

Determinación y cuantificación simultánea de conservantes por electroforesis capilar

Williner, María R.¹; Sobrero, María S.²

1- Química Analítica II.

2- Química General. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (UNL). 3000 Santa Fe. E-mail: williner@fcb.unl.edu.ar

RESUMEN: El uso de benzoato de sodio y sorbato de potasio como conservantes está ampliamente difundido. Su cuantificación en jugos es una preocupación tanto de industriales como de los entes de control. En el presente estudio se propuso utilizar electroforesis capilar para cuantificar simultáneamente ambos compuestos, determinando las condiciones experimentales para aplicarlo a jugos de naranja.

Las condiciones de corrida adoptadas fueron: 240 nm de longitud de onda, Buffer: borato de sodio 35 mM, 25 kV y 25 °C.

El método desarrollado permite identificar y cuantificar simultáneamente los dos conservantes estudiados en jugos, en forma rápida (menos de 6 minutos) y sencilla. Evita las complejas tareas de preparación de la muestra y el uso de grandes volúmenes de solventes de los otros métodos comúnmente usados.

Palabras claves: sorbato de potasio - benzoato de sodio - electroforesis capilar - jugos.

SUMMARY: Simultaneous determination of preservatives by capillary electrophoresis. Williner María R.¹; Sobrero María S.²

The use of sodium benzoate and potassium sorbate as preservatives is widely spread. Quantification of these compounds has been worrying industrialists and control institutions. In the present study, capillary electrophoresis was used for the simultaneous identification of these compounds. The separation was achieved at 25 kV, at 25 °C using 35 mM, pH 9.3 borate buffer as background electrolyte.

This method allows fast (less than 6 minutes), simple and simultaneous identification and assessment of both preservatives in orange juices. Thus, it allows us to avoid complex sample clean up and the use of large quantities of organic solvents, as happen when other methods are used.

Keys words: potassium sorbate - sodium benzoate -capillary electrophoresis - juices.

Introducción

La utilización de conservantes químicos como benzoato de sodio y sorbato de potasio está ampliamente difundida en la industria de los alimentos (1-4). En las bebidas a base de jugos de fruta, gaseosas y/o jugos concentrados, se los puede agregar respetando las concentraciones permitidas por la legislación vigente (5-14). Su cuantificación es una preocupación actual tanto de industriales como de los entes de control, por la necesidad de:

- Controlar la pureza de los compuestos que se agregan.
- Controlar su presencia en alimentos que no lo declaran en sus etiquetas.
- Controlar la concentración en alimentos que los declaran.
- Controlar la concentración en jugos concentrados y/o cremogenados que se utilizan en la formulación de bebidas que no utilizan conservantes químicos para preservar su calidad.
- Monitorear la concentración en función del tiempo, debido a la existencia de mohos y levaduras capaces de degradarlos, entre otras razones (15-18).

Los métodos disponibles para determinar sorbato de potasio y benzoato de sodio son numerosos e incluyen entre otros espectrofotometría, HPLC (19).

Nota:

El presente trabajo fue presentado: Williner MR, Sobrero MS. Determinación de conservantes por electroforesis capilar. Congreso de Químicos Analíticos. Rosario. Argentina. 6 y 7 de diciembre de 2001.

Recientemente se ha comenzado a utilizar la electroforesis capilar, que involucra a una familia de técnicas relacionadas basadas en la separación de sustancias en un campo eléctrico. Este proceso de separación se produce dentro de capilares de estrecho calibre (5-100 μm). Existen diferentes modos de electroforesis capilar, siendo el más común la electroforesis capilar zonal o en solución libre (20-21). En este tipo de separación, la muestra se inyecta dentro del capilar, que contiene un electrolito buffer. Cuando se aplica un voltaje, los solutos migran a través del capilar, separándose según su movilidad electroforética y el flujo electroosmótico (21). Es una técnica versátil, pues puede aplicarse tanto para la separación de moléculas grandes como pequeñas (22). Actualmente, se la reconoce entre otras ventajas, por su alta eficiencia, rapidez, bajo volumen de muestra requerido, aplicabilidad a sustancias polares y no polares (23).

La bibliografía cita la posibilidad de resolver el benzoato de sodio y sorbato de potasio con esta técnica, trabajando con un buffer de corrida de $\text{pH} = 9,3$ adicionado de 5 % de acetonitrilo (24).

El objetivo de este trabajo fue establecer las condiciones experimentales para la determinación simultánea por electroforesis capilar, de benzoato de sodio y sorbato de potasio presentes en jugo de naranja, en el menor tiempo posible y sin el agregado de solventes orgánicos en el buffer.

Materiales y Métodos

Instrumentos

Equipo de Electroforesis capilar SpectraPHO-RESIS 100. Detector UV variable (Thermo Separation Products, San José, California, USA). Los capilares de sílice de 75 μm de diámetro interno, 70 cm longitud total y 42 cm de longitud efectiva, fueron provistos por la misma empresa.

Filtros

Filtros de acetato de celulosa de 0,20 μm , marca Sartorius.

Reactivos y muestras

Todas las experiencias fueron realizadas con agua destilada ultrapura. Las soluciones estándares utilizadas fueron sorbato de potasio 1000 mg l^{-1} y benzoato de sodio 1000 mg l^{-1} .

Se trabajó con muestras artificiales preparadas con jugo de naranja natural y los conservantes estudiados. Estas fueron clarificadas mezclando volumen a volumen con etanol 80%.

Se emplearon muestras comerciales que también fueron clarificadas. Tanto los estándares, como las muestras artificiales y las comerciales fueron filtradas y desgasificadas, antes de cada corrida electroforética.

Se trabajó con buffer borato de sodio 35 mM, $\text{pH} = 9,3$ con y sin agregado de acetonitrilo.

Para evaluar estadísticamente los resultados se utilizó el programa Statgraphics 3.0, licenciado por la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Litoral.

Resultados

Determinación de las condiciones experimentales

La longitud de onda de trabajo fue seleccionada analizando los espectros individuales de los dos conservantes puros. Como resultado de este estudio, fue elegida la $\lambda = 240 \text{ nm}$, ya que a dicha longitud de onda los dos compuestos mostraron tener coeficientes de extinción molar similares.

El buffer de corrida, borato de sodio 35 mM, se eligió teniendo en cuenta las características químicas de los analitos y los datos obtenidos de la bibliografía (24).

Para seleccionar el voltaje se realizaron corridas a 15 kV, 18 kV, 20 kV, 22 kV y 25 kV. A todos estos voltajes se obtuvo una buena Resolución entre los picos, pero la aparición de los mismos fue a tiempos diferentes. La ecuación 1 permite calcular la Resolución (21-23) como:

$$R = \frac{2(t_2 - t_1)}{w_1 + w_2} \quad (\text{Ecuación 1})$$

donde t_1 y t_2 representan los tiempos de migración de los analitos 1 y 2, y w_1 y w_2 , son los ancho de zona de los picos medidos sobre la línea de base. Se considera que las dos especies están resueltas cuando R es mayor a 1,5. Como era de esperar, los tiempos de migración de ambos analitos disminuyeron a medida que se aumentó el voltaje de trabajo. A 15 kV, los picos muy bien resueltos, tardaron mucho en aparecer. Cuando las corridas se realizaron a 20 kV,

los dos picos aparecieron alrededor de los 10 minutos, y a 25 kV los tiempos de migración fueron menores a los 6 minutos, con una muy buena resolución.

Cuando se agregó acetonitrilo al buffer de corrida los tiempos de migración fueron mayores con disminución de la intensidad de corriente.

La temperatura de trabajo fue 25 °C, que por las características del instrumento es la más baja que se puede reproducir.

Por lo tanto, las condiciones de trabajo se establecieron a $\lambda = 240$ nm, buffer de corrida borato de sodio 35 mM, 25 kV y 25 °C.

Identificación de los picos

Una vez establecidas las condiciones de trabajo utilizando una solución estándar con los dos conservantes, se procedió a realizar corridas con cada uno de los estándares por separado para determinar el tiempo de migración de los mismos, siendo el orden de aparición, primero sorbato de potasio y luego benzoato de sodio.

Electroferogramas obtenidos

En la Figura 1 se muestra el electroferograma obtenido utilizando las condiciones propuestas por Cancalon: buffer borato de sodio de pH = 9,3, conteniendo 5 % de acetonitrilo (v/v), voltaje = 20 kV, temperatura = 23 °C. La separación de ambos compuestos se logró en 12 minutos.

Cuando se realizó la corrida electroforética de la solución estándar formada por una mezcla de partes iguales de benzoato de sodio 1000 mg l⁻¹ y de sorbato de potasio 1000 mg l⁻¹, bajo las condiciones establecidas en este trabajo, se obtuvo el resultado que se muestra en la Figura 2.

Luego se corrieron distintas muestras artificiales de jugo de naranja adicionados con ambos conservantes a diferentes concentraciones. En la Figura 3 se muestra el electroferograma obtenido cuando al jugo natural de naranja se le adicionó 250 mg l⁻¹ de sorbato de potasio y 250 mg l⁻¹ de benzoato de sodio.

Cuando se analizaron muestras comerciales que no declaran el agregado de conservantes (en envases tetrapack), se observó la presencia de sorbato de potasio y de benzoato de sodio, posiblemente por estar presentes en los concentrados de naranja con que fueron fabricados (Figura 4).

Validación

Linealidad

Para verificar la linealidad del método se realizaron, para los dos conservantes, las gráficas de calibración: Área vs. Concentración (25). Se trabajó por triplicado a seis niveles de concentración (50,0 – 100,0 – 200,0 – 300,0 – 400,0 – 500,0 mg l⁻¹). Los estimadores de regresión se muestran en la Tabla 1.

Para comprobar la idoneidad del modelo lineal se aplicó un ANOVA, analizando conjuntamente el coeficiente de determinación (R²) que orienta sobre el porcentaje de la variación que ha sido explicada por el modelo. Para sorbato de potasio R² = 99,77 % y para benzoato de sodio R² = 99,76 %. El análisis de la varianza reafirma que el modelo elegido es altamente significativo para los dos conservantes ($p \leq 0,0001$).

Precisión

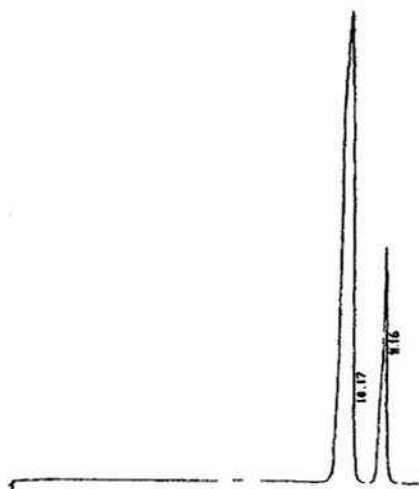
La precisión del sistema (25) para ambos conservantes se determinó haciendo cinco réplicas para tres niveles de concentración de los estándares (50,0 – 250,0 – 500,0 mg l⁻¹), en condiciones repetitivas (mismo analista, mismo día, mismo instrumento).

La precisión del método, que corresponde a todo el procedimiento, desde la preparación de la muestra hasta la medición del analito por parte del instrumento, se determinó para una concentración de 250,0 mg l⁻¹. Los valores se muestran en la Tabla 2.

Exactitud

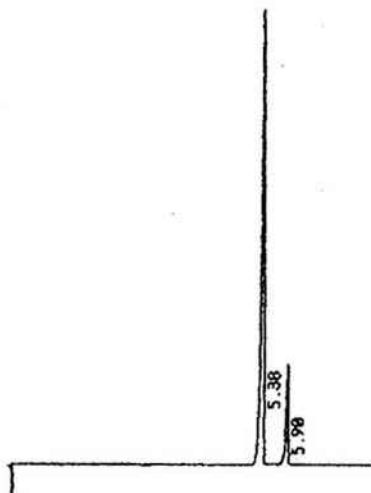
El porcentaje de recuperación del método se calculó preparando jugos naturales, a los que se adicionó cantidades conocidas de benzoato de sodio y sorbato de potasio. Se evaluaron tres niveles de concentración de cada uno (50,0 – 250,0 – 500,0 mg l⁻¹) por triplicado. Las recuperaciones promedio se presentan en la Tabla 2.

Figura 1: Separación de sorbato de potasio y benzoato de sodio en la disolución estándar utilizando buffer borato de sodio 35 mM adicionado de acetonitrilo, T = 23 °C y 20 kV.

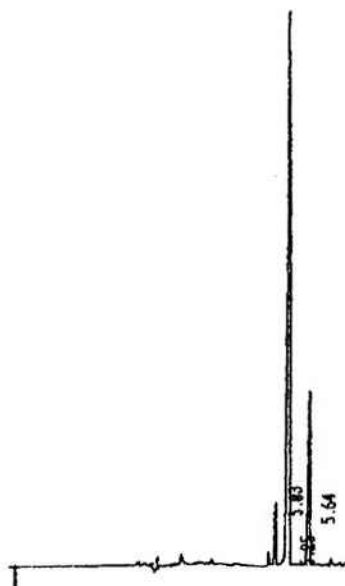


Sorbato de potasio: 10.17 minutos.
Benzoato de sodio: 11.16 minutos.

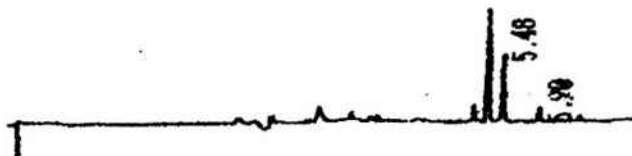
Figura 2: Separación de sorbato de potasio y benzoato de sodio en la disolución estándar: Buffer borato de sodio 35 mM, V= 25kV, T= 25°C



Sorbato de potasio: 5.38 minutos
Benzoato de sodio: 5.90 minutos

Figura 3: Muestra artificial de jugo natural de naranja + 250 mg l⁻¹ de cada conservante

Pico desconocido: 5.03 minutos
Sorbato de potasio: 5.25 minutos.
Benzoato de sodio: 5.64 minutos.

Figura 4: Muestra comercial con conservantes no declarados

Sorbato de potasio: 5.48 minutos.
Benzoato de sodio: 5.90 minutos.

Tabla 1: Estimadores de linealidad de las curvas de calibración, para benzoato de sodio y sorbato de potasio, por electroforesis capilar. Modelo $Y = bX + a$

Analito*	Parámetros**	Estimación	Error Estándar	t-test	P justo
Sorbato	a	253173,0	35490,1	7,1332	0,0000
	b	7962,35	107,0	74,4098	0,0000
	r	0,9988			
Benzoato	a	34947,9	7812,1	4,4735	0,0000
	b	1730,86	23,6	73,4828	0,0000
	r	0,9988			

* Cada analito con seis estándares y tres replicaciones.

** a: ordenada al origen.

b: pendiente.

r: coeficiente de regresión lineal.

Tabla 2: Parámetros de validación del método

Cifras de mérito	Sorbato de potasio	Benzoato de sodio
RSD % sistema (50 mg l ⁻¹)	3,1	2,2
RSD % sistema (250 mg l ⁻¹)	2,1	1,9
RSD % sistema (500 mg l ⁻¹)	2,0	1,7
RSD % método (250 mg l ⁻¹)	2,1	1,9
Recuperación % (50 mg l ⁻¹)	90,3 ± 1,4	96,0 ± 1,1
Recuperación % (250 mg l ⁻¹)	91,0 ± 4,8	93,5 ± 4,4
Recuperación % (500 mg l ⁻¹)	95,0 ± 9,0	97,0 ± 8,2

Conclusiones

El método desarrollado permite identificar y cuantificar simultáneamente sorbato de potasio y benzoato de sodio en jugo de naranja, en forma rápida (menos de 6 minutos), económica, sencilla y sin el empleo de solventes orgánicos.

Bibliografía

- 1- Block, S. 1991. Disinfection, sterilization and preservation. 4th Edition.
- 2- CRC. Handbook of food additives. 1975. 2nd Edition. Ed. Thomas E. Furia. Palo Alto California.
- 3- Fulton, K. 1980. Surveys of industry on the use of foods additives. Food Technology. December. 80-83.
- 4- Russell, A; Hugo, W; Ayliffe, G. 1992. Principles and Practice of disinfections, preservation and sterilization. A 2nd edition. Blackwell Scientific Publications.
- 5- 1992. CODEX ALIMENTARIUS. Zumos de fruta y productos afines. Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias. Volumen 6.
- 6- 1992. Código Alimentario Argentino. Zumos (jugos) normas alimentarias. Marzochi. Ediciones Argentinas. 6: 259-260.
- 7- Araujo, P. 1977. Role of citrus fruit in human nutrition. Citrus Science and Technology. The Avi publishing Company, Inc. Westport. Connecticut. 1:1-69.
- 8- Baird-Parker, A; Kooiman, W. 1980. Soft drinks, fruit juices, concentrates and preserves. In Microbial Ecology of Foods. Vol. II. Food Commodities, International Commission on Microbiological Specification for Foods, Academic Press. London.
- 9- Gareis, M, Bauer, J; von Nontgela, A; Gedek, B. 1984. Stimulation of aflatoxin B, and T₂ toxin production by sorbic acid. Appl. Environ. Microbiol. 47:416-418.
- 10- Nagy, S. 1993. Fruit Juice Processing Technology. Edited by Steven Nagy, Chin Shu Chan, Philip Shaw. AGSCIENCE, INC. Auburndale, Florida. USA
- 11- Nagy, S; Shaw, P; Veldhius, M. 1977. Citrus Science and Technology. Nutrition, Anatomy, Chemical Composition and Bioregulation. The Avi Publishing Company, Inc. Westport. Connecticut. USA. Vol 1.
- 12- Rouseff, R; Nagy, S. 1994. Health and Nutrition Benefits of Citrus Fruit Components. Food Technology. 125-132.
- 13- Somogyi, LP; Ramaswamy, HS; Hui, YH. 1996. Processing fruit Science. Technomic Publishing Company, Inc. Lancaster. Pennsylvania. USA.
- 14- Ting, S; Russell, L. 1986. Citrus fruit and their products. Analysis and Technology. Ed. by Tannenbaum, S; Walstra, P. Florida Department of Citrus. Lake Alfred, Florida. USA.
- 15- Nielsen, P; Beuchat, L; Frisvad, J. 1989. Growth and fumitremorgin production by *Neosartorya fischeri* as affected by food preservatives and organic acids. J. Appl. Bacteriol. 66: 197-207.
- 16- Rajashekara, E; Suresh, E; Ethiraj, S. 1998. Thermal death rate of ascospores of *Neosartorya fischeri* ATCC 200957 in the presence of organic acids and preservatives. Journal of Food Protection. 61: 1358-1362.
- 17- Rajashekara, E; Suresh, E; Ethiraj, S. 2000. Modulation of thermal resistance of ascospores of *Neosartorya fischeri* by acidulants and preservatives in mango and grape juice. Food Microbiology. 17: 269-275.
- 18- Roland, JO. 1984^b. Effects of sorbate, benzoate, sulfur dioxide and temperature on growth and patulin production by *Byssoschlamys nivea* in grape juice. J. Food. Prot. 47: 237-241.
- 19- Montano, A; Sanchez, AH; Rejano, L. 1995. Determination of benzoic and sorbic acids in packaged vegetable products. Analyst. 120 (10): 2483-2487.
- 20- Guzmán, N. 1993. Capillary Electrophoresis Technology. Marcel Dekker Inc. (New York), 857.
- 21- Baker, DR. 1995. Capillary electrophoresis. John Wiley & Sons, Inc.(New York), 54.
- 22- Grossman, PD; Colburn, JC. 1992. Capillary electrophoresis. Theory and practice. Academic Press, Inc., (San Diego).
- 23- Kuhn, R; Hoffstetter-Kuhn, S. 1993. Capillary electrophoresis: principles and practice. Springer Laboratory (Berlin).
- 24- Cancalon, PF.1999. Analytical monitoring of citrus juices by using capillary electrophoresis. J. AOAC.82 (1):95-106.
- 25- Quattrocchi, OA; Abelaira de Andrizzi, SI; Laba, RF. 1992. Introducción a la HPLC. Aplicación y práctica. Artes Gráficas Faro S.A. (Buenos Aires).