

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO - FACULTAD DE FARMACIA

LABORATORIO DE ANALISIS QUIMICO
Y BROMATOLOGIA - TOXICOLOGIA

APLICACION DE LA CROMATOLOGRAFIA
EN FASE DE VAPOR AL ANALISIS DE
AGUARDIENTES Y LICORES

M E M O R I A

QUE PARA ASPIRAR AL GRADO DE
DOCTOR EN FARMACIA

PRESENTA

JESUS SIMAL LOZANO

SANTIAGO

1 9 6 4



~~Q.A.V. 27~~

FATS-1964/5

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA DE SANTIAGO



00140050

ESTUDIO DE LA GEOGRAFIA
EN PAIS DE NACER AL MUNDO DE
LOS ARABES Y LOS TURCOS

MEMORIA

DEL COMITÉ DE ESTUDIOS
DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO

~~1179~~





R.5572

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO - FACULTAD DE FARMACIA
LABORATORIO DE ANALISIS QUIMICO
Y BROMATOLOGIA - TOXICOLOGIA

APLICACION DE LA CROMATOLOGRAFIA
EN FASE DE VAPOR AL ANALISIS DE
AGUARDIENTES Y LICORES

M E M O R I A

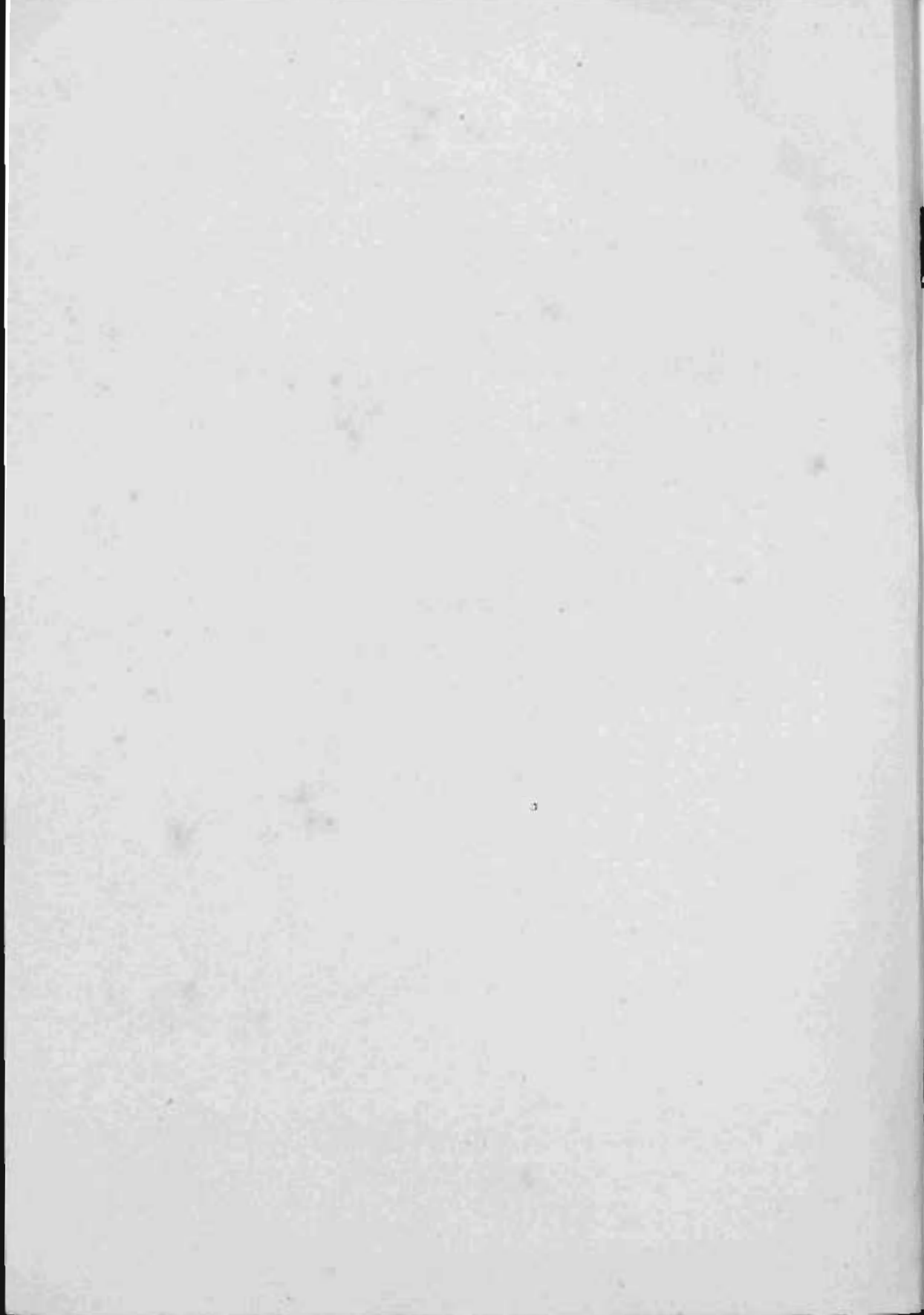
QUE PARA ASPIRAR AL GRADO DE
DOCTOR EN FARMACIA

PRESENTA

JESUS SIMAL LOZANO

SANTIAGO

1 9 6 4



APLICACION DE LA CROMATOGRAFIA EN FASE DE VAPOR AL ANALISIS DE AGUARDIENTES Y LICORES

Por JESÚS SIMAL LOZANO

Laboratorio de Análisis Químico y Bromatología-Toxicología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Santiago y

Sección de Química Analítica Bromatológica (C. S. I. C.) de Santiago.
DIRECTOR: PROF. DR. A. CHARRO ARIAS

SUMMARY

The present work summarizes: a commentary about the composition of the spirituous beverages and the procedures of analysis utilized today in its control; a short theoretical summary about the gas-chromatography and the application of this technical to the problems that are present in the analysis of the brandies; finally the study of different types of Spanish and Foreign beverages, making use of Fractometer Perkin-Elmer mod. 116 E, equipped with hot wire detector of which were obtained some interesting analytical conclusions.

Also there is described a proceeding to determine quantitatively and simultaneously the different components of the beverages, indicating as an example the quantitative determination of methanol and of ethanol, making use in this case of a personal modification of the backflushing system.

Last there is made a study of the origin of methanol in grape brandies as well as the possibility of reducing the contents these beverages in said component making use of the fractionated distillation.

INTRODUCCIÓN

Las bebidas espirituosas, integran un amplio capítulo de la Bromatología; en ella se incluyen, como alimentos energéticos, dado su elevado contenido en etanol. La acción beneficiosa de las mismas, depende, como la de otros alimentos, de la cantidad ingerida, pues un consumo copioso puede traer consigo enfermedades como el alcoholismo. Otro aspecto a señalar es la diferente toxicidad aguda que pueden presentar, consecuencia, no sólo de su contenido en etanol, sino también de la proporción, más o menos elevada, de otros componentes: propanol, iso-butanol, etc.

El análisis de estos alimentos, constituye, dada su gran complejidad, un serio problema para el químico-analista encargado de su control, que se contenta en la mayoría de los casos, con obtener una serie limitada de datos con carácter

de «índice», para poder calificarlos. Consecuencia de ello, en la escasa bibliografía española dedicada al tema (1, 2, 3, 4), se observa la ausencia de información acerca de los componentes «minoritarios», cuya presencia y cuantía es de gran interés, ya que su conocimiento permitiría establecer su origen, genuinidad, envejecimiento, etc., o por el contrario, la existencia de fraudes. Todo esto nos hizo pensar en la conveniencia de aplicar la moderna técnica de la cromatografía de gases a la resolución de tales problemas.

A tal fin, tras largos y a veces desesperanzadores intentos de montaje y puesta a punto de la técnica, hemos logrado el análisis de estas bebidas, obteniendo resultados que son el motivo de nuestra tesis doctoral.

Antes de proceder a la exposición de nuestra labor, queremos indicar que no pretendemos hacer un estudio exhaustivo, ya que sería ilimitado y alargaría demasiado nuestro trabajo, por lo que nos concretaremos a determinar los componentes volatizables que consideramos más importantes.

Así mismo, hemos de señalar, que nuestro estudio ha sido realizado con un cromatógrafo equipado con detector de conductividad térmica, lo cual limita la sensibilidad y supone algunos inconvenientes para estos análisis, que más adelante expondremos.

También, por ser este método analítico de reciente introducción, y no haber encontrado bibliografía en español, haremos un resumen del fundamento y práctica del mismo, al objeto de facilitar nuestra exposición.

AGUARDIENTES Y LICORES. DEFINICION, COMPOSICION Y ANALISIS

DEFINICIÓN.

En España, según el artículo quinto del Decreto de 8 de septiembre de 1932 (5) «Se llamarán aguardientes, en términos generales y sin perjuicio de su distinción arancelaria en simples y compuestos, los productos obtenidos por destilación directa de un líquido cualquiera que haya sufrido previamente la fermentación alcohólica y que no exceda de 80 grados, o la mezcla de alcohol etílico con agua en diversas proporciones, en presencia de anís o no, aromatizados o no, endulzados o no con sacarosa o azúcar ordinario y coloreados o no con caramelo puro de azúcar».

Y según el artículo sexto, del mismo Decreto, «Se denominarán licores a los alcoholes destinados a la alimentación, aromatizados por maceración o destilación en presencia de diversas sustancias vegetales o preparados por la adición a dichos alcoholes de esencias, en presencia de alcohol o de agua, o por empleo combinado de estos procedimientos; endulzados o no por medio del azúcar, glucosa de uva o miel y coloreado o no con sustancias inofensivas».

COMPOSICIÓN Y ANÁLISIS.

Tanto unas como otras bebidas, se caracterizan por poseer alcohol etílico y agua en gran cantidad, así como pequeñas cantidades de diversos componen-

tes, en su mayoría volátiles, capaces de contribuir al «bouquet», amén de otras sustancias, entre las que figuran las extraídas de la madera en el proceso de maduración o envejecimiento (caso del coñac, whisky, etc.).

Su exacta composición no está aún bien esclarecida y son muchos los autores que, al estudiar las mismas bebidas, encuentran diferencias notables, tanto en su composición cualitativa, como en la cantidad de cada componente (véanse las tablas de composición que figuran más adelante).

Cuando se trata de bebidas artificiales, la composición difiere notablemente de las naturales, ya que se elaboran a base de alcohol de diversas procedencias y de esencias en las que no figuran todos y cada uno de los componentes de los productos naturales; a título de ejemplo, a continuación damos una fórmula de esencia de coñac tomada del Jacobs (6): acetato de etilo, nitrito de etilo y aceite de fúsel de vino.

Para la investigación y/o determinación de estos componentes vienen utilizándose una serie de métodos físicos y químicos, que denominaremos clásicos, en los que, las más de las veces, ante la imposibilidad de identificar o valorar un componente determinado, se investigan, conjuntamente, los de naturaleza afín, por lo que, el resultado puede tener valores similares en aguardientes de composición diferente; esto ocurre en la dosificación de alcoholes superiores, esterés, aldehídos, etc., haciéndose imposible la tipificación de una bebida.

Por considerarlo de interés, ya que en ciertos casos los hemos aplicado, comentaremos, someramente, los métodos clásicos que vienen utilizándose en estos análisis. Igualmente, para cada componente que a continuación estudiaremos, indicaremos, de manera breve, su origen y daremos las cifras que han encontrado otros autores como normales en estas bebidas.

ETANOL.

Como es sabido, esta sustancia se origina en la fermentación alcohólica de diferentes azúcares bajo la acción de levaduras.

La cantidad presente en las bebidas —expresada en España en grado alcohólico, o porcentaje de alcohol, en volumen, a la temperatura de 15° C. es muy variable; desde las de más baja graduación (anis, cremas de licor, etc.) que tienen unos 30 grados, hasta otras de elevado porcentaje en etanol (como ocurre con diversas suertes de ron) que pueden alcanzar hasta 80 grados, se encuentran todos los valores intermedios (coñac, whisky, etc.) (7).

Para su determinación, existen numerosos métodos físicos en los cuales es preciso realizar una destilación previa que permita eliminar los otros componentes. En el destilado hidroalcohólico obtenido, se dosifica el etanol, ya mediante alcohómetros sensibles (8), ya por medida de su densidad (picnometría, balanza de Mohr-Westphal, etc.) y el empleo de tablas que relacionan esta constante física con el contenido en etanol (9). Hay que señalar, que para lograr resultados exactos con estos procedimientos, sería necesario que la mezcla hidroalcohólica obtenida en la destilación careciese de los componentes «minoritarios» (acetaldehído, metanol, propanol, etc.) circunstancia que en la práctica es

imposible de alcanzar, debido, unas veces, a la alta volatilidad de estos componentes, y otras, a la formación de mezclas azeotrópicas.

Mayor exactitud puede lograrse si la destilación se hace en presencia de un álcali, el cual descompone los ésteres, fija los ácidos libres y actúa sobre los aldehídos, con lo que parte de las impurezas a que antes nos referíamos, son eliminadas (10).

Cuando la cantidad de destilado es pequeña, cabe emplear el método refractométrico (11) o métodos químicos similares a los utilizados para vinos (12). Estos últimos se basan en la oxidación del etanol a ácido acético, por mediación, casi en todos los procedimientos, del bicromato potásico en medio ácido, y posterior valoración del exceso de reactivo, ya por colorimetría, ya por yodometría, ya mediante sulfato ferroso amónico.

Otros métodos, basados en la extracción del alcohol por solventes no miscibles con el agua, y posterior medida del volumen ocupado por el mismo (13) no dan resultados exactos, por lo que no son aconsejables.

METANOL

Durante muchos años se ha considerado que, la presencia del alcohol metílico en las bebidas espirituosas, era debida solamente a un fraude consistente en la adición de alcohol metílico puro o de alcoholes desnaturalizados conteniendo metanol; sin embargo, hoy día, tal criterio no es sostenible, ya que por diversos autores: Bertrand y Silberstein (14), Fellenberg (15), Trillat (16), etc., etc., se ha podido comprobar que es un componente natural en la mayoría de las bebidas alcohólicas, por originarse en procesos de hidrólisis de materias pécicas, bajo la acción de la pectasa existente en los jugos de los diversos frutos utilizados para su elaboración. Su porcentaje depende de la naturaleza del fruto (17), de la clase de uva (18) y del tiempo de permanencia del hollejo y pulpa en el líquido, durante el proceso de elaboración (18).

Leyte (19) ha sugerido que en los aguardientes de orujo, cierta proporción del metanol sería debida a un proceso de destilación seca del raspón, hollejo, etc.

En el cuadro número 1 figura el contenido en metanol de diversas bebidas espirituosas. También se incluyen algunos vinos, dado que de ellos se obtienen, por destilación, algunas de aquéllas.

Como puede observarse, en el cuadro a que nos estamos refiriendo, existen bebidas donde el metanol no ha sido encontrado o aparece con la indicación de «trazas» (ron, vodka, etc.); en los vinos y coñac hay grandes variaciones, aun que sus valores suelen ser bajos; y en los aguardientes de orujo también hay grandes diferencias de unos a otros, pero las cifras, en todos los casos, son superiores al 1 por 1.000.

Morris B. Jacobs (20) señala que una pequeña cantidad de metanol es inherente a todo brandy auténtico y marca un contenido inferior al 0,05 por 1.000 como cifra normal. Este mismo autor da para los aguardientes de frutas un contenido en metanol del 5 al 10 por 1.000.

CUADRO NUMERO 1

Contenido en metanol de diferentes bebidas

PROCEDENCIA	Naturaleza	Autor	Metanol (c. c./litro)
Acqui (Italia)	Aguardiente de orujo	Lab. Chim. C. Dogane	2.9
Calamandrana	id.	id.	4.9
Toscolano	id.	id.	5.3
Dolce Acqua	id.	id.	1.0
Ostra	id.	id.	2.6
Bagnoli di Sopra	id.	id.	5.0
Montagnana	id.	id.	4.4
Galicia (Rúa Petín)	id.	Leyte Marrero	3.9
Desconocida	id.	Á. Castille	5.7
Desconocida	id.	id.	4.1
Charenta	Coñac	P. Valaer	0.2
Armañac	id.	id.	0.3
California	id.	id.	0.5
California	id.	id.	0.9
Desconocida	Aguardiente de vino	A. Castille	0.3
Desconocida	id.	id.	0.2
Desconocida	Aguardiente de azúcar	id.	negativo
Desconocida	Aguardiente sem. fruta	id.	4.8
Desconocida	Aguardiente de granos	id.	negativo
Desconocida	Aguardiente de vino	id.	0.2
Ostra	id.	Lab. Chim. C. Dogane	trazas
Varsovia	Vodka	Jacobs	trazas
Francia	Vitis vinífera	Flanzy	0.3 (x)
Francia	Híbridos	id.	0.2 (x)
Francia	Blanco	Bertrand y Silberstein	0.1 (x)
Francia	Rojo	id.	0.2 (x)
Francia	Vitis vinífera	Amiel, Nurtz y Puisais	0.2 (y)
Francia	Híbridos	id.	0.5 (y)

(x) Los valores así marcados han sido calculados dividiendo por la densidad del metanol a 15° C. (0.7959), los gramos/litro encontrados en la bibliografía.

(y) Estos valores han sido hallados dividiendo el metanol en gramos/100 de alcohol, por la referida densidad, y se ha supuesto que los vinos contenían 10%.

Un aspecto interesante a considerar, al hablar de este componente, es su toxicidad, por lo que, a fin de hacer algunos comentarios acerca de la misma, reproducimos un cuadro (núm. 2) con la toxicidad, para el gato, de distintos alcoholes administrados por vía intravenosa.

Como puede notarse, en dicho cuadro se cumple la regla general de que la toxicidad aumenta con el peso molecular para los miembros de una misma serie. También es de señalar que los alcoholes de cadena normal son más tóxicos que sus isómeros de cadena ramificada.

Según el cuadro 2, el alcohol metílico es el de menor toxicidad, pero, sin

embargo, a dosis pequeñas y repetidas resulta mucho más peligroso. Esta contradicción se explica por su lenta eliminación, ya que, como ha demostrado Nicloux y Placet (21), mientras el etanol (en experiencias con diferentes animales) se elimina dentro de las veinticuatro horas, el metanol persiste varios días (más de cinco días en el caso del perro).

Por otro lado este alcohol, incluso a dosis relativamente bajas, presenta tendencia a localizarse en el nervio óptico, produciendo trastornos oculares (dismi-

CUADRO NUMERO 2

Toxicidad comparada de los alcoholes

Metanol	0,8
Etanol	1,0
Propanol	2,5
Isopropanol	2,0
Butanol	16,5
Isobutanol	5,5
Alcohol amílico	33,2
Alcohol iseamílico	19,2

Estas toxicidades han sido calculadas por inyección intravenosa en el gato (según «Leçons de Toxicologie» (21).

nición de la agudeza visual, etc.) (22), mientras que el etanol se distribuye, casi por igual, en la totalidad de los órganos (23).

Dada la toxicidad de este componente, la legislación de muchos países señala la cifra límite de su contenido en las bebidas. En el cuadro número 3 puede observarse que la cantidad autorizada en España es bajísima comparada con la de otros países, y un límite tan bajo entre nosotros, origina la circunstancia curiosa de que, la casi totalidad de las bebidas espirituosas genuinas, españolas y extranjeras, son ilegales.

La determinación del contenido en metanol en los aguardientes, o en general, en las bebidas alcohólicas, presenta ciertas dificultades debido a las parecidas propiedades físicas y químicas que tiene con el etanol; no obstante, en la actualidad se dispone de buenos métodos químicos, en su mayor parte basados en la oxidación del metanol a aldehído fórmico y posterior caracterización de éste. Las condiciones de los métodos son tales que el etanol no interfiere.

De los procedimientos utilizados comentaremos los dos que creemos de mayor importancia: el método de Denigés (24) se basa en la oxidación del metanol mediante permanganato potásico en medio ácido y posterior caracterización del formaldéhidó con el reactivo de Schiff (fuschina bisulfitada). Para la determinación cuantitativa se prepara una escala de testigos con cantidades conocidas de metanol. En esta técnica, el etanol que haya podido formarse, no interfiere, siempre que la lectura se realice a las cinco o seis horas (24). El método, actualmente muy en uso entre nosotros por circunstancias harto conocidas, no está

CUADRO NUMERO 3

Valor máximo de metanol en bebidas espirituosas marcado por diferentes países (las cifras corresponden a grs./litro)

Argentina	1
Bélgica	2
Italia	20
España	0,05

exento de posibles causas de error, que consideramos de interés señalar, pues precisamente, creemos son el origen de las discrepancias encontradas entre los analistas al efectuar estas determinaciones.

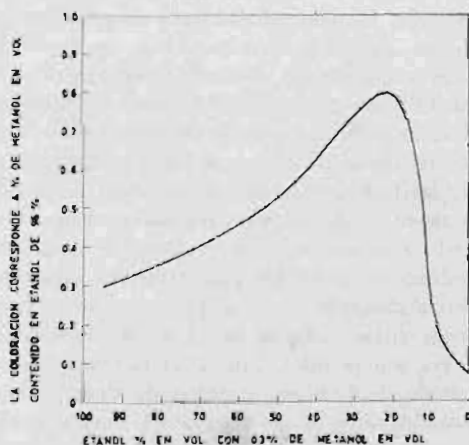


Fig. 1.

En primer lugar como ha podido comprobar Fellenberg (25), el color desarrollado no aumenta de manera proporcional al contenido en metanol, sino más intensamente, por lo que hay que evitar las extrapolaciones y utilizar, para cada caso, testigos que tengan un contenido en metanol muy próximo al del problema.

En segundo lugar hay que señalar el fenómeno observado por Jekliński (26) acerca de la influencia del contenido en etanol en la intensidad de color que se produce con la fucsina bisulfatada (fig. 1), razón por la cual se hace absolutamente preciso que los testigos y el problema contengan la misma proporción en volumen de alcohol etílico; de aquí nace la necesidad de conocer la riqueza alcohólica del problema y posteriormente preparar testigos, de diferente contenido en metanol, pero de riqueza en etanol igual a la del problema, cual se hace en el método propuesto por Casares (27); o bien, diluir los problemas a

una concentración alcohólica preestablecida que es también la existente en la escala de testigos, como aconseja Villavecchia (24).

Otra causa de error que puede originarse en la preparación de los testigos es ocasionada al emplear alcohol absoluto conteniendo metanol, que, generalmente, no se declara por los fabricantes; en estas condiciones, el color de los testigos resulta más intenso del que correspondería a su contenido real escalar, con lo cual, bebidas que tienen cifras notables de metanol, pasan a ser consideradas como de menor riqueza.

Si la bebida tuviese aldehidos libres el color desarrollado sería debido, tanto al formaldehído procedente de la oxidación del metanol, como a estos aldehidos; por dichas razón, es aconsejable hacer un ensayo previo de aldehidos y, en caso positivo, proceder a su eliminación por extracción con éter de petróleo, previa dilución de la bebida con agua saturada de cloruro sódico (28).

El segundo método, de los dos a que antes nos hemos referido, es debido a Boos (29), y se basa en la reacción cromática del aldehído fórmico con el ácido cromotrópico. Este método, ha sido señalado por Eegrave (30) y Keinert y Sre-pal (31), como específico del formaldehído incluso en presencia de otros aldehidos: acetaldehído, propionaldehído, *n*-iso-butialdehído, etc.

La Association of Official Agricultural Chemists, en la novena edición de sus métodos de análisis lo incluye como oficial (32).

La reacción se efectúa oxidando el metanol con solución de permanganato en medio ligeramente ácido (fosfórico) a una temperatura de 0° C., durante media hora; después se destruye el exceso de oxidante mediante bisulfito sódico en sustancia, y se procede a añadir solución reciente de ácido cromotrópico al 5 por 100 y ácido sulfúrico concentrado, manteniendo durante quince minutos en baño maría la mezcla resultante, con lo que se origina, en caso positivo, una coloración más o menos violácea. La posterior lectura espectrofotométrica a una longitud de onda de 575 μ permite dosificar el metanol. En este caso, al igual que ocurría en el método de Denigés, es necesario determinar el grado alcohólico del problema a fin de diluirlo de manera que quede comprendido entre 5 y 6 por 100. También es preciso que el porcentaje de metanol en el líquido a oxidar, sea próximo a 0,05 por 100, a cuyo objeto o bien se diluye el problema mediante alcohol etílico de 5,5 por 100 o se le concentra por destilación.

Según los estudios de Rankoff, Popoff y Jovtscheff (33), este método del ácido cromotrópico, permite determinar cantidades de metanol desde 0,01 a 8 ml./l., mientras que el método de Denigés sólo da buenos resultados para concentraciones de metanol de 0,1 a 10 ml./l.

El método refractométrico (34), se ve influenciado por la presencia de otros alcoholes (recuérdese que existen procedimientos refractométricos para determinar al etanol y al isopropanol) (35, 36), por lo que sus resultados no son exactos.

ALCOHOLS SUPERIORES (Aceite de fusel).

Se denominan así los alcoholes de peso molecular más alto al del etanol, sean o no de su serie homóloga. Su presencia en las diferentes bebidas es debida

a fermentaciones secundarias, y al parecer, proceden de los aminoácidos. Las teorías dadas para la explicación de su presencia en los vinos y consecuentemente en sus destilados, son varias. En una de ellas, los alcoholes se consideran originados por las bacterias que acompañan a las levaduras; sin embargo, si estos alcoholes fueran ocasionados por contaminaciones bacterianas, su aparición sería esporádica, como ocurre con el n-butanol (37).

Otros autores, entre los que se cuenta Ehrlich (38), explican que, en la mayoría de los casos, los alcoholes superiores son productos de catabolismo de ciertos aminoácidos, pues si a un líquido en fermentación alcohólica se le adiciona un poco de valina, ésta se transforma en isobutanol, la leucina en amílico inactivo y la isoleucina en amílico activo; parece ser, por tanto, que la levadura transforma los aminoácidos en alcoholes de n-1 átomos de carbono. No obstante, ello no prueba que ésta sea la única vía de formación de dichos alcoholes, ya que, como ha demostrado Castor y Guymon (39) fermentando un mosto de uva conteniendo algunos centigramos de estos aminoácidos, se obtienen algunos decigramos de los pentanoles, lo cual no sería lógico admitiendo únicamente la teoría de Ehrlich.

Por otro lado, como indica Genevois (37), existen cinco alcoholes citados como componentes normales en las bebidas, que no pueden derivar de aminoácidos, estos son: el n-propanol, que sería originado por la butilalanina, aminoácido que no existe ni en las levaduras, ni en los mostos, ni en ninguna proteína animal o vegetal; el hexanol, que debería provenir del ácido α -aminoheptanoico, que no existe; y tres alcoholes secundarios, el isopropanol, el sec-butanol y el metil-3 butanol-2.

En el cuadro número 4, figuran las cantidades totales de alcoholes superiores halladas por diversos autores, en análisis de diferentes bebidas espirituosas. Como puede observarse, estos valores globales no permiten la tipificación de las bebidas.

En cuanto a su determinación, cabe indicar que el procedimiento utilizado oficialmente entre nosotros es el método de Röse (40), basado en medir el aumento que experimenta un volumen establecido de cloroformo al ser agitado con un determinado volumen del problema, previamente destilado, diluido a una riqueza alcohólica del 30 por 100 en volumen, y acidulado con sulfúrico adecuadamente. Este incremento es superior al que se obtiene agitando, en idénticas condiciones y con los mismos reactivos, la mezcla formada tan sólo por etanol y agua al 30 por 100 en volumen. El método da cifras con carácter de índice, pero nada nos dice acerca de los alcoholes superiores que pueden estar presentes. De otro lado, como ha sido probado por Moreno Martín (41), y Clavera y Moreno (42), el contenido en metanol contribuye a modificar notablemente los resultados, obteniéndose valores más bajos a medida que aumenta el porcentaje en metanol, lo cual viene a confirmarnos su poca evaluación.

Estamos de acuerdo en que como la legislación actual no tolera sino un 0,05 gramos de metanol por litro, la influencia de esta cantidad en el método de Röse sería despreciable, pero la realidad es que, como quedó aclarado anteriormente, en la mayoría de las bebidas existe una cierta proporción de metanol bastante superior a este límite, que incluso puede llegar a ser cien veces

mayor (caso de los aguardientes de orujo que contengan un 5 por 1.000), por lo cual al aplicar el método de Röse, sin tener en cuenta la corrección por este componente, resultaría, de acuerdo con las conclusiones de Clavera y Moreno (42), una cifra de alcoholes superiores aproximadamente cien veces menor.

Otros métodos colorimétricos para determinación del aceite de fúsel se basan en la condensación de estos alcoholes con un hidroxialdehído aromático, tal como el aldehído salicílico, vanilina, etc. (reacción de Komarowsky) (43).

CUADRO NUMERO 4

Contenido en alcoholes superiores de diferentes bebidas

PROCEDENCIA	Naturaleza	Autor	Alc. superiores en mg./100 de alcohol anhidro
Acqui	Aguardiente de orujo	Lab. Chim. C. Dogane	250 (*)
Calamandrana	id.	id.	340 (*)
Ostra	id.	id.	470 (*)
Toscolana	id.	id.	500 (*)
Francia	Cofiac	Corad y Cumasse	166
Francia (Gran Champagne)	id.	id.	347
Francia (gran marca de 70 años)	id.	Lab. Chim. C. Dogane	497
Charenta	id.	P. Valaer	89
Armañac	id.	id.	96
Ostra	Aguardiente de vino	Lab. Chim. C. Dogane	350
Cuba	Ron	P. Valaer	73
Jamaica	id.	id.	62
Desconocida	Ron artificial	Mohler	8
Desconocida	Ginebra	Royal Com. an Whisky	157
Desconocida	id.	id.	105
Polonia	Vodka	Jacobs	1,8
Rusia	id.	id.	4,5
Varsovia	id.	id.	1

(*) Por el método colorimétrico de Reques.

El método de la Royal Commission on Whisky and Potable Spirit se funda en el color desarrollado al condensarse el furfural y los alcoholes superiores en medio sulfúrico (44).

La A. O. A. C., en su edición de 1960, propone un método basado en el color aparecido al condensarse los alcoholes superiores con paradietilaminobenzaldehído en medio sulfúrico (35).

Sin embargo, las cifras encontradas por estos procedimientos (cuadro número 4) tienen el inconveniente de que no permiten conocer a todos y cada uno de los alcoholes que integran el aceite de fúsel, y dado el interés que supone, por una parte comprobar la presencia de estos alcoholes debido a su diferente toxicidad (véase cuadro número 2) y, por otra, el poder tipificarlas, es recomendable buscar un método capaz de identificarlos aisladamente, permitiendo incluso su determinación cuantitativa.

CUADRO NUM. 5

NATURALEZA	A U T O R	n-propanol	n-butanol	sec-butanol	isobutanol	amílicos
Cóñac Charenta	Claudon y Morin (x)	27,3	—	—	6,5	190
Cóñac	Ordonneau (y) ...	48,1	199,9	—	18,5	139,5
Aguardiente de Surgères	— (y) ...	46,2	0	—	11,1	324,6
Cóñac	Ordonneau (x) ...	40,0	219	—	—	84
Fúsel de vino	Webb col. (1952)	4,1	1,9	4,9	18,3	54

(x) Referido en mg. por 100 de bebida.

(y) Referido por 100 de alcohol absoluto.

El estudio de cada alcohol en particular presenta serias dificultades debido a la falta de reacciones específicas y, como señala Genevois (37), únicamente los métodos de cromatografía en fase de vapor pueden ser útiles. Algunos autores, a pesar de los inconvenientes señalados, lo han identificado y valorado por métodos químicos (cuadro número 5).

El único alcohol superior que con relativa frecuencia se determina es el isopropanol, y los métodos de identificación propuestos, por lo general, se basan en oxidarlo a acetona y posterior reconocimiento de la misma por la reacción de Denigés, de Legal, de Penzoldt, etc. (véase más adelante acetona). Como es lógico, este ensayo no tendría valor si en el problema existiera acetona, en cuyo caso antes de realizar la oxidación habría que eliminarla mediante paraformaldehído (45). Cabe indicar, como señala Durodie y Roelens (46), que el procedimiento que usa la reacción de Denigés no es el más adecuado, ya que es común a todos los alcoholes secundarios.

Para el n-propanol, n-butanol, isobutílico, butanol-2, alcoholes amílicos, hexanol, etc., principales alcoholes superiores citados como componentes normales en estas bebidas, no hemos encontrado procedimientos de investigación directa en ellas.

ALDEHIDOS

De los aldehidos que se han señalado como componentes de las bebidas alcohólicas destaca el acetaldehido y, en menores cantidades, el hidroximetilfurfuro, el furfuro y otros aldehidos superiores (47), pero como en las condiciones de trabajo desarrollado por nosotros sólo es posible poner de manifiesto al etanal, nos referiremos a él exclusivamente.

El acetaldehido se origina en la descarboxilación del ácido pirúvico y pasa rápidamente por reducción a etanol. Su cantidad varía según el tipo de bebida y grado de envejecimiento, por lo que se comprende el interés de su dosificación aislada.

A los métodos químicos utilizados para la determinación de aldehidos les ocurre otro tanto que a los propuestos para los alcoholes superiores, pues como en aquel caso, nos dan una cifra del contenido global que nada indica acerca de los diferentes aldehidos (cuadro número 6).

No obstante, puede valorarse el acetaldehido aisladamente si se hace una destilación previa, ya que este componente, sumamente volátil (21°C.), pasa en las primeras porciones. En el destilado se realiza su dosificación por diversos métodos (48)

CUADRO NUM. 6

Contenido en aldehidos de diferentes bebidas espirituosas

PROCEDENCIA	NATURALEZA	A U T O R	Aldehidos en mg./100 c. c. de alc. anhidro
Acqui	Aguardiente de orujo	Lab. Chim C. Dogane	166
Calamandrana	id.	id.	182
Ostra	id.	id.	264
Desconocida	Coñac	Möhler	10
Desconocida (artificial)...	id.	id.	2
Francia	id.	Girard y Cuniasse	25
Francia	id.	Rocques	23
Francia (gran marca 70 años)	id.	Lab. Chim. C. Dogane	40
Armañac	id.	P. Valaer	9
Desconocida	Whisky	Rocques	20
Desconocida (4 años) ...	id.	Royal Com. on Whisky	8
Desconocida (10 años) ...	id.	id.	11
Escocia	id.	P. Valaer	10
Desconocida	Ginebra	Girard y Cuniasse	9.9
Desconocida	id.	Royal Com. on Whisky	12
Desconocida	id.	id.	9.8

Los procedimientos usuales para la dosificación global son muchos, aunque aquí sólo mencionaremos el colorimétrico que emplea el reactivo de Schiff (49); el basado en determinar volumétricamente el ácido liberado al condensarse los aldehídos con el clorhidrato de hidroxilamina (50), y el que se funda en determinar el consumo de bisulfito (51). Este último, debido a Ripper (52), está incluido en los *Métodos Oficiales de Análisis de Alimentos* (53).

El benzaldehído no se cita como componente normal de las bebidas espirituosas, y únicamente en aquellas que procedan de frutas (cerezas, etc.), puede encontrarse (54).

ACETONA

Esta sustancia es tenida por la mayoría de los autores como un producto anormal en las bebidas alcohólicas, y su presencia en ellas indicaría un fraude. No obstante, Genevois (37) señala su presencia en los aguardientes de la Charenta; Maynard A. Amerine (47) también indica que puede ser encontrada en algunos vinos; además, por los recientes estudios de cromatografía gaseosa también se señala como componente natural.

La determinación química se realiza con nitroprusiato sódico, según la reacción de Legal (55) o alguna de sus modificaciones (56). También puede hacerse por el método de Denigés (57), que emplea sulfato mercúrico; o por la reacción de Penzoldt (58), basada en la formación de índigo por condensación con o-nitrobenzaldehído en medio alcalino.

ACIDOS

Se ha señalado la presencia de diferentes ácidos libres en las bebidas espirituosas. En los últimos años, por la técnica de cromatografía de gases y determinados procedimientos de concentración, extracción, etc., se han encontrado: acético, butírico, fórmico, etc. (59), pero como en nuestras condiciones de trabajo no los hemos hallado, no creemos oportuno detenernos en su estudio.

ESTERES

Son originados por reacciones entre los ácidos y alcoholes presentes en las bebidas. Su cantidad oscila con el tipo de bebida y grado de envejecimiento (cuadro número 7). De los muchos ésteres encontrados, merece especial atención el acetato de etilo, por hallarse en proporción destacada.

Algunos autores los han determinado aisladamente por procedimientos químicos (cuadro número 8). Actualmente, gracias a los métodos de cromatografía en fase de vapor aplicados a los residuos de extracción con éter-pentano, se han identificado numerosos ésteres de los ácidos grasos superiores.

CUADRO NUMERO 7

Contenido en ésteres de diferentes bebidas espirituosas

PROCEDENCIA	Naturaleza	Autor	Esteres en mg./100 c. c. de alc. anhidro
Acqui	Aguardiente de orujo	Lab. Chim. C. Dogane	400
Calamandrana	íd.	íd.	695
Ostra	íd.	íd.	674
Toscolano	íd.	íd.	421
Francia	Cofiac	Girard y Cuniasse	133
Francia	íd.	Rocques	109
Charenta	íd.	P. Valaer	58
Armañac	íd.	íd.	59
California	íd.	íd.	14
Desconocida	Whisky	Rocques	52
Escocia (6 años)	íd.	König y Bömer	79
Escocia	íd.	P. Valaer	28
Desconocida	Ginebra	Girard y Cuniasse	18
Desconocida	íd.	Royal Com. on Whisky	98
Cuba	Ron	P. Valaer	21
Jamaica	íd.	íd.	66
Martinica	íd.	Simón	49
Rusia	Vodka	Jacobs	5.5
Varsovia	íd.	íd.	4

Su estimación cuantitativa, basada, por lo general, en determinar la sosa necesaria para producir la saponificación completa de un destilado convenientemente preparado, da un valor índice que, expresado en acetato de etilo, se viene utilizando para establecer la composición de las bebidas (60).

CUADRO NUMERO 8

Contenido en ésteres de diferentes bebidas

NATURALEZA	Autor	Formiato de etilo	Acetato de etilo	Butirato de etilo	Caprinato de etilo
Ron de Jamaica	Sell	17	251	5.0	12
Ron de Jamaica ordinario	íd.	22	495	6.2	8
Ron de Cuba	íd.	10	92	10.3	6
Ron de Jamaica	Windisch	0	1.847	56	2.3
Ron de Habana	íd.	9	206	17	12
Cofiac francés	Sell y Windisch	0	53	5.0	14
Cofiac ruso	íd.	6	145	6	18
Cofiac californiano	íd.	0	43	4	8

Estas cifras están expresadas en miligramas por cien.

LA CROMATOLOGRAFIA DE GASES

I.—TECNICA

ORIGEN Y FUNDAMENTO

Es conocido de todos la técnica de cromatografía en columna, ya de partición (cromatografía líquido-líquido), ya de adsorción (cromatografía sólido-líquido), que se inició con los trabajos realizados por Tswett (61) en 1903, basados en la separación de algunos pigmentos vegetales a través de una columna absorbente, merced al retardo que experimentan algunos de ellos por sus diferentes propiedades físico-químicas.

La cromatografía en fase de vapor o cromatografía de gases no es sino una variante de la cromatografía en columna, en la que se utiliza como fase móvil del sistema cromatográfico un gas permanente, y el problema, en su totalidad, debe hallarse en estado de vapor y mantenerse en esta forma mientras dura el proceso de fraccionamiento. Esta simple modificación hace que la migración diferencial, establecida en toda cromatografía, sea acelerada gracias a la alta difusibilidad de gases y vapores.

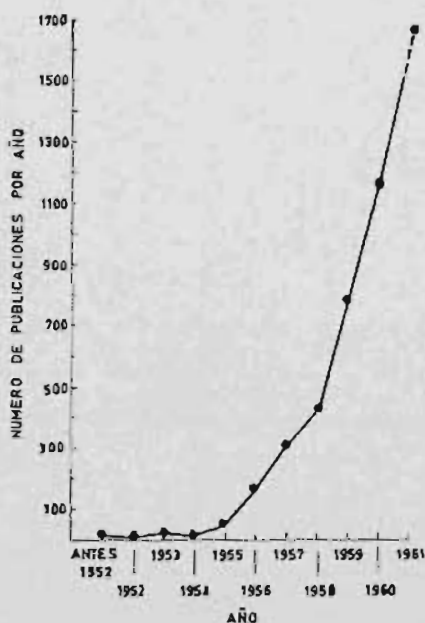


Fig. 1 bis.

El empleo de un gas permanente como fase móvil en cromatografía fue sugerido en 1941 por Martín y Syngé (62), pero no fue puesto en práctica hasta

los trabajos de Cremer y Prior (63) y Cremer y Müller (64) en 1951, que lo utilizan con una columna de adsorción (cromatografía gas-sólido), y los de James y Martin (65) en 1952, que lo hacen empleando una columna de partición (cromatografía gas-líquido).

En estos últimos años la cromatografía de gases ha tenido un considerable auge dado su amplio campo de aplicaciones, no sólo en el laboratorio, donde se emplea en las tareas de investigación más diversas (66, 67, 68, etc.), sino también en el terreno industrial para la obtención de sustancias de elevada pureza (cromatografía preparativa), así como en el control de fabricación de diferentes productos (69, etc.).

Prueba de tal desarrollo es la fig. 1 bis, tomada de la obra de S. Dal Nogar & R. S. Juvet Jr. (70).

APARATO Y TÉCNICA

Indicado el fundamento de la cromatografía gaseosa o en fase de vapor (*) y el de los dos grupos en que cabe dividirla (cromatografía gas-sólido y cromatografía gas-líquido), al objeto de facilitar la exposición de nuestro trabajo, con-

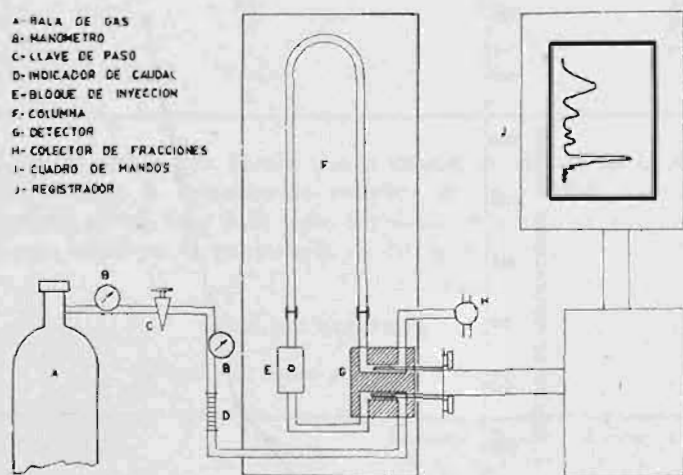


Fig. 2.

sideramos necesario señalar los elementos que constituyen un cromatógrafo de gases, así como comentar brevemente algunos detalles de interés práctico.

Dentro de la gran variedad de aparatos, un esquema general podría ser el representado en la figura 2. En él aparece en primer lugar la bala conteniendo

(*) Estos dos términos se emplean como sinónimos, pero lo más exacto sería utilizar este último; no obstante, para evitar repeticiones, los utilizaremos indistintamente.

el gas portador, fase móvil de estos procesos cromatográficos. Como particularidad hay que señalar que, a diferencia de la cromatografía sobre papel, capa fina, etcétera, dicha fase no es necesario cambiarla para resolver problemas de diferente naturaleza, pues como más adelante veremos, con cada tipo de detector puede elegirse el gas portador que reúna las condiciones más idóneas y con él resolver los más diversos problemas.

Los gases de uso frecuente, así como sus propiedades de interés para la cromatografía gaseosa, que seguidamente comentaremos, figuran en el cuadro número 9, en el que hemos reunido datos de diferentes fuentes bibliográficas.

La viscosidad de los gases, al contrario de lo que ocurre con los líquidos, aumenta con la temperatura, lo cual hay que tener en cuenta cuando se realizan cromatografías a temperaturas programadas.

Su difusibilidad depende de la viscosidad, densidad, etc., y juega un papel importante en el desarrollo de un análisis; así, por ejemplo, cuando se emplea hidrógeno, gas de elevada difusibilidad, el tiempo necesario para eluir un determinado componente, es inferior al necesitado cuando se utiliza nitrógeno.

La conductividad térmica, propiedad que decrece con el aumento del peso molecular, juega un papel primordial al emplear detectores térmicos (véase más adelante), ya que la señal obtenida en ellos depende de la diferencia de conductividad entre gas portador y soluto, por lo que, indudablemente, el gas más adecuado, cuando se emplean estos detectores, es elegido entre aquellos de conductividad elevada. En este caso concreto son recomendables el hidrógeno y el helio.

CUADRO NUMERO 9

Gas portador	PM o PA	Coeficiente de difusión en H. (cm ² /seg.)	Viscosidad (μ poises)	Conductividad térmica K × 10 ⁸		Potencial de ionización (ev.)
				0° C.	100° C.	
Hidrógeno (H ₂)...	2	—	83.5	41.6	53.4	15.6
Helio (He)	4	—	186.0	34.8	41.6	24.4
Neon (Ne)	20.2	—	297.3	11.1	—	21.4
Nitrógeno (N ₂)...	28	0.674	156.3	5.81	7.5	15.5
Aire	—	0.611	170.8	5.83	7.5	12.8
Oxígeno (O ₂) ...	32	—	189	5.9	7.6	12.5
Argón (A)	39.9	0.77	209.6	4.0	5.2	15.68
Carbónico (CO ₂)	44	0.55	141	3.5	5.3	14.4

El uso de nitrógeno, aire, carbónico, etc., tiene sus limitaciones cuando se emplean detectores térmicos como consecuencia de que la conductividad de la mayoría de los compuestos orgánicos son muy próximos a las de aquéllos.

Empleando detectores de ionización la selección del gas portador debe hacerse de modo que su potencial de ionización sea más elevado que el de los componentes a medir, por lo cual es aconsejable el neón, y mejor aún, el helio.

Como es lógico, el gas portador no debe reaccionar químicamente con los

compuestos a separar; así, por ejemplo, el hidrógeno puede reducir compuestos orgánicos cuando se utiliza con detectores térmicos.

Los gases empleados como portadores en esta técnica deben ser puros, y como los suministrados por la industria contienen pequeñas cantidades de agua y vapores orgánicos, se hace preciso, en aquellos casos que los detectores acusen tales impurezas, someterlos a un proceso de purificación por filtración a través de gel de sílice y/o tamices moleculares.

En el esquema de la figura 2 siguen a continuación de la bala una serie de manómetros y llave de paso cuya finalidad es controlar y regular la presión de entrada del gas portador a lo largo de cada experiencia; también en esta parte suele colocarse un indicador del caudal de gas que penetra en el cromatógrafo.

El elemento siguiente suele ser el dispositivo de introducción de muestras, el cual varía según se trate de mezclas de sustancias gaseosas o líquidas; así, mientras en aquellas debe posibilitar la introducción de cantidades relativamente grandes de muestra (1 a 100 c. c.), sin modificar sensiblemente la presión gaseosa del circuito cromatográfico, para las muestras líquidas, el dispositivo de introducción debe permitir ser calentado a temperatura más o menos elevada, a fin de conseguir la vaporización instantánea de la mezcla inyectada, circunstancia no muy difícil de obtener dada la exigua cantidad utilizada para cada análisis (0,001 a 0,05 ml.).

Inmediatamente después va la columna cromatográfica, de longitud variable según su poder separador, naturaleza, complejidad del problema, etc., pero por lo general es de dos metros, y su forma difiere según el modelo de cromatógrafo; el diámetro interno también varía de unos aparatos a otros, pero de manera general, para la cromatografía analítica, puede decirse que oscila alrededor de 0,5 cm. (en la cromatografía preparativa es muy superior). El relleno de la columna cambia con el tipo de cromatografía a realizar; en la de adsorción está constituido por un sólido absorbente (carbón activo, óxido de aluminio, etc.), homogéneamente dividido, que tiene la propiedad de fraccionar a los componentes de una mezcla compleja, gracias a procedimientos de adsorción-desorción. Este grupo de cromatografías se reserva, casi exclusivamente, al análisis de gases permanentes, por lo que no serán tratadas en esta memoria.

En la de partición, la columna está rellena de un sólido inerte, homogéneamente dividido, impregnado en su superficie de un líquido no volátil ni destruíble a la temperatura de la experiencia, siendo en este caso separados los diversos componentes merced a procesos de partición entre la fase móvil gaseosa y la fija líquida. Esta modalidad es la que encuentra mayores aplicaciones, dado que la fase estacionaria (fase fija) puede modificarse a voluntad en un amplio campo por el empleo de líquidos de diferente polaridad.

Como soporte generalmente se emplean materiales porosos que permiten retener grandes cantidades de fase líquida sin que haya adherencia entre sus partículas. También es conveniente posean resistencia a la fragmentación, al objeto de evitar pulverización y falta de uniformidad en el llenado de la columna que restarían eficacia a la misma.

El tamaño de las partículas es de gran importancia, pues afecta a la efica-

cia separadora por modificar la superficie activa. Con soportes finamente divididos el número de platos teóricos (número con el que suele expresarse el poder separador de una columna) que puede alcanzarse es muy elevado, pero como con ellos se dificulta el paso de gas, se hace necesario una mayor presión de entrada para obtener el caudal deseado, y esto crea un elevado gradiente de presión en la columna que da lugar a que el tiempo de elución de los componentes menos volátiles resulte excesivamente aumentado.

El número de platos teóricos a que se equivale la columna se calcula mediante la fórmula $N = 16(x/y)^2$ (71), donde N representa el número de platos; x es la abscisa del máximo del pico, desde el punto de inyección o tiempo de retención; y y es la base del pico medida entre los puntos de intersección de las tangentes con la línea base (fig. 5). Este valor, en la práctica, no resulta igual al calcularlo para otro componente del mismo cromatograma, por lo que para obtener resultados comparativos es necesario fijar el componente con el que se van a realizar tales determinaciones.

Otras veces el poder separador de una columna para dos componentes dados puede calcularse por la relación entre sus tiempos de retención, y se le denomina también factor de separación.

Los soportes de uso frecuente son: celita, sterchamol, Firebrick C-22, Chromosorb W y P, etc., constituidos por tierras de diatomeas; en algunos casos aglomerada y calcinada adecuadamente para obtener un material del tamaño deseado.

Otra característica que deben presentar es la de ser inertes y no retener ni actuar sobre los solutos, pero en la práctica esta propiedad no se logra y aparecen interacciones que se traducen en colas y deformaciones en las curvas de elución o incluso en la aparición de nuevos picos (72). Para evitar estos fenómenos ha de someterse el material a tratamientos desactivantes con dimetildiclorosilano (73), hexametildisilizano (74), etc., cuyo detalle no es posible mencionar aquí.

Otro tipo de soporte lo constituyen materiales *no porosos*: perlas de vidrio, polvo de teflón, polvo de merales, incluso sales inorgánicas, como el cloruro sódico, en los que no se presentan estas interacciones, si bien tienen el inconveniente de su reducida capacidad de carga de fase líquida que obliga a operar con muestras de volumen pequeño y, consecuentemente, con detectores de alta sensibilidad.

En lo que se refiere a la fase líquida, como ya se ha indicado, ha de tratarse de un líquido no volátil y estable a la temperatura a que se opera. Para su selección hay que tener en cuenta la naturaleza de los componentes a separar y la temperatura a la que ha de mantenerse la columna. Por su naturaleza cabe clasificarlas en tres grupos: no polares, semipolares y polares, aunque es de señalar que esta clasificación no es absoluta, y diferentes autores incluyen un mismo líquido en grupos de distinta polaridad.

En el cuadro número 10 figuran algunas fases fijas de uso frecuente, así como las propiedades de interés para la cromatografía gas-líquido.

CUADRO NUM. 10

FASE LÍQUIDA	Temperatura máxima de trabajo (°C)	Polaridad	Aplicaciones
Aceite de silicona	225	No polar	Alcoholes de C ₅ a C ₁₆ ; ésteres metílicos de C ₁ -C ₃ .
Apieción L	250	id.	Esteres de ácidos grasos.
Escualeno	160	id.	Hidrocarburos alifáticos de C ₁ a C ₁₀ .
Goma de silicona	300	id.	Alcaloides y esteroides.
Ftalato de diisodécilo	165	Semi-polar	Uso general.
Sebacato de bis (2-etilhexilo)	125	id.	Uso general.
Versamid 900	250	id.	Comp. polares de p. eb. alto.
Succinato de dietilenglicol	210	Polar	Esteres metílicos C ₅ a C ₂₂ .
Polipropilenglicol	200	id.	Uso general de comp. polares.
Polietilenglicol (carbowa x 1.500)	175	id.	Alcoholes, cetonas y agua.
Polietilenglicol (carbowa x 1.540)	225	id.	Alcoholes, cetonas y agua.

También queremos señalar los principales criterios para su elección: cuando la polaridad de la fase estacionaria es de igual naturaleza a la de los componentes a fraccionar, la selectividad de la columna es escasa y en las separaciones sólo intervienen los puntos de ebullición de los solutos, es decir, el proceso cromatográfico es semejante a una destilación fraccionada. De otro lado, solutos polares son retenidos tanto más intensamente cuanto mayor sea la polaridad de la fase fija; y al contrario, solutos no polares son retenidos tanto más cuanto menor es la polaridad de la fase estacionaria.

A veces para lograr mejores separaciones en problemas complejos se emplean columnas mixtas, rellenas en un tramo de una fase líquida no polar, y en el resto por una fase polar. Con ellas se logra mejorar las separaciones de compuestos de polaridad semejante y punto de ebullición algo diferente, o compuestos de distinta polaridad y próximo o igual punto de ebullición.

Recientemente se utilizan con gran éxito columnas capilares (columnas G_olay), formadas por tubos de diferentes materiales con un diámetro interior de 0,2 a 0,5 mm., o todavía menores, y una longitud de 25 a 100 m. (75); en estas columnas la fase líquida impregna la pared interna del tubo (que actúa de soporte), formando una delgada película de tres a cinco micras de espesor. Al igual que ocurría con las columnas llenadas a base de materiales no porosos, también tienen pequeña capacidad de carga, lo cual obliga a operar con cantidades de muestra no superiores al microlitro (0,001 ml.) y detectores altamente sensibles.

De igual modo existen las denominadas columnas «macro-G_olay» de 1 mm. de diámetro interior y unos 100 metros de longitud que, por su mayor capacidad de carga, permiten el empleo de detectores no tan sensibles.

A la salida de la columna el gas efluente, mezcla binaria formada por el gas

portador y el vapor de un determinado componente, atraviesa el dispositivo de detección, cuya misión es poner de manifiesto los componentes separados.

El detector ha de ser de gran sensibilidad, dada la pequeñísima cantidad de soluto que constituye una fracción. En este dispositivo cabe distinguir la célula de detección propiamente dicha (sistema sensible) y el aparato de registro que permite obtener el cromatograma.

Como detectores han sido propuestos diferentes modelos: unos, ya en desuso, miden la cantidad total de cada componente separado: «detectores integrales», y en ellos el cromatograma resultante se muestra con una serie de escalones, cada uno de los cuales representa una fracción (fig. 3 A), y su altura la cantidad total de soluto. La bureta usada por James y Martin (76) en 1952 es un ejemplo de este tipo de detector; sus desventajas son la baja versatilidad y sensibilidad.

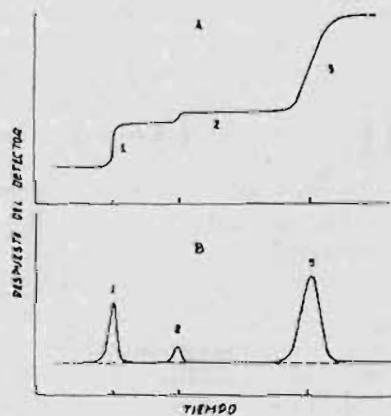


Fig. 3.

Otros, los más utilizados, miden alguna diferencia establecida en las propiedades físicas (conductividad, densidad, etc.) entre el gas portador puro y el gas effluente de la columna; en conjunto reciben el nombre de «detectores diferenciales», y el cromatograma resultante presenta el aspecto que se observa en la fig. 3 B.

Mientras el gas portador es puro, la señal del detector es constante y constituye una recta (línea base) tan pronto como el gas portador arrastre un componente, se produce un pico o campana de aspecto gaussiano (curva de elución). Tienen ventaja sobre los integrales, ya que por su elevada sensibilidad pueden ser utilizados en la detección de componentes «trazas».

Los detectores también se clasifican en destructivos y no destructivos, atendiendo a que los componentes detectados sean destruidos (detector de llama, etcétera) o, por el contrario, no lo sean y puedan ser recogidos, permitiendo posteriores determinaciones, lo cual hacen sean éstos los preferidos (detectores térmicos, etc.).

Entre los no destructivos los más usados son los de conductividad térmica, y teniendo en cuenta que en nuestros trabajos hemos utilizado uno de ellos, haremos una breve descripción de su fundamento.

Estos detectores miden las diferencias de conductividad que presenta el gas portador puro y el mismo gas conteniendo alguna de las fracciones cromatografiadas. En su forma más simple consisten en un bloque metálico con dos cámaras o células de capacidad reducida para evitar la difusión y mezcla de las fracciones; en ellas, montadas axialmente, se encuentran dos resistencias de hilo metálico de igual valor, que constituyen dos de los elementos de un puente de Wheatstone (fig. 4). La corriente que circula por el puente se ajusta de for-

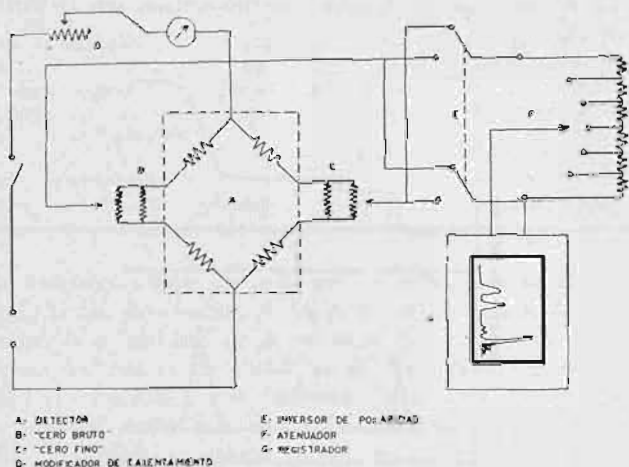


Fig. 4.

ma que la temperatura de los filamentos sea superior a la del bloque (de aquí la denominación de *hilo caliente*), cuya temperatura ha de mantenerse adecuadamente constante para evitar la condensación de vapores. Por una de las células térmicas circula siempre el gas portador puro (célula de referencia o de comparación); por la otra, conectada después de la columna cromatográfica (figura 2), pasa la mezcla binaria de dicho gas y uno de los componentes separados (célula detectora o analítica). Momentos antes de comenzar un análisis, ambas células son atravesadas por el gas portador puro, sus resistencias alcanzan un valor fijo y el puente puede ser dispuesto de modo que el voltaje diagonal resulte nulo; en cambio, cuando por la segunda célula pasa el gas portador con uno de los componentes, se origina un cambio de conductividad que se traduce en una variación de la temperatura de la resistencia y, consecuentemente, en una modificación de su valor, originándose, mientras dura la elución, un voltaje diagonal que, convenientemente registrado, da lugar a los picos del cromatograma.

Mayor sensibilidad se logra empleando un detector térmico de cuatro cé-

lulas, cuyas resistencias forman los cuatro elementos del puente de Wheatstone; dos de tales células son de referencia, y en todo momento están atravesadas por el gas portador puro; las otras dos sirven de células analíticas, pasando por ellas el gas efluente de la columna.

Aparte de los elementos mencionados hay que considerar el circuito eléctrico (figura 4), constituido por el puente de Wheatstone, por dos resistencias variables en «shunt» con otras dos fijas, que posibilitan equilibrar las diferencias existentes entre los filamentos de las cuatro células del detector antes de comenzar un análisis; uno de estos conjuntos permite un equilibrio aproximado, por lo que se denomina «cero bruto»; el otro sirve para lograr el equilibrio exacto y recibe el nombre de «cero fino». Completan este circuito un modificador de la intensidad de calentamiento, un inversor de la polaridad y un atenuador. El primero se emplea para variar adecuadamente la intensidad de la corriente continua de alimentación y, subsiguientemente, la temperatura de las resistencias del bloque térmico. En unos casos como manantial de energía se emplean baterías y en otros la energía procede de un rectificador conectado a la red.

El inversor de la polaridad de la corriente diagonal permite salvar el inconveniente que se presenta al cromatografiar mezclas de sustancias con conductividad térmica superior e inferior a la del gas portador, fenómeno frecuente cuando se emplea nitrógeno, carbónico, etc.

El atenuador sirve para reducir el voltaje originado, al objeto de que la señal quede dentro de la escala del aparato de registro, permitiendo una reducción sucesiva al medio, al cuarto, etc., o bien al tercio, al noveno, etc., por lo que también se denomina divisor de corriente.

Para la obtención de cromatogramas con detectores térmicos es indispensable utilizar un potenciómetro registrador, consistente en un dispositivo electrónico en el que intervienen un sistema de amplificación, un dispositivo inscriptor con motor sincronizado, etc., gracias al cual se pueden medir y registrar los voltajes momentáneos originados en la elución de cada soluto fraccionado.

Otro detector de gran interés por su elevada sensibilidad es el de ionización de llama de hidrógeno; además, por no ser sensible al paso del agua, sustancia de difícil elución, permite, con gran ventaja, el examen directo de soluciones acuosas, lo cual se hace el preferido en análisis de bebidas alcohólicas. No obstante, este detector tiene el serio inconveniente de destruir las fracciones medidas, impidiendo su posible colección y posterior análisis.

La gran sensibilidad del método exige que durante la operación tanto el bloque detector como la columna de fraccionamiento se mantengan a temperatura constante, para lo cual estas piezas están colocadas dentro de una cámara, cuya temperatura, una vez fijada para cada experiencia, se mantiene constante mediante un baño de vapor, o mejor, gracias a un dispositivo electrónico de termostatación.

Recientemente se desarrolla con gran éxito técnicas de cromatografía con temperatura programada, en las que la columna cromatográfica va gradualmente adquiriendo temperaturas más elevadas, permitiendo mejorar, con mucho, las separaciones y, sobre todo, posibilita una determinación cuantitativa más exacta

de cada componente. En estas técnicas, al igual que en las anteriores, el detector debe mantenerse a una temperatura rigurosamente constante.

LOS CROMATOGRAMAS Y SU INTERPRETACIÓN

Como ya se indicó, en los cromatogramas obtenidos empleando un detector diferencial se observa la existencia de una serie de picos, cada uno de los cuales, en principio, corresponde a un componente puro.

En todo pico cabe distinguir, en primer lugar, su tiempo de retención ($Tr.$) o tiempo en minutos que transcurre desde la introducción de la muestra hasta la aparición de la máxima altura del pico (en la figura 5 está representado por x). En la práctica se opera con el tiempo de retención corregido, es decir,

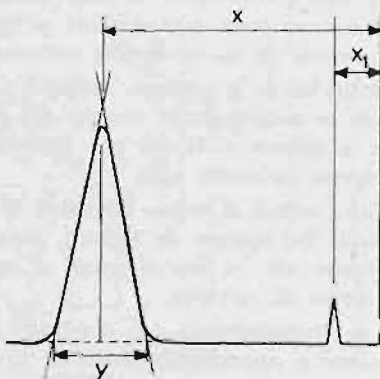


Fig. 5

el que resulta de restar del tiempo de retención observado el tiempo que exige el gas portador para ir del punto de inyección al detector (en la figura 5: $x-x_1$); este último se determina midiendo el tiempo transcurrido desde el instante de la inyección de la muestra hasta la aparición del pico de un componente inabsorbido, generalmente el aire, para lo cual cabe introducir un poco del mismo en el momento de la inyección.

El producto del tiempo de retención ($Tr.$) por el caudal de gas (C), el cual se expresa en ml./minuto, nos da el volumen de gas portador necesario para la elución de un determinado componente. A este volumen se le da el nombre de volumen de retención y tiene un valor casi específico de cada sustancia, por lo que servirá para identificarla.

En igualdad de condiciones (caudal constante, etc.) el tiempo de retención también es característico de cada sustancia, y como resulta más fácil de medir, es éste el que suele emplearse para su reconocimiento.

Se llama volumen de retención relativo al cociente entre el volumen de retención de una sustancia y el volumen de retención de otra tipo. Operando en

igualdad de condiciones, esta relación es a la vez igual a la existente entre sus tiempos de retención.

La altura máxima del pico corresponde a la mayor concentración que alcanza un componente en el gas portador, y su ancho a media altura guarda relación con la lentitud con que la fase estacionaria cede al componente.

Según Kaiser (77), entre el tiempo de retención y el ancho a media altura o semibase de cada pico, existe una relación sencilla que viene expresada por la fórmula $b/z \approx Tr \cdot \text{constante}$; de la que se deduce que la anchura de los picos, cuando alcanzan alturas similares, aumenta de manera proporcional al tiempo de retención. Consecuencia de esto, si en un cromatograma aparece un pico cuya anchura no es la que le corresponde dada su situación, podría sospecharse una separación defectuosa de componentes de volumen de retención semejante.

Algunas veces los picos no tienen la forma simétrica de una curva de elución, en la que ambas vertientes se separan del eje de altura con igual ángulo. En ocasiones parecen inclinarse hacia delante, lo que podría ser ocasionado por una cesión lenta por parte de la fase estacionaria (este defecto suele presentarse en los cromatogramas obtenidos con columna de adsorción). Otras veces lo hacen hacia atrás, y en estos casos puede ser debido a que la temperatura de la columna es demasiado inferior al punto de ebullición del vapor que dio lugar al pico (este fenómeno es relativamente frecuente cuando los cromatogramas son obtenidos con columnas de partición).

ANÁLISIS CUALITATIVO

La cromatografía de gases es por sí misma un excelente método de análisis cualitativo. Los volúmenes de retención, cuando se utiliza una fase líquida determinada, son característicos y reproducibles e independientes de todos los parámetros operativos, exceptuando la temperatura, por lo cual su determinación puede utilizarse para identificaciones. Por las razones ya conocidas también la simple medida del tiempo de retención facilita resolver tales problemas.

Otro procedimiento de identificación es el denominado de «sobrecarga», basado en adicionar al problema el componente sospechado y repetir la cromatografía; en estas condiciones el incremento de altura del pico estudiado permitiría concluir que la sustancia sospechada era la misma que la utilizada en la sobrecarga.

Gracias a los trabajos de James y Martin (76) y de Desty y Wyman (78) se ha puesto en práctica otro método de análisis cualitativo. Estos autores encontraron que entre los miembros de una serie homóloga el logaritmo del volumen de retención es función lineal del número de átomos de carbono; como es lógico, al operar en iguales condiciones esta propiedad también se cumple para el logaritmo del tiempo de retención. Mediante las gráficas correspondientes a cada serie homóloga puede identificarse cualquier miembro de ella.

Otro tipo de problema es el que se presenta cuando las sustancias, en condiciones experimentales determinadas, tienen un volumen de retención parecido, lo que daría lugar a que en el cromatograma saliesen en el mismo pico o casi

superpuestas. En tales casos la identificación puede lograrse mediante la técnica de dos columnas (79), basada en hacer dos cromatografías, una con fase estacionaria polar y otra con fase no polar y aprovechar la particularidad presentada por los miembros de una serie homóloga de que el logaritmo del volumen de retención obtenido en una columna es función lineal del logaritmo del volumen de retención obtenido en la otra, resultado de esta manera gráficas similares a las anteriores.

De todos modos, es aconsejable una confirmación final, ya por métodos químicos, ya por métodos instrumentales, a cuyo fin se hace necesario recoger las fracciones mediante un colector adecuado situado a la salida del cromatógrafo. Si la cantidad de soluto es suficiente (cromatografía preparativa), pueden hacerse determinaciones físicas (punto de ebullición, índice de refracción, etc.) o métodos químicos (identificación de grupos funcionales, reacciones específicas, etcétera). En otros casos, especialmente cuando la cantidad de fracción es mínima, se recurre a la espectrofotometría con ultravioleta, espectrofotometría con infrarrojos, espectrometría de masas, espectrometría de resonancia magnética nuclear, etc., con las cuales pueden conocerse detalles estructurales de las sustancias colectadas y lograr su identificación.

La confirmación por estos medios instrumentales aún no es posible realizarla con las pequeñísimas fracciones obtenidas al emplear columnas capilares (80).

Otro procedimiento muy utilizado en la práctica es el realizar diferentes pruebas químicas con la mezcla compleja y coordinar los resultados con los obtenidos por cromatografía de gases.

ANÁLISIS CUANTITATIVO

La cromatografía de gases también puede utilizarse para la resolución de problemas de análisis cuantitativo operando en condiciones adecuadas y con medidas cuidadosas de los parámetros de los picos puede alcanzarse un error del 1-2 por 100 (81).

Si los cromatogramas fuesen obtenidos con detectores integrales (fig. 3 A), bastará medir la altura de cada meseta, ya que ésta es proporcional a la cantidad de soluto. Sin embargo, como indicábamos al hablar de los mismos, lo frecuente es que los cromatógrafos estén equipados con detectores diferenciales, dadas las ventajas que presentan frente a aquéllos, y en los cromatogramas resultantes (fig. 3 B) se llegará a conocer la cantidad de un componente midiendo la superficie del pico, o a veces, incluso, sólo su altura.

Por no alargarnos demasiado en la exposición de los numerosos métodos propuestos, nos limitaremos a señalar los frecuentemente utilizados.

Métodos basados en la medida del área de los picos.—Dada la proporcionalidad existente entre la concentración de soluto y área de sus respectivos picos, un gran número de métodos para la estimación cuantitativa están basados en la medida de la superficie del pico problema y su comparación con la del pico originado por la misma sustancia en concentraciones conocidas. Esta medida

puede hacerse aplicando la planimetría, la integración mecánica, o bien puede hallarse por el producto de su altura y el ancho a media altura o semibase, considerando al pico como un triángulo isósceles.

Otros procedimientos: unos a base de añadir al problema una cantidad conocida de una sustancia testigo (standard interno) y comparar su área con la de cada componente; otros, en los que se establece la relación entre el área de cada pico y la suma de las áreas de todos los componentes, según la fórmula:

$$\% i = (A_i / A_i + \dots + A_n) \times 100$$

dado el carácter de esta memoria, no procede desarrollarlos.

Métodos basados en la medida de la altura de los picos.—Siempre que las condiciones experimentales sean reproducibles de análisis a análisis, las alturas de los picos son proporcionales a la concentración de soluto, y esto puede ser utilizado para la cuantitativa. Este método exige que los picos sean muy agudos y de base estrecha, y para su aplicación es necesario construir curvas de calibración relacionando altura-concentración y que el problema tenga una riqueza comprendida entre sus valores.

Pese a los errores que de este método pueden derivarse, es el más útil para análisis de rutina, siempre que, como ya indicábamos, las condiciones experimentales sean reproducibles.

II.—APLICACION DE LA CROMATOLOGRAFIA DE GASES AL ANALISIS DE BEBIDAS ESPIRITUOSAS

Métodos

En general, la aplicación de la cromatografía de gases al análisis de bebidas alcohólicas con los detectores usuales de hilo caliente, encuentra una dificultad derivada de la gran cantidad de agua, ya que esta sustancia es mal eluida, dando, cuando menos, un gran pico asimétrico (consecuencia de su lenta elución), por originarse en su parte posterior una enorme cola, lo cual hace que algunos componentes queden ocultos si sus tiempos de retención son próximos y mayores a los del agua. Este hecho explica que la mayoría de los autores estudien las bebidas realizando, unas veces, destilaciones enriquecedoras de componentes volátiles; otras, extracciones con determinados solventes; y, a veces, deshidrataciones conducentes a lograr eliminar la mayor parte del agua.

Otros investigadores recurren a utilizar detectores insensibles al paso del agua. Todo lo cual nos ha llevado a clasificar los métodos según el detector empleado en cada uno de ellos:

1) *Métodos que emplean detectores de conductividad térmica.*—A su vez podemos clasificarlos en:

A) Por inyección directa.

La mayoría de los que han aplicado esta técnica cromatográfica al análisis de bebidas alcohólicas han preferido la inyección directa de las muestras, pues se evitan pérdidas de los componentes o modificaciones incontroladas de los mis-

mos. Entre ellos cabe citar como los primeros en estas investigaciones a Gygi y Potterat (82), que en 1957 lo hacen al objeto de obtener la tipificación gascromatográfica de los aromas de diferentes bebidas, si bien no identifican los picos obtenidos. Algunas condiciones experimentales son: fractómetro Perkin-Elmer 154-B, equipado con termistores; fase estacionaria, sebacato de dioctilo; temperatura 69° C. y gas portador helio.

En 1959, Carroll y O'Brien (83), hallan estas bebidas integradas, aparte del etanol y del agua, por siete componentes: acetaldehído, formaldehído, formiato de etilo, acetato de etilo, metanol, n-propanol y alcohol isoamílico. En los cromatogramas de algunas bebidas (French apple brandy) aparece un pico no identificado entre el etanol y el propanol.

Las condiciones de trabajo son: columna de dos metros, llenada con carbowax 1.500; sobre firebrick C-22, celita 545 y chromosorb al 15, 20 ó 25 por 100; el análisis lo llevan a cabo con helio, con presión de entrada de 10 psig. (*) y una temperatura de 95° C. El cromatógrafo utilizado es un Perkin-Elmer, modelo 154-C, equipado con detector de termistores; cantidad de muestra de 0,01-0,05 ml.; registrador de 5 mV. No especifican claramente las condiciones de trabajo de cada caso (tiempo de análisis, soporte, etc.).

Castille (84), en 1960, aplica esta técnica de inyección directa a la determinación cuantitativa del metanol en bebidas alcohólicas, fijando las siguientes condiciones: fase estacionaria, polietilenglicol sobre celita en columna de un metro; temperatura, 90° C.; fase móvil, hidrógeno; volumen de muestra inyectado, 0,02 ml. No señala la sensibilidad del registro, ni la proporción fase estacionaria/soporte, ni tiempo de análisis. El cromatógrafo es un Fractovap (Carlo Erba). Caudal de hidrógeno, dos litros por hora. La estimación cuantitativa del metanol la logra mediante curvas de calibración relacionando superficie de los picos con centímetro cúbico de metanol por ml.

Salo (85), en 1961, preocupado por la existencia de falsificaciones de bebidas espirituosas con alcohol isopropílico, señala un método de identificación y valoración del mismo utilizando una columna mixta a base de 2,24 metros de columna de parafina y 0,6 metros de columna de carbowax 1.500, ambos al 25 por 100, sobre chromosorb de 60/80 mesh. En tales condiciones logra buenas separaciones entre metanol, etanol, isopropanol y agua, que son iludidos en este orden. Otras condiciones experimentales son: fractómetro Perkin-Elmer, mod. 154-B; 47° C. de temperatura en la columna; gas portador helio a 0,8 kilogramos por centímetro cuadrado; rotámetro, 3,3; tensión de detector, 8V; tiempo de retención para el agua, treinta y seis minutos.

Charro Arias (86), en 1963, aplica este método de inyección directa para descubrir falsificaciones por metanol en bebidas alcohólicas.

B) Por enriquecimiento mediante destilación.

Bonhüter y Lowrey (87), en 1959, cromatografían el residuo de la destilación de un brandy y lo encuentran constituido por n-propanol, isobutanol y alcoholes amílicos, eluidos en la cola del pico del etanol. Las condiciones operativas son las siguientes: cromatógrafo Beckman, modelo GC-2, con detector

(*) 1 psig = 1 pounds per square inch gauge = 0,07 Kg./cm².

de hilo caliente a 230 mA; columnas de seis pies, llenadas con flexol plastificado 8N8, sobre Firebrick; temperatura, 130°C.; fase móvil, hidrógeno a 20 psig.; cantidad de muestra inyectada, 0,015 ml.; registrador de 1 mV. No dan la relación fase estacionaria/soporte ni tiempo de análisis.

Bavisotto y Roch (88), en 1959, aplican un procedimiento de enriquecimiento por destilación de los componentes volátiles al análisis de cervezas, y encuentran acetato de etilo, acetato de amilo, etanol, d-amílico y alcohol isoamílico, señalando que algunos picos pueden quedar ocultos debido a la anchura del pico del etanol. La determinación cuantitativa a base de curvas de calibración, relacionando concentración con la altura de los picos, son reproducibles. Las condiciones de trabajo son: cromatógrafo Beckman, modelo GC-2, equipado con detector de hilo caliente a 350 mA; fase estacionaria, glicerina al 30 por 100 sobre firebrick de 30/60 mesh. U. S. en columnas de cobre de 2,3; temperatura, 75°C.; gas portador helio con una presión de 15 psig.; cantidad de muestra de destilado inyectada, 0,05 ml.; tiempo de análisis, ochenta minutos, incluyendo el ciclo de backflushing.

C) Con previa eliminación de agua por deshidratación.

Cacace, Ihram y Stein (89), en 1959, tratan muestras diferentes de coñac con carbonato potásico anhidro, con lo que aparecen dos fases: la superior o alcohólica, es decantada y mantenida con sulfato cúprico anhidro durante dos días a fin de completar la deshidratación; inyectan 0,05 ml. de la capa alcohólica y la encuentran constituida por acetaldehído, acetato de etilo, acetal, metanol, etanol, isobutanol, alcohol isoamílico y sus respectivos acetatos. Señalan es posible la dosificación del metanol hasta un 0,05 por 100. Las condiciones experimentales son: cromatógrafo Carlo Erba, modelo B, equipado con detectores térmicos; columna mixta formada por un metro de ftalato de didecilo y dos metros de polietilenglicol, ambos sobre firebrick C-22 de 30/60 mesh.; temperatura 85°C.; gas portador hidrógeno con una presión de entrada de 1.000 mm. de Hg.; registrador de 10 mV.

D) Con previa extracción mediante el azeótropo éter-pentano.

Mecke y de Vries (90), en 1959, estudian los componentes del coñac, realizando extracciones con éter-pentano y eliminando las trazas de etanol por sucesivos lavados con agua del extracto; después desecan con cloruro cálcico y destilan el éter-pentano. El residuo aparece integrado por más de 12 componentes de los que, inexplicablemente, los autores no señalan su naturaleza. Las condiciones de trabajo son: cromatógrafo Perkin-Elmer, modelo 154-B, equipado con termistores; temperatura 70°C.; fase estacionaria polietilenglicol, en columna de tres metros; gas portador hidrógeno con un caudal de 45 ml./minuto; cantidad de muestra 0,01 ml.; tiempo de análisis de treinta a sesenta minutos. No da la sensibilidad del registrador ni el soporte inerte.

Mecke, Schindler y de Vries (91), en 1960, empleando un procedimiento similar al anteriormente descrito, encuentran en el aguardiente: acetato de etilo, isopropanol, isobutanol, isopentanol, caproato de etilo, enantato de etilo, caprilato de metilo (?), caprilato de etilo, caprato de etilo (?), pelargonato de etilo, caprato de etilo, aldehído cinámico y laurato y cinamato de etilo confundidos, quedando sin identificar otros componentes. Las condiciones de trabajo son:

columna de dos metros de succinato de polipropilenglicol al 20 por 100, temperatura 184° C. y gas portador helio con un caudal de 60 ml./minuto.

Baraud (92), en 1962, publica los resultados obtenidos con diversas bebidas francesas a las que aplica este procedimiento de extracción éter-pentano, y encuentra como componentes frecuentes: acetona, acetato de etilo, acetal, propionato de etilo, acetato de isobutilo e isopentanoles cuando realiza las separaciones a una temperatura de 80° C., empleando una columna mixta de dos metros de sebacato de polipropilenglicol al 30 por 100 y dos metros de carbowax 1.500 al 25 por 100. Como gas portador emplea nitrógeno a una presión de entrada de 640 mm. de Hg. y 300 mm. de Hg. de salida. El cromatógrafo es un Griffin y George equipado con detector térmico.

Si la separación la realiza a una temperatura de 210° C., con la misma fase estacionaria e igual gas portador al que somete a una presión de entrada de 680 mm. de Hg. y 270 mm. Hg. de salida, logra separar los isopentanoles, caproato de etilo, caprilato de etilo, caprato de etilo, undecanoato de etilo, laurato de etilo, cinamato de etilo y miristato de etilo. No nos explicamos por qué a la temperatura de 210° C. no se descompone el carbowax 1.500, que según los datos reunidos en el cuadro número 10, se señala como inestable a 175° C.

E) Otros métodos.

Hunter, Cole y Pence (93), en 1960, empleando un ingenioso procedimiento logran eliminar los inconvenientes derivados de la presencia del agua. Estos autores colocan una torre de deshidratación de perclorato magnésico, después de una columna de combustión situada detrás de la de fraccionamiento. El método sólo ha sido empleado para la determinación del etanol en líquidos fermentados, pero podría utilizarse para poner de manifiesto otros componentes.

Drawert y Kupfer (94) en 1960 analizan las bebidas alcohólicas separando los alcoholes que las integran en forma de nitritoderivados y, posteriormente, cromatografían los productos resultantes de su reducción o de su deshidratación. Este procedimiento tiene el inconveniente de no permitir conocer la existencia de otros componentes.

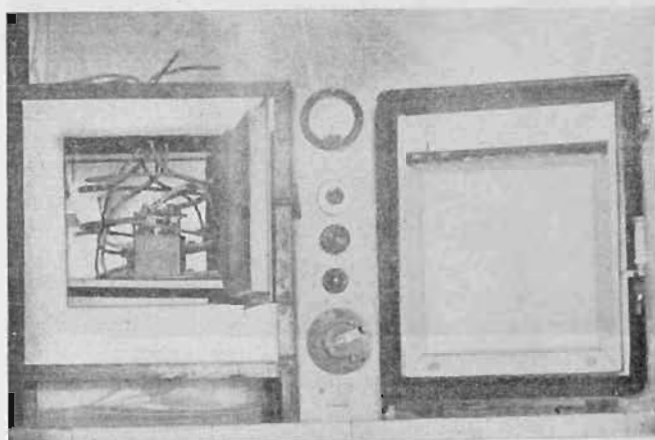
2. Métodos que utilizan detectores de ionización de llama

Kabot y Eitre (95) en 1962 aplican este método analítico a la determinación por inyección directa, de los componentes volátiles de las bebidas alcohólicas, con la ventaja de emplear un detector insensible al agua pero altamente sensible a los restantes componentes; obteniendo en un tiempo próximo a una hora los siguientes componentes separados: acetaldéhid, acetona, metanol, acetato de etilo, propionato de metilo, etanol, propionato de etilo, butanol-2 (?), isobutanol y alcoholes isoamílicos (2 metil butanol-1 y 2 metil butanol-4), usando un fractómetro Perkin-Elmer, modelo 154 D; temperatura 52° C.; caudal de gas de 80 a 100 ml./minuto; columna de dos metros llenada con 3,8 y 0,5 por 100 en peso de Hallconid 18 y «carbowax 600» respectivamente sobre polvo de celión.

PARTE EXPERIMENTAL

Equipo y puesta a punto.

Animados por la sencillez de la técnica anteriormente descrita, al menos en lo que se refiere a su manejo, intentamos, desde los últimos años de nuestra licenciatura en Farmacia, aplicarla al análisis de bebidas alcohólicas, con el fin de resolver los problemas a que dan lugar las frecuentes falsificaciones y fraudes que con ellas se cometen, para lo cual, por carecer del correspondiente cromatógrafo, fuimos montando uno con nuestros propios medios, ya que contábamos con un potenciómetro registrador Linecomp de la casa Hartmann & Braun.

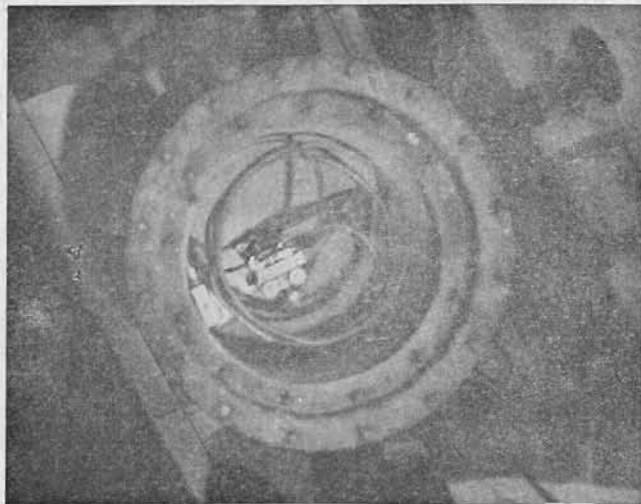


Fotografía 1.

Algunos detalles del montaje fueron publicados en *Medicamenta* (96) y de este trabajo reproducimos la fotografía (número 1), que corresponde a un aspecto parcial del cromatógrafo. Con dicho equipo logramos la separación de algunos gases permanentes, operando a temperatura ambiente y empleando columnas de carbón activo, pero no resultó adecuado para el análisis de unos patrones, preparados por nosotros, a base de los componentes más frecuentes de los aguardientes, por presentarse diferentes dificultades; de una parte, el mantener la temperatura constante $\pm 0,1$ en la columna cromatográfica y detector, y de otra, que nuestro atenuador de voltaje, formado por ocho resistencias, aparte de no permitir más que análisis cualitativos (ya que los valores de las resistencias no eran rigurosamente exactos), sólo posibilitaba disminuir la señal del detector hasta 128 veces, y tal reducción no era suficiente para algunos de nuestros análisis, dada la gran desproporción existente entre los componentes de

las bebidas (*), que exige poder aplicar atenuaciones mucho mayores para el etanol si se desea que en el cromatograma, los picos de los componentes minoritarios aparezcan con alturas que permitan su identificación sin lugar a dudas.

Por todo ello nos fue necesario, en primer lugar, la construcción de un baño termostato de dobles paredes (fotografía núm. 2), dentro del cual lográbamos mantener constante la temperatura deseada, por ebullición de líquidos puros o de mezclas azeotrópicas.



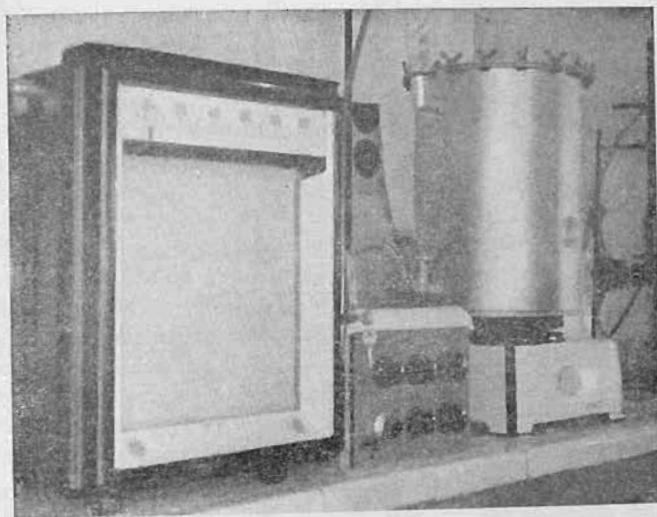
Fotografía 2.

En segundo lugar, la adquisición del dispositivo electrónico de la casa Perkin-Elmer, provisto de atenuador de 10 resistencias, que permite reducir hasta 512 veces y hacer análisis cuantitativos.

Con este nuevo montaje (fotografía núm. 3), fuimos ensayando, con mezclas testigos a base de los componentes de las bebidas, las diferentes fases líquidas citadas en la bibliografía para la resolución de mezclas hidroalcohólicas, empleando como fase móvil nitrógeno. En tales condiciones, nos encontramos con una nueva dificultad —por cierto no citada en la bibliografía— consistente en que, trabajando con sustancias puras p.a. aisladamente, los cromatogramas mostraban dos, tres y a veces más picos de altura destacada, e incluso dispuestos a ambos lados de la línea base, lo cual no es lógico, ya que si se tratase de impurezas los picos resultantes podrían aparecer a diferente lado de la línea base (véase gas portador), pero con una altura considerablemente menor a la del pico principal.

(*) Recuérdese que mientras el acetaldehído u otro componente se encuentra en cantidad de unos miligramos por litro, el etanol puede alcanzar hasta 800 gramos/litro.

Después de varios ensayos, pudimos darnos cuenta de que esta anomalía, en ocasiones similar a una invaginación del pico, era debida a la cantidad de muestra inyectada y podría ser explicada teniendo en cuenta que en las condiciones experimentales la conductividad térmica de los vapores cromatografiados era de un valor similar a la del nitrógeno, por lo cual pequeños cambios en la presión del gas effluente de la columna hacían variar el valor de las resistencias determinando este hecho.



Fotografía 3.

El fenómeno aparece esquematizado en las figuras 6, 7, 8, 9, donde se presentan los resultados obtenidos al inyectar cantidades crecientes de una misma sustancia. En la figura 9 «todos los picos» han sido registrados hacia el mismo lado gracias al inversor de polaridad.

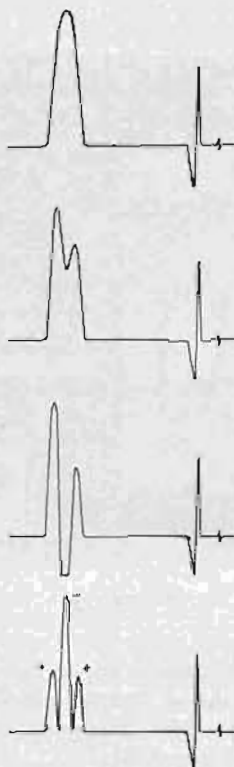
Aclarado este hecho, que nos obliga a emplear un gas portador de mayor conductividad, que además tiene la ventaja de dar mayor sensibilidad al método, buscamos entre los diferentes gases empleados como fase móvil uno que reuniese tal propiedad. Como ya se indicó, los más adecuados son el hidrógeno y el helio, pero de ellos el último, por su elevado precio, resulta prohibitivo, por lo que, a pesar de los riesgos de inflamación y explosión que pueden originarse con el hidrógeno, lo hemos preferido.

En nuestro montaje algunas uniones estaban realizadas con tubo de goma y podrían ocasionarse fugas; además, los filamentos del detector estaban sin protección alguna, debido a lo cual el empleo de hidrógeno resultaba aún más peligroso; todo ello hizo que decidiéramos la adquisición de la unidad básica del cromatógrafo Perkin-Elmer, modelo 116 E.

Entre tanto, pese a las dificultades señaladas cuando se emplea nitrógeno

como gas portador, lo hemos utilizado para ensayar algunas fases líquidas y soportes inertes operando con pequeñas cantidades de nuestras mezclas testigos, a fin de evitar las invaginaciones a que antes hemos aludido.

Otra variable experimental que hemos seleccionado fue el soporte inerte de la fase líquida, para lo cual, aunque en principio sea indiferente su elección, pues son inertes (el concepto de inertes no es absoluto), al haberlos de diverso



Figs. 6, 7, 8 y 9

tamaño de partícula, característica que juega un papel importante en los procesos cromatográficos, hemos ensayado dos soportes de diferente tamaño: celita 545 y sterchamol 50/70 mesh., ambos de la casa Carl Roth Karlsruhe, impregnándolos de la misma fase líquida y en igualdad de relación ponderal fase líquida/soporte y preparando con ellos columnas de dos metros de longitud; de este modo, con la notable diferencia del diámetro de sus partículas, nos fue posible adquirir una idea práctica acerca de las ventajas e inconvenientes de uno y otro.

Como era lógico, al utilizar la celita, debido a su menor tamaño y subsiguientemente a su mayor superficie activa, obtuvimos un poder separador más

grande que con el sterchamol (la eficacia de estas columnas se calculó por la fórmula $N=16(x/y)^2$, y se tomó como referencia el propanol, obteniendo valores casi triples al emplear la celita); sin embargo, esto no fue suficiente para descartar al sterchamol, dado que con él resulta más fácil de lograr el llenado uniforme de la columna, sin creación de «espacios muertos», por lo que a pesar del menor número de platos teóricos alcanzado, para igual longitud de columna, lo hemos elegido como material inerte en nuestros trabajos.

Una vez seleccionado el soporte nos dedicamos a ensayar las diferentes fases líquidas de que disponíamos: silicona, AK-350; sebacato de dioctilo; ftalato de dioctilo; tricresil fosfato; glicerol; polietilenglicol 400 y 1.500, así como carbowax 1.540 (polietilenglicol 1.540); grasa de silicona P. (*). Llegando a la conclusión de que las no polares (véase cuadro número 10), no deben utilizarse en la cromatografía por inyección directa de las bebidas alcohólicas, cuando se emplean detectores térmicos, pues el agua, eluida al principio, impide la identificación de algunos componentes minoritarios; con otras fases líquidas de las citadas (fosfato de tricresilo, etc.), el agua es resuelta casi inmediatamente después del etanol, lo que también impide la identificación de otros componentes. De todas ellas, las más interesantes son los polietilenglicoles, ya que presentan la propiedad de retener el agua el tiempo suficiente para que sean eluidos la mayoría de los componentes minoritarios; siendo la temperatura de trabajo, en este caso, la que determina la elección entre los diferentes polietilenglicoles..

Nosotros hemos empleado en el desarrollo de este estudio el carbowax 1.540, que por ser más termoestable que los polietilenglicoles 400 y 1.500 (cuadro número 10), ofrece la ventaja de una mayor duración de la eficacia de la columna.

Otra circunstancia objeto de ensayo fue el establecimiento de la relación ponderal entre fase líquida/soporte, puesto que no son deseables ni un defecto de aquélla, que produce picos con colas por ser mayores las interacciones soporte-soluto, ni un exceso de la misma, que aumenta considerablemente el volumen de retención, con lo que se originan pérdidas en la resolución cromatográfica. Tras nuestros estudios con las mezclas testigos, hemos encontrado la relación 25:75 (carbowax: soporte) como la más adecuada.

La preparación de la mezcla la realizamos de la manera siguiente: en primer lugar, se somete el sterchamol a un proceso de purificación que consiste en un lavado con ácido clorhídrico; una eliminación de las partículas más pequeñas por un método semejante al de James y Martín (76), basado en la diferente velocidad de sedimentación; y una posterior desecación a 200° C. durante varias horas (mejor toda una noche), al objeto de eliminar las materias volátiles que puedan existir. Después se deja enfriar en desecador a la temperatura ambiente.

Por otra parte, se prepara con la cantidad adecuada de carbowax una solución al 5 ó 10 por 100 en alcohol de 95°, siendo aconsejable calentar en baño

(*) Aprovechamos la ocasión para agradecer a las casas Industrias Químicas de Luchana, S. A.; Destilerías Adrián Klein, S. A., y Campi & Jose, el habernos suministrado muestras de los productos que ellos elaboran.

María para favorecer la disolución (*). Una vez conseguida dicha disolución, se le adiciona el sterchamol por pequeñas porciones para lograr que sea bien empapado de aquélla; añadida su totalidad, la mezcla se calienta en baño María, a fin de eliminar el alcohol del agua, agitando continuamente con una varilla de vidrio para mantener una impregnación uniforme. La evaporación puede realizarse con gran ventaja valiéndose de un «rotavapor» de la casa Buchi, que permite la agitación continua y evita el peligro de una fragmentación por el movimiento de la varilla. Dicha fragmentación ocasionaría pérdidas en el poder separador de la columna, como consecuencia de la falta de homogeneidad en el tamaño de las partículas.

Las columnas utilizadas por nosotros en esta primera etapa del trabajo estaban constituidas por tubo de cobre de 0,4 cm. de diámetro interior y dos metros de longitud. El llenado, con la mezcla anteriormente preparada, se hizo auxiliándonos de una continua vibración mecánica para evitar «espacios muertos» que entorpecerían las separaciones por actuar de cámaras de difusión.

En los extremos de las columnas, una vez llenadas, se colocan pequeños rollos de tela metálica de cobre, a fin de que no se produzcan desplazamientos de las partículas en el interior.

Antes de la puesta en uso de las columnas, y al objeto de estabilizarlas, se mantienen durante cuatro horas en estufa a 170° C. (temperatura próxima a la máxima que pueden soportar sin destruirse), a la vez que se hace pasar nitrógeno por ellas.

Recibido el fractómetro Perkin-Elmer, modelo 116E, que posibilitaría el empleo de hidrógeno como gas portador se instaló un dispositivo metálico (figura 10) a la entrada del gas en el fractómetro, que permite, tanto la eliminación del aire que exista en el circuito cromatográfico (a cuyo fin se utiliza el arrastre por nitrógeno), como la purificación del hidrógeno (para lo que se utiliza un tamiz molecular de 5 Å de la casa Merck, colocado en tubo en «U» del dispositivo).

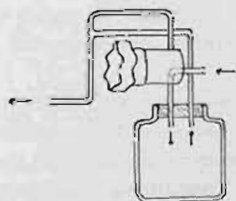
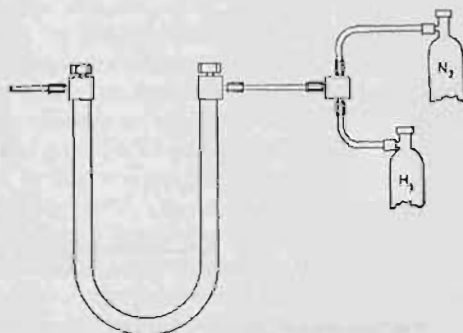
A la salida del fractómetro se dispuso un tubo de cobre para conducir el hidrógeno, efluente del aparato, fuera del local de trabajo; también se colocó entre el cromatógrafo y dicho tubo una vasija (figura 11), que impide se condensen los vapores de las sustancias cromatografiadas en el interior del tubo, pues, según pudimos comprobar, tales condensaciones daban lugar a fluctuaciones de la línea base en el aparato de registro.

Algunas características del cromatógrafo Perkin-Elmer 116E son: regulador de la presión de entrada del gas portador desde 0 a 2,5 kg. cm⁻²; indicador de caudal; dispositivo regulable de calentamiento de los filamentos del detector, que permite amperajes desde 100 a 230 mA.; la temperatura de la columna y del detector puede mantenerse constante entre el ambiente y 250° C. por un dispositivo de aire caliente termostatzado electrónicamente; el bloque de inyección puede ser calentado hasta 350° C. para conseguir una vaporización instantánea de las muestras (la temperatura alcanzada en dicho bloque se

(*) En la preparación de otras fases hemos empleado solventes más volátiles: acetona, éter, etc., pero en este caso se utilizó alcohol, dado el marcado carácter hidrófilo del poliestirenilcol.

conoce mediante un gráfico que acompaña al aparato, en función de la temperatura de la estufa).

La temperatura que hemos elegido para nuestras separaciones se obtuvo experimentalmente, modificándola hasta lograr establecer la más adecuada. Como punto de partida se ensayaron aquellas temperaturas comprendidas entre 50 y 100° C. que más frecuentemente se venían utilizando en el análisis de este tipo, manteniendo, claro está, todas las demás variables fijas, al objeto de notar su



Figs. 10 y 11.

influencia en la resolución de una misma mezcla testigo. En este caso pudimos comprobar que con temperaturas bajas se lograban mejorar las separaciones entre los componentes volátiles y entre aquellos de tiempo de retención próximo, si bien los de punto de ebullición alto no eran bien resueltos; además, estas temperaturas, relativamente bajas para el tipo de problema, aumentaban el tiempo de retención de todos los componentes, lo cual hace que los picos se ensanchen considerablemente, efecto perjudicial si se quiere obtener una mayor respuesta con igual cantidad de soluto.

Las figuras 12, 13 y 14, correspondientes a los cromatogramas obtenidos al operar con la misma mezcla testigo, a 50, 80 y 95° C., respectivamente, son prueba de lo indicado.

De los cromatogramas representados puede deducirse que, para la separación de los componentes de esa mezcla testigo, la temperatura más adecuada sería la de 80° C., pero dado que los problemas a resolver tienen componentes meno-

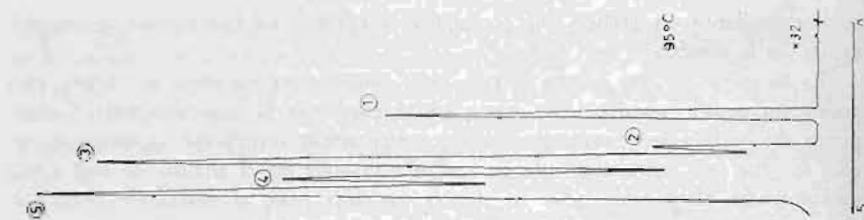


Fig. 12.

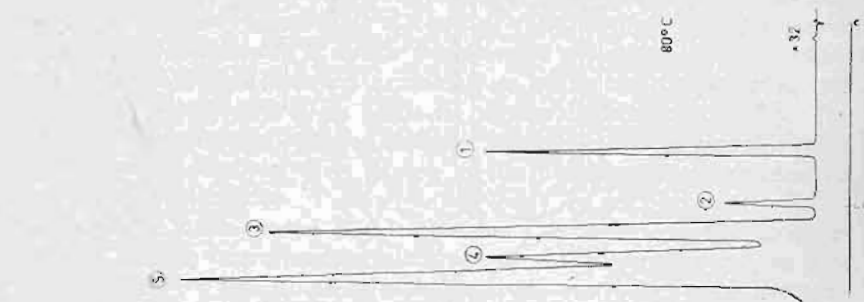


Fig. 13.



Fig. 14.

- 1 FORMIATO DE ETILO
 2 ACETATO DE ETILO
 3 METANOL
 4 PROPANOL-2
 5 ETANOL

ritarios (propanol, isobutanol, etc.) de tiempo de retención mucho más alto, los picos que originarían serían poco destacados e inapreciables a veces, por lo que resulta más conveniente sacrificar, en parte, la buena resolución de los primeros componentes y operar a 95° C., con lo cual la elución de aquellos sería mejorada, e incluso el tiempo de análisis quedaría reducido a unos treinta minutos.

Otro factor de gran interés para conseguir una óptima resolución, con una misma columna, temperatura, etc., es el caudal de gas portador, pues, como señala Dal Nogare (97), se pueden obtener diferente número de platos teóricos, manteniendo las restantes condiciones constantes, con la simple modificación del caudal. Por esta razón, es de sumo interés determinar, experimentalmente, el más adecuado; su elección se consigue variando de manera gradual la presión de entrada del gas portador hasta lograr el caudal más conveniente.

La presión a que hemos realizado las determinaciones, en esta primera etapa de trabajo, fue de 0,5 kg. cm⁻², con la que obteníamos un caudal de hidrógeno de 90 ml./minuto, medido a temperatura ambiente (18° C.). Con presiones más elevadas y subsiguientemente mayores caudales, la resolución se veía afectada por presentarse algunos picos superpuestos; al disminuirla, el caudal decrece y la duración del análisis se incrementa considerablemente por alargarse el tiempo de retención de cada componente, según la relación $Tr = Vr/C$, donde Vr es el volumen de retención que, como ya indicábamos, es constante para una temperatura y columna; Tr, el tiempo de retención, y C el caudal. Además los componentes de elevado punto de ebullición no eran bien resueltos, dificultándose no sólo su posible determinación cuantitativa, sino también su identificación.

Este efecto, similar al originado por una diferente temperatura experimental, no debe olvidarse que procede de distinta causa.

La cantidad de muestra a inyectar fue establecida tras ensayos hasta hallar la más adecuada para la sensibilidad de nuestro detector y sistema de registro, encontrando como aconsejable, en nuestras condiciones de trabajo y para la sensibilidad 1, no inyectar muestras superiores a 0,005 ml., porque con mayor cantidad se ve afectada la línea base, así como la resolución.

Para la inyección hemos utilizado una jeringa Hamilton de 0,05 ml. de capacidad dividida en 0,001 ml.

En la figura 15, que corresponde al cromatograma de un aguardiente de orujo, pueden observarse los diferentes picos obtenidos en estas condiciones tras la inyección directa de la bebida.

Como consecuencia de todos los ensayos anteriores, las condiciones de trabajo quedaron establecidas como sigue:

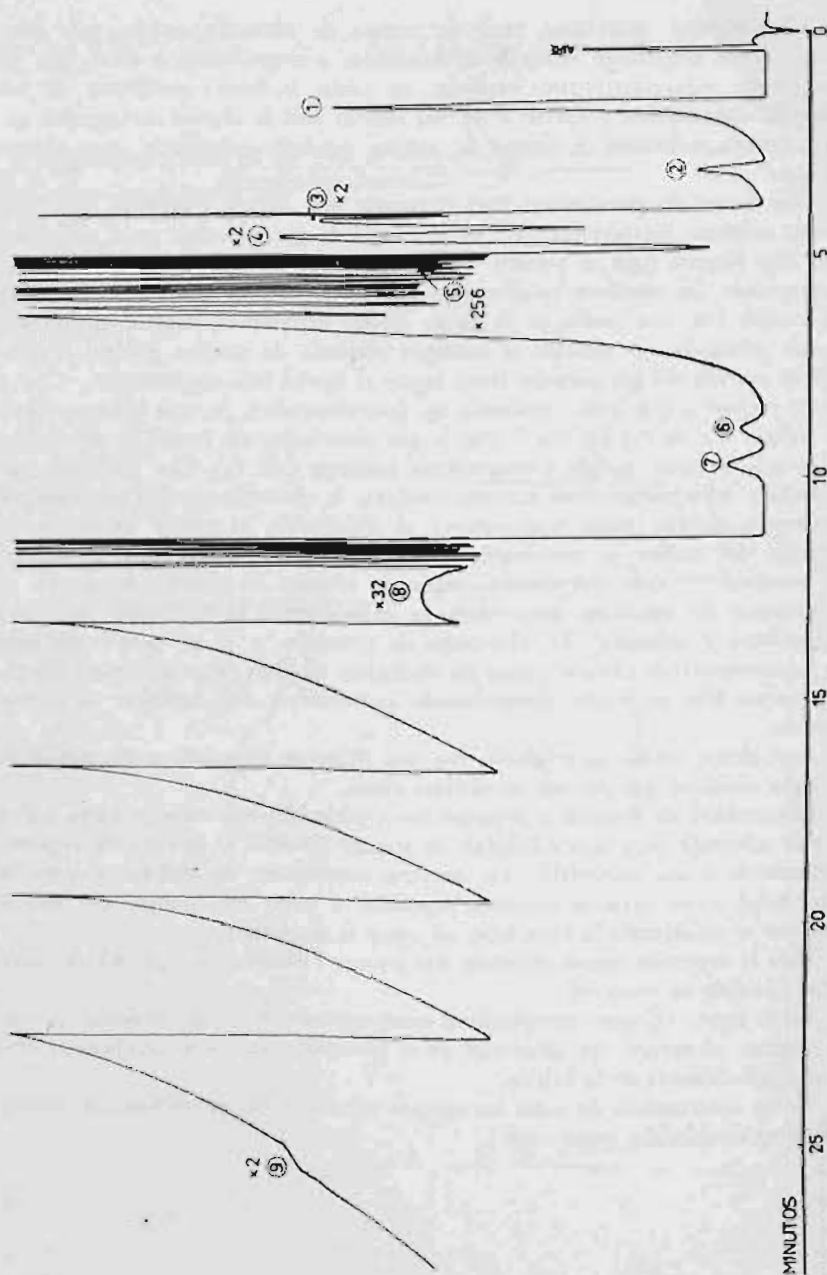


Fig. 15

Cromatógrafo	Perkin-Elmer, modelo 116 E.
Dimensiones columna	200 × 0,4 cm.
Soporte sólido	Sterchamol 50/70 (0,2-0,3 mm.).
Fase estacionaria	Carbowax 1,540 (25 : 75).
Temperatura columna	95° C. ± 0,1.
Gas portador	Hidrógeno puro de la S. E. O.; 0,5 kg./cm ² .
Detector	4 filamentos; 230 mA.
Registrador	Hartmann & Braun, 1 mV. «Linecomp».
Velocidad papel	1 cm./minuto.
Cantidad muestra	0,005 ml.
Bloque inyección	150° C.
Tiempo análisis	Aproximadamente 30 minutos.

Trabajos con columna de dos metros

Operando con las condiciones señaladas, hemos procedido a cromatografiar las diferentes muestras de bebidas espirituosas, comenzando por los aguardientes de orujo que, debido a su composición compleja, presentan cromatogramas más complicados.

Los resultados gráficos obtenidos (figura 15), fueron muy similares a los de Carroll y O'Brien (83), lo que nos hizo pensar habíamos logrado buenas separaciones y que los componentes de las bebidas españolas serían los mismos que ellos indicaban, salvada la excepción del formaldehído, cuyo pico no hemos observado.

Sin embargo, para mayor garantía, preferimos probar por diferentes procedimientos si los picos correspondían a los componentes que dichos autores indicaban, ya que sus resultados no coinciden con los de otros investigadores (95). Con esta finalidad, en todos los casos se procedió a determinar el tiempo de retención de la sustancia sospechada y comprobar si coincidía con el pico estudiado.

De esta manera pudimos concluir que el primer componente correspondía al acetaldehído, pues su tiempo de retención era igual al que presentaba esta sustancia aislada; además, si se añadía una pequeña cantidad al aguardiente, dicho pico se veía aumentado.

También eliminando el acetaldehído del aguardiente, mediante clorhidrato de 2-4 dinitrofenilhidracina, por formación a 0° C. de la dinitrofenil-hidrazona correspondiente (98), en el cromatograma desaparecía este componente.

Por último se hizo la reacción cromática de Sánchez (99), mediante la solución piperacín-nitroprúscica, con la que obtuvimos un color azul de índigo. Esta reacción ha sido señalada por su autor como característica de los aldehídos etílico, propílico y alílico, pero, teniendo en cuenta que pertenecen a la misma serie homóloga, sus tiempos de retención son mucho más elevados, por lo que pudimos concluir que el componente estudiado era el acetaldehído.

El segundo componente representado en el cromatograma correspondería, por comparación a los resultados de Carroll y O'Brien (83), al formiato de etilo;

aunque, como en los casos anteriores, para mayor certeza se cromatografió dicha sustancia aisladamente y en mezcla con el aguardiente, con lo cual pudo observarse que podía corresponder a dicha sustancia.

Kabor y Eitre (95), no han encontrado, mediante la cromatografía de gases, tal componente y sí acetona, por lo que también se procedió a realizar algunas pruebas encaminadas a ponerla de manifiesto. Estas nuevas experiencias permitieron comprobar que al adicionarla al aguardiente se incrementaba el pico objeto de estudio y, por tanto, cabía sospechar que se trataba de acetona y no del formiato, puesto que ambos presentaban el mismo tiempo de retención.

Para averiguar de cuál de los dos componentes se trataba, o si estaban los dos presentes, se realizaron las pruebas siguientes: una parte alícuota se saponificó con potasa a reflujo y el líquido resultante se cromatografió, observándose que este segundo pico desaparecía del cromatograma, lo cual hizo suponer que era una sustancia con grupo funcional éster.

Por otra parte, una porción alícuota del líquido de saponificación fue evaporada a sequedad y en el residuo se realizó la reacción cromática de Sánchez para el ácido fórmico (100), que consiste en añadir resorcina y unas gotas de sulfúrico, con lo que apareció una coloración rojo escarlata, característica y específica del mismo. Esta reacción y las pruebas anteriores dieron como conclusión que en el aguardiente estudiado existía formiato de etilo.

También realizamos algunas pruebas para poner de manifiesto la acetona (caso de que existiese); los resultados fueron negativos cuando aplicamos la reacción de Legal (55), encontrando en cambio positiva la reacción de Denigés (57). Tal discrepancia podría explicarse teniendo en cuenta la diferente sensibilidad señalada para estas reacciones (101).

Además se recurrió a la caracterización mediante la obtención de la 2-4 dinitrofenilhidrazona correspondiente, para lo cual a un concentrado de aguardiente obtenido por destilación se añadió un exceso de solución de clorhidrato de 2-4 fenilhidracina y se dejó veinticuatro horas a 6° C. (98). La 2-4 dinitrofenilhidrazona conseguida se presentaba al microscopio en forma de pequeñas agujas, mientras la 2-4 dinitrofenilhidrazona obtenida de la acetona aparece en forma de agujas ligeramente más largas.

Determinando el punto de fusión, auxiliándonos de un microscopio de platina calentable, se encontró, para la dinitrofenilhidrazona que procedía del aguardiente, un valor de 140° C., superior al que corresponde a la del derivado de la acetona, que es 126° C., lo cual excluye la posibilidad de que se halle ésta presente.

La discrepancia del valor obtenido para el derivado del acetaldehído que se encuentra en el aguardiente (140° C. como valor experimental y 168° C. de valor teórico) (98), se explica teniendo en cuenta que dicho derivado presenta a veces distintos valores (102).

No satisfechos todavía con el resultado de esta discriminación, se probó de confirmar por cromatografía de gases si se trataba de acetona o de formiato de etilo, pero dado que la separación en una columna de naturaleza polar, como la que veníamos utilizando, no se lograba; procedimos a emplear una columna de fase estacionaria no polar (aceite de sílicona al 30 por 100 sobre sterchamol

de 50/70 mesh.), ya que por sus diferentes puntos de ebullición (54 el formiato de etilo y 56 la acetona), podrían ser separados.

Operando con esta fase líquida, resultó fácil lograrlo en una mezcla binaria, a temperatura baja (40° C.), pero al proceder de igual manera con una bebida alcohólica, el enorme pico del agua, eluida al principio, ocultaba a estos componentes, por lo que decidimos utilizar una columna mixta formada por un metro de aceite de silicona al 30 por 100 y cuatro metros de polietilenglicol 1.540 al 25 por 100, ambos sobre sterchamol de 50/70 mesh, y operar a temperatura relativamente baja (50° C.) con lo que se consiguió eliminar el inconveniente antes señalado, pues de un lado se tiene la ventaja del aceite de silicona de separar ambos componentes y, de otro, eluir el agua al final del cromatograma, como ocurre cuando se opera con la columna de carbowax solamente. De esta manera hemos podido comprobar que el componente era el formiato de etilo.

El tercer pico presenta todas las características del acetato de etilo: su tiempo de retención coincide al cromatografarlo aisladamente o en mezcla con el aguardiente; sin embargo, tras una hidrólisis, bajo reflujo, con exceso de álcali, este componente no desaparece completamente del cromatograma, lo que hace sospechar que el pico esté integrado por dos sustancias de igual tiempo de retención. Una, hidrolizable con los álcalis, el acetato de etilo y, otra, probablemente, el acetal, ya que dada su gran estabilidad en medio alcalino permanecería después de saponificar. Precisamente Ribéreau Gayon y Peynaud (103), aprovechando esta propiedad, han efectuado la investigación química de este componente en los aguardientes, encontrando cifras que oscilan desde 24 a 118 mg./litro.

El cuarto componente representado en los cromatogramas corresponde al metanol, y su comprobación se hizo por el tiempo de retención y el método de sobrecarga, como en casos anteriores, y químicamente, por transformación en formaldehído y posterior identificación del mismo por la técnica de Deniges (24) o la de Boos (29).

El quinto pico corresponde al etanol, y su identificación no deja lugar a dudas dada su cuantía; no obstante, se determinó el tiempo de retención de etanol puro y se comprobó la exacta coincidencia.

En algunas bebidas, concretamente en todos los aguardientes de orujo, se encontró un componente casi en la cola del pico del etanol, con un tiempo de retención, para estas condiciones experimentales, de 8,9 minutos (véase el cromatograma de la figura 15), que si bien en ocasiones lo han encontrado Carroll y O'Brien (83), su naturaleza no fue señalada, por lo que su identificación tiene gran valor.

Dicho componente persiste después de la saponificación, por lo que supusimos se trataría de algún alcohol, y para su identificación aplicamos el método de las series homólogas, a cuyo objeto se procedió en primer lugar a determinar la relación existente entre el número de átomos de carbono de los términos de los alcoholes primarios, y el logaritmo de su tiempo de retención, encontrando que el componente incógnita no pertenecía a esta serie. Seguidamente se cromatografiaron los primeros términos de los alcoholes secundarios, hallando para el

butanol-2 un tiempo de retención coincidente con el del componente que queremos identificar. Efectivamente, al añadir el aguardiente de orujo una pequeña cantidad de este alcohol, se notaba fácilmente el aumento en altura de este pico.

Como complemento, también se hizo la reacción de Chancel (104), con ácido nítrico y el procedimiento que emplea el reactivo de Deniges para detectar la acetona obtenida por la oxidación de los alcoholes secundarios, lo que nos permitió poner de manifiesto la función alcohol secundario, y ello unido a las anteriores conclusiones permitió asegurar la naturaleza del componente estudiado.

El pico número siete, presente en casi todos los cromatogramas, tras pruebas similares a las realizadas con los otros componentes, fue fácil comprobar que se trataba del *n*-propanol.

La confirmación química, aparte de las dificultades que encierra, no se consideró necesaria, dado que a medida que los tiempos de retención se elevan, su especificidad es mayor, por ser la temperatura de trabajo más adecuada para la separación de estos componentes.

El pico número ocho, extraordinariamente ensanchado, tampoco dejó lugar a dudas acerca de su naturaleza, identificándose como agua.

El pico número nueve, que, pese a tener un tiempo de retención casi doble al del agua, aparece situado en la cola del pico asimétrico de la misma, es más bien una inflexión, y se corresponde por su tiempo de retención con los alcoholes amilicos (2-metil butanol-1 y 3-metil butanol-1).

Como resultado de esta primera fase experimental, llegamos a la conclusión de que se encuentran como componentes normales en los aguardientes de orujo: acetaldehído, formiato de etilo, acetato de etilo y acetal confundidos, metanol, etanol, *sec*-butanol, *n*-propanol, agua y alcoholes amilicos; lo cual está casi de acuerdo con las conclusiones de Carroll y O'Brien (83), en lo que no coincidimos con dichos autores es en la presencia del formaldehído, pues no lo hemos encontrado, ni por cromatografía de gases, pese a operar con un registrador más sensible que el utilizado por ellos, ni mediante la reacción del ácido cromotrópico (reacción de alta sensibilidad) (33). Otra diferencia se refiere al *sec*-butanol (butanol-2), que si bien en alguno de los cromatogramas de los citados autores aparece su pico no lo han identificado, cosa que nosotros hemos logrado por cromatografía de gases y por pruebas químicas.

A pesar de tener todos estos componentes identificados, al cromatografiar un aguardiente (muestra número 13), que nos habían enviado para investigar la presencia del metanol, obtuvimos un cromatograma representado en la figura 16. En él puede notarse la ausencia de este alcohol y la aparición de otro componente, casi superpuesto al etanol, hasta ahora no encontrado. Posteriormente, cromatografiando diferentes sustancias puras, pudimos sospechar se trataba de alcohol isopropílico (propanol-2), dado que su tiempo de retención coincide con el de aquél. También, aplicando los métodos químicos usuales para la investigación de este alcohol en las bebidas espirituosas, pudimos comprobar que se trataba de la sustancia a que hemos hecho referencia.

La determinación química que hemos empleado fue la de oxidación previa

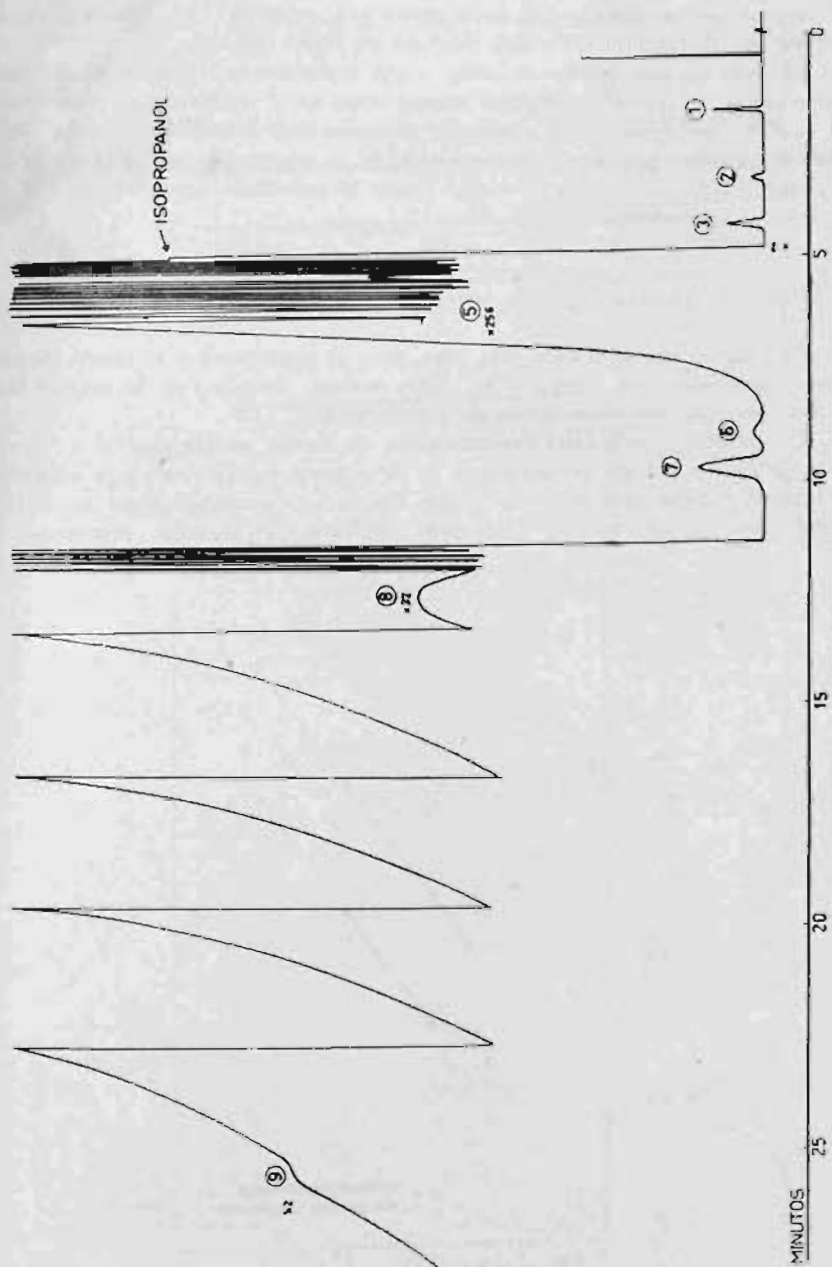


Fig. 16

a acetona por mediación del ácido crómico y posterior caracterización de la misma con el nitroprusiato sódico (reacción de Legal) (55).

El problema que plantea el hecho a que acabamos de referirnos es de suma importancia, ya que el isopropanol normalmente no se determina, y puede darse el caso de que aguardientes artificiales conteniéndolos fuesen dados como aptos para el consumo, por la sola comprobación de la ausencia de metanol, siendo en realidad debidas de elevada toxicidad (véase la toxicidad comparada de los alcoholes, cuadro número 2).

Trabajos con columna de cuatro metros

Para lograr una separación más clara entre el isopropanol y el etanol, decidimos operar con una columna de cuatro metros, llenada con la misma fase estacionaria que veníamos utilizando anteriormente.

Las restantes condiciones experimentales no fueron modificadas, si se exceptúan la presión del gas portador, que se elevó hasta 0.9 kg./cm^2 y la velocidad del papel registro que se redujo desde 600 a 240 mm./hora (que se corresponde con 0.4 cm./minuto). Con estas condiciones el metanol, isopropanol y

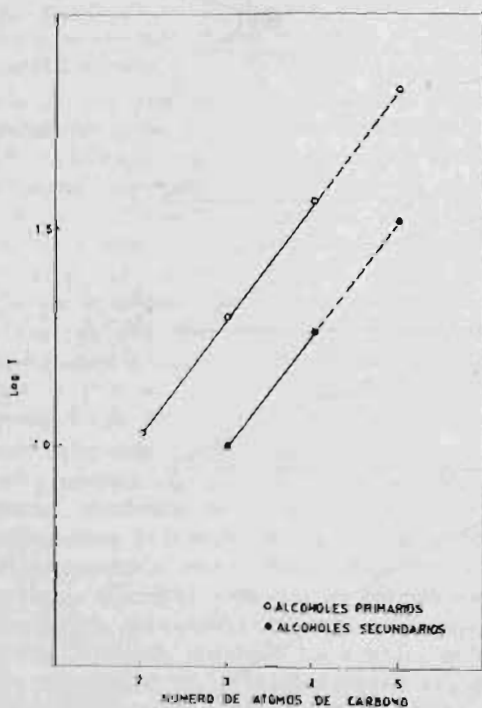
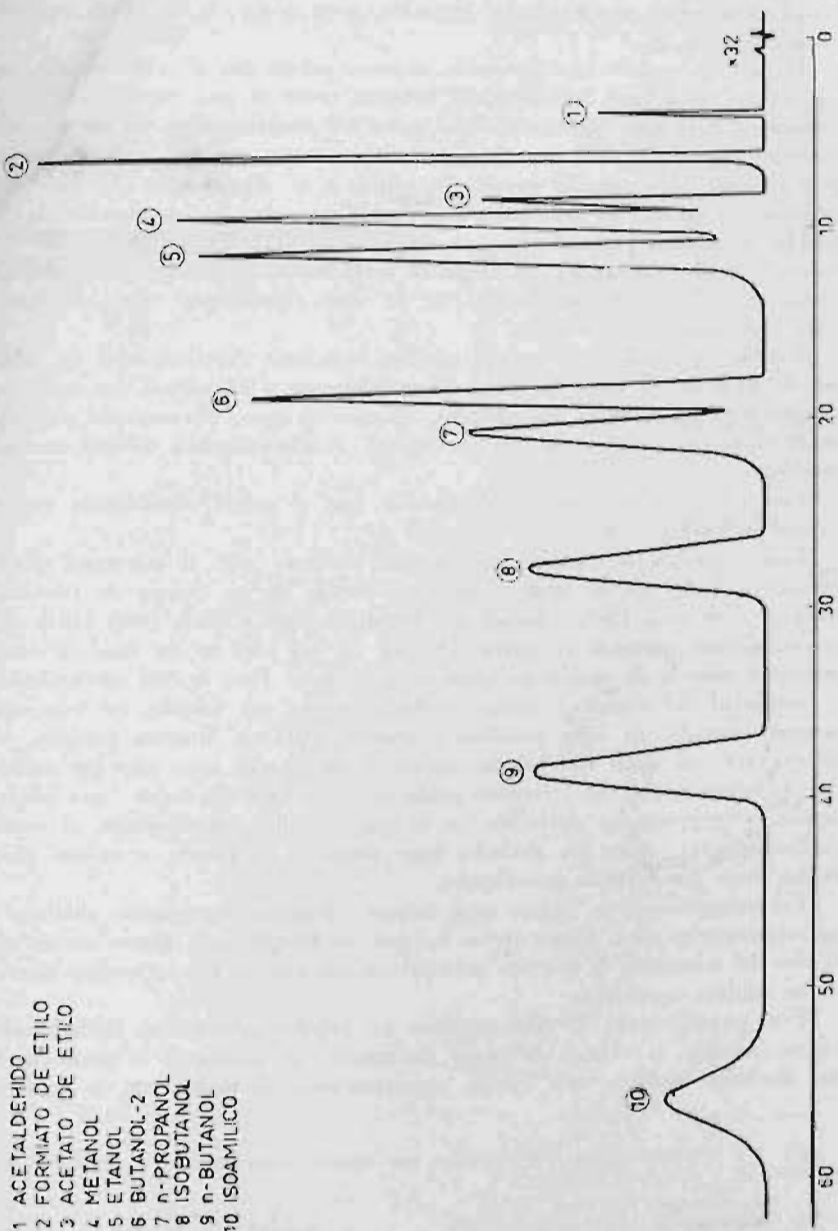


Fig. 17.



- 1 ACETALDEHIDO
- 2 FORMIATO DE ETILO
- 3 ACETATO DE ETILO
- 4 METANOL
- 5 ETANOL
- 6 BUTANOL-2
- 7 n-PROPANOL
- 8 ISOBUTANOL
- 9 n-BUTANOL
- 10 ISOAMILICO

Fig. 18.

etanol presentaban un tiempo de retención igual a 9.7, 11.0 y 11.7, respectivamente.

El azar nos reservó una agradable sorpresa, puesto que al cromatografiar en las nuevas condiciones las diferentes bebidas, entre el pico correspondiente al *n*-propanol y el agua, apareció en casi todos los cromatogramas un nuevo componente (figura 20), que anteriormente no era visto por ser ocultado por el gran pico del agua; con tal motivo procedimos a su identificación (*). Para ello, teniendo en cuenta los antecedentes bibliográficos sobre la composición de las bebidas alcohólicas, sospechamos que podía tratarse del *n*-butanol o del isobutanol (metil-2 propanol-1), y, como en otros casos, se procedió a su identificación por el ya referido método de las series homólogas, cuyos resultados están representados en la figura 17.

También determinamos, con las nuevas condiciones experimentales, los tiempos de retención de estos dos alcoholes aisladamente y en mezcla con todos los componentes hasta ahora identificados, excepto el agua. El resultado obtenido puede verse en la figura 18, que corresponde al cromatograma de esta muestra compleja.

Con tales ensayos pudimos comprobar que el nuevo componente era el alcohol isobutílico.

Estas experiencias también permitieron presumir que el *n*-butanol puede quedar ocultado por el agua, como consecuencia de su tiempo de retención superior al de ésta. Dicho alcohol que Webb, Kepner e Ikeda (105) hallan por procedimientos químicos en proporción del 1.9 por 100 en un fusel de vino, pensamos ponerlo de manifiesto eliminando el agua. Para lo cual aprovechando la propiedad del etanol y demás alcoholes de no ser solubles en soluciones acuosas saturadas de sales potásicas (carbonato potásico, fluoruro potásico, etcétera) (106), al agitar una bebida con exceso de una de estas sales (en nuestro caso lo hemos hecho con carbonato potásico) se obtienen dos capas: una inferior acuosa, y otra superior alcohólica, en la que se hallan representados, al menos cualitativamente, todos los alcoholes que componen la bebida, e incluso parte de los otros componentes minoritarios.

Cromatografiando la última capa, hemos logrado cromatogramas similares a los representados en la figura 19, en los que, en ningún caso, hemos encontrado el pico del *n*-butanol, lo que nos permite concluir que no es componente normal de las bebidas espirituosas.

Este procedimiento de cromatografiar las bebidas previamente deshidratadas ofrece, además, la ventaja de poner claramente de manifiesto la presencia de los alcoholes amilicos, que en los cromatogramas obtenidos con la columna

(*) Los números, en los cromatogramas que siguen, corresponden a las siguientes sustancias:

- | | |
|-------------------------------|-----------------------------|
| 1. Acetaldehído. | 6. Butanol-2 (sec-butanol). |
| 2. Formiato de etilo. | 7. Propanol-1. |
| 3. Acetato de etilo y acetal. | 8. Isobutanol. |
| 4. Metanol. | 9. Butanol-1. |
| 5. Etanol. | 10. Isoamilicos. |

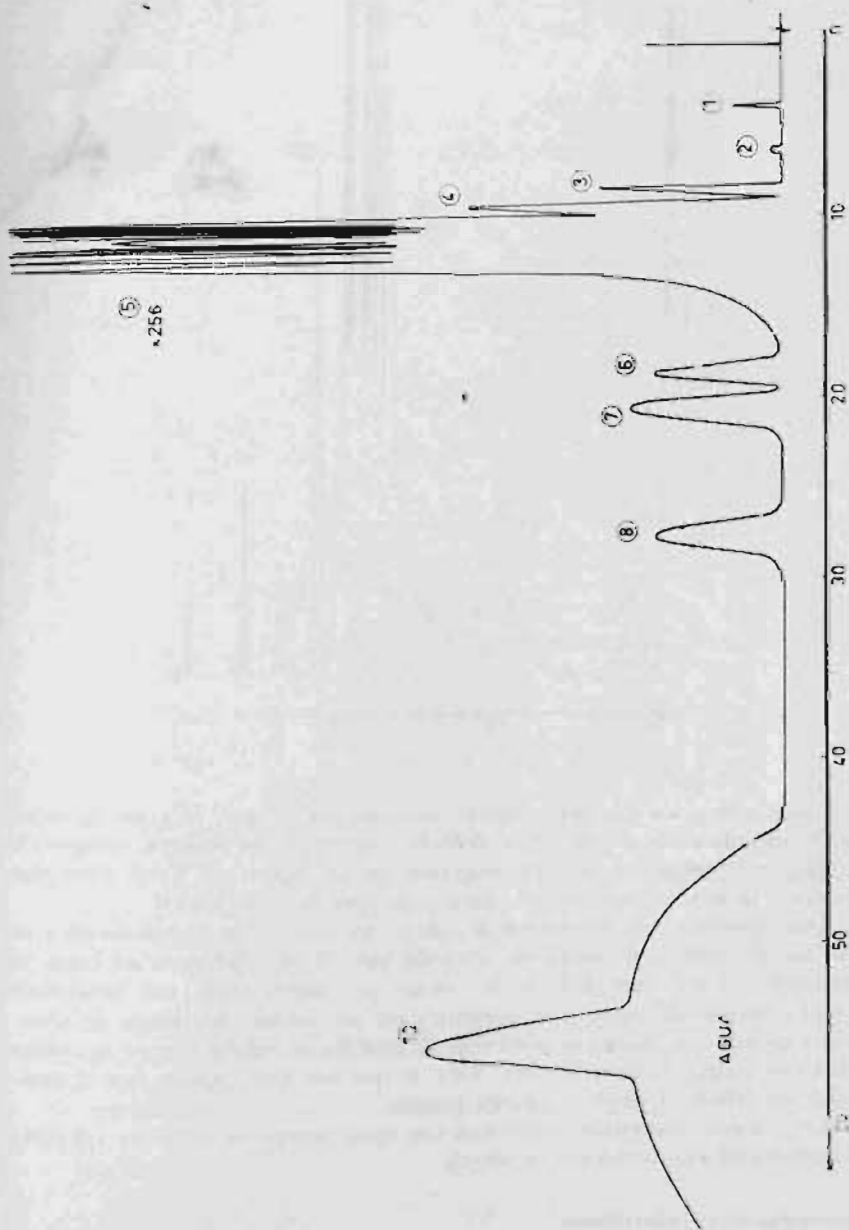


Fig. 19

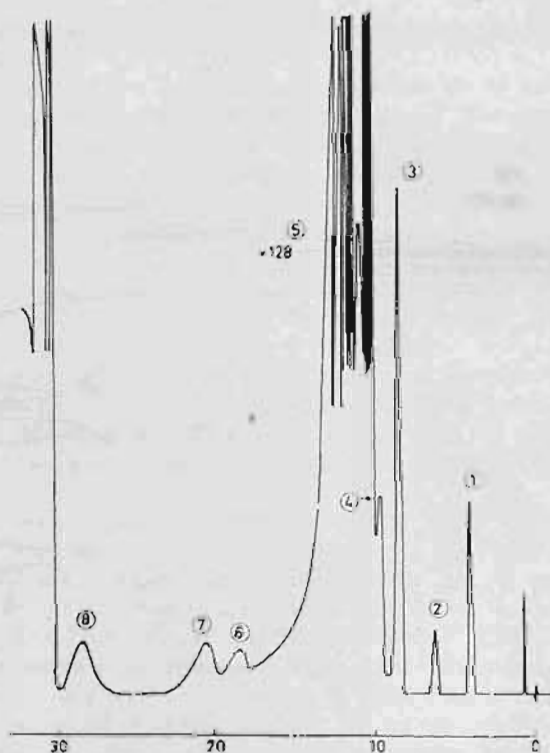


Fig. 20.

de cuatro metros son casi por completo ocultados por el agua, así como de mejorar la identificación de los otros alcoholes superiores por haberse enriquecido la solución. Compárense los cromatogramas de las figuras 20 y 19, correspondientes a la muestra número 10, antes y después de deshidratarla.

Otro fenómeno que se observó al aplicar este método de deshidratación parcial, fue el cambio del tiempo de retención para el pico del agua, así como su exagerado achatamiento. Este hecho, citado por Smith (107), está relacionado con el contenido del agua, y se manifiesta por un aumento del tiempo de retención a medida que decrece el porcentaje de ésta. Es de señalar que en su trabajo opera con ftalato de dioctilo sobre celita, lo que nos hace suponer que el fenómeno sea debido al emplear soportes porosos.

Los restantes componentes aparecen con igual tiempo de retención calculado al cromatografiarlos aislados o en mezcla.

Determinaciones cuantitativas

Terminada esta parte de identificación nos dedicamos a realizar algunas determinaciones cuantitativas de interés, y como quiera que en los aguardientes

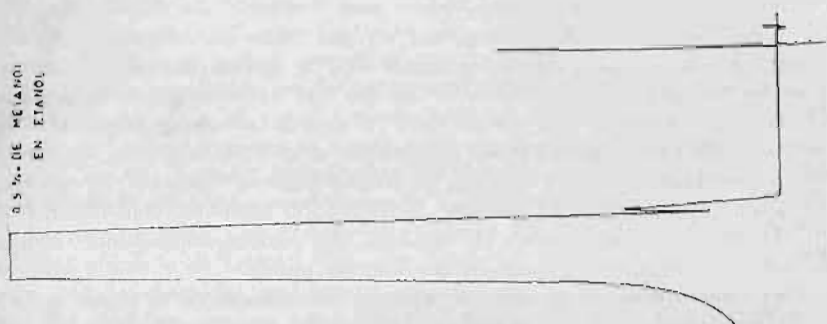


FIG. 21

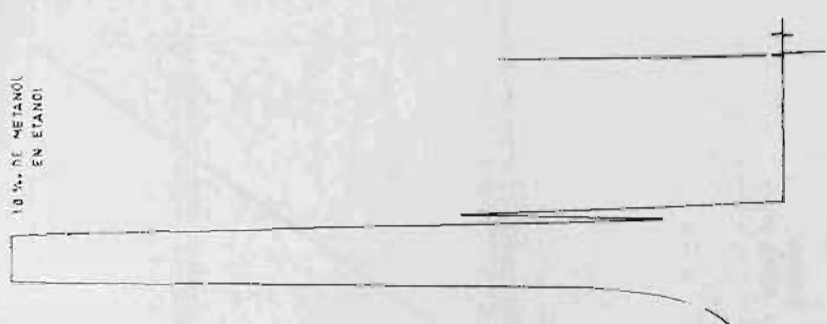


FIG. 22

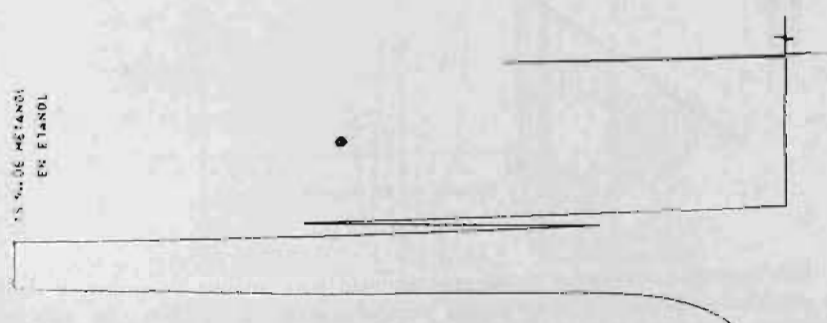


FIG. 23

de orujo, a juzgar por la altura de los picos del metanol, su proporción sería elevada, procedimos a dosificarlo.

Con este propósito preparamos una escala creciente de metanol en etanol, ambos de la casa Merck (0,5, 1,0, 1,5 por 1.000 en volumen a 15° C.). El preparar los testigos a esta temperatura tiene la ventaja de que permite expresar los resultados en peso/volumen, sin más que multiplicar por la densidad del metanol anhidro a esta temperatura (= a 0,7959) que cromatografiados en nuestras condiciones experimentales nos resultaron los cromatogramas representados en las figuras 21, 22 y 23, con los cuales pudimos construir la curva de calibración (figura 24), que permite determinar el contenido en metanol de una bebida, con la sola medida de la altura del pico correspondiente, siempre que todas las condiciones experimentales sean las mismas.

Para concentraciones superiores de metanol no incluidas en la citada gráfica es necesario emplear menor sensibilidad de registro y construir curvas de calibración con nuevas series de testigos.

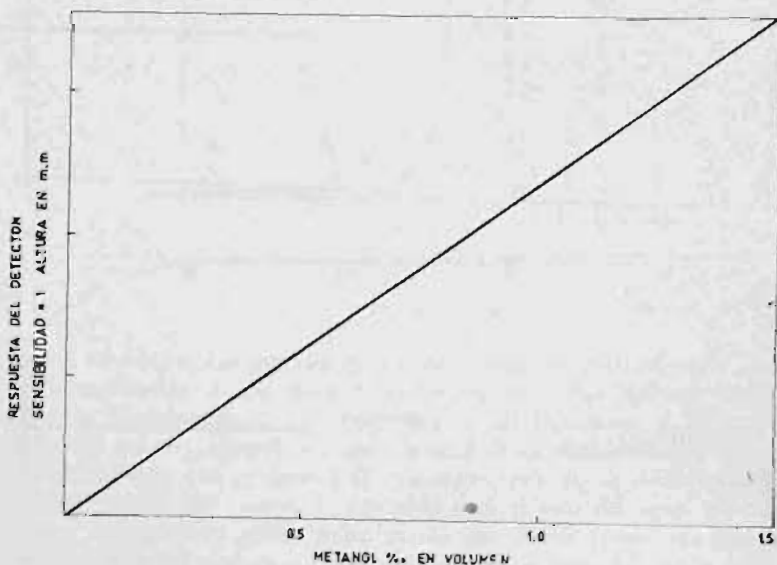


Fig. 24.

Este método cuantitativo es de gran utilidad para análisis de rutina, y dado los numerosos problemas que hemos tenido ocasión de resolver, no sólo en destilados alcohólicos, sino también en bebidas complejas: licores, cremas, etc., e incluso en sangre, orina, escabeche, etc., lo hemos preferido.

Al cromatografiar estos líquidos ricos en materia orgánica, es aconsejable colocar en la pequeña cámara del bloque de inyección, un apelsonamiento de alambre de acero, que retiene las partículas no volatilizables e impide se ensucie el circuito cromatográfico. Dicho dispositivo es conveniente cambiarlo al trans-

currir un determinado número de inyecciones para evitar los resultados anormales originados por los productos de la pirolisis de tales sustancias orgánicas.

Conviene señalar de manera especial que, pese a tener las curvas de calibración para unas condiciones experimentales determinadas, es aconsejable repetir las cada día, o, al menos, comprobar con un patrón su vigor.

Los valores encontrados en los aguardientes de orujo genuinos, superan, en la mayoría de los casos, al 3 por 1.000 en volumen, e incluso alcanzan cifras del 5 por 1.000 (véase la figura 25, correspondiente al cromatograma de la muestra número 9). En algunos aguardientes de hiervas, a toda vista fraudulentos, hemos hallado cifras de 300 por 1.000 en volumen (muestra 14, figura 26).

La determinación cuantitativa del metanol fue también realizada por los métodos químicos de Deniges (24) y de Boos (29), a fin de comparar sus resultados con los obtenidos mediante el procedimiento cromatográfico, con lo cual pudimos confirmar nuestra suposición de que las discordancias existentes entre

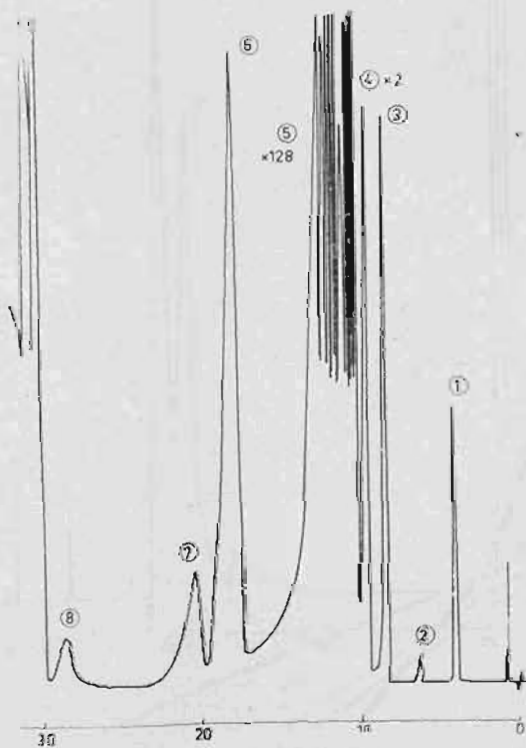


Fig. 25.

diversos analistas eran debidas a deficiencias, ya preparativas, ya experimentales. También la aplicación de estos métodos ha servido para comprobar lo que ya señala Rankoff, Popoff y Jovtscheff (33) acerca de la mayor sensibilidad del procedimiento del ácido cromotrópico.

Conocido el elevado contenido de metanol que existe en los aguardientes de orujo, que sobrepasa con mucho el límite de 0,05 grs./litro, tolerado por la legislación actual española (*), nos pareció interesante el precisar su origen, ya que, aunque la mayoría de los autores hacen a las pectinas de la uva responsables de la existencia del metanol, entre el vulgo existe la creencia de que en su formación interviene un proceso de destilación seca de las materias «deñosas» que integran el hollejo, raspón, etc., así como los sarmientos que se introducen en los alambiques con objeto de facilitar su vaciado, una vez terminado el proceso de elaboración.

Por tal causa, recogiendo muestras en diversos momentos de la destilación

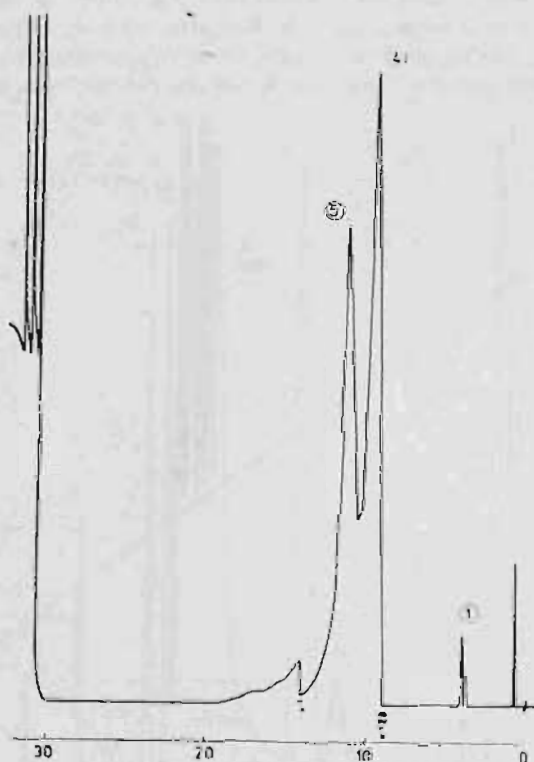


Fig. 26.

del orujo, en distintos lugares de la provincia (Sobredo, Sete, etc.), procedimos a su estudio por cromatografía de gases, con miras a probar si el metanol existente en el orujo fermentado se incrementaba al final del proceso de desti-

(*) De modo aficioso sabemos que el límite tolerado ha sido elevado a 2 granos por mil.

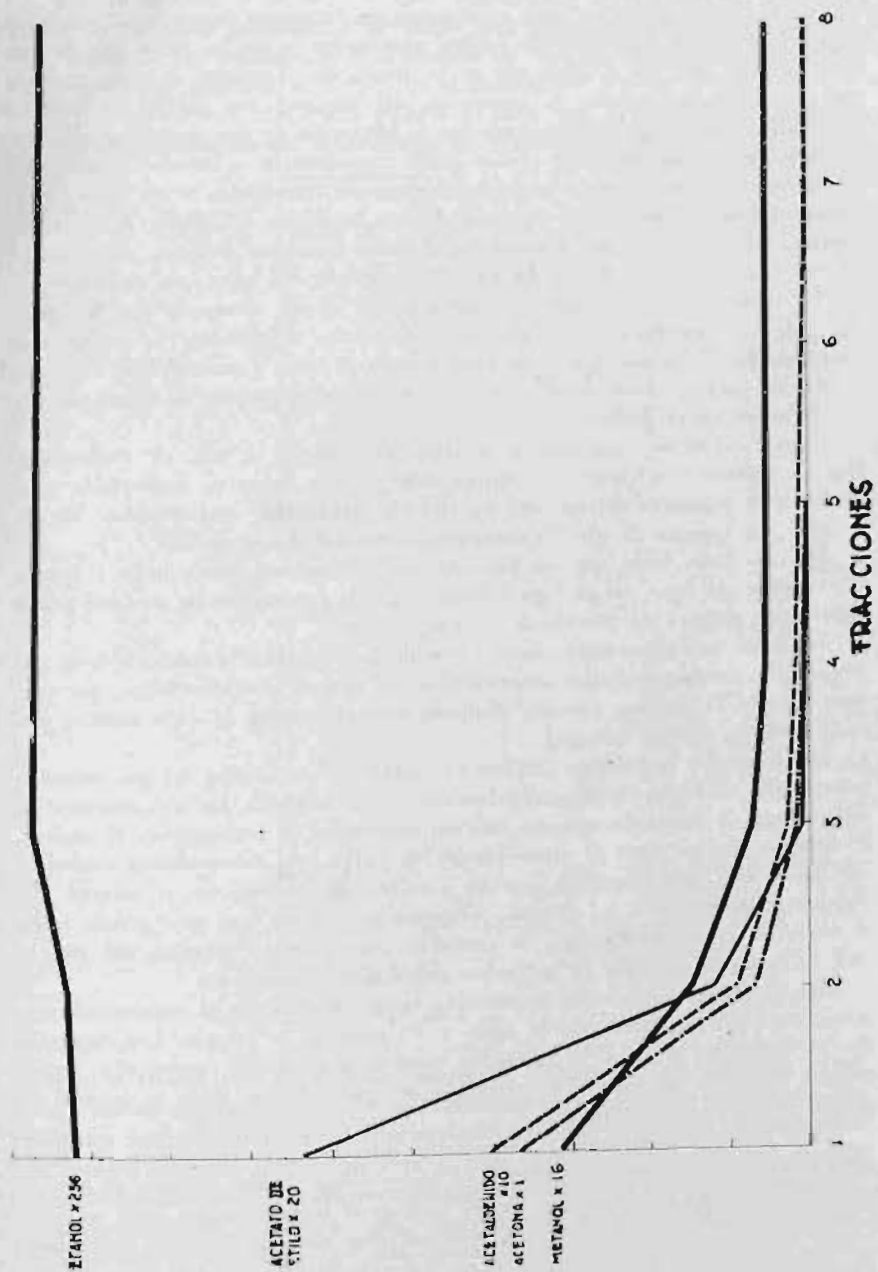


FIG. 27

lación. Como resultado de estas experiencias encontramos metanol casi en igual proporción, en las fracciones de cabeza intermedias y en las colas, por lo que cabe concluir que no es originado en la destilación. También se pudo comprobar lo difícil que resulta la separación del metanol por destilación con los alambiques usuales, que se explicaría por la formación de una mezcla azeotrópica.

Más tarde, con objeto de probar dicha circunstancia, se estudió cromatográficamente en el laboratorio el proceso de destilación fraccionada de un aguardiente, encontrándose los resultados representados en la figura 27, donde se ve claramente cómo varía la composición de las distintas fracciones y cómo, sin embargo, el metanol, a partir de la tercera fracción, mantiene un valor casi constante.

La figura se ha obtenido representando la altura alcanzada por los picos de cada componente en las distintas fracciones, señalándose la sensibilidad empleada en el registro. Los valores del acetato de etilo y acetaldehído, han sido calculados para la sensibilidad $1/20$ y $1/10$, respectivamente, al objeto de poderlos incluir en el gráfico.

Como ampliación, también se hicieron experiencias a base de cromatografiar los líquidos resultantes de simples maceraciones de orujo fermentado y se evidenció la presencia del metanol en elevada proporción, confirmándose las anteriores conclusiones de que es componente normal del orujo.

De otro lado, dado que en los procesos destilatorios nunca llega a quedar el «bagazo» sin agua, no es lógico admitir que la producción de metanol pueda deberse, en parte, a un proceso de destilación seca.

Todas las determinaciones cuantitativas de metanol, con la columna de 4 metros, fueron cromatografiadas auxiliándonos del sistema «backflushing», que permite invertir el circuito gaseoso, disminuyendo el tiempo de cada análisis, por evitar la lenta elución del agua.

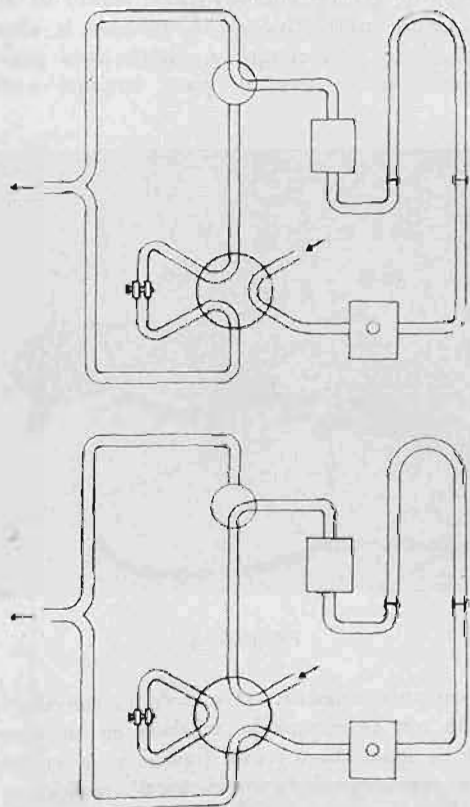
Dicho sistema se basa en cambiar el sentido de circulación del gas portador, con lo que se logra eliminar rápidamente de la columna los componentes de alto tiempo de retención que no interesa determinar y prolongarían el análisis. El sistema original tiene el inconveniente de exigir una manipulación cuidadosa de llaves, etc., que suponen grandes cambios de presión en el interior del circuito cromatográfico y, además, es necesario perforar con una gruesa aguja el cierre de goma del inyector de muestras, para permitir la salida del gas, lo cual hace que el «tabique de goma» se deteriore con frecuencia.

Con el fin de evitar estas desventajas, hemos modificado el mencionado sistema, eludiendo el empleo de la aguja y los cambios de presión. Los esquemas de las figuras 28 y 29 y la fotografía número 4 permiten comprender, según nuestra modificación, cuál es el recorrido del gas portador antes y después de aplicar el sistema «backflushing».

Otra cuestión interesante es la notable diferencia existente entre el contenido en metanol de los vinos blancos y tintos (véase cuadro número 1), que se atribuye a que en la elaboración de los últimos el hollejo, raspón, etc., se mantienen sumergidos en el mosto durante bastante tiempo. Esto nos hizo pensar que un proceso análogo ocurriría en los aguardientes, es decir, que cuanto más tiempo estuviese almacenado y en fermentación el orujo, mayor sería el contenido en metanol del aguardiente correspondiente. Al objeto de compro-

bar esta suposición, se llevaron a cabo experiencias consistentes en cromatografiar aguardientes procedentes de orujos con diferente tiempo de fermentación, habiendo encontrado que el contenido en metanol, referido al alcohol, se incrementaba al aumentar el tiempo de almacenaje.

A la vista de esta conclusión pudiera pensarse que la solución al problema del alcohol metílico en los aguardientes de orujo consistiría en proceder a su



Figs. 28 y 29.

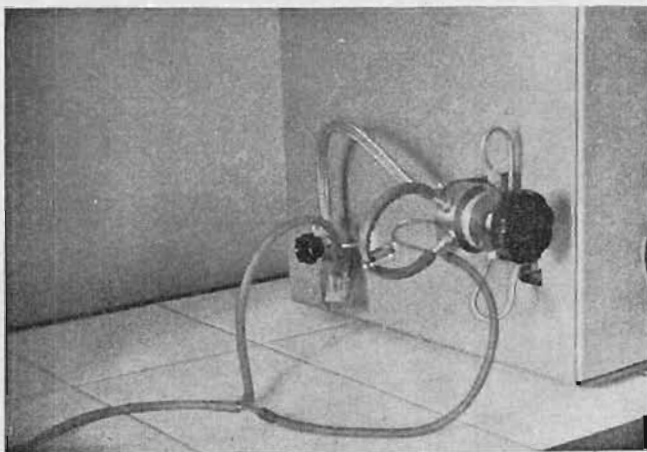
elaboración tras el mínimo tiempo posible de almacenaje; sin embargo, como hemos podido comprobar después de cromatografiar destilados procedentes de un mismo orujo obtenido en el laboratorio y sometido al proceso de fermentación durante diferente número de días, si bien el contenido en metanol es menor en los primeros días, el rendimiento en etanol resulta notablemente perjudicado.

La determinación del etanol por cromatografía de gases en estas bebidas resulta altamente interesante, ya que, aparte de simultanearse con la del metanol, permite dosificaciones mucho más exactas que las obtenidas por los métodos clásicos.

Para tal determinación se prepara una escala con porcentajes crecientes de etanol en agua en volumen (a 15° C.) de concentraciones alcohólicas próximas a la del problema y se elabora la curva de calibración (fig. 30) en forma análoga a como se indicó para el metanol.

En este caso, dada la elevada concentración de etanol existente, los picos resultan tan altos que es preciso modificar la sensibilidad del registro mediante el atenuador al objeto de que su máximo quede dentro de la escala.

Para la determinación cuantitativa se ha utilizado la altura del pico desde su máximo a la línea base, pues aunque a primera vista pudiera parecer inadecuado el procedimiento, por tratarse de picos bastante anchos, como hemos



Fotografía 4

podido comprobar experimentalmente, el método es correcto, ya que si el pico se hubiese registrado con la atenuación señalada en su parte superior, habría resultado estrecho y de igual altura (véase figuras 31 y 32, correspondiente a la muestra número 19, cromatografiada en idénticas condiciones, variando sólo la forma de registro). Para este caso concreto de la figura 21 sería necesario emplear una curva de calibración construida para la sensibilidad 1/256.

Los restantes componentes podrían determinarse cuantitativamente por cromatografía de gases, aplicando, según los casos, o el método de la relación alturas/concentración, o un método de medida de área, pero teniendo en cuenta que tales determinaciones no tienen interés sino en contados casos, no consideramos necesario hacerlas en este estudio.

BEBIDAS CROMATOGRAFIADAS Y RESULTADOS

Concluidas las anteriores etapas, procedimos a cromatografiar diferentes tipos de bebidas con el propósito de establecer una tipificación por el aspecto

de su cromatograma gaseoso y aplicarlo a la comprobación de su genuinidad.

Las muestras estudiadas, unas genuinas y otras fraudulentas, figuran en el cuadro número 11. Las particularidades encontradas en cada una de ellas son expuestas a continuación:

1) *Aguardientes de orujo.*

Su gascromatograma típico es el representado en la figura 15, si bien como ha sido obtenido con una columna de dos metros de carbowax 1.540, el isobu-

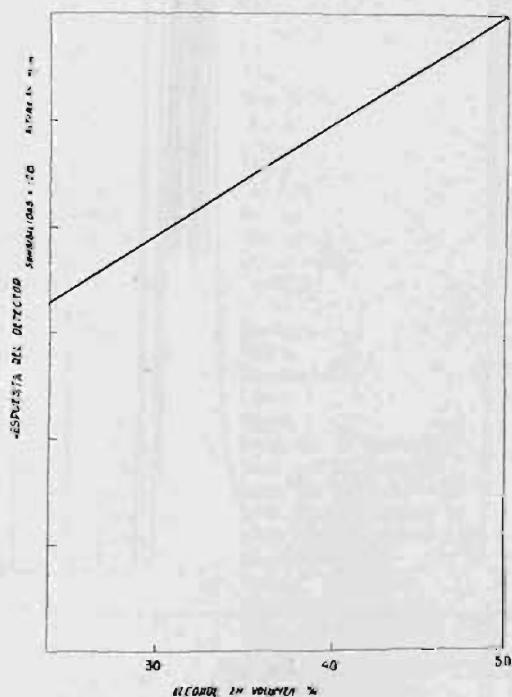


Fig. 30.

tanol no aparece por quedar oculto por el agua y los alcoholes amílicos no son bien observados. Las alturas de los distintos picos se modifican de unos aguardientes a otros, a veces sensiblemente, pero por lo general los diferentes componentes se encuentran en proporción destacada.

Otros ejemplos podemos verlos en los cromatogramas parciales (no está representada el agua y alcoholes amílicos), figuras 20, 25, 31, 32, obtenidos por inyección directa de las bebidas con columna de cuatro metros; en estas condiciones aparece el isobutanol.

La característica más interesante es que en todos los aguardientes de orujo que hemos analizado en una u otra de las condiciones señaladas, se ha encontrado el butanol-2 por inyección directa de la bebida, hecho importante, ya que por este procedimiento y empleando detectores térmicos no ha sido puesto de manifiesto anteriormente.

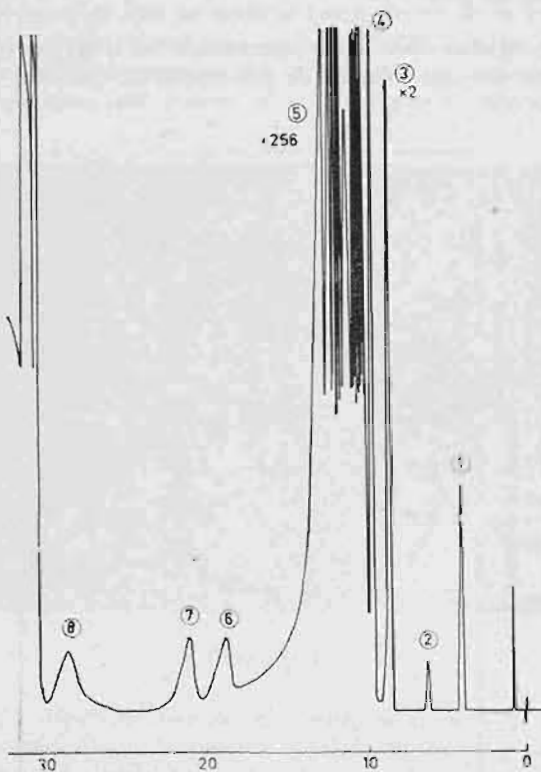


Fig. 31.

También es de indicar la destacada altura de los picos del metanol, acetato de etilo-acetal y acetaldehído, que a veces han obligado a ser registrados con menor sensibilidad (muestra número 19, figuras 31 y 32).

Por otro lado, como en las restantes bebidas, se han hecho cromatogramas previa deshidratación parcial por saturación de la bebida con carbonato potásico anhidro, lo cual ha permitido observar la elevada proporción de los alcoholes amílicos, que en la cromatografía directa quedaban ocultos total o parcialmente por el agua (la figura 19, correspondiente a la muestra número 10, es un ejemplo de estos resultados); así mismo se ha podido concluir que el *n*-butanol no está presente en estas bebidas.

Como quedó dicho anteriormente, la cantidad de alguno de estos compo-

CUADRO NUMERO 11

Muestras	Naturaleza	Procedencia	Observaciones
1	Aguardiente de orujo	Ulla	Fig. 34
2	id.	Rúa de Petín	
3	id.	Caldas de Reyes	Fig. 15 (con 2 m.)
4	id.	Chantada	
5	id.	Ulla	
6	id.	Ulla	Fig. 27
7	id.	Sete (Ulla)	
8	id.	Orense	
9	id.	Noya	
10	id.	Noya	Figs. 19 y 20
11	id. (7 días)	Sobredo	
12	id. (1 mes)	Sobredo	
13	Aguardiente de hierbas	Desconocida	Fig. 16
14	id.	Desconocida	Fig. 26
15	Aguardiente de orujo, 1960	Santiago	
16	id., 1963	Santiago	
17	Aguardiente de orujo	Ribero	
18	id.	Pontevedra	
19	id.	Ulla	Figs. 31 y 32
20	Acqua vitae	Danés	
21 (*)	Brandy 5 años	Jerez de la Frontera	Fig. 34
22 (*)	Brandy 7 años	Jerez de la Frontera	
23 (*)	Brandy 10 años	Jerez de la Frontera	
24 (*)	Brandy 15 años	Jerez de la Frontera	
25 (*)	Brandy 20 años	Jerez de la Frontera	
26	Coñac artificial	Desconocida	
27	Coñac	Francia	Fig. 33
28 (y)	Brandy	Jerez de la Frontera	
29 (y)	id.	Jerez de la Frontera	
30	Whisky	Escocia	Figs. 35 y 36
31 (z)	Whisky sospechoso	Desconocida	
32	Whisky	España	Fig. 37
33	Ginebra	Amsterdan	
34	Ginebra artificial	España	
35	id.	España	
36	Ron	Cuba	Fig. 38
37	id.	Canarias	Fig. 39
38	Wodka	Polonia	Fig. 40
39	Licor café	Galicia	
40	id.	Castilla	
41	Anís	Castilla	
42	Licor de guindas	Galicia	
43	Crema cacao	Galicia	

(*) Muestras cedidas por la Casa Pedro Domecq, S. A.

(y) Muestras cedidas por la Casa Palomino & Vergara, S. A.

(z) Muestras cedidas por don Antonio López González.

mentos, concretamente de metanol, depende en gran parte del tiempo de duración de la fermentación del orujo. La muestra número 11 procede del mismo orujo que la número 12; sin embargo, esta última nos ha dado 3,5 metanol (ml./litro), mientras la número 11 sólo dio 2,3 ml./litro de metanol.

Puede señalarse que algunos componentes, principalmente el acetato de etilo, presentan grandes variaciones durante el proceso de envejecimiento, como ha sido probado al cromatografiar las muestras 15 y 16, que corresponden al mismo aguardiente con tres años de diferencia en solera. Actualmente hemos

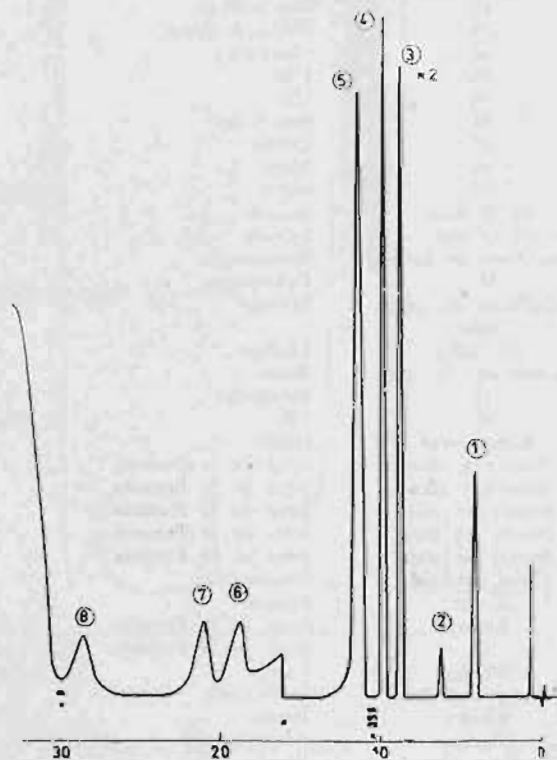


Fig. 32.

iniciado estudios por cromatografía de gases del envejecimiento, tanto natural como artificial (métodos físicos y químicos).

El «acqua vitae» analizado, muestra número 20, dio como resultado un cromatograma muy similar al de los aguardientes de vino, con la característica de no tener butanol-2 y una cifra de metanol relativamente baja (1,2 ml./litro).

En este grupo de aguardientes de orujo también incluimos los denominados en Galicia «aguardientes de hiervas», para los que cabe indicar iguales características, pues las sustancias aromáticas que los integran no son puestas de

manifiesto en estas condiciones. Como caso curioso presentamos el cromatograma obtenido con la muestra número 14, que corresponde a una de esas bebidas, a todas luces fraudulenta (fig. 26). Otros ejemplo de este tipo de bebidas, sin duda falsificada también, es la muestra número 13 (fig. 16), donde hay que destacar la elevada proporción de propanol-2, que ha tenido que ser registrado con sensibilidad $1/2$. Este grupo de bebidas, junto con los licores, han sido las

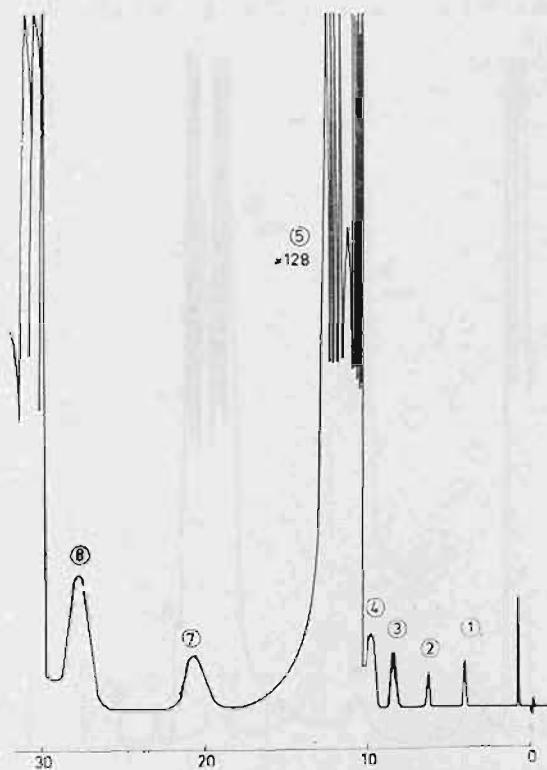


Fig. 33.

más falsificadas, debido a que las esencias o el azúcar que las componen, respectivamente, disimulan el olor típico del metanol.

2) *Brandys.*

Sus cromatogramas son muy similares al representado en la figura 33, que corresponde a un auténtico coñac francés (muestra número 27), en los que aparecen los componentes señalados para los aguardientes, exceptuando el sec-butanol; los componentes minoritarios más volátiles aparecen en proporción mucho más reducida que en el anterior grupo de bebidas.

Para los brandys españoles, si bien hemos encontrado los mismos componentes, sus proporciones relativas varían sensiblemente para cada marca, siendo frecuente que el pico del metanol sea algo más acentuado (fig. 34. muestra número 21) que el de aquella bebida.

Como con las restantes bebidas, se ha procedido a cromatografiar la capa alcohólica obtenida al saturar con carbonato potásico anhidro, encontrándose

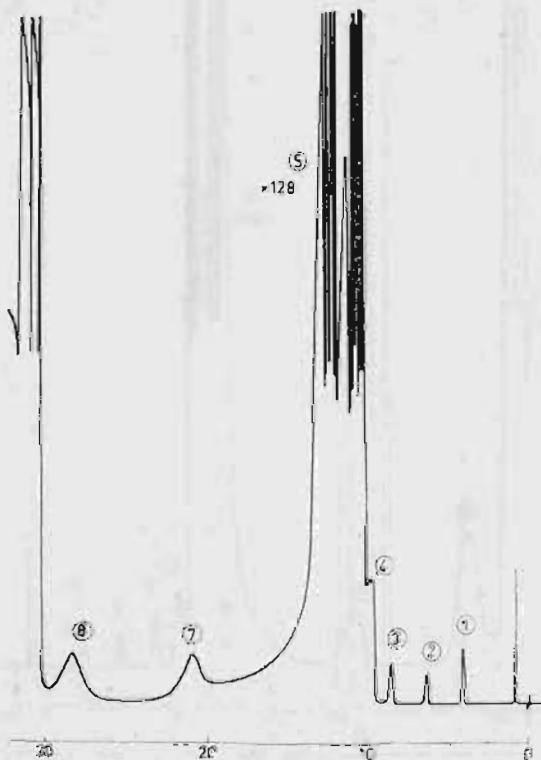


Fig. 34

los alcoholes amílicos, aunque en menor proporción que en los aguardientes de orujo, pero nunca hemos hallado al n-butanol.

La muestra número 26 corresponde a un coñac artificial elaborado con «esencia de coñac», y su cromatograma no permite, al menos en este caso concreto, diferenciarlo de uno genuino.

La comparación de los cromatogramas obtenidos con las muestras 21, 22, 23, 24 y 25 no han posibilitado, de momento, establecer sus diferencias.

3) *Whiskys.*

Los cromatogramas de estos aguardientes de granos adoptan representaciones similares a la figura 35, que corresponde a un whisky escocés legítimo (muestra número 30). En la figura 36 aparece representado el cromatograma obtenido con la misma bebida, con previa deshidratación con carbonato potásico anhidro. Como particularidad cabe señalar la ausencia casi total de metanol.

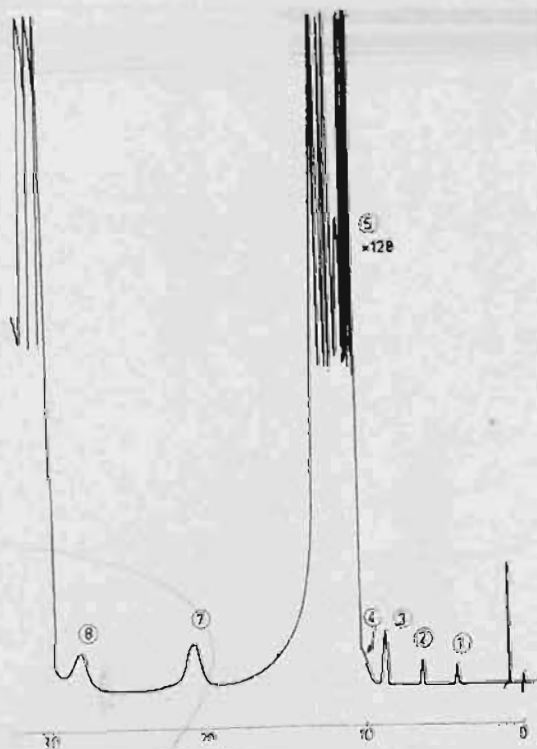


Fig. 35

por lo cual la determinación de este componente puede utilizarse para poner de manifiesto su falsificación, lo que hemos confirmado en el caso de la muestra número 31, que, analizada por los métodos químicos, había sido calificada como sospechosa (*). Los restantes componentes se hallan pobremente representados, y únicamente los alcoholes superiores, si se exceptúan los amílicos, aparecen en proporción similar a otras bebidas.

(*) Agradecemos al Dr. don Antonio López González, del Laboratorio Central de Análisis, el habernos proporcionado algunas muestras de bebidas genuinas y fraudulentas.

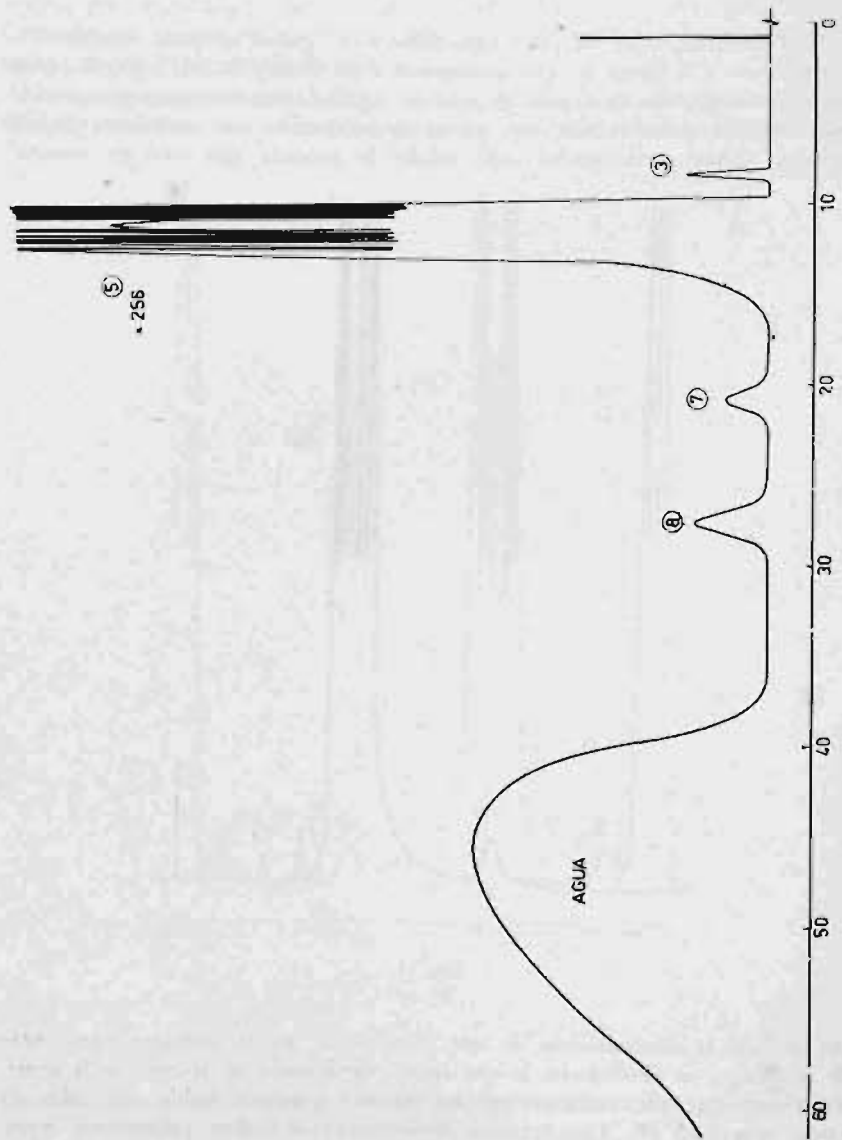


Fig. 36.

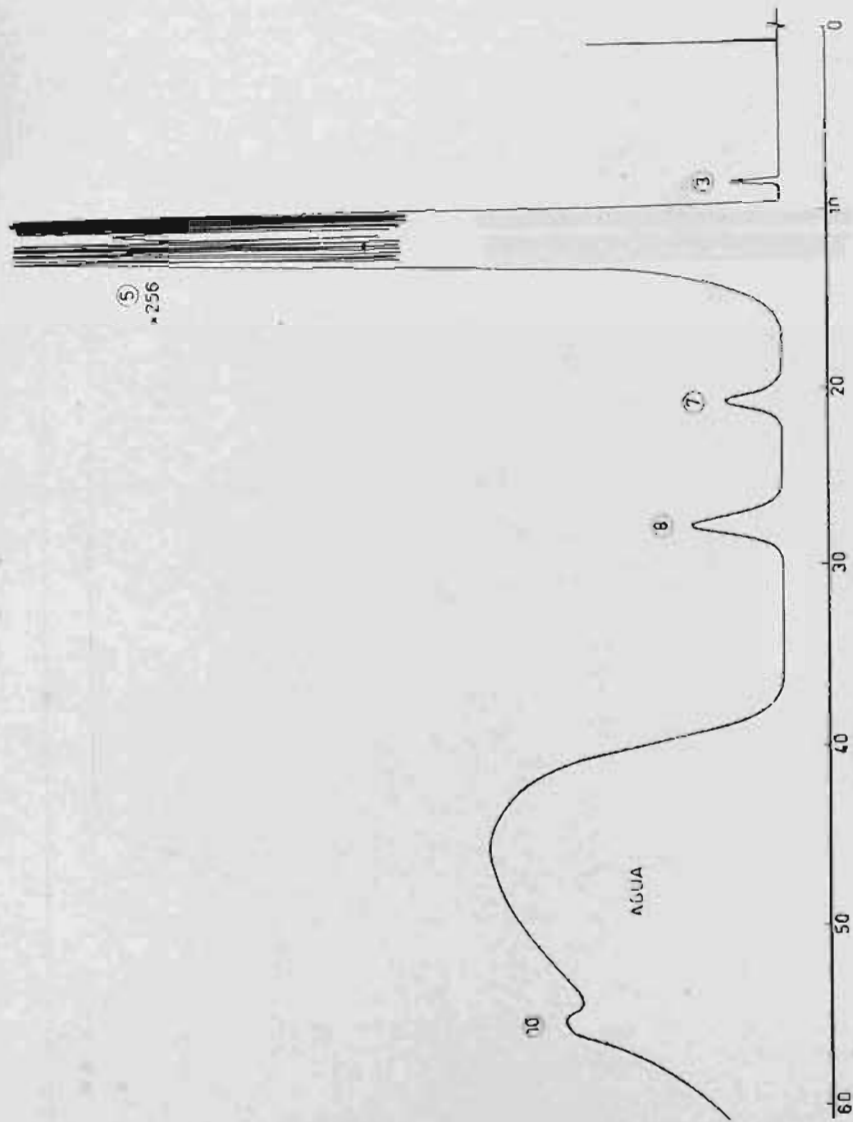


Fig. 37.

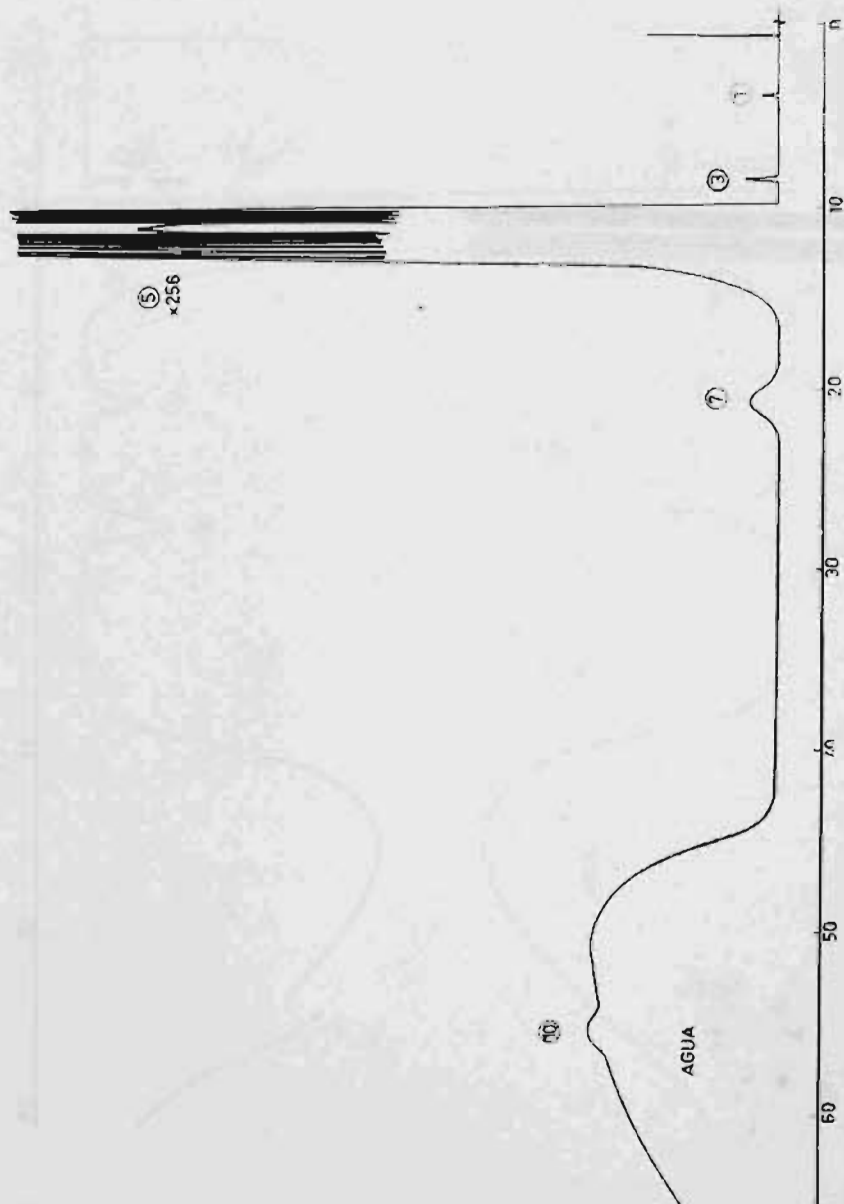


Fig. 15

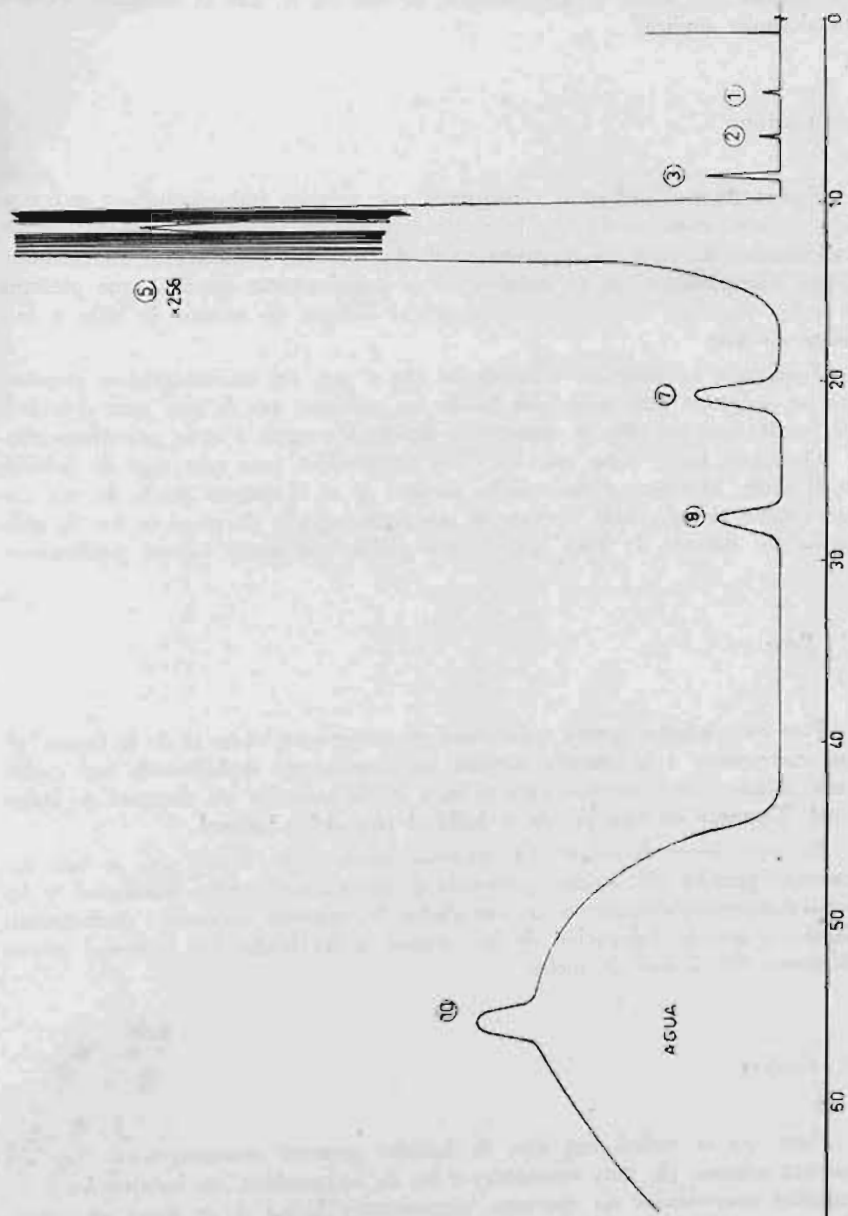


Fig. 39

En la figura 37, correspondiente a un whisky elaborado en España (muestra número 32), ofrece la particularidad de que en él, por el contrario, existen los alcoholes amílicos.

4) *Ginebras.*

Podría decirse que están constituidas por mezclas hidroalcohólicas prácticamente puras, aromatizadas por la esencia extraída de las bayas de enebro, cuyos componentes no aparecen al cromatografiarlas en estas condiciones. Su cromatograma, característico por su simplicidad, es prácticamente igual al que presenta el vodka (fig. 40), si bien pueden presentar indicios de acetato de etilo y formiato de etilo.

Analizadas las muestras fraudulentas (34 y 35), sus cromatogramas respectivos no presentan diferencias con los de las genuinas, por lo que para descubrir los fraudes que con ellas se cometen es necesario recurrir a otros procedimientos.

Queremos hacer notar que los datos encontrados para este tipo de bebidas de alcoholes superiores (véase cuadro número 4) es, a nuestro modo de ver, excesivamente elevado, toda vez que ni por cromatografía de gases ni tras la aplicación del método de Röse (40), hemos podido encontrar valores significativos.

5) *Rones.*

Para estas bebidas hemos encontrado cromatogramas como el de la figura 38, que corresponde a la muestra número 36, previamente deshidratada con carbonato potásico. Su principal característica es la ausencia de metanol e isobutanol. Tampoco en esta bebida se halló el pico del n-butanol.

En otros rones de fabricación nacional (muestra 37, figura 37), se han encontrado grandes diferencias: presencia de formiato de etilo, isobutanol y los otros componentes aparecen en cantidades ligeramente mayores; posiblemente debidas a que la elaboración de los mismos se ha hecho con materias primas diferentes del alcohol de melazas.

6) *Vodkas.*

Como ya se indicó, este tipo de bebidas presenta cromatogramas (fig. 40, muestra número 38) muy semejantes a los de las ginebras, en los que los componentes minoritarios no aparecen, circunstancia lógica si se tiene en cuenta el proceso de elaboración, en el cual incluso interviene una purificación a base de hacerlos pasar a través de carbón activo.

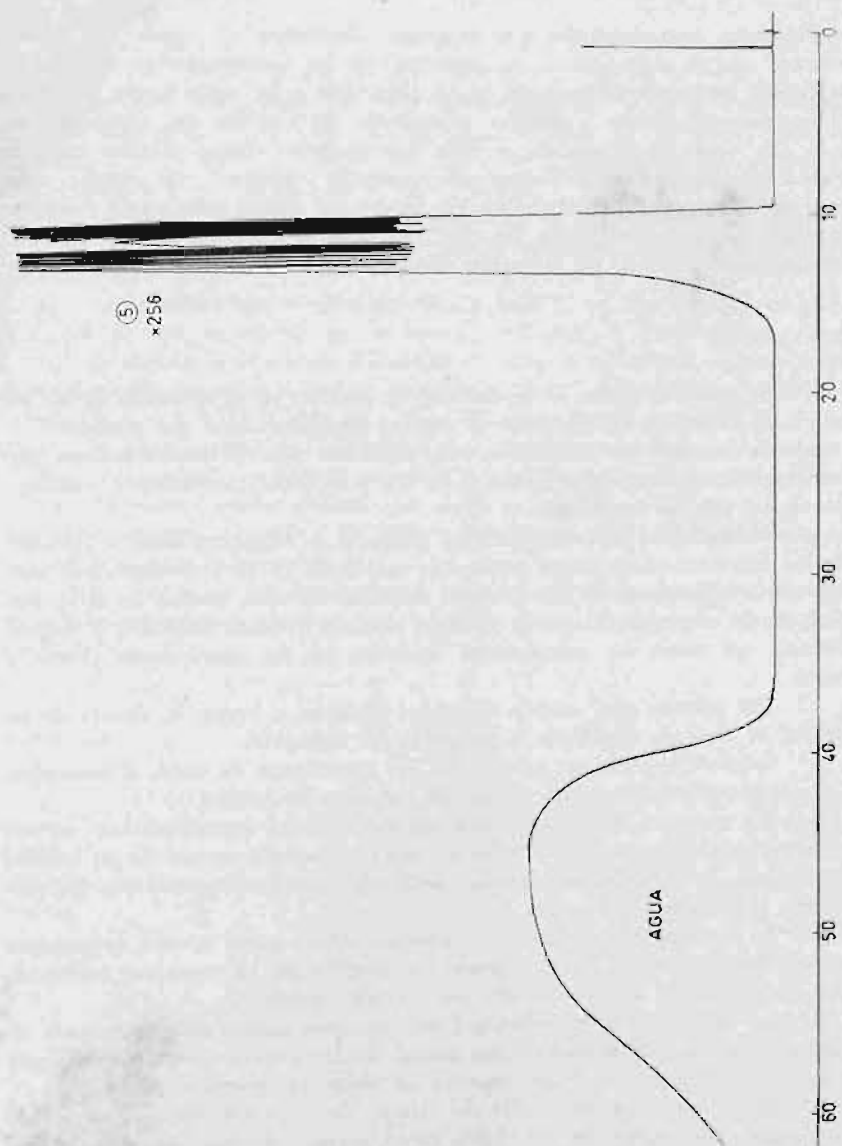


Fig. 4^o.

7) *Licores y cremas.*

Presentan cromatogramas que muestran claramente el origen del alcohol utilizado en su elaboración; así, mientras en los cromatogramas de bebidas de Galicia (muestras números 39 y 42) recuerdan a los aguardientes de orujo, en los correspondientes a bebidas procedentes de Castilla, etc. (muestras 40, 41 y 43), como la preparación se hace con alcoholes vínicos diluidos hasta la graduación deseada, los cromatogramas muestran claramente un aspecto similar al de una mezcla hidroalcohólica, por lo que en ambos casos puede conocerse el origen del alcohol utilizado. En este caso, ante la imposibilidad de encontrar bebidas representativas, no se expone ninguno de los cromatogramas obtenidos.

CONCLUSIONES

1.^a Se señala el efecto de la cantidad de muestra en el desarrollo de los picos en los cromatogramas cuando se emplea nitrógeno como gas portador.

2.^a Se estudian las condiciones más adecuadas para el fraccionamiento gas-cromatográfico (con detector térmico) de los principales componentes volatilizables de las bebidas espirituosas.

3.^a Valiéndonos de procedimientos químicos y cromatográficos se identifican los diferentes componentes puestos de manifiesto en los cromatogramas, confirmando la presencia de acetaldehído, formiato de etilo, acetato de etilo, metanol, etanol, n-propanol, agua y alcoholes amflicos (2-metil butanol-1 y 3-metil butanol), así como los componentes incluidos en las conclusiones cuarta y quinta.

4.^a Por primera vez, usando detectores térmicos e inyección directa de las bebidas, se pone de manifiesto la presencia del isobutanol.

5.^a Se identifica, por vez primera, en los aguardientes de orujo, el butanol₁₂, y se señala como componente normal de este tipo de bebidas.

6.^a En muestras condiciones experimentales no se ha encontrado acetona (sustancia señalada por diversos autores como componente normal de las bebidas espirituosas) en las diferentes bebidas analizadas, si bien en ocasiones ha sido positiva la reacción de Deniges.

7.^a El formaldehído, señalado por algunos autores como normal componente de estas bebidas, no se ha encontrado en ninguna de las muestras analizadas. Esta conclusión ha sido confirmada por métodos químicos.

8.^a La investigación del n-butanol por inyección directa del concentrado alcohólico obtenido por deshidratación parcial de las bebidas mediante carbonato potásico anhidro, dio resultado negativo en todas las muestras analizadas.

9.^a Se establece que el cambio del tiempo de retención del agua observado por Smith (107) operando con celita como soporte de fase líquida, también se presenta al emplear sterchamol, y se señala la influencia del porcentaje del agua en este fenómeno.

10. Se demuestra la existencia del isopropanol en un aguardiente compuesto y se señalan las condiciones para su mejor caracterización.

A diferencia de otros autores, no hemos encontrado dicho alcohol en las bebidas genuinas

11. Se establece un método sencillo para la dosificación de metanol en todo tipo de bebidas, incluso en aquellas ricas en sustancias no volatilizables.

12. Se hace una modificación del sistema «backflushing» del fractómetro Perkin-Elmer, mod. 116-E, que supone gran sencillez de manejo y presenta las ventajas de no alterar la presión en el circuito cromatográfico y salvaguardar el «tabique de goma» de la cámara de inyección.

13. Se evidencia que el metanol presente en los aguardientes de orujo no se forma como consecuencia de una destilación seca de los productos «leñosos» que integran el orujo.

14. Se demuestra que el contenido en metanol, en los aguardientes de orujo, se incrementa con el tiempo que se mantiene el orujo en fermentación.

15. Se estudia la separación del metanol y otros componentes de bajo punto de ebullición en los aguardientes de orujo por técnicas usuales de destilación fraccionada, y se señala la posible formación de un azeótropo (metanol-agua) que impide, en tales condiciones, la obtención de aguardientes exentos de metanol.

16. Se establece un método sencillo para la determinación del etanol mediante esta técnica cromatográfica, que evita los errores de los procedimientos usuales, presentando la ventaja de poderlo simultanear con la determinación del metanol o de otro componente.

17. Se establecen las características gas-cromatográficas de diferentes tipos de bebidas espirituosas genuinas, y se señalan las particularidades de algunas falsificaciones.

AGRADECIMIENTO

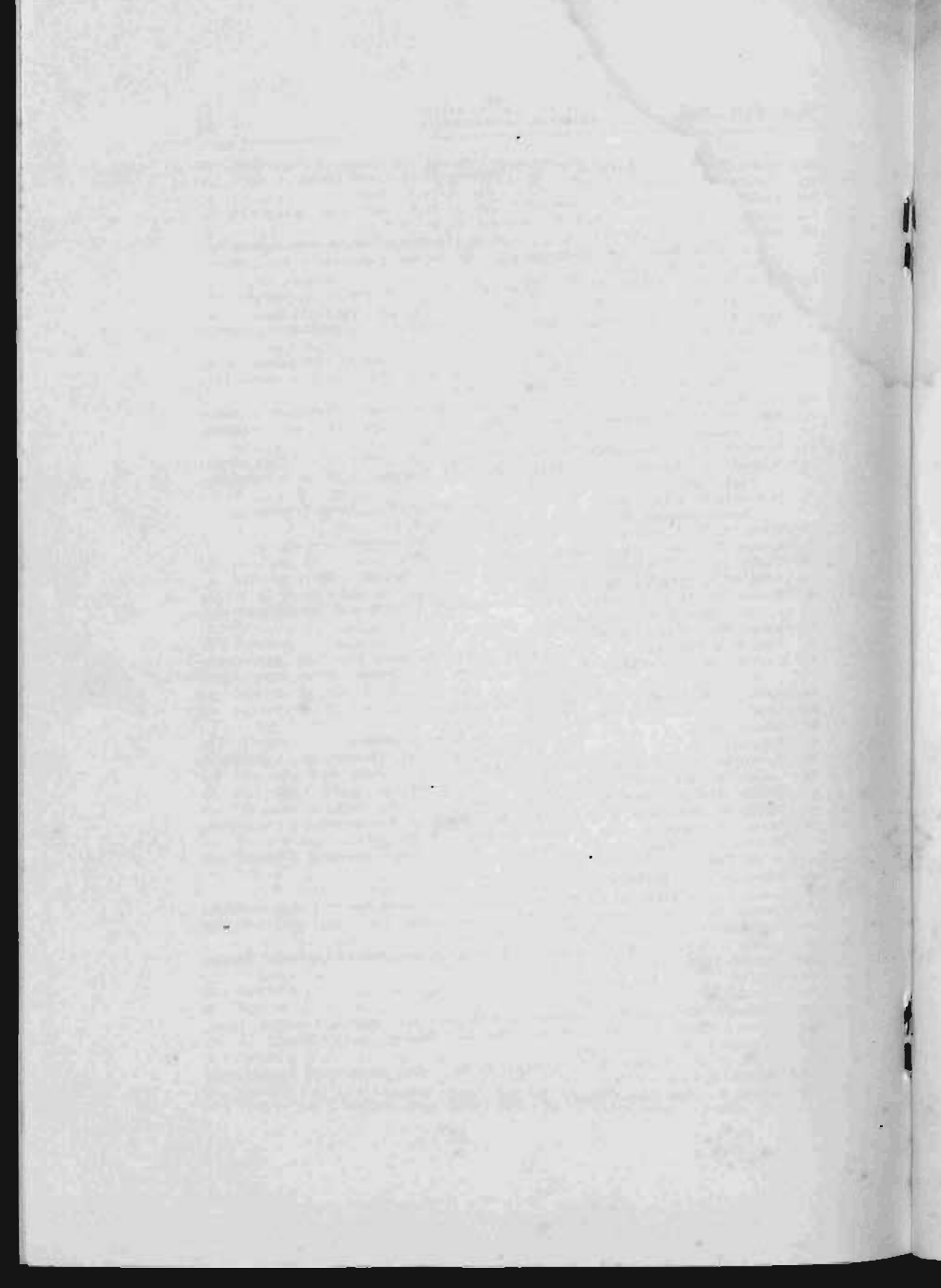
El autor desea expresar su gratitud al profesor doctor Aniceto Charro Arias, jefe de los Laboratorios donde se realizó el trabajo, por la ayuda y facilidades dispensadas durante el desarrollo del mismo. Al mismo tiempo agradece a la Comisaría de Protección Escolar la ayuda económica prestada durante su realización.

BIBLIOGRAFÍA

1. CASARES, R. y OLMEDO, R. G.: *Anales de Bromatología*, I, 31 (1949).
2. CASARES, R. y CASARES, E.: *Anales de Bromatología*, IV, 397 (1952).
3. RODR, J. M.: *Anales de Bromatología*, VIII, 409 (1956).
4. LÓPEZ GONZÁLEZ, A.: «Tesis Doctoral en Farmacia», 1963.
5. «Estatuto del Vino», *Gaceta* de 13 de septiembre de 1932.
6. MORRIS B. JACOBS: *Synthetic Food Additives*, New York, 1947, 7.
7. CASARES LÓPEZ, R.: *Tratado de Bromatología*, Madrid, 640 (1959).
8. VILLAVECCHIA, V.: *Tratado de Química Analítica Aplicada*, Barcelona, II, 294 (1949).
9. VILLAVECCHIA, V.: *Loc. cit.*, 287.
10. CASARES COL, J. y CASARES LÓPEZ, R.: *Análisis Químico Aplicado*, Madrid III, 284 (1958).
11. VILLAVECCHIA, V.: *Loc. cit.*, 306.

12. MINISTERIO de Agricultura: *Métodos oficiales para análisis de vino*. Madrid, 12 (1956).
13. ETIENNE, A. D. y BREYER, G. F.: *Wines & Vines*, 32: 63 (1951).
14. BERTRAND, G. y SILBERSTEIN, L.: *Compt. rend.*, 229: 1281 (1949) y 234: 491 (1952).
15. FELLEBERG, TH.: *Mitt. Lebensm. Unters. Hyg.*, 4: 146 (1931).
16. TRILLAT, A.: *Compt. rend.*, 128: 438 (1899).
17. MORRIS B. JACOBS: *Food and Food Products*. London, III, 2446 (1951).
18. RENOUIL, Y. y TRAVERSAY, P.: *Dictionaire du vin*. Bordeaux, 92 (1962).
19. LEYTE MARRERO, J.: «Estudio sobre el contenido en metanol de los aguardientes gallegos». La Coruña (1963).
20. MORRIS B. JACOBS: *Loc. cit.* 2447 (1951).
21. FABRE, R.; REGNIER, M. T., y CHÉRAMY, P.: *Leçons de Toxicologie*. Paris, IV, 52 (1943).
22. DÉROBERT, L.: «Intoxications et maladies professionnelles». Paris, 843 (1954).
23. DOUBRIS, R.: *Toxicologie Moderne*. Paris, 272 (1951).
24. VILLAVECCHIA, V.: *Loc. cit.*, 336-339.
25. FELLEBERG, TH.: *Biochem. Zeitschr.*, 85: 62 (1918).
26. JEGLIŃSKI, H.: *Pharm. Ztg.*, 78: 77 (1933).
27. CASARES GIL, J. y CASARES LÓPEZ, R.: *Loc. cit.*, 291.
28. VILLAVECCHIA, V.: *Loc. cit.*, 349.
29. BOOS, R. N.: *Anal. Chem.*, 20: 964 (1948).
30. EEBRIVE, E.: *Z. Anal. Chem.*, 110: 22 (1937).
31. KEINERT, I. y SREPEL, E.: *Mikrochem.*, 33: 328 (1948).
32. A. O. A. C. (Association of Official Agricultural Chemists). *Methods of Analysis*. Washington, 109 (1960).
33. RANKOFF, G.; POPOFF, A., y JOVITSCHIFF, A.: *Z. Anal. Chem.*, 163: 218 (1958).
34. WINTON, A. L. y WINTON, K. B.: *Análisis de alimentos*. Barcelona, 853 (1958).
35. A. O. A. C.: *Loc. cit.*, 140.
36. VILLAVECCHIA, V.: *Loc. cit.*, 347.
37. GENEVOIS, L.: «Mises au point de chimie analytique». Paris, X, 50 (1962).
38. EHRICH, P.: *Biochem. Z.*, 18: 391 (1909).
39. CASTOR, J. C. y GUYMON, J. F.: *Science*, 115: 147 (1952).
40. CLAVERA, J. M.: *Bromatología*. Granada, 627 (1953).
41. MORINO MARTÍN, F.: Congr. Inter. química pura y aplicada, 9: (VI), 272 (1934).
42. CLAVERA, J. M. y MORINO MARTÍN, F.: *Anal. Soc. Española Física y Química*, 34: 507 (1936).
43. WINTON, A. L. y WINTON, K. B.: *Loc. cit.*, 844.
44. PEARSON, D.: *The chemical analysis of foods*. London, 273 (1962).
45. HOFF, R. W. y MACOUN, J. M.: *Analyt.*, 58: 749 (1933).
46. DURODIL, J. y ROLLENS, E.: *Bull. Soc. Chim. France*, 19: 822 (1942).
47. MAYNARD, A. AMERINE: *Advances in food research*. New York, V, 382 (1954).
48. CHARLES, E.: *Ann. fals. fraudes*, 23: 153 (1930).
49. VILLAVECCHIA, V.: *Loc. cit.*, 319.
50. BÖMER, A. y WINDHAUSEN, O.: *Handbuch Lebensm. chem.*. Berlin, II/2, 1033 (1935).
51. SÁNCHEZ, J. A.: *Química analítica funcional de medicamentos orgánicos*. Buenos Aires, 348 (1941).
52. RIPPER, M.: *Monatsh. chem.*, 11: 1073 (1900).
53. DIRECCIÓN General de Sanidad: «Métodos oficiales para análisis de alimentos». Madrid, 92 (1940).
54. MATHERS, A. P. y SCHONEMAN, R. L.: *J. Assoc. Offic. Agr. Chemists*, 35: 830 (1952).
55. SÁNCHEZ, J. A.: *Loc. cit.*, 348, 364 y 536.
56. KOLMER, J. A.; SAUDELING, E. H., y ROBINSON, H. W.: *Métodos de laboratorio*. Méjico, 140 (1955).
57. A. O. A. C.: *Loc. cit.*, 109.
58. SÁNCHEZ, J. A.: *Loc. cit.*, 362 y 536.
59. DUMAIR, W. y ESCHENAS, E.: *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 112: 457 (1960).
60. CASARES GIL, J. y CASARES LÓPEZ, R.: *Loc. cit.*, 285.
61. TSWEFF, M. S. Según Lederer, E. y Lederer, M.: *Cosmografías*. Argentina, 5 (1960).

62. MARTIN, A. J. P. y SYNGE, R. L. M.: *Biochem. J.*, 35: 1:358 (1941).
63. CREMER, E. y PRIOR, F.: *Chem. Abstr.*, 45: 9:334 h. (1951).
64. CREMER, E. y MÜLLER, R.: *Chem. Abstr.*, 45: 5:057 h. (1951) y 45: 9: 335 a (1951).
65. JAMES, A. T. y MARTIN, A. J. P.: *Biochem. J.*, 50: 679 (1952).
66. DOMANGE, L. y LONGUEVALLE, S.: «Dosage de l'eucalyptol dans les essences d'eucalyptus et de niaouli par chromatographie de partage gas-liquide». *Ann. Pharm. franç.*, 16, 557 (1958).
67. CRAIG, B. M. y MURTY, N. L.: «Quantitative fatty acid analysis of vegetable oils by gas-liquid Chromatography». *J. Am. Chem. Soc.*, 36: 549 (1959).
68. KIRCHER, H. W.: «Gas-liquid partition Chromatography of methylated sugars». *Anal. Chem.*, 32: 1:103 (1960).
69. CHARRO ARIAS, A. y SIMAL LOZANO, J.: «La cromatografía en fase gaseosa en el control de medicamentos balsámicos». II Convención Bienal de la Industria Farmacéutica Española. Madrid (1963) (en prensa).
70. DAL NOGARE, S. y JUVET, R. S., Jr.: *Gas-liquid Chromatography*. New York, 2 (1962).
71. JONES, A. G.: *Analytical Chemistry. Some New Techniques*. London, 101 (1960).
72. DAL NOGARE, S. y JUVET, R. S., Jr.: *Loc. cit.*, 142.
73. HORNING, E. C.; MOSCATELLI, E. A., y SWEELEY, C. C.: *Chem. & Ind.*, 751 (1959).
74. BOHEMEN, J.; LANGER, S. H.; PERRET, R. H., y PURNELL, J. H.: *J. Chem. Soc.*, 2:444 (1960).
75. JENTZSCH, D. y HÖVEIMANN, W.: «The application of Macro-Golay Columns in Gas Chromatography». Research lab. of Perkin-Elmer & Co.
76. JAMES, A. T. y MARTIN, A. J. P.: *Analyst*, 77: 915 (1952).
77. KAISER, R.: *Gas Chromatographie*. Leipzig, 153 (1960).
78. DESTY, D. H. y WYMAN, B. H. F.: *Anal. Chem.*, 29: 320 (1957).
79. ROSE, B. A.: *Analyst*, 84: 574 (1959).
80. PIRROFIELD, H. P. y STORRS, E. E.: «Biochemical applications of Gas Chromatography». New York, 125 (1962).
81. JONES, A. G.: *Loc. cit.*, 102.
82. GYGI, R. y POTTERAT, M.: *Mitt. Gebiet. Lebensmittelunters Hyg.*, 48: 497 (1957).
83. CARROLL, R. B. y O'BRIEN, L. C.: *Am. Chem. Soc. Meeting*. Boston, Mass. April, 8 (1959).
84. CASTILLE, A.: *Anales de Bromatología*, 12: 335 (1960).
85. SALÓ, T.: *Z. Lebensm. Unters Forsch.*, 54 (1961).
86. CHARRO ARIAS, A.: *Anales Real Academia de Farmacia*. Madrid, 114 (1963).
87. BOUTHLET, R. J. y LOWREY, W.: *J. Assoc. Offic. Agr. Chemists*, 42: 634 (1959).
88. BAVISOTTO, V. S. y ROCH, L. A.: *Proc. Am. Soc. Brew. Chem.*, 63 (1959).
89. CACACE, F.; IIRAM, M., y STEIN, M. L.: *Ann. Chim.*, 49: 1:383 (1959).
90. MECKE, R. y DE VRIES, M.: *Z. Anal. Chem.*, 170: 326 (1959).
91. MECKE, R.; SCHINDLER, R., y DE VRIES, M.: *Die Wein Wissenschaft*, 15: 10 (1960).
92. BARAUD, J.: *Moes au point de chimie analytique*, X, 80 (1962).
93. HUNTER, J. R.; COLL, E. W., y PENCE, J. W.: *J. Assoc. Offic. Agr. Chemists*, 43: 769 (1960).
94. DRAWERT, F., y KUPFER, G.: *Angew. Chem.*, 72: 33 (1960).
95. KABOT, F. J., y ETRIE, I. S.: *The Perkin-Elmer Instrument News*, 13: (4), 1 (1962).
96. CHARRO ARIAS, A. y SIMAL LOZANO, J.: *Medicamenta*, 219: 199 (1962).
97. DAL NOGARE, S., y JUVET, R. S., Jr.: *Loc. cit.*, 87.
98. HOPKIN & WILLIAMS, LTD.: *Organic reagents for organic analysis*. London, 53 (1944).
99. SÁNCHEZ, J. A.: *Loc. cit.*, 357, 523 y 530.
100. SÁNCHEZ, J. A.: *Loc. cit.*, 547.
101. SÁNCHEZ, J. A.: *Loc. cit.*, 364.
102. HOPKIN & WILLIAMS, LTD.: *Organic reagents for organic analysis*, Essex, 70 (1950).
103. RIBERAUD GAYON, J., y PEYNAUD, E.: *Ann. Inst. Pasteur*, 73: 777 (1947).
104. SÁNCHEZ, J. A.: *Loc. cit.*, 303.
105. WEBB, A. D.; KUPNER, R. E., e IKEDA, R. M.: *Anal. Chem.*, 24: 1:944 (1952).
106. DOURIS, R.: *Loc. cit.*, 271.
107. SMITH, B.: *Acta Chem. Scand.*, 13: 480 (1959).



Leída esta Memoria el día 7 de julio de 1964, ante el Tribunal formado por los señores Profesores:

PRESIDENTE

Dr. D. Aniceto Charro Arias

VOCALES

Dr. D. Román Casares López

Dr. D. José María Montañés del Olmo

Dr. D. Francisco Moreno Martín

SECRETARIO

Dr. D. Rafael Cadórniga Carro

obtuvo, por unanimidad, la calificación de SOBRESALIENTE «Cum Laude».

