

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ

ESCUELA DE POSGRADO



**Desarrollo de una estrategia de calibración simplificada para la
cuantificación de terpenos en Pisco**

TESIS PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN QUÍMICA

AUTOR

Christian Martín Raphael Uribe Rosas

ASESOR

Dr. Eric Gabriel Cosio Caravasi

Junio, 2019

Resumen

Se investiga la combinación de la adición estándar de un solo punto y el uso de un estándar interno natural, como una estrategia de calibración simplificada para la cuantificación de terpenos en muestras de Pisco utilizando HS-SPME-GC-MS. Para evaluar la calidad de los resultados obtenidos se estima la incertidumbre de las mediciones y se calcula valores de zeta-score comparando 2 estrategias de calibración denominadas “estrategia de referencia” y “estrategia simplificada”. Las condiciones de preparación de la muestra se definieron en un trabajo previo de Gromova [1]. Todos los datos de GC-MS se adquieren con un modo simultáneo SCAN/SIM (iones fragmento 43, 59 y/o 93). Se evalúa primero la linealidad adicionando 3 niveles de concentración de óxido de linalol, linalol y α -terpineol a una muestra de Pisco no aromático. La estrategia simplificada consiste en adición estándar multicomponente de los terpenos a muestras de Pisco aromático utilizando un éster (acetato de isoamilo, hexanoato de etilo ó decanoato de etilo) como estándar interno natural candidato. La estrategia de referencia consiste en la adición estándar individual, y a muestras diferentes, de cada terpeno evaluado, utilizando 2 terpenos (linalol, hotrienol, óxido de nerol y/o α -terpineol) como estándares internos naturales de referencia. Para la estrategia de referencia se obtienen incertidumbres combinadas relativas entre 6,6 % y 10,0 %. Los resultados de la estrategia simplificada muestran que el acetato de isoamilo ofrece las mejores características para ser utilizado como estándar interno natural en la determinación de terpenos en Pisco. La linealidad utilizando acetato de isoamilo se confirma con valores de R^2 mayores a 0,99. Usando este estándar interno natural se obtienen incertidumbres combinadas relativas entre 8,6 % y 22,8 %. Con estas incertidumbres se obtienen valores de zeta-score inferiores a 2. La combinación de la adición estándar de un solo punto y el uso de un estándar interno natural para mediciones con HS-SPME-GC-MS, aparece como un nuevo enfoque interesante, práctico y confiable que contribuiría a la estandarización de las mediciones de contenido de terpenos en Pisco. Se espera que la estrategia de calibración planteada pueda ser también evaluada para otros campos de medición que aún se encuentren en desarrollo.

Palabras claves HS-SPME, GC-MS, contenido de terpenos, Pisco, adición estándar de un solo punto, estándar interno natural.

Abstract

Combination of single-point standard addition and a natural internal standard is investigated as a practical calibration strategy for the quantification of terpenes in Pisco samples using HS-SPME-GC-MS. In order to evaluate the quality of the obtained results, measurement uncertainties are estimated and zeta-score values are calculated comparing 2 calibration strategies identified as “reference strategy” and “simplified strategy”. The sample preparation conditions were defined in a previous work by Gromova [1]. All GC-MS data are acquired under simultaneous Full Scan and SIM modes (ion fragments 43, 59 and/or 93). Linearity is first assessed by adding 3 concentration levels of linalool oxide, linalool and α -terpineol to a non-aromatic Pisco sample. The simplified strategy consists of standard multicomponent addition of the terpenes to aromatic Pisco samples using one ester (isoamyl acetate, ethyl hexanoate or ethyl decanoate) as the candidate natural internal standard. The reference strategy consists in the addition of individual standard to samples of each evaluated terpene, using 2 terpenes (linalool, hotrienol, nerol oxide and/or α -terpineol) as reference natural internal standards. Relative combined measurement uncertainties for the reference strategy are between 6,6 % and 10,0 %. According to the results obtained from the simplified strategy, isoamyl acetate offers the best characteristics for use as natural internal standard for terpene determinations in Pisco. Linearity using isoamyl acetate is confirmed with R^2 values greater than 0,99. Using this natural internal standard, relative combined measurement uncertainties are between 8,6 % and 22,8 %. Zeta-score values obtained with these uncertainties are smaller than 2. The combination of single-point standard addition and a natural internal standard for HS-SPME-GC-MS measurements appears to be a potentially useful new approach, practical and reliable, which could contribute to the standardization of measurements for terpene content in Pisco. It is expected that this proposed calibration strategy could be evaluated in other measurements fields still in development.

Keywords HS-SPME, GC-MS, terpene content, Pisco, single-point standard addition, natural internal standard

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	12
2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	16
3. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	17
3.1 Objetivo general	17
3.2 Objetivos específicos	17
4. MARCO TEÓRICO	18
4.1 Regulación peruana sobre el Pisco	18
4.2 Diferenciación de Piscos obtenidos de diferentes variedades de uvas.....	18
4.3 Métodos de calibración utilizados en cuantificación por SPME.....	19
4.3.1 Calibración por curva externa	20
4.3.2 Calibración por adición estándar	21
4.3.3 Calibración por estándar interno	21
4.3.4 Otros métodos de calibración	22
4.3.5 Calibración por adición estándar de un punto con estándar interno natural	22
4.4 Estimación de incertidumbre de medición	23
4.4.1 Nociones sobre la estimación de incertidumbre en los resultados de mediciones químicas	23
4.4.2 Etapas de la estimación de incertidumbre	24
4.4.3 Especificación del mensurando	26
4.4.4 Identificación de las fuentes de incertidumbre	26
4.4.5 Cuantificación de las componentes de incertidumbre	26
4.4.6 Cálculo de la incertidumbre combinada	29
4.4.7 Cálculo de la incertidumbre expandida	30

4.5 Comparación de resultados reportados por diferentes métodos mediante el cálculo del zeta-score	31
5. METODOLOGÍA	32
5.1 Estándares y reactivos	32
5.2 Preparación de soluciones para adición estándar	32
5.3 Procedimiento HS-SPME y preparación de muestras para adición estándar ..	33
5.4 Condiciones analíticas cromatográficas y adquisición de datos.....	33
5.5 Identificación de compuestos	34
5.6 Evaluación de linealidad con muestra Quebranta	34
5.7 Cálculo de concentración y estimación de incertidumbre de medición	34
5.7.1 Esquema de cuantificación utilizando la estrategia de referencia	34
5.7.2 Esquema de cuantificación utilizando la estrategia simplificada	35
5.7.3 Cálculo de concentración C_m	36
5.7.4 Estimación de incertidumbre de medición	38
5.7.4.1 Identificación de las fuentes de incertidumbre	38
5.7.4.2 Estimación de la componente de incertidumbre para el cociente reducido	39
5.7.4.3 Estimación de la componente de incertidumbre para la concentración del estándar	40
5.7.4.4 Estimación de la componente de incertidumbre para el volumen del estándar y el volumen de la muestra.....	43
5.7.4.5 Estimación de la incertidumbre estándar combinada de C_m	44
5.7.4.6 Estimación de la incertidumbre expandida de C_m	44
5.7.5 Selección del mejor estándar interno natural candidato	44
5.7.6 Evaluación de resultados obtenidos por la estrategia simplificada en comparación con la estrategia de referencia	45
6. PRESENTACIÓN DE RESULTADOS	46
6.1 Preparación de soluciones para adición estándar	46

6.2	Identificación de compuestos	46
6.3	Resultados de linealidad con muestra de Pisco Quebranta	47
6.3.1	Uso de acetato de isoamilo como estándar interno natural	48
6.3.2	Uso de hexanoato de etilo como estándar interno natural	50
6.3.3	Uso de decanoato de etilo como estándar interno natural	52
6.4	Cuantificación utilizando la estrategia de referencia	53
6.4.1	Áreas TIC de compuestos (terpenos y estándares internos naturales de referencia).....	53
6.4.2	Componente de incertidumbre para el cociente reducido.....	55
6.4.3	Componente de incertidumbre para la concentración del estándar adicionado a la muestra.....	56
6.4.3.1	Incertidumbre estándar de la masa del terpeno de partida	56
6.4.3.2	Incertidumbre estándar de la pureza del terpeno de partida	56
6.4.3.3	Incertidumbre estándar del volumen V_0	57
6.4.3.4	Incertidumbre estándar del volumen V_{i1}	57
6.4.3.5	Incertidumbre estándar de los volúmenes V_{f1} y V_{f2}	58
6.4.3.6	Incertidumbre estándar del volumen V_{i2}	58
6.4.3.7	Combinación de incertidumbres para la concentración del estándar adicionado a la muestra	58
6.4.4	Componente de incertidumbre para el volumen del estándar adicionado a la muestra	59
6.4.5	Componente de incertidumbre para el volumen de la muestra	59
6.4.6	Cálculo de C_{mREF} y su incertidumbre combinada	59
6.5	Cuantificación utilizando la estrategia simplificada	60
6.5.1	Áreas TIC de compuestos (terpenos y estándares internos naturales candidatos)	60
6.5.2	Componente de incertidumbre para el cociente reducido	61
6.5.2.1	Cálculo de desviación estándar relativa	61
6.5.2.2	Cálculo de desviación estándar relativa agrupada	63
6.5.2.3	Cálculo de incertidumbre estándar del cociente reducido	64
6.5.3	Componente de incertidumbre para la concentración del estándar adicionado a la muestra	66
6.5.4	Componente de incertidumbre para el volumen del estándar adicionado a la muestra y del volumen de la muestra	66

6.5.5	Combinación de componentes de incertidumbre	66
6.5.6	Cálculo de incertidumbre combinada.....	67
6.5.7	Selección del mejor estándar interno natural candidato.....	69
6.5.8	Resumen de resultados obtenidos con la estrategia simplificada	71
6.6	Comparación de resultados entre la estrategia de referencia y la estrategia simplificada	72
7.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	73
7.1	Sobre la identificación de compuestos	73
7.2	Sobre la evaluación de linealidad utilizando la muestra Quebranta	73
7.3	Sobre la selección de las características de la estrategia de referencia y la estrategia simplificada	74
7.3.1	Interferencias en la medición por HS-SPME	74
7.3.2	Estructura química de los estándares internos naturales	74
7.3.3	Tiempos de retención de los estándares internos naturales	75
7.3.4	Número de réplicas de medición	75
7.3.5	Sobre la selección de los iones fragmento para cada uno de los terpenos medidos	75
7.4	Sobre los resultados obtenidos con la estrategia de referencia	77
7.5	Sobre los resultados obtenidos con la estrategia simplificada	78
7.6	Sobre la comparación de resultados calculando el zeta-score	80
8.	CONCLUSIONES	81
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1:</i>	Proceso de la estimación de incertidumbre	25
<i>Figura 2:</i>	Distribución rectangular	27
<i>Figura 3:</i>	Distribución triangular	27
<i>Figura 4:</i>	Distribución normal	28
<i>Figura 5:</i>	Diagrama de causa y efecto	39
<i>Figura 6:</i>	Curvas para óxido de linalol utilizando acetato de isoamilo como estándar interno natural.	48
<i>Figura 7:</i>	Curvas para linalol utilizando acetato de isoamilo como estándar interno natural.	49
<i>Figura 8:</i>	Curva para α -terpineol utilizando acetato de isoamilo como estándar interno natural.	49
<i>Figura 9:</i>	Curvas para óxido de linalol utilizando hexanoato de etilo como estándar interno natural.	50
<i>Figura 10:</i>	Curvas para linalol utilizando hexanoato de etilo como estándar interno natural.	51
<i>Figura 11:</i>	Curva para α -terpineol utilizando hexanoato de etilo como estándar interno natural.	51
<i>Figura 12:</i>	Curvas para óxido de linalol utilizando decanoato de etilo como estándar interno natural.	52
<i>Figura 13:</i>	Curvas para linalol utilizando decanoato de etilo como estándar interno natural.	53
<i>Figura 14:</i>	Curva para α -terpineol utilizando decanoato de etilo como estándar interno natural.	53
<i>Figura 15:</i>	Cromatogramas superpuestos de mezcla sin adición y mezcla con adición de linalol en la muestra Moscatel M_{MULTI}	73
<i>Figura 16:</i>	Cromatogramas superpuestos de mezcla sin adición y mezcla con adición de linalol en la muestra Italia I_{MULTI} (modo SCAN).....	76
<i>Figura 17:</i>	Cromatogramas superpuestos de mezcla sin adición y mezcla con adición de linalol en la muestra Italia I_{MULTI} (modo SIM ión fragmento 93).....	76
<i>Figura 18:</i>	Cromatogramas superpuestos de mezcla sin adición y mezcla con adición de α -terpineol en la muestra Moscatel M_{TER} (modo SIM con ión fragmento 93)	77

- Figura 19:* Contribuciones de incertidumbre para la medición de óxido de linalol en la muestra I_{OXL}78
- Figura 20:* Cromatogramas superpuestos de mezcla sin adición y mezcla con adición que corresponden a la adición múltiple en la muestra Moscatel M_{MULTI} ...79



ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1:</i>	Tabla guía de cuantificación	20
<i>Tabla 2:</i>	Mediciones realizadas con la estrategia de referencia	35
<i>Tabla 3:</i>	Mediciones realizadas con la estrategia simplificada.....	36
<i>Tabla 4:</i>	Concentraciones en masa de las soluciones preparadas a partir de terpenos puros.....	46
<i>Tabla 5:</i>	Comparación de tiempos de retención para mezcla sin adición y mezcla con adición	46
<i>Tabla 6:</i>	Identificación de compuestos	47
<i>Tabla 7:</i>	Áreas TIC de terpenos y estándares internos naturales para la adición múltiple en la muestra de Pisco Quebranta	47
<i>Tabla 8:</i>	Datos para las curvas de adición con acetato de isoamilo como estándar interno natural	48
<i>Tabla 9:</i>	Datos para las curvas de adición con hexanoato de etilo como estándar interno natural	50
<i>Tabla 10:</i>	Datos para las curvas de adición con decanoato de etilo como estándar interno natural	52
<i>Tabla 11:</i>	Áreas TIC de óxido de linalol y estándares internos naturales de referencia para adición individual de óxido de linalol en las muestras I_{OXL} y T_{OXL} ...	54
<i>Tabla 12:</i>	Áreas TIC de linalol y estándares internos naturales de referencia para adición individual de linalol en las muestras I_{LIN} y M_{LIN}	54
<i>Tabla 13:</i>	Áreas TIC de α -terpineol y estándares internos naturales de referencia para adición individual de α -terpineol en las muestra I_{TER} y M_{TER}	54
<i>Tabla 14:</i>	Cocientes reducidos calculados para ambos estándares internos naturales de referencia	55
<i>Tabla 15:</i>	Cálculo de incertidumbre estándar relativa para cocientes reducidos	55
<i>Tabla 16:</i>	Cálculo de incertidumbre combinada y expandida para la estrategia de referencia	60
<i>Tabla 17:</i>	Áreas TIC de terpenos y de estándares internos naturales candidatos para la adición múltiple en la muestra I_{MULTI}	60
<i>Tabla 18:</i>	Áreas TIC de terpenos y estándares internos naturales candidatos para la adición múltiple en la muestra T_{MULTI}	61

<i>Tabla 19:</i>	Áreas TIC de terpenos y estándares internos naturales candidatos para la adición múltiple en la muestra M_{MULTI}	61
<i>Tabla 20:</i>	Cálculo de desviación estándar relativa para la adición múltiple en la muestra I_{MULTI}	62
<i>Tabla 21:</i>	Cálculo de desviación estándar relativa para la adición múltiple en la muestra T_{MULTI}	62
<i>Tabla 22:</i>	Cálculo de desviación estándar relativa para la adición múltiple en la muestra M_{MULTI}	63
<i>Tabla 23:</i>	Cálculo de desviación estándar relativa agrupada para la adición múltiple en las muestras I_{MULTI} , T_{MULTI} y M_{MULTI}	63
<i>Tabla 24:</i>	Cálculo de incertidumbre estándar relativa para la adición múltiple en la muestra I_{MULTI}	64
<i>Tabla 25:</i>	Cálculo de incertidumbre estándar relativa para la adición múltiple en la muestra T_{MULTI}	65
<i>Tabla 26:</i>	Cálculo de incertidumbre estándar relativa para la adición múltiple en la muestra M_{MULTI}	65
<i>Tabla 27:</i>	Cálculo de incertidumbre combinada para adición múltiple en la muestra I_{MULTI}	66
<i>Tabla 28:</i>	Cálculo de incertidumbre combinada para adición múltiple en la muestra T_{MULTI}	67
<i>Tabla 29:</i>	Cálculo de incertidumbre combinada para adición múltiple en la muestra M_{MULTI}	67
<i>Tabla 30:</i>	Cálculo de incertidumbre combinada y expandida para adición múltiple en la muestra I_{MULTI}	68
<i>Tabla 31:</i>	Cálculo de incertidumbre combinada y expandida para adición múltiple en la muestra T_{MULTI}	68
<i>Tabla 32:</i>	Cálculo de incertidumbre combinada y expandida para adición múltiple en la muestra M_{MULTI}	69
<i>Tabla 33:</i>	Resultados de medición ordenados en relación a sus incertidumbres expandidas relativas	70
<i>Tabla 34:</i>	Resumen de resultados de la estrategia simplificada para comparación con estrategia de referencia.....	71
<i>Tabla 35:</i>	Mediciones adicionales con la estrategia simplificada	71
<i>Tabla 36:</i>	Cálculo del zeta-score para comparación de estrategias	72

1. INTRODUCCIÓN

De acuerdo al Reglamento de la Denominación de Origen Pisco [2], este producto debe ser producido utilizando métodos que mantengan los principios tradicionales de calidad. Además, debe cumplir con requisitos físico-químicos que incluyen límites permisibles para las concentraciones de componentes volátiles y congéneres. De acuerdo al reglamento, estas sustancias son medidas por cromatografía de gases GC-FID con inyección directa y son principalmente componentes mayoritarios (alcoholes, ésteres, furfural, aldehídos y acidez volátil). Por otro lado, el producto Pisco debe cumplir requisitos organolépticos de aspecto, color, olor y sabor que han sido establecidos para diferenciar los Piscos puro de tipo aromático, puro de tipo no aromático, Acholado y Mosto Verde. Sin embargo, en el reglamento no se hace referencia a terpenos o a componentes minoritarios presentes en el Pisco y que permitirían diferenciar entre Piscos provenientes de distintas variedades de uva.

Desde 1988, el Pisco es reconocido por el Estado peruano como "Patrimonio Cultural de la Nación", debido a su importancia para la cultura nacional y su contribución al desarrollo económico del país. Asimismo, en 2005, el Pisco fue declarado como un producto de bandera en el Perú, en el marco de la estrategia nacional para la identificación de productos que caracterizan la calidad de nuestras exportaciones y preservan nuestra tradición e identidad. De esta manera, el Pisco se posiciona actualmente en los mercados internacionales como un producto de calidad que contribuye a la identidad de la gastronomía peruana y al fomento del turismo receptivo [3]. Hoy en día es ampliamente aceptada la contribución del contenido de terpenos al aroma y calidad de las bebidas alcohólicas destiladas (como el Pisco). Debido a ello, el perfil de contenido terpénico se ha estudiado en estas bebidas con diferentes enfoques analíticos, cualitativos y cuantitativos, dependiendo del objetivo del estudio. La preparación previa de muestras utilizadas para fines analíticos cuenta con diferentes opciones como extracción líquido-líquido (LLE), extracción en fase sólida (SPE), microextracción en fase sólida (SPME), entre otras. Desde su primer desarrollo por Pawliszyn y colaboradores a partir de 1990 [4, 5], la microextracción en fase sólida ha demostrado ser una excelente opción para la preparación de muestras en diferentes matrices. Después de numerosos artículos técnicos publicados, algunos de los cuales cuestionaban su uso en aplicaciones

cuantitativas, la maduración de esta técnica ha alcanzado un hito importante en relación a las determinaciones cuantitativas en matrices acuosas ambientales con la reciente emisión de la norma ISO 17943:2016 *Water quality -- Determination of volatile organic compounds in water -- Method using headspace solid-phase micro-extraction (HS-SPME) followed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)* [6]. Esta norma formaliza finalmente el uso de la microextracción en fase sólida para medición de componentes orgánicos volátiles en agua, constituyéndose esto en un paso importante para la medición cuantitativa en matrices ambientales. Sin embargo, en lo que se refiere al Pisco, aún no se cuenta con normas aceptadas nacional o internacionalmente para la medición de terpenos en matrices de interés.

La teoría indica que cuando se trata de matrices complejas, los métodos de cuantificación precisos exigen la elección de una técnica de calibración adecuada. Los efectos de la matriz deben tenerse en cuenta, especialmente si ésta contiene disolventes orgánicos, como en las bebidas alcohólicas y la cuantificación generalmente requiere estándares de matriz coincidente (matrix matching) o el método de adición estándar [7]. Estas formas de cuantificación son laboriosas y no son utilizadas comúnmente en mediciones de rutina realizadas por laboratorios de ensayo. Otra alternativa es la medición por dilución isotópica, que debido al costo de estándares isotópicos no es una alternativa práctica. Es importante indicar que la aplicación de una calibración externa para la cuantificación o el uso del estándar interno, como se ha desarrollado en la norma ISO 17943 para matrices acuosas, podrían verse limitados debido al efecto de matriz causado por la matriz alcohólica.

De acuerdo a lo mencionado anteriormente, los métodos capaces de lidiar con el efecto de matriz en la cuantificación de terpenos en Pisco serían muy costosos y/o laboriosos como para ser aplicados en mediciones de rutina. De esta manera, es deseable simplificar alguno de estos métodos de tal manera que sea eficaz y suficiente para ser aplicado en la práctica común. En el presente trabajo se propone simplificar el conocido método de adición estándar. Para ello se propone y evalúa el uso de la calibración de un solo punto. Esta estrategia se combina con el uso de un estándar interno natural para cuantificación de terpenos en Pisco mediante HS-SPME-GC-MS. En los siguientes párrafos se describe el raciocinio utilizado para fundamentar esta propuesta de estrategia combinada de calibración.

La adición estándar multipunto, utilizada comúnmente para la cuantificación en mediciones de referencia, resulta limitada debido a la tediosa preparación de muestras para la medición. Es decir, se debe preparar una curva de calibración para cada muestra medida (y en algunos casos podría ser necesaria una curva para cada componente en cada muestra medida). Sin embargo, cuando la linealidad ya se ha demostrado en un rango particular de concentración y para una matriz específica, la adición estándar de un solo punto representa un enfoque confiable y más rápido para la medición de muestras [8]. Los Institutos Nacionales de Metrología (INM), que generalmente realizan mediciones de referencia de alta precisión, ya han mostrado su confianza en la adición estándar de un solo punto para la certificación de materiales de referencia [9]. La Dirección de Metrología - INACAL (Instituto Nacional de Metrología del Perú) ha implementado este enfoque de cuantificación para mediciones de referencia de plomo en vino y lo ha utilizado para demostrar su competencia técnica comparando sus resultados con métodos de la más alta exactitud disponible a nivel mundial [10].

Una de las dificultades en desarrollos anteriores de metodologías de medición cuantitativa para compuestos volátiles en bebidas alcohólicas utilizando HS-SPME-GC-MS fue la selección del estándar interno agregado. En primer lugar, se debe asegurar la ausencia de dicho estándar interno en las muestras a medir. Para cumplir este requisito se ha utilizado diferentes sustancias (como el 3-octanol), que no se encontrarían de manera natural en las bebidas alcohólicas [11]. Sin embargo, no se tiene hasta ahora un consenso en la elección del estándar interno y se han utilizado otras sustancias como 2-octanol y 4-hidroxi-4-metil-2-pentanona [12]. Como se indicó anteriormente, se debe asegurar ausencia (en las muestras a medir) de la sustancia elegida como estándar interno, lo que podría requerir de una medición preliminar de dichas muestras antes de agregar el estándar interno. Esta medición preliminar también es necesaria para verificar que no coeluya ninguna sustancia en el tiempo de retención del estándar interno elegido. Sin embargo, cuando se usa la calibración de adición estándar para la cuantificación (de acuerdo a lo propuesto en la presente tesis), se puede elegir un estándar interno natural de uno de los componentes ya presentes en la muestra que se va a medir. Esto es debido a que, para la adición estándar, la muestra se mide al menos 2 veces, una con adición de solvente y otra con adición de estándar. En ambas mediciones existen compuestos en la matriz con posibilidad de utilizarse como estándares internos (si sus características

químicas lo permiten). Esto significa que no sería necesario agregar un estándar interno, siempre que se pueda seleccionar un compuesto conveniente, natural en la muestra de Pisco. En este caso, ya no sería necesario verificar la ausencia del estándar interno en las muestras a medir. De manera razonable sería necesario elegir estándar interno natural que no coeluya con alguna otra sustancia presente en la muestra. El uso de un estándar interno natural ha demostrado ser útil para la determinación de metales en agua de mar costera [13]. A nuestro entender, este enfoque rara vez se ha probado para cuantificaciones por cromatografía de gases.

El Laboratorio de Bioanálítica de la PUCP (Pontificia Universidad Católica del Perú) ha venido utilizando HS-SPME-GC-MS durante varios años para realizar determinaciones cualitativas y cuantitativas de compuestos volátiles en diferentes matrices ambientales y alimentarias. Las condiciones de preparación de la muestra de Pisco utilizando microextracción en fase sólida en el espacio de cabeza (HS-SPME) se definieron en una tesis de maestría desarrollada por Gromova [1]. De esta manera, el trabajo que se expone a continuación complementa otros previamente realizados, con el fin de desarrollar metodologías prácticas de cuantificación de terpenos en Pisco.

Demostrar la viabilidad para la cuantificación práctica de terpenos en muestras de Pisco utilizando HS-SPME-GC-MS y la calibración de adición estándar de un solo punto combinada con un estándar interno natural abriría una oportunidad para formalizar este enfoque de medición como una herramienta que permita evaluar la calidad y diferenciar Piscos producidos a partir de diferentes variedades de uvas. Estandarizar el método de cuantificación para componentes volátiles minoritarios (como los terpenos) es una meta ambiciosa, tanto para el Pisco como para cualquier otra bebida destilada, sin embargo, ésta es una meta que no se debe perder de vista y se espera que este trabajo contribuya significativamente a lograr dicho objetivo.

2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

En comparación con otras formas de extracción utilizadas en la preparación previa de muestras para fines analíticos, la microextracción en fase sólida ha demostrado ser una forma más rápida, más económica y más amigable con el medio ambiente. Sin embargo la aplicación de esta forma de extracción se ha visto limitada debido a la falta de estandarización en relación a la elección del método de calibración más adecuado para los análisis cuantitativos. En los últimos años esta dificultad se viene superando para algunas matrices de interés. Aquí cabe mencionar, por ejemplo, la reciente publicación de la norma ISO 17943:2016 que formaliza finalmente el uso de la microextracción en fase sólida para medición de componentes orgánicos volátiles en agua, constituyéndose esto en un paso importante para la medición cuantitativa en matrices ambientales. Sin embargo, para esta forma de extracción aún no se cuenta con normas aceptadas nacional o internacionalmente que aborden la medición de terpenos u otros compuestos de interés relacionados con el aroma y calidad de las bebidas alcohólicas. Se reconoce que para obtener resultados válidos en este tipo de matrices se deben utilizar métodos laboriosos como calibración por adición estándar o incluso es necesario realizar mediciones por dilución isotópica.

Con el fin de atender la problemática descrita en el párrafo anterior, el presente trabajo plantea una estrategia simplificada y confiable para análisis cuantitativo de terpenos por HS-SPME-GC-MS que pueda ser utilizada para mediciones rutinarias en Pisco. Además se plantea una estrategia de referencia que permita evaluar la confiabilidad de la estrategia simplificada propuesta. La comparación de los resultados de ambas estrategias planteadas se basa en requisitos de comparabilidad previamente establecidos.

3. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

3.1 Objetivo general

El objetivo del presente trabajo es desarrollar una estrategia práctica y confiable (estrategia simplificada) para análisis cuantitativo de terpenos por HS-SPME-GC-MS que pueda ser utilizada para mediciones rutinarias en Pisco. La difusión de este trabajo contribuiría a la estandarización de las mediciones de estos componentes minoritarios en nuestra bebida de bandera.

3.2 Objetivos específicos

- Evaluar la linealidad de las mediciones realizadas utilizando la estrategia simplificada para cada uno de los terpenos en estudio.
- Plantear una estrategia práctica de calibración (estrategia simplificada)
- Plantear y justificar una estrategia de calibración de referencia técnicamente válida (estrategia de referencia) contra la cual se pueda evaluar la confiabilidad de la estrategia simplificada.
- Estimar la incertidumbre de medición para los resultados utilizando ambas estrategias.
- Identificar un estándar interno natural óptimo para la estrategia simplificada con ayuda de la estrategia de referencia. El estándar óptimo brindará resultados con las menores incertidumbres de medición.
- Comparar resultados de la estrategia simplificada y la estrategia de referencia calculando valores de zeta-score.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 Regulación peruana sobre el Pisco

De acuerdo al Reglamento de la Denominación de Origen Pisco [2], el producto que ostente esta denominación debe cumplir requisitos organolépticos de aspecto (claro, límpido y brillante) y color (incoloro). En relación al olor y sabor, se establecen requisitos diferenciados para el Pisco puro de uvas aromáticas, Pisco puro de uvas no aromáticas, Pisco Acholado y Pisco Mosto Verde. Se debe mencionar que los Piscos puros provienen de una sola variedad de uvas, a diferencia de los Piscos acholados que provienen de la mezcla uvas aromáticas y no aromáticas. Los Piscos mosto verde son aquellos que se obtienen a partir de uvas pisqueras con fermentación interrumpida. Son no aromáticas las uvas Quebranta, Negra Criolla, Mollar y Uvina; y son aromáticas las uvas Italia, Moscatel, Albilla y Torontel. Además, el Pisco no debe presentar olores y sabores o elementos extraños que recuerden a aromas y sabores de diferentes sustancias químicas y sintéticas que se enumeran en el reglamento de Denominación de Origen Pisco [2].

En relación a los requisitos físico-químicos, el reglamento establece valores máximos (y algunos mínimos) para el grado alcohólico, extracto seco y los siguientes componentes volátiles y congéneres: ésteres, furfural, aldehídos, alcoholes superiores, acidez volátil y alcohol metílico. El método de ensayo utilizado para el análisis cromatográfico de componentes orgánicos es la Norma Técnica Peruana NTP 211.035 BEBIDAS ALCOHÓLICAS. Determinación de metanol y de congéneres en bebidas alcohólicas y en alcohol etílico empleado en su elaboración, mediante cromatografía de gases. De acuerdo a esta norma las mediciones se realizan por cromatografía de gases con detector FID.

4.2 Diferenciación de Piscos obtenidos de diferentes variedades de uvas

Los requisitos organolépticos indicados en el Reglamento de la Denominación de Origen Pisco establecen características diferenciadas para el olor y sabor de los Piscos puros de uvas aromáticas, Piscos puros de uvas no aromáticas, Piscos acholados y Piscos mosto verdes. Estas características son evaluadas por un catador (o panel de catadores). El reglamento no presenta requisitos que permita diferenciar entre los Piscos obtenidos de diferentes uvas no aromáticas, o de diferentes uvas aromáticas (por ejemplo

diferenciar un Pisco Italia de un Pisco Moscatel). Tampoco hace ninguna referencia al contenido de terpenos presentes en el Pisco con fines de evaluar la calidad del producto.

Diversas publicaciones [14] [15] [16] han dado cuenta acerca del estudio de perfiles terpénicos (y de otros compuestos minoritarios) en bebidas alcohólicas con fines de diferenciación y autenticidad de los productos. El análisis cuantitativo de estos compuestos ha sido típicamente por GC-MS, utilizando, en muchos casos, técnicas laboriosas de extracción (como extracción líquido-líquido o extracción en fase sólida) lo cual ha limitado el uso práctico de los métodos de medición desarrollados. Por otro lado, en los últimos años se ha incrementado el uso de la microextracción en fase sólida (SPME) como una forma de extracción rápida, económica y amigable con el ambiente (libre de solventes). SPME utiliza una fibra que puede extraer los compuestos volátiles por inmersión directa (DI-SPME) o por extracción en el espacio de cabeza (HS-SPME). El uso de HS-SPME combinado con GC-MS para el análisis de terpenos ha mostrado la rapidez y eficiencia de esta técnica en mediciones con tequila, leche, frutas, entre otros [17] [18] [19].

4.3 Métodos de calibración utilizados en cuantificación por SPME

Para las mediciones cuantitativas rutinarias con diferentes técnicas analíticas se suele utilizar la calibración con curva externa o con estándar interno. Estos métodos de calibración suelen ser suficientes para muchas aplicaciones. Sin embargo, para mediciones de terpenos en bebidas alcohólicas con HS-SPME-GC-MS no se ha alcanzado consenso en relación a la validez de resultados obtenidos con estos métodos de calibración y no se cuenta con métodos aceptados nacional o internacionalmente para este fin. En estos casos se suele reconocer que para obtener resultados válidos se deben utilizar métodos laboriosos como calibración por adición estándar o incluso es necesario realizar mediciones por dilución isotópica [7]. En concordancia con lo indicado, la Tabla 1 muestra información extraída de una guía práctica de cuantificación por SPME que ha sido publicada por SUPELCO [20] y que recomienda la cuantificación por adición estándar (última columna de la tabla) cuando se trabaja con matrices líquidas complejas o matrices sólidas complejas.

Tabla 1. Tabla guía de cuantificación. Información extraída de [20].

Matrix	Type	Method	External	Recommended Approach	
				Internal	Standard Addition
Gas	Simple	Headspace	✓		
	Complex	Headspace	✓	✓	
Liquid	Simple Immersion	Headspace	✓	✓	
	Complex Immersion	Headspace		✓	✓
Solid	Simple	Headspace		✓	✓
	Complex	Headspace			✓

A continuación se detallan las características de los métodos de calibración tradicionales de acuerdo a lo descrito por Ouyang y Pawliszyn [21] para mediciones por SPME. También se enlistan al final otros métodos de calibración que han sido descritos por este mismo autor. Finalmente se dan detalles acerca de la calibración por adición estándar de un punto con estándar interno natural que se utiliza en el presente trabajo.

4.3.1 Calibración por curva externa

Esta calibración consiste en la preparación de varias soluciones estándar y se obtiene la relación (usualmente lineal) entre las respuestas instrumentales y las concentraciones conocidas de las soluciones estándar. Las muestras son analizadas con las mismas condiciones de extracción. De esta manera, la concentración del analito desconocido se puede calcular con la ecuación de la curva de calibración previamente obtenida.

Este método de calibración no requiere una extensa preparación de muestra, pero requiere que las condiciones instrumentales y de extracción sean constantes durante todo el proceso de medición.

Es recomendable que los estándares preparados para la curva de este método de calibración cuenten con una matriz semejante a aquella de las muestras a medir (*matrix match calibration*).

4.3.2 Calibración por adición estándar

Esta calibración implica la adición de diferentes estándares con concentraciones conocidas del analito que son agregados a la muestra a analizar, la cual contiene la concentración desconocida de dicho analito. Las diferentes mezclas preparadas son analizadas obteniéndose una curva de respuestas instrumentales versus concentraciones adicionadas. La extrapolación de esta curva hasta cero permite obtener la concentración desconocida de analito.

Este método de calibración requiere extensa preparación de muestra. Puede ser extremadamente tedioso para el análisis de un gran número de muestras. La ventaja de este método es que los efectos de matriz pueden ser compensados. Es apropiado cuando el número de muestras es pequeño y la composición de la muestra es desconocida y compleja.

4.3.3 Calibración por estándar interno

Esta calibración implica la adición de un mismo compuesto (diferente al analito de concentración desconocida) a las soluciones de calibración y las muestras a medir. El compuesto añadido debe resolverse adecuadamente en el cromatograma obtenido y debe tener una respuesta instrumental similar al analito de concentración desconocida. La curva de calibración se grafica con los valores de los cocientes de las áreas instrumentales de diferentes niveles de analito de concentración desconocida entre las áreas instrumentales del compuesto añadido (estándar interno) versus los cocientes de concentraciones de analito entre la concentración fija de estándar interno.

Un estándar interno se suele utilizar para compensar por el efecto matriz, las pérdidas de analito durante la preparación de muestra y la irreproducibilidad en parámetros instrumentales. Sin embargo, no es fácil encontrar estándares internos adecuados para matrices complejas. La calibración utilizando estándares internos isotópicos puede producir resultados satisfactorios, pero estos estándares no están disponibles para todos los analitos de interés.

4.3.4 Otros métodos de calibración

Otros métodos de calibración que han sido desarrollados son:

- Extracción de equilibrio
- Extracción exhaustiva
- Calibración basada en la difusión
- Calibración por inyección líquida

4.3.5 Calibración por adición estándar de un punto con estándar interno natural

Cuando la linealidad ya se ha demostrado en un rango particular de concentración y para una matriz específica, la adición estándar de un solo punto representa un enfoque confiable y práctico para la medición de muestras [8]. El uso de la adición estándar de un punto se ha popularizado para las mediciones de referencia inorgánicas realizadas por Institutos Nacionales de Metrología (INM) que participan en comparaciones clave del Buro Internacional de Pesas y Medidas. Esto se observa por ejemplo en la Comparación Clave *Key Comparison CCQM-K127 "Contaminant and other elements in soil"* [22] donde los Institutos de Metrología de Estados Unidos (NIST) y México (CENAM) han declarado esta forma de calibración. También se está volviendo común (entre los Institutos Nacionales de Metrología) el uso de un estándar interno en combinación con la adición estándar de un punto. Esta forma de calibración se está utilizando cada vez más para la certificación de materiales de referencia [9].

En mediciones de compuestos orgánicos se puede mencionar el uso de la adición estándar de un punto para el análisis cuantitativo de residuos de pesticidas en muestras de alimentos por GC-MS/MS [23]. Por otro lado, diferentes enfoques de calibración fueron comparados para compensar efectos de matriz en la determinación de micotoxinas en alimentos y piensos por LC-MS/MS [24].

En relación a las mediciones por HS-SPME, se ha utilizado como método de referencia la adición estándar combinada con un estándar interno para las mediciones de furano en alimentos por HS-SPME-GC-MS con trampa de iones [25]. De acuerdo al autor, las

mediciones por adición estándar combinada con estándar interno se utilizan como método de referencia al ser comparadas con mediciones por dilución isotópica usando furano-d4.

Luego de una búsqueda bibliográfica, no se han encontrado referencias para el uso de HS-SPME-GC-MS utilizando adición estándar de un punto combinada con estándar interno natural.

4.4 Estimación de incertidumbre de medición

4.4.1 Nociones sobre la estimación de incertidumbre en los resultados de mediciones químicas

Los laboratorios que reportan resultados de mediciones químicas deben dar alguna indicación acerca de la variabilidad de sus resultados obtenidos. De acuerdo a la norma ISO/IEC 17025:2017 Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración [26], la calidad de las mediciones reportadas se expresa acompañando un resultado con su incertidumbre de medición.

Siendo los resultados de medición los principales productos ofrecidos por los laboratorios de ensayo, la incertidumbre está directamente relacionada a la calidad del servicio brindado por el laboratorio. La incertidumbre permite evaluar la comparabilidad de resultados de medición reportados por diferentes laboratorios para una misma muestra evaluada. También es útil para evaluar las comparabilidad de resultados reportados por diferentes métodos.

La incertidumbre permite sostener los diferentes niveles de la cadena de trazabilidad de un resultado de medición. También permite entender qué etapa del proceso de medición influye más en la calidad del resultado final. De acuerdo a esto, siempre tendrá sentido hacer una inversión económica adicional en mejorar cualquier etapa relacionada con una componente de incertidumbre que sea significativa en comparación con las demás componentes.

La guía fundamental para la estimación de incertidumbre es la GUM *Guide to the expression of uncertainty in measurement* [27] publicada por el Buro Internacional de Pesas y Medidas en conjunto con diferentes organizaciones: IEC, IFCC, ILAC, ISO, IUPAC, IUPAP y OIML. Para mediciones químicas se cuenta con la Guía de Cuantificación de la Incertidumbre en Medidas Analíticas [28] publicada por EURACHEM en conjunto con CITAC, traducida al español por EUROLAB (España). Esta traducción fue revisada en colaboración con INACAL.

4.4.2 Etapas de la estimación de incertidumbre

De acuerdo a la Guía EURACHEM Guía de Cuantificación de la Incertidumbre en Medidas Analíticas, las etapas para la estimación de incertidumbre son:

Etapas 1: Especificación del mensurando

Etapas 2: Identificación de las fuentes de incertidumbre

Etapas 3: Cuantificación de las componentes de incertidumbre

Etapas 4: Cálculo de la incertidumbre combinada y la incertidumbre expandida

La Figura 1 muestra el proceso de estimación de incertidumbre de acuerdo a lo descrito por la Guía EURACHEM. Estas 4 etapas se describen en las siguientes líneas.

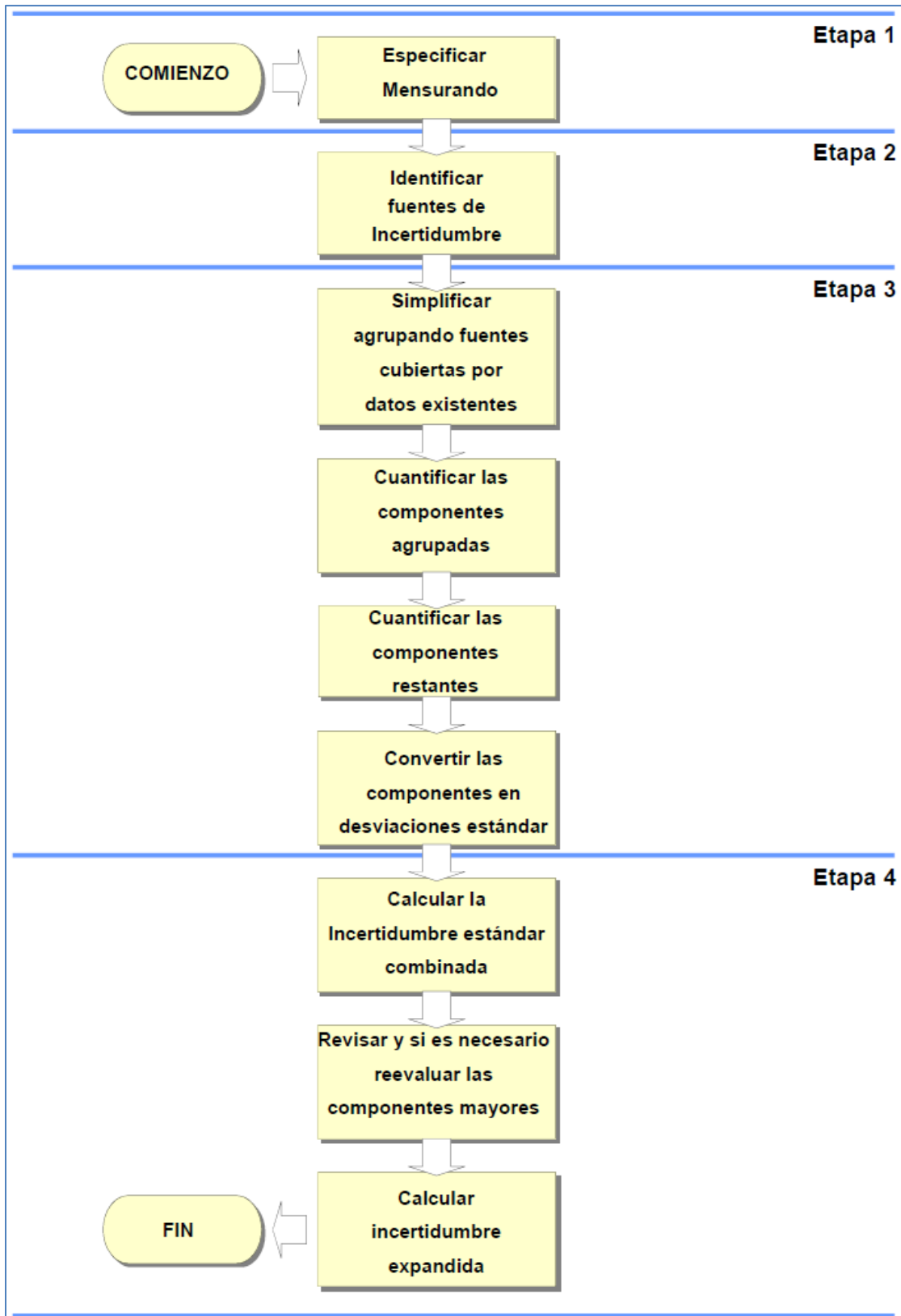


Fig. 1. Proceso de la estimación de incertidumbre. Información extraída de [28].

4.4.3 Especificación del mensurando

En esta etapa se debe describir claramente qué se va a medir incluyendo la relación entre el mensurando y las magnitudes de entrada (p. ej. magnitudes medidas, constantes, valores de patrones de calibración, etc.) que afectan la medición. Esto se expresa usualmente como una ecuación que relaciona al mensurando con todas las variables de las que depende.

4.4.4 Identificación de las fuentes de incertidumbre

Aquí se enlistan las posibles fuentes de incertidumbre. Esto incluirá las fuentes que contribuyen a la incertidumbre de los parámetros especificados al definir el mensurando, pero pueden incluir otras fuentes y se deben incluir las fuentes que surgen de las suposiciones químicas. La forma típica de mostrar las fuentes de incertidumbre es a través de un diagrama de Ishikawa también conocido como diagrama de espina de pescado o diagrama de causa y efecto.

4.4.5 Cuantificación de las componentes de incertidumbre

Aquí se estima cada componente de la incertidumbre asociada con cada fuente identificada en la etapa anterior. A veces es posible estimar o determinar una contribución única a la incertidumbre con varias fuentes separadas utilizando los datos de control de calidad, resultados de participación en ensayos de aptitud, etc. Las componentes de incertidumbre deben ser obtenidas como incertidumbres estándar para que puedan ser combinadas posteriormente.

En la Guía EURACHEM se muestran diferentes ejemplos para evaluar una incertidumbre estándar. En las siguientes líneas se describen algunos casos de aplicación práctica.

Para estimar la incertidumbre estándar de repetibilidad que se obtiene a partir de mediciones repetidas se utiliza la desviación estándar de la media de acuerdo a:

$$u_{\text{repetibilidad}} = \left(\frac{\text{Desviación estándar } (x_1; x_2 \dots x_n)}{\sqrt{n}} \right) \dots\dots \text{Ecuación 1}$$

Cuando un certificado o alguna tolerancia da unos límites, $X \pm a$, sin especificar el nivel de confianza (por ejemplo, 25 mL \pm 0,05 mL para una fiola), se trata de una distribución rectangular que se puede graficar como se muestra en la Figura 2:

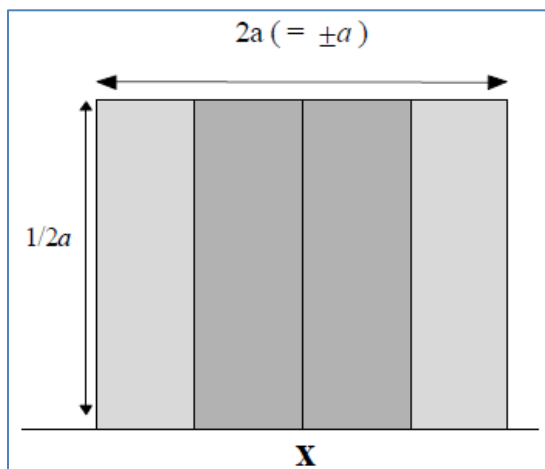


Fig. 2. Distribución rectangular. Información extraída de [28].

En este caso la incertidumbre estándar se obtiene como:

$$u_{\text{estándar}} = \frac{a}{\sqrt{3}} \quad \dots\dots\dots \text{Ecuación 2}$$

Cuando se presenta el mismo caso anterior pero se considera que los valores son más cercanos al centro de la distribución, entonces se trata de una distribución triangular que se puede graficar como se muestra en la Figura 3:

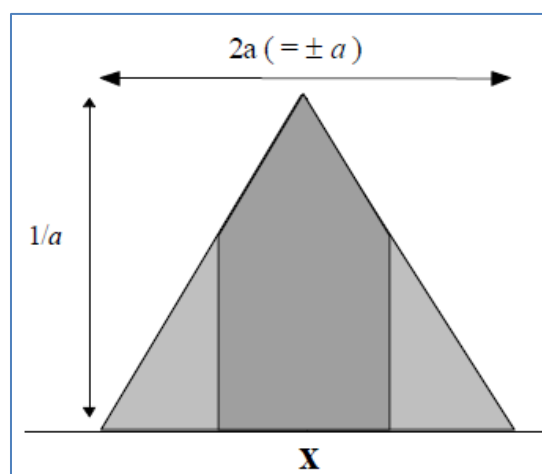


Fig. 3. Distribución triangular. Información extraída de [28].

En este caso la incertidumbre estándar se obtiene como:

$$u_{estandar} = \frac{a}{\sqrt{6}} \quad \dots\dots\dots \text{Ecuación 3}$$

Cuando se ha hecho una estimación a partir de observaciones repetidas de un proceso de variación aleatoria o se ha expresado la repetibilidad en forma de una desviación estándar, entonces se trata de una distribución normal que se puede graficar como se muestra en la Figura 4:

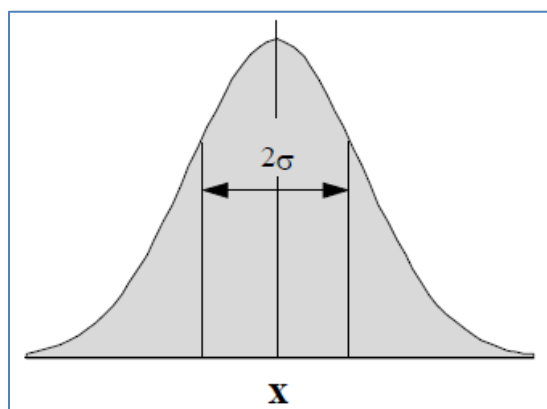


Fig. 4. Distribución normal. Información extraída de [28].

En este caso la incertidumbre estándar se obtiene como:

$$u_{estandar} = \text{Desviación estándar} \quad \dots\dots\dots \text{Ecuación 4}$$

Otro caso de la distribución normal sucede cuando se cuenta con un dato de incertidumbre expandida U con un nivel de confianza especificado. La incertidumbre estándar se obtendrá dividiendo la incertidumbre expandida entre el factor de cobertura k que corresponde al nivel de confianza especificado. Por ejemplo, un nivel de confianza del 95 % se relaciona con un factor de cobertura $k = 2$. En este caso la incertidumbre estándar se obtiene como:

$$u_{estandar} = \frac{U}{2} \quad \dots\dots\dots \text{Ecuación 5}$$

4.4.6 Cálculo de la incertidumbre combinada

La incertidumbre $u_{combinada}$ se obtiene a partir de la siguiente ecuación:

$$u_{combinada} = \sqrt{\sum_{i=1}^N (u_i(y))^2} \quad \dots\dots\dots \text{Ecuación 6}$$

$$u_i(y) = c_i u(x_i) \quad \dots\dots\dots \text{Ecuación 7}$$

Cada c_i es el coeficiente de sensibilidad que se obtiene por derivada parcial de y con respecto de la variable x_i . Cada $u(x_i)$ es la incertidumbre estándar de la variable x_i .

Existen 2 reglas prácticas que se pueden utilizar para calcular la incertidumbre combinada. Estas reglas permiten evitar el uso de derivadas parciales y se describen a continuación.

Regla 1

Cuando la ecuación del mensurando es una suma o diferencia de cantidades, por ejemplo, $y = p + q - r \dots$, la incertidumbre estándar combinada se obtiene como:

$$u_{combinada} = \sqrt{(u(p))^2 + (u(q))^2 + (u(r))^2 \dots} \quad \dots\dots\dots \text{Ecuación 8}$$

Regla 2

Cuando la ecuación del mensurando es un producto o cociente de cantidades, por ejemplo, $y = p \cdot q / r \dots$, la incertidumbre estándar combinada se obtiene a partir de las incertidumbres estándar relativas. Tomando el caso de la variable p , su incertidumbre estándar relativa se obtiene de acuerdo a:

$$u_{relativa}(p) = \frac{u(p)}{p} \quad \dots\dots\dots \text{Ecuación 9}$$

De manera semejante se obtiene la incertidumbre estándar relativa de cada variable. Entonces la incertidumbre estándar relativa de y se obtiene como:

$$u_{relativa}(y) = \frac{u(y)}{y} = \sqrt{\left(\frac{u(p)}{p}\right)^2 + \left(\frac{u(q)}{q}\right)^2 + \left(\frac{u(r)}{r}\right)^2 \dots} \dots \text{Ecuación 10}$$

De aquí se puede despejar la incertidumbre estándar de y obteniéndose:

$$u(y) = y \cdot u_{relativa}(y) \dots \text{Ecuación 11}$$

4.4.7 Cálculo de la incertidumbre expandida

Finalmente luego de obtener la incertidumbre combinada, se obtiene la incertidumbre expandida de acuerdo a:

$$U(y) = 2 \cdot u(y) \dots \text{Ecuación 12}$$

Donde se ha utilizado un factor de cobertura de $k = 2$ para un nivel de confianza de 95 %. La incertidumbre expandida relativa se obtiene de acuerdo a:

$$U_{relativa}(y) = 2 \cdot u_{relativa}(y) \dots \text{Ecuación 13}$$

Las incertidumbres estándar o expandida relativas también se pueden expresar en porcentaje multiplicando por 100 %

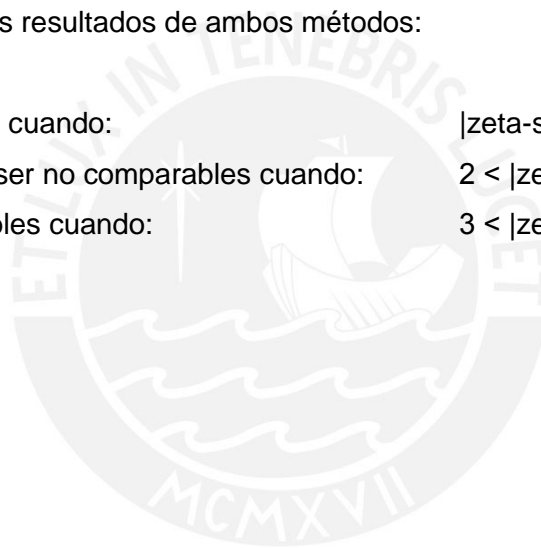
4.5 Comparación de resultados reportados por diferentes métodos mediante el cálculo del zeta-score

Para comparar el resultado x_{met} de un método propuesto cuya incertidumbre estándar es u_{met} con el resultado x_{ref} de un método de referencia cuya incertidumbre expandida es u_{ref} se calcula el valor del zeta-score de acuerdo a [29][30]:

$$zeta - score = \frac{x_{met} - x_{ref}}{\sqrt{u_{met}^2 + u_{ref}^2}} \quad \dots\dots\dots \text{Ecuación 14}$$

Se considera que los resultados de ambos métodos:

- son comparables cuando: $|zeta-score| \leq 2$.
- tienen riesgo de ser no comparables cuando: $2 < |zeta-score| \leq 3$
- no son comparables cuando: $3 < |zeta-score|$



5. METODOLOGÍA

5.1 Estándares y reactivos

Las curvas de calibración para la adición estándar se prepararon a partir de los siguientes estándares de terpenos puros: óxido de linalol (pureza $\geq 96\%$) suministrado por Wako Chemicals, Japón; linalol (pureza $\geq 97\%$) suministrado por Sigma Aldrich CHEMIE GmbH, Alemania; y α -terpineol (pureza $\geq 98\%$) suministrado por Merk KGaA, Alemania.

El cloruro de sodio, utilizado para aumentar la fuerza iónica durante la extracción con SPME, fue suministrado por Merk KGaA, Alemania.

No fue necesaria la adquisición de sustancias puras para la estandarización interna. Para la estrategia simplificada se utilizó estándar internos (identificados como: *candidatos*) presentes naturalmente en todas las muestras de Pisco estudiadas. Para la estrategia de referencia se utilizó estándares internos (identificados como: *de referencia*) presentes naturalmente en las muestras de Pisco estudiadas.

5.2 Preparación de soluciones para adición estándar

Con una balanza analítica Sartorius BL 120S con resolución de 0,1 mg se pesó aproximadamente 100 mg de cada estándar de terpeno puro para preparar soluciones (al 100 % de etanol) en fioles de 10 mL ó 50 mL (soluciones stock 1). Estas soluciones se diluyeron volumétricamente varias veces para preparar soluciones stock 2 y 3 (al 40% de etanol en volumen) en fioles de 5 mL ó 10 mL . Posteriormente se diluyó la solución stock 3 y se preparó 3 niveles de soluciones para la adición estándar en la muestra Quebranta con el fin de evaluar linealidad. El nivel intermedio preparado también se utilizó para las mediciones de cuantificación que se realizaron con la estrategia de referencia y la estrategia simplificada.

Adicionalmente se prepararon las siguientes soluciones necesarias para el proceso de medición:

Solución salina: Se preparó mezclando 25 g de NaCl por 100 g de agua

Solución alcohólica al 40 %: Se preparó volumétricamente mezclando 40 partes de etanol absoluto y 60 partes de agua

5.3 Procedimiento HS-SPME y preparación de muestras para adición estándar

Las condiciones experimentales óptimas para HS-SPME se determinaron en un trabajo previo de Gromova [1]. Para la extracción de terpenos se utilizó fibras DVB-CAR-PDMS Supelco (Bellefonte, PA, USA). Antes de la extracción, la fibra se acondicionó por exposición en el puerto de inyección GC a 250 °C. Para cada experimento de adición se prepararon cuatro mezclas, cada una de ellas en un vial de 4 mL de capacidad. El contenido de estos cuatro viales se describe a continuación:

Dos viales de mezclas sin adición (MSA) consistentes en: 0,25 mL de muestra de Pisco; 0,25 mL de solución alcohólica al 40 % y 1,5 mL de una solución salina. Estas mezclas se denotan como MSA1 y MSA2.

Dos viales de mezclas con adición (MCA) consistentes en: 0,25 mL de muestra de Pisco; 0,25 mL de la solución de adición del terpeno puro y 1,5 mL de una solución salina. Estas mezclas se denotan como MCA1 y MCA2.

Cada una de los cuatro viales se acondicionó durante 15 minutos a 40 °C sin agitación. Las fibras se expusieron al espacio de cabeza de 2 mL en los viales durante 50 minutos. Después de la extracción, las fibras se insertaron en el puerto de inyección GC para su análisis.

5.4 Condiciones analíticas cromatográficas y adquisición de datos

Los análisis se ejecutaron utilizando un cromatógrafo Agilent 7890 acoplado a un espectrómetro de masas 5977. Todos los datos se adquirieron con un modo simultáneo SCAN/SIM.

Se utilizó una columna capilar DB-5, 30m x 0.25mm, 0.25 μ m (Agilent Technologies). El caudal de gas portador de helio se estableció en 0,9 mL/min. Se usó una relación de split de 20:1. La temperatura del inyector se ajustó a 250 °C. El programa de temperatura del

horno fue: 40 °C durante 4 minutos, rampa hasta 280 °C a 10 °C/min y mantener a 280 °C durante 5 minutos. La energía de ionización se fijó a 70 eV.

Se realizó adquisición de datos en modo SCAN para cuantificación de óxido de linalol y de linalol. La adquisición de datos en modo SIM se realizó monitoreando iones fragmento con m/z de 43 y 59 (para óxido de linalol) y m/z de 93 (para α -terpineol).

5.5 Identificación de compuestos

La adición estándar de cada uno de los terpenos en evaluación permitió una identificación directa de cada compuesto en estudio por comparación de los tiempos de retención de los cromatogramas de la mezcla sin adición y de la mezcla con adición.

La identificación también se realizó utilizando la base de datos de NIST disponible en el software Chemstation de Agilent. Para ello se compararon los patrones de fragmentación de los espectros de masas. También se compararon los índices de retención lineales (IRL) obtenidos por inyección de un estándar de alcanos (C₈-C₂₀) y valores de IRL obtenidos de fuentes bibliográficas.

5.6 Evaluación de linealidad con muestra Quebranta

Para la evaluación de linealidad se utilizó una muestra de Pisco Quebranta debido a sus bajos niveles de concentración en los terpenos evaluados. Esto es necesario debido a que, en la evaluación de linealidad para la cuantificación por adición estándar, la curva se construye sobre la muestra de Pisco. La curva se construye por adición de las soluciones de adición preparadas de acuerdo a 5.2.

5.7 Cálculo de concentración y estimación de incertidumbre de medición

5.7.1 Esquema de cuantificación utilizando la estrategia de referencia

La estrategia de referencia consistió en la adición estándar individual, y por separado, de cada terpeno evaluado en dos de las tres variedades de Pisco en estudio (Piscos Italia, Moscatel y Torontel) de acuerdo a lo indicado en la Tabla 2. Las muestras se identificaron con la inicial de la variedad, I para Italia, T para Torontel y M para Moscatel. Los subíndices OXL, LIN y TER identifican las adiciones de óxido de linalol, linalol o α -

terpineol, respectivamente. Por ejemplo, I_{OXL} identifica a una muestra Italia a la cual se le adicionó un estándar de óxido de linalol.

Tabla 2. Mediciones realizadas con la estrategia de referencia

Terpeno medido	Muestra ¹	Mezclas preparadas	1er estándar interno natural de referencia	2do estándar interno natural de referencia
Óxido de linalol	I_{OXL}	MSA1, MCA1; MSA2, MCA2	Linalol	Hotrienol
Óxido de linalol	T_{OXL}	MSA1, MCA1; MSA2, MCA2	Linalol	Hotrienol
Linalol	I_{LIN}	MSA1, MCA1; MSA2, MCA2	Hotrienol	Óxido de nerol
Linalol	M_{LIN}	MSA1, MCA1; MSA2, MCA2	Óxido de nerol	α -terpineol
α -terpineol	I_{TER}	MSA1, MCA1; MSA2, MCA2	Linalol	Hotrienol
α -terpineol	M_{TER}	MSA1, MCA1; MSA2, MCA2	Linalol	Óxido de nerol

¹Los subíndices indican adición de óxido de linalol (OXL), linalol (LIN) o α -terpineol (TER)

Todas las mediciones se realizaron por duplicado requiriéndose la preparación de 4 mezclas para cada muestra de acuerdo a lo siguiente. Para la primera réplica se preparó una mezcla sin adición (MSA1) y una mezcla con adición (MCA1). De manera semejante, para la segunda réplica se preparó una mezcla sin adición (MSA2) y una mezcla con adición (MCA2). En la estrategia de referencia, para cada réplica se obtuvieron 2 resultados, uno para cada estándar interno natural de referencia.

De acuerdo a lo indicado, cada resultado de referencia se calculó a partir de 4 valores obtenidos a partir del procesamiento de datos con dos estándares internos naturales de referencia por cada réplica.

5.7.2 Esquema de cuantificación utilizando la estrategia simplificada

La estrategia simplificada consistió en la adición estándar multicomponente de los terpenos evaluados en las tres variedades de Pisco en estudio (Piscos Italia, Moscatel y Torontel) de acuerdo a lo indicado en la Tabla 3. Las muestras se identificaron con la inicial de la variedad, I para Italia, T para Torontel y M para Moscatel. El subíndice MULTI identifica la adición múltiple de óxido de linalol, linalol y α -terpineol. Por ejemplo, I_{MULTI} identifica a una muestra Italia a la cual se le adicionó un estándar de óxido de linalol, linalol y α -terpineol.

Tabla 3. Mediciones realizadas con la estrategia simplificada

Muestra	Mezclas preparadas	Estándar interno natural de candidato
I_{MULTI}^1	MSA1, MCA1; MSA2, MCA2	Acetato de isoamilo, hexanoato de etilo, decanoato de etilo
T_{MULTI}^1	MSA1, MCA1; MSA2, MCA2	Acetato de isoamilo, hexanoato de etilo, decanoato de etilo
M_{MULTI}^1	MSA1, MCA1; MSA2, MCA2	Acetato de isoamilo, hexanoato de etilo, decanoato de etilo

¹El subíndice MULTI indica la adición y medición múltiple de óxido de linalol, linalol y α -terpineol

Todas las mediciones se realizaron por duplicado requiriéndose la preparación de 4 mezclas para cada muestra de acuerdo a lo siguiente. Para la primera réplica se preparó una mezcla sin adición (MSA1) y una mezcla con adición (MCA1). De manera semejante, para la segunda réplica se preparó una mezcla sin adición (MSA2) y una mezcla con adición (MCA2). Cada resultado de la estrategia simplificada se calculó a partir de 2 valores obtenidos a partir del procesamiento de datos de cada réplica.

En la estrategia simplificada se evaluó la factibilidad de utilizar acetato de isoamilo, hexanoato de etilo o decanoato de etilo como estándar interno natural. Para ello se identificó con cuál de los estándares internos naturales candidatos se obtienen los menores valores de incertidumbre de medición. Asimismo, se calculó el zeta-score para comparar los resultados de óxido de linalol (en I_{MULTI} y T_{MULTI}), linalol (en I_{MULTI} y M_{MULTI}) y de α -terpineol (en I_{MULTI} y M_{MULTI}) con aquellos resultados que se obtuvieron con la estrategia de referencia.

5.7.3 Cálculo de concentración C_m

Para ambas estrategias el cálculo de concentración de la muestra (C_m) en la adición estándar con estándar interno de un solo punto se expresa por la siguiente ecuación:

$$C_m = \left(\frac{\left(\frac{TIC}{TIC_{is}} \right)_{MSA}}{\left(\frac{TIC}{TIC_{is}} \right)_{MCA} \left(\frac{C_{isMCA}}{C_{isMSA}} \right) - \left(\frac{TIC}{TIC_{is}} \right)_{MSA}} \right) C_{std} \left(\frac{V_{std}}{V_m} \right) \quad \dots\dots \text{Ecuación 15}$$

donde:

$(TIC / TIC_{is})_{MSA}$: Cociente entre el área TIC del terpeno a determinar y el área TIC de su estándar interno en la mezcla sin adición (MSA)

$(TIC / TIC_{is})_{MCA}$: Cociente entre el área TIC del terpeno a determinar y el área TIC de su estándar interno en la mezcla con adición (MCA)

C_{isMSA} : Concentración del estándar interno en la mezcla sin adición (MSA)

C_{isMCA} : Concentración del estándar interno en la mezcla con adición (MCA)

C_{std} : Concentración del terpeno en la solución estándar

V_{std} : Volumen de la solución estándar

V_m : Volumen de la muestra

Como $C_{isMSA} = C_{isMCA}$, el cálculo de la concentración puede ser expresado por la siguiente ecuación:

$$C_m = \left(\frac{\left(\frac{TIC}{TIC_{is}} \right)_{MSA}}{\left(\frac{TIC}{TIC_{is}} \right)_{MCA} - \left(\frac{TIC}{TIC_{is}} \right)_{MSA}} \right) C_{std} \left(\frac{V_{std}}{V_m} \right) \quad \dots\dots\dots \text{Ecuación 16}$$

Para este trabajo se denota como Q_{MSA} y Q_{MCA} a los cocientes de área TIC del terpeno a determinar y el área TIC de su estándar interno en la mezcla sin adición y en la mezcla con adición, respectivamente. De esta manera la Ecuación 16 aparece como:

$$C_m = \left(\frac{Q_{MSA}}{Q_{MCA} - Q_{MSA}} \right) C_{std} \left(\frac{V_{std}}{V_m} \right) \quad \dots\dots\dots \text{Ecuación 17}$$

Esta ecuación puede ser expresada también de la siguiente manera:

$$C_m = \left(\frac{1}{\frac{Q_{MCA}}{Q_{MSA}} - 1} \right) C_{std} \left(\frac{V_{std}}{V_m} \right) \quad \dots\dots\dots \text{Ecuación 18}$$

Es útil finalmente realizar un cambio de variable reemplazando a Q_{MCA}/Q_{MSA} por la variable Q_R (cociente reducido). La ecuación para el cálculo de C_m , concentración del terpeno en la muestra, es entonces dependiente de 4 variables y se expresa de la siguiente manera:

$$C_m = \left(\frac{1}{Q_R - 1} \right) C_{std} \left(\frac{V_{std}}{V_m} \right) \quad \dots\dots\dots \text{Ecuación 19}$$

La concentración del estándar C_{std} se obtuvo por el cálculo de diluciones a partir de un terpeno puro. La ecuación para el cálculo de la concentración final de las diluciones es:

$$C_{std} = \left(\frac{m.P}{V_0}\right) \left(\frac{V_{i1}}{V_{f1}}\right) \left(\frac{V_{i2}}{V_{f2}}\right) \dots\dots\dots \text{Ecuación 20}$$

donde:

m es la masa de terpeno puro para la preparación de la solución stock de partida

P es la pureza del terpeno utilizado para preparar la solución de partida

V_0 es el volumen de la solución stock de partida.

V_{i1} y V_{f1} son los volúmenes para la preparación de la primera dilución a partir de la solución stock de partida.

V_{i2} y V_{f2} son los volúmenes para la preparación de la segunda dilución a partir de la primera dilución.

Para el caso del óxido de linalol se requirió una tercera dilución incluyendo en la Ecuación 20 los volúmenes V_{i3} y V_{f3} .

5.7.4 Estimación de incertidumbre de medición

5.7.4.1 Identificación de las fuentes de incertidumbre

En la Figura 5 se observa las fuentes de incertidumbre identificadas a partir de la Ecuación 19:

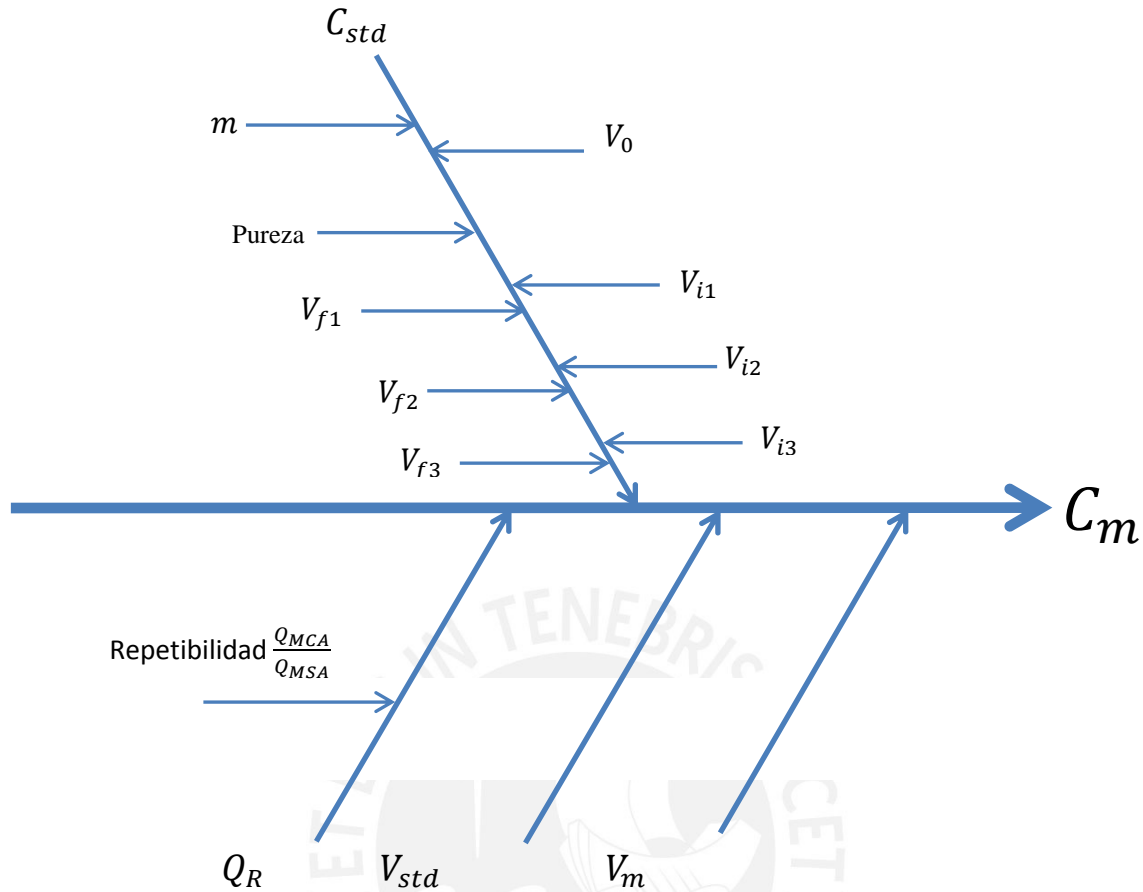


Fig. 5. Diagrama de causa y efecto

5.7.4.2 Estimación de la componente de incertidumbre para el cociente reducido

Para la estrategia de referencia

La incertidumbre estándar para cada cociente reducido en la estrategia de referencia se calculó como la desviación estándar (DE) de los cocientes reducidos obtenidos para 2 réplicas, cada una procesada para 2 estándares internos naturales de referencia, contándose con 4 resultados para el cálculo de la desviación estándar. Los cocientes reducidos para el primer estándar interno natural de referencia se identifican como Q_{R1a} y Q_{R2a} para la primera y segunda réplica, respectivamente. De manera semejante los cocientes reducidos para el segundo estándar interno natural de referencia se identifican como Q_{R1b} y Q_{R2b} para la primera y segunda réplica, respectivamente. De

esta manera, la desviación estándar $DE(Q_R)$ se obtuvo a partir de los valores de Q_{R1a} , Q_{R2a} , Q_{R1b} y Q_{R2b} . Para obtener la incertidumbre estándar se calculó la desviación estándar de la media. Para ello se dividió la desviación estándar entre $\sqrt{4}$ de acuerdo a:

$$u_c(Q_R) = \left(\frac{DE(Q_R)}{\sqrt{4}} \right) \dots\dots\dots \text{Ecuación 21}$$

Para la estrategia simplificada

Por otro lado, la incertidumbre estándar para cada cociente reducido en la estrategia simplificada se calculó a partir de una desviación estándar relativa agrupada (DERA) de los cocientes reducidos Q_{RI} (2 réplicas) para la muestra I_{MULTI} ; Q_{RT} (2 réplicas) para la muestra T_{MULTI} ; y Q_{RM} (2 réplicas) para la muestra M_{MULTI} :

$$DERA(Q_R) = \sqrt{\frac{(DER(Q_{RI}))^2 + (DER(Q_{RT}))^2 + (DER(Q_{RM}))^2}{3}} \dots\dots \text{Ecuación 22}$$

A partir de este valor se calculó la desviación estándar agrupada DEA multiplicando por el respectivo cociente reducido de acuerdo a la Ecuación 23. Tomando como ejemplo el cálculo de desviación estándar agrupada para la muestra Italia se tiene:

$$DEA(Q_{RI}) = Q_{RI} \cdot DERA(Q_R) \dots\dots\dots \text{Ecuación 23}$$

La desviación estándar agrupada sirve para obtener la incertidumbre estándar del cociente reducido (tomando como ejemplo la muestra Italia) de acuerdo a:

$$u_c(Q_{RI}) = \left(\frac{DEA(Q_{RI})}{\sqrt{2}} \right) \dots\dots\dots \text{Ecuación 24}$$

5.7.4.3 Estimación de la componente de incertidumbre para la concentración del estándar

Se estimaron primero las incertidumbres de cada una de las variables de la Ecuación 20. Luego se combinaron todas las incertidumbres estimadas.

Incertidumbre estándar de la masa

La incertidumbre estándar de la masa se calculó combinando la componente de incertidumbre correspondiente a la linealidad de la balanza utilizada y la componente de incertidumbre correspondiente a la repetibilidad de la balanza utilizada. La componente correspondiente a la linealidad se tuvo en cuenta dos veces debido a que se ejecuta dos veces la pesada (masa final menos masa inicial).

$$u(m) = \sqrt{(u_{linealidad})^2 + (u_{linealidad})^2 + (u_{rep_masa})^2} \dots \text{Ecuación 25}$$

La componente de incertidumbre correspondiente a la linealidad de la balanza utilizada se calculó como:

$$u_{linealidad} = \frac{\text{Valor de linealidad dado por el fabricante}}{\sqrt{3}} \dots \text{Ecuación 26}$$

El valor de linealidad para la Ecuación 26 se obtuvo del manual de la balanza. Por otro lado, para la incertidumbre estándar de repetibilidad de la masa u_{rep_masa} indicada en la Ecuación 25 se utilizó directamente el dato indicado por el fabricante de acuerdo a lo indicado en la Ecuación 4.

Incertidumbre estándar de la pureza de terpeno de partida

La incertidumbre estándar de la pureza del terpeno de partida se obtuvo utilizando la Ecuación 2:

$$u_{pureza} = \frac{(\text{Rango de especificación de pureza})/2}{\sqrt{3}} \dots \text{Ecuación 27}$$

El rango de especificación de pureza se puede obtener a partir de la especificación de pureza dada por el proveedor. Por ejemplo, si la especificación de pureza es $\geq 98\%$,

entonces el rango de especificación de pureza es 2 % que también puede ser expresado como 0,02.

Incertidumbre estándar de los volúmenes V_0 , V_{f1} y V_{f2}

De acuerdo a lo indicado en [31], la incertidumbre estándar de volumen contenido de cada matraz volumétrico (fiola) se calculó combinando la componente de incertidumbre correspondiente al error máximo permisible (EMP) de la fiola utilizada y la componente de incertidumbre correspondiente a la variabilidad de la temperatura del laboratorio.

$$u(V) = \sqrt{(u_{EMP})^2 + (u_{temp})^2} \dots\dots\dots \text{Ecuación 28}$$

La componente de incertidumbre correspondiente al error máximo permisible (EMP) de la fiola se calculó como:

$$u_{EMP} = \frac{EMP}{\sqrt{3}} \dots\dots\dots \text{Ecuación 29}$$

La incertidumbre estándar debido al margen de variación de la temperatura en el laboratorio se obtuvo con la fórmula:

$$u_{temp} = \frac{(V_{fiola})(\text{margen de temperatura})(2,1 \cdot 10^{-4})}{\sqrt{3}} \dots\dots \text{Ecuación 30}$$

donde V_{fiola} es el volumen de la fiola utilizada y se ha utilizado un coeficiente de expansión de volumen de agua de $2,1 \cdot 10^{-4} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$

Incertidumbre estándar de los volúmenes V_{i1} y V_{i2}

La incertidumbre estándar de cada volumen dispensado por la pipeta automática se calculó combinando la componente de incertidumbre correspondiente a la calibración de volumen de la pipeta automática utilizada y la componente de incertidumbre correspondiente a la repetibilidad de volumen de la pipeta automática utilizada.

$$u(V) = \sqrt{(u_{calib})^2 + (u_{repet})^2} \dots\dots\dots\text{Ecuación 31}$$

La componente de incertidumbre debido a la calibración u_{calib} se calculó como:

$$u_{calib} = \frac{\text{Exactitud declarada por el fabricante}}{\sqrt{3}} \dots\dots\dots\text{Ecuación 32}$$

La componente de incertidumbre debido a la repetibilidad u_{repet} se tomó directamente a partir del dato de precisión declarado por el fabricante, es decir:

$$u_{repet} = \text{Precisión declarada por el fabricante} \dots\dots\dots\text{Ecuación 33}$$

Incertidumbre estándar combinada de C_{std}

La incertidumbre estándar relativa de la concentración del estándar de adición C_{std} se calculó combinando las componentes obtenidas anteriormente:

$$\frac{u(C_{std})}{C_{std}} = \sqrt{\left[\frac{u(m)}{m}\right]^2 + \left[\frac{u(P)}{P}\right]^2 + \left[\frac{u(V_0)}{V_0}\right]^2 + \left[\frac{u(V_{i1})}{V_{i1}}\right]^2 + \left[\frac{u(V_{f1})}{V_{f1}}\right]^2 + \left[\frac{u(V_{i2})}{V_{i2}}\right]^2 + \left[\frac{u(V_{f2})}{V_{f2}}\right]^2} \dots\dots\text{Ec. 34}$$

Para el caso del óxido de linalol se realizó una tercera dilución agregándose a la Ecuación 34 las componentes correspondientes a V_{i3} y V_{f3} .

5.7.4.4 Estimación de la componente de incertidumbre para el volumen del estándar y el volumen de la muestra

La incertidumbre estándar del volumen del estándar o del volumen de muestra (dispensados por la pipeta automática) se calculó combinando la componente de incertidumbre correspondiente a la calibración de volumen de la pipeta automática utilizada y la componente de incertidumbre correspondiente a la repetibilidad de volumen de la pipeta automática utilizada. Para el cálculo de esta incertidumbre estándar se utilizó las Ecuaciones 31, 32 y 33 indicadas anteriormente.

5.7.4.5 Estimación de la incertidumbre estándar combinada de C_m

La ecuación de la incertidumbre estándar combinada de C_m se puede deducir utilizando la regla indicada en las Ecuaciones 10 y 11 obteniéndose lo siguiente:

$$u_{relativa}(C_m) = \frac{u(C_m)}{C_m} = \sqrt{\left[\frac{u(Q_R - 1)}{Q_R - 1}\right]^2 + \left[\frac{u(C_{std})}{C_{std}}\right]^2 + \left[\frac{u(V_{std})}{V_{std}}\right]^2 + \left[\frac{u(V_m)}{V_m}\right]^2}$$

..... Ecuación 35

$$u(C_m) = C_m \cdot u_{relativa}(C_m) \quad \text{..... Ecuación 36}$$

5.7.4.6 Estimación de la incertidumbre expandida de C_m

De acuerdo a la Ecuación 12, la incertidumbre expandida de C_m para un factor de cobertura de $k = 2$ se obtuvo como:

$$U(C_m) = 2 \cdot u_c(C_m) \quad \text{..... Ecuación 37}$$

De acuerdo a la Ecuación 13, la incertidumbre expandida relativa de C_m es:

$$U_{relativa}(C_m) = 2 \cdot u_{relativa}(C_m) \quad \text{..... Ecuación 38}$$

5.7.5 Selección del mejor estándar interno natural candidato

En base a todos los resultados obtenidos de incertidumbre de medición se seleccionó el mejor estándar interno natural que corresponde a los menores valores de incertidumbre.

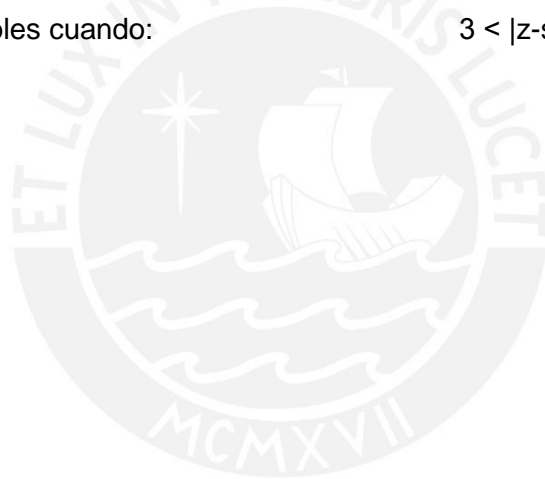
5.7.6 Evaluación de resultados obtenidos por la estrategia simplificada en comparación con la estrategia de referencia

Los resultados de ambas estrategias se compararon calculando el zeta-score indicado en la Ecuación 14 de acuerdo a:

$$zeta - score = \frac{C_m - C_{mREF}}{\sqrt{u(C_m)^2 + u(C_{mREF})^2}} \quad \dots\dots\dots \text{Ecuación 39}$$

Se considera que los resultados de ambas estrategias:

- son comparables cuando: $|z\text{-score}| \leq 2$.
- tienen riesgo de ser no comparables cuando: $2 < |z\text{-score}| \leq 3$
- no son comparables cuando: $3 < |z\text{-score}|$



6. PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

6.1 Preparación de soluciones para adición estándar

La Tabla 4 muestra los niveles de concentración obtenidos en las diferentes soluciones stock y las tres soluciones de adición preparadas para cada terpeno medido.

Tabla 4. Concentraciones en masa de las soluciones preparadas a partir de terpenos puros

Terpeno	Solución stock 1 (mg/l)	Solución stock 2 (mg/l)	Solución stock 3 (mg/l)	Solución de adición 1 (mg/l)	Solución de adición 2 (mg/l)	Solución de adición 3 (mg/l)
Oxido de linalol	8996	360	36,0	1,71	3,42	5,13
Linalol	8591	344	---	6,01	12,03	18,04
α -terpineol	2156	86	---	3,88	7,76	11,64

6.2 Identificación de compuestos

En las mediciones por adición estándar, siempre se analiza la mezcla sin adición (MSA) y su mezcla con adición (MCA) respectiva. Si comparamos los tiempos de retención de los cromatogramas obtenidos para ambas mezclas se puede identificar directamente a los analitos en estudio. La Tabla 5 muestra los tiempos de retención de los terpenos en estudio en las mezclas (con adición y sin adición) preparadas para cada una de las determinaciones por adición estándar.

Tabla 5. Comparación de tiempos de retención para mezcla sin adición y mezcla con adición¹

Compuesto	Italia sin adición	Italia con adición	Moscatel sin adición	Moscatel con adición	Torontel sin adición	Torontel con adición
Acetato de isoamilo	6,73	6,73	6,73	6,73	6,73	6,73
Hexanoato de etilo	9,31	9,31	9,30	9,30	9,31	9,31
Óxido de linalol	10,79	10,72	---	---	10,75	10,71
Linalol	11,13	11,17	11,11	11,16	---	---
Hotrienol	11,21	11,22	---	---	11,20	11,20
Óxido de nerol	12,01	12,00	12,02	12,02	11,99	11,99
α -terpineol	12,60	12,62	12,61	12,61	---	---
Decanoato de etilo	15,43	15,42	15,42	15,41	15,42	15,42

¹ Los valores indicados se obtuvieron del promedio de 2 réplicas

Por otro lado, la Tabla 6 muestra la identificación utilizando la base de datos de espectros de masas NIST 2011. Para ello se comparan los patrones de fragmentación de los espectros de masas. También se comparan los índices de retención lineales (IRL) obtenidos por inyección de un estándar de alcanos (C₈-C₂₀) y valores de IRL obtenidos de fuentes bibliográficas.

Tabla 6. Identificación de compuestos

Compuesto	Tiempo de retención (minutos)	IRL ¹ (calc./teor.)	NIST ² (Match/R.Match)	Pureza según AMDIS
Acetato de isoamilo	6,73	871 / 860	951 / 958	96
Hexanoato de etilo	9,31	983 / 980	951 / 959	96
Óxido de linalol	10,75	1059 / 1075	886 / 918	77
Linalol	11,13	1080 / 1099	962 / 963	94
Hotrienol	11,21	1084 / 1101	892 / 947	78
Óxido de nerol	12,01	1133 / 1155	904 / 945	81
α-terpineol	12,61	1174 / 1189	937 / 941	91
Decanoato de etilo	15,42	1380 / 1367	937 / 937	93

¹ Índice de retención lineal calculado versus teórico

² Probabilidad de coincidencia según librería NIST

6.3 Resultados de linealidad con muestra de Pisco Quebranta

En la Tabla 7 se muestran las áreas TIC obtenidas para los análisis de una muestra de Pisco Quebranta sin adición y con 3 niveles de concentración adicionados.

Tabla 7. Áreas TIC de terpenos y estándares internos naturales candidatos para la adición múltiple en la muestra de Pisco Quebranta^(*)

Compuesto	Iones	Área TIC Sin adición	Área TIC Adición 1	Área TIC Adición 2	Área TIC Adición 3
Oxido de linalol	---	---	14782443 (4)	30784124 (11)	45073123 (5)
Oxido de linalol	43, 59	425629 (26)	3906651(2)	7720044 (6)	11276293 (7)
Linalol	---	---	245786922 (9)	534094649 (2)	744255904 (3)
α-terpineol	93	330567 (0,3)	12188403 (3)	27935595 (4)	40108842 (3)
Acetato de isoamilo	---	60376617 (20)	65367078 (15)	67578878 (6)	60395653 (13)
Hexanoato de etilo	---	177408012 (39)	146652120 (10)	168483729 (19)	134894185 (43)
Decanoato de etilo	---	961334127 (6)	940922682 (7)	994306979 (27)	879473749 (29)

(*) Valores de TIC son promedio de 2 réplicas. Valores entre paréntesis son desviaciones estándar relativas.

6.3.1 Uso de acetato de isoamilo como estándar interno natural

En la Tabla 8 se muestran los cocientes obtenidos al dividir las áreas TIC de los terpenos entre el área TIC del acetato de isoamilo para la mezcla sin adición y las mezclas de los 3 niveles de adición. También se muestran las concentraciones en mg/l para cada uno de los 3 niveles de adición. En la última columna se muestra el valor de R^2 obtenido para cada curva.

Tabla 8. Datos para las curvas de adición con acetato de isoamilo como estándar interno natural (*)

Terpeno	Iones	Q ₀	C ₁ (mg/l)	Q ₁	C ₂ (mg/l)	Q ₂	C ₃ (mg/l)	Q ₃	R ²
Óxido de linalol	---	---	1,71	0,226	3,42	0,456	5,13	0,746	0,996
Óxido de linalol	43, 59	0,007	1,71	0,060	3,42	0,114	5,13	0,187	0,994
Linalol	---	---	6,01	3,760	12,03	7,903	18,04	12,323	0,999
α-terpineol	93	0,005	3,88	0,186	7,76	0,413	11,64	0,664	0,995

(*) C₁, C₂ y C₃ denotan concentraciones. Q₀, Q₁, Q₂ y Q₃ denotan cocientes de áreas TIC

A continuación (Figuras 6 a 8) se muestran las curvas de adición obtenidas para cada terpeno utilizando acetato de isoamilo como estándar interno natural. Se observa que el requisito de R^2 mayor o igual a 0,99 se cumple en todos los casos.

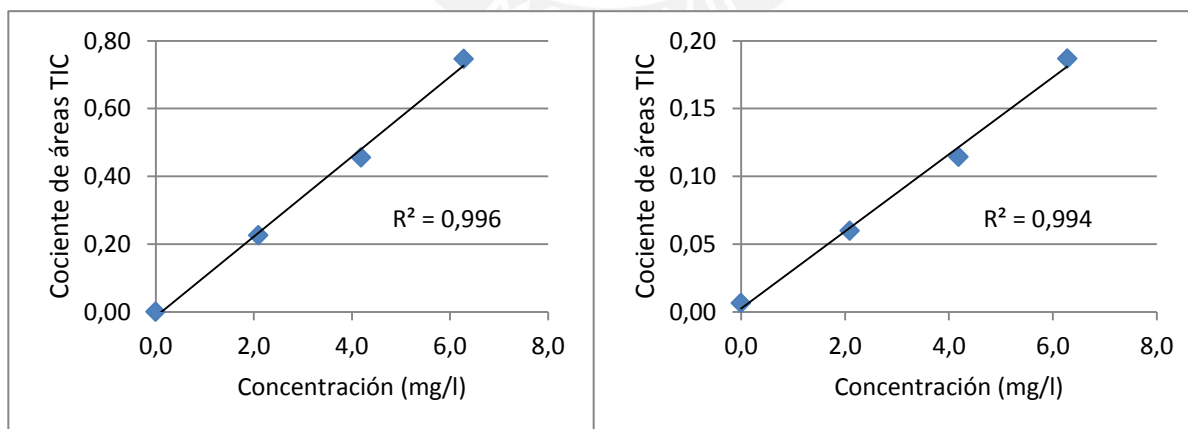


Fig. 6. Curvas para óxido de linalol utilizando acetato de isoamilo como estándar interno natural. Óxido de linalol adquirido en modo SCAN (izquierda) y en modo SIM con iones 43 y 59 (derecha)

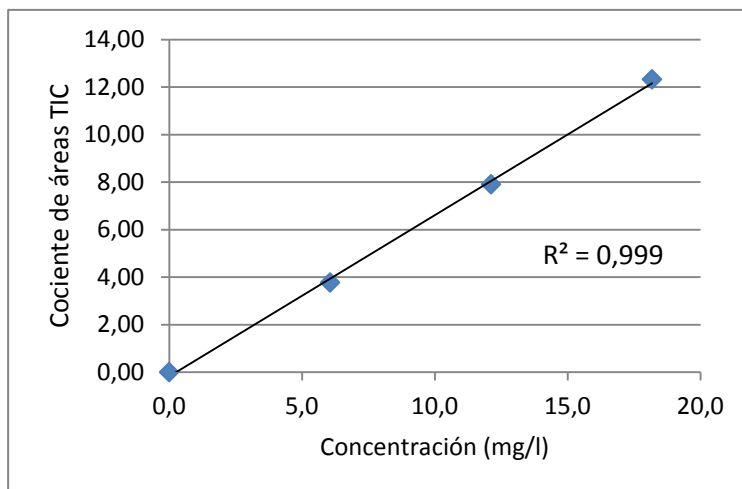


Fig. 7. Curvas para linalol utilizando acetato de isoamilo como estándar interno natural. Linalol adquirido en modo SCAN.

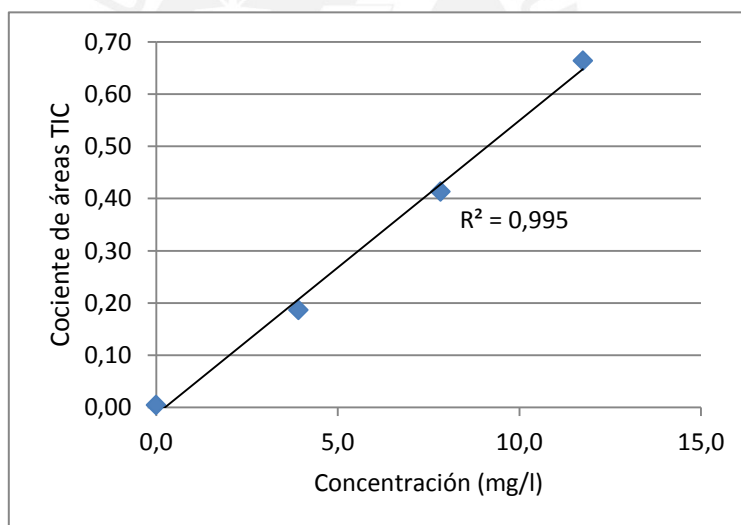


Fig. 8. Curva para α -terpineol utilizando acetato de isoamilo como estándar interno natural. α -terpineol adquirido en modo SIM con ión 93

6.3.2 Uso de hexanoato de etilo como estándar interno natural

En la Tabla 9 se muestran los cocientes obtenidos al dividir las áreas TIC de los terpenos entre el área TIC del hexanoato de etilo para la mezcla sin adición y las mezclas de los 3 niveles de adición. También se muestran las concentraciones en mg/l para cada uno de los 3 niveles de adición. En la última columna se muestra el valor de R^2 obtenido para cada curva.

Tabla 9. Datos para las curvas de adición con hexanoato de etilo como estándar interno natural (*)

	Iones	Q ₀	C ₁ (mg/l)	Q ₁	C ₂ (mg/l)	Q ₂	C ₃ (mg/l)	Q ₃	R ²
Óxido de linalol	---	---	1,71	0,101	3,42	0,183	5,13	0,334	0,983
Óxido de linalol	43, 59	0,002	1,71	0,027	3,42	0,046	5,13	0,084	0,978
Linalol	---	---	6,01	1,676	12,03	3,170	18,04	5,517	0,990
α-terpineol	93	0,002	3,88	0,083	7,76	0,166	11,64	0,297	0,984

(*) C₁, C₂ y C₃ denotan concentraciones. Q₀, Q₁, Q₂ y Q₃ denotan cocientes de áreas TIC

A continuación (Figuras 9 a 11) se muestran las curvas de adición obtenidas para cada terpeno utilizando hexanoato de etilo como estándar interno natural. Se observa que el requisito de R^2 mayor o igual a 0,99 no se cumple. Se presentaron valores de R^2 a partir de 0,978.

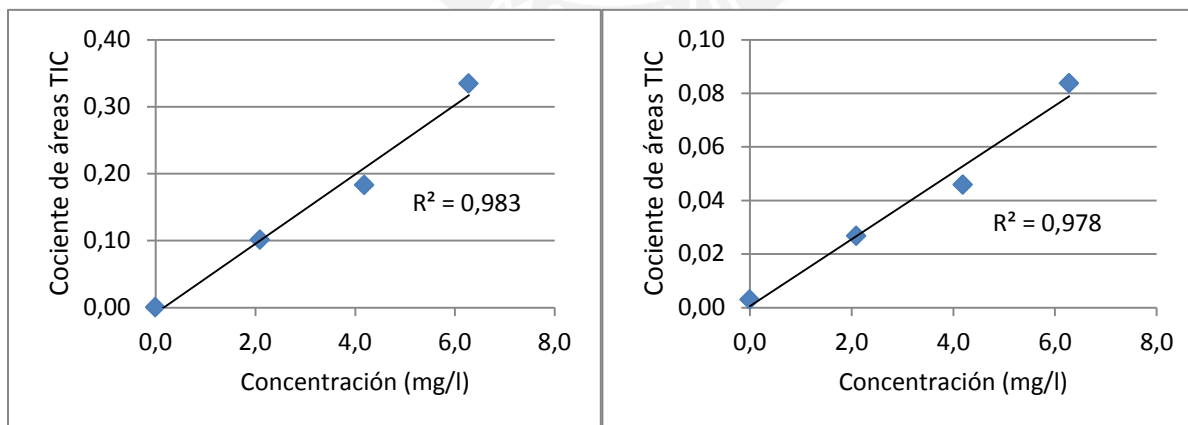


Fig. 9. Curvas para óxido de linalol utilizando hexanoato de etilo como estándar interno natural. Óxido de linalol adquirido en modo SCAN (izquierda) y en modo SIM con iones 43 y 59 (derecha)

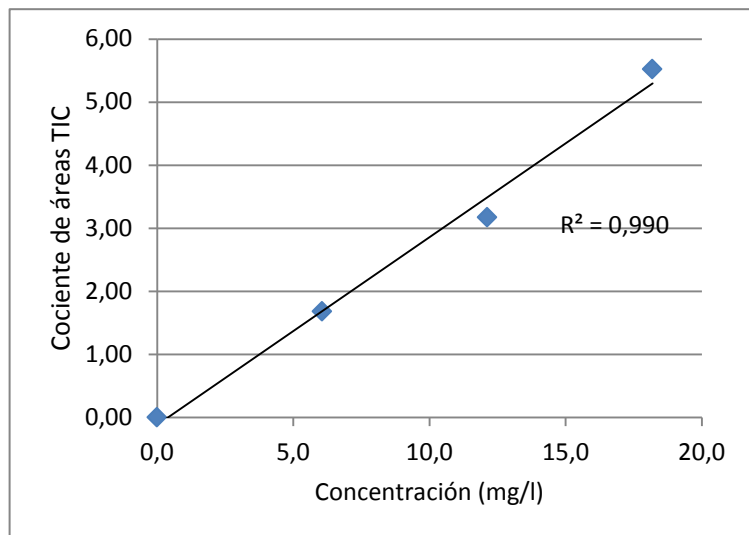


Fig. 10. Curvas para linalol utilizando hexanoato de etilo como estándar interno natural. Linalol adquirido en modo SCAN.

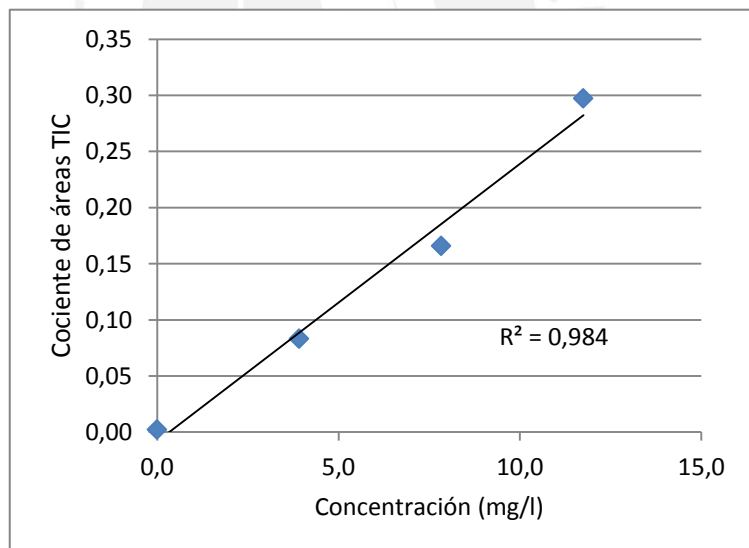


Fig. 11. Curva para α -terpineol utilizando hexanoato de etilo como estándar interno natural. α -terpineol adquirido en modo SIM con ión 93

6.3.3 Uso de decanoato de etilo como estándar interno natural

En la Tabla 10 se muestran los cocientes obtenidos al dividir las áreas TIC de los terpenos entre el área TIC del decanoato de etilo para la mezcla sin adición y las mezclas de los 3 niveles de adición. También se muestran las concentraciones en mg/l para cada uno de los 3 niveles de adición. En la última columna se muestra el valor de R^2 obtenido para cada curva.

Tabla 10. Datos para las curvas de adición con decanoato de etilo como estándar interno natural (*)

Compuesto	Iones	Q ₀	C ₁ (mg/l)	Q ₁	C ₂ (mg/l)	Q ₂	C ₃ (mg/l)	Q ₃	R ²
Óxido de linalol	---	---	1,71	0,0157	3,42	0,0310	5,13	0,0513	0,995
Óxido de linalol	43, 59	0,0004	1,71	0,0042	3,42	0,0078	5,13	0,0128	0,993
Linalol	---	---	6,01	0,2612	12,03	0,5372	18,04	0,8463	0,999
α-terpineol	93	0,0003	3,88	0,0130	7,76	0,0281	11,64	0,0456	0,995

(*) C₁, C₂ y C₃ denotan concentraciones. Q₀, Q₁, Q₂ y Q₃ denotan cocientes de áreas TIC

A continuación (Figuras 12 a 14) se muestran las curvas de adición obtenidas para cada terpeno utilizando decanoato de etilo como estándar interno natural. Se observa que el requisito de R^2 mayor o igual a 0,99 se cumple en todos los casos.

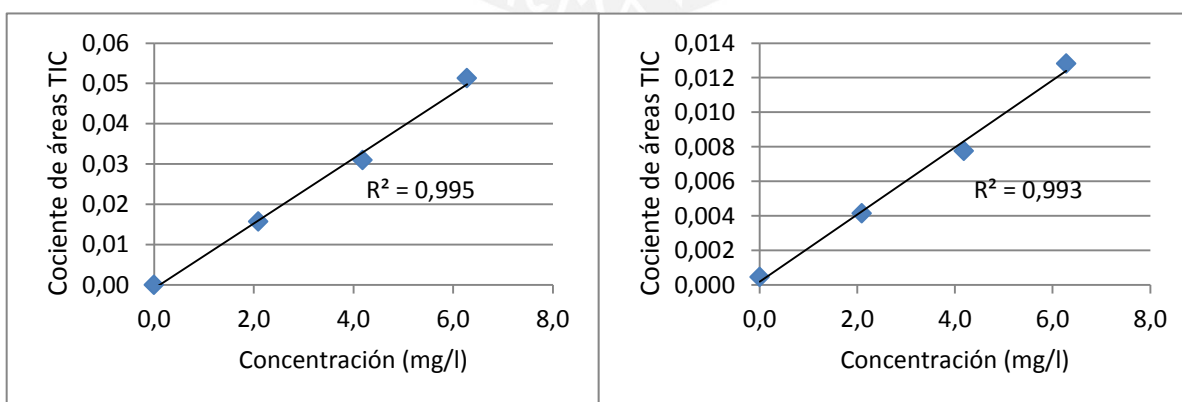


Fig. 12. Curvas para óxido de linalol utilizando decanoato de etilo como estándar interno natural. Óxido de linalol adquirido en modo SCAN (izquierda) y en modo SIM con iones 43 y 59 (derecha)

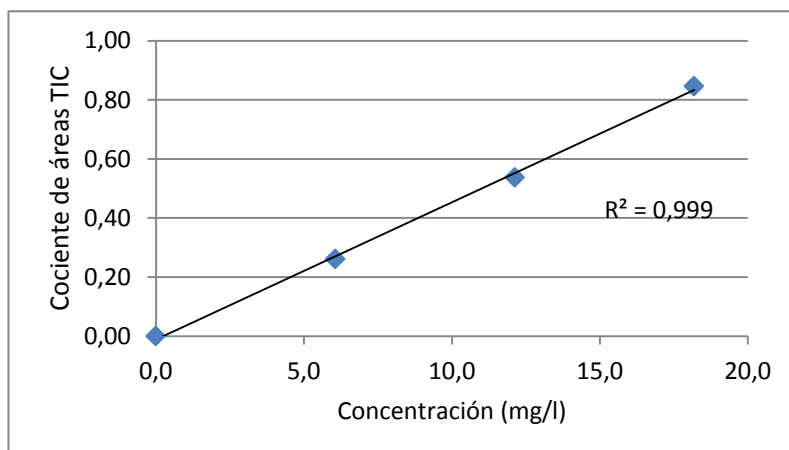


Fig. 13. Curvas para linalol utilizando decanoato de etilo como estándar interno natural. Linalol adquirido en modo SCAN.

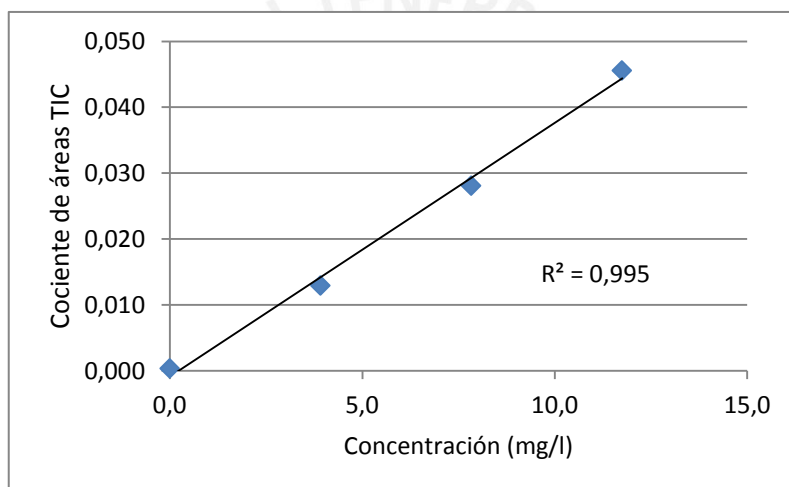


Fig. 14. Curva para α -terpineol utilizando decanoato de etilo como estándar interno natural. α -terpineol adquirido en modo SIM con ión 93

6.4 Cuantificación utilizando la estrategia de referencia

A continuación se muestran los resultados obtenidos con la estrategia de referencia.

6.4.1 Áreas TIC de compuestos (terpenos y estándares internos naturales de referencia)

En las Tablas 11, 12 y 13 se muestran las áreas TIC de terpenos y de estándares internos naturales de referencia para las adiciones individuales de óxido de linalol (en

muestras I_{OXL} y T_{OXL}), linalol (en muestras I_{LIN} y M_{LIN}) y α -terpineol (en muestras I_{TER} y M_{TER}) respectivamente. Para la adición en cada muestra la secuencia de medición fue MSA1, MCA1, MSA2 y MCA2. Los estándares internos naturales de referencia utilizados fueron linalol y hotrienol (para la medición de óxido de linalol); hotrienol, óxido de nerol y α -terpineol (para la medición de linalol); linalol, hotrienol y óxido de nerol (para la medición de α -terpineol).

Tabla 11. Áreas TIC de óxido de linalol y estándares internos naturales de referencia para adición individual de óxido de linalol en las muestras I_{OXL} y T_{OXL}

Muestra	Iones	Compuesto	Área TIC (MSA1)	Área TIC (MCA1)	Área TIC (MSA2)	Área TIC (MCA2)
I_{OXL}	43, 59	Óxido de linalol	2764623	10441153	3248156	9271332
I_{OXL}	43, 59	Linalol	28380027	28847480	25050095	24549141
I_{OXL}	43, 59	Hotrienol	11704077	12795310	11453418	10567099
T_{OXL}	43, 59	Óxido de linalol	7286483	11687348	6718388	13895977
T_{OXL}	43, 59	Linalol	36471129	31604015	28818564	27759053
T_{OXL}	43, 59	Hotrienol	20201679	18798994	17441552	18531778

Tabla 12. Áreas TIC de linalol y estándares internos naturales de referencia para adición individual de linalol en las muestras I_{LIN} y M_{LIN}

Muestra	Iones	Compuesto	Área TIC (MSA1)	Área TIC (MCA1)	Área TIC (MSA2)	Área TIC (MCA2)
I_{LIN}	---	Linalol	378923123	1011602045	428770253	901458160
I_{LIN}	---	Hotrienol	105959889	104429513	119753646	107103842
I_{LIN}	---	Óxido de nerol	86243975	76419785	93617183	82510018
M_{LIN}	93	Linalol	22179406	103513697	22304747	99736830
M_{LIN}	---	Óxido de nerol	20373906	19368894	21180660	16326222
M_{LIN}	93	α -terpineol	4909984	4500053	5840753	4037419

Tabla 13. Áreas TIC de α -terpineol y estándares internos naturales de referencia para adición individual de α -terpineol en las muestras I_{TER} y M_{TER}

Muestra	Iones	Compuesto	Área TIC (MSA1)	Área TIC (MCA1)	Área TIC (MSA2)	Área TIC (MCA2)
I_{TER}	93	α -terpineol	19717302	49789742	16855211	51514939
I_{TER}	93	Linalol	66442892	59312229	61281015	55036017
I_{TER}	---	Hotrienol	126787257	122439661	108365177	116609201
M_{TER}	93	α -terpineol	6687541	41672542	6484195	44974964
M_{TER}	93	Linalol	25787301	22331699	25552362	23191029
M_{TER}	---	Óxido de nerol	25466742	23705178	23656464	18946944

6.4.2 Componente de incertidumbre para el cociente reducido

En la Tabla 14 se muestran los valores de los cocientes reducidos correspondientes al primer estándar interno natural de referencia (Q_{R1a} y Q_{R2a}) y al segundo estándar interno natural de referencia (Q_{R1b} y Q_{R2b}) que se obtuvieron para las adiciones individuales de óxido de linalol (en muestras I_{OXL} y T_{OXL}), linalol (en muestras I_{LIN} y M_{LIN}) y α -terpineol (en muestras I_{TER} y M_{TER}) respectivamente. Cada cociente reducido se calcula como Q_{MCA}/Q_{MSA} , donde Q_{MSA} y Q_{MCA} corresponden a los cocientes de área TIC del terpeno a determinar y del área TIC de su estándar interno en la mezcla sin adición (MSA) y en la mezcla con adición (MCA), respectivamente.

Tabla 14. Cocientes reducidos calculados para ambos estándares internos naturales de referencia

Terpeno medido	Muestra	1er estándar interno natural de referencia	Q_{R1a}	Q_{R2a}	2do estándar interno natural de referencia	Q_{R1b}	Q_{R2b}
Óxido de linalol	I_{OXL}	Linalol	3,716	2,913	Hotrienol	3,455	3,094
Óxido de linalol	T_{OXL}	Linalol	1,851	2,147	Hotrienol	1,724	1,947
Linalol	I_{LIN}	Hotrienol	2,709	2,351	Óxido de nerol	3,013	2,385
Linalol	M_{LIN}	Óxido de nerol	4,909	5,801	α -terpineol	5,092	6,469
α -terpineol	I_{TER}	Linalol	2,829	3,403	Hotrienol	2,615	2,840
α -terpineol	M_{TER}	Linalol	7,196	7,642	Óxido de nerol	6,694	8,660

En la Tabla 15 se muestran el promedio Q_R y la desviación estándar $DE(Q_R)$ obtenidos a partir de los valores de los cocientes reducidos Q_{R1a} , Q_{R2a} , Q_{R1b} y Q_{R2b} . La incertidumbre estándar $u(Q_R)$ se calcula (según Ecuación 1) dividiendo la desviación estándar entre $\sqrt{4}$. La última columna de la Tabla muestra la incertidumbre estándar relativa de $(Q_R - 1)$ que se obtiene de acuerdo a la Ecuación 9. Para este cálculo se debe tener en cuenta que $u(Q_R - 1) = u(Q_R)$.

Tabla 15. Cálculo de incertidumbre estándar relativa para cocientes reducidos

Terpeno medido	Muestra	Q_R	$DE(Q_R)$	$u(Q_R)$	$\frac{u(Q_R - 1)}{Q_R - 1}$
Óxido de linalol	I_{OXL}	3,294	0,360	0,180	0,078
Óxido de linalol	T_{OXL}	1,917	0,179	0,089	0,097
Linalol	I_{LIN}	2,614	0,311	0,155	0,096
Linalol	M_{LIN}	5,568	0,713	0,357	0,078
α -terpineol	I_{TER}	2,922	0,337	0,169	0,088
α -terpineol	M_{TER}	7,548	0,836	0,418	0,064

¹DE: Desviación estándar

6.4.3 Componente de incertidumbre para la concentración del estándar adicionado a la muestra

A continuación se estima la componente de incertidumbre para la concentración del estándar de linalol. Para los otros terpenos se calcula esta componente de forma similar. Los resultados de incertidumbre estándar relativa para la concentración del estándar de todos los terpenos se muestran más adelante en la Tabla 16.

6.4.3.1 Incertidumbre estándar de la masa del terpeno de partida

La masa del terpeno de partida se determina por diferencia de la masa final (23,2116 g) y la masa inicial (23,1250 g) obteniéndose un valor 0,0866 g .

El valor de linealidad obtenido del manual de la balanza es 0,0002 g . Utilizando este dato en la Ecuación 26 se obtiene una incertidumbre estándar de linealidad $u_{linealidad}$ de 0,00012 g .

El valor de repetibilidad (expresado como desviación estándar) obtenido del manual de la balanza es 0,0001 g. De acuerdo a la Ecuación 4 se obtiene una incertidumbre estándar de repetibilidad de la masa u_{rep_masa} de 0,0001 g .

La incertidumbre estándar de la masa se obtiene combinando las incertidumbres estándar de linealidad y de repetibilidad de acuerdo a lo indicado en la Ecuación 25:

$$u(m) = \sqrt{(0,00012)^2 + (0,00012)^2 + (0,0001)^2} = 0,00019 \text{ g}$$

6.4.3.2 Incertidumbre estándar de la pureza del terpeno de partida

La pureza declarada por el productor es 99,2 % también expresada como 0,992. La especificación de la pureza del linalol es $\geq 97 \%$. Entonces el rango de especificación de pureza es 3 % . Este valor también se expresa como 0,03. Utilizando este dato en la

Ecuación 27 se obtiene una incertidumbre estándar del terpeno de partida u_{pureza} de 0,0087 .

6.4.3.3 Incertidumbre estándar del volumen V_0

El volumen V_0 de la fiola es 10 mL. El error máximo permisible (EMP) grabado en la fiola es 0,04 mL. Utilizando este dato en la Ecuación 29 se obtiene una incertidumbre u_{EMP} de 0,0231 mL .

Se considera un margen de variación de la temperatura en el laboratorio de 5 °C . Utilizando la Ecuación 30 se obtiene:

$$u_{temp} = \frac{(10)(5)(2,1 \cdot 10^{-4})}{\sqrt{3}} = 0,0061 \text{ mL}$$

Se combinan las incertidumbres del error máximo permisible y de la temperatura utilizando la Ecuación 28 obteniéndose una incertidumbre estándar $u(V_0) = 0,0239$ mL.

6.4.3.4 Incertidumbre estándar del volumen V_{i1}

El volumen V_{i1} dispensado por la micropipeta es 0,4 mL. La exactitud declarada por el fabricante de la micropipeta para este volumen dispensado es 0,004 mL . Utilizando este dato en la Ecuación 32 se obtiene una incertidumbre debido a la calibración u_{calib} de 0,0023 mL .

La precisión declarada por el fabricante para un volumen dispensado de 0,4 mL es 0,001 mL . Utilizando este dato en la Ecuación 33 se obtiene una incertidumbre de la repetibilidad del volumen u_{repet} de 0,001 mL .

Se combinan las incertidumbres de calibración y de repetibilidad utilizando la Ecuación 31 obteniéndose una incertidumbre estándar $u(V_{i1}) = 0,0025$ mL

6.4.3.5 Incertidumbre estándar de los volúmenes V_{f1} y V_{f2}

Las incertidumbres estándar de los volúmenes V_{f1} y V_{f2} (ambos de 10 mL) se calculan igual que V_0 . De esta manera, el valor obtenido de incertidumbre para ambos volúmenes es 0,0239 mL.

6.4.3.6 Incertidumbre estándar del volumen V_{i2}

El volumen V_{i2} dispensado por la micropipeta es 0,35 mL. La exactitud declarada por el fabricante para este volumen dispensado es 0,004 mL. Utilizando este dato en la Ecuación 32 se obtiene una incertidumbre debido a la calibración u_{calib} de 0,0023 mL.

La precisión declarada por el fabricante para un volumen dispensado de 0,35 mL es 0,001 mL. Utilizando este dato en la Ecuación 33 se obtiene una incertidumbre de la repetibilidad del volumen u_{repet} de 0,001 mL.

Se combinan las incertidumbres de calibración y de repetibilidad utilizando la Ecuación 31 obteniéndose una incertidumbre estándar $u(V_{i2}) = 0,0025$ mL.

6.4.3.7 Combinación de incertidumbres para la concentración del estándar adicionado a la muestra

Utilizando la Ecuación 20 con los datos indicados en las etapas anteriores se obtiene un valor C_{std} de 12,03 mL. Para obtener la incertidumbre estándar relativa de C_{std} se utiliza la Ecuación 34 obteniéndose:

$$\frac{u(C_{std})}{C_{std}} = \sqrt{\left[\frac{0,0002}{0,0866}\right]^2 + \left[\frac{0,0087}{0,992}\right]^2 + \left[\frac{0,0239}{10}\right]^2 + \left[\frac{0,0025}{0,4}\right]^2 + \left[\frac{0,0239}{10}\right]^2 + \left[\frac{0,0025}{0,35}\right]^2 + \left[\frac{0,0239}{10}\right]^2}$$

$$\frac{u(C_{std})}{C_{std}} = 0,014$$

6.4.4 Componente de incertidumbre para el volumen del estándar adicionado a la muestra

El volumen V_{std} dispensado por la micropipeta es 0,25 mL . La exactitud declarada por el fabricante para este volumen dispensado es 0,004 mL . Utilizando este dato en la Ecuación 32 se obtiene una incertidumbre debido a la calibración u_{calib} de 0,0023 mL .

La precisión declarada por el fabricante para un volumen dispensado de 0,25 mL es 0,001 mL . Utilizando este dato en la Ecuación 33 se obtiene una incertidumbre de la repetibilidad del volumen u_{repet} de 0,001 mL .

Se combinan las incertidumbres de calibración y de repetibilidad utilizando la Ecuación 31 obteniéndose una incertidumbre estándar $u(V_{std}) = 0,0025$ mL . Dividiendo este valor entre V_{std} (de acuerdo a la Ecuación 9) se obtiene una incertidumbre estándar relativa de 0,010 mL .

6.4.5 Componente de incertidumbre para el volumen de la muestra

La incertidumbre estándar relativa del volumen de la muestra V_m (0,25 mL) se calcula de manera semejante a lo indicado para el volumen V_{std} . De esta manera, el valor obtenido para la incertidumbre estándar relativa del volumen de la muestra V_m es 0,010 mL .

6.4.6 Cálculo de C_{mREF} y su incertidumbre combinada

En la Tabla 16 se muestra el valor calculado de la concentración C_{mREF} , su incertidumbre estándar combinada y su incertidumbre expandida para las adiciones individuales de óxido de linalol en muestras I_{OXL} y T_{OXL} ; de linalol en muestras I_{LIN} y M_{LIN} ; y de α -terpineol en muestras I_{TER} y M_{TER} . Cada valor de C_{mREF} se obtuvo con la Ecuación 19. Se utilizó las Ecuaciones 35 y 36 para obtener la incertidumbre estándar combinada relativa $u_c(C_{mREF})/C_{mREF}$ y la incertidumbre estándar combinada $u_c(C_{mREF})$ por combinación de las incertidumbres relativas correspondientes a $(Q_{red} - 1)$, C_{std} , V_{std} , V_m . Estas últimas fueron obtenidas en 6.4.2, 6.4.3, 6.4.4 y 6.4.5. La Tabla 16 también muestra la incertidumbre estándar combinada relativa expresada en porcentaje. Esta última se

multiplicó por 2 para obtener la respectiva incertidumbre expandida relativa (según Ecuación 38).

Tabla 16. Cálculo de incertidumbre combinada y expandida para la estrategia de referencia

Terpeno y muestra medidos	C_{mREF} mg/l	$\frac{u(Q_R - 1)}{Q_R - 1}$	$\frac{u(C_{std})}{C_{std}}$	$\frac{u(V_{std})}{V_{std}}$	$\frac{u(V_m)}{V_m}$	$\frac{u(C_{mREF})}{C_{mREF}}$	$u(C_{mREF})$ mg/l	$u(C_{mREF})$ relativa %	$U(C_{mREF})$ relativa %
Óxido de linalol (I_{OXL})	1,490	0,078	0,016	0,010	0,010	0,081	0,121	8,1	16
Óxido de linalol (T_{OXL})	3,727	0,097	0,016	0,010	0,010	0,100	0,372	10,0	20
Linalol (I_{LIN})	7,450	0,096	0,014	0,010	0,010	0,098	0,732	9,8	20
Linalol (M_{LIN})	2,633	0,078	0,014	0,010	0,010	0,081	0,212	8,1	16
α -terpineol (I_{TER})	4,040	0,088	0,012	0,010	0,010	0,090	0,362	9,0	18
α -terpineol (M_{TER})	1,186	0,064	0,012	0,010	0,010	0,066	0,079	6,6	13

6.5 Cuantificación utilizando la estrategia simplificada

A continuación se muestran los resultados obtenidos con la estrategia simplificada.

6.5.1 Áreas TIC de compuestos (terpenos y estándares internos naturales candidatos)

En las Tablas 17, 18 y 19 se muestran las áreas TIC de terpenos y ésteres (estándares internos naturales candidatos) para la adición múltiple en las muestras I_{MULTI} , T_{MULTI} y M_{MULTI} respectivamente. La solución estándar para la adición múltiple incluyó óxido de linalol, linalol y α -terpineol. Para la adición en cada muestra la secuencia de medición fue MSA1, MCA1, MSA2 y MCA2. Los estándares internos naturales candidatos utilizados fueron acetato de isoamilo, hexanoato de etilo y decanoato de etilo.

Tabla 17. Áreas TIC de terpenos y de estándares internos naturales candidatos para la adición múltiple en la muestra I_{MULTI}

Compuesto	Iones	Área TIC (MSA1)	Área TIC (MCA1)	Área TIC (MSA2)	Área TIC (MCA2)
Óxido de linalol	---	14150579	53919892	17447995	46422579
Óxido de linalol	43, 59	3650001	13189292	4161706	11791825
Linalol	---	390496451	859409057	375685198	832655476
α -terpineol	93	17700732	50350116	17783186	46956882
Acetato de isoamilo	---	49945208	44447712	46256732	40200489
Hexanoato de etilo	---	85520666	59903834	70351144	77266156
Decanoato de etilo	---	858818298	692207462	801525634	782697633

Tabla 18. Áreas TIC de terpenos y estándares internos naturales candidatos para la adición múltiple en la muestra T_{MULTI}

Compuesto	Iones	Área TIC (MSA1)	Área TIC (MCA1)	Área TIC (MSA2)	Área TIC (MCA2)
Óxido de linalol	---	33538613	56967540	33369546	60896859
Óxido de linalol	43, 59	8491997	14078004	8206391	14025439
Linalol	---	434662196	823940211	453048895	819416676
α -terpineol	93	26015600	51176198	25941471	51134289
Acetato de isoamilo	---	40383342	42214271	55165645	44770324
Hexanoato de etilo	---	69202885	77173031	68140866	61975262
Decanoato de etilo	---	571142109	710750415	690039571	514901402

Tabla 19. Áreas TIC de terpenos y estándares internos naturales candidatos para la adición múltiple en la muestra M_{MULTI}

Compuesto	Iones	Área TIC (MSA1)	Área TIC (MCA1)	Área TIC (MSA2)	Área TIC (MCA2)
Óxido de linalol	---	3187273	31919901	4529494	29790336
Óxido de linalol	43, 59	914699	8384035	1283618	7892581
Linalol	---	121221598	672479024	150907749	650552802
α -terpineol	93	3734194	33610341	5039101	31777334
Acetato de isoamilo	---	54801006	66719800	59180689	50918083
Hexanoato de etilo	---	178823819	168920059	128477993	114281819
Decanoato de etilo	---	818065832	720691953	485538352	438505401

6.5.2 Componente de incertidumbre para el cociente reducido

6.5.2.1 Cálculo de desviación estándar relativa

En las Tablas 20, 21 y 22 se muestran los valores de los cocientes reducidos obtenidos por adición múltiple en la muestra I_{MULTI} (Q_{R1I} y Q_{R2I}), en la muestra T_{MULTI} (Q_{R1T} y Q_{R2T}) y en la muestra M_{MULTI} (Q_{R1M} y Q_{R2M}) respectivamente. Cada cociente reducido se calcula como Q_{MCA}/Q_{MSA} , donde Q_{MSA} y Q_{MCA} corresponden a los cocientes de área TIC del terpeno a determinar y del área TIC de su estándar interno en la mezcla sin adición (MSA) y en la mezcla con adición (MCA), respectivamente. Al final de las tablas se muestran los promedios Q_{RI} , Q_{RT} y Q_{RM} acompañados de sus desviaciones estándar y desviaciones estándar relativas respectivas.

Tabla 20. Cálculo de desviación estándar relativa para la adición múltiple en la muestra I_{MULTI}

Terpeno medido	Iones ¹	Estándar interno natural candidato	Q_{R1I}	Q_{R2I}	Q_{RI}	² DE(Q_{RI})	³ DER(Q_{RI})
Óxido de linalol	---	Acetato de isoamilo	4,282	3,061	3,672	0,863	0,235
Óxido de linalol	---	Hexanoato de etilo	5,440	2,423	3,931	2,134	0,543
Óxido de linalol	---	Decanoato de etilo	4,728	2,725	3,726	1,416	0,380
Óxido de linalol	43, 59	Acetato de isoamilo	4,060	3,260	3,660	0,566	0,155
Óxido de linalol	43, 59	Hexanoato de etilo	5,159	2,580	3,869	1,824	0,471
Óxido de linalol	43, 59	Decanoato de etilo	4,483	2,902	3,692	1,118	0,303
Linalol	---	Acetato de isoamilo	2,473	2,550	2,512	0,055	0,022
Linalol	---	Hexanoato de etilo	3,142	2,018	2,580	0,795	0,308
Linalol	---	Decanoato de etilo	2,731	2,270	2,500	0,326	0,130
α -terpineol	93	Acetato de isoamilo	3,196	3,038	3,117	0,112	0,036
α -terpineol	93	Hexanoato de etilo	4,061	2,404	3,233	1,171	0,362
α -terpineol	93	Decanoato de etilo	3,529	2,704	3,117	0,583	0,187

¹Iones para el terpeno medido. ²DE: Desviación estándar ³DER: Desviación estándar relativa

Tabla 21. Cálculo de desviación estándar relativa para la adición múltiple en la muestra T_{MULTI}

Terpeno medido	Iones ¹	Estándar interno natural candidato	Q_{R1T}	Q_{R2T}	Q_{RT}	² DE(Q_{RT})	³ DER(Q_{RT})
Óxido de linalol	---	Acetato de isoamilo	1,625	2,249	1,937	0,441	0,228
Óxido de linalol	---	Hexanoato de etilo	1,523	2,006	1,765	0,342	0,194
Óxido de linalol	---	Decanoato de etilo	1,365	2,446	1,905	0,764	0,401
Óxido de linalol	43, 59	Acetato de isoamilo	1,586	2,106	1,846	0,368	0,199
Óxido de linalol	43, 59	Hexanoato de etilo	1,487	1,879	1,683	0,278	0,165
Óxido de linalol	43, 59	Decanoato de etilo	1,332	2,290	1,811	0,678	0,374
Linalol	---	Acetato de isoamilo	1,813	2,229	2,021	0,294	0,145
Linalol	---	Hexanoato de etilo	1,700	1,989	1,844	0,204	0,111
Linalol	---	Decanoato de etilo	1,523	2,424	1,974	0,637	0,323
α -terpineol	93	Acetato de isoamilo	1,882	2,429	2,155	0,387	0,179
α -terpineol	93	Hexanoato de etilo	1,764	2,167	1,966	0,285	0,145
α -terpineol	93	Decanoato de etilo	1,581	2,642	2,111	0,750	0,355

¹Iones para el terpeno medido. ²DE: Desviación estándar ³DER: Desviación estándar relativa

Tabla 22. Cálculo de desviación estándar relativa para la adición múltiple en la muestra M_{MULTI}

Terpeno medido	Iones ¹	Estándar interno natural candidato	Q_{R1M}	Q_{R2M}	Q_{RM}	² DE(Q_{RM})	³ DER(Q_{RM})
Óxido de linalol	---	Acetato de isoamilo	8,226	7,644	7,935	0,411	0,052
Óxido de linalol	---	Hexanoato de etilo	10,602	7,394	8,998	2,268	0,252
Óxido de linalol	---	Decanoato de etilo	11,368	7,282	9,325	2,889	0,310
Óxido de linalol	43, 59	Acetato de isoamilo	7,529	7,146	7,337	0,270	0,037
Óxido de linalol	43, 59	Hexanoato de etilo	9,703	6,912	8,308	1,973	0,238
Óxido de linalol	43, 59	Decanoato de etilo	10,404	6,808	8,606	2,543	0,295
Linalol	---	Acetato de isoamilo	4,557	5,010	4,783	0,321	0,067
Linalol	---	Hexanoato de etilo	5,873	4,846	5,360	0,726	0,135
Linalol	---	Decanoato de etilo	6,297	4,773	5,535	1,077	0,195
α -terpineol	93	Acetato de isoamilo	7,393	7,329	7,361	0,045	0,006
α -terpineol	93	Hexanoato de etilo	9,528	7,090	8,309	1,725	0,208
α -terpineol	93	Decanoato de etilo	10,217	6,983	8,600	2,287	0,266

¹Iones para el terpeno medido. ²DE: Desviación estándar ³DER: Desviación estándar relativa

6.5.2.2 Cálculo de desviación estándar relativa agrupada

En la Tabla 23 se muestra el resumen de los valores de las desviaciones estándar relativas (DER) que fueron calculados en las Tablas 20, 21 y 22 para las muestras I_{MULTI} , T_{MULTI} y M_{MULTI} respectivamente. Se utiliza la Ecuación 22 para obtener la desviación estándar relativa agrupada (DERA) que se muestra en la última columna de la Tabla 23.

Tabla 23. Cálculo de desviación estándar relativa agrupada para la adición múltiple en las muestras I_{MULTI} , T_{MULTI} y M_{MULTI}

Terpeno medido	Iones ¹	Estándar interno natural candidato	² DER(Q_{RI})	² DER(Q_{RT})	² DER(Q_{RM})	³ DERA(Q_R)
Óxido de linalol	---	Acetato de isoamilo	0,235	0,228	0,052	0,191
Óxido de linalol	---	Hexanoato de etilo	0,543	0,194	0,252	0,363
Óxido de linalol	---	Decanoato de etilo	0,380	0,401	0,310	0,366
Óxido de linalol	43, 59	Acetato de isoamilo	0,155	0,199	0,037	0,147
Óxido de linalol	43, 59	Hexanoato de etilo	0,471	0,165	0,238	0,319
Óxido de linalol	43, 59	Decanoato de etilo	0,303	0,374	0,295	0,326
Linalol	---	Acetato de isoamilo	0,022	0,145	0,067	0,093
Linalol	---	Hexanoato de etilo	0,308	0,111	0,135	0,205
Linalol	---	Decanoato de etilo	0,130	0,323	0,195	0,230
α -terpineol	93	Acetato de isoamilo	0,036	0,179	0,006	0,106
α -terpineol	93	Hexanoato de etilo	0,362	0,145	0,208	0,255
α -terpineol	93	Decanoato de etilo	0,187	0,355	0,266	0,278

¹Iones para el terpeno medido. ²DER: Desviación estándar relativa

³DERA: Desviación estándar relativa agrupada

6.5.2.3 Cálculo de incertidumbre estándar del cociente reducido

De acuerdo a la Ecuación 23, en las Tablas 24, 25 y 26 se muestran los valores de Q_{RI} , Q_{RT} y Q_{RM} que son multiplicados por la desviación estándar relativa agrupada $DERA(Q_R)$ (calculada en la Tabla 23) para obtener los respectivos valores de desviaciones estándar agrupadas $DEA(Q_{RI})$, $DEA(Q_{RT})$ y $DEA(Q_{RM})$. Estos últimos valores se dividen entre $\sqrt{2}$ para obtener las respectivas incertidumbres estándar de los cocientes reducidos de acuerdo a la Ecuación 24. La última columna de la Tabla muestra la incertidumbre estándar relativa de $(Q_R - 1)$ que se obtiene de acuerdo a la Ecuación 9. Para este cálculo se debe tener en cuenta que $u(Q_R - 1) = u(Q_R)$.

Tabla 24. Cálculo de incertidumbre estándar relativa para la adición múltiple en la muestra I_{MULTI}

Terpeno medido	Iones ¹	Estándar interno natural candidato	Q_{RI}	² DERA(Q_R)	³ DEA(Q_{RI})	$u(Q_{RI})$	$\frac{u(Q_{RI})}{Q_{RI} - 1}$
Óxido de linalol	---	Acetato de isoamilo	3,672	0,191	0,702	0,497	0,186
Óxido de linalol	---	Hexanoato de etilo	3,931	0,363	1,428	1,009	0,344
Óxido de linalol	---	Decanoato de etilo	3,726	0,366	1,363	0,964	0,353
Óxido de linalol	43, 59	Acetato de isoamilo	3,660	0,147	0,539	0,381	0,143
Óxido de linalol	43, 59	Hexanoato de etilo	3,869	0,319	1,235	0,873	0,304
Óxido de linalol	43, 59	Decanoato de etilo	3,692	0,326	1,204	0,851	0,316
Linalol	---	Acetato de isoamilo	2,512	0,093	0,234	0,166	0,110
Linalol	---	Hexanoato de etilo	2,580	0,205	0,528	0,373	0,236
Linalol	---	Decanoato de etilo	2,500	0,230	0,576	0,407	0,271
α -terpineol	93	Acetato de isoamilo	3,117	0,106	0,330	0,233	0,110
α -terpineol	93	Hexanoato de etilo	3,233	0,255	0,825	0,583	0,261
α -terpineol	93	Decanoato de etilo	3,117	0,278	0,867	0,613	0,290

¹Iones para el terpeno medido. ²DERA: Desviación estándar relativa agrupada

³DEA: Desviación estándar agrupada

Tabla 25. Cálculo de incertidumbre estándar relativa para la adición múltiple en la muestra T_{MULTI}

Muestra	Iones ¹	Estándar interno natural candidato	Q_{RT}	² DERA(Q_R)	³ DEA(Q_{RT})	$u(Q_{RT})$	$\frac{u(Q_{RT})}{Q_{RT} - 1}$
Óxido de linalol	---	Acetato de isoamilo	1,937	0,191	0,370	0,262	0,280
Óxido de linalol	---	Hexanoato de etilo	1,765	0,363	0,641	0,453	0,593
Óxido de linalol	---	Decanoato de etilo	1,905	0,366	0,697	0,493	0,544
Óxido de linalol	43, 59	Acetato de isoamilo	1,846	0,147	0,272	0,192	0,227
Óxido de linalol	43, 59	Hexanoato de etilo	1,683	0,319	0,537	0,380	0,556
Óxido de linalol	43, 59	Decanoato de etilo	1,811	0,326	0,591	0,418	0,515
Linalol	---	Acetato de isoamilo	2,021	0,093	0,188	0,133	0,131
Linalol	---	Hexanoato de etilo	1,844	0,205	0,377	0,267	0,316
Linalol	---	Decanoato de etilo	1,974	0,230	0,454	0,321	0,330
α -terpineol	93	Acetato de isoamilo	2,155	0,106	0,228	0,161	0,139
α -terpineol	93	Hexanoato de etilo	1,966	0,255	0,502	0,355	0,367
α -terpineol	93	Decanoato de etilo	2,111	0,278	0,587	0,415	0,374

¹Iones para el terpeno medido. ²DERA: Desviación estándar relativa agrupada

³DEA: Desviación estándar agrupada

Tabla 26. Cálculo de incertidumbre estándar relativa para la adición múltiple en la muestra M_{MULTI}

Muestra	Iones ¹	Estándar interno natural candidato	Q_{RM}	² DERA(Q_R)	³ DEA(Q_{RM})	$u(Q_{RM})$	$\frac{u(Q_{RM})}{Q_{RM} - 1}$
Óxido de linalol	---	Acetato de isoamilo	7,935	0,191	1,518	1,073	0,155
Óxido de linalol	---	Hexanoato de etilo	8,998	0,363	3,268	2,311	0,289
Óxido de linalol	---	Decanoato de etilo	9,325	0,366	3,411	2,412	0,290
Óxido de linalol	43, 59	Acetato de isoamilo	7,337	0,147	1,079	0,763	0,120
Óxido de linalol	43, 59	Hexanoato de etilo	8,308	0,319	2,652	1,875	0,257
Óxido de linalol	43, 59	Decanoato de etilo	8,606	0,326	2,806	1,984	0,261
Linalol	---	Acetato de isoamilo	4,783	0,093	0,446	0,315	0,083
Linalol	---	Hexanoato de etilo	5,360	0,205	1,096	0,775	0,178
Linalol	---	Decanoato de etilo	5,535	0,230	1,274	0,901	0,199
α -terpineol	93	Acetato de isoamilo	7,361	0,106	0,778	0,550	0,087
α -terpineol	93	Hexanoato de etilo	8,309	0,255	2,121	1,500	0,205
α -terpineol	93	Decanoato de etilo	8,600	0,278	2,392	1,691	0,223

¹Iones para el terpeno medido. ²DERA: Desviación estándar relativa agrupada

³DEA: Desviación estándar agrupada

6.5.3 Componente de incertidumbre para la concentración del estándar adicionado a la muestra

Esta componente de incertidumbre se estima de manera semejante a lo indicado en 6.4.3 para la concentración del estándar de linalol. Todos los resultados de incertidumbre para la concentración del estándar se muestran en las Tablas 27, 28 y 29.

6.5.4 Componente de incertidumbre para el volumen del estándar adicionado a muestra y del volumen de la muestra

Estas componentes de incertidumbre se estiman de manera semejante a lo indicado en 6.4.4. Los resultados de incertidumbre para el volumen del estándar y el volumen de la muestra se muestran en la Tablas 27, 28 y 29.

6.5.5 Combinación de componentes de incertidumbre

En las Tablas 27, 28 y 29 se muestra el valor de C_m y las incertidumbres relativas correspondientes a las variables de entrada para la adición múltiple en las muestras I_{MULTI} , T_{MULTI} y M_{MULTI} respectivamente. El valor de C_m fue obtenido utilizando la Ecuación 19. Las incertidumbres relativas corresponden a las variables $(Q_{red} - 1)$, C_{std} , V_{std} y V_m . Se utilizó la Ecuación 35 para obtener la incertidumbre estándar combinada $u_c(C_m)/C_m$ por combinación de las incertidumbres relativas de las variables.

Tabla 27. Cálculo de incertidumbre combinada para adición múltiple en la muestra I_{MULTI}

Terpeno medido	Iones	Estándar interno natural candidato	C_m mg/l	$\frac{u(Q_{RI} - 1)}{Q_{RI} - 1}$	$\frac{u(C_{std})}{C_{std}}$	$\frac{u(V_{std})}{V_{std}}$	$\frac{u(V_m)}{V_m}$	$\frac{u(C_m)}{C_m}$
Óxido de linalol	---	Acetato de isoamilo	1,280	0,186	0,016	0,010	0,010	0,187
Óxido de linalol	---	Hexanoato de etilo	1,166	0,344	0,016	0,010	0,010	0,345
Óxido de linalol	---	Decanoato de etilo	1,254	0,353	0,016	0,010	0,010	0,354
Óxido de linalol	43, 59	Acetato de isoamilo	1,285	0,143	0,016	0,010	0,010	0,145
Óxido de linalol	43, 59	Hexanoato de etilo	1,191	0,304	0,016	0,010	0,010	0,305
Óxido de linalol	43, 59	Decanoato de etilo	1,270	0,316	0,016	0,010	0,010	0,317
Linalol	---	Acetato de isoamilo	7,956	0,110	0,014	0,010	0,010	0,111
Linalol	---	Hexanoato de etilo	7,612	0,236	0,014	0,010	0,010	0,237
Linalol	---	Decanoato de etilo	8,017	0,271	0,014	0,010	0,010	0,272
α -terpineol	93	Acetato de isoamilo	3,666	0,110	0,012	0,010	0,010	0,112
α -terpineol	93	Hexanoato de etilo	3,477	0,261	0,012	0,010	0,010	0,262
α -terpineol	93	Decanoato de etilo	3,668	0,290	0,012	0,010	0,010	0,290

Tabla 28. Cálculo de incertidumbre combinada para adición múltiple en la muestra T_{MULTI}

Muestra	Iones	Estándar interno natural candidato	C_m mg/l	$\frac{u(Q_{RT} - 1)}{Q_{RT} - 1}$	$\frac{u(C_{std})}{C_{std}}$	$\frac{u(V_{std})}{V_{std}}$	$\frac{u(V_m)}{V_m}$	$\frac{u(C_m)}{C_m}$
Óxido de linalol	---	Acetato de isoamilo	3,649	0,280	0,016	0,010	0,010	0,280
Óxido de linalol	---	Hexanoato de etilo	4,470	0,593	0,016	0,010	0,010	0,593
Óxido de linalol	---	Decanoato de etilo	3,776	0,544	0,016	0,010	0,010	0,545
Óxido de linalol	43, 59	Acetato de isoamilo	4,041	0,227	0,016	0,010	0,010	0,228
Óxido de linalol	43, 59	Hexanoato de etilo	5,006	0,556	0,016	0,010	0,010	0,557
Óxido de linalol	43, 59	Decanoato de etilo	4,214	0,515	0,016	0,010	0,010	0,515
Linalol	---	Acetato de isoamilo	11,780	0,131	0,014	0,010	0,010	0,132
Linalol	---	Hexanoato de etilo	14,246	0,316	0,014	0,010	0,010	0,317
Linalol	---	Decanoato de etilo	12,354	0,330	0,014	0,010	0,010	0,331
α -terpineol	93	Acetato de isoamilo	6,719	0,139	0,012	0,010	0,010	0,141
α -terpineol	93	Hexanoato de etilo	8,040	0,367	0,012	0,010	0,010	0,368
α -terpineol	93	Decanoato de etilo	6,986	0,374	0,012	0,010	0,010	0,374

Tabla 29. Cálculo de incertidumbre combinada para adición múltiple en la muestra M_{MULTI}

Muestra	Ión	Estándar interno natural candidato	C_m mg/l	$\frac{u(Q_{RM} - 1)}{Q_{RM} - 1}$	$\frac{u(C_{std})}{C_{std}}$	$\frac{u(V_{std})}{V_{std}}$	$\frac{u(V_m)}{V_m}$	$\frac{u(C_m)}{C_m}$
Óxido de linalol	---	Acetato de isoamilo	0,493	0,155	0,016	0,010	0,010	0,156
Óxido de linalol	---	Hexanoato de etilo	0,427	0,289	0,016	0,010	0,010	0,290
Óxido de linalol	---	Decanoato de etilo	0,411	0,290	0,016	0,010	0,010	0,290
Óxido de linalol	59	Acetato de isoamilo	0,539	0,120	0,016	0,010	0,010	0,122
Óxido de linalol	59	Hexanoato de etilo	0,468	0,257	0,016	0,010	0,010	0,258
Óxido de linalol	59	Decanoato de etilo	0,449	0,261	0,016	0,010	0,010	0,262
Linalol	---	Acetato de isoamilo	3,179	0,083	0,014	0,010	0,010	0,086
Linalol	---	Hexanoato de etilo	2,759	0,178	0,014	0,010	0,010	0,179
Linalol	---	Decanoato de etilo	2,652	0,199	0,014	0,010	0,010	0,200
α -terpineol	93	Acetato de isoamilo	1,220	0,087	0,012	0,010	0,010	0,088
α -terpineol	93	Hexanoato de etilo	1,062	0,205	0,012	0,010	0,010	0,206
α -terpineol	93	Decanoato de etilo	1,022	0,223	0,012	0,010	0,010	0,223

6.5.6 Cálculo de incertidumbre combinada

En las Tablas 30, 31 y 32 se muestra la incertidumbre estándar combinada (según Ecuación 36) y su correspondiente incertidumbre combinada relativa expresada en

porcentaje. Esta última se multiplicó por 2 para obtener la respectiva incertidumbre expandida relativa (según Ecuación 38).

Tabla 30. Cálculo de incertidumbre combinada y expandida para adición múltiple en la muestra I_{MULTI}

Terpeno medido	Iones	Estándar interno natural candidato	$u_c(C_m)$ mg/l	C_m mg/l	$u_c(C_m)$ relativa (%)	$U_c(C_m)$ relativa (%)
Óxido de linalol	---	Acetato de isoamilo	0,239	1,280	18,7	37
Óxido de linalol	---	Hexanoato de etilo	0,402	1,166	34,5	69
Óxido de linalol	---	Decanoato de etilo	0,444	1,254	35,4	71
Óxido de linalol	43, 59	Acetato de isoamilo	0,186	1,285	14,5	29
Óxido de linalol	43, 59	Hexanoato de etilo	0,364	1,191	30,5	61
Óxido de linalol	43, 59	Decanoato de etilo	0,402	1,270	31,7	63
Linalol	---	Acetato de isoamilo	0,886	7,956	11,1	22
Linalol	---	Hexanoato de etilo	1,804	7,612	23,7	47
Linalol	---	Decanoato de etilo	2,181	8,017	27,2	54
α -terpineol	93	Acetato de isoamilo	0,409	3,666	11,2	22
α -terpineol	93	Hexanoato de etilo	0,911	3,477	26,2	52
α -terpineol	93	Decanoato de etilo	1,064	3,668	29,0	58

Tabla 31. Cálculo de incertidumbre combinada y expandida para adición múltiple en la muestra T_{MULTI}

Terpeno medido	Iones	Estándar interno natural candidato	$u_c(C_m)$ mg/l	C_m mg/l	$u_c(C_m)$ relativa (%)	$U_c(C_m)$ relativa (%)
Óxido de linalol	---	Acetato de isoamilo	1,024	3,649	28,0	56
Óxido de linalol	---	Hexanoato de etilo	2,650	4,470	59,3	119
Óxido de linalol	---	Decanoato de etilo	2,057	3,776	54,5	109
Óxido de linalol	43, 59	Acetato de isoamilo	0,921	4,041	22,8	46
Óxido de linalol	43, 59	Hexanoato de etilo	2,787	5,006	55,7	111
Óxido de linalol	43, 59	Decanoato de etilo	2,171	4,214	51,5	103
Linalol	---	Acetato de isoamilo	1,555	11,780	13,2	26
Linalol	---	Hexanoato de etilo	4,510	14,246	31,7	63
Linalol	---	Decanoato de etilo	4,084	12,354	33,1	66
α -terpineol	93	Acetato de isoamilo	0,945	6,719	14,1	28
α -terpineol	93	Hexanoato de etilo	2,958	8,040	36,8	74
α -terpineol	93	Decanoato de etilo	2,613	6,986	37,4	75

Tabla 32. Cálculo de incertidumbre combinada y expandida para adición múltiple en la muestra M_{MULTI}

Terpeno medido	Iones	Estándar interno natural candidato	$u_c(C_m)$ mg/l	C_m mg/l	$u_c(C_m)$ relativa (%)	$U_c(C_m)$ relativa (%)
Óxido de linalol	---	Acetato de isoamilo	0,077	0,493	15,6	31
Óxido de linalol	---	Hexanoato de etilo	0,124	0,427	29,0	58
Óxido de linalol	---	Decanoato de etilo	0,119	0,411	29,0	58
Óxido de linalol	43, 59	Acetato de isoamilo	0,066	0,539	12,2	24
Óxido de linalol	43, 59	Hexanoato de etilo	0,120	0,468	25,8	52
Óxido de linalol	43, 59	Decanoato de etilo	0,118	0,449	26,2	52
Linalol	---	Acetato de isoamilo	0,272	3,179	8,6	17
Linalol	---	Hexanoato de etilo	0,494	2,759	17,9	36
Linalol	---	Decanoato de etilo	0,530	2,652	20,0	40
α -terpineol	93	Acetato de isoamilo	0,108	1,220	8,8	18
α -terpineol	93	Hexanoato de etilo	0,219	1,062	20,6	41
α -terpineol	93	Decanoato de etilo	0,228	1,022	22,3	45

6.5.7 Selección del mejor estándar interno natural candidato

A continuación todos los resultados de las Tablas 30, 31 y 32 se muestran reordenados en la Tabla 33 en relación a la incertidumbre expandida relativa de C_m . Se observa claramente que las menores incertidumbres expandidas relativas se alcanzan utilizando acetato de isoamilo como estándar interno natural de referencia. Utilizando este estándar interno también se observa que, para el óxido de linalol, las menores incertidumbres expandidas relativas se alcanzan con los iones fragmento 43 y 59.

Tabla 33. Resultados de medición ordenados en relación a sus incertidumbres expandidas relativas

Muestra	Terpeno medido	Ión	Estándar interno natural candidato	$u_c(C_m)$ mg/l	C_m mg/l	$U_c(C_m)$ relativa (%)
M _{MULTI}	Linalol	---	Acetato de isoamilo	0,272	3,179	17
M _{MULTI}	α -terpineol	93	Acetato de isoamilo	0,108	1,220	18
I _{MULTI}	Linalol	---	Acetato de isoamilo	0,886	7,956	22
I _{MULTI}	α -terpineol	93	Acetato de isoamilo	0,409	3,666	22
M _{MULTI}	Óxido de linalol	43, 59	Acetato de isoamilo	0,066	0,539	24
T _{MULTI}	Linalol	---	Acetato de isoamilo	1,555	11,780	26
T _{MULTI}	α -terpineol	93	Acetato de isoamilo	0,945	6,719	28
I _{MULTI}	Óxido de linalol	43, 59	Acetato de isoamilo	0,186	1,285	29
M _{MULTI}	Óxido de linalol	---	Acetato de isoamilo	0,077	0,493	31
M _{MULTI}	Linalol	---	Hexanoato de etilo	0,494	2,759	36
I _{MULTI}	Óxido de linalol	---	Acetato de isoamilo	0,239	1,280	37
M _{MULTI}	Linalol	---	Decanoato de etilo	0,53	2,652	40
M _{MULTI}	α -terpineol	93	Hexanoato de etilo	0,219	1,062	41
M _{MULTI}	α -terpineol	93	Decanoato de etilo	0,228	1,022	45
T _{MULTI}	Óxido de linalol	43, 59	Acetato de isoamilo	0,921	4,041	46
I _{MULTI}	Linalol	---	Hexanoato de etilo	1,804	7,612	47
I _{MULTI}	α -terpineol	93	Hexanoato de etilo	0,911	3,477	52
M _{MULTI}	Óxido de linalol	43, 59	Hexanoato de etilo	0,12	0,468	52
M _{MULTI}	Óxido de linalol	43, 59	Decanoato de etilo	0,118	0,449	52
I _{MULTI}	Linalol	---	Decanoato de etilo	2,181	8,017	54
T _{MULTI}	Óxido de linalol	---	Acetato de isoamilo	1,024	3,649	56
I _{MULTI}	α -terpineol	93	Decanoato de etilo	1,064	3,668	58
M _{MULTI}	Óxido de linalol	---	Hexanoato de etilo	0,124	0,427	58
M _{MULTI}	Óxido de linalol	---	Decanoato de etilo	0,119	0,411	58
I _{MULTI}	Óxido de linalol	43, 59	Hexanoato de etilo	0,364	1,191	61
I _{MULTI}	Óxido de linalol	43, 59	Decanoato de etilo	0,402	1,270	63
T _{MULTI}	Linalol	---	Hexanoato de etilo	4,51	14,246	63
T _{MULTI}	Linalol	---	Decanoato de etilo	4,084	12,354	66
I _{MULTI}	Óxido de linalol	---	Hexanoato de etilo	0,402	1,166	69
I _{MULTI}	Óxido de linalol	---	Decanoato de etilo	0,444	1,254	71
T _{MULTI}	α -terpineol	93	Hexanoato de etilo	2,958	8,040	74
T _{MULTI}	α -terpineol	93	Decanoato de etilo	2,613	6,986	75
T _{MULTI}	Óxido de linalol	43, 59	Decanoato de etilo	2,171	4,214	103
T _{MULTI}	Óxido de linalol	---	Decanoato de etilo	2,057	3,776	109
T _{MULTI}	Óxido de linalol	43, 59	Hexanoato de etilo	2,787	5,006	111
T _{MULTI}	Óxido de linalol	---	Hexanoato de etilo	2,65	4,470	119

6.5.8 Resumen de resultados obtenidos con la estrategia simplificada

De acuerdo a lo indicado en 6.5.7, se observa que el acetato de isoamilo tiene los menores valores de incertidumbre expandida relativa. Por otro lado, en relación a las mediciones de óxido de linalol, se observan menores valores de incertidumbre para las mediciones que utilizaron los iones fragmento 43 y 59.

De acuerdo a lo indicado en el párrafo anterior, se escoge al acetato de isoamilo como estándar interno natural para la estrategia simplificada. También se escoge a los iones fragmento 43 y 59 para las mediciones de óxido de linalol. Los resultados finales de la estrategia simplificada se muestran a continuación. En la Tabla 34 se indican los resultados que se utilizan para comparación con la estrategia de referencia mediante el cálculo de zeta-score. También se obtuvieron incertidumbres expandidas (ver Tabla 35) para las mediciones adicionales que se realizaron para la determinación de la desviación estándar relativa agrupada de los cocientes reducidos.

Tabla 34. Resumen de resultados de la estrategia simplificada para comparación con estrategia de referencia

Muestra	Terpeno medido	Ión	Estándar interno natural candidato	$u_c(C_m)$ mg/l	C_m mg/l	$u_c(C_m)$ relativa (%)	$U_c(C_m)$ relativa (%)
M _{MULTI}	Linalol	---	Acetato de isoamilo	0,272	3,179	8,6	17
M _{MULTI}	α -terpineol	93	Acetato de isoamilo	0,108	1,220	8,8	18
I _{MULTI}	Linalol	---	Acetato de isoamilo	0,886	7,956	11,1	22
I _{MULTI}	α -terpineol	93	Acetato de isoamilo	0,409	3,666	11,2	22
I _{MULTI}	Óxido de linalol	43, 59	Acetato de isoamilo	0,186	1,285	14,5	29
T _{MULTI}	Óxido de linalol	43, 59	Acetato de isoamilo	0,921	4,041	22,8	46

Tabla 35. Mediciones adicionales con la estrategia simplificada

Muestra	Terpeno medido	Ión	Estándar interno natural candidato	$u_c(C_m)$ mg/l	C_m mg/l	$u_c(C_m)$ relativa (%)	$U_c(C_m)$ relativa (%)
M _{MULTI}	Óxido de linalol	43, 59	Acetato de isoamilo	0,066	0,539	12,2	24
T _{MULTI}	Linalol	---	Acetato de isoamilo	1,555	11,780	13,2	26
T _{MULTI}	α -terpineol	93	Acetato de isoamilo	0,945	6,719	14,1	28

6.6 Comparación de resultados entre la estrategia de referencia y la estrategia simplificada

En la Tabla 36 se muestra el zeta-score (según Ecuación 39) calculado a partir de los resultados de C_m y $U(C_m)$ de la estrategia simplificada (Tabla 34) con respecto a los resultados C_{mREF} y $U(C_{mREF})$ de la estrategia de referencia (Tabla 16). En la estrategia simplificada se utilizó acetato de isoamilo como estándar interno natural.

Tabla 36. Cálculo del zeta-score para comparación de estrategias

Muestra	Terpeno medido	C_m mg/l	$u(C_m)$ mg/l	C_{mREF} mg/l	$u(C_{mREF})$ mg/l	zeta-score
I _{MULTI}	Óxido de linalol	1,285	0,186	1,490	0,121	0,9
T _{MULTI}	Óxido de linalol	4,041	0,921	3,727	0,372	-0,3
I _{MULTI}	Linalol	7,956	0,886	7,450	0,732	-0,4
M _{MULTI}	Linalol	3,179	0,272	2,633	0,212	-1,6
I _{MULTI}	α -terpineol	3,666	0,409	4,040	0,362	0,7
M _{MULTI}	α -terpineol	1,220	0,108	1,186	0,079	-0,3

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

7.1 Sobre la identificación de compuestos

Para cada réplica medida se puede superponer el cromatograma obtenido para la mezcla sin adición (MSA) y su mezcla con adición (MCA) respectiva. La Figura 15 muestra esta superposición para la medición de linalol en la muestra Moscatel M_{MULTI} . Se observa en este caso que el tiempo de retención del linalol en la mezcla sin adición es 11,11 y el tiempo de retención en la mezcla con adición es 11,16. Todos los resultados de esta comparación de tiempos de retención entre mezcla sin adición y mezcla con adición se detallan en la Tabla 5.

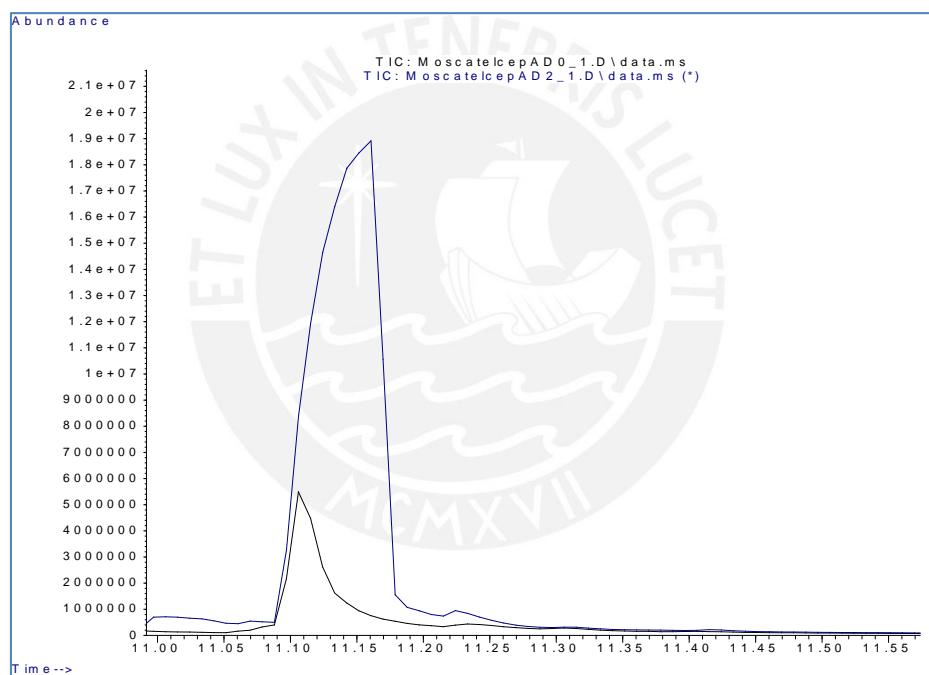


Fig. 15. Cromatogramas superpuestos de mezcla sin adición y mezcla con adición de linalol en la muestra Moscatel M_{MULTI}

7.2 Sobre la evaluación de linealidad utilizando la muestra Quebranta

Trabajos previos de medición con HS-SPME han demostrado la linealidad de esta técnica en diferentes rangos de concentración para la cuantificación de terpenos en bebidas alcohólicas utilizando calibración con curva externa [11][12][14][17]. Los resultados obtenidos en 6.3 confirman la linealidad (valor de R^2 mayores a 0,99) utilizando

adición estándar combinada con acetato de isoamilo o con decanoato de etilo como estándares internos naturales. Utilizando hexanoato de etilo no se cumple el requisito de R^2 mayor o igual a 0,99. Para este caso se presentaron valores de R^2 a partir de 0,979.

7.3 Sobre la selección de las características de la estrategia de referencia y la estrategia simplificada

Se utilizó una estrategia de referencia con características que brinden alta confiabilidad en los resultados obtenidos para las mediciones por HS-SPME al ser comparado con los resultados de la estrategia simplificada. A continuación se comparan las diferentes características de la estrategia de referencia y de la estrategia simplificada utilizadas.

7.3.1 Interferencias en la medición por HS-SPME

En la estrategia simplificada se realiza una adición estándar múltiple de los terpenos y se requiere evaluar si los terpenos adicionados para la medición interfieren entre ellos. Para evaluar si los resultados son afectados debido a esta adición múltiple, la estrategia de referencia ha considerado una adición estándar individual (de un solo terpeno). De esta manera se ha podido evaluar si existen interferencias por la adición múltiple de la estrategia simplificada al comparar sus resultados con los de la estrategia de referencia.

7.3.2 Estructuras químicas de los estándares internos naturales

Los estándares internos naturales candidatos utilizados (ésteres) no cuentan necesariamente con estructuras químicas similares a los terpenos evaluados. Para evaluar si esta diferencia de estructuras afecta los resultados, la estrategia de referencia ha utilizado estándares internos naturales de referencia con estructura similar a aquellas de los terpenos medidos.

Los terpenos medidos en este trabajo fueron de óxido de linalol, linalol y α -terpineol. Los dos últimos también fueron utilizados como estándares internos naturales de referencia. Para la estandarización interna con la estrategia de referencia también se incluyó los siguientes terpenos de estructura similar: hotrienol y óxido de nerol.

7.3.3 Tiempos de retención de los estándares internos naturales

Los estándares internos naturales candidatos utilizados no cuentan con tiempos de retención similares a aquellos de los terpenos evaluados. Para evaluar si las diferencias en los tiempos de retención afectan los resultados, la estrategia de referencia ha utilizado estándares internos naturales de referencia con tiempos de retención similares a aquellos de los terpenos medidos.

7.3.4 Número de réplicas de medición

La estrategia simplificada utiliza 2 réplicas en el proceso de medición. Cada réplica consiste en la medición de una mezcla sin adición (MSA) y una mezcla con adición (MCA). Por otro lado, se decidió que la estrategia de referencia utilice 4 réplicas (2 réplicas por cada estándar interno natural de referencia).

7.3.5 Sobre la selección de los iones fragmento para cada uno de los terpenos medidos

Debido a que el objetivo de este trabajo es desarrollar una estrategia simplificada, se utilizaron iones fragmento solo si estos representan una mejora significativa de los resultados obtenidos.

Para la medición de óxido de linalol se obtuvieron resultados tanto en modo SCAN como en modo SIM (con iones 43 y 59) con el fin de comparar las incertidumbres de medición obtenidas en cada caso.

No fue necesario utilizar iones fragmento para la medición de linalol debido a que su área TIC siempre presenta una forma simétrica y suele ser una de las áreas de mayor tamaño para los terpenos que se pueden analizar.

Si fue necesario utilizar el modo SIM con ión fragmento 93 para el α -terpineol debido a su coelución con octanoato de etilo en modo SCAN. En la Figura 16 se observan los cromatogramas superpuestos de la mezcla sin adición y la mezcla con adición en la muestra I_{MULTI}. Se observa que en la mezcla sin adición el α -terpineol tiene interferencia

debido a su coelución con octanoato de etilo (modo SCAN). Por otro lado, en la Figura 17 se observa que el modo SIM con ión fragmento 93 no presenta esta interferencia.

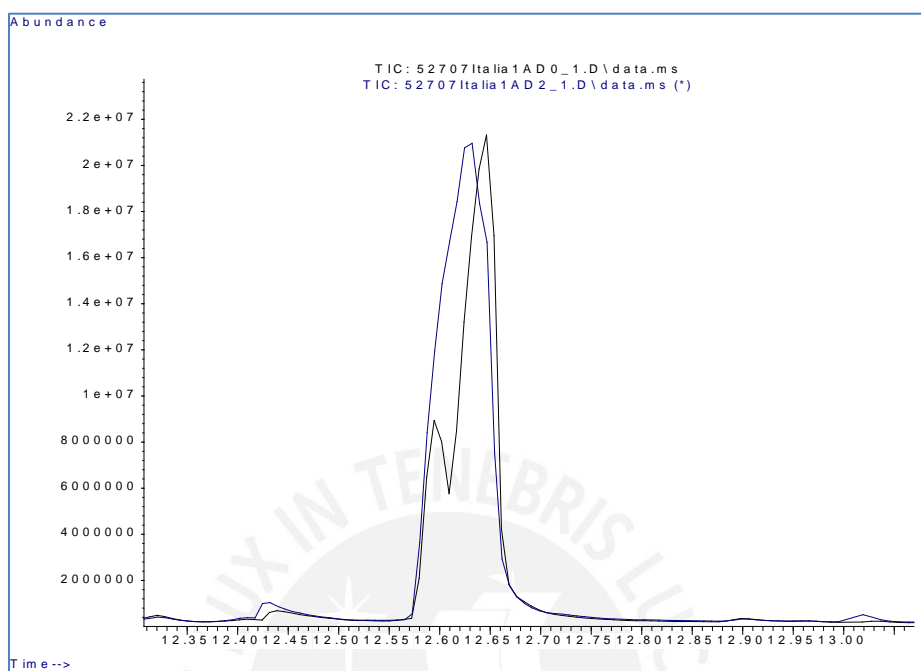


Fig. 16. Cromatogramas superpuestos de mezcla sin adición y mezcla con adición de linalol en la muestra Italia I_{MULTI} (modo SCAN)

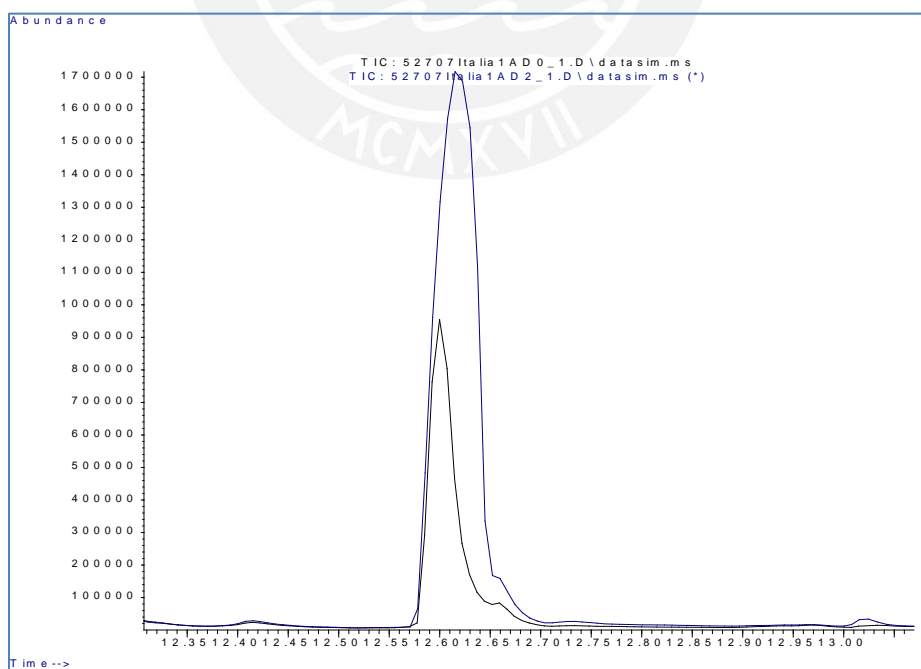


Fig. 17. Cromatogramas superpuestos de mezcla sin adición y mezcla con adición de linalol en la muestra Italia I_{MULTI} (modo SIM ión fragmento 93)

7.4 Sobre los resultados obtenidos con la estrategia de referencia

Todas las mediciones con la estrategia de referencia son adiciones estándar individuales (de un solo terpeno). En la Figura 18 se observa la superposición de cromatogramas para la mezcla sin adición y la mezcla con adición correspondientes a una de las réplicas de la adición individual de α -terpineol en la muestra M_{TER} . La figura muestra que en esta adición individual solo cambia el área TIC del terpeno adicionado (α -terpineol).

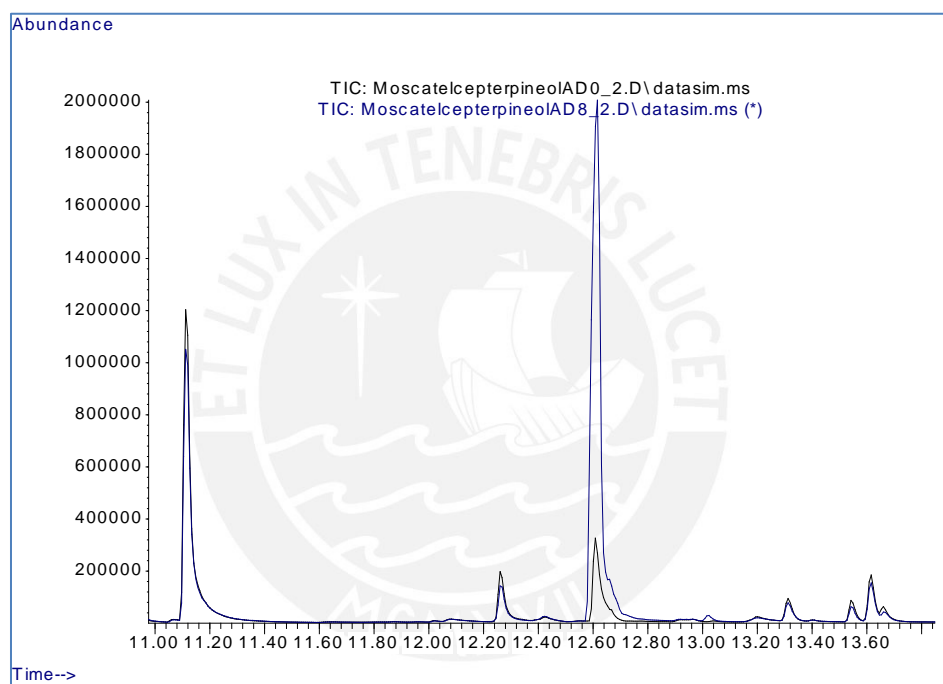


Fig. 18. Cromatogramas superpuestos de mezcla sin adición y mezcla con adición de α -terpineol en la muestra Moscatel M_{TER} (modo SIM con ión fragmento 93)

En la Tabla 16 se ha mostrado las contribuciones de incertidumbre correspondientes al cociente relativo, la concentración del estándar, el volumen del estándar y el volumen de la muestra, que se combinan con el fin de obtener la incertidumbre estándar combinada relativa $u_c(C_{\text{mREF}})/C_{\text{mREF}}$. En la Figura 19 se muestran las contribuciones de incertidumbre que corresponden a la medición de óxido de linalol en la muestra I_{OXL} . Los valores han sido expresados en porcentaje y se calculan dividiendo los cuadrados de las incertidumbres relativas de cada variable entre el cuadrado de la incertidumbre relativa de la concentración C_{mREF} . Se observa que en todos los casos la contribución de

incertidumbre con mayor aporte corresponde al cociente reducido (93 %). La segunda contribución de mayor aporte corresponde a la concentración del estándar (4 %).

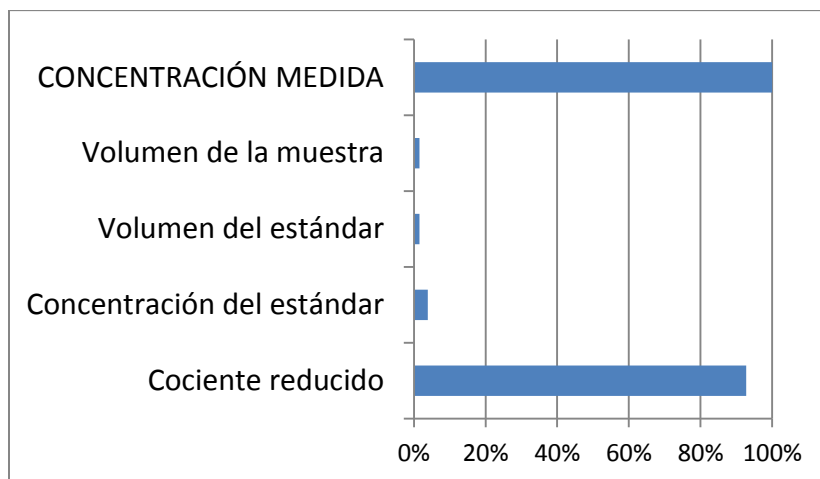


Fig. 19. Contribuciones de incertidumbre para la medición de óxido de linalol en la muestra I_{OXL}

7.5 Sobre los resultados obtenidos con la estrategia simplificada

Todas las mediciones con la estrategia simplificada son adiciones múltiples individuales (de óxido de linalol, linalol y α -terpineol). En la Figura 20 se observa la superposición de cromatogramas para la mezcla sin adición y la mezcla con adición correspondientes a una de las réplicas de la adición múltiple en la muestra M_{MULTI} . La figura muestra el cambio de las áreas TIC para linalol con tiempo de retención 11,15 y α -terpineol con tiempo de retención 12,60. El óxido de linalol (tercer terpeno medido) está fuera de la figura.

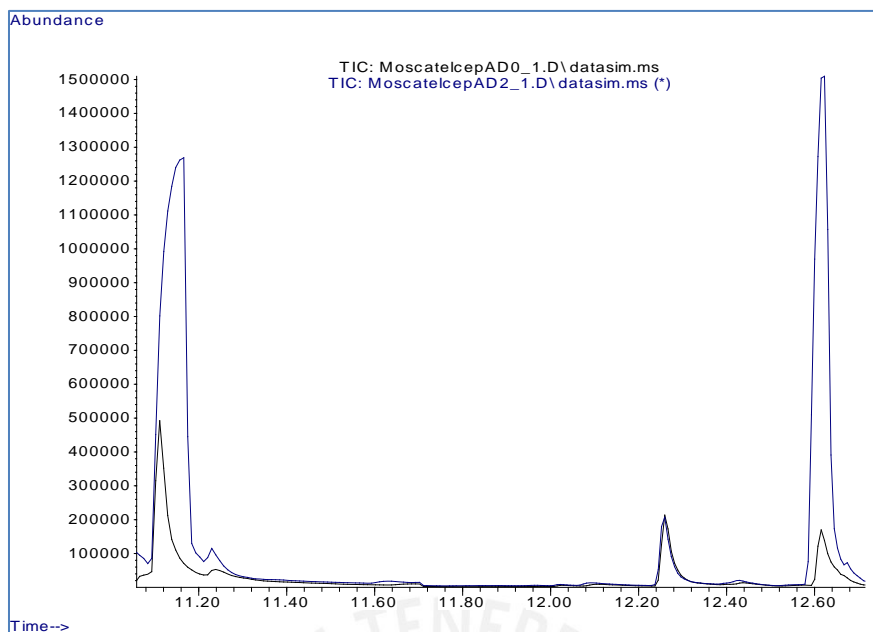


Fig. 20. Cromatogramas superpuestos de mezcla sin adición y mezcla con adición que corresponden a la adición múltiple en la muestra Moscatel M_{MULTI}

De manera semejante a lo observado para los resultados de la estrategia de referencia, en las Tablas 27, 28 y 29 para la estrategia simplificada se observa que la principal contribución de incertidumbre corresponde al cociente reducido. De acuerdo a ello, con el fin de optimizar la estimación de incertidumbre para esta variable, se decidió calcular la desviación estándar como un valor agrupado a partir de los resultados de desviación estándar en las 3 variedades de Pisco aromático estudiadas. Los resultados del cálculo de esta desviación estándar relativa agrupada (según Ecuación 22) fueron denotados como $DERA(Q_R)$ y han sido mostrados en la Tabla 23. Este tipo de cálculo permite obtener incertidumbres estándar para el cociente reducido más representativas del conjunto de mediciones realizadas.

En la Tabla 33 se muestra el resumen de todos los resultados e incertidumbres obtenidos con la estrategia simplificada. Estos fueron reordenados de menor a mayor incertidumbre expandida relativa. Se observa claramente que se obtiene menores incertidumbres para las mediciones utilizando acetato de isoamilo como estándar interno natural.

7.6 Sobre la comparación de resultados calculando el zeta-score

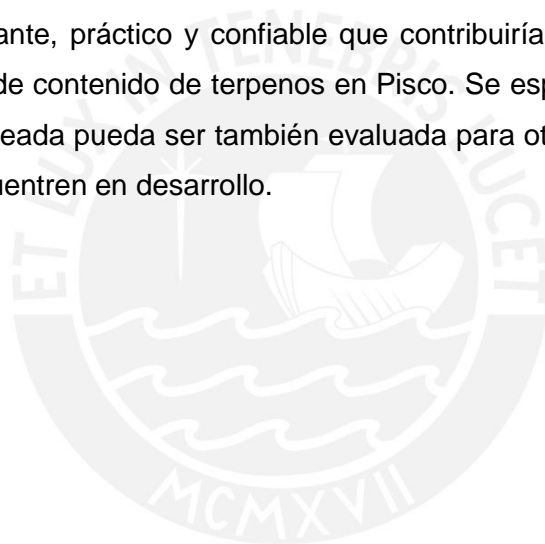
Se compararon los resultados obtenidos para la estrategia simplificada (en la Tabla 34) con los resultados obtenidos para la estrategia de referencia (en la Tabla 16) calculando valores de zeta-score (según Ecuación 39). Los resultados obtenidos se mostraron en la Tabla 36. Todos los valores absolutos de zeta-score son menores que 2. Esto indica que existe comparabilidad para los resultados obtenidos por la estrategia de simplificada en comparación con la estrategia de referencia.



8. CONCLUSIONES

- 1) En base a las mejores características conocidas para la calibración por adición estándar y la calibración por estándar interno aplicadas a mediciones por HS-SPME-GC-MS, fue posible contar con valores de referencia (estrategia de referencia) que permitan evaluar el desempeño analítico de la estrategia simplificada (método de rutina). Estas características se relacionan con adición individual y múltiple de un estándar, estructura química y tiempo de retención similares entre analito y estándar interno, número de réplicas de medición, entre otras.
- 2) Se obtuvieron menores incertidumbres expandidas relativas para las mediciones realizadas utilizando acetato de isoamilo como estándar interno natural en comparación con las que fueron obtenidas utilizando hexanoato de etilo o decanoato de etilo como estándar interno natural. De acuerdo a ello, se recomienda al acetato de isoamilo como estándar interno para este tipo de mediciones.
- 3) Los estándares internos evaluados (acetato de isoamilo, hexanoato de etilo y decanoato de etilo) se encuentran presentes de manera natural en las muestras de Pisco evaluadas. En particular, el acetato de isoamilo es un éster que también se menciona en el Reglamento de la Denominación de Origen Pisco. De acuerdo al Reglamento las mediciones para los ésteres se realizan por GC-FID. De acuerdo a ello, se considera que en mediciones por HS-SPME-GC-MS siempre se contará con la presencia de este compuesto y puede ser utilizado como estándar interno natural.
- 4) El uso del modo SIM con ión fragmento 93 para las mediciones de α -terpineol permitió evitar su coelución con octanoato de etilo. Por otro lado, los iones fragmento 43 y 59 permitieron obtener menores valores de incertidumbre para las mediciones de óxido de linalol. No fue necesario utilizar el modo SIM para las mediciones de linalol.

- 5) La incertidumbre de medición es el mejor indicador conocido actualmente para mostrar la calidad de cualquier medición realizada. La estimación de incertidumbres asociadas a los resultados de medición en este trabajo ha permitido evaluar el desempeño analítico de la estrategia simplificada propuesta. Para ello se han calculado valores de zeta-score para comparar las mediciones de realizadas. Para todas las mediciones realizadas utilizando acetato de isoamilo se obtuvo resultados comparables (valor absoluto del zeta-score menor que 2).
- 6) La combinación de la adición estándar de un solo punto y el uso de un estándar interno natural para mediciones con HS-SPME-GC-MS, aparece como un nuevo enfoque interesante, práctico y confiable que contribuiría a la estandarización de las mediciones de contenido de terpenos en Pisco. Se espera que la estrategia de calibración planteada pueda ser también evaluada para otros campos de medición que aún se encuentren en desarrollo.



9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Gromova.O.V. 2011. Evaluación del origen varietal de piscos por Microextracción en Fase Sólida (SPME) y Cromatografía de Gases. Tesis para optar el grado de Magister en Química. Pontificia Universidad Católica del Perú.
- [2] Reglamento de la Denominación de Origen Pisco. 2011. Consejo Regulador de la Denominación de Origen Pisco
- [3] Ministerio de la Producción. Directorio de Productores de Pisco, 2013. Page 5
- [4] Arthur C. L., Pawliszyn J., 1990. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Anal. Chem.* 62 (19), 2145-2148
- [5] Zhang Z., Pawliszyn J., 1993. Headspace solid-phase microextraction. *Anal. Chem.* 65 (14), 1843-1852
- [6] ISO 17943:2016 Water quality -- Determination of volatile organic compounds in water -- Method using headspace solid-phase micro-extraction (HS-SPME) followed by gas chromatography-mass spectrometry. International Organization for Standardization, Geneva
- [7] Souza-Silva É. A., Gionfriddo E., Pawliszyn J., 2015. A critical review of the state of the art of solid-phase microextraction of complex matrices II. Food analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 71, 236-248
- [8] Ellison S.L.R., Thompson M., 2008. Standard additions: myth and reality. *Analyst* 133, 992–997
- [9] Zhu Y., Nakano K., Wang Z., Shikamori Y., Chiba K., Kuroiwa T., Hioki A., Inagaki K., 2018. Applications and Uncertainty Estimation of Single Level Standard Addition Method ICP-MS for Elemental Analysis in Various Matrix. *Analytical Sciences* 34, 701-710
- [10] Massif G., 2013. Final report on CCQM-K30.1: Lead in wine. *Metrologia* 50 08007
- [11] Peña R.M., Barciela J., Herrero C., García-Martín S., 2008. Headspace Solid-Phase Microextraction Gas Chromatography–Mass Spectrometry Analysis of Volatiles in Orujo Spirits from a Defined Geographical Origin. *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56, 2788–2794
- [12] Moncayo L. 2014. Caracterización de los piscos del Perú a través de su composición aromática. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.
- [13] Field M. P.; Cullen J. T., Sherrell R. M., 1999. Direct determination of 10 trace metals in 50 mL samples of coastal seawater using desolvating micronebulization sector field ICP-MS. *J. Anal. At. Spectrom.* 14, 1425–1431

- [14] Piñeiro Z., Palma M., Barroso C.G., 2004. Determination of terpenoids in wines by solid phase extraction and gas chromatography. *Analytica Chimica Acta* 513 (2004) 209–214
- [15] Karagiannis S., Economou A., Lanaridis P., 2000. Phenolic and Volatile Composition of Wines Made from *Vitis vinifera* Cv. Muscat Lefko Grapes from the Island of Samos. *J. Agric. Food Chem.*, 48 (11), pp 5369–5375
- [16] Castro-Vázquez L., Pérez-Coello M.S., Cabezudo M.D., 2003. Analysis of volatile compounds of rosemary honey. Comparison of different extraction techniques. *Chromatographia* 57, 227-233
- [17] Peña-Alvarez A., Capella S., Juarez R., Labastida C., 2006. Determination of terpenes in tequila by solid phase microextraction-gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1134, 291–297
- [18] Abilleira E., Mertxe de Renobales, Nájera A.I., Virto M., Ruiz de Gordo J.C., Pérez-Elortondo F.J., Albisu M., Barron L.J.R., 2010. An accurate quantitative method for the analysis of terpenes in milk fat by headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography–mass spectrometry. *Food Chemistry* 120, 1162–1169
- [19] Kupska M., Wasilewski T., Jędrkiewicz R., Gromadzka J., Namieśnik J., 2016. Determination of Terpene Profiles in Potential Superfruits. *International Journal of Food Properties*, 19:2726–2738
- [20] Bulletin 929. A Practical Guide to Quantitation with Solid Phase Microextraction. Supelco. Bellefonte
- [21] Ouyang G., Pawliszyn J., 2008. A critical review in calibration methods for solid-phase Microextraction. *Anal. Chim. Acta* 627, 184–197
- [22] Arvizu M., Lara J., Valle E., Horvat M., Jaćimović R., Zuliani T., Vreča P., Acosta O., Bennet J., Snell J., Almeida M., Cacicano de Sena R., Dutra E., Yang L., Li H., Chao J., Fisicaro P., Guillaume L., Yau M., Fung W., Aggarwal S., Soni D., Miyashita S., Uribe C., Buzoianu M., Konopelko L., Linsky M., Cankur O., Can S., Winchester M., Rabb S., Murphy K., Caceres G., Oduor Okumu T., 2017. Key Comparison CCQM-K127 “Contaminant and other elements in soil”. Final Report.
- [23] Garrido A., Martínez J., Fernández J., Romero-González R., 2009. Compensation for matrix effects in gas chromatography–tandem mass spectrometry using a single point standard addition. *Journal of Chromatography A*, 1216, 4798–4808
- [24] Fabregat-Cabello N., Zomer P., Sancho J., Roig-Navarro A., Mol H., 2016. Comparison of approaches to deal with matrix effects in LC-MS/MS based determinations of mycotoxins in food and feed. *World Mycotoxin Journal* 9 (2): 149-161

- [25] Altaki M., Santos F., Galceran M., 2007. Analysis of furan in foods by headspace solid-phase microextraction–gas chromatography–ion trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1146, 103–109
- [26] ISO 17025:2017 Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración. International Organization for Standardization, Geneva
- [27] JCGM 100:2008 GUM 1995 with minor corrections. Evaluation of measurement data - Guide to the expression of uncertainty in measurement. BIPM, Sevres
- [28] Guía CG 4 Eurachem/Citac. Guía de Cuantificación de la Incertidumbre en Medidas Analíticas. Eurachem. Traducida por Eurlolab, España
- [29] ISO 17043:2010 Conformity assessment - General requirements for proficiency testing. International Organization for Standardization, Geneva
- [30] <https://sisu.ut.ee/measurement/12-using-measurement-uncertainty-estimates-decision-making>. Capítulo 12 de curso virtual de estimación de incertidumbre de medición en análisis químico. Universidad de Tartu. Estonia.
- [31] Meyer V., Phohl J., Winter B., 2010. Calibration, handling repeatability, and the Maximum Permissible Error of single-volume glass instruments. *Accred Qual Assur* 15:705–708

