

Determinación de conservadores en alimentos mediante cromatografía gas líquida. II. Extracción y cuantificación en alimentos de los ácidos: sórbico, benzoico, parahidroxibenzoico y salicílico¹

Claudio Ciudad Banda²

INTRODUCCION

Como ya se informó en la I Parte de este trabajo, el análisis de conservadores en alimentos, necesariamente, implica enfrentar el problema en dos etapas sucesivas. La primera es la aislación o extracción del principio activo de la matriz, y la segunda, la cuantificación. Habiendo dilucidado esta última,

nos abocaremos en esta II Parte, al estudio del rendimiento de sistemas de extracción.

Desde uno de los primeros trabajos sobre el particular, de Noble y Stanley (1965), en que analizaron benzoato de sodio en carne, extrayendo previamente el conservador con solvente y posterior determinación directa con cromatografía de gases, esta técnica ha sufrido sustanciales modificaciones.

Dos años después Okamoto (1967), en salsa de soya y en alimentos que la contienen, determinó directamente ácido sórbico, ácido dehidroacético, ácido benzoico y ésteres del ácido parahidroxibenzoico usando una columna de dietilen glicol succinato poliéster y

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.

ácido fosfórico (10 : 2). Para extraer los aditivos de la matriz, usó arrastre de vapor y extracción etérea, con el fin de impedir la interacción de los ácidos láctico y levulínico en el extracto. La calidad de la separación por cromatografía gaseosa es discutida, debido a los problemas que presenta este tipo de columna.

Lewis y Schwartzman (1967), proponen un método general para alimentos sólidos y líquidos, en que se combina el arrastre por vapor y la extracción con solvente, siguiendo la marcha del análisis en cromatografía de capa fina y posterior cuantificación por espectrofotometría U. V.

Engst, Prahll y Jarmatz (1969), obtienen buenos resultados utilizando el arrastre de vapor y posterior determinación colorimétrica de los ácidos benzoico y sórbico y los parahidroxibenzoatos en forma diferente por el método de Carrer.

Uno de los más relevantes trabajos sobre esta materia, es el que aporta Gosselé (1971), citado en la I Parte, describe un método por cromatografía gas-líquida, para alimentos en general, utilizando extracción directa con éter etílico-arena. Los extractos así obtenidos son derivados para formar trimetil silil, ésteres que son inyectados en una columna SE-30 al 3% (100-120 mallas) a temperatura programada de 90°C a 290°C, usando un detector de ionización de llama, cuantifica los ácidos: sórbico y benzoico, además de los ésteres del parahidroxibenzoico, metil, etil y propil.

Finalmente, Graveland (1972), describe un método de extracción directa con solvente y ácido ortofosfórico para margarina y productos de panadería. El extracto es inyectado directamente en una columna de Carbo-Wax 20M-ácido tereftálico al 5% en Chromosorb W (AW-DM-C5). Por este método se cuantifica ácido propiónico, ácido sórbico y ácido benzoico.

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 las matrices. Se prepararon dos matrices de la siguiente manera: en forma separada, tomate y mermelada de pera, se sometieron a una homogenización en un aparato minipimer Braun a 12.000 r.p.m., durante dos minutos. A cada homogenizado se

le adicionó 1 gramo por kilogramo de matriz, de los siguientes conservadores: ácido sórbico, ácido benzoico, ácido salicílico y ácido parahidroxibenzoico, los que fueron agregados en mezcla en forma de sal sódica.

Métodos de extracción. En las matrices de tomate en conserva y mermelada de pera, se practicaron las siguientes técnicas de extracción:

a) *Arrastre de vapor:* se propone un método por arrastre de vapor como se detalla a continuación: 20 g de muestra homogenizada fueron colocados junto con 200 g de sulfato de magnesio, 7H₂O y 25 ml de ácido fosfórico, en un matraz Kjeldahl de 100 ml. Esta mezcla se diluyó con agua destilada hasta aproximadamente 350 ml con vigorosa agitación. El matraz Kjeldahl se montó en un equipo de destilación por arrastre de vapor. El destilado se recibió en 50 ml NaOH (4 g/100 ml); hasta recoger aproximadamente 750 ml en embudo de decantación de 1000 ml. El destilado se extrajo con una porción de 100 ml y cuatro de 50 ml de una mezcla de cloroformo y éter etílico (2 : 1). Se agitó cada vez rigurosamente no menos de un minuto, recogiendo los extractos en un vaso de 500 ml. Se evaporó los extractos en un baño de agua hirviendo con ayuda de una corriente de aire en una campana de extracción. En casi sequedad se arrastró el residuo a cápsula de porcelana de 30 ml. Lavando con pequeñas porciones de mezcla de cloroformo-éter sin dejar que se seque. Finalmente, se llevó a sequedad total. El residuo resultante, se redisolvió en 2 ml de piridina con cuidadosa agitación, tratando de lograr una completa disolución. Una alícuota de 1 ml de esta solución se derivó para la formación de trimetil silil compuesto que fue inyectado en el cromatógrafo, de acuerdo a la técnica descrita en la I Parte de este trabajo.

b) *Extracción con disolventes:* el método por extracción directa con disolventes, es una simplificación del método anteriormente descrito, ya que supera la etapa de arrastre de vapor y continúa en la fase que corresponde al método de partición con solventes orgánicos. Veinte gramos de muestra fueron colocados en un embudo de decantación de 1000 ml y diluidos hasta aproximadamente 750 ml con agua destilada. Esta disolución se acidificó con 20 ml de ácido clorhídrico concentrado. Se ex-

trajo con una porción de 100 ml y cuatro porciones de 50 ml cada una, de una mezcla de cloroformo y éter etílico (2 : 1). Se agitó cada vez rigurosamente no menos de un minuto y se recogieron los extractos en un vaso de 500 ml, si se formaban emulsiones, era posible romper éstas con adiciones esporádicas de una solución saturada de cloruro de sodio. El tratamiento de los extractos se llevó en la misma forma del método por arrastre de vapor.

RESULTADOS Y DISCUSION

Habiéndose establecido las técnicas de derivación y condiciones cromatográficas para este tipo de compuestos fase fundamental del trabajo, nos resta establecer aquellas condiciones más apropiadas para una eficiente extracción.

Influencia del tipo de extracción en las áreas desarrolladas por el cromatógrafo.

Tipo de extracción sobre matriz tomate en conserva:

- a) Arrastre de vapor: en el Cuadro 1 y Figura 1, aparecen las áreas de los TMSD de los ácidos sórbico, benzoico y salicílico.

El TMSD del ácido p-hidroxibenzoico no aparece. Esto concuerda con los antecedentes bibliográficos. Gosselé (1971), citado en la I Parte, informa la no volatilización de este ácido en arrastre por vapor de agua.

- b) Extracción con solventes: en el Cuadro 1 Figura 2, aparecen las áreas de los TMSD de los ácidos sórbico, benzoico, salicílico y p-hidroxibenzoico. En este caso aparece el TMSD del ácido p-hidroxibenzoico, pero en forma de trazas. Esto hace suponer que este ácido es poco soluble en la mezcla cloroformo-éter. En todo caso, no es un problema de la formación de TMSD, ya que se deriva y separa perfectamente por cromatografía gas líquido (Figura 2, I Parte).

Tipo de extracción sobre matriz mermelada de pera:

- a) Arrastre de vapor: en el Cuadro 2, Figura 3, aparecen las áreas de los TMSD de los ácidos sórbico, benzoico y salicílico, al igual que en el caso de arrastre por vapor de conserva de tomate, el TMSD del ácido p-hidroxibenzoico no aparece por las mismas razones anotadas anteriormente.
- b) Extracción con solventes: en el Cuadro 2, Figura 4, se da la misma situación que

Cuadro 1 — Influencia de la extracción sobre área de los conservadores.

MATRIZ DE TOMATE

Tipo extracción	a ¹ mm ²				a. promedio ác. succ.	a. sórb. a. succ.	a. benz. a. succ.	a. salic. a. succ.	a. p-h-benz. a. succ.
	ác. sórb.	ác. benz.	ác. salic.	ác. p-h-benz.					
Arrastre vapor 1	56,01	75,92	56,87	—	35.500	1,577	2,137	1,660	—
Arrastre vapor 2	45,82	75,01	49,92	—	36.080	1,271	2,079	1,384	—
Ext. solvente 1	42,47	72,22	61,30	t ²	34.680	1,224	2,081	1,765	—
Ext. solvente 2	49,39	79,74	64,63	t	36.230	1,363	2,199	1,785	—

¹a = área
²t = trazas

Cuadro 2 — Influencia de la extracción sobre área de los conservadores.

MATRIZ DE MERMELADA DE PERA

Tipo extracción	a ¹ mm ²				a. promedio ác. succ.	a. sórb. a. succ.	a. benz. a. succ.	a. salic. a. succ.	a. p-h-benz. a. succ.
	ác. sórb.	ác. benz.	ác. salic.	ác. p-h-benz.					
Arrastre vapor 1	64,20	83,40	48,73	—	37.750	1,847	2,400	1,402	—
Arrastre vapor 2	61,33	72,00	44,00	—	42.350	1,448	1,700	1,038	—
Ext. solvente 1	42,74	51,33	40,00	t ²	37.150	1,150	1,381	1,076	—
Ext. solvente 2	37,80	46,75	44,25	t	39.380	0,960	1,187	1,123	—

¹a = área
²t = trazas

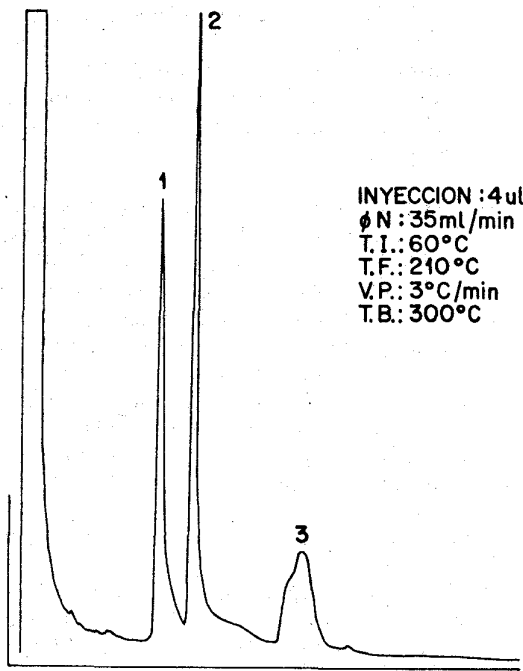


Figura 1 — Muestra: Tomate pelado arrastre vapor.

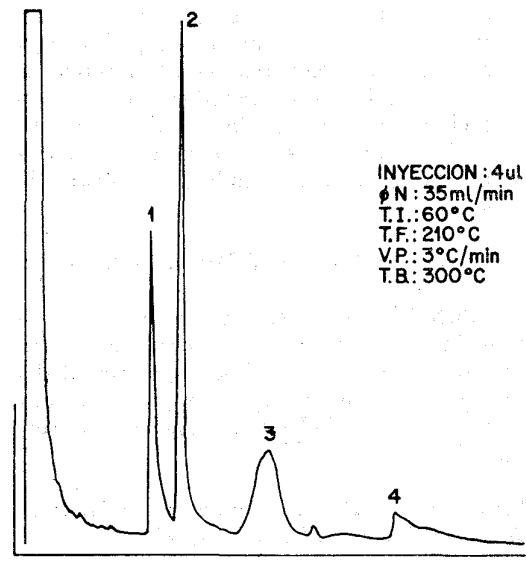


Figura 2 — Muestra: Tomate pelado ext. solvente.

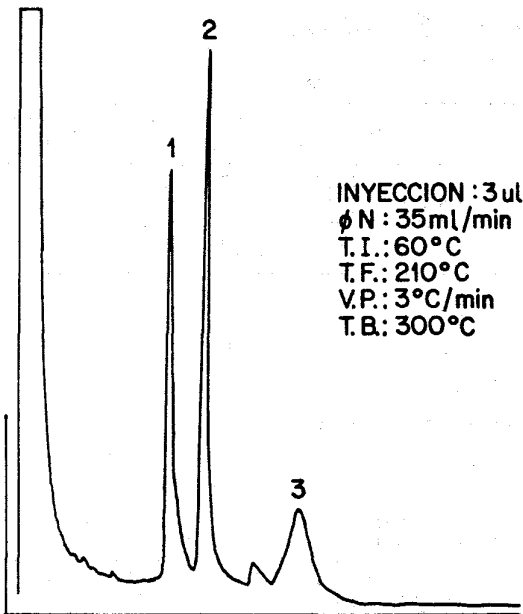


Figura 3 — Muestra: Mermelada pera arrastre vapor.

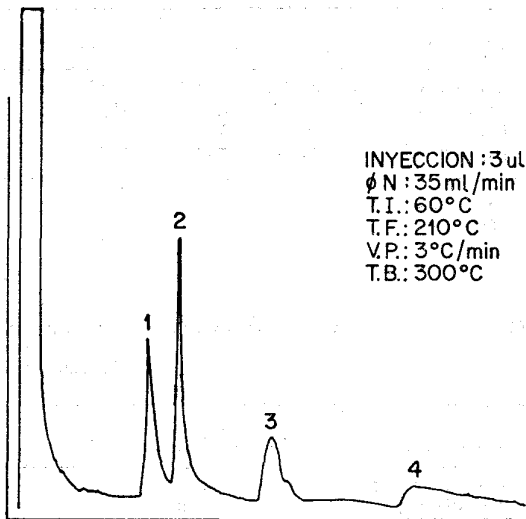


Figura 4 — Muestra: Mermelada pera ext. solvente.

para el tomate en conserva con extracción de solventes, es decir, en el cromatograma aparecen los cuatro TMSD de los ácidos en estudio. Pero el ácido p-hidroxibenzoico está notablemente atenuado y difícil de cuantificar.

Recuperación de los conservadores por arrastre de vapor y extracción con solventes en ambas matrices.

En los Cuadros 1 y 2 aparecen las relaciones en áreas (mm²) de los TMSD de los ácidos sórbico, benzoico y salicílico y el TMSD del estándar externo, ácido succínico. Como se recordará, todas estas áreas corresponden a una concentración de 1 g de conservador por kilogramo de matriz, que en definitiva, por el método seguido, representa una concentración de 10 mg de conservador por ml de piridina. Esta última, es la solución que se hace reaccionar para la formación de TMSD. Por tanto, ésta es la concentración utilizada por el estándar externo.

Los promedios de los valores encontrados son comparados con los promedios de los valores esperados, que corresponden a los calculados por la ecuación de regresión de cada conservador.

Matriz de tomate en conserva:

a) *Arrastre de vapor*: en el Cuadro 3 aparecen los porcentajes de recuperación de los ácidos benzoico, sórbico y salicílico.

Para el ácido sórbico, se esperaba un valor 2,257 que es el que corresponde a una muestra teórica de tomate que contiene 1 g de ácido sórbico por kilogramo

de matriz y que durante el proceso de arrastre no sufre pérdida. Como es obvio, el valor encontrado es más bajo, 1,424. De estos dos valores se calculó el porcentaje de recuperación que en este caso es 63,10. Esto nos indica, que en alguna etapa del proceso no se ha recuperado todo el ácido, ya sea el arrastre de vapor con una baja volatilización y/o la extracción con solventes con un coeficiente de reparto poco conveniente.

Del mismo modo, el ácido benzoico y el ácido salicílico presentan recuperaciones muy dispares, pero reproducibles 94,40 y 75,27 respectivamente.

b) *Extracción con solventes*: al igual que en el caso anterior los valores son dispares, pero reproducibles, que es lo que interesa para nuestros fines. En el Cuadro 3, tenemos los porcentajes de recuperación del ácido sórbico 57,28; ácido benzoico 95,83 y ácido salicílico 89,55. Estos valores son muy parecidos a los obtenidos por arrastre de vapor, lo que nos estaría indicando que las dificultades en la recuperación están en el bajo coeficiente de reparto que tiene la mezcla de disolventes cloroformo-éter (2:1) y que sería inconveniente para los ácidos sórbico y salicílico.

A la luz de estos resultados podemos afirmar que la matriz tomate en conserva no afecta sustancialmente a la calidad de los datos obtenidos por extracción directa con solvente, lo que significa un ahorro de tiempo considerable, al no ser necesario emplear el arrastre de vapor.

Matriz mermelada de pera:

Cuadro 3 — Porcentaje de recuperación de los conservadores en muestras por arrastre de vapor y extracción con solventes.

MATRIZ DE TOMATE

		ác. sórb. ác. succ.	ác. benz. ác. succ.	ác. salic. ác. succ.	ác. p-h-benz. ác. succ.
Arrastre vapor	Valor esperado	2.257	2.233	1.982	0,626
	Valor encontrado	2.108	2.108	1.492	—
	% recuperación	63.10	94.40	75.27	—
Extracción solvente	Valor esperado	2.257	2.233	1.982	0,626
	Valor encontrado	1.293	2.140	1.775	t ¹
	% recuperación	57.28	95.83	89.55	—

¹t = trazas

Cuadro 4 — Porcentaje de recuperación de los conservadores en muestras por arrastre de vapor y extracción con solventes.

MATRIZ DE MERMELADA DE PERA

		ác. sórb. ác. succ.	ác. benz. ác. succ.	ác. salic. ác. succ.	ác. p-h-benz. ác. succ.
Arrastre vapor	Valor esperado	2.257	2.233	1.982	0,626
	Valor encontrado	1.648	2.050	1.220	—
	% recuperación	73.01	91.80	61.55	—
Extracción solvente	Valor esperado	2.257	2.233	1.982	0,626
	Valor encontrado	1.055	1.284	1.099	t ¹
	% recuperación	46.74	57.50	55.44	—

t¹ = trazas

- a) *Arrastre de vapor*: en el Cuadro 4, aparecen los porcentajes de recuperación por arrastre de vapor en mermelada de pera. Para el ácido sórbico 73,01; para el ácido benzoico 91,80 y para el ácido salicílico 65,55 manteniendo la misma tendencia que en los casos anteriores. Alta recuperación para el ácido benzoico y más baja para los otros ácidos.
- b) *Extracción con solventes*: los valores encontrados en el Cuadro 4, demuestran una baja sustancial en la recuperación de los ácidos. Lo que significa una interacción de la matriz sobre el rendimiento de la extracción con solventes. Este fenómeno es citado por Gosselé (1971), al practicar en mermeladas, la extracción de conservadores con una mezcla de arena y disolventes. Los porcentajes de recuperación para los ácidos son: sórbico 46,74; benzoico 57,50 y salicílico 55,44. Ante esta evidencia en que la matriz interactúa sobre el rendimiento de la extracción de los conservadores, lo

recomendable es utilizar el arrastre de vapor.

CONCLUSIONES

— Se propone un método para analizar simultáneamente en alimentos, por cromatografía gas-líquida, a nivel cualitativo y cuantitativo los siguientes conservadores: ácido sórbico, ácido benzoico y ácido salicílico.

— Según sean las características químicas y fisicoquímicas de la matriz se podrá optar por un tipo de separación de conservadores. Si la matriz interactúa con la extracción, es conveniente usar arrastre de vapor, si no fuera así es recomendable hacer una extracción directa con solventes.

— El ácido p-hidroxibenzoico no es posible aislarlo por arrastre de vapor. Sólo es detectable en forma cualitativa al extraerlo con cloroformo-éter (2 : 1).

— La mezcla cloroformo-éter (2 : 1) tiene un bajo coeficiente de reparto para los ácidos sórbico y salicílico.

RESUMEN

Se dispone de un método analítico mediante cromatografía en fase gaseosa para la cuantificación de agentes conservadores de alimentos, tales como los ácidos sórbico, benzoico, parahidroxibenzoico y salicílico.

En la etapa de preparación de la muestra, pre-cromatográfica, se someten a prueba dos métodos extractivos: arrastre por corriente de vapor y extracción por solventes (cloroformo: éter = 2 : 1).

Siguiendo con la marcha analítica corresponde proceder con la cuantificación de los trimetil silil derivados (TMSD) de los ácidos en alimentos, mediante cromatografía gas-líquida, usando el método propuesto por Sweeley.

SUMMARY

EXTRACTION AND QUANTITATIVE EVALUATION OF SORBIC, BENZOIC, P-HYDROXYBENZOIC AND SALICYLIC ACIDS IN FOODS

An analytical procedure is described for the quantitative estimation by gas liquid chromatography of food preservatives, such as sorbic, benzoic, p-hydroxybenzoic and salicylic acids, in foods.

In the pre-chromatographic preparative step of the sample, two different methods of extraction were tested: steam distillation and extraction by solvents (Chloroform: ether = 2:1).

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

ENGST, R., PRAHL, L. and JARMATZ, E. 1969. Analysis of preservatives. *Nahrung.*, 13: 417-426.

GRAVELAND, A. 1972. Gas chromatographic determination of propionic, sorbic and benzoic acids in rye bread and margarine. *J.A.O.A.C.*, 55: 1024-1026.

LEWIS, H. M. and SCHWARTZMAN, G. 1967. Benzoates in Foods. *J.A.O.A.C.*, 50: 985-989.

NOBLE, B. and STANLEY, R. 1965. Gas chromatographic determination of sodium benzoate in meat. *J.A.O.A.C.*, 48: 791-793.

OKAMOTO, T. 1967. Gas chromatographic studies in the foods preservatives in soy sauce and some foods containing soy sauce. *Kagasawa Ken Hakko shokukin shikenjo Hokoku*, 59: 40-46.