	Valeraldehído	Pentanal
Isobutiraldehído	2-Metilpropanal	Metil-t-butil eter	Sec-butilacetato
Alcohol n-propílico	n-Propanol	Alcohol amílico	Alcohol isoamílico
Etanoato etílico	Acetato de etilo	n-Pentanol	Alcohol n-amílico
2-butanol	Sec-Butanol	Hexanaldehído	Hexanal
Ácido acético-3-metil-butil-ester	3-Amilacetato	Heptanaldehído	Heptanal
Furan-2-carboxialdehído	Furfural		

estándar relativa (% RSD). Se aplicó la comparación de dos medias experimentales. También se utilizó el contraste de dos colas y el contraste F para la comparación de las desviaciones estándar. Se aplicó el paquete estadístico SPSS y la hoja de cálculo de Excel para evaluar la Normalidad de los datos, pruebas paramétricas y linealidad.

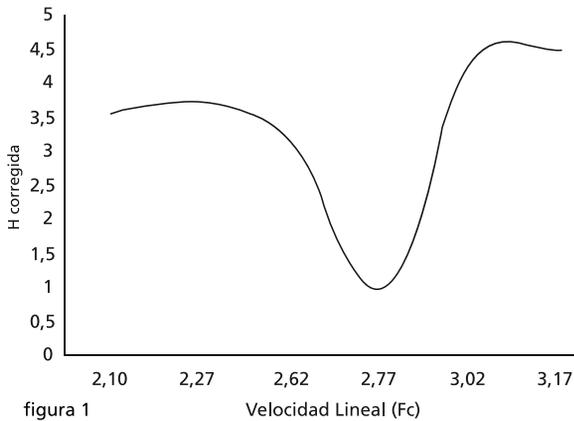
RESULTADOS

Determinación del flujo óptimo para la metodología de CG

La elaboración de la curva de Golay se realizó empleando la metodología reportada en [8] con una columna ATM – 624 con fase estacionaria 6% de Cianopropilfenil - 94% Metilpolisiloxano marca Alltech de este modo se encontró el mínimo en la curva, correspondiente al flujo óptimo de la columna el cual fue de 7,2 mL.min⁻¹ (velocidad lineal de 2,77 cm.min⁻¹) de nitrógeno como gas de arrastre, como se muestra en la figura 1. El establecimiento del rango de velocidad lineal a analizar se estableció de acuerdo a las condi-

ciones de la columna cromatográfica (nivel máximo de presión corresponde a 9,0 psi y el mínimo a 5,8 psi).

Figura 1. Determinación del flujo óptimo empleando curva de Golay.



Implementación de los métodos para la determinación de congéneres

Se estableció la programación de temperatura del horno teniendo en cuenta la mejor resolución que presentaron los diecinueve congéneres. Sin embargo dentro de la implementación inicial no se logró la separación de isopropanol (IPA) y Acetato de metilo (AM) como se presenta en la figura 2.

Debido a esto, se decidió implementar un segundo método para la separación de estos compuestos incluyendo el metanol. Así que se asignaron dos métodos: el primer método fue diseñado para 16 congéneres y el segundo para la cuantificación de IPA, AM y metanol (figura 3). La resolución obtenida en los dos métodos oscila entre 1,2 y 2,1, indicando esto la separación apropiada de los congéneres. Las condiciones cromatográficas para cada método son presentadas en el Cuadro 3.

Figura 2. Cromatograma de congéneres método 1

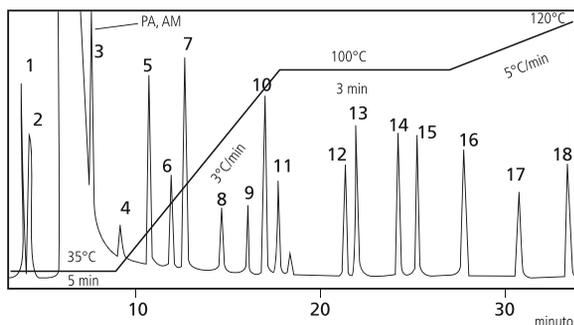
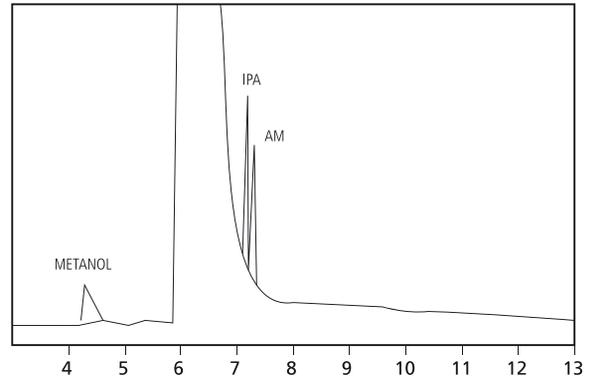


Figura 3. Cromatograma de congéneres con IPA, AM y metanol obtenido por el método 2.



Acetaldehído (1), Metanol (2) Isopropanol (3) Acetato de Metilo (3) 2-Metil Propanal (4) N propanol (5) Acetato de etilo (6) Sec butanol (7) Iso butanol (8) Metil Isobutirato (9) N butanol (10) Pentanal (11) Sec Butil acetato (12) Alcohol Iso – amílico (13) Alcohol n – amílico (14) Hexanal (15) 3-Amil acetato (16) Furfural (17) Heptanal (18)

Estandarización y Validación de los métodos

Se realizó la determinación de los parámetros de calidad correspondientes, tal como se analiza a continuación.

Límite de detección (ecuación 1) y límite de cuantificación (ecuación 2). Se calculó la mínima cantidad detectable utilizando los resultados de la curva de calibración de acuerdo con el procedimiento sugerido por la IUPAC [11] y utilizando las ecuaciones:

$$LOD = \frac{3 * S_{intercepto}}{m_{curva}} \tag{Ec. 1}$$

$$LOQ = \frac{10 * S_{intercepto}}{curva} \tag{Ec. 2}$$

Cuadro 3 .Condiciones cromatográficas para los dos métodos implementados en el análisis de congéneres.

	Método 1	Método 2
Inyector	Inyección directa 150°C	
Horno	35°C (5 min) @ 3°C min ⁻¹ 100°C (5 min) @ 5°C min ⁻¹ 120°C	35°C (6 min) @ 3°C/min 150°C (3 min)
Detector	FID 200°C	
Relación Split	2:10	

Para la determinación del LOD se realizaron 5 inyecciones de cada uno de los niveles de concentración de la curva de calibración de cada congénere. Los Límites de Detección obtenidos para los métodos estuvieron en un rango de concentración de 0,1 a 0,9 mg.L⁻¹, lo que indica que la mínima cantidad detectable encontrada está por debajo (LOD < 1,0 mg.L⁻¹) de los valores de concentración mínimos permitidos que exige la NTC 620 [12] entre (2 y 80 mg.L⁻¹).

Paralelamente se determinó el LOD por medio del cálculo de la relación señal/ruido inyectando 20 veces el blanco y determinando la señal del LOD (3,0) como $S_{LOD} = 3 \cdot \frac{Señal}{Ruido}$ y a partir de la solución stock se prepararon diluciones hasta alcanzar la señal del LOD. Para los 19 congéneres se determinó que la variación de los métodos establecida como %RSD fue menor a 3%.

Para calcular el Límite de Cuantificación (LOQ), se determinó de forma similar $S_{LOQ} = 10 \cdot \frac{Señal}{Ruido}$ encontrándose que la mínima señal cuantificable (30) correspondía a concentraciones que oscilan entre 0,3 y 2 mg.L⁻¹. El LOQ también se determinó a través del procedimiento sugerido por la IUPAC utilizando los resultados de los interceptos y las pendientes obtenidas por las ecuaciones de las curvas de calibración resultaron en rangos de concentraciones entre 0,3 y 1,9 mg.L⁻¹. Comparando los resultados de las concentraciones obtenidas se encontraron %RSD menores al 2%.

Los valores de LOD y LOQ para los 19 congéneres se resumen en el cuadro 4, apreciándose que los métodos garantizan el cumplimiento de la norma NTC 620

Intervalo lineal y sensibilidad analítica. De acuerdo con los resultados para las curvas de calibración en el intervalo de concentraciones de 2 a 50 mg.L⁻¹, los coeficientes de correlación se encuentran en un rango de 0,993 hasta 0,999, comprobando con ello la respuesta lineal del equipo en el rango de concentraciones de los congéneres trabajados. La sensibilidad analítica se midió teniendo en cuenta la capacidad de discriminar pequeñas diferencias de concentración en un analito, los valores de las pendientes mayores obtenidas por repetibilidad y precisión intermedia se reportaron para los alcoholes superiores indicando con ello una mayor sensibilidad del detector hacia estos compuestos.

Repetibilidad y precisión intermedia por SPSS

A continuación en los cuadros 5, 6, 7 y 8 se presentan los resultados para el estudio del congénere metanol de las pruebas estadísticas realizadas utilizando el programa de SPSS.

Cuadro 4. Concentraciones de LOD y LOQ determinados para los 19 congéneres.

Congénere	LOD (mg L ⁻¹)	LOQ (mg L ⁻¹)
Acetaldehído	0,2	0,8
Metanol	0,2	0,8
IPA	0,4	1,4
AM	0,6	1,9
2-Metilpropanal	0,4	1,5
n-Propanol	0,6	1,8
Acetato de etilo	0,2	0,7
Sec-Butanol	0,3	0,9
Isobutanol	0,3	1,0
Metil isobutirato	0,3	1,0
n-Butanol	0,9	2,8
Pentanal	0,8	1,0
Sec-Butil acetato	0,7	1,8
Alcohol isoamilico	0,3	1,1
Alcohol n-amilico	0,1	0,3
Hexanal	0,2	0,5
3-Amilacetato	0,4	1,0
Furfural	0,5	1,6
Heptanal	0,4	1,4

Cuadro 5. Análisis estadístico Shapiro-Wilk para el congénere Metanol.

Concentración metanol	Estadístico de Shapiro Wilk (W) calculado	
	Repetibilidad	Precisión Intermedia
Nivel		
5	0,860	0,933
10	0,801	0,860
20	0,916	0,839
23	0,728	0,810
30	0,920	0,786
35	0,807	0,938
40	0,719	0,929
50	0,902	0,822
$W_{(5gl)} = 0,986$ $W_{(12 gl)} = 0,979$		

De la aplicación del estadístico W de Shapiro Wilk se definió trabajar con la media de los datos ya que la muestra proviene de una población normal.

Cuadro 6. Análisis estadístico Levene para el congénere Metanol.

Metanol	Estadístico de Levene (Wcalc)	gl 1	gl 2
Repetibilidad		Wtab (10,50)=5,9	
Basándose en la media	2,467	7	38
Basándose en la mediana	1,432	7	32
Precisión intermedia		Wtab(10,100)=5,0	
Basándose en la media	4,252	7	88
Basándose en la mediana	3,342	7	88

Los datos obtenidos por la repetibilidad y la precisión intermedia provienen de la misma población ya que las varianzas son homogéneas

Cuadro 7. Análisis estadístico Pearson para el congénere Metanol.

Metanol	Repetibilidad	Precisión Intermedia
Correlación de pearson	0,998	0,977
N	40	96
Análisis de regresión para el modelo $Y = \alpha_0 + \alpha_1 x$	t calculado de la pendiente	Intervalo de confianza
Repetibilidad	59,159 133,58	143,053
Precisión Intermedia	59,780 90,967	97,218

El análisis de regresión para el modelo $Y = \alpha_0 + \alpha_1 x$, con $t(0,05; 8) = 1,859$ para repetibilidad y $t(0,05; 107) = 1,600$ para precisión intermedia.

Cuadro 8. Resultados del cálculo ANOVA para el congénere metanol.

Repetibilidad	Suma Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F cal
Regresión	152759224,80	1	152759224,802	3499,76
Residual	1658641,97	38	43648,473	
TOTAL	154417866,77	39		
Precisión Intermedia	Suma Cuadrados	gl	Media Cuadrática	Fcal
Regresión	169652655,876	1	169652655,876	3573,646
Residual	4462487,530	94	47473,272	
TOTAL	174115143,406	95		

El coeficiente de Correlación de Pearson (cuadro7) mostró que las curvas de calibración de los congéneres presenta una linealidad buena con un valor de R por encima de 0,995 cuando se realizó el análisis estadístico mediante el contraste de regresión por ANOVA tanto en la repetibilidad como en precisión intermedia

Mediante el análisis de regresión para el modelo $Y = \beta_0 + \beta_1 x$ de acuerdo con los resultados, mostrando la existencia de una relación lineal significativa entre la concentración y el área

El contraste de hipótesis ANOVA (Cuadro 8) para la regresión, que separa la variabilidad explicada por la regresión y la variabilidad no explicada o residual, ($H_0 =$ la pendiente es significativamente igual a cero). Se establece que tanto para la repetibilidad como la precisión intermedia, la H_0 se rechaza porque el F experimental es mayor que el F tabulado. $F > F(\alpha, 1, n-2)$ donde α es 0,05, (por lo tanto se concluye que existe asociación entre las dos variables (área y concentración) mediante una regresión lineal.

Finalmente en el cuadro 9 se resumen los resultados estadísticos para los demás congéneres

Cuadro 9. Sinopsis de las pruebas estadísticas realizadas en la evaluación de los métodos para los 19 congéneres.

Prueba	Resultado	
	Repetibilidad	Precisión Intermedia
Shapiro Wilk	0,620-0,935	0,378-0,968
Levene	1,702-5,680	1,278-6,230
Pearson	0,995-0,999	0,994-0,997

Como complemento del estudio se realizó empleando el paquete estadístico del programa Excel de Microsoft Office el análisis de Repetibilidad y Precisión intermedia por medio de la prueba paramétricas t de student y ANOVA obteniéndose los siguientes resultados:

Análisis de Repetibilidad y Precisión Intermedia por Excel

Para evaluar la repetibilidad mediante el paquete estadístico de Excel, se determinó el valor promedio de las cinco inyecciones, se calculó la desviación estándar, la varianza y el %RSD cuyos resultados indican que el coeficiente de variación dio por debajo de 3%. Este valor indica que el método es repetible. Este parámetro se examinó mediante las inyecciones repetidas para patrones estándares en un rango de 2 a 50 mg.L⁻¹ de congéneres, los cuales se analizaron el mismo día; con los valores de áreas encontrados se halló su respectiva concentración.

Comparación de dos medias experimentales, prueba t método 1 y 2. Se realizó un paquete estadístico por Excel aplicando el parámetro t de medias entre los valores obtenidos por repetibilidad y precisión intermedia para comparar si las dos medias difieren significativamente o no, en el caso de la prueba t se tiene que para la comparación de las medias la Ho: "Las dos medias no difieren significativamente" y la H1: "Las medias difieren significativamente".

En el caso en que la hipótesis nula se acepta, indicando que no hay diferencia significativa entre las dos medias. Esto significa que hay evidencia de errores sistemáticos y para ello se realizó una prueba F.

Para saber si las varianzas (la obtenida por repetibilidad y la precisión intermedia), difieren significativamente se utilizó un contraste de dos colas, teniendo en cuenta que si el valor obtenido experimentalmente, F es menor que el F tabulado, la hipótesis nula se acepta; "Las varianzas son iguales" y en caso contrario se acepta la hipótesis alternativa (Las varianzas no son iguales).

Linealidad. Se examinó la linealidad de los datos obtenidos para los estándares en un intervalo de concentraciones desde 2 hasta 50 mg L⁻¹ definiendo la función que mejor explica la relación entre las variables a través del Coeficiente de Correlación de Pearson (tanto para el método 1 como para el método 2, en los parámetros de repetibilidad y precisión intermedia), en-

contrando una buena linealidad entre las dos variables ($R \cong 1$). La cuantificación de los congéneres se hizo independiente para cada método por curva de calibración. A continuación se presenta un resumen general de los resultados agrupados por familias:

Robustez del método. Para evaluar la robustez del método, se prepararon 3 soluciones estándar de propanol de concentraciones de 15 y 30 mg.L⁻¹ se refrigeraron a una temperatura de 15°C y se realizaron inyecciones por triplicado por tres días consecutivos y luego se volvieron a preparar a las mismas condiciones después de dos meses. Al realizar estas inyecciones por el método ya calibrado en el equipo de cromatografía, se obtuvieron las concentraciones esperadas indicando que el método está calibrado y es robusto tal como se muestra en el cuadro 11.

Análisis de muestras reales

Para el análisis de muestras reales, se recogieron muestras provenientes de la sección de preparación donde se almacena el alcohol y se les midió el grado alcohólico el cual estaba dentro de los límites permitidos, luego se inyectó la muestra utilizando el método ya calibrado teniendo en cuenta que este método es aplicable en el intervalo de concentraciones de 2 a 50 mg.L⁻¹ de

Cuadro 10. Resultados de Regresión Lineal para Curvas de Calibración de 19 Congéneres.

Congéneres por familias	Rango Concentración	Regresión Curvas
AldehídoAldehídos	2-50 mg.L ⁻¹	0,995-0,999
Esteres	2-50 mg.L ⁻¹	0,995-0,999
Alcoholes Superiores	2-50 mg.L ⁻¹	0,998-0,999
Metanol	5-50 mg.L ⁻¹	0,998
Isopropanol	5-50 mg.L ⁻¹	0,993
Acetato Metilo	5-50 mg.L ⁻¹	0,996

Cuadro 11. Resultados de Robustez del método 1.

15 mg L ⁻¹	Conc Calc	30 mg L ⁻¹	Conc Calc
1	15,364	1	30,621
2	14,949	2	31,047
3	15,484	3	32,001
Media	15,266	Media	31,223
Desv Estd	0,281	Desv Estd	0,707
%RSD	1,839	%RSD	2,263

solución. En el Cuadro 12 se presentan los resultados obtenidos para algunas de las muestras analizadas.

Cuadro 12. Resultados obtenidos en el análisis de muestras reales de alcohol neutro rectificado.

Muestra	Congéneres identificados	Concentración
1	Secbutil acetato Alcohol isoamílico	Dentro del rango permitido
2	Secbutil acetato	Dentro del rango permitido
3	Secbutil acetato	Dentro del rango permitido

CONCLUSIONES

Se implementó y estandarizó un método analítico para cuantificar e identificar congéneres en alcohol neutro rectificado pasando muestras reales a través de los métodos calibrados. Los datos de calibración dan Normalizados y los métodos tienen precisión intermedia. Los resultados fueron analizados estadísticamente a través de (3) ANOVA y SPSS(4). Los parámetros de calidad como el LOD ($< 0,9 \text{ mg L}^{-1}$), LOQ, ($< 2,0 \text{ mg L}^{-1}$) Intervalo Lineal, Selectividad, Sensibilidad; arrojaron resultados los cuales sirvieron para saber el grado de certeza en la determinación de congéneres menores a 50 mg L^{-1} con el fin de identificar y cuantificar este tipo de sustancias en bebidas alcohólicas.

La herramienta estadística utilizada como el SPSS en la cual vienen involucradas pruebas paramétricas como Shapiro Wilk, Levene, Pearson, ANOVA (Análisis de Varianza) entre otras; sirvieron para comprobar la confiabilidad en los resultados obtenidos mediante el análisis de estas pruebas, concluyendo así que los datos arrojados con la utilización de este método son repetibles y reproducibles cuando se realizó la estandarización del método. Esto indica un aumento en el grado de certeza del resultado.

La estandarización del método analítico incidió en el mejoramiento de la técnica porque permitió cuantificar congéneres en concentraciones por debajo de las exigidas por la norma ICONTEC. Debido a esto se aprecia que la calidad del alcohol extra neutro rectificado empleado en la elaboración de las bebidas alcohólicas en la I.L.C. cumple con las normas que exige el ICONTEC para la comercialización de aguardiente.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la colaboración y apoyo económico para el desarrollo del presente trabajo al Departamento de Química, la Facultad de Ciencias, la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad del Cauca y a la Industria Licorera del Cauca.

REFERENCIAS

- [1] INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN (ICONTEC). Norma técnica colombiana (NTC) 4118, Bebidas Alcohólicas: Determinación de Metanol y de Congéneres en Bebidas Alcohólicas y en Alcohol etílico empleado en su elaboración, mediante cromatografía de Gases. Bogotá (Colombia): séptima actualización 1997, p. 1-12.
- [2] INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN (ICONTEC), norma técnica colombiana (NTC) 411, Bebidas Alcohólicas Anís o Anisado. Bogotá (Colombia): séptima actualización 2005, p. 1-10.
- [3] ZHU, H., XIAO-DONG, P., PING-GU, W., QUING, C., JIAN-LONG, H. and XIANG-HONG, S. Validation of the quantification method for ethyl carbamate in alcoholic beverages and soy sauce by GC-MS. *Food Chemistry*, 141(4), 2013, p. 4161-4165.
- [4] CEBALLOS-MAGAÑA, S., DE PABLOS, F., JURADO, J., MARTIN, M., ALCAZAR, A., MUÑIZ-VALENCIA, R., GONZALO-LUMBRERAS, R. and IZQUIERDO-HORNILLOS R. Characterisation of tequila according to their major volatile composition using multilayer perceptron neural networks. *Food Chemistry*, 136(3-4), 2013, p. 1309-1315.
- [5] COLLINS, T., ZWEIGENBAUM, J., and EBELER, S. Profiling of nonvolatiles in whiskeys using ultra high pressure liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UHPLC-QTOF MS). *Food Chemistry*, 163(15), 2014, p. 186-196.
- [6] PAIANO, V., BIANCHI, G., DAVOLI, E., NEGRI, E., FANELLI, R. and FATTORE, E. Risk assessment for the Italian population of acetaldehyde in alcoholic and non-alcoholic beverages. *Food Chemistry*, 154(1), 2014, p. 26-31.
- [7] KRUSE, J.A. Methanol and Ethylene Glycol Intoxication. *Critical Care Clinics*, 28(4), 2012, p. 661-711
- [8] PETISCA, C., HENRIQUES, A.R., PÉREZ-PALACIOS, T., PINHO, O. and FERREIRA, I.M.P.L.V.O.,

- Assessment of hydroxymethylfurfural and furfural in commercial bakery products. *Journal of Food Composition and Analysis*, 33(1), 2014, p. 20-25.
- [9] SPSS Inc. SPSS para Windows, versión 11.5.1, 1989-2002 [online]. 2011. Available: <http://www.spss.com> [citado 19 julio de 2011]
- [10] BLAUBRAND. Aparatos volumétricos y picnómetros, con certificado de conformidad; ISO 9001; Instrucciones de calibrado (SOP) [online]. 2015. Available http://www.brand.de/fileadmin/user/pdf/SOPs/SOP_BLAUBRAND_ES.pdf [citado marzo 2015.]
- [11] MOCÁK, J., BOND, A.M. and MITCHELL, S. A statistical overview of standard (IUPAC and ACS) and new procedures for determining the limits of detection and quantification. *Pure and Applied Chemistry*, 69(2), 1997, p. 297-328
- [12] INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN (ICONTEC). Norma técnica colombiana (NTC) 620, Bebidas alcohólicas. Alcohol etílico. Bogotá (Colombia): Séptima actualización 2001, p. 1-22.