

5.0 DETERMINACION DE ALDEHIDOS, ESTERES, METANOL V ALCOHOLES SUPERIORES. METODO POR CROMATOGRAFIA DE GASES

5.1 Fundamento

Este método se basa en los principios de la cromatografía de gases y consiste en la inyección de una pequeña cantidad de la muestra (que contiene 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, integrador o sistema de manejo de datos en una gráfica llamada cromatograma.

La identificación de cada componente registrado como un pico en el cromatograma, se realiza por inyección del o de los componentes en forma pura y con las mismas características y entidades que se sospecha contiene 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.

La cuantificación se puede efectuar por cualquiera de estos tres métodos: normalización, estandarización externa 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, 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 intervalo de concentración que el componente de la muestra por cuantificar. Deben obtenerse cromatogramas paralelos con soluciones de concentración conocida de cada componente por cuantificar y del estándar interno que sea adecuada muestra y trazar una curva de calibración que tenga por ordenada la relación de concentraciones correspondientes al componente por cuantificar y al estándar interno y en las abscisas la relación de áreas correspondientes al compuesto por cuantificar y a las áreas del estándar interno.

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

5.2 Alcance

Este método determina la concentración de aldehídos, ésteres, alcoholes superiores y metanol en bebidas alcohólicas por cromatograma de gases.

5.3 Equipos e instrumentos

Todos los equipos e instrumentos de medición deberán ser calibrados y/o verificados.

5.3.1 Cromatógrafo de gases equipado con detector de ionización de flama, de masas o tiempo de vuelo con sistema de inyección capilar, con integrador o sistema de manejo de datos y auto-muestreador (opcional).

5.3.2 Columna para sistema capilar cuya fase estacionaria y dimensiones sea capaz de separar los componentes a cuantificar con una resolución ≥ 1 con respecto a los compuestos mas cercanos.

Se sugiere utilizar alguna de las siguientes columnas:

- Fase estacionaria de polietilenglicol de 60 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 μm de espesor de película.
- Fase estacionaria de polietilenglicol de 50 m de longitud, 0.20 mm de diámetro interno y 0.25 μm de espesor de película.
- Fase estacionaria de polietilenglicol de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 1.0 μm de espesor de película.

Nota: Asegurar que el acetal se separe de los compuestos a cuantificar, en el caso de las columnas sugeridas es conveniente se separe del acetato de etilo debido a true puede interferir e a cuantificación de este último.

5.3.3 Inserto de vidrio para columna capilar, de acuerdo a la marca y modelo del cromatógrafo, así como al tipo de puerto de inyección y empacado para ayudar a retener impurezas y una mayor vida de la columna (puede ser de fibra de vidrio o de esferas de nana silabizadas).

5.3.4 Jeringa de 5 μl o 10 μl

5.3.5 Balanza analítica con resolución de 0.0001 g.

5.3.6 Sistema para atemperar los elementos de ensayo (prueba) como baño de agua, refrigeración, entre otros a 293 K ($20\text{ }^\circ\text{C}$) + 5 K.

5.3.7 Potenciómetro.

5.3.8 Pipeta volumétrica o micropipeta.

5.4 Reactivos y Materiales

Observaciones:

1. Se sugiere comprar los reactivos en su mínima presentación.
2. El agua empleada para la dilución de los patrones deberá ser grado I (ver Apéndice 1).
3. Material de Referencia trazable a patrones nacionales y/o patrones internacionales o bien reactivos que sean trazables y de pureza acorde al certificado de análisis del fabricante la cual no deba ser menos del 98.0%(Efectuar las correcciones necesarias para tener valores de calibración verdaderos en la tabla de calibración para cada componente).

5.4.1 acetaldehído (por la naturaleza volátil y la toxicidad de este compuesto se recomienda usar una ampollita sellada).

5.4.2 Acetal.

5.4.3 Metanol.

5.4.4 Sec-butanol (2-butanol).

5.4.5 n-propanol (1-propanol). ‘

5.4.6 n -butanol (1-butanol).

5.4.7 iso-butanol (2-metil-1-1-propanol)

5.4.8 isoamílico (3-metil-1-butanol).

5.4.9 Amílico Activo(2-metil-1-butano1) (aplicable en caso de que la columna logre la separación de este reactivo). Ver 5.7.1

5.4.10 n-amino (1-pentanol)

5.4.11 Acetato de etilo

5.4.12 Lactato de etilo.

5.4.13 Considerar el estandar interno apropiado pidiendo ser 2-pentanol, sec-butilacetato, hexanol, o 4-metil-2-pentanol. The ethanol contained in the analyzed alcoholic product is used as an internal standard.

5.4.14 Bicarbonato de sodio o Hidróxido de sodio.

5.4.15 Alcohol etílico grado cromatográfico y/o libre de los compuestos a cuantificar verificado por cromatografía de gases antes de usarlo.

5.4.16 Solución de alcohol etílico al 40% v/v.

Medir 400 ml de etanol en una probeta y llevar al volumen de 1000 ml con agua, ajustar el pH de 8.2 a 8.5 con bicarbonato de sodio o hidróxido de sodio para evitar la degradación de algunos de los compuestos en un medio ácido.

Se recomienda que antes de utilizar esta solución se encuentre a temperatura ambiente de laboratorio.

5.4.17 Gases para el cromatógrafo:

- Aire grado extra-seco.
- Hidrogeno (mínimo 99.99% de pureza).
- Nitrógeno o Helio o Hidrogeno (mínimo 99% de pureza).

La pureza de los gases se demuestra con el informe o certificado del proveedor o bien con las especificaciones del fabricante de los generadores de gases.

5.4.18 Matraces volumétricos de diferentes capacidades clase A, certificados o verificados.

5.4.19 Pipetas volumétricas de diferentes capacidades clase A, o micropipetas certificadas o verificadas.

5.5 Precauciones

5.5.1 Para las muestras

5.5.1.1 Es importante hacer la medición de volúmenes siempre $293\text{ K } (20^{\circ}\text{C}) + 5$ a fin de evitar el error por volumen en dos pruebas de una misma muestra.

5.5.1.2 Verifica el contenido alcohólico de la muestra antes de realizar el análisis, en caso de que los resultados se expresan en mg/100 Alcohol Anhidro.

5.5.1.3 Si la muestra tiene contenido alto de sólidos como en el caso de licores, cremas o bebidas preparadas es necesario llevar a cabo una destilación, si la muestra tiene extracto seco inferior a 5 g/l no es necesario destilar y se debe utilizar el inserto con lana de vidrio para evitar la contaminación del sistema cromatográfico.

5.5.2 Para el analista

5.5.2.1 Se sugiere emplear el equipo de seguridad necesario y adecuado, lentes de seguridad y guantes para el manejo de sustancias tóxicas.

5.5.2.2 Se sugiere tomar en cuenta las indicaciones contenidas en las hojas de seguridad de cada reactivo.

5.5.3 Para la preparación de soluciones

Las cantidades y volúmenes expresados en esta norma podrán variar según los procedimientos del laboratorio, siempre y cuando se mantenga la equivalencia.

5.6 Procedimiento

5.6.1 preparación de la solución concentrada

Para preparar la solución concentrada, se puede optar por cualquiera de los siguientes procedimientos:

- Preparar las soluciones concentradas de los componentes en forma individual. Determinar la masa o medir la cantidad requerida de cada componente en diferentes matraces volumétricos y aforar (se puede utilizar como referencia la tabla No. 1).
- Preparar una solución concentrada en conjunto, la cual contenga todos los componentes a analizar. Determinar la masa o medir la cantidad requerida de cada componente en un solo matraz y aforar (se puede utilizar como referencia tabla No.1).
- Se puede preparar la solución patrón en varios matraces de manera que tenga todos los componentes a cuantificar.

La(s) solución(es) concentrada(s) debe(n) prepararse con las cantidades necesarias para cubrir el intervalo de trabajo del laboratorio.

TABLA No 1
Concentraciones recomendadas para la preparación de la(s) solución(es) concentrada(s).

No.	Componente	Concentración en g/100 ml de solución de Etanol al 40% v/v
1	acetaldehído	0.16
2	Acetal de etilo	0.30
3	Metanol	1.20
4	Sec-butanol	0.20
5	n-propanol	0.60
6	Iso-butanol	0.60
7	n-butanol	0.20
8	Amílico activo*	0.20
9	Isoamílico	0.60
10	n-amílico	0.60
11	Lactato de etilo	0.30

* Ver 5.4.8

Se recomienda al pesar, iniciar por el componente menos volátil y terminar con el más volátil.

Si las soluciones se van a utilizar posteriormente, es recomendable almacenarlas en refrigeración hasta su uso.

5.6.2 preparación de la solución concentrada de acetaldehído

En un matraz volumétrico de 100 ml adicionar aproximadamente 50 ml de etanol al 40% v/v, taponarlo y determinar su masa, anotar el valor de la masa.

La adición de la cantidad necesaria de acetaldehído se puede realizar de las siguientes maneras:

- a) Medir con una jeringa de preferencia gastype, o
- b) Medir con una pipeta o micropipeta previamente refrigerada, o
- c) Transferir el contenido de un vial o ampolla sellada, en todos los casos el material debe utilizarse como máximo a 279 K (6°C).

Tapar el matraz y determinar su masa nuevamente, anotar el valor de la masa, agregar solución de etanol al 40 % v/v cercano a la línea de aforo. mantener en matraz volumen rico en ambiente controlado (por lo menos durante 30 minutos), llevar al aforo homogeneizar. Si la solución e va a utilizar posteriormente se almacena en refrigeración.

Nota: Todos los reactivos deberán almacenarse de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

5.6.3 Preparación de la solución de estándar interno

En este caso se ejemplifica preparación de 1 2 pentano 1.

En un matraz volumétrico de 100 ml adicionar aproximadamente 50 ml de etanol al 40 % v/v, tapar el matraz y determinar la masa diccionario la cantidad requere de estándar interno, tapar y determinar la masa nuevamente, agregar solución de etanol al 40 % v/v cercano a la línea de aforo, y homogeneizar. Colocar el volumétrica en un ambiente controlado hasta llevarlo a 293 K (20°C) + 5 aforar y homogeneizar.

La concentración de las soluciones se calcula e la siguiente manera:

Concentración del analito en $\frac{g}{100ml} = \frac{P_1}{P_2}$

En donde:

P_1 = masa del matraz con etanol al 40% v/v y estándar interno.

P_2 = masa del matraz con etanol al 40% v/v.

O bien se puede utilizar la función de tara en la balanza analítica. The ethanol contained in the analyzed alcoholic product is used as an internal standard.

5.6.4 Preparación de las diluciones de calibración

Para preparar las soluciones de calibración transferir a matraces volumétricos de 100 ml las cantidades necesarias de la solución concentrada a temperatura controlada del laboratorio para obtener las concentraciones en Ing./100 ml recomendadas en la Tabla No. 2, adicionar el volumen requerido de solución estándar interno. Posteriormente llevar al volumen con la solución de etanol. The ethanol contained in the analyzed alcoholic product is used as an internal standard.

Estas soluciones deben guardarse bien tapadas en refrigeración.

Tabla No. 2
Niveles y concentraciones recomendadas para preparar las diluciones de calibración.

Concentración (mg/100ml)

Solución concentrada (ml)	Acetal dehidro	Metanol	s-Butanol	n-Propanol	Iso-Butanol	n-Butanol	Iso-amílico	amílico activo	n-amílico	Acetato de Etilo	Lactato de Etilo
1	1.60	12	2	6	6	2	6	2	6	3	3
2	3.20	24	4	12	12	4	12	4	12	6	6
3	4.80	36	6	18	18	6	18	6	18	9	9
4	6.40	48	8	24	24	8	24	8	24	12	12
5	8.00	60	10	30	30	10	30	10	30	15	15
6	9.60	72	12	36	36	12	36	12	36	18	18
7	11.2	84	14	42	42	14	42	14	42	21	21
8	12.5	96	16	48	48	16	48	16	48	24	24
9	14.4	105	18	54	54	18	54	18	54	27	27
IO	16.0	120	20	60	60	20	60	20	60	30	30

La concentración de la(s) Solución(es) de calibración dependen de la concentración que se espera determinar en la muestra por analizar y el intervalo de trabajo de cada uno de los la rotarios.

5.6.5 Condiciones de operación

Las condiciones de operación (flujos rampas de temperatura del horno, temperatura del inyector, detector, volumen de inyección, entre otros varían d acuerdo a la columna e instrumentos utilizados y deben ser optimizados por cada laboratorio los cuales son determinados por medio del material de referencia certificado o con la(s) solución(es) patrón(es).

Los parámetros deberán ser ajustados para obtener la resolución ≥ 1 de cada uno de los componentes a cuantificar median el software del equipo o alguna de las siguientes ecuaciones:

$$R = \frac{2(T_{R(b)} - T_{R(a)})}{W_{(B)b} + W_{(B)a}} \quad R = \frac{\left(\frac{2.35}{2}\right)(T_{R(b)} - T_{R(a)})}{W_{(50)a} + W_{(50)b}}$$

En donde:

R = Resolución.
 $T_{R(a)}$ Tiempo de retención del pico del componente a evaluar
 $T_{R(b)}$ Tiempo de retención del pico próximo al componente a evaluar
 $W_{(B)b}, W_{(B)a}$ Ancho de los picos a la base del componente a evaluar y el próximo a este.
 $W_{(50)a}, W_{(50)b}$ Ancho del pico medido al 50 % de su altura.

Con el objeto de obtener cromatogramas confiables debe tomarse en cuenta las siguientes precauciones:

- Acondicionamiento de la columna.
- Limpieza del inyector, detector y columna.
- Detección de fugas del sistema.

Inyectar al cromatógrafo la cantidad de muestra apropiada. La cantidad sugerida de inyección es de 1 a 2 μ l.

5.6.6 Preparación de la muestra

A las muestras que requieran reportarse en mg/100 ml de alcohol anhidro (AA) se les debe determinar el contenido alcohólico en % Alc. Vol., a 293K (20°C) de acuerdo a la NMX-V-013-NORMEX vigente.

~~Para tener resultados confiables es conveniente preparar las muestras a volúmenes exactos (en matraces volumétricos) y a temperatura de 293 K (20°C) + 5 con pipeta volumétrica o micropipeta adicionar la misma concentración de la solución del estándar interno que fue agregado a las diluciones de calibración, tomando en cuenta que en el cromatograma el pico del estándar interno no deber saturar la escala. The ethanol contained in the analyzed alcoholic product is used as an internal standard.~~

5.6.7 Curva de calibración

Se requiere mínimo cinco niveles para la elaboración de la curva de calibración e inyectar mínimo por duplicado cada nivel para obtener los cromatogramas respectivos y con estos realizar la curva de calibración en el equipo.

5.6.8 Análisis de la muestra

Inyectar al cromatógrafo la cantidad adecuada de muestra para obtener el cromatograma correspondiente

5.7 Cálculos y resultados

5.7.1 Expresión de resultados

Los resultados se deben expresar en mg de aldehídos, ésteres, alcoholes superiores y metanol referidos a 100 ml de alcohol anhidro (mg/100 ml AA) utilizando al menos una cifra decimal. En caso de ser necesario se puede expresar en otras unidades realizando la conversión correspondiente.

Los alcoholes isoamílico y amílico activo pueden expresarse por separado o como la suma de estos.

5.7.2 Cálculo de relación de concentraciones y de áreas, en la curva de calibración y de la muestra.

Cuando el equipo cuenta con software, este realiza los cálculos en forma automática, basándose en el modelo matemático de regresión lineal:

$$y = mx + b$$

En donde:

Relación de área del compuesto a cuantificar entre el área del estándar interno $\left(\frac{A_c}{A_{ei}}\right)$

X= relación de la concentración del analito entre la concentración del estándar interno en mg/ 100ml m

m= pendiente(Factor de respuesta relativo)

b = intercepto en el origen de la ordenada “y”.

Sustituyendo variables

$$\left(\frac{Ac}{Aei}\right) = m \left(\frac{Cc}{Cei}\right) + b$$

Despejando para obtener la concentración del

compuesto Cc en m 100 ml:

$$(1) \text{ Response factor} = \frac{\text{Peak area of ethanol}}{\text{Peak area of congener}} \times \frac{\text{Concentration of congener (g/100 L of anhydrous ethanol)}}{\text{Concentration of ethanol (78927 g/100 L)}}$$

Congener concentrations, **(g/100 L)=**

$$\frac{\text{Peak area of congener}}{\text{Peak area of ethanol}} \times \text{Concentration of ethanol (78927 g/100 L)} \times \text{RF}$$

Considerando el Factor de dilución el contenido alcohólico de la muestra a concentración del compuesto expresado en mg/100 ml/AA se o tiene con la siguiente formula:

$$\text{concentracion en } \frac{\text{mg}}{100 \text{ ml A. A.}} = CC * FD * 100\% \text{ Alc. Vol.}$$

En donde

FD = Factor de dilución en la preparación de la muestra con el estándar interno. (Volumen total del matraz volumétrico/ Volumen de muestra empleada en la preparación)

% Alc. Vol. = Contenido alcohólico de la muestra en % alcohol en volumen a 293 K (C).

Nota: En caso de realizar réplicas de cada uno de los niveles de la curva, se puede promediar las áreas para calcular los factores de respuesta.

La curva de calibración se considera valida si el coeficiente de correlación (r) es mayor o igual a 0.99 Los cálculos anteriores pueden hacerse utilizando altura de pico en lugar de áreas.

5.8 Repetibilidad y reproducibilidad

5.8.1 Repetibilidad

5.8.1.1 La repetibilidad de los resultados de las mediciones con este método.

- Para valores de hasta 10 mg/100 ml A.A., no debe exceder de 12 %.
- Para valores mayores de 10 hasta 250 mg/100 ml A.A., no debe exceder de 5 %.
- Para valores mayores a 250 mg/100 ml A.A., no debe exceder de 3 %.

5.8.2 Reproducibilidad

5.8.2.1 La reproducibilidad de los resultados de las mediciones con este método.

- Para valores de hasta 10 mg/100 ml A.A., no debe exceder de 25 %.
- Para valores mayores de 10 hasta 250 mg/100 ml A.A., no debe exceder de 15 %.
- Para valores mayores a 250 mg/100 ml A.A., no debe exceder de 7 %.