

Determinación de conservadores en alimentos mediante cromatografía gas líquida. I. Cuantificación de ácido sórbico, ácido benzoico, ácido parahidroxibenzoico y ácido salicílico¹

Claudio Ciudad Banda²

INTRODUCCION

La necesidad de prolongar la vida útil de los alimentos y el manejo de producciones masivas de éstos hacen que sea recomendable en ciertos casos el uso de agentes químicos, tales como: ácido sórbico, ácido benzoico, ácido parahidroxibenzoico y ácido salicílico, que en pequeñas concentraciones (0,1%) tienen efecto inhibitor, principalmente sobre el desarrollo de hongos y levaduras.

Por otra parte, su uso está restringido por las diversas legislaciones de cada país, permitiéndose la incorporación, ya sea, individual o en mezclas; aprovechando el efecto sinérgico, que permite bajar el nivel de detección organoléptica. Por esta razón, es posible encontrar en un alimento una mezcla de conservadores químicos planteando un problema analítico de difícil solución.

En general, la determinación de conserva-

dores en alimentos por los métodos conocidos hasta ahora, implica abordar el problema en dos etapas sucesivas. La primera es la extracción de éstos mediante diversas técnicas tales como extracción con solventes, diálisis, sublimación, cromatografía, ya sea, columna, papel, capa fina, etc.

La segunda es la detección y/o la evaluación con la ayuda de cromatografía de gases, cromatografía de columnas y espectrofotometría U. V. e IR.

A la vista de los antecedentes bibliográficos es posible visualizar algunas dificultades técnicas inherentes a los métodos combinados de cromatografía de gases, sobre todo, en aquellos en que la matriz aporta sustancias interferentes a la medición o porque por esos métodos no sea posible separar las sustancias en estudio.

La conveniencia de poder controlar, simultáneamente, con precisión y relativa facilidad en conservas, la presencia de conservadores de uso corriente en tecnología de alimentos, cuyo empleo indiscriminado es lesivo a la salud pública, nos ha motivado a realizar en forma preliminar, un estudio de la posible determinación de estos compuestos por cromatografía gas líquida. Basándo-

¹Parte del trabajo presentado por el autor al Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos de Valencia para optar al Diploma de Alta Especialización en Tecnología de Alimentos.

Recepción originales: 5 de diciembre de 1974.

²Bioquímico y Tecnólogo de Alimentos: Jefe del Laboratorio de Agroquímica, Estación Experimental La Platina, Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Casilla 5427, Santiago, Chile.

nos en las ventajas de carácter cualitativo y cuantitativo que ofrece esta técnica eminentemente separativa.

REVISION DE LITERATURA

Desde el principio el problema de identificar y cuantificar estos conservadores se circunscribió a técnicas como la cromatografía de papel, Genest y Chapman (1960), también Halver, Van Dame (1960), usa técnicas de cromatografía de papel cuantificando los eluidos por espectrofotometría U. V.

Aprovechando las ventajas de la cromatografía de capa fina y cromatografía de columnas de poliamida, Nagasawa, Yoshidome y Takeshita (1969), separan e identifican en forma conjunta, ácido benzoico, ácido sórbico, ácido salicílico y derivados del ácido parahidroxibenzoico. Evaluando su presencia en los eluidos por métodos espectrofotométricos.

En resinas de intercambio en base a estireno, Nomura *et al.* (1971), aportan un interesante trabajo sobre las posibilidades de detección de derivados del benceno, que tendría aplicación para algunos aditivos y conservadores en alimentos.

Como es obvio dada la importancia indiscutible del tema, la bibliografía con respecto a cromatografía gaseosa, es fecunda en procedimientos e información.

Narafu *et al.* (1967) cuantifican acetanilida y los ácidos sórbico, benzoico y dehidroacético con un detector de conductividad térmica con relativo éxito, ya que las lecturas no eran reproducibles después de 50 inyecciones directas en el cromatógrafo.

Un año más tarde, Lewis (1968), trabajando en cromatografía de capa fina intenta aislar metil parabeno, etil parabeno y propil parabeno, además, de ácido benzoico, no obteniendo una resolución aceptable, prueba la separación a manera preliminar con cromatografía gas líquida con resultados promisorios.

Continuando en la misma línea de trabajo, Narafu *et al.* (1969) en un cromatógrafo de temperatura programada y un detector de ionización de llama de hidrógeno con una columna de dietilen glicol succinato y ácido fosfórico en Chromosorb W (60-80 mallas), detectan, aplicando directamente, el extracto en la columna, ácido sórbico, ácido dehidroacético, ácido benzoico y ésteres del parahidroxibenzoico, en forma simultánea y obteniendo buenas separaciones.

Gosselé (1971), aprovechando las excelentes expectativas que ofrece la formación de trimetil silil derivados (TMSD), descrito por: Sweeley *et al.* (1963), Brobst y Lott (1966), Chambaz y Horning (1967) y Klebe, Finkbeiner y White (1966), describe un método modificado por cromatografía gas líquida, ácido sórbico y benzoico, además de los ésteres del parahidroxibenzoico, metil, etil y propil.

MATERIALES Y METODOS

Reactivos: Todos los reactivos utilizados fueron de calidad para análisis (Merck) exceptuando el cloroformo y éter etílico que fueron de calidad comercial.

Preparación de los trimetil silil derivados (TMSD). Se preparó una solución patrón de mezclas de los cuatro conservadores en estudio, en una concentración de 10 mg/ml de cada uno en piridina, se observó el comportamiento de los TMSD por el método de Sweeley *et al.* (1963), que consiste fundamentalmente en hacer reaccionar 1 ml de muestra disuelta en piridina con 0,5 ml de hexametil disilazano (HMDS). Se agitó durante 5 minutos en un vial de 5 ml. A continuación se agregó 0,5 ml de trimetil clorosilano (TMCS) y se agitó durante 10 minutos, al término de los cuales la muestra estaba en condiciones de inyectarse en el cromatógrafo.

Establecimiento de las condiciones cromatográficas. Se utilizó un cromatógrafo Perkin-Elmer F-11 con temperatura programada y doble detector de ionización de llama (FID). Con columnas de vidrio de 2 m de longitud y 3 mm de diámetro interno. El material de relleno SE-30 al 3% sobre Chromosorb WDMCS de 100-120 mallas.

Con el fin de establecer aquellos parámetros más convenientes para la separación de los TMSD, se ensayó principalmente los propuestos por Gosselé (1971):

Flujo de gas portador (Nitrógeno)	: 15 a 35 ml/min
Flujo de hidrógeno	: 350 ml/min
Temperaturas iniciales	: 40° y 60°C
Velocidad de programación	: 3°C/min y 8°C/min
Temperatura bloque inyección	: 300°C
Atenuación	: 1000

Las cantidades inyectadas de TMSD varían de 2 ml a 4 ml.

Preparación de las curvas patrones de los ácidos en estudio. Se preparó los TMSD en cinco concentraciones diferentes 5-7, 5-10-12, 5-15 mg/ml para los ácidos sórbicos, benzoico y salicílico. Para el ácido parahidroxibenzoico se usó 10-12, 5-15-17, 5-20 mg/ml. Como estándar externo se empleó el TMSD del ácido succínico en una concentración de 10 mg/ml. Se inyectaba 2 ml de ácido succínico derivado antes y después de cada inyección de muestra. Estos valores fueron promediados y seleccionados con el valor de la muestra.

Para conseguir los fines antes indicados se graficó: concentración de ácido problema/ concentración ácido succínico Vs área ácido problema/área ácido succínico. De estas relaciones se dedujeron las respectivas ecuaciones de regresión lineal de cada ácido.

Conociendo la relación entre área y concentración de cada ácido patrón podemos calcular el porcentaje de recuperación para cualquier método extractivo que se quiera probar. Sobre todo en aquellos casos que la matriz presente problemas a la eficiencia de la extracción.

Del rendimiento de la extracción podemos inferir un coeficiente de corrección para cada método extractivo y para cada tipo de matriz, que será el que nos dé el valor de concentración verdadera de la muestra.

RESULTADOS Y DISCUSION

Para poder llegar a establecer los métodos adecuados para la extracción de los conservadores en las diferentes matrices que se estudiarán en la segunda parte de este trabajo, previo fue necesario trabajar simultáneamente en la puesta a punto de técnicas de derivación y condiciones cromatográficas convenientes para este tipo de compuestos.

Condiciones cromatográficas. Hubo dificultades para establecer las condiciones cromatográficas apropiadas, fase netamente empírica del trabajo. A pesar de emplear prácticamente los mismos parámetros de los establecidos por Gosselé (1971), diferíamos en el largo de columna, detalle importante, porque seguramente implica una mejor separación de los TMSD. Por esta razón se bajó el flujo de nitrógeno propuesto por este autor, de 35 ml/min a 15 ml/min manteniendo los demás parámetros. Las curvas que muestra

la Figura 1 son la expresión de esta experiencia. Por orden de aparición, desde el de menor tiempo de retención hasta el de mayor, ácido sórbico, ácido benzoico, ácido salicílico y ácido parahidroxibenzoico. La identidad de cada ácido fue comprobada por pruebas de solapamiento y tiempos de retención llevadas a cabo con patrones preparados especialmente para este efecto.

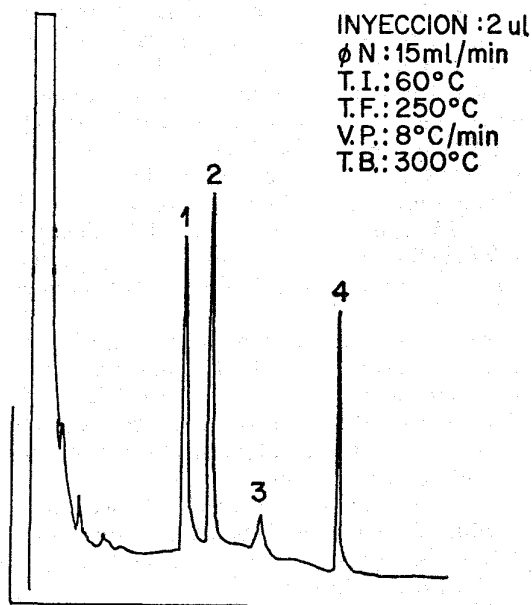


Figura 1 — Muestra: Mezcla patrón acs.: 1 sórbico, 2 benzoico, 3 salicílico, 4 p-h-benzoico.

Dado que no era satisfactorio la separación de los TMSD de los ácidos en estudio, se procedió a cambiar los parámetros cromatográficos llegándose finalmente al cambio de velocidad de programación de 3°C/min, los demás parámetros permanecieron constantes, Figura 2. Se observan cambios ostensibles sobre todo en la buena separación de los TMSD lo que permitiría el uso de un apropiado estándar interno con las consiguientes ventajas que esto significa.

Pero nuestra dificultad principal residía en la imposibilidad de obtener resultados reproducibles. Problema que se superó al hacer la limpieza exhaustiva de los detectores después de cada inyección. El depósito de sílice proveniente de los TMSD resta sensibilidad al detector hasta un 75%.

Con el fin de buscar un estándar externo apropiado para la confección de las curvas patrones, se ensayaron un gran número de

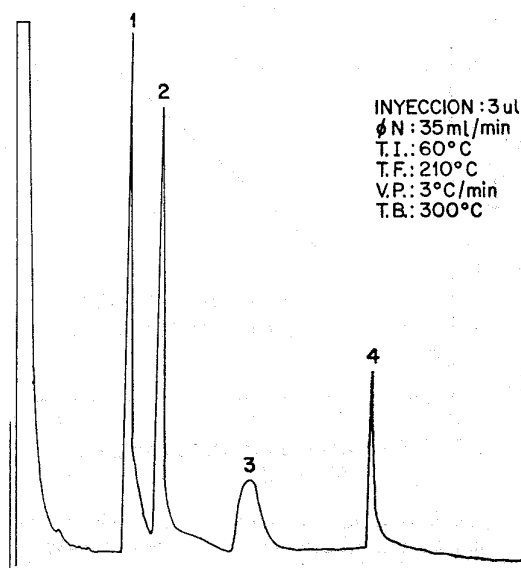


Figura 2 — Muestra: Mezcla patrón acs.: 1 sórbico, 2 benzoico, 3 salicílico, 4 p-h-benzoico.

ácidos orgánicos, entre los cuales se prefirió el ácido málico por sus buenas respuestas al análisis cromatográfico.

Formación de trimetil silil derivados. Los mejores resultados fueron obtenidos por el método propuesto por Sweeley *et al.* (1963). Contrariamente a los expresados por Gosselé (1971) el cual obtiene mejores resultados por el método de Brobst y Lott (1966), aunque reconoce no ser conveniente por su probada acción corrosiva del ácido tricloro acético sobre los detectores del cromatógrafo.

Nuestra experiencia es coincidente con lo informado por la literatura en lo que respecta a las ventajas de la formación de TMSD.

Simplicidad del método y formación de trimetil silil derivados muy estables que dan respuestas reproducibles. Las Figuras 1 y 2 muestran los TMSD obtenidos por esta técnica.

Obtención de las curvas patrones de los TMSD de los ácidos: sórbico, benzoico, salicílico y parahidroxibenzoico. Relación entre concentración y área del ácido sórbico con respecto al estándar externo ácido succínico. En la Figura 3 se aprecia la respuesta cromatográfica en áreas en función a las diferentes concentraciones de los TMSD del ácido sórbico, de acuerdo a los datos obtenidos la ecuación de regresión calculada es $Y = 0,237 + 0,338x$ con una correlación (r) de 0,87, significativa ($P < 0,01$).

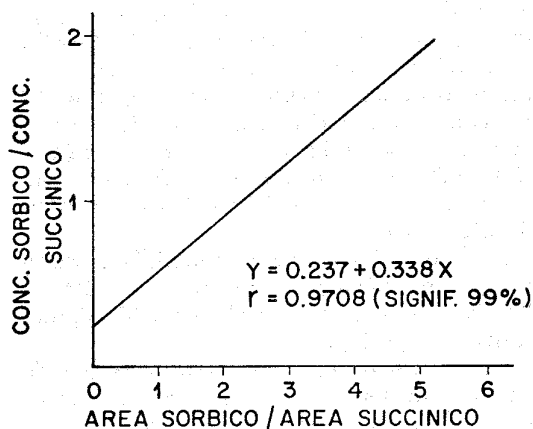


Figura 3 — Relación entre concentración y área del ácido sórbico respecto al estándar externo ác. succínico.

Relación entre concentraciones y área del ácido benzoico con respecto al estándar externo ácido succínico. En la Figura 4 se aprecia la respuesta cromatográfica en áreas en función a las diferentes concentraciones de los TMSD del ácido benzoico. De acuerdo a los datos obtenidos, la ecuación de regresión calculada es $Y = 0,225 + 0,347x$ con una correlación (r) de 0,97, significativa ($P < 0,01$).

Relación entre concentraciones y área del ácido salicílico con respecto al estándar externo ácido succínico. En la Figura 5 se aprecia la respuesta cromatográfica en áreas en función a las diferentes concentraciones de los TMSD del ácido salicílico. De acuerdo con los datos obtenidos la ecuación de regresión

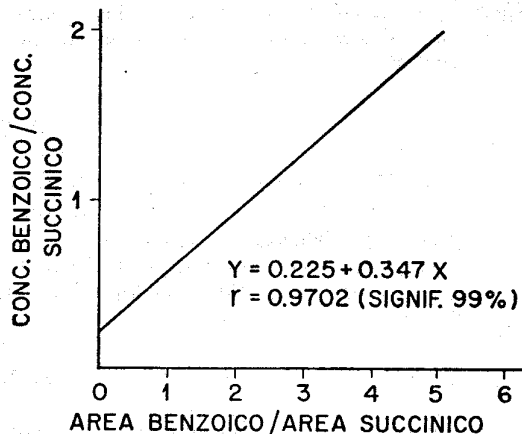


Figura 4 — Relación entre concentración y área del ác. benzoico respecto al estándar externo ác. succínico.

calculada es $Y = 1,342 + 0,332x$ con una correlación (r) de 0,98 significativa ($P < 0,01$).

Relación entre concentración y área del ácido parahidroxibenzoico con respecto al estándar externo del ácido succínico. En la Figura 6 se aprecia la respuesta cromatográfica en áreas en función de las diferentes concentraciones de los TMSD del ácido parahidroxibenzoico.

De acuerdo a los datos obtenidos la ecuación de regresión calculada es $Y = 0,469 + 0,846x$, con una correlación de 0,97, significativa ($P < 0,01$).

Las curvas de los cuatro ácidos en estudio demuestran tener una casi perfecta correlación entre concentración y respuesta cromatográfica con un buen nivel de significación. Lo que permite usar estas ecuaciones antes calculadas en el análisis de los conservadores en estudio.

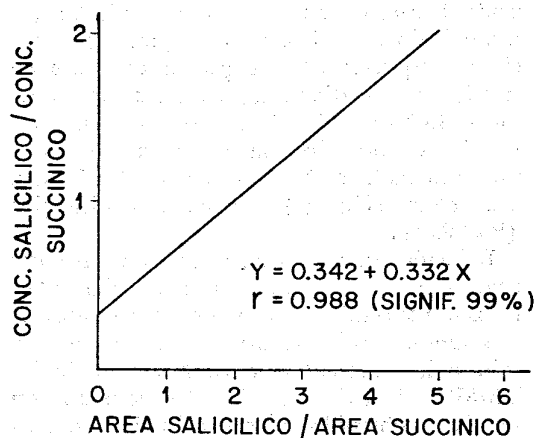


Figura 5 — Relación entre concentración y área del ác. salicílico respecto al estándar externo ác. succínico.

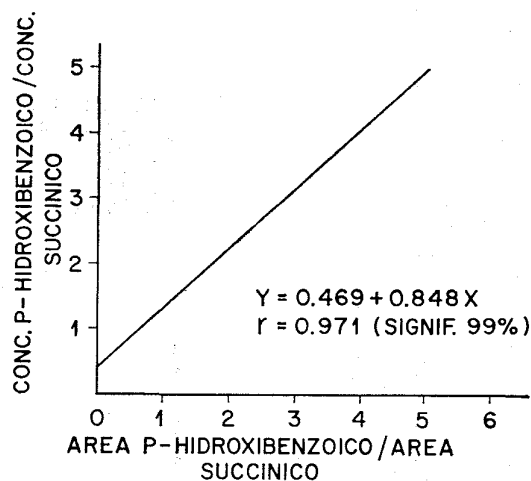


Figura 6 — Relación entre concentración y área del ác. p-hidroxi benzoico respecto al estándar externo ác. succínico.

Podemos señalar también, que los TMSD de los ácidos: sórbico, benzoico y salicílico tienen una respuesta muy similar al análisis por cromatografía gas líquida, siendo diferente la conducta del TMSD del ácido parahidroxibenzoico. Hecho notorio en las ecuaciones de regresión que presentaron dichos ácidos.

CONCLUSIONES

— Los cuatro ácidos estudiados pueden formar TMSD por el método de Sweeley *et al.* (1963).

— Es condición *Sine qua non* al trabajar con TMSD en detectores de ionización de llama (FID) hacer una exhaustiva limpieza de estos después de cada inyección.

RESUMEN

Se dispone de un método analítico mediante cromatografía gas líquida para la cuantificación de agentes conservadores tales como los ácidos: sórbico, benzoico, parahidroxibenzoico y salicílico.

El análisis cromatográfico, se lleva a cabo mediante la formación de los trimetil silil derivados (TMSD) de los ácidos en estudio, usando el método propuesto por Sweeley.

SUMMARY

GAS CHROMATOGRAPHIC DETERMINATION OF SORBIC, BENZOIC, P-HYDROXYBENZOIC AND SALICYLIC ACIDS

An analytical procedure is described for the quantitative estimation by gas chro-

matography of sorbic, benzoic, p-hydroxybenzoic and salicylic acids.

The chromatographic step is performed through the formation of trimethyl silyl derivatives (TMSD) of the analyzed acids, using the method proposed by Sweeley.

LITERATURA CITADA

- BROBST, M. and LOTT, G. 1966. Determination of some components in corn syrup by gas-liquid chromatography of the trimethyl silyl derivatives. *Cereal Chem.*, 43: 35-43.
- CHAMBAZ, E. and HORNING, B. 1967. Esteroid trimethyl silyl ethers. *Anal. Lett.*, 1: 201-203.
- GENEST, C. and CHAPMAN, D. 1960. Procedure for the qualitative extraction of certain antimicrobial. Preservatives from foods. *J. A. O. A. C.*, 43: 483-439.
- GOSSELÉ, J. 1971. Gas chromatographic determination of preservatives in food. *J. Chromatography*, 63: 429-432.
- HALVER, C. VAN DAME. 1960. Chromatographic separation and Ultra Violet spectrophotometric determination of benzoic acid, m-hydroxybenzoic acid, p-hydroxybenzoic acid, and salicylic acid in mixtures. *J.A.O.A.C.* 43: 593-594.
- KLEBE, J., FINKBEINER, H. and WHITE, M. 1966. Silylations with bis (trimethyl silyl) acetamide, a highly reactive silyl donor. *J. Amer. Chem. Soc.* 88: 3390-3395.
- LEWIS, H. M. 1968. Determination of hydroxybenzoates and benzoates in foods. *J.A.O.A.C.*, 51: 876-877.
- NAGASAWA, K., YOSHIDOME, H. and TAKESHITA, R. 1969. Chromatography of food preservatives on polyamide layers and columns. *J. Chromatogr.* 43: 473-479.
- NARAFU, T., HAYAKAWA, J., TAKAHASHI, H. and ISHIDA, Y. 1967. The determination of food additives by gas chromatography. *Shokuhim Eiseigaku Zasshi*, 8: 351-357.
- _____, _____, _____. 1969. Determination of food additives by gas chromatography. *Shokuhim Eiseigaku Zasshi*, 10: 186-189.
- NOMURA, N., HIRAKI, S., YAMADA, M. and SHIHO, D. 1971. Automatic liquid chromatography., 59: 373-381.
- SWELEY, C., BENTLEY, R., MAKITA, M. and WELL, D. 1963. Gas liquid chromatography of trimethyl silyl derivatives of sugar and relatives substances. *J. Amer. Chem. Soc.*, 85: 2497-2507.