

**Validación del método de determinación de la edad de los rones por
cromatografía líquida de alta eficiencia**

Trabajo de grado para optar por el título de Ingeniera de Alimentos

Evelin Yuliana Raigoza Montoya

**Asesor
Ana María Muñoz Jiménez
Química**

**Corporación Universitaria Lasallista.
Facultad de Ingenierías
Ingeniería de Alimentos
Caldas-Antioquia
2017**

Contenido

Resumen	6
Introducción	8
Justificación	9
Objetivos	11
Objetivo General	11
Objetivos Específicos	11
Marco Teórico	12
El Ron	12
Origen	12
Elaboración	12
Añejamiento	13
Compuestos de interés	15
Vainillina y Siringaldehído	18
Contextualización	18
Determinación de Vainillina y Siringaldehído por HPLC	18
Validación de métodos	22
¿Qué es validar un método?	22
Necesidad de validar un método	22
Metodología	37
Material de referencia	37
Principio del método	37
Montaje del método	37
Condiciones cromatográficas del método	37
Equipo y materiales	38
Validación del método	40
Pruebas de significancia	45
Resultados	47
Selectividad	47
Linealidad	49
Linealidad del sistema	49
Linealidad del método	53
Precisión	60
Repetibilidad	60
Precisión Intermedia	62
Exactitud	64
Robustez	68
Estimación de la incertidumbre	69
Muestreo	72
Conclusiones	74
Recomendaciones	75
Referencias	76

Lista de tablas

Tabla 1. Selectividad	24
Tabla 2. Intervalo de trabajo.....	27
Tabla 3. Sesgo	30
Tabla 4. Precisión.....	33
Tabla 5. Robustez	36
Tabla 6. Resultados para la Vainillina	48
Tabla 7. Resultados para el Siringaldehído.....	48
Tabla 8. Parámetros de aceptación.....	48
Tabla 9. Valores para el sistema (donde sistema es la curva de calibración realizada en solvente)	49
Tabla 10. Tratamiento estadístico para la linealidad del sistema	51
Tabla 11. Valores para el método (donde método es la curva realizada en matriz).....	53
Tabla 12. Tratamiento estadístico para la linealidad del método	55
Tabla 13. Valores para el LD y el LC.....	57
Tabla 14. Evaluación del LD y LC	59
Tabla 15. Repetibilidad para la Vainillina	60
Tabla 16. Repetibilidad para el Siringaldehído.....	60
Tabla 17. Precisión Intermedia para la Vainillina (Analista 1, día 1 y 2).....	62
Tabla 18. Precisión Intermedia para la Vainillina (Analista 2, día 3)	62
Tabla 19. Precisión Intermedia para el Siringaldehído (Analista 1, día 1 y 2)	63
Tabla 20. Precisión Intermedia para el Siringaldehído (Analista 2, día 3)	63

Tabla 21. Parámetros de aceptación para la precisión intermedia.....	64
Tabla 22. Exactitud nivel bajo de la curva para Vainillina.....	65
Tabla 23. Exactitud nivel bajo de la curva para Siringaldehído	65
Tabla 24. Exactitud nivel medio de la curva Vainillina.....	66
Tabla 25. Exactitud nivel medio de la curva Siringaldehído	66
Tabla 26. Exactitud nivel alto de la curva Vainillina.....	67
Tabla 27. Exactitud nivel alto de la curva Siringaldehído	67
Tabla 28. Análisis de la robustez	68
Tabla 29. Incertidumbre para la Vainillina	69
Tabla 30. Incertidumbre para el Siringaldehído.....	70
Tabla 31. Datos del muestreo (Vainillina).....	72
Tabla 32. Datos del muestreo (Siringaldehído)	73

Lista de ilustraciones

Ilustración 1. Datos de espectroscopia y espectrometría de los compuestos fenólicos del ron añejado en barriles de roble.....	16
Ilustración 2. Compuestos volátiles en g/g de madera en extractos hidroalcohólicos de roble Americano y Francés (Allier, Vosges y centro de Francia) por GC-MS	17
Ilustración 3. A) Ejemplo típico de una curva de respuesta obtenida con un método instrumental. Se identifican las características de desempeño “intervalo de trabajo”, “intervalo lineal”, “sensibilidad analítica”, “LD” Y “LC”. B) Ejemplo típico de una curva obtenida	29
Ilustración 4. Campana de Gauss	44
Ilustración 5. Cromatograma para análisis de la selectividad.....	47
Ilustración 6. Curva de calibración del sistema (Vainillina).....	50
Ilustración 7. Curva de calibración del sistema (Siringaldehído)	50
Ilustración 8. Curva de calibración del método (Vainillina)	54
Ilustración 9. Curva de calibración del método (Siringaldehído)	54
Ilustración 10. Curva de linealidad del LD y LC (Vainillina)	58
Ilustración 11. Curva de linealidad del LD y LC (Siringaldehído)	58

Resumen

Un método analítico por HPLC por sus siglas en inglés *high performance liquid chromatography* fue desarrollado y validado para determinar la edad de los rones, cuantificando Vainillina y Siringaldehído. Se usó un cromatógrafo líquido de alta presión (HPLC modelo Agilent 1260 Infinity) con detector ultravioleta, equipado con software de cromatografía (HP GC ChemStation), una columna cromatográfica: Agilent 5 TC-C18 de 250 X 4.6mm. Las condiciones cromatográficas fueron: temperatura de horno 40,0°C, tiempo de corrida 13,0 min, bomba cuaternaria con un flujo de 2,0 mL/min de una mezcla de Metanol/Agua en una proporción 22/78 respectivamente, detector Ultravioleta a 311 nm con un ancho de banda de 4 nm, señal de obtención de datos 5 Hz e inyección estándar de 10 µL. El objetivo general fue, validar y estandarizar una técnica para la determinación de la edad de un Ron por HPLC. La validación del método se basó en parámetros como: linealidad, precisión, exactitud, límites de detección (LD), límite de cuantificación (LC) e incertidumbre de medición. La curva de calibración para la Vainillina y el Siringaldehído presentaron un r^2 de 0,9999 para ambos. El LD y LC experimentalmente fueron 0,1 y 0,3 mg/L respectivamente para ambos analitos. Los resultados de la precisión cumplen los parámetros de aceptabilidad ya que se obtiene un coeficiente de variación expresado en porcentaje %CV < 2,0% y porcentajes de recuperación entre 79,0 y 88,0%. La metodología analítica para el análisis de contenido por HPLC de Vainillina y Siringaldehído en rones, demostró ser específica y selectiva para los analitos, también demostró linealidad, repetibilidad, precisión intermedia y exactitud cumpliendo así con los parámetros exigidos.

Palabras clave: Método analítico, Validación, HPLC, Vainillina, Siringaldehído.

Introducción

Este trabajo se realiza en el marco de la formación del pregrado: Ingeniería de Alimentos, suscrito a la Corporación Universitaria Lasallista, en la modalidad de práctica empresarial en la Fábrica de Licores y Alcoholes de Antioquia, en el marco del proyecto “Asistencia técnica para el mantenimiento y mejoramiento del Sistema de Gestión de la Calidad bajo la Normativa de Acreditación para Laboratorios de ensayo NTC-ISO/IEC 17025”.

Justificación

La Oficina del Laboratorio, siendo parte importante en el cumplimiento de las políticas de calidad de la Fábrica de Licores y Alcoholes de Antioquia, cuenta con los recursos físicos, de personal y tecnológicos, necesarios para el desarrollo de métodos analíticos, que llevan a la mejora continua y a un nivel sobresaliente del cumplimiento de las normas vigentes de licores y alcoholes en el país, ya que cuenta con la acreditación bajo la Norma NTC-ISO/IEC17025 por parte del Organismo Nacional de Acreditación de Colombia (ONAC).

La validación del método analítico para la determinación de la edad de los rones, surge de la necesidad de contar con una herramienta tecnológica que apoye las negociaciones de compra de tafias de ron y además de soporte de los resultados de las pruebas sensoriales. Para dicho propósito, se usa la técnica de HPLC, pues esta tecnología permite separar mezclas complejas en sus componentes individuales para que puedan ser identificadas y cuantificadas.

La Vainillina y el Siringaldehído son considerados compuestos químicos que se usan como marcadores de añejamiento; por su concentración en dicho proceso hacen que estos dos analitos sean de interés en la construcción de una curva de calibración, que permita saber la edad aproximada de los rones.

La validación del método analítico para la determinación de la edad de los rones de la Fábrica de Licores y Alcoholes de Antioquia, impacta a diversos niveles sociales y económicos. En primer lugar, el Laboratorio, desarrollando nuevos métodos analíticos con tecnología de punta, demuestra su liderazgo en la industria de licores colombiana,

lo que se refleja en la calidad de los productos. En segundo lugar a la empresa, ya que este método sirve como herramienta de apoyo para las negociaciones de tafia de ron y de soporte a los resultados de las pruebas sensoriales de los rones, proceso que garantiza la alta calidad de esto, redundando en la fidelización de los consumidores, la competitividad en el mercado, el aumento en las ventas y por ende la generación de recursos económicos. Y en tercer lugar, a los antioqueños, pues con los recursos generados se aporta al desarrollo y bienestar de los hogares, invirtiendo en programas de salud, educación y deporte.

Objetivos

Objetivo General

Validar y estandarizar una técnica para la determinación de la edad de un Ron por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia.

Objetivos Específicos

Optimizar las condiciones cromatográficas para el análisis de los marcadores de la Vainillina y el Siringaldehído por HPLC.

Validar, elaborar e implementar un protocolo de analítico para la cuantificación de la Vainillina y el Siringaldehído en Rones.

Verificar el funcionamiento del método en muestras reales de Rones.

Marco Teórico

El Ron

Origen

El ron proveniente del lejano oriente, se adaptó perfectamente al clima caluroso y húmedo del caribe. Los árabes lo introducen al sur de España, y allí fue donde se desarrolló por completo el proceso de elaboración, desde la fermentación hasta la destilación. Pero la mejor adaptación de esta bebida fue en las islas canarias, y desde allí Cristóbal Colón las llevo a las Antillas, en su segundo viaje en 1493. La primera mención oficial de la palabra “*rum*” aparece en un documento del gobernador de Jamaica en 1661, y es probable que el origen de esta palabra provenga del nombre científico de la caña de azúcar “*saccharum officinarum*” (Bernad, S F).

Elaboración

Para iniciar, las materias primas (alcoholes, mieles, melazas, soda, ácido), son transportadas en camiones cisterna hacia las instalaciones de la Fábrica de Licores y Alcoholes de Antioquia. Las melazas se descargan con ayuda de vapor a un tanque de recepción; con bombas se realiza el trasiego hacia los tanques de almacenamiento. La melaza es enviada a la planta de fermentación, la cual es diluida con agua y ácido, y es calentada con vapor con el fin de eliminar bacterias. El sustrato es enviado a tanques donde se adicionan fuentes de nitrógeno y fosforo, estos se inoculan con levadura, y allí ocurre la transformación bioquímica de las fuentes de azúcares en alcohol, a este proceso se le llama fermentación y el producto que se obtiene de este se conoce como vino, este es llevado a la torre de destilación donde pasara por tres etapas (separación,

concentración y rectificación) hasta obtener el alcohol para el Ron. El alcohol obtenido del proceso de destilación es almacenado en tinas. Luego el alcohol es sometido a análisis fisicoquímico y sensorial para verificar el cumplimiento de los estándares de calidad bajo norma técnica colombiana. El alcohol de ron, conforme por la dirección de aseguramiento de la calidad, es trasegado por las respectivas bodegas de añejamiento. Se almacena en toneles de roble blanco americano (Select One Jack Daniel's) de una sola siembra de whiskey o bourbon; para su posterior añejamiento de 3, 5 y 12 años, en condiciones ideales que confieren a los productos sus características. El maestro ronero, transcurrido el tiempo de añejamiento, selecciona los toneles para realizar la respectiva preparación y blended, conservando el perfil de cada uno de los rones. Después del añejamiento y preparación, se realiza el envasado del producto (Fabrica de Licores y Alcoholes de Antioquia, 2016).

“Los rones se pueden dividir en dos clases: blanco (los rones se filtran para eliminar cualquier color adquirido durante el envejecimiento) y los rones oscuros o envejecidos” (Pino, Tolle, Gök, Winterhalter, 2011, 1436).

Añejamiento

“La maduración se ha hecho durante cientos de años para mejorar el sabor y el olor de las bebidas espirituosas, convirtiéndose en parte integral del proceso de producción de bebidas alcohólicas de alta calidad, como brandy, whisky, cognac, armagnac, ron” (Cernişev, 2016, 281).

Para dicho proceso, se utiliza toneles o barriles de madera que reciben un tratamiento térmico previo para el proceso de añejamiento, según (Conner,

Reid y Jack, 2003, 216) el principal efecto del tratamiento térmico es la degradación de los polímeros de madera para formar compuestos de color y sabor. La mayoría de los estudios en el pasado se han centrado en la degradación de la lignina para producir aldehídos aromáticos y ácidos, como la vainillina y el ácido vanílico.

Nishimura y Matsuyama, 1989 (como se citó en Mosedale y Puech, 1998, 95) define que el añejamiento es uno de los factores más importantes y más costosos que influyen en la calidad de las bebidas destiladas. Una amplia gama de bebidas alcohólicas destiladas ahora se maduran en barricas de roble, sobre todo los whiskies y aguardientes, pero también muchos roncs y licores. El proceso de maduración y añejamiento se caracteriza por cambios en el color y sabor del espíritu maduro y una disminución tanto del volumen como del contenido alcohólico. El tiempo requerido para una maduración satisfactoria varía según las características del destilado crudo, el tamaño, los orígenes de la madera y el tratamiento del barril y el ambiente en el que se ha madurado el espíritu. El cambio en el sabor de los aguardientes maduros se debe a cambios en la composición y concentración de compuestos que influyen en el sabor y aroma. Estos cambios pueden ser causados por:

- Extracción directa de compuestos de madera.
- Descomposición de macromoléculas de madera y extracción de sus productos en el destilado.

- Reacciones entre los componentes de la madera y los componentes del destilado en bruto.
- Reacciones que implican sólo extractos de madera.
- Reacciones que afectan únicamente a los componentes del destilado.
- Evaporación de compuestos volátiles.

Compuestos de interés

El Ron se deriva principalmente de la fermentación y destilación de la melaza de azúcar. Una vez que el alcohol se obtiene de los procesos de fermentación y destilación, se somete a otro procesamiento, tal como percolación a través de filtros de carbón, envejecimiento en barricas de roble y mezclas, lo que da al ron su sabor característico, Nicol, 2003 (como se citó en Jorge A. Pino, 2011, 1436). El objetivo de Pino, 2006, 422, fue analizar los compuestos volátiles de diferentes rones envejecidos usando Microextracción en Fase Solida (SPME), Cromatografía de Gases (GC) y Espectrometría de Masas (MS), los resultados arrojaron las funcionalidades químicas que confirman estar presentes en el ron como: terpenoides, alcoholes, acetales, aldehídos, fenoles, cetonas, furanos, ácidos y benzopiranos.

La presencia de componentes volátiles en el ron, tales como alcoholes, acetato de etilo, ácido acético, ésteres etílicos y compuestos no volátiles, originarios de las materias primas y los procesos de fermentación,

destilación y envejecimiento, es esencial para definir la composición de bebidas y, proporcionar elementos para su distinción, mencionan Regalado, Tolle, Pino, Wintehalter, Mendez, Morales y Rodriguez, 2011, 7358, dando introducción a su trabajo que tuvo como objetivo, estudiar la composición fenólica del ron envejecido en barriles de roble y su capacidad antioxidante, mediante tres diferentes ensayos *in vitro* de barrido de radicales libres determinando su poder de reducción, los resultados, para el presente trabajo son de interés pues en la siguiente tabla se observa la presencia de la Vainillina y el Siringaldehído:

Fraction-peak	t_R (min)	Compound	λ (max)	MW	ESI-MS/MS prominent ions (m/z)
F1-1	10.8	Gallic acid	270	170	169 [M-H] ⁻ , 125
F2-1					
F2-3	18.6	Protocatechuic acid	259, 293	154	153 [M-H] ⁻ , 109
F3-2					
F3-3	19.4	<i>o</i> -Guaicol ^a	283, 308	124	123 [M-H] ⁻ , 108
F4-2	26.0	Protocatechualdehyde	280, 310	138	137 [M-H] ⁻
F5-1					
F4-3	28.2	<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid ^a	255	138	137 [M-H] ⁻
F5-2					
F4-4	29.7	<i>o</i> -Vanillin ^a	304	152	151 [M-H] ⁻ , 136, 108
F3-4	29.8	Methyl protocatechuate	304	168	167 [M-H] ⁻ , 109
F2-7	30.8	Peucedanol ^a	326	264	263 [M-H] ⁻ , 245, 233, 217, 291, 163
F4-5	31.0	<i>p</i> -Vanillin ^a	274	152	151 [M-H] ⁻ , 136, 108
F5-3	31.8	Homovanillic acid ^a	290	182	181 [M-H] ⁻ , 137
F3-6	32.5	<i>p</i> -Vanillic acid	260, 291	168	167 [M-H] ⁻ , 152, 123, 108
F4-6					
F5-4					
F2-9	33.8	Syringic acid	275	198	197 [M-H] ⁻ , 182, 153, 138, 121
F3-7					
F6-1	36.8	Benzoic acid	283	122	121 [M-H] ⁻
F4-7	37.4	Eudesmic acid ^a	263, 312	212	211 [M-H] ⁻ , 167, 152
F2-10	37.4	Kaempferol ^a	365	286	287 [M+H] ⁺ , 271, 227
F3-8	40.5	Ethyl gallate	271	198	197 [M-H] ⁻ , 169
F4-8					
F2-11	40.7	3-(Carbethoxymethyl)-flavone ^a	320	308	307 [M-H] ⁻ , 261, 235
F1-11	40.8	Ellagic acid	365	302	301 [M-H] ⁻ , 284, 257, 229, 185
F5-5	42.7	Syringaldehyde	307	182	183 [M+H] ⁺ , 155, 123
F6-3	43.4	Ethyl vanillate	282, 318	196	195 [M-H] ⁻ , 135
F3-9	43.7	Ethyl syringate ^a	280	226	225 [M-H] ⁻ , 210, 166
F4-10	44.5	Spigenin ^a	320	270	271 [M+H] ⁺ , 243, 211, 183
F5-7	48.5	Genistein ^a	342	270	269 [M-H] ⁻ , 221
F5-8	49.9	Formononetin ^a	272	268	267 [M-H] ⁻ , 223
F6-6	49.9	Tectochrysin ^a	294	268	269 [M+H] ⁺ , 251, 225
F6-7	52.1	3-Benzyl-7-hydroxy-4-methylcoumarin ^a	297	266	265 [M-H] ⁻ , 221

^a Tentative identification (based on the comparison of UV spectra, t_R and MS with respective literature).

Ilustración 1. Datos de espectroscopia y espectrometría de los compuestos fenólicos del ron añejado en barriles de roble

Fuente: Regalado et al., 2011.

Según Philp et al., 1989 (como se cita en Pérez, Sanz y Cabezudo, 1997, 427) la cantidad de componentes liberados por la madera durante el envejecimiento dependerá de las especies de madera, el tamaño del barril, la historia del barril individual (incluyendo la fabricación, el carbonizado y el acondicionamiento inicial y el número de veces que se utilizó anteriormente) y las condiciones del almacenamiento, en el desarrollo de este trabajo se elaboró dos métodos de análisis para cinco compuestos volátiles de gran importancia en las propiedades sensoriales (cis y trans- β -metil- γ -octalactona, eugenol, vainillina y siringaldehído) presentes en cuatro tipos de roble, evidenciando para nuestra investigación la presencia de Vainillina y Siringaldehído, mostrada en la tabla 2.

Compound	American oak	French oak		
		Allier	Centre of France	Vosges
<i>trans</i> - β -Methyl- γ -octalactone	4.07	4.82	22.58	11.77
<i>cis</i> - β -Methyl- γ -octalactone	37.02	27.82	25.36	44.51
Eugenol	1.93	2.46	5.14	2.78
Vanillin	9.84	4.82	5.46	8.99
Syringaldehyde	23.97	14.12	13.16	22.68

Ilustración 2. Compuestos volátiles en g/g de madera en extractos hidroalcohólicos de roble Americano y Francés (Allier, Vosges y centro de Francia) por GC-MS

Fuente: Pérez et al., 1997.

Vainillina y Siringaldehído

Contextualización

La vainilla es uno de los sabores más populares del mundo. Su fragancia floral y frutal combinada con un cuerpo profundo y aromático lo hace único y universalmente favorecido. Por lo tanto, la determinación de la vainillina es uno de los parámetros más importantes en los extractos naturales (Valdez y Macías, 2007, 1201).

Y en el caso de las bebidas añejadas, Puech, 1988 (como se cita en Blanco, Redondo, Ribas y Queris, 2005, 25) afirma “que se podía producir una transformación del Siringaldehído en Vainillina, por lo que la presencia de dicho compuesto tendría más importancia de la que a priori se esperaba”

“La despolimerización de la lignina es uno de los muchos procesos existentes que producen compuestos fenólicos funcionales con valor agregado como la Vainillina y el Siringaldehído” (Mota, Rodríguez, Loureiro, y Rodríguez, 2016), proceso que se presenta en el añejamiento.

Determinación de Vainillina y Siringaldehído por HPLC

(Blanco et al., 2005, 25), en su estudio de los compuestos fenólicos en extractos de roble en el proceso del tratamiento térmico de la madera, presento como objetivo, establecer las mejores condiciones para el tratamiento térmico de las virutas de roble y así lograr las mayores concentraciones de fenoles (Vainillina y Siringaldehído) en los extractos de aguardientes con la consiguiente disminución del tiempo de envejecimiento

de los rones, utilizando la cromatografía HPLC para la determinación de los mismos. Las sustancias patrones que se utilizaron fueron el Siringaldehído de la firma SERVA y la Vainillina de la firma ANALAR, se disolvieron en la mezcla terciaria ácido sulfúrico/metanol/propanol (180/30/5 v/v). Para la determinación de fenoles por HPLC se utilizó un cromatógrafo líquido KNAUER con una columna Hypersil 5 ODS (250 mm; 4,6 mm d.i., 5m) la determinación se realizó de forma isocrática con una fase móvil de ácido sulfúrico/metanol/propanol (180/30/5) a un flujo de 1 mL/ min., utilizando un lazo de 20 L y se realizó la detección a una longitud de onda de 280 nm. Los cromatogramas fueron procesados en el software BioCrom. Las muestras se filtraron por una membrana de 0,45m de tamaño del poro y se inyectaron al cromatógrafo. Las soluciones estándar de calibración utilizadas para la cuantificación consistieron en una mezcla de Vainillina, Siringaldehído en un rango de concentraciones de 0.1145- 0.01145, 0.2391-0.02391 mg/mL respectivamente disuelta en la fase móvil. Para las dos variables estudiadas, la Vainillina y el Siringaldehído se ajustaron los dos modelos cuadráticos con altos valores de coeficientes de correlación R² y bajos coeficientes de variación.

El objetivo de González, Calderón y Cabeza, 2008, 58, en su trabajo de cuantificación de sustancias marcadoras de envejecimiento en *quercus humboldtii* por HPLC a, fue estudiar la composición química de sustancias marcadoras de envejecimiento del roble colombiano sin tostar y tostado a

180°C por tres horas, por HPLC. Para la determinación y cuantificación de Siringaldehído y Vainillina por Análisis cromatográfico, las muestras se analizaron en fase reversa, en un cromatografo liquido Agilent 1100® con bomba cuaternaria, columna supelcosil LC-18.DB de 5µm 25 cm x 4,5 mm a 40°C. Para la elución de los compuestos se empleó una fase móvil compuesta por dos solventes: fase móvil A compuesta por agua/ácido acético glacial (98/2) y una fase móvil B compuesta por metanol/agua/ácido acético glacial (70/28/2), en gradiente con flujo del solvente de 1,25 ml/min. Se cuantifico a una longitud de onda de 300 nm. Las inyecciones cromatograficas se llevaron a cabo por triplicado para cada una de las muestras, previa filtración a través de filtros millipore de 0,45. La relación de Siringaldehído/Vainillina para el roble colombiano se fija en 1.43 atendiendo a las concentraciones encontradas, concordando con el trabajo de Puech y Jouret (1982), que tras analizar las concentraciones de Siringaldehído y Vainillina en muestras de origen perfectamente conocido, llegaron a la conclusión de que dicha relación debe estar comprendida entre 1,4 y 2,5, lo cual indicaría que existe un equilibrio entre los productos de degradación de la lignina (Siringaldehído y Vainillina).

(Regalado et al., 2011, 7358,) para el análisis cromatográfico de las fracciones de HSCCC se llevó a cabo en una LC-MS Bruker HCTultra ETD II (Bruker Daltonik, Bremen, Alemania) con ionización por electrospray en los modos positivo y negativo. El sistema de HPLC consistió en una bomba

binaria Serie 1100 G1312A de HP, un muestreador automático HP serie 1200 G1329B ALS SL y un detector de matriz de diodos serie HP 1100 (Agilent, Böblingen, Alemania). El sistema fue controlado por el software Compass 1.3, con nitrógeno de gas seco con un flujo de gas de 10 ml/min (350 C), se ajustó el nebulizador a 60 psi. Las separaciones se realizaron usando una columna Synergi MAX-RP (250 mm x 4,6 mm, tamaño de partícula de 4 µm con una columna (4,0 mm x 3,0 mm) llena del mismo material (Phenomenex; ESTADOS UNIDOS). Como fases móviles (A) agua/acetonitrilo/ácido fórmico 87:3:10 (v /v /v) respectivamente y (B) agua/acetonitrilo/ácido fórmico 40:50:10 (v /v /v) con el siguiente gradiente: 0 min, 6% B; 20 min, 20% de B; 35 min, 40% de B; 40 min, 60% de B; 45 min, 90% de B; 55 min, 6% de B. El flujo se fijó en 0,5 ml / min. El volumen de inyección se ajustó a 20 µl.

(Schwarz, Rodríguez, Sánchez, Guillén y Barroso, 2014, 109), para el análisis fenólico uso, *Ultra Performance Liquid Chromatography* (UPLC). La columna utilizada fue una ACQUITY UPLC C18 con las siguientes dimensiones: diámetro interno de 2,1 mm, longitud de 100 mm y tamaño de partícula de 1,7 µm. La temperatura de la columna se mantuvo constante a 47 °C. Los polifenoles identificados y cuantificados fueron: ácido gálico, ácido 5-hidroximetilfurfural, ácido protocatequídico, furfural, protocatequualdehído, ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido vanílico, *p*-

hidroxibenzaldehído, metilfurfural, ácido jeringa, vainillina, ácido *p*-cármico y Siringaldehído.

Validación de métodos

¿Qué es validar un método?

Es básicamente el proceso para definir un requisito analítico, y la confirmación de que cuenta con capacidades consistentes con las aplicaciones requeridas. Inherente a esto está la necesidad de evaluar el desempeño del método. Es importante la valoración de la idoneidad del método; en el pasado la validación del método se centraba solo en la evaluación de las características de desempeño (Magnusson y Örnemark, 2014).

Necesidad de validar un método

Por requerimiento de la NTC/ISO/IEC 17025, en el numeral 5.4.2 El Laboratorio debe utilizar los métodos de ensayo o de calibración, incluidos los de muestreo, que satisfagan las necesidades del cliente y que sean apropiados para los ensayos o las calibraciones que realiza. Se deben utilizar preferentemente los métodos publicados como normas internacionales, regionales o nacionales (Magnusson y Örnemark, 2014).

¿Cuándo debe validarse un método?

En la NTC/ISO/IEC 17025, se solicita en el numeral 5.4.5.2 que el Laboratorio debe validar los métodos no normalizados, los métodos que se diseñan o desarrolla, los métodos normalizados empleados fuera del

alcance previsto, así como las ampliaciones y modificaciones de los métodos normalizados, para confirmar que los métodos son aptos para el fin previsto. La validación debe ser tan amplia como sea necesario para satisfacer las necesidades del tipo de aplicación o del campo de aplicación dados (Magnusson y Örnemark, 2014).

Parámetros de validación

Selectividad

Es el grado en el que un método puede ser utilizado para determinar analitos particulares en mezclas o matrices sin interferencias de otros componentes de comportamiento similar según IUPAC 2011 (como se citó en Magn.usson y Örnemark, 2014).

La selectividad de un procedimiento debe ser establecida para métodos desarrollados internamente en el laboratorio, métodos adaptados de la literatura científica y métodos publicados por organismos de estandarización utilizados fuera del alcance especificado en el método estándar. Cuando los métodos publicados por organismos de normalización son aplicados dentro de su alcance, la selectividad usualmente habrá sido estudiada como parte del proceso de normalización (Magnusson y Örnemark, 2014).

Tabla 1. Selectividad

Qué hacer	Cuántas veces	Qué calcular/determinar a partir de la información	Comentarios
Analice muestras de ensayo y material de referencia por el método y otros métodos independientes.	1	Use los resultados de las técnicas confirmatorias para evaluar la capacidad del método para confirmar la identidad del analito y su capacidad para medir el analito aislado de otras interferencias.	Decida qué cantidad razonable de información adicional es necesaria para conferir suficiente confiabilidad.
Analice muestras de ensayo conteniendo varias interferencias sospechadas en la presencia de los analitos de interés.	1	Examine el efecto de las interferencias. ¿La presencia de la interferencia inhibe la detección y cuantificación de los analitos?	Si la detección o cuantificación es inhibida por las interferencias, será necesario continuar con el desarrollo del método.

Fuente: Magnusson y Örnemark, 2014.

Límite de detección y límite de cuantificación

Límite de detección: se define como la concentración neta mínima detectable de la variable (Magnusson y Örnemark, 2014).

Límite de cuantificación: se define como la concentración mínima que puede ser cuantificada en el equipo (Magnusson y Örnemark, 2014).

Los siguientes puntos deberían ser considerados en el momento de determinar LD y LC en un experimento que consiste en una única réplica:

Muestras adecuadas para estimar LD y LC: Las muestras usadas deberían ser preferentemente o bien a) muestras blanco, es decir, muestras que no tengan cantidades detectables de analito, o b) muestras de ensayo con concentraciones de analito cercanas o por debajo del LC esperable (Magnusson y Örnemark, 2014).

Asegurar un replicado representativo: La desviación estándar debería ser representativa del desempeño del método tal como se aplica en el laboratorio, es decir, la desviación estándar debe ser calculada basándose en resultados obtenidos cuando el análisis se efectúa exactamente de acuerdo a todo el procedimiento de medición documentado, incluyendo cualquier paso de preparación de muestra. Los valores usados para calcular la desviación estándar (S_0) deberían informarse en las unidades de medición especificadas en el procedimiento (Magnusson y Örnemark, 2014).

Número de observaciones: El número de réplicas (m) debería ser suficiente para obtener un estimado adecuado de la desviación estándar. Típicamente se consideran necesarias de 6 a 15 réplicas; usualmente se recomiendan 10 réplicas (Magnusson y Örnemark, 2014).

Considerar el promedio: En varios procedimientos de medición se reporta el promedio de las réplicas durante el uso de rutina del método, donde cada replicado se obtiene siguiendo el procedimiento de medición entero. En este caso, la desviación estándar de cada resultado único s_0 debería ser corregida dividiéndola por la raíz cuadrada de n , donde n es el número de réplicas promediadas en el uso de rutina (Magnusson y Örnemark, 2014).

Intervalo de trabajo

Es el intervalo en el cual el método proporciona resultados con una incertidumbre aceptable. El extremo inferior del intervalo de trabajo está

determinado por el LC. El extremo superior del intervalo de trabajo está definido por las concentraciones a las cuales se observan anomalías significativas en la sensibilidad analítica (Magnusson y Örnemark, 2014).

El intervalo de trabajo del método que se va a validar, debe indicarse en el alcance del procedimiento documentado. Durante la validación, es necesario confirmar que el método puede utilizarse en este intervalo. Para evaluar el intervalo de trabajo, el laboratorio tiene que considerar tanto la linealidad del método como el procedimiento de calibración propuesto indicado en el método (Magnusson y Örnemark, 2014).

Para evaluar el intervalo de trabajo del método, 1) muestras con concentraciones conocidas y blancos de muestra deberían estar disponibles; 2) las muestras utilizadas deberían someterse al procedimiento de medición completo; 3) las concentraciones de las diferentes muestras deben cubrir, de preferencia, todo el rango de interés; y 4) el instrumento debería haber sido calibrado de acuerdo con el procedimiento de calibración propuesto. El resultado de medición para cada muestra de ensayo se calcula de acuerdo con el procedimiento documentado en la tabla 2. Estos valores se grafican en el eje y en función de las concentraciones conocidas de las muestras (eje x) como en la ilustración 3. El intervalo de trabajo y la linealidad del método se evalúan mediante una inspección visual del gráfico, con el apoyo de estadísticas y un gráfico de residuales de una regresión lineal. La evaluación del intervalo

de trabajo se sustentará con datos de estudios de precisión y sesgo, siempre que estos estudios cubran las concentraciones en todo el intervalo de trabajo del método. Se debe establecer el intervalo de trabajo del método para cada matriz cubierta en el alcance del método. Esto se debe a que las interferencias pueden producir respuestas no lineales, y la capacidad del método para extraer/recuperar el analito puede variar con la matriz de la muestra (Magnusson y Örnemark, 2014).

Tabla 2. Intervalo de trabajo

Qué hacer	Cuántas veces	Qué calcular a partir de los datos	Qué hacer
1) Medir un blanco más patrones de calibración, a 6-10 concentraciones espaciadas uniformemente en el rango de interés.	1	Graficar las respuesta (<i>eje y</i>) en función de la concentración (<i>eje x</i>). Examinar visualmente para identificar el rango lineal aproximado y los límites superior e inferior del intervalo de trabajo del instrumento. Luego pasa a 2)	Esto dará una confirmación visual de si el intervalo de trabajo del instrumento es lineal o no. Nota: Cuando la señal no es directamente proporcional a la concentración, por ejemplo, al trabajar con pH u otros electrodos de ion selectivo o métodos inmunométricos, se requiere una transformación de los valores medidos antes de que se pueda evaluar la linealidad.
2) Medir un blanco más patrones de calibración, 2-3 veces a 6-10 concentraciones espaciadas	1	Graficar la respuesta en el (<i>eje y</i>) en función de la concentración (<i>eje x</i>). Examinar visualmente para determinar valores atípicos que quizá no se reflejen en la regresión.	Esta etapa es necesaria para ensayar un intervalo de trabajo, que se considere lineal y especial mete en el que el método utilice

<p>uniformemente en el rango lineal.</p>		<p>Calcular las estadísticas de regresión apropiadas. Calcular y graficar los residuales (la diferencia entre el valor observado de y y el valor calculado de y pronosticado por la línea recta, para cada valor de x). La distribución aleatoria de residuales en torno a cero confirma la linealidad. Las tendencias sistemáticas indican la no linealidad o un cambio de varianza con el nivel.</p>	<p>una calibración de dos puntos.</p> <p>Si la desviación estándar es proporcional a la concentración, entonces considerar utilizar un cálculo de regresión ponderado en vez de una regresión lineal no ponderada simple.</p> <p>Es peligroso eliminar un valor atípico sin verificarlo primero utilizando otras mediciones a concentraciones cercanas.</p> <p>En ciertas circunstancias, para la calibración de instrumentos, puede ser mejor tratar de ajustar una curva no lineal a los datos. En ese caso, se debe incrementar el número de muestras. Por lo general, no se recomienda el uso de funciones superiores a las cuadráticas.</p>
<p>3) Calibrar el instrumento de acuerdo con el procedimiento de calibración propuesto. Medir, de acuerdo con el método documentado, un blanco más</p>	<p>1</p>	<p>Graficar la concentración medida (<i>eje y</i>) en función de la concentración de las muestras de ensayo (<i>eje x</i>).</p> <p>Examinar visualmente para identificar el rango lineal aproximado y los</p>	<p>Este paso se requiere para evaluar si el rango propuesto del instrumento y procedimiento de calibración son aptos para el uso.</p>

<p>materiales de referencia o blancos de muestras adicionadas 2-3 veces a 6-10 concentraciones espaciadas uniformemente en el rango de interés.</p>		<p>límites superior e inferior del intervalo de trabajo.</p> <p>Calcular las estadísticas de regresión apropiadas. Calcular y graficar los residuales (la diferencia entre el valor observado de y y el valor calculado de y pronosticado por la línea recta, para cada valor de x). La distribución aleatoria de residuales en torno a cero confirma la linealidad. Las tendencias sistemáticas indican la no linealidad.</p>	<p>Si pueden encontrarse datos en estudios de precisión y sesgo que cubren el rango de interés, quizá no se requiera otro estudio del intervalo de trabajo del método.</p>
---	--	---	--

Fuente: Magnusson y Örnemark, 2014.

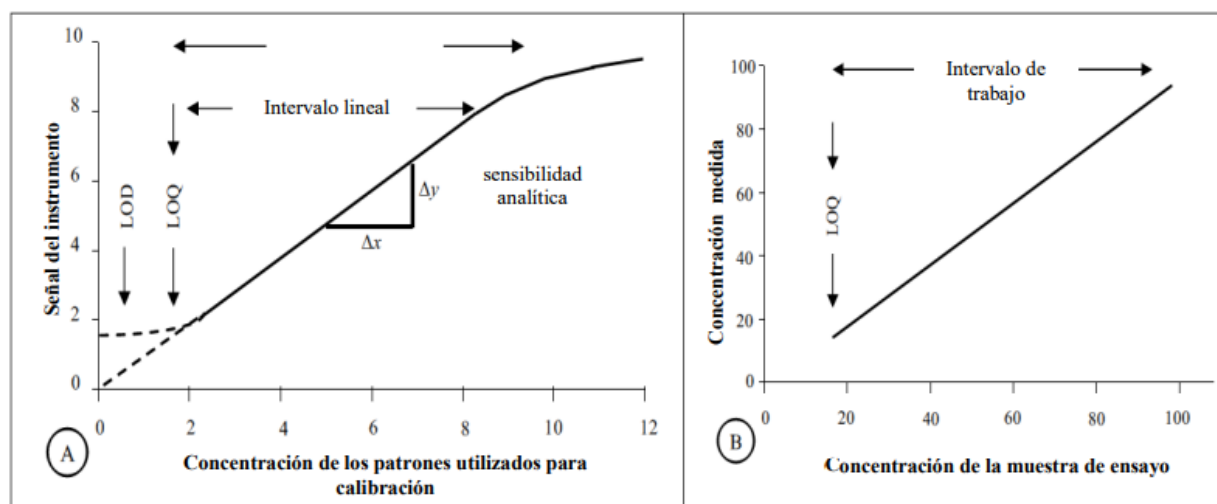


Ilustración 3. A) Ejemplo típico de una curva de respuesta obtenida con un método instrumental. Se identifican las características de desempeño “intervalo de trabajo”, “intervalo lineal”, “sensibilidad analítica”, “LD” Y “LC”. B) Ejemplo típico de una curva obtenida

Fuente: Magnusson y Örnemark, 2014.

Determinación del sesgo

Una determinación práctica del sesgo se basa en la comparación de la media de los resultados, el método candidato con un valor de referencia adecuado (ref x). *Existen tres enfoques generales: a) análisis de materiales de referencia, b) experimentos de recuperación utilizando muestras adicionadas, y c) comparación con resultados obtenidos mediante otro método, Tabla 3 Los estudios de sesgo deben cubrir el alcance del método y, por lo tanto, pueden requerir el análisis de diferentes tipos de muestra y/o diferentes niveles de analito (Magnusson y Örnemark, 2014).

Tabla 3. Sesgo

Qué hacer	Cuántas veces	Qué calcular a partir de los datos	comentarios
a) Medir el material de referencia en el método candidato.	10	Comparar el valor medido, \bar{x} con el valor de referencia x_{ref} para el material de referencia. Calcular el sesgo, b , (%) o la recuperación relativa en porcentaje (recuperación aparente). $b = \bar{x} - x_{ref}$ $b(\%) = \frac{\bar{x} - x_{ref}}{x_{ref}} \times 100$ $R(\%) = \frac{\bar{x}}{x_{ref}} \times 100$	Da una medida del sesgo tomando en cuenta los efectos del sesgo del método y del laboratorio.
b) Medir blancos de matriz o muestras de ensayo no adicionadas y adicionadas con el analito de interés en un intervalo de concentraciones.	10	Comparar la diferencia entre el valor medido de adiciones \bar{x}' y el valor medido \bar{x} , con la concentración añadida $x_{adición}$. Calcular la recuperación relativa de adiciones $R'(\%)$ a las diferentes concentraciones: $R'(\%) = \frac{\bar{x}' - \bar{x}}{x_{adición}} \times 100$	Se deben comparar las muestras adicionadas con las mismas muestras no adicionadas para evaluar la recuperación neta de la adición. Las recuperaciones a partir de muestras adicionadas o blancos de matriz generalmente serán

			mejores que para muestras de rutina en las cuales el analito está más fuertemente ligado.
c) Medir el material de referencia/muestra de ensayo utilizando el método candidato y el método alternativo.	10	<p>Medir el material de referencia/muestra de ensayo utilizando el método candidato y el método alternativo.</p> $b = \frac{x - x_{ref}}{x_{ref}} \times 100$ $b(\%) = \frac{x - x_{ref}}{x_{ref}} \times 100$ $R(\%) = \frac{x}{x_{ref}} \times 100$	<p>Da una medida del sesgo en relación con el método alternativo. El método alternativo puede ser un método de referencia o, si la intención es sustituir un método por otro y hace falta demostrar el desempeño equivalente, un método utilizado actualmente en el laboratorio.</p> <p>El método alternativo por sí mismo puede estar sesgado, en cuyo caso el experimento no dará una medición absoluta de la veracidad.</p>
NOTA: El sesgo puede variar con la matriz y el nivel de concentración, lo cual significa que el número de matrices y niveles de concentración que se va a examinar, debe indicarse en el plan de validación.			

Fuente: Magnusson y Örnemark, 2014.

Precisión

La repetición es esencial para obtener estimaciones fiables de características de desempeño del método, tales como la precisión y el sesgo. Los experimentos que implican análisis repetidos deben ser diseñados para tener en cuenta todas las variaciones en las condiciones operativas que se pueden esperar durante el uso rutinario del método. El objetivo debería ser determinar la variabilidad típica y no la variabilidad mínima. Las submuestras del material de ensayo seleccionado se analizan por replicado en condiciones de repetibilidad a través de un número de diferentes series de medida, con una variación máxima en condiciones entre las series de medida (diferentes días, diferentes analistas, diferentes equipos, entre otros) (Magnusson y Örnemark, 2014).

Tabla 4. Precisión

Qué hacer	Cuántas veces	Qué calcular/determinar de los datos	Comentarios
Medir materiales de referencia (MR), muestras excedentes de ensayos o blancos de muestra adicionados a diversas concentraciones en todo el intervalo de trabajo. La repetibilidad y la precisión intermedia se pueden determinar a partir de estudios por separado (véase a) y b) o simultáneamente en un solo estudio (ver c).			
a) Mismo equipo y mismo analista, mismo laboratorio, plazo prolongado de tiempo.	6-15 réplicas para cada material.	Determinar la desviación estándar (S) de los resultados para cada material.	Estimar la desviación estándar de repetibilidad S_r para cada material. ^a
b) Analistas y equipos diferentes, mismo laboratorio, plazo prolongado de tiempo.	6-15 réplicas para cada material.	Determinar la desviación estándar (S) de los resultados para cada material.	Estimar la desviación estándar de la precisión intermedia S_r para cada material.
c) Analistas y equipos diferentes, mismo laboratorio, plazo	6-15 grupos de medidas duplicadas ^b obtenidas bajo condiciones de repetibilidad en días/equipos	Calcular la desviación estándar de repetibilidad de los resultados de la ANOVA para cada material.	Estimar la desviación estándar de repetibilidad S_r para cada material.

prolongado de tiempo.	diferentes para cada material.	Calcular la desviación estándar entre grupos de los resultados de la ANOVA y combinarla con la desviación estándar de repetibilidad para cada material.	Estimar la desviación estándar de la precisión intermedia S_r para cada material.
d) Analistas y equipos diferentes, laboratorios diferentes, plazo prolongado de tiempo.	6-15 grupos de medidas duplicadas ^b obtenidas bajo condiciones de repetibilidad en diferentes laboratorios para cada material.	Calcular la desviación estándar de repetibilidad de los resultados de la ANOVA para cada material. Calcular la desviación estándar entre laboratorios de los resultados de la ANOVA y combinarla con la desviación estándar de repetibilidad para cada material.	Estimar la desviación estándar de repetibilidad S_r para cada material. Estimar la desviación estándar de reproducibilidad S_R para cada material. Esto requiere una comparación especial entre laboratorios (“ensayo colaborativo”).
<p>^a Una desviación estándar de repetibilidad también se puede estimar al reunir varios conjuntos pequeños de datos, por ejemplo, $n=2$, de diferentes días.</p> <p>^b Las mediciones duplicadas dentro de cada grupo proporcionara un numero equilibrado de grados de libertad para las estimaciones las desviaciones estándar inter y entre grupos. Aumentando el número de repeticiones por grupo aumentara el número de grados de libertad asociados con la estimación de la repetibilidad.</p>			

Fuente: Magnusson y Örnemark, 2014.

Robustez

La “robustez” de un procedimiento analítico es “una medida de su capacidad para permanecer no afectado por pequeñas variaciones premeditadas de los parámetros del método. La robustez proporciona una indicación de la fiabilidad del método durante su uso normal” según ICH 2005 (como se citó en Magnusson y Örnemark, 2014.)

En cualquier método habrá ciertas etapas que, si no se realizan con suficientemente cuidado, tendrán un efecto significativo en el desempeño del método e incluso puede resultar que el método no funciona en absoluto. Estas etapas deberían ser identificadas, por lo general como parte del desarrollo del método, y si es posible, su influencia en el desempeño del método evaluado utilizando una "prueba de resistencia" ("prueba de robustez "). La AOAC ha definido este término y describe una técnica establecida para la forma de llevar a cabo una prueba de este tipo utilizando un diseño experimental PlackettBurman. Un "ensayo de robustez" implica hacer cambios deliberados en el método, e investigar el efecto subsiguiente en el desempeño.* A continuación, es posible identificar las variables en el método que tienen el efecto más significativo y garantizar que, cuando se utiliza el método, están controladas estrictamente. Donde hay una necesidad de perfeccionar más el método, las mejoras se pueden probablemente hacer mediante la concentración en aquellas partes del método conocidas por ser críticas. La robustez de un procedimiento debe

ser establecida para los métodos de desarrollo interno, métodos adaptados de la literatura científica y los métodos publicados por organismos de normalización utilizados fuera del alcance especificado en el método estándar. Cuando se utilizan métodos publicados por organismos de normalización dentro del alcance de aplicación del método, la robustez por lo general ha sido estudiada como parte del proceso de normalización. Por lo tanto un estudio de robustez se encuentra en la mayoría de los casos no necesariamente en el nivel de un solo laboratorio. La información sobre la robustez se debe indicar en el procedimiento del laboratorio en forma de los límites de tolerancia establecidos para los parámetros experimentales críticos (Magnusson y Örnemark, 2014).

Tabla 5. Robustez

Qué hacer	Cuántas veces	Qué calcular/determinar de los datos	Comentarios
<p>Identificar las variables que podrían tener un efecto significativo en el desempeño del método.</p> <p>Establecer experimentos (analizando material de referencia o muestras de ensayo) para supervisar el efecto en los resultados de la medida cambiando de forma sistemática las variables.</p>	<p>Evaluado más efectivamente utilizando diseños de experimentos. Por ejemplo: 7 parámetros se pueden estudiar en 8 experimentos utilizando un diseño de experimentos.</p>	<p>Determinar el efecto de cada cambio de condición en los resultados de la medida.</p> <p>Clasificar las variables según el mayor efecto sobre el desempeño del método.</p> <p>Realizar pruebas de significación para determinar si los efectos observados son estadísticamente significativos.</p>	<p>Diseñar el control de calidad o modificar el método para controlar las variables críticas, por ejemplo, indicando los límites de tolerancia adecuados en el procedimiento operativo estándar.</p>

Fuente: Magnusson y Örnemark, 2014.

Metodología

Material de referencia

Estándar de Vainillina (Merck), de pureza 99,0%, número de lote S5651218 306 e incertidumbre por el proveedor de $\pm 0,5$.

Estándar de Siringaldehído (Merck), de pureza 97,0%, número de lote S29672 141 e incertidumbre por el proveedor de $\pm 0,5$.

Principio del método

Consiste en la separación por afinidad polar o apolar de los compuestos a través de una columna cromatográfica y una fase móvil a alta presión, con la gráfica del área de los compuestos Siringaldehído y Vainillina contra la concentración de los diferentes estándares se determina por interpolación la concentración de Siringaldehído y Vainillina en roncs para análisis.

Montaje del método

Calibración de Siringaldehído y Vainillina (estas soluciones deben ser inyectadas el mismo día de su preparación preferiblemente, deben ser almacenadas en la nevera aproximadamente a unos 4°C) protegidas de la luz o en viales de vidrio ámbar.

Las curvas se realizan por separado para cada compuesto.

Se ha determinado que para realizar el montaje del método cromatográfico, se deben seguir las siguientes etapas:

Condiciones cromatográficas del método

Horno: Temperatura en 40,0°C durante toda la corrida cromatográfica. Tiempo total de corrida 13,0 minutos.

Bomba: Bomba cuaternaria con un flujo de 2,0 mL/min de una mezcla de Metanol/Agua al 22/78.

Columna: Agilent 5 TC-C18 (2) de 250 X 4.6mm

Detector: Ultravioleta a 311 nm con un ancho de banda de 4 nm.

Señal: Obtención de datos 5 Hz

Inyector automático: Inyección estándar de 10 μ L

Equipo y materiales

Cromatógrafo líquido de alta presión (HPLC modelo Agilent 1260 Infinity) con detector UV, equipado con software de cromatografía (HP GC ChemStation)

Balanza analítica de precisión mínima de ± 0.0001 g

Balón volumétrico aforado CLASE A de 1000 mL

Balones volumétricos aforados CLASE A de 100 mL

Pipetas volumétricas CLASE A de 10, 20 y 50mL

Metanol para cromatografía HPLC (grado cromatográfico)

Alcohol extra neutro de 96%vol

Agua Tipo I para HPLC

Jeringas

Filtros de jeringa de 0.45 micras

Viales de cromatografía de 1,5 mL

Una vez establecidas las condiciones apropiadas de operación del cromatógrafo líquido (carpeta del equipo), se procede al montaje del método.

Preparación de solución madre de Siringaldehído y Vainillina: Pesar alrededor de 0,1 g de Siringaldehído y Vainillina (con exactitud de 0,0001 g en un pesa-sustancias) y transferirlo cuantitativamente con agua Tipo I en un balón volumétrico de 100mL (solución de 1000 mg/L).

Preparación de soluciones estándar de Siringaldehído y Vainillina: Preparar todas las soluciones patrón por triplicado en balones de 100 mL, de 1, 3, 5, 7 y 9 mg/L por dilución partiendo de la solución madre de 1000 mg/L, aforar con agua tipo I.

Tratamiento de las soluciones estándar para inyectar: Todas las soluciones patrón se filtran a través de filtros de jeringa con membrana de polietileno y 0,45 μ m antes de ser inyectadas en el HPLC.

Curva de calibración: Colocar la muestra en un vial cromatográfico, llenándolo hasta no más de 1,5 mL y proceder a inyectar 10 μ L de cada una de las soluciones estándar, en el cromatógrafo HPLC y seleccionar la mejor curva posible con las posibilidades del software.

Preparación de la muestra: Las muestras deben ser diluidas con factor de dilución de 2,5 en balones volumétricos, en todos los casos las muestras a inyectar deben estar filtradas o limpias, pues de no ser así esto afecta la vida útil de la columna cromatográfica.

Inyección de la muestra en el cromatógrafo HPLC: La muestra una vez preparada debe inyectarse en el cromatógrafo, con la programación de los valores para el factor de dilución y factor multiplicador (para los estándares de calibración estos dos factores son iguales a 1).

Validación del método

El método para la determinación de la edad de ronés cuantificando Vainillina y Siringaldehído por HPLC, se validó para selectividad, linealidad, LD y LC, precisión (intermedia y repetibilidad), exactitud (recuperación) y robustez de acuerdo a la guía EURACHEM 2014. La selectividad se ensayó realizando por triplicado la inyección de tres muestras con las siguientes características: primera muestra, agua tipo I, la cual se usó para preparar las diluciones, por lo que no debe contener los analitos de interés ni compuestos interferentes para estos, segunda muestras, ron 3 años, esta es la matriz de la que se espera contenga los analitos de interés y sus demás componentes no interfieran en la cuantificación de estos, y la tercera muestra es la matriz enriquecida con los analitos, el cual se espera que aumenten la concentración de los analitos. Se preparó las diluciones para la curva de calibración adaptada a la matriz para cinco concentraciones (1,0- 3,0- 5,0- 7,0 y 9,0 mg/L) de Vainillina y Siringaldehído en agua tipo I para la curva de calibración del sistema y ron 3 años para la curva de calibración del método, la linealidad se calculó usando estas cinco concentraciones por triplicado. Los valores de LD y LC se calcularon a partir de las curvas de calibración obtenidas de cada analito. Se analizó la precisión intermedia y la repetibilidad, con el nivel medio de la curva

de calibración, inyectando por dos días 7 veces cada día y por el mismo analista dicha concentración, para la repetibilidad y para la precisión intermedia se inyectó por tres días 7 veces cada día, por dos analistas. La exactitud se obtuvo al inyectar los niveles bajo, medio y alto de la curva de calibración, cinco veces cada nivel y determinando con ello la desviación estándar, el coeficiente de variación y la recuperación. La robustez se analizó identificando aquellos factores que posiblemente afectarían los resultados finales obtenidos a través de este, se seleccionó el flujo, la temperatura del horno y la composición de la fase móvil, tomando como valores máximos los valores establecidos en el procedimiento y como mínimos 1,9 mL/min para el flujo, 30°C para la temperatura del horno y agua/metanol 77/23 para la composición de la fase móvil. Por último la incertidumbre de medición se estimó basado en los lineamientos establecidos en la "Guide to the Uncertainty of Measurement" (GUM)¹ y en la EURACHEM/CITAC "Guide Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement 2 nd. Ed. a partir de los datos de validación proporcionados durante cada etapa del procedimiento analítico. Se consideraron cinco fuentes de incertidumbre para cada analito, la dilución mayor, la repetibilidad, los instrumentos y equipos de medición, la concentración de los estándares y la curva de calibración. Así, la incertidumbre expandida se calculó multiplicando la incertidumbre estándar combinada con un factor de cobertura ($k=2$) que produce un nivel de confianza de ~95%.

Para determinar los parámetros de aceptación de la validación, se hace uso comúnmente de mediciones estadísticas, como son:

Media: Conocida también como media aritmética o promedio, es la cantidad total de la muestra distribuida a partes iguales entre cada observación.

$$X = \frac{\sum x_i}{n}$$

Siendo:

x_i = valor de una lectura

n = número de lecturas

(Instituto de Salud Pública Chile, S F).

Desviación estándar (σ , S): Es el promedio de lejanía de los valores obtenidos (lecturas) respecto del promedio.

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1} (x_i - X)^2}{n - 1}}$$

Siendo:

x_i = valor de una lectura

X = promedio de la totalidad de lecturas

n = número de lecturas

(Instituto de Salud Pública Chile, S F).

Coeficiente de Variación (CV): Desviación estándar dividida por la media. También es conocida como desviación estándar relativa (RSD). El CV puede ser expresado en porcentaje.

$$\%CV = \frac{S}{X} \times 100$$

Siendo:

S = desviación estándar de las lecturas

X = promedio de la totalidad de lecturas

(Instituto de Salud Pública Chile, S F).

Varianza: Es una medida de dispersión definida como el cuadrado de la desviación estándar.

$$S^2 = \sqrt{\frac{\sum_{i=1} (x_i - X)^2}{n - 1}}$$

x_i = valor de una lectura

X = promedio de la totalidad de lecturas

n = número de lecturas

(Instituto de Salud Pública Chile, S F).

Distribución normal: Distribución continua conocida también como distribución Gaussiana, la distribución normal de una variable normal está completamente determinada por dos parámetros, su media y su desviación estándar, denotadas generalmente por μ y σ . La distribución normal se caracteriza por tener una única moda, que coincide con su media y su mediana. Su expresión gráfica es una curva normal, cuya forma es similar a los histogramas con forma de campana, es conocida como campana de gauss que es simétrica respecto a su media y asintótica al eje de abscisas, esto hace que cualquier valor entre $-\infty$ y $+\infty$ es teóricamente posible. El área total bajo la curva es, por lo tanto, igual a 1. Para este tipo

de variables existe una probabilidad de un 50% de observar un dato mayor que la media, y un 50% de observar un dato menor (Instituto de Salud Pública Chile, S F).

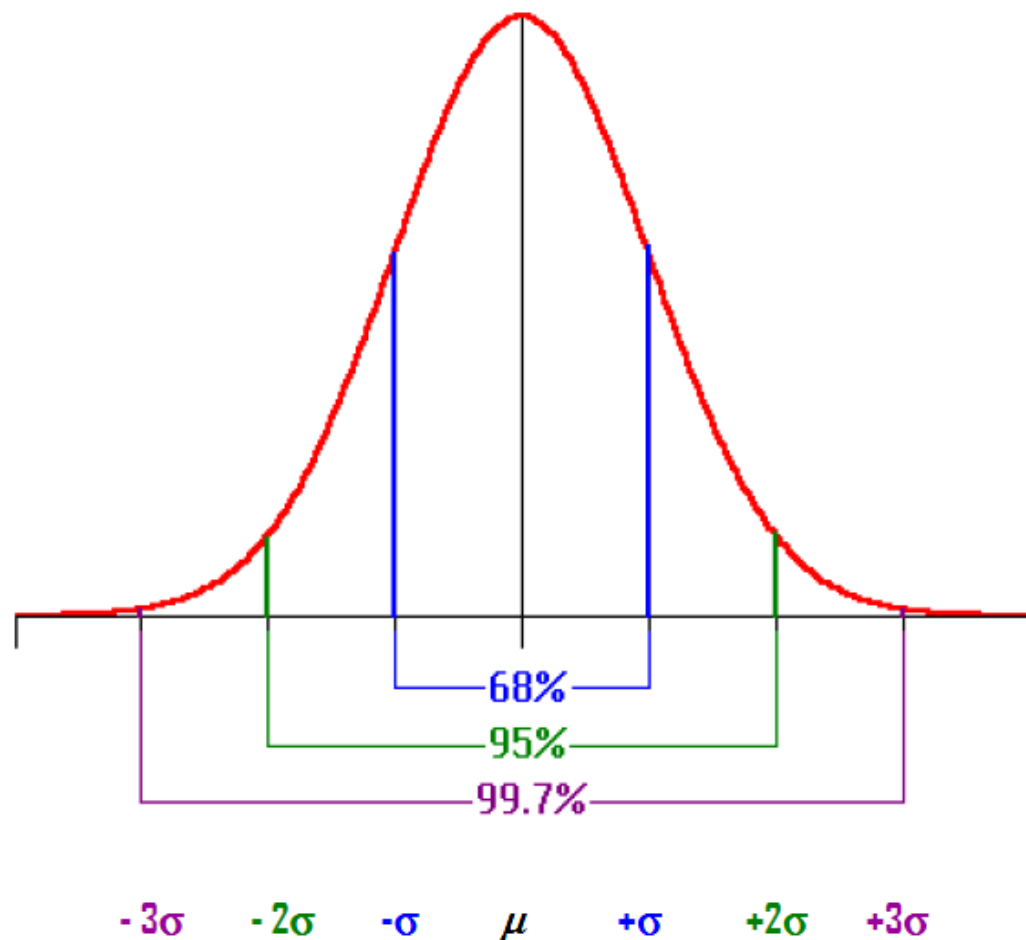


Ilustración 4. Campana de Gauss

Fuente: Instituto de Salud Pública Chile, S F.

La probabilidad de que X_0 caiga en el intervalo comprendido entre $\mu \pm \sigma$ es aproximadamente 0,687 o 68,27% (Instituto de Salud Pública Chile, S F).

La probabilidad de que X_0 caiga en el intervalo comprendido entre $\mu \pm 2\sigma$ es aproximadamente 0,9545 o 95,45% (Instituto de Salud Pública Chile, S F).

La probabilidad de que X_0 caiga en el intervalo comprendido entre $\mu \pm 3\sigma$ es aproximadamente 0,9973 o 99,73% (Instituto de Salud Pública Chile, S F).

Nivel de significancia (Alfa, α): Es el nivel de significación utilizado para calcular el nivel de confianza. El nivel de confianza es igual a 100% (1 - α), es decir, un alfa (α) de 0,05 indica un nivel de confianza de 95% (Instituto de Salud Pública Chile, S F).

Pruebas de significancia:

Prueba t- student para identificar errores sistemáticos (sesgo): Esta prueba permite comparar las medias de dos grupo de datos y determinar si entre estos parámetros las diferencias son estadísticamente significativas. En la prueba t, se procede a determinar el valor t de student calculado, obtenido de la experiencia analítica, y este valor posteriormente se compara con el llamado valor crítico, este valor crítico se obtiene de la tabla de t-student para un determinado porcentaje de confiabilidad (normalmente se utiliza el 95% de confianza, es decir, un valor α de 0,05). Si no existen diferencias significativas entre 2 grupos, el t calculado debería ser inferior al t crítico (o conocido también como t de tabla) (Instituto de Salud Pública Chile, S F).

Prueba F-Fisher para identificar errores aleatorios (precisiones): Prueba en la que el estadístico utilizado sigue una distribución F si la hipótesis nula no puede ser rechazada. En estadística aplicada se prueban muchas hipótesis mediante el test F, entre ellas: La hipótesis nula= H_0 de que las medias de

múltiples poblaciones normalmente distribuidas y con la misma desviación estándar son iguales. Esta es, quizás, la más conocida de las hipótesis verificadas mediante el test F y el problema más simple del análisis de varianza. Y la hipótesis de que las desviaciones estándar de dos poblaciones normalmente distribuidas son iguales (Instituto de Salud Pública Chile, S F).

Resultados

Selectividad

Para verificar la selectividad del método, se inyectaron tres muestras, agua tipo I, una solución de los analitos en agua tipo I y ron 3 años enriquecido. Los cromatogramas obtenidos evidencian que las condiciones cromatográficas establecidas son específicas para los analitos de interés.

Además, se realizó un análisis de estadística extendida sobre un Cromatograma correspondiente al día 1 de la repetibilidad (mostrado en la ilustración 5), ya que en él se presentan los analitos de interés, los datos presentados en las tablas 6 y 7 son un promedio de los valores extraídos directamente del equipo y la tabla 8 presenta los parámetros de aceptación.

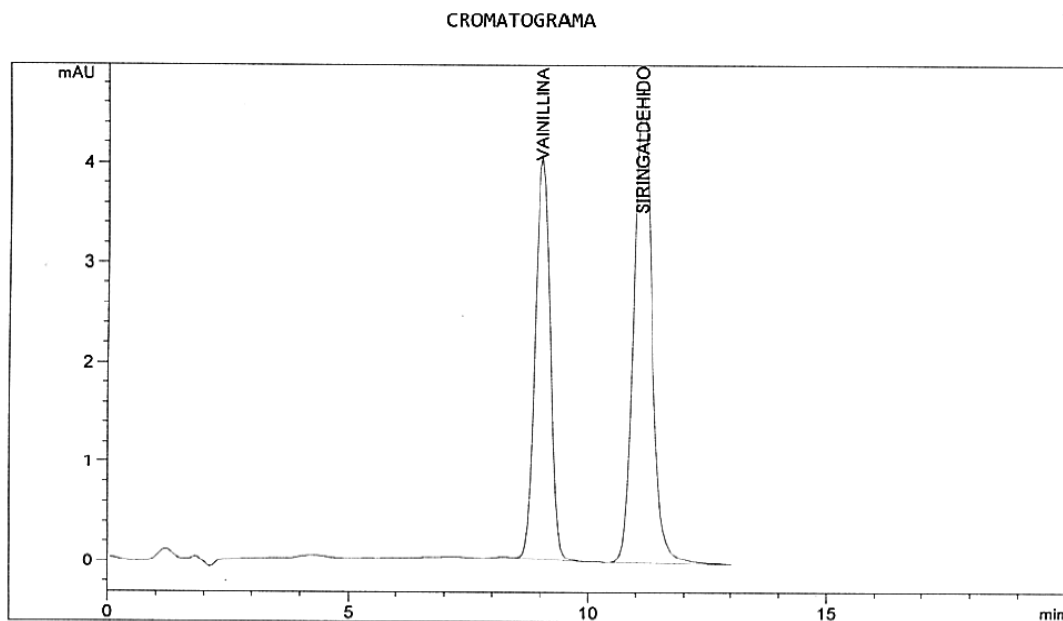


Ilustración 5. Cromatograma para análisis de la selectividad

Tabla 6. Resultados para la Vainillina

Estadístico	TR (min)	K'	S	N
Inyección 1	9,041	5,24	0,98	3289
Inyección 2	9,048	5,24	0,99	3255
Inyección 3	9,047	5,24	0,99	3334
Inyección 4	9,052	5,24	0,97	3334
Inyección 5	9,056	5,25	0,96	3360
Inyección 6	9,057	5,25	0,95	3193
Promedio	9,050	5,243	0,973	3294
S	0,006	0,005	0,016	62,133
CV (%)	0,067	0,098	1,678	1,886

Tabla 7. Resultados para el Siringaldehído

Estadístico	TR (min)	K'	S	N
Inyección 1	11,114	6,66	0,88	4076
Inyección 2	11,116	6,67	0,89	3988
Inyección 3	11,115	6,67	0,89	4064
Inyección 4	11,128	6,67	0,89	4008
Inyección 5	11,126	6,67	0,87	4170
Inyección 6	11,126	6,67	0,87	3960
Promedio	11,121	6,668	0,882	4044
S	0,0065	0,0041	0,0098	75,878
CV (%)	0,058	0,061	1,115	1,876

Tabla 8. Parámetros de aceptación

Parámetro evaluado	Criterio de aceptación
Tiempo de retención (TR)	$CV \leq 5,0\%$
Factor de capacidad (K')	Entre 1,0 y 10,0
Factor de simetría (S)	Entre 0,5 y 2,0
Platos Teóricos (N)	Mínimo 2000.
Resolución (R)	Mínimo 2

Linealidad

Linealidad del sistema

Tabla 9. Valores para el sistema (donde sistema es la curva de calibración realizada en solvente)

Analito	Concentración Teórica (%)	Área	Concentración (mg/L)
Vainillina	20	20,124	1,10069
		20,054	1,10069
		20,698	1,10069
	60	56,495	3,30206
		57,834	3,30206
		58,049	3,30206
	100	96,273	5,50344
		96,227	5,50344
		95,906	5,50344
	140	134,301	7,70482
		135,038	7,70482
		135,306	7,70482
	180	172,702	9,90619
		173,622	9,90619
		173,488	9,90619
Siringaldehído	20	18,8561	1,00498
		18,5122	1,00498
		17,7612	1,00498
	60	54,2378	3,01493
		54,6625	3,01493
		54,8550	3,01493
	100	91,0698	5,02488
		89,7110	5,02488
		90,9764	5,02488
	140	125,5791	7,03483
		126,4837	7,03483
		125,9459	7,03483
	180	163,0661	9,04478
		162,3385	9,04478
		164,1771	9,04478

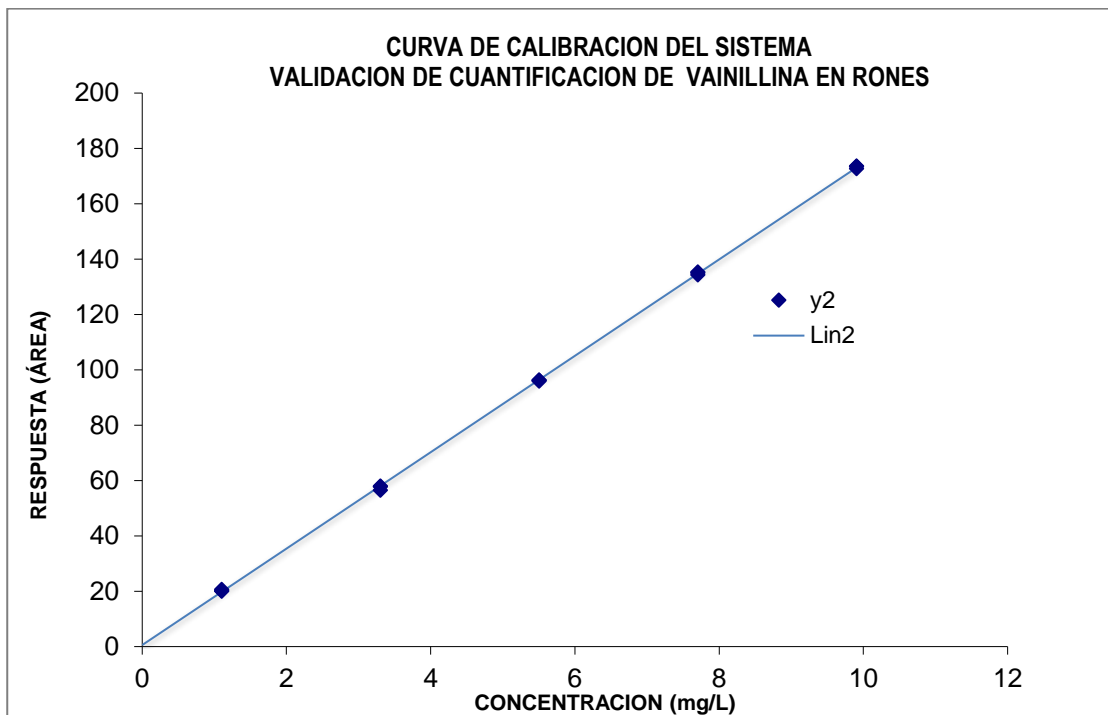


Ilustración 6. Curva de calibración del sistema (Vainillina)

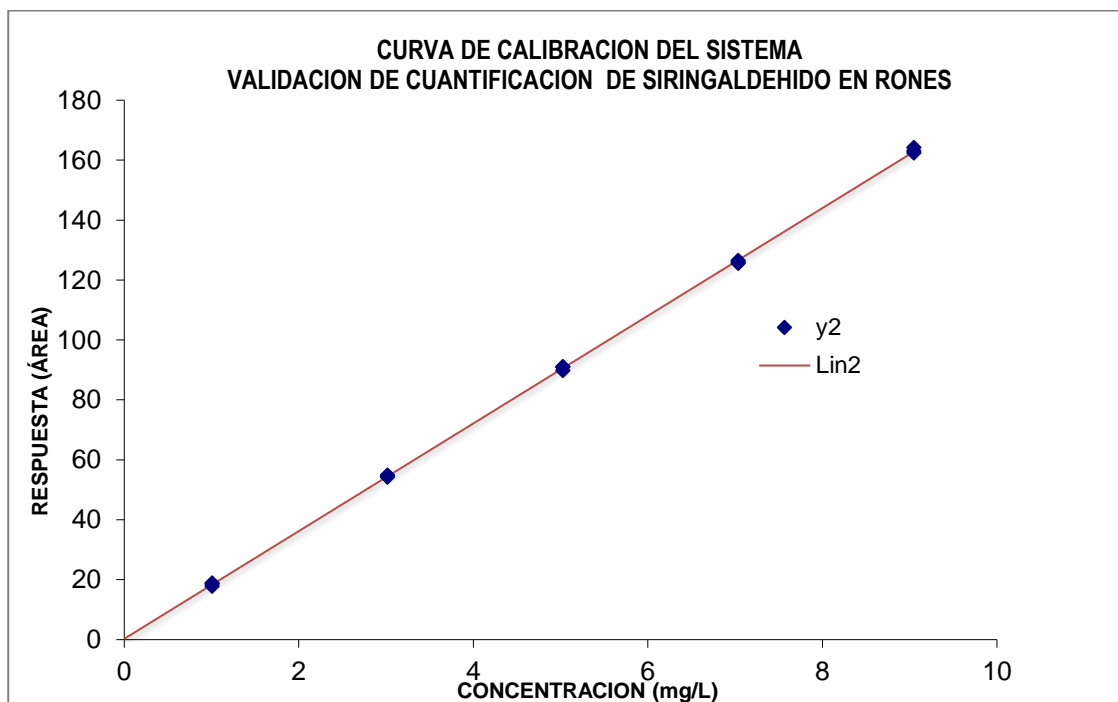


Ilustración 7. Curva de calibración del sistema (Siringaldehído)

Tabla 10. Tratamiento estadístico para la linealidad del sistema

Parámetro Estadístico	Valores obtenido para la Vainillina	Valores obtenido para el Siringaldehído
b	17,4155	17,9632
a	0,5628	0,2857
r	0,9999	0,9999
Test de Hipótesis para la Pendiente		
t exp b.	331,17	290,74
t tabla_T	2,14	2,14
Conclusión	t exp b >> t tabla Por lo tanto, la pendiente es significativamente diferente de cero	t exp b >> t tabla Por lo tanto, la pendiente es significativamente diferente de cero
Test de Hipótesis para el Intercepto		
t exp a.	1,692	0,801
t tabla_(p=0,05; 14 g.l.)	2,14	2,14
Conclusión	t exp a < t tabla Por lo tanto, el intercepto NO es significativamente diferente de cero	t exp a < t tabla Por lo tanto, el intercepto NO es significativamente diferente de cero
Límites de Confianza para la Pendiente	17,30; 17,53	17,83; 18,10
Límites de confianza para el Intercepto	-0,16; 1,28	-0,48; 1,06
Test de Fisher para la Pendiente		
F exp b	109673,54	84528,69
F tabla	4,67	4,67
Conclusión	Fexp > Ftabla Por lo tanto la pendiente es significativamente diferente de cero	Fexp > Ftabla Por lo tanto la pendiente es significativamente diferente de cero
Test de Fisher para la Linealidad		
F exp b	2,9231	1,5478
F tabla	3,71	3,71
Conclusión	Fexp < Ftabla Por lo tanto la respuesta del sistema es lineal	Fexp < Ftabla Por lo tanto la respuesta del sistema es lineal

De acuerdo con los resultados obtenidos en el tratamiento estadístico para el intercepto, la pendiente y el análisis de Varianza (que evalúa la linealidad y la regresión), la metodología analítica empleada tiene un comportamiento lineal presentando un valor

de coeficiente de correlación de 0,9999 para la Vainillina y el Siringaldehído, el cual no es estadísticamente diferente de 1. El método de análisis cumple con los parámetros estadísticos establecidos por La Fábrica de Licores y Alcoholes de Antioquia, indicándonos todo esto que existe linealidad, correlación y regresión entre los resultados obtenidos en el intervalo de concentraciones evaluadas, para los analitos en cuestión. Igualmente, las curvas de calibración obtenidas son convergentes al origen (no es significativamente diferente de cero) y los límites de confianza obtenidos para el intercepto cubren ampliamente la zona del cero. Las ecuaciones obtenidas para las curvas de calibración del sistema cromatográfico son:

Ecuación general

$$\frac{AREA - a}{b} = CONCENTRACIÓN\left(\frac{mg}{L}\right)$$

Siendo:

a = el intercepto de la curva de calibración del sistema

b = la pendiente de la curva de calibración del sistema

Para La Vainillina

$$\frac{AREA - 0,5628}{17,4155} = CONCENTRACIÓN\left(\frac{mg}{L}\right)$$

Para El Siringaldehído

$$\frac{AREA - 0,2857}{17,9632} = CONCENTRACIÓN\left(\frac{mg}{L}\right)$$

Linealidad del método

Tabla 11. Valores para el método (donde método es la curva realizada en matriz)

Analito	Concentración Teórica (%)	Área	Concentración (mg/L)
Vainillina	33	18,4805	1,02292
		17,8521	1,02292
		18,8726	1,02292
	66	52,9474	3,06877
		54,1152	3,06877
		52,5499	3,06877
	100	89,3196	5,11461
		87,7637	5,11461
		83,6636	5,11461
	134	128,5781	7,16045
		126,4086	7,16045
		130,4000	7,16045
	167	165,7856	9,20630
		157,6517	9,20630
		164,6963	9,20630
Siringaldehído	45	18,438933	1,01893
		18,541433	1,01893
		18,427833	1,01893
	73	54,384933	3,05680
		53,943433	3,05680
		53,474833	3,05680
	100	88,356533	5,09467
		89,429333	5,09467
		90,178233	5,09467
	127	126,58833	7,13254
		126,15783	7,13254
		131,58673	7,13254
	155	159,97483	9,17041
		161,95863	9,17041
		163,70173	9,17041

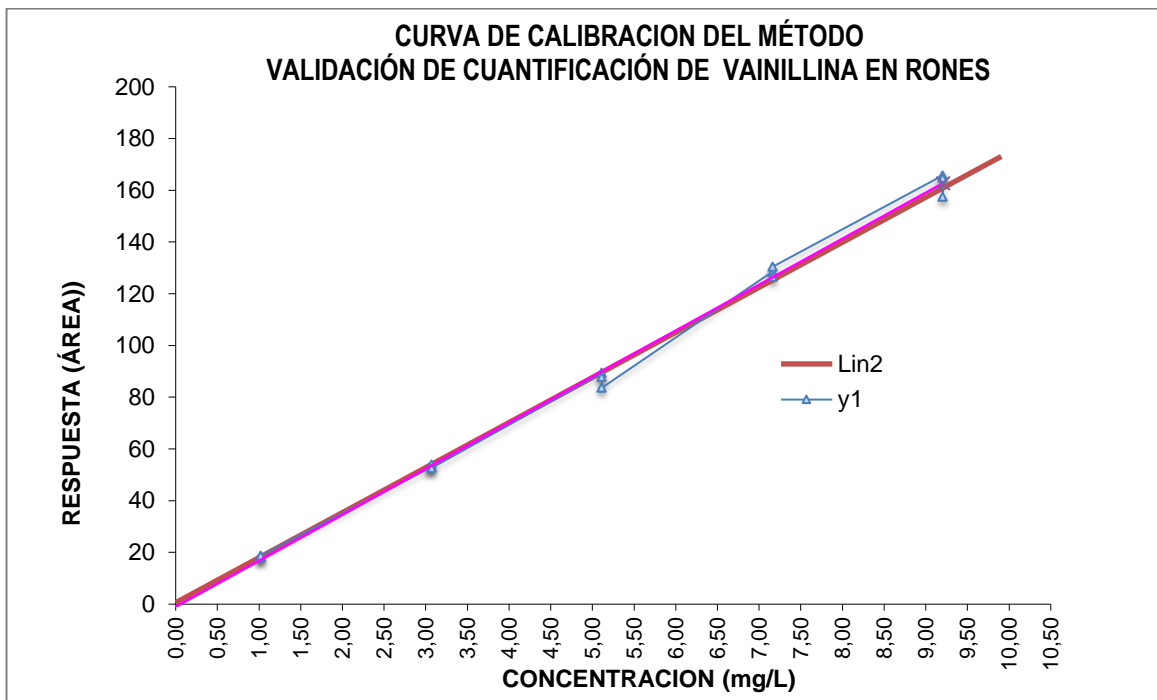


Ilustración 8. Curva de calibración del método (Vainillina)

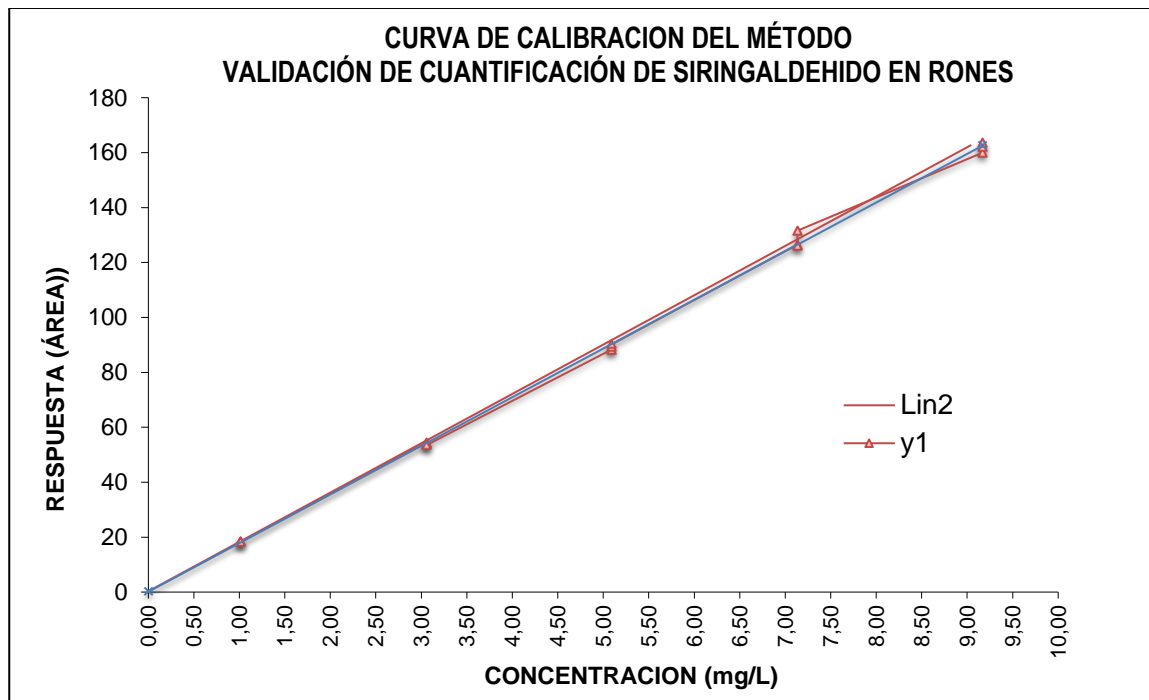


Ilustración 9. Curva de calibración del método (Siringaldehído)

Tabla 12. Tratamiento estadístico para la linealidad del método

Parámetro Estadístico	Valores obtenido para la Vainillina	Valores obtenido para el Siringaldehído
b	17,7862	17,7143
a	-1,0302	0,0943
r	0,998594	0,999480
Test de Hipótesis para la Pendiente		
t exp b.	67,91	111,78
t tabla _(p=0,05; 14 g.l.)	2,14	2,14
Conclusión	t exp b >> t tabla Por lo tanto, la pendiente es significativamente diferente de cero	t exp b >> t tabla Por lo tanto, la pendiente es significativamente diferente de cero
Test de Hipótesis para el Intercepto		
t exp a.	0,6694	0,1016
t tabla _(p=0,05; 14 g.l.)	2,14	2,14
Conclusión	t exp a < t tabla Por lo tanto, el intercepto NO es significativamente diferente de cero	t exp a < t tabla Por lo tanto, el intercepto NO es significativamente diferente de cero
Límites de Confianza para la Pendiente	17,22; 18,35	17,37; 18,06
Límites de confianza para el Intercepto	-4,35; 2,29	-1,90; 2,10
Test de Fisher para la Pendiente		
F exp b	4611,86	12494,92
F tabla	4,67	4,67
Conclusión	Fexp > Ftabla Por lo tanto la pendiente es significativamente diferente de cero	Fexp > Ftabla Por lo tanto la pendiente es significativamente diferente de cero
Test de Fisher para la Linealidad		
F exp b	2,33	1,63
F tabla	3,71	3,71
Conclusión	Fexp < Ftabla Por lo tanto la respuesta del sistema es lineal	Fexp < Ftabla Por lo tanto la respuesta del sistema es lineal
Comparación Intercepto y pendiente		
t exp a	1,0117	0,1926
t exp b	1,3876	1,4634
t tabla	2,06	2,06
Conclusión	t s < t tabla Por lo tanto las dos pendientes y los dos interceptos son similares.	t s < t tabla Por lo tanto las dos pendientes y los dos interceptos son similares.

De acuerdo con los resultados obtenidos en el tratamiento estadístico para el intercepto, la pendiente y el análisis de Varianza (que evalúa la linealidad), los resultados obtenidos al ejecutar la técnica de análisis tienen un comportamiento lineal presentando un valor de coeficiente de correlación de 0,998594 y 0,999480 para la Vainillina y el Siringaldehído respectivamente, los cuales no son estadísticamente diferentes de 1. Los resultados obtenidos cumplen con los parámetros estadísticos establecidos por la Fábrica de Licores y Alcoholes de Antioquia, indicándonos que existe linealidad, correlación y regresión entre los resultados obtenidos en el intervalo de concentraciones evaluadas, para los analitos en cuestión. Igualmente, la curva de calibración obtenida es convergente al origen (no es significativamente diferente de cero) y los límites de confianza obtenidos para los parámetros evaluados determinan los intervalos en que se pueden esperar resultados que sean reproducibles y confiables.

Límite de detección y límite de cuantificación

Tabla 13. Valores para el LD y el LC

Analito	Conc. (mg/L)	Área	Promedio	Desviación Estándar	D.R.S
Vainillina	0,3312	6,1833	6,1052	0,2884	4,7
		6,3465			
		5,7857			
	0,5520	10,6262	10,4392	0,1685	1,6
		10,3922			
		10,2991			
	1.1040	20,1075	20,0951	0,0367	0,2
		20,1239			
		20,0538			
Siringaldehído	0,3024	5,8655	5,8818	0,1118	1,9
		5,7790			
		6,0008			
	0,5040	9,8244	9,9218	0,0845	0,9
		9,9751			
		9,9659			
	1,0080	19,0196	18,7960	0,2590	1,4
		18,8561			
		18,5122			

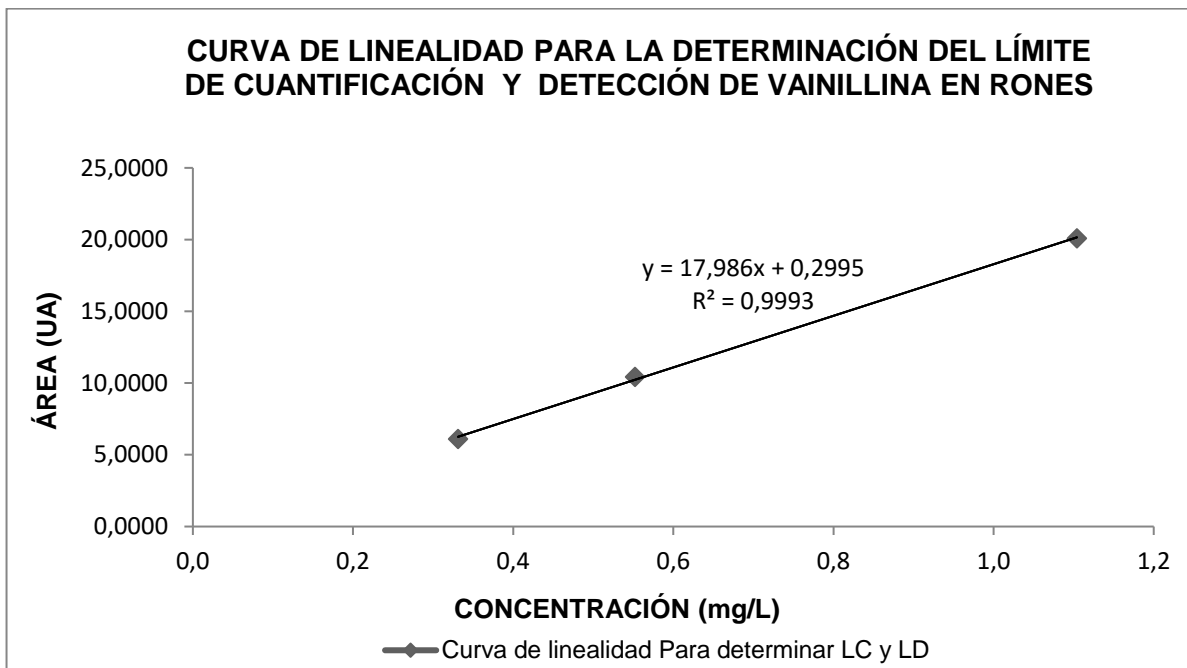


Ilustración 10. Curva de linealidad del LD y LC (Vainillina)

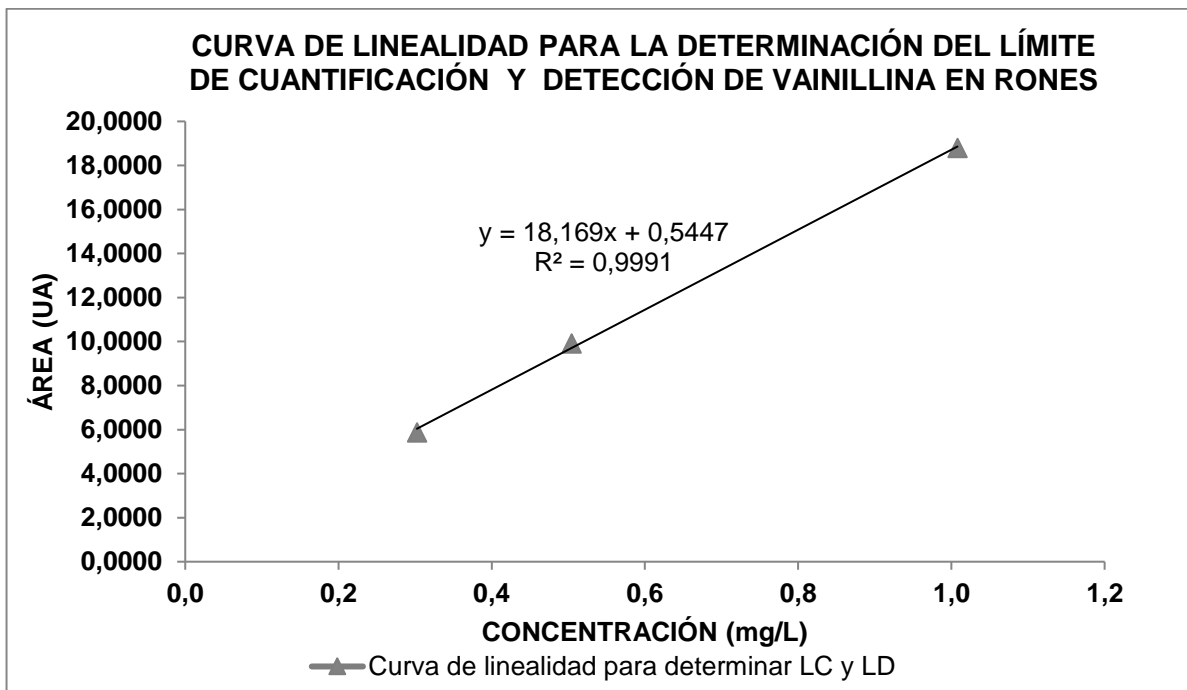


Ilustración 11. Curva de linealidad del LD y LC (Siringaldehído)

Para cada uno de los analitos se obtuvieron los parámetros de las rectas, en la siguiente tabla se muestran los resultados.

Tabla 14. Evaluación del LD y LC

	Vainillina	Siringaldehído
a= Intercepto	0,2995	0,5447
b=Pendiente	17,986	18,169
r	0,9993	0,9991
$Limite\ de\ Detección = \frac{(3 \times a)}{b} \times \frac{1}{\sqrt{n}}$ (mg/L)	0,029	0,052
$Limite\ de\ Cuantificación = \frac{(10 \times a)}{b} \times \frac{1}{\sqrt{n}}$ (mg/L)	0,096	0,173

Matemáticamente los límites de cuantificación y detección se muestran en la tabla inmediatamente anterior pero experimentalmente se encontró que los límites de detección fueron de 0,1 mg/L, para los dos analitos; y los límites de cuantificación fueron de 0,3mg/L para los dos analitos.

Precisión

Repetibilidad

Tabla 15. Repetibilidad para la Vainillina

Lectura N°	Analista 1 - (EVELIN RAIGOZA)			
	Día 1		Día 2	
	Área Vainillina	Concentración (mg/L)	Área Vainillina	Concentración (mg/L)
1	90,0986	5,19437	87,2188	4,98999
2	91,7210	5,19437	86,4788	4,98999
3	90,8669	5,19437	87,0544	4,98999
4	90,9042	5,19437	86,9074	4,98999
5	91,7892	5,19437	87,1048	4,98999
6	92,9292	5,19437	88,7486	4,98999
7	91,0637	5,19437	87,3779	4,98999
Promedio X	91,3390	N.A.	87,2701	N.A.
S	0,9		0,7	
CV (%)	1,0		0,8	
< 3,0%				
Concepto	CUMPLE		CUMPLE	

Tabla 16. Repetibilidad para el Siringaldehído

Lectura N°	Analista 1 - (EVELIN RAIGOZA)			
	Día 1		Día 2	
	Área Siringaldehído	Concentración (mg/L)	Área Siringaldehído	Concentración (mg/L)
1	124,8360	6,93912	117,2917	6,50543
2	125,3624	6,93912	114,0531	6,50543
3	123,9555	6,93912	118,7290	6,50543
4	123,3513	6,93912	117,2089	6,50543
5	123,4177	6,93912	117,9062	6,50543
6	125,4729	6,93912	118,4570	6,50543
7	125,3029	6,93912	119,8151	6,50543
Promedio X	124,5284	N.A.	117,637286	N.A.
S	0,9		1,8	
CV (%)	0,7		1,5	
< 3,0%				
Concepto	CUMPLE		CUMPLE	

La repetibilidad de los resultados obtenidos al aplicar la metodología de análisis para los analitos en cuestión (a una concentración del 100%), bajo las mismas condiciones operativas (mismo analista y equipo, diferentes días) demuestra un alto grado de confiabilidad de la metodología de análisis empleada.

Precisión Intermedia

Tabla 17. Precisión Intermedia para la Vainillina (Analista 1, día 1 y 2)

Lectura N°	Analista 1 - (EVELIN RAIGOZA)			
	Día 1		Día 2	
	Área Vainillina	Concentración (mg/L)	Área Vainillina	Concentración (mg/L)
1	90,0986	5,19437	87,2188	4,98999
2	91,7210	5,19437	86,4788	4,98999
3	90,8669	5,19437	87,0544	4,98999
4	90,9042	5,19437	86,9074	4,98999
5	91,7892	5,19437	87,1048	4,98999
6	92,9292	5,19437	88,7486	4,98999
7	91,0637	5,19437	87,3779	4,98999

Tabla 18. Precisión Intermedia para la Vainillina (Analista 2, día 3)

Lectura N°	Analista 2 - (JOAN QUINTERO)	
	Día 3	
	Área Vainillina	Concentración (mg/L)
1	90,9203	5,19437
2	91,6885	5,19437
3	90,5579	5,19437
4	90,5670	5,19437
5	91,7168	5,19437
6	92,1440	5,19437
7	91,6779	5,19437

Tabla 19. Precisión Intermedia para el Siringaldehído (Analista 1, día 1 y 2)

Lectura N°	Analista 1 - (EVELIN RAIGOZA)			
	Día 1		Día 2	
	Área Siringaldehído	Concentración (mg/L)	Área Siringaldehído	Concentración (mg/L)
1	124,8360	6,93912	117,2917	6,50543
2	125,3624	6,93912	114,0531	6,50543
3	123,9555	6,93912	118,7290	6,50543
4	123,3513	6,93912	117,2089	6,50543
5	123,4177	6,93912	117,9062	6,50543
6	125,4729	6,93912	118,4570	6,50543
7	125,3029	6,93912	119,8151	6,50543

Tabla 20. Precisión Intermedia para el Siringaldehído (Analista 2, día 3)

Lectura N°	Analista 2 - (JOAN QUINTERO)	
	Día 3	
	Área Siringaldehído	Concentración (mg/L)
1	124,1364	6,93912
2	123,8303	6,93912
3	123,1155	6,93912
4	123,4665	6,93912
5	122,9019	6,93912
6	124,5132	6,93912
7	124,6597	6,93912

Tabla 21. Parámetros de aceptación para la precisión intermedia

Parámetro estadístico	Valores obtenidos para la Vainillina	Valores obtenidos para el Siringaldehído
Promedio del área de analito hallado entre 2 analistas. n = 21	89,9	121,9
S	2,1	3,3
CV (%) (Criterio de aceptación CV < 3,0%)	2,3	2,7
Concepto	CUMPLE	CUMPLE

De acuerdo con los resultados obtenidos en la precisión intermedia, se observa un alto grado de precisión de la metodología de análisis sobre muestras individuales de estándar (en una concentración cercana al 100%) analizadas por dos analistas en días diferentes lo cual demuestra la confiabilidad de la metodología de análisis.

Exactitud

La exactitud se evaluó calculando el porcentaje de recuperación al inyectar 3 muestras fortificadas con los analitos de interés, el nivel bajo, medio y alto de la curva de calibración. La fórmula usada para dicho cálculo fue:

$$\%Recuperación = \frac{A - B}{C} \times 100$$

Siendo:

A= Concentración de Ron 3 años enriquecido

B= Concentración de Ron 3 años sin adición de analito

C= Concentración de analito adicionado

Tabla 22. Exactitud nivel bajo de la curva para Vainillina

LECTURA N°	Analista - (EVELIN RAIGOZA)			
	Nivel Bajo (VAINILLINA)			
	Concentración de Ron 3 años sin adición de analito (B)	Concentración de analito adicionado (C)	Concentración de Ron 3 años enriquecido (A)	%Recuperación
1	1,120	1,013	1,98	85,19
2			2,00	87,17
3			2,01	88,15
4			1,99	86,18
5			1,97	84,21
promedio	NA			86,18
X				
S				1,56
CV (%)				1,81
< 3,0%				
Concepto	CUMPLE			

Tabla 23. Exactitud nivel bajo de la curva para Siringaldehído

LECTURA N°	Analista - (EVELIN RAIGOZA)			
	Nivel Bajo (SIRINGALDEHÍDO)			
	Concentración de Ron 3 años sin adición de analito (B)	Concentración de analito adicionado (C)	Concentración de Ron 3 años enriquecido (A)	%Recuperación
1	1,120	1,013	1,72	59,23
2			1,73	60,22
3			1,70	57,26
4			1,71	58,24
5			1,69	56,27
promedio	NA			58,24
X				
S				1,56
CV (%)				2,68
< 3,0%				
Concepto	CUMPLE			

Tabla 24. Exactitud nivel medio de la curva Vainillina

LECTURA N°	Analista - (EVELIN RAIGOZA)			
	Nivel Medio (VAINILLINA)			
	Concentración de Ron 3 años sin adición de analito (B)	Concentración de analito adicionado (C)	Concentración de Ron 3 años enriquecido (A)	%Recuperación
1	1,120	5,070	3,90	54,83
2			3,79	52,66
3			3,74	51,68
4			3,81	53,06
5			3,75	51,87
promedio	NA			52,82
X				1,26
S				2,38
CV (%)				
< 3,0%				
Concepto	CUMPLE			

Tabla 25. Exactitud nivel medio de la curva Siringaldehído

LECTURA N°	Analista - (EVELIN RAIGOZA)			
	Nivel Medio (SIRINGALDEHÍDO)			
	Concentración de Ron 3 años sin adición de analito (B)	Concentración de analito adicionado (C)	Concentración de Ron 3 años enriquecido (A)	%Recuperación
1	1,120	5,070	4,01	57,00
2			3,97	56,21
3			3,89	54,64
4			4,05	57,79
5			4,01	57,00
promedio	NA			56,53
X				1,20
S				2,12
CV (%)				
< 3,0%				
Concepto	CUMPLE			

Tabla 26. Exactitud nivel alto de la curva Vainillina

LECTURA N°	Analista - (EVELIN RAIGOZA)			
	Nivel Alto (VAINILLINA)			
	Concentración de Ron 3 años sin adición de analito (B)	Concentración de analito adicionado (C)	Concentración de Ron 3 años enriquecido (A)	%Recuperación
1	1,120	9,120	8,47	80,59
2			8,44	80,26
3			8,46	80,48
4			8,42	80,04
5			8,39	79,71
Promedio	NA			80,22
X				0,35
S				0,44
CV (%)				
< 3,0%				
Concepto	CUMPLE			

Tabla 27. Exactitud nivel alto de la curva Siringaldehído

LECTURA N°	Analista - (EVELIN RAIGOZA)			
	Nivel Alto (SIRINGALDEHÍDO)			
	Concentración de Ron 3 años sin adición de analito (B)	Concentración de analito adicionado (C)	Concentración de Ron 3 años enriquecido (A)	%Recuperación
1	1,120	9,120	7,61	71,16
2			7,72	72,37
3			7,26	67,32
4			7,37	68,53
5			7,51	70,07
Promedio	NA			69,89
X				2,01
S				
CV (%)				2,88
< 3,0%				
Concepto	CUMPLE			

Robustez

Para esta determinación se aplica el Test de **Youden y Steiner** para la evaluación de la robustez de un método químico analítico. Este procedimiento permite evaluar el efecto de siete variables con sólo ocho análisis de una muestra.

Tabla 28. Análisis de la robustez

Ensayo	1	2	3	4	5	6	7	8
Factor								
A: Flujo	-	+	-	+	-	+	-	+
B. Temperatura horno	-	-	+	+	-	-	+	+
C: Fase móvil	-	-	-	-	+	+	+	+
Resultado para la Vainillina	104,4	109,0	74,6	107,1	103,8	110,4	75,4	109,1
Variación A	19,3534							
Variación B	15,3402							
Variación C	0,9146							
<i>Repetibilidad Método * $\sqrt{2}$</i>	1,3439							
Resultado para el Siringaldehído	92,2	103,7	83,7	100,0	103,3	110,6	91,0	100,9
Variación A	11,2525							
Variación B	8,5180							
Variación C	6,5642							
<i>Repetibilidad Método * $\sqrt{2}$</i>	1,8285							
Concepto	[Variación] > <i>Repetibilidad Método * $\sqrt{2}$</i> , por lo tanto se concluye que el método no es robusto para las variables analizadas en el Siringaldehído; y para la Vainillina solo es robusto para la variable C: Fase Móvil.							

El método debe trabajarse exclusivamente con las variables establecidas en el método, teniendo presente que la Vainillina puede soportar un cambio en la variable de Fase Móvil como se aprecia en la tabla inmediatamente anterior, ya que dicha variación es la única que presenta un valor por debajo del parámetro de aceptación (*Repetibilidad del método * Raíz de 2*).

Estimación de la incertidumbre

Tabla 29. Incertidumbre para la Vainillina

METODO: DETERMINACIÓN DE VAINILLA POR HPLC					
ACTIVIDAD	FUENTE DE INCERTIDUMBRE		CANTIDAD	EXACTITUD DEL EQUIPO	
Pesar Estándares	Incertidumbre Balanza AB204		0,1104	$\pm 2,5e-5g +4e-5$	
Medir volumen	Balón 100 mL (6 Veces)		100	± 0.100 mL	
	Balón 1000 mL (1 Vez)		1000	± 0.400 mL	
	Pipeta 10 mL (3 Veces)		10	± 0.020 mL	
	Pipeta 20 mL (4 Veces)		20	± 0.030 mL	
	Pipeta 50 mL (3 Veces)		50	± 0.050 mL	
Preparación de estándares	Solución Vainillina		0,1g para 100 ml	99,0%	
Diluciones	Dilución para estándares		100		
Error aleatorio	Error humano		N.A	N.A	
CV de la curva	x (g/L)	y (Área)	f(y/x)	Curva	
	1,101	20,124	18,283	Promedio f(y/x)	17,7
	1,101	20,054	18,219		
	1,101	20,698	18,805		
	3,302	56,495	17,109		
	3,302	57,834	17,515		
	3,302	58,049	17,580	Desviación Estándar f(y/x)	0,4
	5,503	96,273	17,493		
	5,503	96,227	17,485		
	5,503	95,906	17,427		
	7,705	134,301	17,431		
	7,705	135,038	17,526	Coeficiente de Variación (CV) %	2,45%
	7,705	135,306	17,561		
	9,906	172,702	17,434		
	9,906	173,622	17,527		
	9,906	173,488	17,513		
ESTIMACION DE INCERTIDUMBRE SIGUIENDO EL METODO DE GUM					
EQUIPO	EXACTITUD	INCERTIDUMBRE TIPO A	INCERTIDUMBRE TIPO B	APORTE	
CV curva de calibración (promedio CV)	0,0245		0,01226	51,34%	
Concentración Vainillina	0,9900		0,00577	24,18%	
Balón 1000 mL	0,0004		0,00016	0,68%	
Balanza AB 204	0,00004		0,00003	0,13%	
Balón 100 mL	0,0001		0,00004	0,17%	

Pipeta 20 mL	0,00003		0,00001	0,05%		
Pipeta 10 mL	0,00002		0,00001	0,03%		
Pipeta 50 mL	0,00005		0,00002	0,09%		
Repetibilidad		0,0054		22,47%		
Dilución (mayor)		0,0002		0,85%		
DATOS PARA REPRODUCIBILIDAD	Concentración de Vainillina (mg/L)				INCERTIDUMBRE COMBINADA (mg/L)	INCERTIDUMBRE EXPANDIDA mg/L (factor de cobertura 95,45%)
	5,165	5,221	5,056	5,218		
	5,259	4,969	4,978	5,242		
	5,210	4,926	5,172	5,215		
	5,212	4,959	5,216			
	5,263	4,951	5,151			
	5,328	4,962	5,151			
DESVIACIÓN ESTÁNDAR	0,1263				0,015	= 0,029 x concentración obtenida
PROMEDIO	5,134					
MEDIDAS	21					

Tabla 30. Incertidumbre para el Siringaldehído

METODO: DETERMINACIÓN DE SIRINGALDEHIDO POR HPLC				
ACTIVIDAD	FUENTE DE INCERTIDUMBRE	CANTIDAD	EXACTITUD DEL EQUIPO	
Pesar Estándares	Incertidumbre Balanza AB204	0,1008	$\pm 2,5e-5g + 4e-5$	
Medir volumen	Balón 100 mL (6 Veces)	100	± 0.100 mL	
	Balón 1000 mL (1 Vez)	1000	± 0.400 mL	
	Pipeta 10 mL (3 Veces)	10	± 0.020 mL	
	Pipeta 20 mL (4 Veces)	20	± 0.030 mL	
	Pipeta 50 mL (3 Veces)	50	± 0.050 mL	
Preparación de estándares	Solución Siringaldehído	0,1 g para 100 ml	97,0%	
Diluciones	Dilución para estandares	100		
Error aleatorio	Error humano	N.A	N.A	
CV de la curva	x (mg/L)	y (Área)	f(y/x)	Curva
	1,005	18,8561	18,763	
	1,005	18,5122	18,420	
	1,005	17,7612	17,673	
	3,015	54,2378	17,990	
	3,015	54,6625	18,131	
Promedio f(y/x)				18,07441

3,015	54,8550	18,194	Desviación Estándar f(y/x)	0,25962
5,025	91,0698	18,124		
5,025	89,7110	17,853		
5,025	90,9764	18,105		
7,035	125,5791	17,851		
7,035	126,4837	17,980	Coeficiente de Variación (CV) %	1,44%
7,035	125,9459	17,903		
9,045	163,0661	18,029		
9,045	162,3385	17,948		
9,045	164,1771	18,152		

ESTIMACION DE INCERTIDUMBRE SIGUIENDO EL METODO DE GUM

EQUIPO	EXACTITUD	INCERTIDUMBRE TIPO A	INCERTIDUMBRE TIPO B	APORTE
CV curva de calibración (promedio CV)	0,01436		0,00718	23,39%
Concentración Siringaldehído	0,9700		0,01732	56,42%
Balón 1000 mL	0,00040		0,000163	0,53%
Balanza AB 204	0,00004		0,00003	0,10%
Balón 100 mL	0,00010		0,00004	0,13%
Pipeta 20 mL	0,00003		0,00001	0,04%
Pipeta 10 mL	0,00002		0,00001	0,03%
Pipeta 50 mL	0,0001		0,00002	0,07%
Repetibilidad		0,0057		18,63%
Dilución (mayor)		0,0002		0,66%

DATOS PARA PRECISIÓN INTERMEDIA	Concentración de Siringaldehído (mg/L)				INCERTIDUMBRE COMBINADA (mg/L)	INCERTIDUMBRE EXPANDIDA mg/L (factor de cobertura 95,45%)
	6,94	6,97	6,60	6,80		
	6,97	6,53	6,67	6,89		
	6,89	6,35	6,87	6,90		
	6,86	6,61	6,85			
	6,86	6,53	6,81			
	6,98	6,57	6,83			
DESVIACIÓN ESTÁNDAR	0,1775				0,029	= 0,058 x concentración obtenida
PROMEDIO	6,775					
MEDIDAS	21					

Muestreo

Para el análisis de muestras reales se tenía disponible rones de 2, 2.5, 3, 6, 7.5, 8, 9, 10.5, 11, 11.5, 12, 12.5, 13 y 14 años de añejamiento, y 4 lotes diferentes para cada año, contando así con 56 muestras.

Tabla 31. Datos del muestreo (Vainillina)

VAINILLINA					
Años de añejamiento	Muestras				Promedio
2	1,91	1,09	1,87	1,14	1,50
2.5	2,01	2,18	1,98	1,87	2,01
3	2,30	2,21	2,01	2,41	2,23
6	4,87	4,51	4,12	4,88	4,60
7.5	5,01	4,89	4,90	5,11	4,98
8	6,35	6,03	6,13	6,32	6,21
9	8,02	8,25	7,93	7,69	7,97
10.5	8,58	8,32	8,62	8,01	8,38
11	8,84	8,97	8,61	8,70	8,78
11.5	7,05	7,12	7,43	6,98	7,15
12	6,95	6,56	6,78	7,07	6,84
12.5	5,81	5,45	5,75	5,98	5,75
13	8,64	7,34	8,13	8,56	8,17
14	10,29	10,01	10,67	10,45	10,36

Tabla 32. Datos del muestreo (Siringaldehído)

SIRINGALDEHÍDO					
Años de añejamiento	Muestras				Promedio
2	1,73	1,87	1,43	1,76	1,70
2.5	2,46	2,35	2,65	2,43	2,47
3	2,91	2,87	2,98	2,71	2,87
6	3,72	3,69	3,81	3,88	3,78
7.5	4,94	4,76	4,62	4,01	4,58
8	9,49	8,79	8,91	9,56	9,19
9	5,98	6,32	5,99	6,44	6,18
10.5	11,03	11,14	11,21	11,02	11,10
11	13,30	13,43	13,19	13,31	13,31
11.5	8,69	8,76	8,54	8,32	8,58
12	13,42	13,23	13,71	13,45	13,45
12.5	10,01	10,02	9,97	10,1	10,03
13	14,15	14,03	14,29	14,31	14,20
14	19,73	18,78	19,57	19,38	19,37

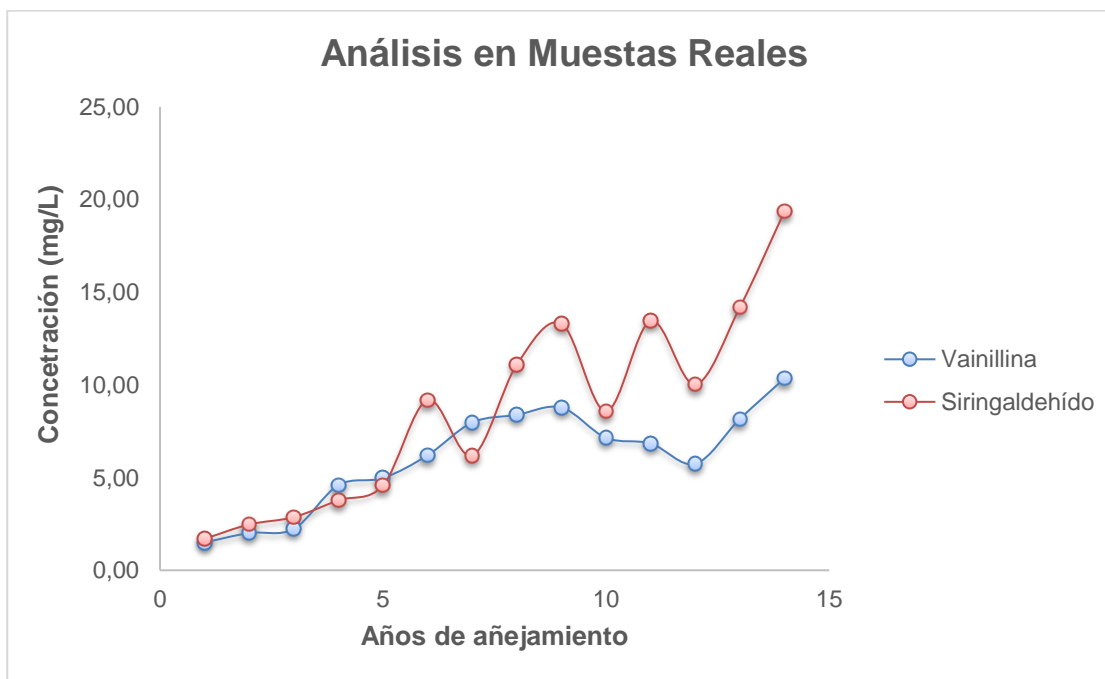


Figura 12. Grafica Años de añejamiento Vs. Concentración de analito

Conclusiones

La metodología analítica para el análisis de Vainillina y Siringaldehído por cromatografía de líquida de alta eficiencia en rones, demostró ser específica y selectiva para los analitos, también demostró linealidad, repetibilidad, precisión intermedia y exactitud cumpliendo así con los parámetros exigidos en el procedimiento PR-M8-P3-066 propio de la empresa y de igual modo con la validación que se buscaba.

Puede decirse que la validación de un método analítico, respecto a la valoración del producto terminado garantiza de esta manera que los resultados obtenidos al aplicarlo son confiables y completamente reproducibles en el intervalo 1,0 a 9,0 mg/L con una incertidumbre de $\pm 0,03$ para la vainillina y $\pm 0,06$ para el Siringaldehído.

Las condiciones cromatográficas para el análisis de Vainillina y Siringaldehído establecidas son: Temperatura de horno en 40,0°C durante toda la corrida cromatográfica. Tiempo total de corrida 13,0 minutos. Bomba cuaternaria con un flujo de 2,0 mL/min de una mezcla de Metanol/Agua al 22/78. Detector Ultravioleta a 311 nm e Inyección estándar de 10 μ L.

Recomendaciones

Es importante que se realice una verificación del método usando Material de Referencia Certificada (CMR), pues para la validación no fue posible disponer de estos de estos materiales, y es de gran importancia su uso por la trazabilidad que los CMR proporcionan así como la veracidad que ofrecen, de esta manera el método quedara con datos más seguros y confiables.

El muestreo evidencia un comportamiento exponencial en la concentración de los dos analitos durante el tiempo de añejamiento, de este modo es indispensable que se realice un muestreo significativo respecto a la cantidad de muestras reales que existen en las bodegas de añejamiento, ya que mientras más aumente el número de datos de un mismo año de añejamiento más confiable será la interpolación al momento de analizar la edad de un ron, puesto que en los datos del muestreo que se realizó en el presente trabajo se observa unos puntos bajos.

Referencias

- Bernard, Jesús. (S.F.). Pasión por el ron. Recuperado de <http://www.planetahedonista.com/pasionporelron/>
- Blanco, Idania. Redondo, Delfa. Rivas, Mauricio. Queris, Oscar. (2005). Estudio de los Compuestos Fenólicos en Extractos de Roble en el Proceso del Tratamiento Térmico De La Madera. *Brazilian Journal of food technology*, (5° SIPAL), 24-29.
- Cernișev, serghei. (2016). Analysis of lignin-derived phenolic compounds and their transformations in aged wine distillates. *Food Control*, 73, 281-290.
- Conner, John. Reid, Ken. Jack, Frances. (2003). Whisky Technology, Production and Marketing. Recuperado de http://ac.els-cdn.com.ezproxy.unal.edu.co/B9780126692020500245/3-s2.0-B9780126692020500245-main.pdf?_tid=686587a2-83b4-11e7-9393-00000aab0f02&acdnat=1503019832_3d93805546c9b45733025a1a73877901
- Fábrica de Licores y Alcoholes de Antioquia. (2016). La esencia del mejor. Recuperado de <http://ronmedellinanejo.com/la-esencia-de-un-buen-ron/>
- Gonzalez, Rafael E. Calderón, Lilia S. Cabeza, Rodolfo A. (2008). Cuantificación de sustancias marcadoras de envejecimiento en *Quercus humboldtii* por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia. *Temas Agrarios*, 13(2). 56-63.
- Instituto de Salud Pública, Chile. (S F). Validación de Métodos y Determinación de la Incertidumbre de la Medición: “Aspectos generales sobre la Validación de Métodos”. Recuperado de http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento_tecnico/2010/12/Guia%20T%C3%A9cnica%20de%20validaci%C3%B3n%20de%20M%C3%A9todos%20y%20determinaci%C3%B3n%20de%20la%20incertidumbre%20de%20la%20medici%C3%B3n_1.pdf
- Magnusson, B. Örnemark, U. (2014). EURACHEM: La Adecuación al Uso de los Métodos Analíticos: Una Guía de laboratorio para Validación de Métodos y Temas Relacionados. Recuperado de https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_ES.pdf

- Mosedale, J. R. Puech, J. L. (1998). Wood maturation of distilled beverages. *Trends in Food Science & Technology*, 9, 95-101.
- Mota, Maria Ines. Rodriguez, Paula. Loureiro, Jose Miguel. Rodrigues, Alirio. (2016). Successful recovery and concentration of vanillin and syringaldehyde onto a polymeric adsorbent with ethanol/water solution. *Chemical Engineering Journal*, 294, 73-82.
- Perez, M.S. Sanz, J. Cabezudo, M. D. (1997). Analysis of volatile components of oak wood by solvent extraction and direct thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 778, 427-434.
- Pino, Jorge A. (2006). Characterization of rum using solid-phase microextraction with gas chromatography–mass spectrometry. *Food Chemistry*, 104, 421-428.
- Pino, Jorge A. Tolle, Sebastian. Gök, Recep. Winterhalter, Peter. (2011). Characterisation of odour-active compounds in aged rum. *Food Chemistry*, 132, 1436-1441.
- Regalado, Erik L. Tolle, Sebastian. Pino, Jorge A. Winterhalter, Peter. Menendez, Roberto. Morales, Ana R. Rodriguez, Jose L. (2011). Isolation and identification of phenolic compounds from rum aged in oak barrels by high-speed countercurrent chromatography/high-performance liquid chromatography-diode array detection-electrospray ionization mass spectrometry and screening for antioxidant activity. *Journal of Chromatography A*, 1218, 7358-7364.
- Schwarz, Monica. Rodriguez, M. Carmen. Sanchez, Manuel. Guillén, Dominico A. Barroso, Carmelo. (2014). Development of an accelerated aging method for Brandy. *LWT – Food Science and Technology*, 59, 108-114.
- Valdez, Claudia. Cañizares, M. P. (2007). On-line dilution and detection of vanillin in vanilla extracts obtained by ultrasound. *Food Chemistry*, 105, 1201-1208.