


aoxlab	Procedimiento de ensayo Determinación de Etanol en bebidas alcohólicas AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-250
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2024-12-05

Procedimiento de ensayo Determinación de Etanol en bebidas alcohólicas

AOXLAB S.A.S.

	Procedimiento de ensayo Determinación de Etanol en bebidas alcohólicas AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-250
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2024-12-05

DOCUMENTO CONTROLADO


PROC-TC-214 Procedimiento de ensayo de Determinación de Metanol en bebidas alcohólicas

Copia controlada No.: 1

	Nombre	Puesto o función	Firma	Fecha
Elaboró:	Brayan Ardila	Analista de Laboratorio		2024-11-20
Revisó:	Angela P. Patiño	Directora de Calidad		2024-12-04
Aprobó:	Jonatan Zárate Álvarez	Director Técnico		2024-12-05
Localización del documento:		Plataforma SGC		


Control de Cambios

Estado	Fecha de Inicio de vigencia	Revisión	Descripción del cambio realizado	Realizó	Revisó	Aprobó
Obsoleto	2023-01-10	1	Ninguno (versión original).	SVA	APPP	DPP
Vigente	2024-12-05	2	Se realiza ajuste a rango de calibración.	BAAD	APPP	JOZA

	Procedimiento de ensayo Determinación de Etanol en bebidas alcohólicas AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-250
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2024-12-05

ÍNDICE

1.	OBJETIVO Y ALCANCE.	4
1.1	Objetivo.	4
1.2	Alcance.	4
2.	DEFINICIONES Y NOTACIONES.	5
2.1	Definiciones.	5
2.2	Notaciones.	5
3.	REFERENCIAS.	6
4.	DESARROLLO	6
4.1	EQUIPOS DE MEDICIÓN.	6
4.2	CONDICIONES GENERALES	6
4.2.1	Inspección visual.	6
4.2.2	Estabilización.	7
4.2.3	Verificación de equipos.	7
4.3	Manejo de la muestra.	8
4.4	Medidas de seguridad.	8
4.5	Instrucciones De Ensayo.	8
4.5.1	Reactivos y/o soluciones	8
4.5.2	Preparación de la muestra:	9
4.5.3	Condiciones cromatográficas	10
4.6	Informe	11
4.7	Control de la calidad	12
5.	RESPONSABILIDADES.	13
5.1	Director técnico.	13
5.2	Director de Calidad.	13
5.3	Líder de Laboratorio.	13
5.4	Analista.	13
6.	FORMATOS RELACIONADOS.	13
7.	ANEXOS.	14

	Procedimiento de ensayo Determinación de Etanol en bebidas alcohólicas AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-250
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2024-12-05

1. OBJETIVO Y ALCANCE.

1.1 Objetivo.


Describir los pasos para realizar la determinación de etanol en bebidas alcohólicas de acuerdo con los parámetros establecidos en la AOAC 984.14 [2], así como con los requisitos establecidos por la norma ISO/IEC 17025:2017 [1].

1.2 Alcance.

Prueba o ensayo	Norma o método de referencia	Técnica o Método
Etanol en bebidas alcohólicas	AOAC 984.14 (Modificado)	Cromatografía Gaseosa acoplada masas-masas (Triple cuadrupolo)

Este método se aplica a las siguientes matrices:

- Cervezas
- Vinos
- Cocteles
- Aguardiente
- Ron
- Vodka
- Bebidas

	Procedimiento de ensayo Determinación de Etanol en bebidas alcohólicas AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-250
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2024-12-05

2. DEFINICIONES Y NOTACIONES.

2.1 Definiciones.

Calibración [4].

Operación que, bajo condiciones especificadas, en un primer paso, establece una relación entre los valores de las magnitudes con su incertidumbre de medición provista por patrones de medición y las indicaciones correspondientes con incertidumbres de medición asociadas y, en segundo paso, usa esta información para establecer una relación para obtener un resultado de medición de una indicación.

Desviación Estándar Relativa (DSR%) [4].

Estimador del grado de dispersión de medidas repetidas. Se calcula como

$$DSR \% = \frac{D.S.}{\bar{x}} \times 100$$

Donde D. S. es la desviación estándar de las réplicas y \bar{x} es el promedio de estas

Error relativo porcentual (E. R. %) [4].

Estimador del sesgo de una medición. Se calcula como

$$b\% = E.R.\% = \frac{\bar{x} - x_{ref}}{x_{ref}} \times 100$$

Donde x_{ref} es el valor teórico o aceptado como verdadero y \bar{x} es el promedio de estas

Ensayo/prueba [3].

Determinación de una o más características de acuerdo con un procedimiento

Procedimiento [3].

Forma especificada para llevar a cabo una actividad o un proceso.


2.2 Notaciones.

Para propósitos de este documento, se hacen las siguientes consideraciones:

“Laboratorio”: se refiere al laboratorio AOXLAB S.A.S.

“Servicios”: para referir a los servicios de ensayo que el Laboratorio ofrece.

“Ítem”: se refiere a los objetos o materiales bajo ensayo.

	Procedimiento de ensayo Determinación de Etanol en bebidas alcohólicas AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-250
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2024-12-05

3. REFERENCIAS.

- [1] ISO/IEC 17025:2017 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories / Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración.
- [2] AOAC 984.14 Official Methods of analysis "Ethanol in Beer"- EOMA Edition Online 2019.
- [3] ISO 9000:2015 Quality management systems -- Fundamentals and vocabulary/ Sistemas de gestión de la calidad-- Fundamentos y vocabulario.
- [4] VIM: 2012, International vocabulary of metrology -- Basic and general concepts and associated terms.

4. DESARROLLO

4.1 EQUIPOS DE MEDICIÓN.

Para realizar el ensayo se utilizan los siguientes equipos y componentes clave:


Equipos y materiales
Cromatógrafo de gases acoplado a masas-masas
Automuestreado AOC-6000
Columna capilar Rxi-624Sil MS 30m, 0.25 mmID, 1.40 µm df
Balones volumétricos de 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL, 25 mL, 50 mL y 100 mL
Transfer pipeta de 1 mL, 200 µL y 10 mL
Viales de vidrio de 2 mL
Vortex

4.2 CONDICIONES GENERALES

4.2.1 Inspección visual.

Al recibirse la muestra en el Laboratorio, ésta es inspeccionada a fin de asegurar que se garanticen las condiciones conforme lo indicado en el procedimiento PROC-TC-008 "Procedimiento de aseguramiento de integridad de los ítems bajo servicio".

Antes de iniciar el análisis, se debe verificar que la muestra se encuentra empacada y sellada herméticamente, y etiquetada con el sticker de identificación interna del

	Procedimiento de ensayo Determinación de Etanol en bebidas alcohólicas AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-250
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2024-12-05

laboratorio. Se debe contar con al menos 50 mililitros de muestra para realizar este análisis.

En caso de que la muestra no presente alguna de estas condiciones, informar de inmediato al líder comercial a través del Líder de Laboratorio.

4.2.2 Estabilización.

Los ítems de ensayo, patrones y controles de calidad deben atemperarse con suficiente antelación de tal manera que se encuentren en equilibrio térmico con el ambiente en el cual se ejecutarán los ensayos.


La balanza analítica y otros equipos electrónicos que realicen mediciones de alguna magnitud correspondiente a condiciones de influencia en la ejecución del ensayo deben encenderse por lo menos media hora antes de su uso. Así mismo, deben verificarse los equipos, de acuerdo con lo establecido en el numeral siguiente.

4.2.3 Verificación de equipos.

Antes de iniciar el ensayo, debe verificarse que el estado de funcionamiento de los equipos sea adecuado. Esto puede llevarse a cabo revisando que cuenten con la etiqueta de mantenimiento vigente y que estos no tengan alguna etiqueta que lo identifique como “Fuera de servicio”. Además, en el caso en el cual se lleve el control de uso, deben registrarse los últimos registros consignados en el formato FOR-TC-017, con el propósito de verificar que no se han registrado fallas en el funcionamiento. Si algún equipo es utilizado para la medición de alguna magnitud de influencia en el ensayo, este debe estar calibrado. Por tanto, se debe verificar la etiqueta de calibración adherida a este, y comprobar que se encuentre vigente.

Además de lo anterior, debe verificarse la fecha de expiración de los patrones, materiales de referencia y controles de calidad empleados en el ensayo con el fin de evitar el uso de materiales vencidos.

El cromatógrafo de gases acoplado a masas-masas, en caso de encontrarse apagado, se debe estabilizar el vacío que se genera en el espectrómetro de masas aproximadamente 12 horas para su correcto funcionamiento, esto se hace a través del *Software GCMS Real Time Analysis*. Asegurarse que no se tenga fugas en el sistema, verificar que el liner sea el adecuado para el análisis, en este caso el inserto split, el liner no puede estar despicado, parcialmente quebrado y mucho menos sucio, de ser así se debe de cambiar inmediatamente. Verificar el estado de la septa, esta no puede presentar deterioros aparentes, de igual manera la septa al igual que el liner se debe de cambiar aproximadamente cada 200 inyecciones, esto con el fin de prevenir fugas o contaminaciones. Se debe de realizar la verificación de la columna, verificar que la

	Procedimiento de ensayo Determinación de Etanol en bebidas alcohólicas AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-250
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2024-12-05

columna no se encuentra partida o quemada; se debe de verificar las conexiones de la columna con el inyector y/o detector.

4.3 Manejo de la muestra.

Las bebidas que se encuentren en la nevera para preservación se deben sacar con anterioridad y atemperar a 20°C. Si las muestras son gasificadas como es el caso de las cervezas, se debe de desgasificar la porción analítica, para esto se toma una cantidad de muestra y se lleva al sonicador por 10 minutos en la opción **DEGAS**, pasados los 10 minutos, se verifica la muestra y de ser necesario se somete a sonicación nuevamente.

4.4 Medidas de seguridad.

Durante el análisis tener en cuenta que se debe seguir el procedimiento aquí descrito sin modificar u omitir ningún paso.

Tener en cuenta las instrucciones dadas en el reglamento interno de trabajo PROC-GC-015 Reglamento Interno AOXLAB S.A.S, capítulo XIII.

4.5 Instrucciones De Ensayo.

4.5.1 Reactivos y/o soluciones

4.5.1.1 Etanol absoluto


4.5.1.2 n-Butanol (Estándar interno)

4.5.1.3 Agua Tipo I

Nota: Los reactivos deben ser grado reactivo cromatográfico

4.5.1.4 Preparación curva de calibración

Concentración %	Volumen etanol (µL)	Volumen de aforo con (mL)	Volumen estándar interno	Concentración estándar interno %
0.01	10	100	300	0.300

	Procedimiento de ensayo Determinación de Etanol en bebidas alcohólicas AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-250
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2024-12-05

0.05	50	100	300	0.300
0.10	100	100	300	0.300
0.30	300	100	300	0.300
0.50	500	100	300	0.300
1.00	1000	100	300	0.300
1.50	1500	100	300	0.300

Nota: El volumen de aforo se completa con agua Tipo I

4.5.1.5 Preparación estándar verificación curva

En un balón volumétrico de 100 mL adicionar 20 mL de agua Tipo I, adicionar 400 µL de etanol absoluto y 300 µL de n-Butanol, completar volumen con agua Tipo I.

4.5.1.6 Preparación estándar


En caso de realizar diluciones a las muestras, se debe preparar un estándar con la concentración aproximada de la muestra y se debe realizar la misma dilución. Adicionar un volumen adecuado del estándar interno para obtener una concentración de 0.3%. Por ejemplo: Si una cerveza tiene aproximadamente 4% de etanol, esta concentración se encuentra por fuera de la curva de calibración, por lo cual se debe de realizar una dilución. En este caso se puede realizar una dilución de 1 en 10, adicionando 10 mL de la muestra en un balón volumétrico de 100 mL y llevando a volumen con agua Tipo I. Antes de aforar, adicionar 300 µL del estándar interno.

El estándar se prepara entonces de la siguiente manera: en un balón volumétrico de 100 mL adicionar 4 mL de etanol absoluto y llevar a volumen con agua tipo I, esta solución se procesa igual que la muestra.

4.5.2 Preparación de la muestra:

Si la muestra presenta una cantidad de etanol **menor a 1.5%**, no se deben realizar diluciones. A 10 mL de muestra se adicionan **30 µL de n-butanol**, se homogeneiza y se filtra una cantidad a través de un filtro con poro de 0.45 µm. El filtrado se adiciona en un vial y se procede a la inyección en el cromatógrafo.

Si la muestra tiene un porcentaje de etanol **mayor del 1.5%** se deben de realizar diluciones. Para ello se puede seguir la siguiente tabla:

	Procedimiento de ensayo Determinación de Etanol en bebidas alcohólicas AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-250
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2024-12-05


Bebidas alcohólicas	% etanol	Factor de dilución
Cerveza	4.0	10
Vino Blanco	12.5	20
Vino Tinto	13.5	20
Baileys	17.0	20
Brandy	36.0	50
Ron Blanco	37.5	50
Ginebra rosa	37.5	50
Tequila	38.0	50
Ron negro	40.0	50
Vodka	40.0	50
Whisky	45.0	100
Ginebra blanco	47.3	100

en el caso de diluciones mayores a 10, realizar diluciones sucesivas y adicionar la cantidad necesaria de estándar interno para obtener la concentración de 0.3 %, el volumen de aforo se completa con agua Tipo I.

Una vez preparadas las muestras, se filtran a través de un filtro de poro de 0.45 µm y el filtrado es recolectado en un vial para posteriormente proceder a la inyección en el cromatógrafo.

4.5.3 Condiciones cromatográficas

GC Column:	Rxi-624Sil MS 30m, 0.25 mmID, 1.40 µm df	Flow Mode:	Velocidad linear constante (41.0 cm/s)
Inj. Mode:	Split	Interface Temp:	300 °C
Split:	50		
GC Oven Temp:	80 °C por 1 minuto, 12 °C / min hasta 150 °C por 1	Ion Source Temp:	230 °C

	Procedimiento de ensayo Determinación de Etanol en bebidas alcohólicas AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-250
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2024-12-05

minuto, 17.5 ° C / min
hasta 240 °, 10 ° C / min
hasta 270 ° C por 2 minutos.

Sample: 1 µL


El etanol y el estándar interno son determinados en el modo SIM, Las condiciones para la determinación fueron parametrizadas para cada compuesto con la ayuda del programa SmartDatabase de Shimadzu. Así mismo, las condiciones cromatográficas se encuentran parametrizadas en el Método “Etanol bebidas”.

4.6 Informe

Los resultados se analizan de la siguiente manera:

4.6.1 Registro de datos.

Los datos primarios relacionados con el procesamiento de la porción analítica serán registrados en el formato FOR-TC-113 “Formato para el registro de datos primarios de Etanol y Metanol en bebidas alcohólicas” el cual contiene la siguiente información:


	Formato para el registro de datos primarios de Etanol y Metanol en bebidas alcohólicas					Identificación:	FOR-TC-113
						Revisión:	1
						Inicio de vigencia:	2023-01-07
⁽¹⁾ Realizó	⁽⁵⁾ Lote Etanol:	⁽⁹⁾ EQUIPOS USADOS EN EL ANÁLISIS			⁽¹⁰⁾ Almacenamiento del registro	⁽¹¹⁾ Consecutivo N°	
⁽²⁾ Fecha inicio:	⁽⁶⁾ Lote n-butanol:	Equipo/N° Inventario	GC-MS (425)		Archivador SGC / 113		
⁽³⁾ Hora inicio:	⁽⁷⁾ Fecha final:	Equipo/N° Inventario	Automuestreador (427)				
⁽⁴⁾ Análisis:	⁽⁸⁾ Hora final:	Equipo/N° Inventario					
⁽¹²⁾ Id Muestra	⁽¹³⁾ Volumen de muestra (mL)	⁽¹⁴⁾ Volumen aforo (mL)	⁽¹⁵⁾ Factor de dilución	⁽¹⁶⁾ Volumen estándar interno (µL)	⁽¹⁷⁾ Concentración STDI (%)	⁽¹⁸⁾ Reporte	⁽¹⁹⁾ Observaciones

4.6.2 Cálculos.

La concentración de etanol en las muestras, es calculada automáticamente por el software, cargando el método con su respectiva curva de calibración.

Los resultados son calculados de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$C_p = \frac{A/A_{stdi} + I}{m} * FD * C_{stdi}$$

	Procedimiento de ensayo Determinación de Etanol en bebidas alcohólicas AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-250
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2024-12-05


C_p: Concentración etanol en %
A: Área del pico
AS: Área del estándar interno
I: Intercepto de la curva
m: Pendiente de la curva
FD: Factor de dilución
Cstdi: Concentración del estándar interno

4.7 Control de la calidad

El tipo, periodicidad y criterios de aceptación para los resultados obtenidos de los ensayos para el control de calidad se resumen en la tabla siguiente:

CONTROL	PERIODICIDAD	CRITERIO
Blanco de reactivos.	Cada que se realice un cambio de lote en los reactivos de extracción.	Menor o igual a la mitad del límite de cuantificación.
Estándar de verificación de la curva	Cada que se realice el análisis	El R% debe estar entre 90-110% del valor teórico.
Estándar	Cada que se realice el análisis	El R% debe estar entre 90-110% del valor teórico.
Duplicado de muestra	Cada que se realice el análisis	El R% debe estar no debe superar el 7%.
Material de referencia certificado MRC*	Trimestral	El resultado del ensayo debe estar en el intervalo de valores establecidos como aceptables en el certificado del material

*El material de referencia será utilizado si se encuentra disponible en el mercado. De igual manera se puede realizar el análisis con muestras retenidas, como por ejemplo pruebas interlaboratorio.

	Procedimiento de ensayo Determinación de Etanol en bebidas alcohólicas AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-250
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2024-12-05

El seguimiento de los resultados obtenidos del control de calidad listado en la tabla control debe realizarse y analizarse mediante el uso de cartas control, de acuerdo con los lineamientos establecidos en el procedimiento PROC-TC-077.

Estos datos son registrados en el cuadro de mando SOFT-TC-082 "Cuadro de mando para el registro de Etanol y metanol en bebidas alcohólicas".

5. RESPONSABILIDADES.

5.1 Director técnico.

Asegurar la aplicación del presente documento y tomar decisiones en casos especiales no contemplados.

Aprobar los informes técnicos una vez han sido revisados por el Líder de Laboratorio.

5.2 Director de Calidad.

Asegurar la aplicación del presente documento

5.3 Líder de Laboratorio.

Asegurar la aplicación del presente documento por el personal subordinado o supervisado.

Revisar los resultados ingresados por el analista, haciendo seguimiento de la trazabilidad del análisis.

5.4 Analista.

Aplicar el presente documento.

6. FORMATOS RELACIONADOS.

SOFT-TC-082 "Cuadro de mando para el registro de Etanol y metanol en bebidas alcohólicas."

FOR-TC-113 "Formato para el registro de datos primarios de Etanol y Metanol en bebidas alcohólicas".

aoxlab	Procedimiento de ensayo Determinación de Etanol en bebidas alcohólicas AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-250
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2024-12-05

7. ANEXOS.

No aplica.