## ANÁLISIS QUÍMICO DEL MEZCAL.

### TABLA 1.

### ANÁLISIS DE LAS ESPECIFICACIONES FISICOQUIMICAS DEL MEZCAL.

| | Mezcal blanco | | Mezcal joven u oro | | Mezcal reposado | | Mezcal añejo | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **mínimo** | **máximo** | **mínimo** | **máximo** | **mínimo** | **máximo** | **mínimo** | **máximo** |
| **Porcentaje de alcohol a 20ªC** | 38,0 | 55,0 | 38,0 | 55,0 | 38,0 | 55,0 | 38,0 | 55,0 |
| **Extracto seco (g/l)** | 0 | 0,20 | 0 | 5,0 | 0 | 5,0 | 0 | 5,0 |
| **Valores expresados en mg/100 ml referido a alcohol anhidro.** | | | | | | | | |
| **Alcoholes superiores (en alcohol amílico) (1)** | 20 | 400 | 20 | 400 | 20 | 400 | 20 | 400 |
| **Metanol (2)** | 30 | 300 | 30 | 300 | 30 | 300 | 30 | 300 |
| **Aldehidos** | 0 | 40 | 0 | 40 | 0 | 40 | 0 | 40 |
| **Esteres** | 2 | 270 | 2 | 350 | 2 | 360 | 2 | 360 |
| **Furfural (3)** | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 |

### NOTAS:

- Nota 1: Supeditado a un análisis cromatográfico, se puede elevar el parámetro máximo hasta 500 mg/100 ml.
- Nota 2: El parámetro mínimo puede disminuir si el productor de Mezcal demuestra a satisfacción del organismo de certificación acreditado, que es viable reducir el contenido de metanol mediante un proceso distinto.
- Nota 3: Supeditado al análisis, vía húmeda, se puede elevar el parámetro máximo hasta 4 mg/100 ml.

# METODOLOGÍA PARA EL ANÁLISIS FÍSICO - QUÍMICO DEL MEZCAL.

## APENDICE A.

### A.1 Determinación de azúcares invertidos en azúcares y jarabes (Método de Lane y Eynon).

*A.1.1 Campo de aplicación.*

El presente procedimiento se aplica para la determinación de reductores totales, contenidos en las materias primas utilizadas para elaborar Mezcal o Mezcal 100% y materiales en proceso, previos a la fermentación.

*A.1.2 Reactivos y materiales.*

*A.1.2.1 Reactivos.*

A menos que se especifique lo contrario, los reactivos que se mencionan a continuación deben ser de grado analítico y cuando se mencione o se indique agua, ésta debe ser destilada o desionizada.

*A.1.2.1.1 Acido clorhídrico concentrado con densidad relativa de 1,1029.*

*A.1.2.1.2 Solución de Fehling.*

a) Solución de sulfato de cobre.

Disolver 34,639 g de sulfato de cobre pentahidratado ($CuSO_4$ $5H_2O$) en un matraz aforado de 500 ml y aforar con agua.

b) Solución alcalina de tartrato.

Disolver 173 g de sales de Rochelle, o sea tartrato de sodio y potasio tetrahidratado ($KNaC_4O_6 4H_2O$) y 50 g de hidróxido de sodio ($NaOH$) en un matraz aforado de 500 ml y aforar con agua. Dejar reposar la solución durante dos días.

***NOTA: Estandarización de la solución de Fehling.***

Con pileta tomar con exactitud 10 ml o 25 ml de la mezcla del reactivo de Soxhlet (5 o 12,5 ml de cada una de las soluciones de soxhlet (a) y (b) en un matraz Erlenmeyer (la cantidad de cobre difiere ligeramente entre los dos métodos de pipeteo, por lo cual se debe usar el mismo, para la estandarización y la determinación). Preparar la solución estándar de azúcar a tal concentración que más de 15 ml y menos de 50 ml sean requeridos para reducir todo el cobre.

Colocar esta solución en una bureta de punta lateral larga que evite el contacto del vapor con el cuerpo de ésta.

Adicionar la solución de azúcar al matraz hasta 0,5 1 ml del total requerido, caliente la mezcla hasta ebullición sobre un mechero con tela de alambre y mantenga la ebullición moderada por 2 min. (se pueden utilizar perlas de ebullición o cualquier material inerte que mantenga la ebullición uniforme). Sin quitar de la llama, adicione 1 ml de solución acuosa de azul de metileno al 0,2% (o de 3 a 4 gotas de solución al 1%) y completar la titulación dentro de un tiempo total de ebullición de 3 min., con adiciones pequeñas (2 a 3 gotas) de la solución de azúcar, hasta decolorar el indicador (mantener la salida del vapor continuamente previene la reoxidación del cobre o el indicador). Luego de completar la reducción del cobre, el azul de metileno es reducido a un compuesto incoloro y la solución toma el color naranja de Cu20 que tenía antes de la adición del indicador.

Si se requieren sólo resultados aproximados (dentro del 1%), la estandarización se puede omitir, siempre y cuando las especificaciones del análisis sean observadas estrictamente.

*A.1.2.1.3 Solución de azúcar invertido en agua.*

Disolver 9.5 g de sacarosa en un matraz aforado de 1000 ml y aforar con agua. Un mililitro de esta solución equivale a 0,01 g de reductores.

*A.1.2.1.4 Solución indicadora de azul de metileno en agua al 0,2%.*

*A.1.2.1.5 Oxalato de sodio seco.*

*A.1.2.2 Materiales y aparatos.*

*A.1.2.2.1 Materiales.*

- Bureta de 50 ml graduada en 0,1 ml.
- Cápsula de níquel de capacidad adecuada.
- Fuente de calor con regulador de temperatura.
- Matraces aforados de 100 ml, 200 ml y 1000 ml.
- Matraz Erlenmeyer de 300 ml.
- Pipetas volumétricas de 5 ml y 10 ml.
- Papel filtro para azúcar.
- Papel filtro ayuda.
- Termómetro con escala de 0°C a 100°C.
- Material común de laboratorio.

*A.1.2.2.2 Aparatos.*

- Agitador eléctrico.
- Balanza analítica con sensibilidad de ± 0,1 mg.

*A.1.3 Preparación para la titulación de la solución de Fehling.*

Con pipeta medir 5 ml de solución de sulfato de cobre y ponerlos en un matraz Erlenmeyer de 300 ml. Hacer lo mismo con la solución de tartrato de sodio y potasio, colocándola en el mismo matraz. Agregar 50 ml de agua. Enjuagar una bureta graduada de 50 ml con solución de azúcar invertido y luego llenarla. Colocar el matraz Erlenmeyer con la solución de Fehling sobre la fuente de calor y cuando empiece la ebullición, hacer una titulación exploratoria rápida, previa a la titulación definitiva, agregando solución de azúcar invertido con la bureta y usando azul de metileno como indicador.

Una vez conocidos casi con exactitud los mililitros necesarios para reducir el cobre de la solución de Fehling, se procede a otra titulación, agregando inmediatamente después que la solución de Fehling comienza a hervir, y de una sola vez, con la bureta un poco inclinada, el volumen necesario menos 1 ml, aproximadamente, de solución de azúcar invertido.

Agregar unas cinco gotas de solución de azul de metileno, y sin que deje de hervir, agregar el volumen que falta (± 1 ml) hasta que el color azul desaparezca.

El tiempo total para hacer la titulación no debe exceder de 3 min.; 2 min., para agregar la casi totalidad de la solución de azúcar invertido y el indicador, y 1 min. más para concluir dicha titulación.

Hacer dos determinaciones y los volúmenes de solución de azúcar invertido gastados no debe diferir en más de 0,1 ml.

El promedio aritmético de ambas lecturas es el volumen gastado en la titulación. Suponiendo que este volumen fue de 5,0 ml, los reductores necesarios para reducir el cobre de la solución de Fehling se obtienen de la siguiente manera:

5,0 X 0,01 = 0,05 g de reductores.

*A.1.4 Procedimiento.*

a) Método de incrementos: Utilice este método si no conoce la concentración aproximada del azúcar en la muestra. A 10 ml o 25 ml de la mezcla de soxhlet, añada 15 ml de la solución de azúcar, y caliente hasta punto de ebullición sobre mechero con tela de alambre. Poner a ebullición por, aproximadamente, 15 s y rápidamente adicionar solución de azúcar hasta que sólo un ligero color azul permanezca. Entonces adicione 1 ml de azul

de metileno al 0,2% (o 3 o 4 gotas de solución al 1%) y completar la titulación adicionando la solución de azúcar gota a gota (el error en esta titulación debe ser 1%).

b) Método estándar: Para una precisión más alta, repetir la titulación adicionando casi la cantidad completa de solución de azúcar requerida para reducir el cobre, calentar hasta punto de ebullición y mantener a ebullición moderada por 2 min. (se recomienda utilizar perlas de ebullición). Sin quitar el calentamiento, adicionar 1 ml de solución acuosa de azul de metileno al 0,2 % (o 3 o 4 gotas de solución al 1%) y completar la titulación dentro de un tiempo total de ebullición de 3 min., con adiciones pequeñas (2 o 3 gotas) de solución de azúcar hasta decolorar el indicador. Después de completar la reducción del cobre se reduce el azul de metileno a un compuesto incoloro y la solución toma el color naranja del Cu20 que tenía antes de la adición del indicador.

*A.1.5 Cálculos.*

$$\frac{\text{mg azúcar}}{100\ \text{ml}} = \frac{\text{azúcar reductor total requerido}}{\text{ml titulación}}$$

**A.2 Determinación de reductores totales en azúcares y materiales azucarados (Método de Lane y Eynon).**

*A.2.1 Reactivos y materiales.*

*A.2.1.1 Reactivos.*

A menos que se especifique lo contrario, los reactivos que se mencionan a continuación deben ser de grado analítico y cuando se mencione o se indique agua, ésta debe ser destilada o desionizada.

*a) Solución de Fehling.*

*a.1) Solución de sulfato de cobre.*

Disolver 34,639 g de sulfato de cobre pentahidratado (CuSO4 5H20) en un matraz aforado de 500 ml y aforar con agua.

*a.2) Solución alcalina de tartrato.*

Disolver 173 g de dales Rochelle, o sea tartrato de sodio y potasio tetrahidratado (KNaC4O64H2O) y 50 g de hidróxido de sodio (NaOH) en un matraz aforado de 500 ml y aforar con agua. Dejar reposar la solución durante dos días.

*b) Solución de azúcar invertido en agua.*

Disolver 10 g de glucosa en un matraz aforado de 1000 ml y aforar con agua. Un mililitro de esta solución equivale a 0,01 g de reductores.

*c) Solución indicadora de azul en metileno en agua.*

Disolver 1 g de azul de metileno en un matraz aforado de 100 ml y aforar.

*d) Oxalato de sodio seco.*

*A.2.1.2 Materiales y aparatos.*

*A.2.1.2.1 Materiales.*

- Bureta de 50 ml graduada en 0,1 ml.
- Cápsula de níquel de capacidad adecuada.
- Fuente de calor con regulador de temperatura.
- Matraces aforados de 100 ml, 100 ml y 1 000 ml.
- Matraz Erlenmeyer de 300 ml.
- Pipetas volumétricas de 5 ml y 10 ml.
- Papel filtro para azúcar.
- Papel filtro ayuda.
- Termómetro con escala de 0ºC a 100ºC.
- Materiales común de laboratorio.

*A.2.1.2.2 Aparatos.*

- Agitador eléctrico
- Balanza analítica con exactitud de ± 0,1 mg

*A.2.1.3 Procedimiento.*

Colocar 26 g de muestra en un matraz aforado de 200 ml, disolver y llevar al aforo, de esta solución, tomar una alicuota de 50 ml transferirlos a un matraz aforado de 100 ml, agregar 25 ml de agua, a continuación agregar poco a poco y girando el matraz 10 ml de ácido clorhídrico con una densidad relativa de 1,1029 (24,85º Brix a 20ºC).

Calentar el baño de agua a 70ºC; colocar el matraz con un termómetro dentro, agitando constantemente hasta que el contenido llegue a 67ºC, lo cual debe lograrse de 2,5 min. a 3 min. Continuar calentando la solución exactamente 5 min. más desde el momento que el termómetro marque los 67ºC, tiempo durante el cual la temperatura del contenido del matraz debe llegar aproximadamente a 69ºC. Al final de los 5 min., colocar el matraz en agua fría. Cuando se alcance más o menos la temperatura ambiente, dejar enfriar en el baño de agua por lo menos 30 min. más. Lavar el termómetro de modo que el agua de lavado caiga dentro del matraz y aforar a 100 ml.

Con una pipeta volumétrica tomar 10 ml de esta solución, transferirlos a un matraz aforado de 100 ml, aforar con agua, tapar el matraz y homogeneizar.

Con una pileta volumétrica transferir 5 ml de solución de sulfato de cobre y 5 ml de solución de tartrato de sodio y potasio a un matraz Erlenmeyer de 300 ml y titular con la solución preparada de reductores totales, procediendo como se hizo para la titulación de la solución de Fehling.

*A.2.4 Expresión de resultados.*

*A.2.4.1 Cálculos.*

El cálculo se hace con la siguiente fórmula:

$$r = \frac{k \times 80 \times 10\,000}{V \times m}$$

Donde:

R: es el porcentaje de reductores totales en la muestra;

K: son los gramos de reductores necesarios resultantes de la titulación de la solución de Fehling;

V: son los centímetros cúbicos de solución de reductores totales gastados en la titulación;

M: son los gramos de muestra empleados;

*A.2.5 Repetibilidad.*

La diferencia entre los volúmenes de solución de reductores totales gastados en dos titulaciones, realizadas una inmediatamente después de la otra, por el mismo analista, con la misma muestra y con los mismos aparatos, no debe diferir de 0,1 ml El resultado es el promedio aritmético de las mismas.

En caso contrario, repetir las titulaciones.

*A.3 Determinación de cenizas y extracto seco.*

*A.3.1 Determinación de cenizas.*

La cápsula que contiene el residuo del extracto seco, se coloca en la mufla a temperatura ambiente y se programa para que llegue a 798 K (525°C), se mantiene a esta temperatura hasta obtener cenizas blancas (20 min. aproximadamente); dejar la cápsula en la mufla, una vez que haya disminuido su temperatura a 473 K (200°C, 1,5 h), sacar la cápsula de la mufla y dejar enfriar en el desecador hasta temperatura ambiente (aproximadamente 4 h). Determinar la masa y repetir esta operación hasta masa constante.

Meter a la estufa durante 1 h a 373 K (100°C). Enfriar en desecador a temperatura ambiente (aproximadamente 2 h). Determinar la masa por tercera vez. La diferencia entre la segunda y tercera pesada no debe ser mayor a 1 mg. Si la diferencia es mayor, repetir el proceso hasta lograrlo.

*A.3.2 Determinación de extracto seco.*

En una cápsula a masa constante, adicionar el volumen de la muestra (como se indica en la tabla A.3), evaporar en baño de agua hasta completa sequedad; pasar la cápsula a la estufa a una temperatura de 373 K a 378 K (100°C a 105°C) durante 1 h como mínimo o hasta que la masa sea constante en tres lecturas consecutivas, previamente llevado a temperatura ambiente en el desecador (aproximadamente 2 h).

**TABLA A.3.- Cantidad de muestra empleada para la determinación de extracto seco.**

| Tipo de bebida. | Volumen de muestra (ml). |
|---|---|
| Bebidas destiladas secas (sin azúcares reductores). | 25 - 50 |
| Bebidas destiladas semisecas (hasta 10 g/l de reductores). | 10 - 25 |
| Bebidas hasta con 10 g/l de reductores. | 10 |
| Bebidas con 10 g/l - 25 g/l de reductores. | 5 |
| Licores con más de 25 g/l de reductores. | 2 |
| Jarabes con más de 100 g/l de reductores. | 1 |

*A.3.3 Expresión de resultados para la determinación de cenizas y extracto seco.*

*A.3.3.1 Cenizas.*

Cálculos para determinar el contenido de cenizas:

$$c = \frac{(Mc-Mv)x10\ 6}{V}$$

Donde:

C: es la cantidad de cenizas, en mg/l;

Mc: es la masa de la cápsula más cenizas, en g;

Mv: es la masa de la cápsula vacía, en g;

V: es el volumen de la muestra empleada, en ml.

*A.3.3.2 Extracto seco.*

La cantidad de extracto seco se calcula de la siguiente manera:

$$Es = \frac{[Me\ (g) - mv\ (g)] \times 1\ 000\ ml}{V\ (ml)}$$

Donde:

Es: es la cantidad de extracto seco, expresado en g/l;

Me: es la masa de la cápsula más extracto seco en g;

Mv: es la masa de la cápsula vacía en g;

V:es el volumen de la muestra empleada en ml.

*A.3.4 Repetibilidad de los métodos.*

La diferencia entre dos resultados sucesivos bajo las mismas condiciones, no debe exceder de 1% del promedio de los mismos, en caso contrario, repetir las determinaciones.

*A.3.5 Reproducibilidad de los métodos.*

La diferencia entre dos determinaciones no debe exceder de 3% del promedio de las mismas.

*A.3.6 Informe de la prueba.*

El informe de la prueba debe contener como mínimo los siguientes datos:

- Nombre del producto.
- Prueba(s) a la(s) que se somete.
- Número de muestras probadas.
- Resultados obtenidos.
- Referencia a esta Norma.
- Lugar y fecha de la prueba.
- Nombre y firma de la persona responsable o signatario autorizado.
- Cualquier suceso no usual, ocurrido durante la prueba.

**A.4 Determinación del por ciento de alcohol en volumen a 293 K (20ºC) (% Alc. Vol).**

*A.4.1 Reactivos, materiales y aparatos.*

*A.4.1.1 Reactivos.*

- Solución de hidróxido de sodio (NaOH), a 6N.
- Agua destilada.

*A.4.1.2 Materiales.*

- Gránulos o trozos de carburo de silicio o perlas de vidrio (destilación de alcoholes).
- Probeta con diámetro suficiente para efectuar, simultáneamente las mediciones alcoholimétricas y de temperatura (prefiérase sin graduación, y con un diámetro 4 cm o 5 cm y de capacidad mínima de 300 ml.
- Matraz volumétrico de 250 ml o 300 ml.
- Matraz de destilación de 1 L.
- Refrigerante tipo Graham de 60 cm de longitud adaptado en el extremo inferior con un tubo y con la punta biselada.
- Trampa de vapor.
- Pipetas (5 ml).
- Tablas de corrección por temperatura para exfuerza real a 293 K (20ºC) (% Alc. Vol.).

*A.4.1.3 Aparatos.*

- Juego de alcoholímetros certificados por el fabricante con escala en por ciento en volumen graduados en 0,1% Alc. Vol. y referidos a 293 K (20ºC).
- Termómetro certificado o calibrado por un laboratorio de calibración autorizado, con escala de 0 K a 323 K (0°C a 50ºC), con división mínima no mayor a 0,1ºC.
- Equipo de ultrasonido.
- Equipo de agitación magnética.

*A.4.2 Procedimiento.*

*A.4.2.1 Procedimiento general.*

A.4.2.1.1 Verter y medir en el matraz volumétrico de 250 ml a 300 ml la muestra a una temperatura de 293 K (20ºC) 0,5 K, transferirlos cuantitativamente con agua destilada, de acuerdo a la tabla A.4 (procurando enjuagar con el agua al menos tres veces el matraz volumétrico), al matraz de destilación que contiene gránulos o trozos de carburo de silicio o perlas de vidrio, conectándolo al refrigerante mediante el adaptador.

A.4.2.1.2 Calentar el matraz de destilación y recibir el destilado en el mismo matraz donde se midió la muestra. El refrigerante termina en una adaptación con manguera y tubo con la punta biselada, que entren en el matraz de recepción hasta el nivel del agua puesta en éste (ver tabla A.4 y según producto). Por el refrigerante está circulando siempre el agua fría, y el matraz de recepción debe encontrarse sumergido en un baño de agua-hielo durante el curso de la destilación.

A.4.2.1.3 Cuando la cantidad de destilado contenida en el matraz de recepción se acerque a la marca (unos 0,5 cm abajo de la marca de aforo), suspender la destilación y retirar el matraz de recepción, y llevar el destilado a la temperatura que se midió la muestra, procurar no perder líquido. Llevar a la marca de aforo con agua destilada, homogeneizar y transferir el destilado a la probeta.

A.4.2.1.4 En una probeta adecuada al tamaño de alcoholímetro y a la cantidad de la muestra destilada, verter el destilado enjuagando la probeta primero con un poco de la misma muestra. Después vaciar el destilado hasta unos 10 cm abajo del nivel total. Introducir el alcoholímetro cuidadosamente junto con el termómetro. El alcoholímetro debe flotar libremente, se aconseja que esté separado de las paredes de la probeta 0,5 cm. Esperar a que se estabilice la temperatura y dando ligeros movimientos con el termómetro, eliminar las burbujas de aire. Efectuar la lectura de ambos. Si la lectura se realiza a una temperatura diferente de 293 K (20ºC), se tiene que pasar a grado volumétrico (% Alco. Vol. a 293 K (20ºC), (exfuerza real), y hacer la corrección necesaria empleando las tablas de corrección por temperatura.

**TABLA A.4.- Volúmenes de muestra y agua para la destilación de las muestras.**

| Producto | % Alc. Vol. 273 K (20ºC) | Contenido de azúcares reductores totales (g/l) | Cantidad de muestra (ml) | Cantidad de agua destilada agregada (ml) | Cantidad de agua en el matraz de recepción de la destilación (ml) |
|---|---|---|---|---|---|
| Bebidas alcohólicas | 35 a 55 | 0 a 15 | 250 | 75<br>300 | 10 |
| Vinos | 10 a 13 | 0 a 30 | 250<br>300 | 100<br>150 | 30 |
| Vinos generosos | 10 a 20 | 0 a 400 | 250<br>300 | 100<br>180 | 30 |
| Vinos espumosos | 10 a 14 | 0 a 100 | 250<br>300 | 100<br>180 | 30 |
| Bebidas carbonatadas y sidras | 3 a 8 | 0 a 120 | 250<br>300 | 100<br>150 | 20 |
| Rompope | 10 a 14 | 200 a 500 | 250<br>300 | 150<br>200 | 30 |
| Cócteles | 12,5 a 24 | 100 a 200 | 250<br>300 | 125<br>150 | 30 |
| Licores | 15 a 45 | 50 a 500 | 250<br>300 | 100<br>200 | 30 |
| Extractos hidroalcohólicos | 45 a 80 | 0 a 50 | 250<br>300 | 50<br>90 | 10 |

*A.4.2.3 Procedimiento para bebidas carbonatadas.*

Eliminar previamente el dióxido de carbono (CO2) de la muestra, mediante agitación mecánica durante 30 min. o 5 min. en ultrasonido.

Continuar con el procedimiento descrito en A.4.2.1.1 y A.4.2.1.2, tomar en cuenta las cantidades de muestra y agua que se expresan en la tabla A.4, y si después del procedimiento de destilación la muestra presenta la acidez total mayor a 3,0 g/l, ésta debe neutralizarse. Continuar con el procedimiento A.4.2.1.3.

*A.4.2.4 Procedimiento para licores.*

Procédase de acuerdo a lo descrito en A.4.2.1.1., A.4.2.1.2 y A.4.2.1.3 y ver la tabla A.4 para el empleo de volumen de muestra y agua.

*A.4.2.5 Procedimiento para aguardientes.*

En aquellos productos que no contienen color o azúcar, como el caso del aguardiente, no es necesario realizar el proceso de destilación y la medición del por ciento de alcohol se realiza con la muestra directa.

*A.4.3 Expresión de resultados.*

A.4.3.1 Si en el momento de la determinación la muestra está a una temperatura diferente a 293 K (20ºC), la lectura debe corregirse usando las tablas alcoholimétricas (ver tabla VIII b de la Guide Practique D´Alcoométrie), en la sección de grado volumétrico (exfuerza real). El por ciento de alcohol en volumen a 293 K (20ºC) de la bebida alcohólica, objeto de esta prueba, es la lectura ya corregida obtenida en el párrafo anterior, puede abreviarse (% Alc. Vol.).

*A.4.4 Repetibilidad del método.*

No debe exceder del 0,2%, en caso contrario repetir las determinaciones.

*A.4.5 Reproducibilidad del método.*

No debe exceder de 0,3 % de alcohol en volumen a 293 K (20ºC).

*A.4.6 Informe de la prueba.*

El informe de la prueba debe contener los siguientes datos como mínimo:

- Nombre del producto.
- Resultados obtenidos (expresados en % Alc. Vol. a 20ºC).
- Referencia a esta Norma.
- Lugar y fecha de la prueba.
- Nombre y firma de la persona responsable o signatario autorizado.

*A.5 Determinación de alcoholes superiores (Aceite de Fusel) excepto n-propanol en bebidas alcohólicas destiladas.*

*A.5.1 Método químico.*

*A.5.1.1 Fundamento.*

Este método sólo determina a los alcoholes superiores de 4 carbonos en adelante, es decir, superiores al propílico, ya que parte de éste se pierde como propileno durante la preparación de la muestra, además de su baja sensibilidad por el p-dimetilamino benzaldehído.

El método se basa en la coloración producida cuando se somete a los alcoholes al calor y a la presencia de ácido sulfúrico concentrado, la reacción se sensibiliza más con la adición de aldehídos aromáticos. El color producido se lee en el espectrofotómetro entre 538 y 543 nm.

Los alcoholes superiores son compuestos orgánicos con más de 2 átomos de carbono y uno o más grupos hidróxilos.

Los principales alcoholes superiores de las bebidas alcohólicas son: propanol I, el 2-butanol, feniletil alcohol, el alcohol isobutílico (metil-2 propanol) y los alcoholes amílicos (mezcla de metil-2-butanol-1, metil-3-butanol-1 y pentanol-1). A la mezcla de estos cuatro últimos alcoholes se le llama aceite de fusel.

La formación de estos alcoholes se atribuye a los azúcares de las bebidas a través de los cuales se sintetizan los aminoácidos.

*A.5.1.2 Reactivos, materiales y aparatos.*

*A.5.1.2.1 Reactivos.*

Los reactivos deben ser grado analítico y por agua debe entenderse "agua destilada".

Acido sulfúrico concentrado.

Alcohol isobutílico.

Alcohol isoamílico.

Solución de p-dimetilamino benzaldehído.- Disolver 1 g de sal de p-dimetilamino benzaldehído en una mezcla de 5 ml de ácido sulfúrico y 40 ml de agua, contenida en un matraz volumétrico de 100 ml, llevar a volumen con agua y homogeneizar.

Alcohol etílico bidestilado.- Por destilación simple, eliminando el 15% de cabezas en cada una de las destilaciones y recolectando el 50%. Estas destilaciones deben efectuarse a una velocidad aproximada de 250 ml/30 min.

Solución patrón de aceite de fusel al 0,1% m/v.- Transferir 2 g de alcohol isobutílico y 8 g de alcohol isoamílico a un matraz volumétrico de 1000 ml, llevar a volumen con agua y homogeneizar.

Tomar de la solución anterior una alícuota de 10 ml y transferirla a un matraz volumétrico de 100 ml, llevar al volumen con agua y homogeneizar.

Preparar con alcohol etílico bidestilado una disolución de grado alcohólico igual al que se espera tener en la muestra cuando es pasada al tubo de análisis.

*A.5.1.2.2 Materiales.*

Material común de laboratorio.

*A.5.1.2.3 Aparatos y equipo.*

Aparato de destilación como se indica en el método de prueba para la determinación del % Alc. Vol. a 20ºC.

Balanza analítica con sensibilidad de 0,0001 g.

Espectrofotómetro.

*A.5.1.3 Preparación de la curva de calibración.*

*A.5.1.3.1 Soluciones tipo para la curva de calibración.*

Prepara seis soluciones tipo, conteniendo de 1 mg/100 ml a 6 mg/100 ml de aceite de fusel, poniendo en matraces volumétricos de 100 ml alícuotas de 1 ml a 6 ml de la solución patrón de aceite de fusel y llevar al aforo con la solución de grado alcohólico igual al que se espera tener en la muestra cuando ésta es pasada al tubo de análisis.

Para comprobar la solución patrón de aceite de fusel sintética, simultáneamente preparar un testigo con 6 ml de la solución patrón de aceite de fusel, en un matraz volumétrico de 100 ml, llevar al aforo con alcohol etílico bidestilado al 95% Alc. Vol. Tratando este testigo como en el apartado A.5.1.5 debe dar una absorbancia de 0,83 ± 0,03 a una longitud de onda de 530 nm, de lo contrario preparar nuevamente la disolución patrón de aceite de fusel.

*A.5.1.4 Preparación de la muestra.*

A.5.1.4.1 Para bebidas destiladas, destilar previamente la muestra, como se indicó en el método de prueba para determinación del % Alc. Vol. a 20ºC.

A.5.1.4.2 En un matraz volumétrico de 100 ml colocar un volumen conocido destilado de la muestra, dependiendo del contenido de alcoholes superiores de la misma y llevar al aforo con agua, homogeneizar y proceder como se indica en el punto A.5.1.5.

***NOTA: En el caso de bebidas alcohólicas con bajo contenido de alcoholes superiores, tomar la muestra directamente del destilado y proceder como se indica en el apartado A.5.1.5.***

*A.5.1.5 Procedimiento.*

A.5.1.5.1 En una serie de tubos de ensayo poner 2 ml de la muestra, 2 ml de cada una de las soluciones tipo preparadas y 2 ml de la disolución testigo y en otro tubo poner 2 ml de agua como blanco.

A.5.1.5.2 Los tubos se colocan en un baño de hielo, agregarles 1 ml de solución de p-dimetilamino benzaldehído, dejarlos en el baño de hielo durante 3 min. Adicionar a cada tubo lentamente gota a gota por medio de una bureta 10 ml de ácido sulfúrico concentrado, dejándolo escurrir por las paredes del tubo, agitar agua en ebullición durante 20 min. Colocarlos después en el baño entre 3 y 5 min., sacarlos y llevarlos a la temperatura ambiente.

A.5.1.5.3 Leer la absorbancia de los tipos y las muestras en el espectrofotómetro a una longitud de onda entre 538 y 543 nm contra el blanco usado como referencia. Usar la misma longitud de onda para tipos y problemas.

A.5.1.5.4 Con los datos obtenidos, construir en papel milimétrico la curva de calibración, colocando en las abscisas las concentraciones de las soluciones tipo de aceite de fusel y en las ordenadas la absorbancia de las mismas.

*A.5.1.6 Cálculos.*

En el contenido de alcoholes superiores (aceite de fusel), expresado en mg/100 ml de alcohol anhidro, se calcula con la siguiente fórmula:

$$A.S. = \frac{P \times FD \times 100}{\%\ Alc.\ Vol.}$$

En donde:

A.S. = Alcoholes superiores (aceite de fusel) en mg/100 ml de alcohol anhidro. Superiores al propílico.

P = mg de aceite de fusel/100 ml de muestra, calculados a partir de la curva de calibración.

$$FD = \frac{\text{Vol. total de la dilución}}{\text{Vol. de la muestra empleada en la dilución}}$$

% Alc. Vol. = Grado alcohólico real de la muestra a 293 K (20ºC) en % de alcohol en volumen.

*A.5.1.7 Repetibilidad y reproducibilidad del método.*

*A.5.1.7.1 Repetibilidad.*

La diferencia entre dos resultados sucesivos, obtenidos en las mismas condiciones, no debe exceder del 5% del promedio de los mismos. En caso contrario, repetir las determinaciones.

*A.5.1.7.2 Reproducibilidad.*

La diferencia entre dos determinaciones no debe exceder del 15% del promedio de las mismas.

*A.5.1.8 Precauciones.*

*A.5.1.8.1 Para las muestras.*

Es importante hacer la medición de volúmenes de muestras, siempre a 20ºC a fin de evitar el error por volumen en dos pruebas de una misma muestra.

*A.5.1.8.2 Para el analista.*

Debe emplearse el equipo de seguridad necesario y adecuado, lentes de seguridad y guantes para el manejo de sustancias tóxicas.

*A.6 Determinación de metanol - Cromatografía de Gases.*

*A.6.1 Fundamentos.*

A.6.1.1 Este método se basa en los principios de la cromatografía de gases y consiste en la inyección de una pequeña cantidad de la muestra (constituida por una mezcla de sustancias volátiles) en el inyector de un cromatógrafo de gases en el que son vaporizadas y transportadas por un gas inerte a través de una columna empacada o capilar con un líquido de partición que presenta solubilidad selectiva con los componentes de la muestra, ocasionando su separación.

Los componentes que eluyen de la columna pasan uno a uno por el "Detector", el cual genera una señal eléctrica proporcional a su concentración, la que es transformada por el registrador (o integrador) en una gráfica de concentración contra tiempo llamada cromatograma.

A.6.1.2 La identificación de cada componente registrado como un pico en el cromatograma, se realiza por inyección del o los componentes que se sospecha contiene la muestra en forma pura y en las mismas condiciones que la muestra, midiendo el tiempo de retención en esas condiciones. También se puede comprobar por adición del componente a la muestra e inyectándola nuevamente para apreciar el incremento de altura o área del pico correspondiente.

A.6.1.3 La cuantificación se puede efectuar por cualquiera de tres métodos; normalización, estandarización extrema y estandarización interna, siendo este último el único que se describe a continuación:

La cuantificación por estandarización interna consiste en obtener el cromatograma de la muestra estandarizada, o sea adicionada de una sustancia llamada estándar interno que debe aparecer en un sitio del cromatograma, libre de traslapes y desde luego no debe ser componente de la muestra, aunque es recomendable que sea de la misma naturaleza química y del mismo rango de concentración que el componente de la muestra por cuantificar (metanol). Debe obtenerse cromatogramas paralelos con soluciones de concentración conocida del componente por cuantificar (metanol) y del estándar interno (por ejemplo butanol o hexanol) y trazar una curva de calibración que tenga por ordenadas la relación de concentraciones correspondientes al componente por cuantificar y al estándar interno.

Esta curva sirve para situar en sus ordenadas la relación de áreas correspondientes al componente por cuantificar y al estándar interno del cromatograma de la muestra estandarizada y así ubicar la relación correspondiente de concentraciones.

*A.6.2 Reactivos y aparatos.*

*A.6.2.1 Reactivos.*

A menos que se especifique lo contrario, los reactivos que se mencionan a continuación deben ser de grado analítico y cuando se mencione o se indique agua, ésta debe ser destilada o desmineralizada.

*A.6.2.1.1 Alcohol etílico de alta pureza y libre de metanol.*

A.6.2.1.2 Disolución de metanol al 0,5% m/v (l g/200 ml) en alcohol etílico de 40ºG.L.

A.6.2.1.3 Disolución de metanol al 0,1% m/v poner 20 ml de disolución de metanol al 0,5% (ver 2.1.2) en un matraz volumétrico de 100 ml y aforar con alcohol etílico de 40ºG.L. Se pueden usar múltiplos de estas cantidades conservando las mismas concentraciones.

A.6.2.1.4 Disolución de estándar interno al 0,5% m/v (1 g/200 ml) en alcohol etílico de 40ºG.L.

A.6.2.1.5 Disolución de estándar interno 0,1% m/v. Poner 20 ml de disolución e estándar interno al 0,5% (ver 2.1.4) en un matraz volumétrico de 100 ml y aforar con alcohol etílico de 40ºG.L.

Se pueden usar múltiplos de estas cantidades, conservando las mismas concentraciones. El estándar interno puede ser N-butanol, N-hexanol, u otro alcohol que no se traslape con los componentes de la muestra.

A.6.2.1.6 Disoluciones de estándar interno y metanol para muestras que contengan 128 mg y 650 mg de metanol por 100 ml de alcohol anhidro (disoluciones de trabajo A. B. C. D y E, para la curva de calibración).

**TABLA A.6.1.- Disoluciones de trabajo.**

| Disolución | miligramos de estándar 100 ml | miligramos de metanol 100 ml | mililitros de disolución al 0,5% de metanol | mililitros de disolución al 0,5% de estándar | Relación de metanol - estándar Cm/Ce |
|---|---|---|---|---|---|
| A | 150 | 50 | 10 | 30 | 0,33 |
| B | 150 | 100 | 20 | 30 | 0,67 |
| C | 150 | 150 | 30 | 30 | 1,00 |
| D | 150 | 200 | 40 | 30 | 1,33 |
| E | 150 | 250 | 50 | 30 | 1,67 |

En la tabla anterior, las diluciones de las columnas 3 y 4 se refieren a los mililitros de las soluciones al 0,05% de metanol y del estándar, que se debe diluir a 100 ml en el mismo matraz con etanol de 40ºG.L., para tener las concentraciones que se indican en las columnas 1 y 2 y la relación de concentraciones que se indican en la columna 5 que deben ser abscisas de la curva de calibración; las ordenadas deben ser las relaciones de área del pico de metanol entre el área del pico del estándar.

*A.6.2.1.7 Solución de muestra estandarizada (adicionado de estándar interno).*

En un matraz volumétrico de 100 ml, poner 30 ml de estándar interno (ver A.6.2.1.4) y aforar con la muestra preparada (ver A.6.2.1.5).

En caso de bebidas que contengan menos de 128 mg de metanol por 100 ml de alcohol anhidro, elaborar una curva de calibración equivalente a la del inciso 2.1.6, pero cambiando la concentraciones de metanol y estándar interno.

**TABLA A.6.2.- Curva de calibración.**

| Disolución | miligramos de estándar 100 ml | miligramos de metanol 100 ml | mililitros de disolución al 0,5% de metanol | mililitros de disolución al 0,5% de estándar | Relación de metanol - estándar Cm/Ce |
|---|---|---|---|---|---|
| A | 150 | 50 | 10 | 30 | 0,33 |
| B | 150 | 100 | 20 | 30 | 0,67 |
| C | 150 | 150 | 30 | 30 | 1,00 |
| D | 150 | 200 | 40 | 30 | 1,33 |
| E | 150 | 250 | 50 | 30 | 1,67 |
| F | 8 | 4 | 4 | 8 | 0,50 |
| G | 8 | 6 | 6 | 8 | 0,75 |
| H | 8 | 8 | 8 | 8 | 1,00 |
| I | 8 | 10 | 10 | 8 | 1,25 |
| J | 8 | 12 | 12 | 8 | 1,50 |
| K | 30 | 10 | 10 | 30 | 0,33 |
| L | 30 | 20 | 20 | 30 | 0,67 |
| M | 30 | 30 | 30 | 30 | 1,00 |
| N | 30 | 40 | 40 | 30 | 1,33 |
| O | 30 | 50 | 50 | 30 | 1,67 |

En la tabla anterior las dilaciones de las columnas 3 y 4 se refieren a los mililitros de las soluciones al 0,1% de metanol y del estándar interno que se deben diluir a 100 ml en el mismo matraz con alcohol etílico de 40ºG.L., para tener las concentraciones que se indican en las columnas 1 y 2.

*A.6.2.2. Aparatos.*

Cromatógrafo de gases equipado con detector de ionización de flama, siendo opcional el sistema dual con programador de temperatura, registrador integrador o sistema de procesamiento de datos (computadora).

*A.6.2.2.1 Parámetros de operación recomendables.*

En cada caso deben optimizarse de acuerdo a la situación geográfica y al aparato, la temperatura de la columna isotérmica 423 K ± 10 K (150°C ± 10°C) o programada de: inicial 343 K (70°C) de cero a cuatro minutos y aumento lineal de 4 K a 8 K (4°C a 8°C) por minuto hasta llegar a 393 K (120°C), manteniendo esta temperatura constante.

Temperatura del inyector 423 K (150°C).

Temperatura del detector 473 K (200°C).

Flujo del gas portador 50 ml/min (aproximadamente).

Las condiciones de operación óptimas varían de acuerdo a la columna e instrumentos utilizados, los cuales son determinados por medio de soluciones estándares, y curvas de número de platos teóricos (N) contra velocidad lineal del gas o flujo (optimización por ecuación de Van Deemeter).

Los parámetros deben ser ajustados para obtener resolución óptima entre el metanol y el etanol, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$R = \frac{2\,AT}{am + ae}$$

Donde:

R: es la resolución;

AT: es la diferencia de tiempos de retención;

Am: es la amplitud del pico en la base correspondiente al metanol;

Ae: es la amplitud del pico en la base correspondiente al etanol.

***NOTA: Las unidades de T, am y ae deben ser las mismas.***

Con objeto de obtener cromatogramas confiables, deben tomarse las siguientes precauciones:

- Acondicionamiento y saturación de la columna.
- Limpieza del inyector.
- Detección de fugas del sistema.
- Estabilidad del flujo del gas.
- Optimización del detector (flujos de hidrógeno y aire).

- Estabilidad de la temperatura.
- Repetibilidad de los cromatogramas.

*A.6.2.2.2 Material de las columnas.*

- Fase móvil (gas acarreador) nitrógeno, helio o argón de alta pureza.
- Hidrógeno prepurificado.
- Aire seco prepurificado.
- Jeringa de 5 l - 10 l.
- Pipeta o jeringa de 100 l - 500 l.

a) Columna empacada - Especificaciones:

Material: inerte a la muestra (vidrio o acero inoxidable)

Longitud: 1,8 m a 6,0 m

Diámetro interior: 2 mm aproximadamente

Relleno (empaque); apropiado para obtener resolución mayor o igual a uno entre el metanol y el etanol.

Se recomienda, entre otros, el siguiente: fase fija o líquido de partición, polietileno glicol-1 540 al 15% o 20%.

b) Otras columnas:

Pueden ser empleadas otras columnas, cuya resolución sea mayor o igual a uno entre el metanol y el etanol.

*A.6.3 Preparación de la muestra.*

Cuando el extracto seco de la muestra exceda de 5 g/l destilar como se indica en la determinación de extracto seco. Se admite el uso de precolumna, en cuyo caso no se requiere destilar.

*A.6.4 Procedimiento.*

Inyectar en el cromatógrafo de 1 l a 5 l de la solución de muestra estandarizada (ver 6) y de cada una de las soluciones estándar (A, B, C u otras de la tabla que corresponda) para obtener los comatogramas respectivos, haciendo las atenuaciones convenientes para obtener un buen cromatograma cuantitativo, verificando que la resolución entre el metanol y el etanol sea mayor o igual a uno.

*A.6.5 Expresión de resultados.*

*A.6.5.1 Curva de calibración.*

Cálculo de áreas y relaciones de áreas: calcule el área correspondiente al metanol (am) y al estándar interno (Ae) en cada cromatograma de las soluciones estándar (A, B, C u otras), divida el área de metanol entre el área del estándar interno y con los valores obtenidos, trace la curva de relación de concentraciones contra relación de áreas (columna 5 de la tabla que corresponda, ver A.6.2.1.7).

Am es el área del pico del metanol;

Ae es el área del pico del estándar;

Cm es la concentración del metanol;

Ce es la concentración del estándar. Cm/Ce

A.6.5.2 Cálculos en el cromatograma de la muestra, estandarizada.

Calcule las áreas del metanol y del estándar interno en el cromatograma y obtenga el valor de Am/Ae con el cual se localiza en la curva de calibración el valor de Cm/Ce.

*A.6.5.3 Cálculo final.*

Con el valor de Cm/Ce obtenido para la muestra en la curva de calibración y conociendo la cantidad de estándar interno (Ce) agregado a la solución de muestra estandarizada, podemos calcular la concentración de metano en la muestra (Cm) con las siguientes fórmulas:

$$Cm = Ce \times Rg$$

Donde:

Cm: es el metanol expresado en mg por 100 ml de muestra directa;

Ce: son los miligramos de estándar interno agregados a la solución de muestra estandarizada;

Rg: es la relación de Cm/Ce obtenida en la curva de calibración.

$$M = \frac{100}{G.A.R.}$$

Donde:

M: es el grado alcohólico real de la muestra a 288 K (15°) en la escala Gay Lussac, determinado de acuerdo como se procede para la determinación del extracto seco.

G.A.R.: son el grado alcohólico real de la muestra a 288 K (15ºC) en la escala Gay-Lussac, determinado de acuerdo con la NMX-V-13.

Los cálculos anteriores pueden hacerse utilizando alturas de picos en lugar de áreas.

*A.6.5.4 Repetibilidad del método.*

La diferencia entre dos resultados sucesivos, obtenidos en las mismas condiciones, no debe exceder del 5% del promedio de los mismos. En caso contrario, repetir las determinaciones.

*A.6.5.5 Reproducibilidad del método.*

La diferencia entre dos determinaciones no debe exceder del 15% del promedio de las mismas.

*A.7 Determinación de ésteres y aldehídos.*

*A.7.1 Reactivos y materiales.*

*A.7.1.1 Reactivos.*

- Ácido clorhídrico.
- Agua.
- Bisulfito de sodio 0.05 N.
- Disolución de tiosulfato de sodio.
- Disolución de yodo.
- Indicador de almidón.
- Indicador de fenolftaleína.
- Hidróxido de sodio (NaOH) 0,1 N.
- Muestra.

A.7.1.2 Materiales.

- Gránulos o trozos de carburo de silicio o perlas de vidrio.
- Matraz de balón de fondo plano con boca esmerilada.
- Matraz Erlenmeyer de 500 ml con boca y tapón esmerilados.
- Matraz volumétrico de 200 ml.

*A.7.2 Preparación de la muestra.*

A.7.2.1 En un matraz balón de fondo plano con boca esmerilada, de 500 ml, poner 200 ml de la muestra, agregar 35 ml de agua y unos gránulos o trozos de carburo de silicio o perlas de vidrio. Destilar lentamente, recibiendo el destilado en un matraz volumétrico de 200 ml

A.7.2.2 Cuando la cantidad contenida en el matraz volumétrico se acerque al aforo, suspender la destilación, llevar al aforo con agua y homogeneizar. Debe tomarse en consideración la temperatura de calibración de los recipientes.

*A.7.3 Procedimiento.*

*A.7.3.1 Determinación de ésteres.*

A.7.3.1.1 Transferir 100 ml del destilado a un matraz balón de fondo plano de boca esmerilada de 500 ml, neutralizar el ácido libre con hidróxido de sodio 0,1 N, utilizando fenolftaleína como indicador, agregar un exceso de disolución de hidróxido de sodio 0,1 N.

A.7.3.1.2 Conectar el matraz al condensador de reflujo y calentar a ebullición durante 2 h.

A.7.3.1.3 Dejar enfriar y titular el exceso de álcali con disolución de ácido clorhídrico 0,1 N. Desechar las determinaciones en las que el exceso de álcali gaste ácido clorhídrico en un volumen menor de 2 ml o mayor de 10 ml.

A.7.3.1.4 Preparar un testigo con la misma cantidad de reactivos utilizados en el problema, sustituyendo la muestra por agua y trabajarlo como la muestra.

A.7.3.1.5 Calcular los ésteres como acetato de etilo, como se indica en el capítulo de expresión de resultados (ver A.7.4.1).

*A.7.3.2 Determinación de aldehídos.*

A.7.3.2.1 Transferir 100 ml del destilado a un matraz Erlenmeyer de 500 ml, con boca y tapón esmerilados, agregar 100 ml de agua y 20 ml de disolución de bisulfito de sodio 0,05 N. Dejar reposar durante 30 min, agitando de vez en cuando.

A.7.3.2.2 Agregar un exceso de disolución de yodo (el exceso de disolución de bisulfito de sodio debe ser equivalente aproximadamente a 25 ml de la disolución de yodo). Titular el exceso de yodo con disolución de tiosulfito de sodio, hasta aparición del color amarillo paja, adicionar disolución de almidón como indicador y continuar la titulación hasta decoloración total.

A.7.3.2.3 Preparar un testigo, tomando 100 ml de agua y adicionar las mismas cantidades de disolución de bisulfito de sodio y disolución de yodo utilizadas para la muestra y trabajarlo como la muestra.

A.7.3.2.4 Calcular los aldehídos como acetaldehído, como se indica en el capítulo de expresión de resultados.

*A.7.4 Expresión de resultados.*

*A.7.4.1 Esteres.*

El contenido de ésteres expresados en miligramos de acetato de etilo por 100 ml referidos a alcohol anhidro, se calcula con la siguiente fórmula:

$$E = \frac{E1 \times 100}{G.A.R.} \quad \text{o sea} \quad E = \frac{(V1N1 - V2N2) \times 88 \text{ a } 100}{M} \times \frac{100}{G.A.R.}$$

Donde:

E: son los ésteres expresados en miligramos de acetato de etilo por 100 ml referidos a alcohol anhidro;

E1: son los ésteres expresados en miligramos de acetato de etilo por 100 ml de muestra;

V1: es el volumen de disolución de hidróxido de sodio utilizado para saponificar, en ml;

V2: es el volumen de disolución de ácido clorhídrico utilizado para titular el hidróxido de sodio sobrante de la saponificación, en ml;

N1 es la normalidad de la disolución valorada de hidróxido de sodio;

N2 es la normalidad de la disolución valorada de ácido clorhídrico;

88: son los miliequivalentes del acetato de etilo expresado en mg;

M: es la alícuota (100 ml);

G.A.R: es el grado alcohólico real de la muestra a 288 K (15ºC) en la escala Gay-Lussac, obtenido de acuerdo con la NMX-V-13.

*A.7.4.2 Aldehídos.*

El contenido de aldehídos expresados en miligramos de acetaldehído por 100 ml, referidos a alcohol anhidro, se calcula con la siguiente fórmula:

$$A = \frac{A1 \times 100}{G.A.R.} \quad \text{o sea} \quad A = \frac{(V1-N1)\ Nx\ 22 \times 100}{M} \times \frac{100}{G.A.R.}$$

Donde:

A: es el aldehído expresado en miligramos de acetaldehído por 100 ml de alcohol anhidro;

A1: son los aldehídos expresado en miligramos de acetaldehído por 100 ml de muestra;

V1: es el volumen de disolución de tiosulfato utilizado para la titulación de la muestra, en ml;

V2: es el volumen de disolución de tiosulfato utilizado para la titulación del testigo, en ml;

N: es la normalidad de la disolución de tiosulfato de sodio;

22: son los miliequivalentes de acetaldehído expresado en mg;

M: es la alícuota (100 ml);

G.A.R.: es el grado alcohólico real de la muestra a 288 K (15ºC) en la escala Gay-Lussac, obtenido de acuerdo con la NMX-V-13.

*A.8 Determinación de furfural-Método colorimétrico.*

*A.8.1 Fundamento.*

Este método de prueba se basa en la determinación colorimétrica del compuesto colorido que se forma al hacer reaccionar el furfural que contenga la bebida destilada con anilina, en presencia de ácido después de un tiempo de 20 min. a 20ºC.

La intensidad de la coloración rojo-cereza que se produce, es proporcional a la concentración de furfural presente en la muestra.

La intensidad de color producida en la muestra, se mide en el espectro visible a 520 nm (determinación de absorbancia).

A.8.1.1 Furfural, también llamado 2-furan-carbonel, es un compuesto que se forma por la deshidratación de las pentosas en medio ácido y con calor. Su concentración varía de acuerdo al tipo de bebida, al tipo de destilación y a las reacciones que presente su proceso de añejamiento. Sin embargo, no contribuye al sabor y aroma de las bebidas, por ser uno de los componentes de menor proporción en las bebidas alcohólicas.

*A.8.2 Reactivos, materiales y aparatos.*

*A.8.2.1 Reactivos.*

Los reactivos que se mencionan a continuación deben ser grado analítico, cuando se hable de agua, debe ser "agua destilada.

- Furfural (de preferencia recientemente destilado a 161 ± 0,1ºC con P = 1,1594 nD 20ºC = 1,52603.
- Anilina (recientemente destilada).
- Ácido acético glacial o ácido clorhídrico concentrado.
- Alcohol etílico (con más del 95% Alc. Vol., libre de furfural).
- Alcohol etílico de 50% Alc. Vol., recientemente destilado y libre de furfural.

Solución valorada de furfural.- Se redestila el furfural, se recoge la fracción que destile a 161 ± 0,1ºC y se corrige por presión atmosférica. Se pasa exactamente 1 g de furfural recientemente destilado y se diluye con alcohol etílico al 95% Alc. Vol., aforando a 100 ml en un matraz volumétrico. De esta solución se toma 1 ml, se lleva a otro matraz volumétrico y se afora a 100 ml con alcohol etílico de 50% Alc. Vol. Esta es la solución valorada de furfural con una concentración de 100 mg/l.

*A.8.2.2 Materiales.*

- Equipo de destilación completo, con juntas esmeriladas (de 1000 ml de capacidad, de preferencia).
- Perlas de ebullición.
- Pinzas para montar el equipo de destilación.
- Parrilla de calentamiento.
- Matraces volumétricos de 10 ml, 50 ml, y 500 ml.
- Pipetas volumétricas de 1 ml, 2 ml, 5 ml y 10 ml.
- Baño de agua (mantenerla a 20ºC).
- Material común de laboratorio.
- Termómetro de inmersión de -35ºC a 50ºC calibrado.

*A.8.2.3 Aparatos.*

Balanza analítica con sensibilidad de ± 0,0001 g.

Espectrofotómetro, con capacidad para leer a 520 nm o colorímetro con filtro verde.

*A.8.3 Preparación de la muestra.*

Todas las bebidas a las que es aplicable este método de prueba, deben llevarse a una temperatura de 20ºC para evitar la variación en volumen en dos pruebas de una misma muestra.

*A.8.3.1 Destilación de la muestra.*

Para llevar a cabo de la mejor manera la destilación de la muestra, consultar el método de prueba para determinación del % de Alc. Vol. a 20ºC.

*A.8.4 Procedimiento.*

*A.8.4.1 Preparación de la curva de furfural.*

Se preparan una serie de soluciones tipo de 50 ml cada una a partir de la solución valorada de furfural y del alcohol al 50% Alc. Vol., que contengan 0 mg/l, 1 mg/l, 2 mg/l, 3 mg/l, 4 mg/l y 5 mg/l de furfural, se llevan al volumen con el etanol a 50%.

A.8.4.2 Se adiciona 1 ml de anilina a cada una de las soluciones tipo y 0,5 ml de ácido acético o clorhídrico y se lleva la muestra a un baño a 20ºC durante 30 min., al término de los cuales, se lee la absorbancia espectrofotométrica a 520 nm.

*A.8.4.3 Procedimiento con la muestra.*

Se miden 10 ml de muestra destilada y se diluyen a 50 ml con etanol a 50% Alc. Vol.

A.8.4.4 Se colocan en un matraz aforado de 50 ml y se procede como se indica en el punto A.8.4.2.

Se grafican las lecturas de la serie de estándares contra concentración mg/l de furfural de cada uno, trazar la curva, determinar su correlación lineal, si es menor del 97%, repetir el proceso de preparación de muestra para la curva.

*A.8.5 Cálculos y expresión de resultados.*

El resultado en mg de furfural por litro de alcohol anhidro mediante la siguiente expresión:

$$F = \frac{5 \times F1 \times 100}{\% \text{ Alc. Vol}}$$

En donde:

F: mg de furfural/l de alcohol base anhidra.

F1: concentración de la muestra obtenida en gráfica.

5: factor de dilución.

% Alc. Vol.: Grado alcohólico volumétrico de la muestra a 20ºC.

*A.8.6 Repetibilidad y reproducibilidad.*

Cuando se requiera mayor confiabilidad de los resultados, se repite la prueba tres veces, a diferente concentración, los resultados no deben variar en más de 5%.

*A.8.7 Cuidados y precaución de seguridad.*

Para la realización de este método de prueba se deben llevar a cabo las siguientes precauciones:

*A.8.7.1 Para la muestra.*

La muestra a la que se determine el contenido de furfural debe ser recientemente destilada, obtenida de su volumen real medido a 20ºC, de lo contrario se obtendrían valores bajos de furfural.

*A.8.7.2 Para los reactivos.*

Los reactivos con que se construya la curva de calibración de furfural, deben ser recientemente destilados y libres de toda oxidación. Si se destilan, deben guardarse en frascos color ámbar perfectamente cerrados, protegidos de la luz y del calor. La solución de furfural concentrado es estable si se le conserva bien tapada en frasco ámbar y en refrigeración para usos posteriores.

*A.8.7.3 Para el analista.*

Debe emplear el equipo de seguridad adecuado durante el proceso de destilación de la muestra y los reactivos (lentes de seguridad y guantes de asbesto) y para la preparación de las muestras (guantes de cirujano) para impedir el contacto de los reactivos tóxicos e irritantes, con la piel.