

P R E F A C I O

La Sociedad Mexicana de Normalización y Certificación, S.C., es un Organismo Nacional de Normalización y Certificación, establecido el 3 de diciembre de 1993, en términos del Artículo 4 de los Estatutos del Acta Constitutiva de la Sociedad, con fundamento en los Artículos 3 fracción I, 65 y 66 de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; y conforme con las Directrices y Procedimientos para la Acreditación de Organismos Nacionales de Normalización, la Sociedad Mexicana de Normalización y Certificación, S.C., fue acreditada como Organismo Nacional de Normalización para elaborar y expedir Normas Mexicanas (acreditamiento No. 0001), el 8 de diciembre de 1993, por la SECOFI, actualmente Secretaría de Economía-Dirección General de Normas.

La Sociedad Mexicana de Normalización y Certificación, S.C., recibió la extensión de acreditamiento para elaborar y expedir Normas Mexicanas en el campo de la industria de Bebidas Alcohólicas (acreditamiento No. 0001/A), el 9 de octubre de 1995.

Con fundamento en el Artículo 51 – A, Fracción III de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, y en el Artículo 43 del Reglamento de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, se publicó, en el Diario Oficial de la Federación, del día ___ de _____ de _____, el aviso de consulta pública del proyecto de norma.

Con base en el Artículo 34 Fracción XIII y XXX de la Ley Orgánica de la Administración, los Artículos 51-A y 66 Fracciones II y V de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; el Artículo 24, Fracciones I y XV del Reglamento Interior de la Secretaría de Economía ; y por conducto de la Dirección General de Normas, se publicó y expidió, en el Diario Oficial de la Federación, del día _____ de _____ del _____, la declaratoria de vigencia como Norma Mexicana.

El presente Proyecto de Norma Mexicana, fue elaborado, por el Subcomité de Producto del Comité Técnico de Normalización Nacional para Bebidas Alcohólicas NBAL-02, coordinado por Bacardí y Compañía, S.A. de C.V. y el Laboratorio de Espectrometría de Masas de Isótopos Estables del Instituto de Geología de la UNAM; con la colaboración de las siguientes instituciones y empresas :

Miembros activos

Este proyecto de norma mexicana cumple con las directrices de los procedimientos para la elaboración y actualización de normas (NOR-03/01); la edición de documentos de normalización - anteproyectos, proyectos y normas mexicanas NORMEX (NOR-03/02); la aprobación por consenso del Comité Técnico de Normalización Nacional para Bebidas Alcohólicas (NBAL-02) y la conformidad de la Sociedad Mexicana de Normalización y Certificación, S.C.

El presente proyecto de Norma Mexicana, está bajo la jurisdicción del Comité Técnico de Normalización Nacional para Bebidas Alcohólicas NBAL-02 y la Sociedad Mexicana de Normalización y Certificación, S.C. (NORMEX). Con base en el Artículo 51 de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización y al Artículo 48 del Reglamento de la misma Ley, deberá revisarse o actualizarse esta Norma, dentro de los 5 años siguientes a la publicación de la declaratoria de vigencia. Los comentarios que puedan surgir deberán ser enviados a la sede del Comité Técnico, Dirección de Normalización de NORMEX, Alfredo B. Nobel 21, Centro Industrial Puente de Vigas, Tlalnepantla de Baz, C.P. 54070, Estado de México, teléfono 5390 4152, fax 5565 8601, correo electrónico normas@normex.com.mx

INDICE

0. INTRODUCCIÓN	4
1. OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACIÓN	4
2. REFERENCIAS.....	4
3 UNIDADES, ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	5
4. DEFINICIONES.....	5
5. EQUIPOS.....	7
6. REACTIVOS Y MATERIALES.....	8
7. DETERMINACIÓN DE $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ EN ETANOL Y MATERIA ORGÁNICA.....	9
8. DETERMINACIÓN DE $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ EN EL CO_2 CONTENIDO EN LA INTERFASE GASEOSA DE VINOS ESPUMOSOS.....	14
9. DETERMINACIÓN DE $\delta^{18}\text{O}_{\text{VSMOW}}$ EN AGUA DE LOS VINOS	15
10. BIBLIOGRAFIA	17
11. CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES	18

**BEBIDAS ALCOHOLICAS- DETERMINACIÓN DE ADICION DE ALCOHOLES O AZUCARES PROVENIENTES DE CAÑA, SORGO O MAIZ A BEBIDAS ALCOHOLICAS PROVENIENTES DE UVA, MANZANA O PERA MEDIANTE LA RELACION ISOTÓPICA DE CARBONO 13 ($\delta^{13}C_{VPDB}$).
DETERMINACIÓN DEL ORIGEN DE CO₂ EN BEBIDAS ALCOHOLICAS GASEOSAS MEDIANTE LA RELACION ISOTÓPICA DE CARBONO 13 ($\delta^{13}C_{VPDB}$).
DETERMINACIÓN DE ADICION DE AGUA EN LOS VINOS MEDIANTE LA RELACION ISOTÓPICA DEL OXIGENO 18 ($\delta^{18}O_{VSMOW}$).
POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ISÓTOPOS ESTABLES - MÉTODOS DE PRUEBA.**

*ALCOHOLIC BEVERAGES - DETERMINATION OF THE ADDITION OF ALCOHOLS OR SUGARS FROM CANE, SORGHUM OR CORN IN ALCOHOLIC BEVERAGES FROM GRAPES, APPLE OR PEAR BY CARBON ISOTOPE RATIO ($\delta^{13}C_{VPDB}$)
DETERMINATION OF THE ORIGIN OF THE CO₂ IN SPARKLING ALCOHOLIC BEVERAGES BY CARBON 13 ISOTOPIC RATIOS ($\delta^{13}C_{VPDB}$).
DETECTION OF WATER ADDITION IN WINES BY OXIGEN 18 ISOTOPIC RATIO ($\delta^{18}O_{VSMOW}$).
BY ISOTOPE RATIO MASS SPECTROMETRY. TEST METHODS.*

0.0 INTRODUCCION

La determinación de la adición de alcoholes ó azúcares provenientes de caña, maíz ó sorgo en bebidas alcohólicas provenientes de uva, manzana y/o pera es fundamental para determinar la autenticidad de las mismas. Así mismo, la determinación del origen del CO₂ en bebidas alcohólicas gaseosas es importante para conocer el proceso de gasificación de los vinos. Y para el caso de los vinos, determinar la adición de agua, es indicativa de procesos no autorizados durante su elaboración.

1.0 OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACION.

1.1 Esta Norma Mexicana establece los métodos de prueba para:

a) Determinar el origen de los alcoholes contenidos en los aguardientes de uva, brandies, vinos, vinos espumosos, productos vinícolas y sidras mediante la relación isotópica de carbono 13 ($\delta^{13}C_{VPDB}$) por espectrometría de masas de isótopos estables.

b) Determinar el origen del CO₂ en vinos espumosos y bebidas alcohólicas gaseosas mediante las relaciones isotópicas de $\delta^{13}C_{VPDB}$ y $\delta^{18}O_{VPDB}$ del CO₂ contenido en la interfase gaseosa dentro de la botella antes de abrir.

c) Identificación del origen del agua contenida en los vinos mediante la determinación de $\delta^{18}O_{VSMOW}$.

1.2 Esta Norma Mexicana es aplicable a:

a) La detección de alcoholes derivados de la caña de azúcar, maíz o sorgo mezclados con, aguardientes de uva, brandies, vinos, vinos espumosos, sidras u otras bebidas alcohólicas que provengan de la uva, manzana y/o pera siempre y cuando contengan al menos 20% de alcohol proveniente de uva, manzana y/o pera del alcohol total contenido.

b) Detección del origen del CO₂ en los vinos espumosos realizados por el método clásico (Champenoise) o Granvás (Charmat).

c) Detección de adición de agua de origen exógeno a los vinos.

Nota: Esta norma no aplica para la detección de adición de azúcar de remolacha.

2.0 REFERENCIAS

Esta norma se complementa con las siguientes Normas Oficiales Mexicanas y Normas Mexicanas vigentes.

2.1 NOM-008-SCFI-1993. Sistema General de Unidades de Medida.

2.2 Proyecto de Norma Mexicana del Procedimiento de NORMEX. Bebidas Alcohólicas – brandy - Especificaciones.

2.3 Ante Proyecto de Norma Mexicana del Procedimiento NORMEX - Bebidas Alcohólicas - vinos- especificaciones.

2.4 Ante Proyecto de Norma Mexicana del Procedimiento NORMEX - Bebidas Alcohólicas - Vinos Generosos - Especificaciones.

2.5 NMX-V-047-NORMEX-2000. Bebidas Alcohólicas – Vino Espumoso y Vino Gasificado - Especificaciones.

2.6 NMX-V-011-NORMEX-2000. Bebidas Alcohólicas – Sidra Natural - Sidra – Sidra Gasificada – Especificaciones.

2.7 NOM-142- SSA1 – 1995. Bienes y servicios. Bebidas alcohólicas. Especificaciones sanitarias. Etiquetado sanitario y comercial.

2.8 NMX-V-013-NORMEX – Bebidas alcohólicas destiladas - Determinación del por ciento de alcohol en volumen a 293 K (20°C) (% Alc. Vol.) – Método de Prueba.

2.9 NMX-V-046-1999-NORMEX. Bebidas Alcohólicas - Denominación, Clasificación, Definiciones y Terminología.

3.0 UNIDADES, ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

¹³ C	Número total de átomos de carbono 13
¹² C	Número total de átomos de carbono 12
δ ¹³ C	Delta de carbono 13
VPDB	Vienna Pee dee Beelemnite
¹⁶ O	Número total de átomos de oxígeno 16
¹⁸ O	Número total de átomos de oxígeno 18
δ ¹⁸ O	Delta de oxígeno 18
VSMOW	Vienna Standard Mean Ocean Water
SLAP	Standard Light Antarctic Precipitation
GISP	Greenland Ice Sheet Precipitation
‰	Partes por mil
%	Partes por ciento
% Alc. Vol.	Por ciento de alcohol en volumen

CO ₂	Bióxido de carbono
CuO	Oxido cúprico
Ag°	Plata metálica
Cu°	Cobre metálico
N ₂	Nitrógeno molecular
g	gramos
mg	miligramos
µg	microgramos
L	litros
mL	mililitros
µL	microlitros
mm	milímetros
cm	centímetro
m ³	metro cúbico
mol	mol
nmol	nanomol
rpm	revoluciones por minuto
h	hora
min	minuto
seg	segundo
°C	grados Celsius
K	grados Kelvin
Pa	Pascal
kPa	kilo Pascal
mbar	milibar
A	Ampere
mA	mili Ampere
nA	nano Ampere
kV	kilo Volt
eV	electrón Volt
uma	unidad de masa atómica
σ	desviación estándar
ρ	número de gramos átomo de O en H ₂ O/número de gramos átomo de O del CO ₂
α	factor de fraccionamiento (¹⁸ O/ ¹⁶ O _(CO2))/(¹⁸ O/ ¹⁶ O _(H2O))
ppm	partes por millón

4.0 DEFINICIONES

4.1 Repetibilidad (de los resultados de mediciones)

Proximidad de la concordancia entre los resultados de las mediciones sucesivas del mismo mesurando, con las mediciones realizadas con la aplicación de la totalidad de las siguientes condiciones:

Notas:

1. A estas condiciones se les llama condiciones de repetibilidad.
- 2 Las condiciones de repetibilidad comprenden: el mismo procedimiento de medición;

el mismo observador;
el mismo instrumento de medición utilizado en las mismas condiciones;
el mismo lugar;
La repetición dentro de un período corto de tiempo.
3. La repetibilidad se puede expresar cuantitativamente con la ayuda de las características de la dispersión de los resultados.

4.2 Reproducibilidad (de los resultados de las mediciones)

Proximidad de la concordancia entre los resultados de las mediciones del mismo mesurando, con las mediciones realizadas haciendo variar las condiciones de medición:

Notas:

1. Para que la expresión de la reproducibilidad sea válida, es necesario especificar las condiciones que se hacen variar.

Las condiciones que se hacen variar pueden ser:

- El principio de medición;
- El método de medición;
- El observador;
- El Instrumento de medición;
- El patrón de referencia;
- El lugar;
- Las condiciones de uso;
- El tiempo.

2. La reproducibilidad puede ser expresada cuantitativamente con la ayuda de las características de la dispersión de los resultados.

3. Los resultados considerados aquí son, habitualmente, los resultados corregidos.

4.3 Mesurando

Magnitud particular sujeta a medición.

4.4 Método de Medición

Secuencia lógica de las operaciones, descritas de manera genérica, utilizada en la ejecución de las mediciones.

4.5 Sensibilidad

Cociente del incremento de la respuesta de un instrumento de medición entre el incremento correspondiente de la señal de entrada.

4.6 Resolución

La mínima diferencia de indicación de un dispositivo indicador, que puede ser percibida de manera significativa.

4.7 Patrón

Medida materializada, instrumento de medición, material de referencia o sistema de medición destinado a definir, realizar, conservar o reproducir una unidad o uno o varios valores de una magnitud para servir de referencia.

4.8 Calibración

Conjunto de operaciones que establecen, en condiciones especificadas, la relación entre los valores de las magnitudes indicadas por un instrumento de medición o un sistema de medición, o los valores representados por una medida materializada o un material de referencia, y los valores correspondientes de la magnitud realizada por los patrones.

4.9 Material de Referencia (MR)

Material o sustancia cuyo(s) valor(es) de la(s) propiedad(es) es (son) suficientemente homogénea(s) y bien definida(s) para permitir su uso para la calibración de un instrumento, la evaluación de un método o la atribución de valores a los materiales.

4.10 Material de Referencia Certificado (MRC)

Material de referencia, acompañado de un certificado cuyo(s) valor(es) de la(s) propiedad(es) es (son) certificado(s) por un procedimiento que establece su trazabilidad a una realización exacta de la unidad en la cual los valores de propiedad son expresados y para la cual cada valor certificado está acompañado de una incertidumbre con un nivel de confianza indicado.

4.11 Trazabilidad

Propiedad del resultado de una medición o del valor de un patrón, tal que esta pueda ser relacionada con referencias determinadas, generalmente patrones nacionales o internacionales, por medio de una cadena ininterrumpida de comparaciones teniendo todas incertidumbres determinadas.

4.12 Incertidumbre

Parámetro asociado al resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que

N.E. 001

podrían razonablemente, ser atribuidos al mesurando.

4.13 Isótopo

Son los átomos cuyos núcleos tienen igual número de protones y electrones, pero diferente número de neutrones. Sus propiedades químicas son casi iguales pero no así sus propiedades físicas ya que difieren en su masa atómica.

4.14 Espectrómetro de masas.

Un espectrómetro de masas es un instrumento diseñado para separar moléculas de acuerdo a su relación carga-masa mediante campos eléctricos y/o magnéticos.

4.15 Metrología Isotópica.

$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ y $\delta^{18}\text{O}_{\text{VPDB}}$

La unidad de reporte $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ es la forma para expresar las relaciones isotópicas de carbono $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$. La unidad de reporte $\delta^{18}\text{O}_{\text{VPDB}}$ es la forma para expresar las relaciones isotópicas de $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ del CO_2 , ambas obtenidas mediante Espectrometría de Masas de Isótopos Estables.

Estas relaciones isotópicas se determinan simultáneamente comparando una muestra de CO_2 con respecto a las relaciones isotópicas de carbono $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ y oxígeno $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ de un CO_2 proveniente de una reacción ácida con el patrón internacional PDB (Pee Dee Belemnite Limestone) el cual es un carbonato de origen marino de la formación cretácica Peedee en Carolina del Sur (Craig, 1957).

La unidad de reporte $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ se calcula de acuerdo a la siguiente expresión:

$$\delta^{13}\text{C} = \left[\frac{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{Muestra}}}{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{VPDB}}} - 1 \right] \cdot 10^3$$

La unidad de reporte $\delta^{18}\text{O}_{\text{VPDB}}$ se calcula de acuerdo a la siguiente expresión:

$$\delta^{18}\text{O} = \left[\frac{(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})_{\text{Muestra}}}{(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})_{\text{VPDB}}} - 1 \right] \cdot 10^3$$

Donde:

$\delta^{13}\text{C}$ está expresada por los cocientes de los isótopos estables ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) de la muestra contra el patrón internacional VPDB y de manera similar la $\delta^{18}\text{O}$ está expresada por los cocientes de los isótopos estables ($^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$) de la muestra contra el patrón internacional VPDB. Morales (1970) introdujo el uso de triple colector, y Mook, W.G. y Grootes P.M. (1973) corrigió los valores absolutos de PDB con otros patrones (NBS-19). Los valores que se utilizan en los programas de operación de los espectrómetros de masas de isótopos estables con triple colector para las masas 44, 45 y 46 del CO_2 , son: $[^{13}\text{C}/^{12}\text{C}]_{\text{PDB}} = 0,0112372$, $[^{17}\text{O}/^{16}\text{O}]_{\text{PDB}} = 0,000380$, $[^{18}\text{O}/^{16}\text{O}]_{\text{PDB}} = 0,0020790$

En agosto 1995, la Comisión en Pesos Atómicos y Abundancias Isotópicas de la International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) recomendó que los resultados isotópicos deben expresarse en escalas definidas en términos de la existencia de materiales de referencia de distribución internacional. Por lo cual el valor de la relación $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ($\delta^{13}\text{C}$) y $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ($\delta^{18}\text{O}$) de carbonatos puede expresarse en partes por mil ‰, relativos a VPDB (Vienna Pee Dee Belemnite) asignando el valor de $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}} = +1,95$ ‰ y $\delta^{18}\text{O}_{\text{VPDB}} = -2,20$ ‰ al RM8544 NBS-19 (calcita), ya que se agotó el material de referencia PDB.

Así mismo, se recomendó el uso en forma continua de un gas CO_2 de pureza 99,995 % como patrón de trabajo para uso interno en el laboratorio. El cual deberá de ser calibrado para carbono y oxígeno, usando la escala VPDB. Para efectos de calibración se recomiendan otros materiales de referencia como lo son: RM 8543 (NBS-18), RM 8544 T.S. (NBS-19). Ambos materiales de referencia son distribuidos internacionalmente por el National Institute of Standards and Technology (NIST) y la International Atomic Energy Agency (IAEA). El espectrómetro de masas de isótopos estables reporta los resultados de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{18}\text{O}$ contra el patrón internacional VPDB.

5.0 EQUIPOS

5.1 Espectrómetro de Masas de Isótopos Estables

Para medir la $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{18}\text{O}$ se utilizan espectrómetros de masas tipo Finnigan Mat 250, 251, 252, 253, Delta Plus, Delta Plus XL, Micromass Optima, IsoPrime, todos ellos con triple colector con caja de Faraday para la determinación simultánea de las masas 44, 45 y 46 del CO_2 .

- Durante la operación del espectrómetro, las mesetas de los picos para colector universal CNOS deben tener una resolución mínima $m/\Delta m = 95$ (definición 10% valle). Diferencia de potencial para la aceleración de iones de 10 kV.
- Presión de trabajo de 1×10^{-5} Pa (1×10^{-3} mbar) y 1×10^{-10} Pa (1×10^{-8} mbar) en el sistema de introducción de muestras y en el tubo de vuelo respectivamente.
- Corriente de filamento de 4,5 A o la necesaria para emitir 1 mA de electrones con una energía de 100 eV para la ionización de las moléculas.
- Fuente de aceleración con un potencial de 3000 V para todas las masas de 28 a 70 uma
- Sistema de doble introducción automática de gases con fuelles de volumen variable. La relación de compresión de los fuelles de volumen variable para el patrón de trabajo y la muestra es de 12:1 o mayor con idéntico flujo tanto el patrón como la muestra desde sus respectivos reservorios.
- La precisión interna en las determinaciones de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{18}\text{O}$ deberá ser de 0,01 ‰. La precisión externa de 0,05 ‰.
- La linealidad debe ser $< 0,02$ ‰/nA de corriente de iones para el haz de la masa 44.
- Sensibilidad. $> 0,2$ A/mbar con respecto a la presión en el analizador. Sensibilidad en abundancia 2×10^{-5} para las masas 44-45

5.2 Mufia.

La combustión de la materia orgánica en tubo de cuarzo sellado se realiza en una mufia que puede operar a una temperatura máxima de 1100°C equipada con control digital de temperatura con un error no mayor de $\pm 5^\circ\text{C}$ y un control de tiempo con una resolución de 1 min.

5.3 Línea de Vacío

Empleada durante el proceso de desgasificación para la preparación de muestras orgánicas, (ver figura 3). Equipada con dos bombas de vacío con una capacidad de bombeo de $4 \text{ m}^3/\text{h}$ y una bomba difusora con trampa para nitrógeno líquido con una velocidad de bombeo de 100 L/seg.

5.4 Línea de vacío

Para la purificación criogénica del CO_2 obtenido de la combustión de las muestras, (ver figura 4). Equipada con dos bombas de vacío con una capacidad de bombeo de $4 \text{ m}^3/\text{h}$ y una bomba difusora con trampa para nitrógeno líquido con una velocidad de bombeo de 100 L/seg.

5.5 Balanza analítica

Para un peso máximo de 200 g con una precisión de 0,1 mg.

5.6 Horno de secado.

Que mantenga una temperatura entre $40 - 70^\circ\text{C}$

5.7 Línea de vacío.

La preparación y purificación de las muestras de agua se realiza en la línea de preparación mostrada en la figura 5. que es una línea vertical de extracción múltiple con capacidad de purificar 5 muestras a la vez, equipada con dos bombas de vacío con una capacidad de bombeo de $4 \text{ m}^3/\text{h}$ y una bomba difusora con trampa para nitrógeno líquido con una velocidad de bombeo de 100 L/seg.

5.8 Baño de agua con control de temperatura.

Capaz de mantener $25^\circ\text{C} \pm 0,1^\circ\text{C}$, requerido para realizar la reacción de intercambio isotópico entre el agua del vino y CO_2 , ya que el factor de fraccionamiento entre el oxígeno del agua y el oxígeno del CO_2 depende fuertemente de la temperatura. Para el caso de técnicas de flujo continuo se utiliza un termoblock para mantener la temperatura.

5.9 Mantilla eléctrica alimentada a través de un controlador de potencia.

Para efectuar las destilaciones.

5.10 Microbalanza

Para un peso máximo de 5g con precisión 1 μg . Para el caso que se utilice el método de flujo continuo utilizando un analizador elemental con combustión tipo Dumas.

6.0 REACTIVOS Y MATERIALES

6.1 Óxido Cúprico (CuO) en alambre. Pasar el CuO por una malla del No. 40 para retirar el polvo y quemar el CuO en una mufia a 850°C durante tres horas.

6.2 Plata (Ag^0) 99,9994% de pureza. Laminar la plata con un grosor entre 0,1 y 0,4 mm, cortar en secciones de 1 mm de ancho por 7 mm de largo,

N.E. 001

limpiar la plata con una solución de ácido nítrico al 30%, lavar con agua destilada y calentar en una mufla a 400°C durante una hora. La plata se usa como catalizador en el tubo de combustión.

6.3 Cobre metálico activado (Cu⁰) (granalla). (Alpha Resources Inc. P.O. BOX 199 Stevensville, Michigan 49127, U.S.A).

6.4 Tanque de CO₂, de 99,995% mínimo de pureza, contenido en un tanque metálico a una presión máxima de 6300 KPa a 294K (21°C) con un regulador de dos pasos con una presión de entrega máxima de 10 Pa y un flujo de 1L/min, para ser utilizado como patrón de trabajo en el espectrómetro de masas de relaciones isotópicas así como para la reacción de intercambio isotópico del agua del vino en la determinación de $\delta^{18}\text{O}$.

6.5 Hielo seco.

6.6 Etanol Reactivo analítico

6.7 Acetona. Reactivo analítico

6.8 Mezcla frigorífica (Hielo seco con etanol o acetona, -80°C)

6.9 Nitrógeno líquido (-190°C).

6.10 Pinzas de punta y espátula de acero inoxidable para el manejo de muestras.

6.11 Secadora de aire caliente tipo industrial con capacidad de alcanzar 500°C con ventilador tipo jaula de ardilla de 1500 rpm.

6.12 Gatos mecánicos de laboratorio de diferentes tamaños.

6.13 Generador tesla para detección de fugas en sistemas al vacío de vidrio.

6.14 Tubo de cuarzo de 9 mm de diámetro externo, 7 mm de diámetro interno y 20 cm de largo, sellado por un lado con soplete, el cual se utiliza como tubo de combustión.

6.15 Tubo de cuarzo de 6 mm de diámetro externo, 4 mm de diámetro interno y aproximadamente 2 cm de largo, sellado por un lado con soplete, el cual se utiliza para mantener separado el óxido cúprico del cobre metálico y como contenedor para muestras orgánicas sólidas.

6.16 Tubo de cuarzo de 3,2 mm de diámetro externo, 2 mm de diámetro interno y aproximadamente 2 cm de largo terminado en punta para ser utilizado como tubo capilar como contenedor de muestras orgánicas líquidas.

6.17 Tubo de cuarzo de 3,2 mm de diámetro externo, 2 mm de diámetro interno y aproximadamente 2 cm de largo se coloca un filamento de plata de 1mm x 7mm de largo y se sella por ambos lados dejando un pequeño orificio para sostener el filamento de plata.

6.18 Calentar todo el material de cuarzo en una mufla a 650°C durante 1 hora para eliminar cualquier partícula de materia orgánica, guardar en

recipientes limpios en un horno con una temperatura de 40-60°C.

6.19 Frascos contenedores de pyrex con válvula para alto vacío con pistón de teflón o de vidrio tipo Lowers o Kontes. Estos frascos se utilizan para transportar el CO₂ de la línea de preparación de muestras al sistema de introducción del espectrómetro de masas de relaciones isotópicas.

6.20 Termos de diferentes tamaños (1, 1/2 y 1/4 L) para nitrógeno líquido.

6.21 Termo de 50 L de acero inoxidable para guardar nitrógeno líquido.

6.22 Un soplete (antorcha) de gas - oxígeno capaz de alcanzar la temperatura de fusión del cuarzo.

6.23 Uniones de Swagelok cajon (ultra torr de 3/8 No. SS-6-UT-6 y filtro para gases SS4VCR25M)

6.24 Uniones de Swagelok cajon (ultra torr de 3/8 No. SS-6-UT-6 con septum).

6.25 Sistema para romper el tubo de cuarzo que contiene el gas CO₂ proveniente de la muestra. Descrito en el artículo (DesMaris y Hayes 1976).

6.26 Microjeringas de volumen variable de 0 a 10 μl y de 0 a 50 μl con puntas de plástico desechables.

6.27 Jeringa para gas con seguro de 50 ml.

6.28 Pipetas volumétricas de 2 ml.

6.29 Propipetas.

6.30 Matraz de bola de 40 ml con válvula de paso para alto vacío.

6.31 Grasa de vacío tipo apiezon N.

Para métodos analíticos de determinación isotópica de $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ que utilizan flujo continuo se utiliza el siguiente material.

6.32 Tanque de Helio 99.999% de pureza.

6.33 Tanque de CO₂, de 99.995% mínimo de pureza.

6.34 Tanque de Oxígeno 99.996% de pureza

6.35 Para el cromatógrafo de gases acoplado al espectrómetro se recomienda utilizar una columna para sistema capilar PLOT, fase estacionaria PoraPLOT Q ó similar de 25 m de longitud X 0,32 mm de diámetro externo.

En el caso de emplear un analizador elemental acoplado al espectrómetro se requiere:

6.36 Cápsulas de estaño.

6.37 Pinzas para cerrar las cápsulas.

7.0 DETERMINACIÓN DE $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ EN ETANOL Y MATERIA ORGÁNICA.

7.1 Descripción del método.

La $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ se determina en un Espectrómetro de Masas de Isótopos Estables utilizando CO_2 separado criogénicamente del producto de la combustión cuantitativa de la muestra a alta temperatura. Los resultados se reportan como $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ expresado en ‰ (partes por mil).

En la literatura internacional se reportan tres métodos de combustión. El más reciente utiliza el espectrómetro de masas de isótopos estables conectado de tal manera que se establece un flujo continuo a través de un sistema compuesto de cromatógrafo de gases – horno de combustión – columna de separación – y el espectrómetro de masas de isótopos estables, (Hener. U et al 1998).

Otro método utiliza un espectrómetro de masas de isótopos estables usando flujo continuo a través de un sistema compuesto por analizador elemental - y espectrómetro de masas de isótopos estables, (Resolución C-20 de la República Argentina, Avant Projet de Resolution OENO/SCMA/ 00/177/Et.4)

Un tercer método, el cual se describirá posteriormente permite la combustión total de la muestra en presencia de óxido cúprico como oxidante, plata como catalizador y cobre metálico como reductor de los óxidos de nitrógeno, estos reactivos contenidos en un tubo de cuarzo sellado al vacío son calentados a 900°C durante dos horas seguido por una estancia de una hora a 650°C . El CO_2 obtenido de la reacción de oxidación de la muestra es purificado mediante un proceso de separación criogénica.

Para realizar el análisis isotópico, se toma una alícuota del CO_2 preparado de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 7.3 y se lleva al espectrómetro de masas de isótopos estables. Cienfuegos, Casar y Morales, 1997, basado en el método de Zvi Sofer 1980.

No se recomienda el método de combustión en tubo de pyrex sellado a 550°C .

7.2 Descripción de los diferentes orígenes de las plantas.

Todos los compuestos orgánicos que forman a los seres vivos contienen al elemento químico carbono.

En la naturaleza existen dos átomos de carbono estables cuya única diferencia entre ellos es su masa atómica, todas las demás propiedades químicas en su mayoría son idénticas. A estos átomos con estas propiedades se les conoce con el nombre de isótopos y se representan como carbono 13 (^{13}C) y carbono 12 (^{12}C).

La proporción de ambos isótopos estables ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) para el caso de los alcoholes es típica de su origen o de su procedencia y en mucho menor escala de los posteriores procesos que sufren. En general la proporción isotópica del carbono de origen, se mantiene, lo cual nos permite identificar la fuente.

La base del método consiste en relacionar la proporción de isótopos estables expresada en unidades delta de un producto determinado con el correspondiente ciclo fotosintético de la planta origen de la materia prima.

Las plantas se clasifican dependiendo del proceso fotosintético para fijar el CO_2 atmosférico en dos grandes grupos. Plantas tipo C_3 que utilizan el ciclo de Calvin, plantas tipo C_4 siguen el ciclo de Hatch Slack.

El ciclo de Calvin es empleado por plantas tipo C_3 , a este ciclo pertenecen los frutales como manzana, pera y uva.

El ciclo de Hatch Slack es empleado por plantas C_4 , a este ciclo pertenecen plantas como: caña de azúcar, sorgo y maíz. De este tipo de plantas se derivan alcoholes hechos por el hombre a partir de la fermentación de melazas provenientes del azúcar de caña, maíz, jarabe de maíz con alto contenido de fructosa.

Entre los grupos de plantas C_3 y C_4 existe una diferencia considerable en la proporción de isótopos estables ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) contenidos en las plantas. Por lo tanto midiendo la proporción isotópica expresada en unidades de $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ en aguardientes de uva, brandies, vinos, sidras y bebidas alcohólicas que contengan uva, manzana y/o pera, es posible reconocer el proceso fotosintético de este grupo de plantas que les dieron origen.

7.3 Procedimiento para la determinación de $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ en materia orgánica en tubo de cuarzo.

7.3.1 Preparación y Acondicionamiento del Material y de la Muestra.

N.E. 001

Las muestras de aguardiente añejado, brandy, vino, vino espumoso o cualquier otra bebida alcohólica que se quiera someter a este análisis isotópico, deberán estar previamente destiladas con el objeto de separar la posible contribución de $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ del azúcar de caña que se utiliza como colorante, edulcorante o cualquier otro aditivo del aguardiente y elevar el % Alc. Vol. del etanol.

7.3.1.1. Extracción del etanol

El método para extraer el etanol es mediante una destilación fraccionada, porque es el método más eficiente de separación para líquidos con puntos de ebullición cercanos, que siguen curvas de temperatura-composición de sistemas no ideales como es el caso de mezclas etanol-agua. Para obtener un alta pureza de etanol depende del poder de separación de la columna y del reflujo, el principal objetivo de la columna es que alcance el máximo contacto entre el vapor que sube y el líquido descendente de tal forma que los vapores más volátiles se muevan al receptor mientras regresan los menos volátiles al matraz de ebullición, la cantidad de líquido descendente es el reflujo.

No se requiere destilar previamente cuando se trate de muestras provenientes de destilados puros generados en columnas industriales, siempre y cuando contengan al menos un 38% Alc. Vol.

Las precauciones que se deben tomar para realizar la destilación son las siguientes:

- Todo el material que se utilice debe estar limpio, libre de material orgánico.
- El material de vidrio debe tener juntas esmeriladas, no se deben utilizar tapones de corcho ó cualquier elastómero en ninguna parte. Si se pueden usar materiales de teflón.
- La mantilla que se utilice para calentar debe estar alimentada a través de un controlador de potencia.
- Se puede utilizar cualquier columna de destilación por ejemplo, columna vigreux, columna de platos, columna con relleno, etc
- Enfriar las muestras aproximadamente hasta los 0°C antes de abrir las botellas para evitar la pérdida de etanol por evaporación.

Un aparato para realizar una destilación fraccionada consiste en:

- Mantilla para calentar el matraz alimentada a través de un controlador de potencia.
- Matraz bola de 1L con una junta hembra esmerilada 24/40.
- 1 Columna de destilación con junta esmerilada 24/40.
- 1 Condensador con junta esmerilada 24/40
- 1 Termómetro (de -10 a 150°C o similar) con una junta 10/30 macho.
- Tubo conector de vacío con juntas esmeriladas 24/40 y una junta 10/30 para el termómetro.
- Probeta de recolección 100 ml con junta hembra 24/40.
- Mangueras para el condensador
- Perlas de ebullición.
- 2 soportes universales.
- Pinzas para sujetar las columnas.

Procedimiento.

- Colocar la muestra de 500 ml y las perlas de ebullición en el matraz de bola. Conectar el matraz a la columna del aparato de destilación y comenzar a calentar la mantilla.
- Si la presión atmosférica en el lugar en donde se realiza la destilación es de 101,3 kPa (a nivel del mar), iniciar la colección del destilado cuando se alcance una temperatura entre 78,0 y 78,2°C. Si la temperatura excede 78,5°C, se descontinúa el proceso de destilación bajando la temperatura de la mantilla por 5 min. Cuando la temperatura alcance los 78°C, se puede reiniciar la colecta del destilado hasta alcanzar nuevamente 78,5°C. La destilación debe pararse hasta cuando la temperatura de ebullición sube 1°C sobre la temperatura a la cual se estableció el proceso de destilación. Nota, en el caso de realizar la destilación en lugares cuya presión atmosférica es de alrededor de 77,3 KPa, iniciar la colección del destilado cuando se alcance la temperatura de 72°C y descontinuar si la temperatura excede de 73°C.
- Todo el material de vidrio utilizado para la destilación debe ser lavado, enjuagado y secado en horno antes de realizar otra destilación.

7.3.1.2 Preparación del tubo de combustión.

N.E. 001

Al tubo de cuarzo quemado a 650°C se le adicionan alrededor de 2 g de óxido cúprico y el capilar con filamento de plata (Fig. 2). El conjunto es calentado una hora a 650°C en una mufla para eliminar cualquier resto de materia orgánica. Los tubos así preparados son almacenados en un recipiente de vidrio con tapa en un horno mantenido entre 40 a 60°C.

La adición de la muestra al tubo de cuarzo se realiza con una micropipeta 10 µl (80 – 96 % Alc. Vol.) ó 20 µl (38 % Alc. Vol.) del alcohol dependiendo del por ciento alcohol volumen y se colocan en un capilar de cuarzo el cual es introducido en el tubo de combustión descrito previamente (fig. 2). Posteriormente se coloca un tubo pequeño de 6mm de diámetro externo de cuarzo y se deposita invertido dentro del tubo de combustión de cuarzo de 9 mm de diámetro externo que contiene CuO, el filamento de plata y la muestra, finalmente se colocan alrededor de 3 g de cobre metálico con un embudo, todo el material se manipula con pinzas. La combustión de la muestra se realiza utilizando el oxígeno liberado por el óxido cúprico, siendo la plata el catalizador de la reacción y el cobre metálico sirve para poder convertir los óxidos de nitrógeno en N₂ a una temperatura de 650°C.

Se colocan los tubos de cuarzo que contienen la muestra, se conectan a la línea de vacío de la figura 3, las muestras se congelan con nitrógeno líquido y se comienza a extraer el aire abriendo la válvula de prevacío hasta alcanzar una presión de 1 Pa, se cierra esta válvula y se abre la válvula de vacío medio hasta alcanzar una presión de 0,1 Pa, una vez alcanzada esta presión, el tubo de cuarzo es sellado con soplete gas-oxígeno con capacidad para fundir el cuarzo.

Cada vez que se prepara un conjunto de muestras para análisis isotópico de δ¹³C, simultáneamente se preparan un material de referencia de distribución internacional pudiendo ser cualquiera de los siguientes: RM 8539: NBS-22 (4µl), RM 8540: PEF1 (4 mg), RM 8541: USGS24 grafito (4 mg) ó RM 8242: Sucrose, ANU (8 mg).

7.3.2 Combustión.

Las muestras en sus correspondientes tubos de cuarzo sellados son calentadas hasta alcanzar una temperatura de 900°C, la cual se mantiene durante dos horas en una mufla, al término de este período se baja la temperatura a 650°C y se mantienen ahí

durante 1 hora. A partir de esto, los tubos se dejan enfriar lentamente hasta alcanzar la temperatura ambiente.

7.3.3 Purificación de CO₂.

El CO₂ producto de la combustión de la muestra es separado y purificado criogénicamente, iniciando con la separación del agua mediante una mezcla frigorífica (mezcla de hielo seco con alcohol o acetona a -80°C), para la purificación se utiliza otra trampa enfriada con nitrógeno líquido (-190°C) que captura el CO₂ y se eliminan los gases no condensables a través de una línea de vacío como lo indica la figura 4.

La operación detallada de la línea de vacío para la purificación del CO₂ de la figura 4 es la siguiente: Se cierran válvulas 1 y 2. Se marca el tubo de cuarzo con un cortador de vidrio y se coloca en el rompedor en la posición A de la línea de vacío con una pinza unión de junta esférica. Se abre la válvula 1, se evacua hasta alcanzar una presión de 1,0 Pa y posteriormente utilizando la bomba difusora hasta obtener una presión de 0,1 Pa.

Se coloca un termo con mezcla frigorífica (-80° C) en la trampa B para condensar el agua y un termo con nitrógeno líquido (-190°C) en la trampa C para condensar el CO₂.

Se cierra la válvula 1 y se procede a romper el tubo, flexionando el rompedor construido de acuerdo al descrito por Desmaries y Hayes en (1976). Los gases no condensables se bombean a través del sistema de vacío, abriendo primero la válvula 5 y después la válvula que conecta a la bomba difusora.

Una vez que se tiene una presión de 0,1 Pa se cierran las válvulas 3 y 4, se retira el termo con nitrógeno líquido y se mide la presión del CO₂ purificado calentándolo a temperatura ambiente.

El CO₂ purificado se transfiere al frasco contenedor utilizando nitrógeno líquido a través de la válvula 4 y cerrando la válvula 5. Se cierran válvulas y se retira el frasco contenedor.

Los frascos con el CO₂ purificado se colocan en el espectrómetro de masas para determinar la δ¹³C de las muestras.

7.4 Resultados

La $\delta^{13}\text{C}$ de un compuesto está expresada mediante las relaciones isotópicas de la muestra con la relación isotópica del patrón internacional VPDB en partes por mil ‰.

Un espectrómetro de masas de isótopos estables con sistema de introducción dual dará el resultado de cada análisis directamente en unidades de $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ y $\delta^{18}\text{O}_{\text{VPDB}}$ con las correcciones por efecto de presión, de masas parásitas, efecto de memoria, gas residual, mezcla de gases por cambio de válvulas y por abundancia isotópica, (Mook, W.G. y Grootes P.M. 1973).

7.4.1 Materiales de Referencia

Los materiales de referencia internacionales utilizados para calibrar el Espectrómetro de Masas de Isótopos Estables son:

Para determinar la $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ en materia orgánica se recomienda utilizar los siguientes materiales de referencia del NIST 8539: NBS-22 aceite, 8540: PEF1 poliuretano, 8541: USGS24 grafito ó 8242: Sucrose, ANU.

Los materiales de referencia para calibrar el CO_2 que se utilizará como patrón de trabajo y determinar $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ y la $\delta^{18}\text{O}_{\text{VPDB}}$ son el NBS-19 y el NBS-18 que se preparan utilizando la técnica de J. M. McCrea (1950) y normalizados de acuerdo a Tyler Coplen, 1988.

Materiales de Referencia	$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ (‰) $\pm \sigma$	$\delta^{18}\text{O}_{\text{VPDB}}$ (‰) $\pm \sigma$
8539: NBS-22 aceite	-29,73 \pm 0,09	
8540: PEF1 poliuretano	-31,77 \pm 0,08	
8541: USGS24 grafito	-15,9 \pm 0,25	
8242: Sucrose, ANU	-10,47 \pm 0,13	
8543. NBS-18 calcita	-5,04 \pm 0,06	-23,05 \pm 0,19
8544. NBS-19 calcita	+1,95	-2,20

7.4.2 Reproducibilidad

Para el análisis isotópico de $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ en materia orgánica es posible alcanzar una reproducibilidad interna 0,1 ‰, y para resultados de

intercomparación internacional se espera una reproducibilidad 0,2 ‰ con una repetibilidad de 0,6 ‰.

7.5 Interpretación de Resultados.

En general la adulteración de las bebidas alcohólicas de uva, manzana y/o pera se lleva a cabo con aguardientes de caña, sorgo o maíz cuyo valor de $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ es más positivo que el límite inferior de $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ de la uva.

La aplicación de esta norma está basada en el conocimiento de los límites estadísticos de las variaciones naturales, para que con ello se dé una mayor certidumbre al proceso de la certificación de autenticidad.

Los límites estadísticos para el caso de la uva se obtienen a partir de una distribución normal basada en la población total de muestreos estadísticos realizados en 1984 y 1986 (fig.1). (Otero F. 1995)

La variación natural de los alcoholes provenientes de la uva, manzana y/o pera presentan una curva que se aproxima a una distribución normal (figura 1); de esta manera se puede asociar un valor de probabilidad para una muestra auténtica cuando esté dentro de los límites estadísticos establecidos por la seguridad tabulada calculada a partir de la distribución normal. Con tal objeto se estableció un criterio estadístico de 2,5 σ el cual tiene una probabilidad de certeza del 99,379%, lo que significa que solamente 1 de cada 161 muestras estarían clasificadas erróneamente cuando están dentro del intervalo mencionado (Abramowitz 1970). De esta manera se puede asociar un valor de probabilidad para una muestra auténtica cuando ésta se encuentre dentro de los límites estadísticos.

Para efectos de verificación de información comercial se toman los intervalos de $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}} = -29$ a -26 ‰ para todos los alcoholes puros destilados provenientes de bebidas alcohólicas derivadas de uvas cultivadas en México, Estados Unidos de Norteamérica y otros países. Para el caso de los aguardientes de uva y vinos españoles, se aplica un intervalo diferente de $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}} = -29$ a -24 ‰. Este intervalo es aplicable a bebidas alcohólicas derivadas de uvas cultivadas en España, Portugal, Italia y Francia.

El intervalo de $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}} = -29$ a -26 ‰ que se determinó para los aguardientes de uvas

mexicanas también es aplicable a otras bebidas alcohólicas derivadas de uvas cultivadas así como a bebidas alcohólicas provenientes de pera y manzana.

Se debe considerar que en algunas bebidas alcohólicas como son vinos generosos, coolers, vinos espumosos, se acepta que se adicione un porcentaje de alcohol proveniente de otro origen, para ello consultar la norma NMX-V-046-NORMEX y para el caso de otras bebidas alcohólicas que contienen uva, manzana o pera.

Para el caso de vinos Europeos cuando las condiciones climáticas lo requieran en determinadas zonas vitícolas de la Unión Europea, los Estados miembros interesados podrán autorizar el aumento del grado alcohólico volumétrico natural según se indica en los incisos C y D del Diario Oficial de las Comunidades Europeas L 179/52 ES 14.7.1999.

La sidra natural debe ser 100% de manzana y/o pera y a las sidras gasificadas, se puede adicionar como máximo 85 g/L de azúcares al mosto por lo que deben tener un mínimo de 50% de alcohol proveniente de la manzana y/o pera.

Para productos de uva y manzana de México, se puede considerar que si la $\delta^{13}C_{VPDB}$ no se encuentra dentro de los intervalos estadísticos establecidos descritos anteriormente, se trata de una mezcla de alcoholes con diferente origen. Por lo que se puede utilizar una ecuación para calcular el % de alcohol de uva, manzana y/o pera según sea el caso la cual tiene una confiabilidad del 95%. Esta fórmula se determinó construyendo una curva tomando en cuenta el valor promedio de $\delta^{13}C$ del jarabe de maíz con alto contenido en fructosa, del azúcar de caña y del sorgo el cual es -11‰ y el valor promedio de $\delta^{13}C$ de la uva, manzana y/o pera el cual es -27‰.

$$\% \text{ Alcohol de uva} = -6,25 * \delta^{13}C_{VPDB} - 68,75$$

$$\% \text{ Alcohol de manzana} = -6,25 * \delta^{13}C_{VPDB} - 68,75$$

8.0 DETERMINACIÓN DE $\delta^{13}C_{VPDB}$ EN EL CO₂ CONTENIDO EN LA INTERFASE GASEOSA DE VINOS ESPUMOSOS.

8.1 Descripción del método.

Para la detección de la adición de CO₂ industrial en los vinos espumosos, se obtiene una alícuota de CO₂ contenido en la interfase gaseosa dentro de la botella antes de abrir. El gas obtenido que contiene al CO₂, requiere para ser introducido al espectrómetro de masas ser purificado para determinar la $\delta^{13}C_{VPDB}$.

De manera similar a la anterior es posible utilizar los espectrómetros de masas de flujo continuo para determinar la $\delta^{13}C_{VPDB}$ del CO₂ contenido en la interfase gaseosa dentro de la botella antes de abrir. Una alícuota de este gas se coloca en un vial previamente se le hace vacío con presión de 0,1 Pa, el tapón debe tener septum y se coloca en una charola, para medir el CO₂ en forma automática se usa una configuración de automuestreador, columna cromatográfica, membrana de nafion para separar el agua y un espectrómetro de masas de isótopos estables.

8.2 Descripción de los diferentes orígenes del CO₂.

Con la composición isotópica tanto del carbono como del oxígeno, es posible conocer el origen del CO₂ que se encuentra disuelto en los vinos espumosos. El fundamento de este criterio se basa en el conocimiento de las principales fuentes del CO₂ en la naturaleza. El contenido isotópico del CO₂ atmosférico en aire marino y áreas rurales tiene un intervalo de $\delta^{13}C_{VPDB} = -6,7$ a $-7,4$ ‰ y la $\delta^{18}O_{VPDB} +0,8$ a $-0,6$ ‰ (Keeling Charles D. 1961). Por otro lado el CO₂ industrial, puede provenir de la combustión de varias fuentes de carbono que hay en la naturaleza, entre ellas gas natural y combustible fósil, con un intervalo de $\delta^{13}C_{VPDB} = -22$ a -75 ‰, de aceites de petróleo con un intervalo de $\delta^{13}C_{VPDB} = -25$ a -33 ‰, de carbón natural o hulla con un intervalo de $\delta^{13}C_{VPDB} = -25$ a -31 ‰ (Dumbar J 1982). En el caso de ser CO₂ endógeno que se encuentra en vinos espumosos, el cual es un producto que puede ser procedente de azúcar de caña con una $\delta^{13}C_{VPDB} = -12,5 \pm 1,5$ ‰, maíz (HFCS) con una $\delta^{13}C_{VPDB} = -9,7 \pm 1$ ‰, uva, remolacha azucarera con una $\delta^{13}C_{VPDB} = -24$ a $-27,5$ ‰ ó mezclas de ellos.

8.3 Procedimiento para la determinación de $\delta^{13}C_{VPDB}$ del CO₂ proveniente de cualquier bebida carbonatada.

Tomar con una jeringa de 50 ml con seguro, una alícuota del gas de la interfase gaseosa del envase. Una alícuota de este gas, se introduce a una línea

de vacío (fig. 4) a través de un septum para purificarla mediante una separación criogénica del CO₂. Esto se realiza mediante el paso de este gas a través de una trampa con mezcla frigorífica (-80°C) y una trampa de nitrógeno líquido (-190°C). Para eliminar el nitrógeno, éste se evacua con prevacío y vacío medio. Se cierran las válvulas 3 y 4 y el CO₂ de la trampa se descongela y se mide la presión de CO₂ en la trampa C con el objeto de verificar que se cuenta con suficiente CO₂ para ser medido (la cantidad de CO₂ depende de cada espectrómetro). Con el objeto de eliminar los óxidos de nitrógeno se transfiere contenidos en la muestra el CO₂ purificado a un tubo de cuarzo con Cu⁰ y Ag⁰ utilizando nitrógeno líquido y se sella con soplete. Se calienta el tubo en la mufla a 650°C por una hora, posteriormente se purifica el CO₂ en la línea de vacío (fig 4) y se transfiere en CO₂ en un frasco contenedor y se lleva al espectrómetro de masas.

8.4 Resultados

8.4.1 La unidad de reporte es la $\delta^{13}C_{VPDB}$ la cual se explica en el apartado 7.4 y los materiales de referencia que se emplean se mencionan en el apartado 7.4.1.

8.4.2 Reproducibilidad

Para el análisis isotópico de $\delta^{13}C_{VPDB}$ en materia orgánica es posible alcanzar una reproducibilidad interna de 0,2 ‰, y para resultados de intercomparación internacional se espera una reproducibilidad de 0,6 ‰.

8.4.3 Interpretación de Resultados.

Para los casos en donde se quiere juzgar el origen del CO₂ de los vinos espumosos es conveniente conocer que el CO₂ atmosférico en aire marino tiene un intervalo de $\delta^{13}C_{VPDB} = -6,7$ a $-7,4$ ‰ (Keeling Charles D. 1961).

Para el caso de vinos espumosos realizados por el método Champenoise ó Charmat el CO₂ contenido en estas muestras tiene que ser endógeno con un intervalo de $\delta^{13}C_{VPDB} = -12 \pm 1,5$ ‰ cuando son derivadas de azúcar de caña o $\delta^{13}C_{VPDB} = -9,7 \pm 0,9$ ‰ de maíz que son plantas C₄, en el caso de vinos espumosos europeos utilizan también azúcar de remolacha con una $\delta^{13}C_{VPDB} = -24$ a $-27,5$ ‰ o mezclas de estos azúcares.

Para vinos gasificados el intervalo es de $\delta^{13}C_{VPDB} = -22$ a -75 ‰. En un estudio de mercado de bebidas

gasificadas se obtuvo un intervalo de $\delta^{13}C_{VPDB} = -34$ a -42 ‰

9.0 DETERMINACIÓN DE $\delta^{18}O_{VSMOW}$ EN AGUA DE LOS VINOS.

9.1 Descripción del método

Para la detección de la adición de agua en los vinos se utiliza la determinación $\delta^{18}O_{VSMOW}$ en agua, ésta se realiza por medio de un intercambio isotópico entre el oxígeno del agua contenido en el vino y el oxígeno del CO₂ que se adiciona con objeto de realizar este análisis, de tal manera que la composición isotópica del oxígeno del CO₂ que se analiza en el espectrómetro de masas sea representativo de la composición isotópica del oxígeno del agua del vino en la muestra con la cual estuvo en equilibrio de acuerdo al método de Epstein y Mayeda 1953.

9.2 Descripción de los diferentes orígenes del agua.

Para la interpretación de resultados isotópicos de $\delta^{18}O_{VSMOW}$ del agua contenida en los vinos. Se considera como punto de partida que el agua pluvial o de riego que es absorbida por las raíces de la planta y posteriormente es enriquecida en las hojas por evapotranspiración. El enriquecimiento del agua (savia) en la planta puede llegar ha ser de 10 a 15 ‰ en $\delta^{18}O$, lo cual depende fuertemente de la cantidad disponible de agua en la planta.

Cabe resaltar que esta evapotranspiración provoca que la composición isotópica de $\delta^{18}O_{VSMOW}$ del agua subterránea, de lluvia o proveniente de manantiales sea muy diferente al agua contenida en el jugo de fruta por lo que es posible identificar las adiciones ilícitas de agua en los vinos. Típicamente debe haber diferencias de más de 5 ‰.

Muchos estudios realizados en diferentes países se han encontrado pequeñas diferencias las cuales se explican debido a cambios climáticos. Por ejemplo en países en los cuales el clima es cálido el jugo de las uvas se encuentra más enriquecido en ^{18}O que en países con clima más frío y también hay una dependencia con respecto a la cantidad de lluvia anual. El proceso de fermentación del jugo de uva no afecta considerablemente la $\delta^{18}O_{VSMOW}$ del agua en el vino el cual es aproximadamente $-0,2 \pm 1,2$ ‰. (Dumbar 1982).

Los acuíferos de una región específica poseen una composición homogénea, que se relaciona linealmente al promedio de la temperatura de la precipitación y en general con el clima del lugar (evaporación) de acuerdo a la línea meteórica del agua propuesta por Craig H. Es posible conocer la $\delta^{18}\text{O}$ esperada en una región dada, basándose exclusivamente en datos geográficos como son la latitud, longitud, altura sobre el nivel del mar, y factores climáticos locales como la temperatura y precipitación media anual.

Con respecto al agua meteórica muchos parámetros pueden influir el contenido de isótopos de oxígeno, sin embargo existe una correlación lineal entre el contenido de oxígeno 18 del agua y de la temperatura del lugar la cual fue establecida por la IAEA.

$$\delta^{18}\text{O} \text{ ‰} = 0,597T - 0,0035P + 0,106L + 0,0012A$$

con $r = 0,833$

En donde T es la temperatura mensual en °C, P es la precipitación mensual expresada en mm, L es la latitud expresada en grados y A es la altitud sobre el nivel del mar expresada en metros.

9.3 Procedimiento para la determinación de $\delta^{18}\text{O}_{\text{VPDB}}$ en agua

El método que se describe a continuación se basa en el artículo de Epstein y Mayeda 1953, modificado para 2 ml de agua el cual se realiza en una línea de vacío para la preparación y purificación de muestras de agua como la que se muestra en la fig 5.

Procedimiento para adicionar el CO_2 a la muestra de agua: dos mililitros de la muestra por analizar se colocan en el frasco reaccionador utilizando una propipeta y una pipeta volumétrica de 2 ml. Posteriormente el frasco se coloca en la línea de vacío vía la llave de paso (Figura 5). Se congela la muestra con una mezcla frigorífica (-80°C) por 10 minutos, pasado ese tiempo se evacúan los frascos contenedores primero haciendo prevacío hasta obtener una presión de 1,0 Pa y posteriormente vacío medio hasta lograr una presión de 0,1 Pa. Las muestras de agua se descongelan y se vuelven a congelar repitiendo el procedimiento anterior.

Se introduce alrededor de $5,64 \times 10^{-4}$ mol de CO_2 a cada frasco utilizando nitrógeno líquido para congelarlo y se cierran las válvulas de paso, cada vez

que se preparan cinco muestras se llena un frasco contenedor con CO_2 para verificar su contenido isotópico.

Se transfieren los frascos reaccionadores a un baño con termostato a $25^\circ\text{C} \pm 0,1^\circ\text{C}$ durante 16 horas con agitación.

Pasado este tiempo se extrae y purifica el CO_2 mediante trampas criogénicas utilizando mezcla frigorífica y nitrógeno líquido.

Los frascos con el CO_2 purificado se colocan en el espectrómetro de masas de isótopos estables para determinar la $\delta^{18}\text{O}$ de las muestras.

El procedimiento automático utilizando varía en cada equipo así como la temperatura del baño en el cual se realiza el equilibrio, por lo que cualquier variación a este método se puede utilizar siempre y cuando se normalicen los resultados utilizando los materiales de referencia VSMOW, SLAP y GISP de acuerdo con Tyler Coplen (1988).

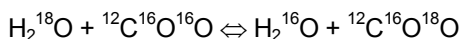
9.4 Resultados

9.4.1 Metrología Isotópica

Actualmente, son utilizadas indistintamente dos escalas para reportar las relaciones isotópicas del $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, las cuales se emplean dependiendo de la matriz de que se trate. Para el reporte de $\delta^{18}\text{O}$ en carbonatos se utiliza preferentemente la escala VPDB. Para el caso del agua, se toma como punto de referencia el contenido $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ del agua de mar promedio el cual es referido como VSMOW (Vienna Standard Mean Ocean Water). Este patrón internacional, es distribuido por las Instituciones de estándares ya mencionadas. Ambas escalas VSMOW y VPDB, se relacionan entre sí, de acuerdo a una expresión matemática descrita por Tyler Coplen 1988.

Por facilidad técnica la determinación de $\delta^{18}\text{O}_{\text{VSMOW}}$ en agua se lleva a cabo por medio de una reacción intercambio isotópico entre el oxígeno del agua y el oxígeno del CO_2 , de tal manera que la composición isotópica del oxígeno del CO_2 que se analiza en el espectrómetro de masas es representativo de la composición isotópica del oxígeno del agua muestra con la cual estuvo en equilibrio descrita por Epstein y Mayeda (1953).

El intercambio isotópico entre el CO₂ y el agua se lleva a cabo a 25°C, esta reacción de intercambio se representa por:



Para el cálculo de la $\delta^{18}O$ del agua se utiliza la ecuación Craig H. (1957).

$$\delta = \delta' \frac{(\rho + \alpha)}{\rho} - \frac{\alpha}{\rho} (\delta^{18}O)_{(CO_2 \text{ de Tanque})}$$

En donde δ es el valor de reporte para el oxígeno del agua. δ' corresponde a la medida del CO₂ equilibrado con el agua relativo al estándar. α es el factor de fraccionamiento. ρ es la relación entre el número de gramos átomo de oxígeno en el agua y el número de gramos átomo de oxígeno del CO₂ introducido en el frasco junto con el agua para realizar la reacción de intercambio isotópico. Se recomienda que ρ tenga un valor alrededor de 90.

En esta expresión α , el factor de fraccionamiento ($^{18}O/^{16}O_{(CO_2)} / ^{18}O/^{16}O_{(H_2O)}$) tiene un valor de 1,039 a 25°C. $\delta^{18}O_{(CO_2 \text{ de Tanque})}$ es el análisis de oxígeno 18 del CO₂ de tanque utilizado para el equilibrio.

La $\delta^{18}O_{VSMOW}$ expresa a partir de las relaciones isotópicas de $^{18}O/^{16}O$ de la muestra y la relación isotópica $^{18}O/^{16}O$ de VSMOW de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\delta^{18}O = \left[\frac{(^{18}O/^{16}O)_{\text{Muestra}}}{(^{18}O/^{16}O)_{VSMOW}} - 1 \right] \cdot 10^3$$

El resultado de $\delta^{18}O$ que se obtiene generalmente del espectrómetro es relativo a VPDB por lo que se requiere aplicar una técnica llamada normalización para transformar este resultado y poderlo reportar como $\delta^{18}O_{VSMOW}$ tal como lo recomendaron en 1995 la Comisión de Pesos Atómicos y Abundancias Isotópicas de la IUPAC. La normalización de los resultados de los análisis isotópicos implica no solo un cambio de escala sino además, esta metodología de normalización, permite corregir los resultados experimentales para eliminar diferencias generadas por el uso de diferentes espectrómetros, laboratorios y técnicas.

La normalización de resultados se debe hacer de acuerdo al método descrito por Tyler Coplen, 1988, para aplicar correctamente esta normalización implica el análisis en el laboratorio de las muestras de interés junto con dos alícuotas de patrones internacionales extremas (SLAP y VSMOW).

9.4.2 Materiales de Referencia

Para determinar $\delta^{18}O_{VSMOW}$ se utilizan los siguientes materiales de referencia 8535: VSMOW, 8536: GISP y 8537: SLAP, los cuales son indispensables para normalizar, su incertidumbre es de 0,05‰. Dado que únicamente cada laboratorio puede obtener una alícuota de 30 ml de estos materiales cada tres años, se recomienda que cada laboratorio prepare muestras de agua con diferente composición isotópica las cuales deberán ser calibradas con VSMOW, SLAP y GISP, estas muestras así calibradas pueden ser utilizadas como patrones de uso diario.

Materiales de Referencia	$\delta^{18}O_{VSMOW}$ (‰)
8535 VSMOW	0,0
8536 GISP	-24,85
8537 SLAP	-55,5

9.4.3 Reproducibilidad

Para el análisis de $\delta^{18}O$ (Epstein y Mayeda 1953) es posible alcanzar una reproducibilidad interna de 0,1‰, y para resultados de intercomparación internacional se espera una reproducibilidad de 0,26‰.

9.5 Interpretación de Resultados

El intervalo de $\delta^{18}O_{VSMOW}$ del agua de los vinos de mesa tiene un intervalo de 1 a 8,5 ‰.

10.0 BIBLIOGRAFIA

- Cienfuegos Edith, Casar Isabel y Morales Pedro, (1998). "Carbon isotopic composition of mexican honey". Journal of Apicultural Reseach 36(3/4): 169 - 179
- Craig Harmon. (1953). The geochemistry of stable carbon isotopes. Geochimica et Cosmochimica Acta, 3: 53 - 92.

Craig Harmon (1957). Isotopic Standards for Carbon and Oxygen and correction factors for mass – spectrometric analysis of carbon dioxide. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, Vol. 12: 133 – 149.

Coplen, Tyler B. (1988). Normalization of oxygen and hydrogen isotope data. *Chemical Geology (Isotope Geoscience Section)*, 72: 293-297.

DesMaris, D.J. and Hayes J.M. (1976). Tube cracker for opening glass Sealed ampoules under vacuum. *Analytical Chem.* 48: 1651 – 1652.

Dumbar John (1982). Use of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Ratios for Studying de origin of CO_2 in Sparkling Wines. *Fresenius Z Anal Chem* 311: 578-580.

Epstein y Mayeda (1953) "Variation of O^{18} content of waters from natural sources". *Geochimica et Cosmochimica Acta* 4: 213-224

Abramowitz Milton y Stegun Irene A. (1970). *Handbook of Mathematical Functions with Formulas, Graphs and Mathematical Functions* U.S. Department of Commerce. National Bureau of Standards Applied Mathematics Series 55. Tabla 26.1 pag. 966-970.

Hener U., Mosandl A., Hilkert A., Bahrs-Windsberg J., Großmann M. and Sponholz W.R. (1998). (Headspace-) GC-IRMS for the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ and $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ analysis of ethanol from alcoholic beverages and distillates. *Vitic. Enol. Sci.* 53 (2) 49-53.

Keeling Charles D. (1961). The concentration and isotopic abundances of carbon dioxide in rural and marine air. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, Vol. 24: 277-298

McCrea J. M. (1950). On the Isotopic Chemistry of Carbonates and Paleotemperature Scale. *The Journal of Chemical Physics* Vol. 18, No. 6 June: 849-857.

Mook, W.G. and Grootes P.M. (1973). The measuring procedure and corrections for the high precision mass – spectrometric analysis of isotopic abundance ratios, especially referring to carbon, oxygen and nitrogen. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics*. Vol 12: 273 – 298.

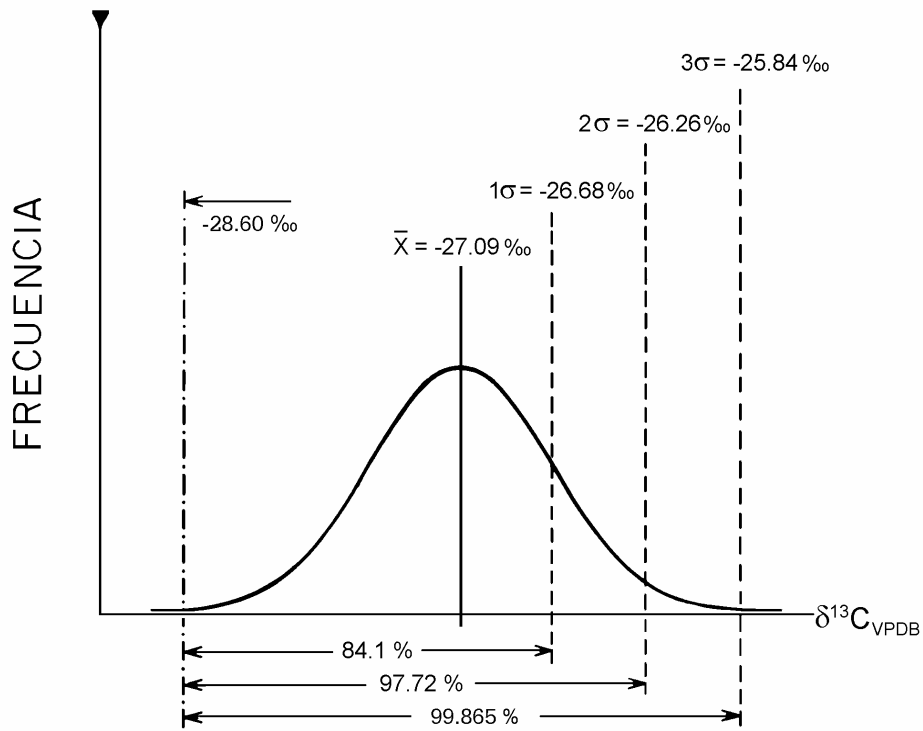
Morales P, Gaona S, Alba F (1970). Espectrometría de masas con triple colector para análisis preciso de relaciones isotópicas de carbono y oxígeno. *Rev. Mex. de Fís.* Vol. 19 p. FA77-FA90, México.

Nelson, Stephen T. (2000) A simple, practical methodology for routine VSMOW/SLAP normalization of water samples analyzed by continuous flow methods. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 14, 1044-1046.

Otero Trujano Francisco Javier. (1995) Tesis "Determinación del origen del Brandy mediante análisis isotópico de $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ mediante Espectrometría de Masas de Isótopos Estables" UNAM.

11.0 CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES

Esta norma no concuerda con ninguna norma internacional, por no existir referencia al momento de su elaboración.

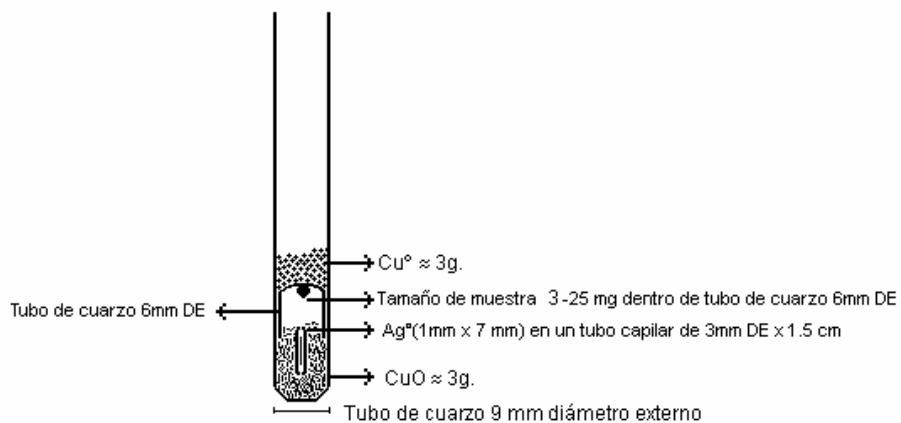


Estimación estadística por intervalos de confianza para el análisis de $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$

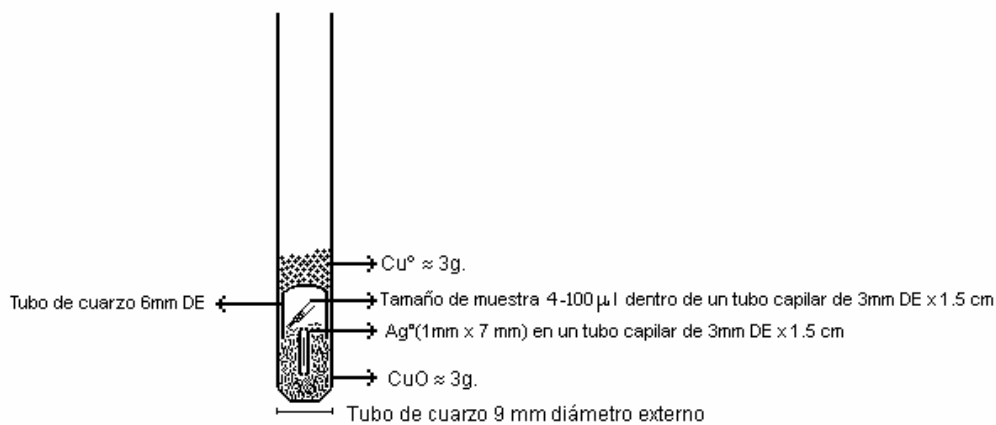
Figura 1

Datos Figura 1.

z	P(x)	1/ (1-P(x))
1 sigma	0.84	1 en 6
2 sigma	0.98	1 en 44
2.5 sigma	0.99	1 en 161
3 sigma	1.00	1 en 741
4 sigma	1.00	1 en 25000
5 sigma	1.00	1 en 1000000



Tubo de Combustión para muestras sólidas



Tubo de combustión para muestras líquidas

Figura 2

Línea de desgasificación de muestras orgánicas

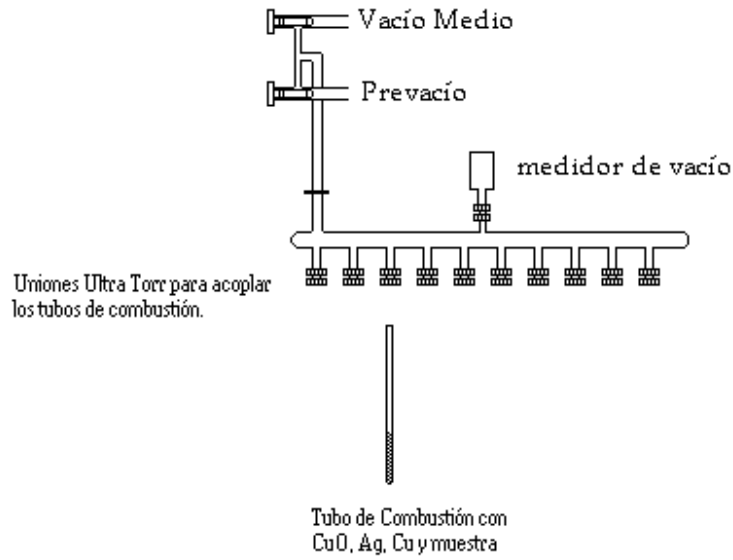


Figura 3

Línea de Vacío para la purificación de muestras Orgánicas

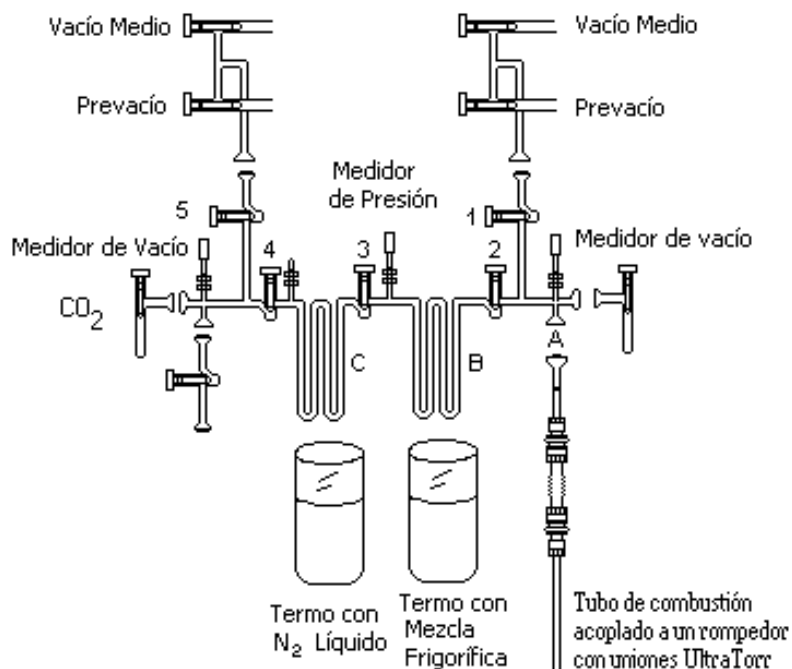


Figura 4

Línea para la preparación y purificación
simultánea de cinco muestras.

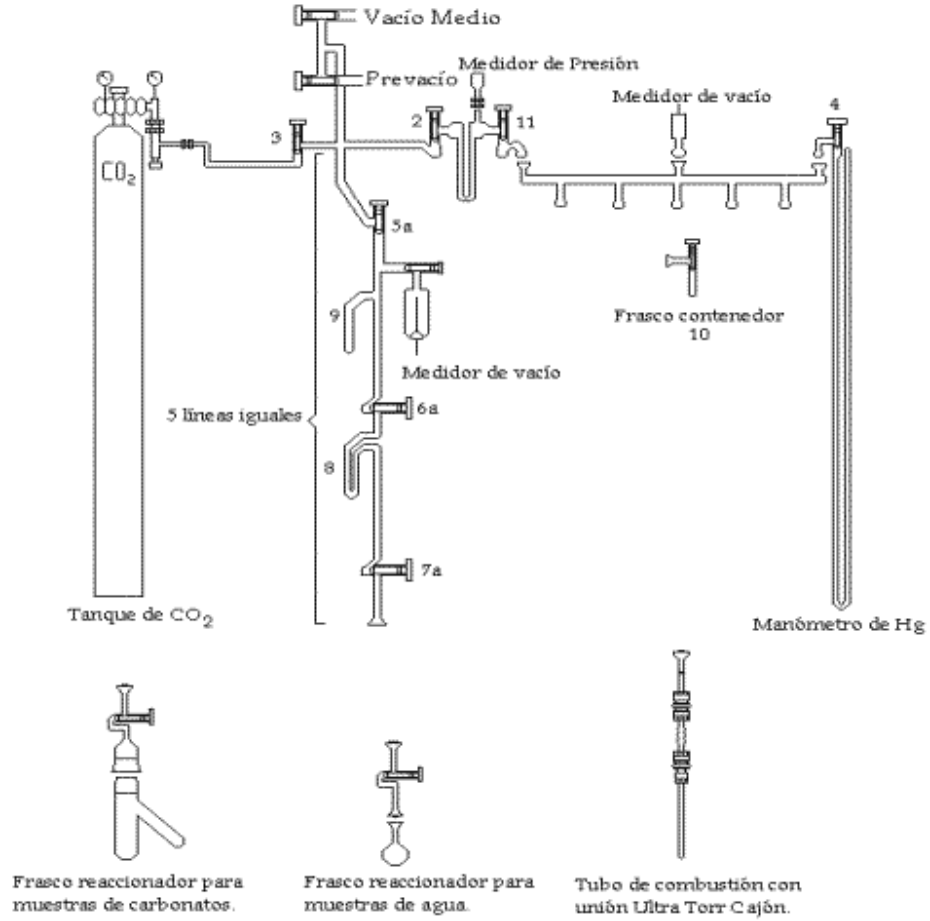


Figura 5