



Departamento de Química Analítica  
Universidad de Córdoba



**PREPARACION AUTOMATICA DE ALIMENTOS  
PARA LA DETERMINACION DE ADITIVOS  
POR CROMATOLOGRAFIA**

Tesis Doctoral

**Mónica González González**

Córdoba, Febrero 2003







**PREPARACION AUTOMATICA DE ALIMENTOS PARA LA DETERMINACION  
DE ADITIVOS POR CROMATOGRAFIA**

LOS DIRECTORES,

Fdo. Miguel Valcárcel Cases  
Catedrático del Departamento de  
Química Analítica de la  
Universidad de Córdoba

Fdo. Mercedes Gallego Fernández  
Profesora Titular del Departamento  
de Química Analítica de la  
Universidad de Córdoba

Trabajo presentado para aspirar  
al Grado de Doctor en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

LA DOCTORANDA,

Fdo. Mónica González González  
Licenciada en Ciencia y Tecnología de los Alimentos  
Licenciada en Ciencias Químicas



**Miguel Valcárcel Cases**, Catedrático del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Córdoba y **Mercedes Gallego Fernández**, Profesora Titular del citado Departamento, en calidad de directores de la Tesis Doctoral presentada por la Licenciada en Ciencia y Tecnología de los Alimentos y en Ciencias Químicas, Mónica González González.

**CERTIFICAN:** Que la Tesis Doctoral “PREPARACION AUTOMATICA DE ALIMENTOS PARA LA DETERMINACION DE ADITIVOS POR CROMATOGRAFIA” ha sido desarrollada totalmente en los Laboratorios del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Córdoba y del Departamento de Ingeniería Química y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de La Laguna, y que a nuestro juicio, reúne todos los requisitos exigidos a este tipo de trabajo.

Y para que conste y surta los efectos pertinentes, expiden el presente certificado en la ciudad de Córdoba, a 29 de Enero de 2003.

**MIGUEL VALCARCEL CASES**

**MERCEDES GALLEGO FERNÁNDEZ**





Son muchas las personas que, de una forma u otra, han contribuido a que esta tesis sea una realidad. A todas deseo expresar mi más profundo agradecimiento. No obstante, quisiera referirme de forma especial a mis padres y a Sara, mi hermana, por el apoyo y comprensión que siempre he encontrado en ellos, así como a Jorge porque, a pesar del sacrificio que ha supuesto este trabajo, siempre ha estado a mi lado.

Tal consideración la hago extensiva a mis directores de Tesis, los Dres. D. Miguel Valcárcel y Doña Mercedes Gallego. A la Dra. Gallego, por su adecuada orientación y consejos, y porque además de directora, ha sido una amiga que me ha brindado su constante apoyo, impulso y cariño. Al Dr. Valcárcel, por darme la oportunidad de introducirme en el mundo de la Ciencia y por sus inestimables consejos, fruto de su amplia experiencia.

Asimismo, quiero agradecer al Dr. D. Evaristo Ballesteros Tribaldo, el haberme transmitido el amor por la cromatografía y al Dr. D. Luis Antonio González Mendoza, su acogida en el Departamento de Ingeniería Química y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de La Laguna, así como sus acertadas orientaciones.

A los responsables de los Departamentos de Química Analítica de la Universidad de Córdoba y de Ingeniería Química y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de La Laguna, así como del Instituto Canario de Investigaciones Agrarias, deseo manifestarles mi gratitud por las facilidades y apoyo que siempre me brindaron para la realización de este trabajo



A mis padres  
A Sara  
A Jorge







## INDICE

<b>INTRODUCCION GENERAL</b>	17
<b>1. Generalidades sobre los aditivos alimentarios</b>	19
1.1. Definición de aditivo	19
1.2. Clasificación de aditivos alimentarios	24
1.3. Regulaciones sobre aditivos alimentarios	28
1.4. Consideraciones toxicológicas	35
1.5. Concepto y criterios para fijar las dosis de uso de los aditivos alimentarios	38
1.6. Procedimientos legales de autorización de empleo de aditivos	45
1.7. Legislación de aditivos alimentarios	48
<b>2. Grupos de aditivos objeto de estudio en esta Tesis Doctoral</b>	58
2.1. Aditivos de mejora de la conservación	58
2.1.1. Antioxidantes	58
2.1.2. Conservantes o Conservadores	72
2.2. Aditivos de mejora de las cualidades sensoriales	85
2.2.1. Colorantes	85
<b>3. Metodologías para la determinación de aditivos antioxidantes, conservantes y colorantes en alimentos</b>	98
3.1. Pretratamiento de la muestra: extracción y limpieza	98
3.2. Determinación, separación y detección de aditivos alimentarios	107
3.3. Identificación de aditivos alimentarios	111
3.4. Automatización y miniaturización	115
3.5. Sistemas de screening	117
<b>Referencias</b>	119
<b>OBJETIVOS Y RESUMEN DE CONTENIDOS</b>	133
<b>CAPITULO I. HERRAMIENTAS ANALITICAS</b>	139
<b>CAPITULO II. ANTIOXIDANTES Y CONSERVANTES</b>	159
<b>Introducción</b>	161
<b>II.1. Continuous-flow determination of natural and synthetic antioxidants in foods by gas chromatography</b>	167
<b>II.2. Simultaneous gas chromatographic determination of</b>	189

<b>food preservatives following solid–phase extraction</b>	
<b>II.3. Gas chromatographic flow method for the preconcentration and simultaneous determination of antioxidant and preservative additives in fatty foods</b>	211
<b>CAPITULO III. COLORANTES SINTÉTICOS Y NATURALES</b>	233
<b>Introducción</b>	235
<b>III.1. Automatic screening method for the rapid and simple discrimination between synthetic and natural colorants in foods</b>	239
<b>III.2. Determination of natural and synthetic colorants in prescreened dairy samples using liquid chromatography– diode array detection</b>	265
<b>III.3. Liquid chromatographic determination of natural and synthetic colorants in lyophilized foods using an automatic solid–phase extraction system</b>	301
<b>CAPITULO IV. RESULTADOS Y CONCLUSIONES</b>	331
<b>IV.1. Discusión general de los resultados</b>	333
<b>IV.2. Conclusiones</b>	399
<b>IV.3. Futuras líneas de investigación</b>	401
<b>Referencias</b>	402
<b>ANEXOS</b>	405
<b>Anexo A. Acrónimos</b>	407
<b>Anexo B. Producción científica fruto de esta Memoria</b>	411



**INTRODUCCION GENERAL**



## 1. GENERALIDADES SOBRE LOS ADITIVOS ALIMENTARIOS

### 1.1. Definición de aditivo

No hay una definición clara y única de los aditivos alimentarios, ya que se pueden encontrar distintas definiciones tanto en los diccionarios como en los acuerdos internacionales y las legislaciones.

El Diccionario de la Real Academia Española define un **aditivo** como *“aquella sustancia que se agrega a otras para darles cualidades de que carecen o para mejorar las que poseen”*.

Las legislaciones nacionales, relacionadas con las Directivas de la Unión Europea (UE) y con acuerdos internacionales, adoptan la siguiente definición de **aditivo alimentario** recogida en el Real Decreto 3177/1983, de 16 de noviembre [1] y en la Directiva Comunitaria 89/107/CEE del Consejo de 21 de diciembre de 1988 [2]: *“any substance not normally consumed as a food in itself and not normally used as a characteristic ingredient of food whether or not it has nutritive value, the intentional addition of which to food for a technological purpose in the manufacture, processing, preparation, treatment, packaging, transport or storage*

*of such food results, or may be reasonably expected to result, in it or its by-products becoming directly or indirectly a component of such foods”.*

Esta definición es compleja y en ella hay que destacar algunos aspectos sobre los aditivos:

- son sustancias que normalmente no se consumen como un alimento en sí,
- no son ingredientes utilizados habitualmente en los alimentos,
- pueden o no poseer valor nutritivo,
- su utilización es deseada y está motivada por necesidades que surgen en el proceso de fabricación, en el almacenamiento o en la venta,
- el aditivo o sus derivados pueden llegar a convertirse en un componente del alimento, y
- la presencia del aditivo en el alimento como componente será como consecuencia de la adición directa, mediante aportación de un ingrediente que contiene dicho aditivo en tal proporción que el aditivo continuará ejerciendo su función en el producto terminado o mediante formación del aditivo como consecuencia de una acción biológica, física o química sobre el alimento.

De todas estas observaciones hay que subrayar que los aditivos son sustancias empleadas intencionadamente, que producen efectos funcionales permanentes y que no se consideran generalmente como alimentos.

Otra definición que debemos destacar es la elaborada en las primeras reuniones de la Comisión del Codex Alimentarius, en 1963, para ser introducida en el manual de procedimiento del Codex [3] y que se mantiene en la actualidad. Un **aditivo alimentario** es: *“toda sustancia que no se consume normalmente, aunque tenga carácter alimenticio y que no sea usada habitualmente como ingrediente característico de un alimento; tenga o no tenga valor nutritivo se añade intencionadamente a un alimento con un fin tecnológico u organoléptico, en cualquier fase de la fabricación, de la transformación, del tratamiento, del acondicionamiento, del envasado, del transporte o del almacenamiento del referido alimento y que puede afectar o afecta (directa o indirectamente) su incorporación o la de sus derivados en el alimento o puede afectar de otra manera las características de dicho alimento. La expresión no se aplica ni a los contaminantes ni a las sustancias añadidas a los alimentos con el objeto de mantener o mejorar sus propiedades nutritivas”*.

En esta definición se hace hincapié en la diferencia entre un aditivo que se añade intencionadamente y un contaminante (ej. microorganismos y sus toxinas, metales pesados, productos fitosanitarios) cuya presencia en el alimento no es intencionada.

En general hay que destacar el consenso a que se ha llegado, a través de los años, para conseguir en todos los países una definición común de un aditivo alimentario. Hay que indicar que es habitual reservar un estatuto especial a los aditivos de los productos dietéticos y de régimen, a las sustancias añadidas a los

productos alimenticios como productos nutritivos (vitaminas, oligoelementos, aminoácidos, etc), a los coadyuvantes tecnológicos y a los aromas.

De forma más específica hay que destacar que las Organizaciones Internacionales y en particular el Consejo de Europa y el Codex Alimentarius, han establecido distinciones entre las sustancias que ejercen sobre el alimento un efecto funcional permanente (los aditivos alimentarios propiamente dichos) y los que intervienen sencillamente con efecto transitorio (los auxiliares o coadyuvantes tecnológicos). Los **coadyuvantes tecnológicos** se definen como [2] *“cualquier sustancia que no se consuma como ingrediente alimenticio en sí, que se utilice intencionadamente en la transformación de materias primas, de productos alimenticios o de sus ingredientes, para cumplir un objetivo tecnológico determinado durante el tratamiento o la transformación, y que pueda tener como resultado la presencia no intencionada, pero técnicamente inevitable, de residuos de dicha sustancia o de sus derivados en el producto acabado, siempre que dichos residuos no presenten riesgo sanitario y no tengan efectos tecnológicos sobre el producto acabado”*.

El aditivo ha de intervenir siempre con un objetivo preciso de orden sensorial, tecnológico o nutricional y además esta sustancia no debe representar un riesgo para la salud. Las definiciones y los principios generales relacionados con los aditivos alimentarios hacen habitualmente referencia al interés de los consumidores [1–3]. Los representantes de éstos han aclarado desde hace tiempo cuáles deben ser los criterios de admisibilidad de los aditivos

para preservar el interés de los consumidores. Estos criterios pueden resumirse en los siguientes [4]:

- **Seguridad.** Un aditivo no debe presentar un peligro para la salud de los consumidores; los productos aprobados como aditivos y su empleo deben estar inscritos en las listas positivas autorizadas y ser sometidos a los controles oficiales.
- **Honestidad.** Un aditivo no debe incitar a engaños dando a los alimentos características químicas o físicas que produzcan confusión o enmascaren una pérdida de calidad.
- **Necesidad tecnológica.** Debe estar probada la necesidad de la adición y corresponder a un objetivo que tenga en cuenta no solamente el interés de los productores sino también el de los consumidores.
- **Control.** El empleo de un aditivo debe controlarse, lo que implica la existencia de métodos de análisis, de confianza y practicables en los laboratorios de análisis de rutina y de control.
- **Revisión de las autorizaciones.** Es recomendable que el número de aditivos autorizados sea el más bajo posible. Esto deberá conducir a los organismos consultados a que si proponen un nuevo aditivo, al mismo tiempo, si es posible, se recomiende suprimir otros que tengan las mismas funciones.
- **Etiquetado.** El empleo de los aditivos debe indicarse en las etiquetas, para que el consumidor esté informado de dicho uso.

Las funciones que los aditivos alimentarios cumplen en los alimentos se resumen en:

- aumentar el tiempo de conservación o la estabilidad de un alimento o mejorar sus propiedades sensoriales, siempre que no se altere la naturaleza, la esencia o la calidad del alimento de una manera que pueda engañar al consumidor,
- ayudar a la fabricación, transformación, preparación, tratamiento, envasado, transporte o almacenamiento de alimentos; siempre que no se utilice el aditivo para disimular el uso de materias primas defectuosas o de métodos indeseables a lo largo de cualquiera de dichas actividades,
- conservar la calidad nutritiva de los alimentos.

Es importante destacar que el uso de los aditivos en los alimentos es la respuesta de la industria alimentaria a las exigencias de los consumidores habituales, creando alimentos elaborados que estén disponibles en cantidades suficientes, cualquiera que sea el lugar y la época del año, que tengan precios razonables, cuya conservación y uso sea fácil y que tengan una adecuada calidad sanitaria, sensorial y nutricional.

## **1.2. Clasificación de aditivos alimentarios**

Existen muchos métodos de clasificación de los aditivos: el orden alfabético, la numeración de cada sustancia dentro de un conjunto de compuestos químicos o una clasificación por funciones químicas. Lo que

---



prevalece, generalmente, es su agrupación por categorías funcionales, es decir, en consideración al empleo previsto, siendo éste el tipo de clasificación elegido en las legislaciones española [1], de la UE [2] y en el Codex Alimentarius [3].

La UE establece una clasificación de los aditivos en veinticuatro categorías:

Colorantes	Conservantes
Antioxidantes	Emulgentes
Sales de fundido	Espesantes
Gelificantes	Estabilizadores
Potenciadores del sabor	Acidulantes
Correctores de acidez	Antiaglomerantes
Almidones modificados	Edulcorantes
Gasificantes	Antiespumantes
Agentes de recubrimiento	Agentes de tratamiento de la harina
Endurecedores	Humectantes
Secuestrantes	Enzimas
Agentes de carga	Gases propulsores y gases de envase

La inclusión de los aditivos alimentarios en alguna de estas categorías se efectúa de acuerdo con la función principal que normalmente se les asocia. Sin embargo, la clasificación en una categoría particular no excluye la posibilidad de que dicho aditivo pueda ser autorizado para otras funciones.

El Codex Alimentarius propone una clasificación funcional de los aditivos en veintiuna categorías:

Correctores de acidez y del pH	Antiaglomerantes
Antiespumantes	Antioxidantes
Agentes de volumen	Edulcorantes
Colorantes	Estabilizadores del color
Emulgentes	Fundentes
Potenciadores del gusto	Mejoradores de harinas
Gelificantes	Agentes lubricantes
Conservantes	Gases propulsores
Estabilizadores	Espesantes
Gasificantes	Espumantes
Humectantes	

La yuxtaposición entre los tipos de aditivos clasificados por la UE y por el Codex Alimentarius no es perfecta, ya que el número de categorías es diferente y ciertas categorías no son comunes. Además hay un gran número de aditivos que son multifuncionales y que podrían figurar en diversas categorías. En la Tabla 1.2.1 se establece una comparación entre ambas clasificaciones.

**Tabla 1.2.1.** Comparación de las clasificaciones de aditivos alimentarios establecidas en la legislación de la UE y del Codex Alimentarius.

Característica de mejora	Legislación España/UE	Codex Alimentarius
Color	Colorantes	Colorantes
Color	–	Estabilizadores del color
Conservación	Conservantes	Conservantes
Conservación	Antioxidantes	Antioxidantes
Textura	Emulgentes	Emulgentes
Textura	Fundentes	Fundentes
Textura	Espesantes	Espesantes
Textura	Gelificantes	Gelificantes
Textura	Estabilizadores	Estabilizadores

---

**Tabla 1.2.1. (continuación).**

Característica de mejora	Legislación España/UE	Codex Alimentarius
Sabor	Potenciadores del sabor	Potenciadores del gusto
Sabor	Acidulantes	–
Sabor	Correctores de acidez	Correctores de acidez y del pH
Textura	Antiaglomerantes	Antiaglomerantes
Sabor	Edulcorantes	Edulcorantes
Textura	Almidones modificados	–
Textura	Gasificantes	Gasificantes
Textura	Antiespumantes	Antiespumantes
Textura	–	Espumantes
Textura	Agente de cobertura y lubricantes	Agentes lubricantes
Textura	Endurecedor	–
Textura	Mejoradores de harinas	Mejoradores de harinas
Textura	Humectante	Humectantes
Textura	Secuestrantes	–
Textura	Enzimas	–
Textura	Agentes de volumen	Agentes de volumen
Textura	Gases propulsores y de envasado	Gases propulsores

En términos prácticos se puede hacer una clasificación más general en la que se pueden englobar las categorías de aditivos anteriormente citadas en tres grandes grupos [4]:

- Aditivos de mejora de la conservación
- Aditivos de mejora de las cualidades sensoriales
- Aditivos de mejora del valor nutricional

Los aditivos también se pueden clasificar en:

- Aditivos naturales
- Aditivos artificiales o sintéticos

Esta clasificación puede dar lugar a discusiones debido a que ciertos procedimientos de extracción o de preparación de los aditivos llamados naturales son tan complejos y lejanos a la “naturaleza” como los métodos de elaboración o de síntesis de aditivos artificiales. Los aditivos de síntesis “idénticos a los aditivos naturales” pueden ser empleados en condiciones que pueden crear confusiones sobre las cualidades sustanciales de los productos alimenticios. A pesar de esto y debido a que el término “natural” resulta atractivo a numerosos consumidores, hay una tendencia a preferir el empleo de los aditivos naturales al de los aditivos sintéticos.

### **1.3. Regulaciones sobre aditivos alimentarios**

Aunque los aditivos se asocian a la industria alimentaria moderna, éstos llevan siglos utilizándose. La conservación de los alimentos es una vieja necesidad y durante mucho tiempo, los alimentos se salaban, se ahumaban o se cubrían de salitre. Por ejemplo, la salazón nació en los desiertos de Asia Central más de 5000 años AC. Los griegos y los romanos poseían un arte evolucionado en la utilización de la sal mezclada con especias, aceite y vinagre. Del mismo modo, los egipcios y los romanos utilizaban ya el SO<sub>2</sub> liberado por la combustión de azufre para desinfectar el material de vinificación [4–6].

A lo largo del siglo XIX y principios del siglo XX empezaron a descubrirse nuevas sustancias químicas que se podían utilizar para conservar los alimentos y para colorearlos. Es, a comienzos del siglo XX, cuando la necesidad de luchar contra los engaños comerciales y contra el abuso de productos químicos, lo que

condujo a que en 1912, en Francia, apareciera la primera regulación de los compuestos químicos añadidos a los alimentos, surgiendo el concepto de aditivos químicos, asociado con la “lista positiva” de autorización de los productos químicos que podían ser añadidos a los alimentos. En dicho sistema se estipula por primera vez la prohibición de añadir a los alimentos, sea para su conservación o coloración, productos químicos o materias colorantes distintas de las que su empleo ha sido declarado lícito. El concepto de listas positivas de aditivos perdura hasta nuestros días y rige las legislaciones europeas e internacionales actuales [4].

#### 1.3.1. Regulaciones en Estados Unidos de América y Europa

En cuanto a las legislaciones internacionales hay que señalar que en los Estados Unidos de América (EE.UU.) la regulación de aditivos la realiza la Agencia Norteamericana para la regulación de Alimentos y Fármacos (FDA, Food and Drug Administration). En 1958, y ante la utilización generalizada de muchas sustancias no aprobadas por la FDA se crearon las “listas GRAS” (Generally Recognized As Safe) donde se recogen aquellas sustancias cuyo consumo se reconoce, de forma unánime, como seguro. En estas listas, equivalentes a las “listas positivas” de la legislación europea, se incorporaban únicamente aquellas sustancias que la evidencia científica y la práctica demostraban su inocuidad para el ser humano, y que fueron denominadas como sustancias GRAS. Además, en este año se aprueba la “Enmienda de los Aditivos en los Alimentos” del Acta Federal de Alimentos, Drogas y Cosméticos (FD&C Act, Federal Food, Drug and

Cosmetic Act) que requiere la aprobación para el uso antes de que un aditivo sea añadido a un alimento. También exige que el fabricante compruebe la seguridad del aditivo en todas las formas en que va a ser usado. Esta enmienda excluyó dos grupos de sustancias del proceso de regulación de los aditivos: todas las sustancias que la FDA o el Departamento de Agricultura (USDA, United States Department of Agriculture) determinaron como sanas y seguras para el uso en alimentos especificados antes de la enmienda de 1958 y las sustancias GRAS. En 1960 el Congreso de los EE.UU. aprobó una legislación similar regulando los colores de los aditivos. La "Enmienda sobre los Colores en los Aditivos" del Acta FD&C, exige que los colorantes usados en alimentos, drogas, cosméticos y ciertos dispositivos médicos, tengan la aprobación de la FDA, antes de ser ofrecidos al mercado. A diferencia del caso de los aditivos de los alimentos, el uso de los colorantes fue permitido únicamente después de haber sido sometidos a exámenes adicionales para confirmar su seguridad [6].

En la Unión Europea, hasta 1988, eran las legislaciones nacionales de cada uno de los Estados de la UE las que establecían el marco regulador para el control de los aditivos, basando sus normas en las recomendaciones de sus propios expertos. A partir de esta fecha, y en función de las valoraciones de seguridad realizadas por el Comité Científico de la Alimentación Humana (SCF, Scientific Committee for Food) de la UE, se produce la armonización de las legislaciones nacionales mediante la aprobación de la Directiva 89/107/CE relativa a la aproximación de los Estados Miembros y concerniente a los aditivos que pueden ser utilizados en los productos destinados a la alimentación humana

[2]. Con la adopción, entre 1994 y 1995, de las tres directivas sobre edulcorantes (Directiva 94/35/CEE) [7], colorantes (Directiva 94/36/CEE) [8] y otros aditivos (Directiva 95/2/CEE) [9], el papel del SCF ha cobrado cada vez mayor relevancia. El Comité, creado en 1974 por la Comisión Europea e integrado por científicos de los Estados Miembros, especializados en diversos campos relacionados con este tema, tiene como misión evaluar los posibles riesgos y elaborar orientaciones para un uso seguro de los aditivos alimentarios en Europa. Por otra parte, la Comisión Europea ha establecido criterios concretos referentes a la pureza de los aditivos, las categorías generales o específicas de alimentos en las que se permite añadir aditivos y respecto a los niveles máximos permisibles.

La Comisión de las Comunidades Europeas en su Libro Blanco sobre Seguridad Alimentaria publicado el año 2000 [10] establece que la seguridad alimentaria ha de ser uno de los principales intereses de los poderes públicos y de los productores del sector agroalimentario. Por lo tanto, plantea como una prioridad de la política alimentaria de la UE el que ésta ha de basarse en normas rigurosas de seguridad alimentaria que sirvan para proteger y fomentar la salud de los consumidores. En este contexto, la Comisión determina, en este documento, que en la UE se abordarán algunas cuestiones sobre la calidad de los alimentos, incluidos los aditivos, así como las indicaciones sobre aspectos sanitarios, al tiempo que se mejorarán los controles aplicados a los nuevos alimentos. En concreto sobre los aditivos alimentarios indica que:

- habrá que actualizar las listas comunitarias de colorantes, edulcorantes y otros aditivos,

- se deberán modificar los criterios de pureza aplicables a los edulcorantes, a los colorantes y a otros aditivos, y se establecerán criterios de pureza apropiados para los aditivos alimentarios producidos a partir de nuevas fuentes,
- la Comisión publicará asimismo un informe sobre la ingestión de aditivos alimentarios, y
- se establecerá la obligación general de realizar una nueva evaluación de la seguridad de los aditivos autorizados elaborados a partir de fuentes novedosas o con métodos nuevos.

Tanto la FDA como el SCF, para tomar decisiones respecto a la regulación de aditivos, tienen en cuenta la opinión de diversos grupos internacionales.

### 1.3.2. Organismos internacionales

Todos los países necesitan tener acceso a evaluaciones fiables de los riesgos asociados con las sustancias químicas utilizadas en los alimentos, pero relativamente pocos cuentan con los conocimientos y los fondos económicos necesarios para hacer evaluaciones individuales sobre riesgos del gran número de aditivos existentes. Los trabajos efectuados por el Comité de Expertos en Aditivos Alimentarios de la FAO/OMS (JECFA, Joint FAO/OMS Expert Committee on Food Additives) y el Comité sobre los Aditivos Alimentarios y los Contaminantes del Codex Alimentarius (CCFAC, Codex Committee on Food Additives and Contaminants) tienen gran importancia en este sentido. Ambos



comités han sido instituidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations) y realizan el examen de los aditivos, con vistas a la elaboración de normas internacionales. El JECFA presta sus servicios como órgano asesor científico de la FAO, la OMS, los gobiernos miembros de la FAO y la OMS y la Comisión del Codex Alimentarius. El asesoramiento a la Comisión del Codex Alimentarius en materia de aditivos alimentarios, contaminantes y sustancias tóxicas naturalmente presentes en los alimentos se realiza normalmente por conducto del CCFAC.

El JECFA se reúne desde 1956, inicialmente para evaluar la inocuidad de los aditivos alimentarios. En la actualidad, este comité establece principios para evaluar la inocuidad de los aditivos, hace evaluaciones toxicológicas y establece la ingesta diaria admisible (IDA) de cada uno de los aditivos, prepara especificaciones relativas a la pureza de los aditivos y evalúa las dosis de ingestión.

El CCFAC examina, desde 1964, las normas de pureza y de identidad de los aditivos, programa las peticiones de opinión al JECFA, fija los contenidos máximos de contaminantes y aconseja a los Comités de Productos del Codex Alimentarius en lo que concierne a la lista y las condiciones de utilización de los aditivos.

### 1.3.3. Etiquetado e identificación de aditivos alimentarios

Además de los estrictos criterios aplicados en la evaluación de riesgos y la exigencia de tener una utilidad demostrada, las normativas relativas a los aditivos exigen que los aditivos figuren en las etiquetas de los envases de los alimentos y bebidas que los contienen. En estas etiquetas debe figurar la función del aditivo y su nombre o número asignado. El etiquetado de los aditivos alimentarios permite a los usuarios estar bien informados y, por consiguiente, elegir mejor.

La identificación de los aditivos alimentarios, en las listas de ingredientes en un alimento determinado, mediante un número es una alternativa a la declaración del nombre específico del aditivo, el cual normalmente es largo y tiene una estructura química compleja. En 1960, la UE puso de manifiesto la necesidad de identificar bien los aditivos asignándoles un número convencional. Se siguió como modelo las tablas de Schultz y de la Deutsche Forschung Gemeinschaft (DFG) utilizadas en Alemania para los colorantes y el Colour-Index utilizado en EE.UU. Se decidió que cada sustancia estaría identificada con un número (de 3 ó 4 cifras) precedido de una letra (E). Se consideró que los aditivos se podrían repartir en nueve categorías y que se dispondría así de cien números en cada una: la primera centena se atribuyó a los colorantes, la segunda a los conservantes, la tercera a los antioxidantes y la cuarta a los emulsionantes, espesantes y gelificantes. La letra inicial E significa que el aditivo ha sido evaluado por el SCF y que se ha aceptado por considerarse seguro en todo el

territorio de la UE. Estos números E se utilizan desde hace años como código en todos los Estados Miembros.

En el marco del Codex Alimentarius, el CCFAC elaboró, en 1989, el Sistema Internacional de Numeración (INS, International Numbering System). Dicho sistema de numeración se preparó con el propósito de alcanzar un acuerdo internacional sobre el sistema numérico de identificación de aditivos y establece la lista de aditivos en orden numérico con el número asignado a cada sustancia y la indicación de la función tecnológica de la misma.

Las Comisiones de la UE y del Codex se han puesto de acuerdo para adoptar los mismos números, aunque evidentemente en el sistema INS los números no están precedidos de la letra E, reservada a la UE.

#### **1.4. Consideraciones toxicológicas**

El estudio toxicológico de un aditivo alimentario debe hacerse según las siguientes pautas:

- debe conocerse la estructura química y las propiedades de la sustancia, que determinan sus condiciones de metabolismo, almacenamiento y acumulación en el organismo,
- deben estudiarse las normas de identidad y de pureza del aditivo,
- debe conocerse el alimento al cual será adicionado, así como las alteraciones e interacciones que puede causar al alimento el proceso tecnológico que implica la incorporación del aditivo,
- debe hacerse una planificación de las pruebas de toxicidad.

Las exigencias toxicológicas para los aditivos alimentarios son mucho más fáciles de satisfacer que las de los contaminantes, puesto que su adición es intencionada y se conoce los aditivos que se añaden a los alimentos, así como la cantidad. Los aditivos han sido objeto de una evaluación toxicológica particularmente profunda. El examen de los datos toxicológicos por los diversos organismos internacionales, la determinación de la IDA y las propuestas de criterios de pureza constituyen las etapas principales para el empleo de un aditivo. La investigación de la toxicidad de los aditivos, según el JECFA, requiere realizar estudios de tipo bioquímico, de toxicidad aguda, estudios a corto plazo y a largo plazo, así como estudios complementarios [11].

#### 1.4.1. Estudios bioquímicos

Estos estudios engloban factores que van a influir tanto en la absorción como en la distribución del aditivo en el organismo, así como en su metabolización y las vías de excreción.

#### 1.4.2. Toxicidad aguda

Comprende el estudio de los efectos producidos por la sustancia que se ensaya cuando se administra una sola vez. Se dan diversas dosis de sustancia, se estudian los signos de intoxicación y la mortalidad, según la dosis recibida. La dosis que produce la muerte se llama dosis letal (DL). La dosis que produce una mortandad del 50% de los animales se llama dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>). En estos estudios se opera sobre dos especies animales, de las que una de ellas debe ser

de la familia de los roedores. Es una técnica exploratoria que permite seleccionar los productos más tóxicos. Una  $DL_{50}$  por debajo de  $3 \text{ g kg}^{-1}$  de peso corporal se considera no significativa.

#### 1.4.3. Toxicidad a corto plazo

Las pruebas de toxicidad a corto plazo tienen por objeto examinar la naturaleza biológica de los efectos tóxicos, determinar la dosis a la cual se producen estos efectos y, finalmente, estudiar una posible acción curativa. Se administra el producto durante un tiempo que puede ser de tres a seis meses, en dos especies animales, una de roedores. Se determina el crecimiento, el comportamiento y la mortalidad del animal. Con este objetivo se procede a estudiar la sangre, la orina y se les practican a los animales exploraciones funcionales de ciertos órganos como el hígado y el riñón. En estos estudios se obtiene como resultado la concentración a la que tienen lugar los efectos nocivos, el tiempo necesario para ello y la naturaleza de los mismos.

#### 1.4.4. Toxicidad a largo plazo

Los estudios de toxicidad a largo plazo tienen como objetivo testificar la acción cancerígena de los aditivos. Estas pruebas pueden durar de dieciocho meses a dos años sobre el ratón, la rata y el perro y se realizan preferentemente en este último. Los animales experimentales se observan minuciosamente durante dos o tres generaciones. Se efectúan estudios sobre la reproducción, la embriotoxicidad y la teratogénesis. En estos ensayos se hace una exhaustiva

---

observación de los órganos de los animales sometidos a experimentación, fundamentalmente, un examen histopatológico muy detallado de los principales órganos observando los posibles signos de carcinogénesis.

#### 1.4.5. Estudios complementarios

Para los aditivos es necesario proceder a estudios complementarios, respecto a los efectos que produzcan sobre la digestión y la absorción intestinal. Se puede también hacer estudios de la inducción a la biosíntesis de sistemas tan fundamentales como de los microsomas de los hepatocitos, ya que éstos son capaces de inducir las propias enzimas de desintoxicación pero también de transformar una sustancia pro-tóxica en sustancia tóxica. Los métodos in vitro [12], llamados alternativos, pueden aportar valiosas indicaciones. Se hace, igualmente, un estudio tóxico cinético del aditivo y del conjunto global de su metabolismo con una aproximación al hombre sin olvidar los problemas alérgicos.

### **1.5. Concepto y criterios para fijar las dosis de uso de los aditivos alimentarios**

En la actualidad, la preocupación por las características tóxicas de los aditivos alimentarios, en relación con la salud humana, ha llevado a hacer grandes esfuerzos por limitar, controlar y regular la utilización de estas sustancias, aunque dicho aditivo haya superado todas las exigencias toxicológicas. Las listas positivas de aditivos recogen los aditivos permitidos para su uso en alimentos, así como los alimentos donde está permitido el uso de

dichos aditivos. En general existe la tendencia a reducir el número de sustancias permitidas, y así evitar riesgos inesperados para la salud del consumidor. La legislación europea señala que los aditivos alimentarios sólo podrán aprobarse cuando [1,2]:

- se pueda demostrar una necesidad tecnológica suficiente y cuando el objetivo que se busca no pueda alcanzarse por otros métodos económica y tecnológicamente utilizables,
- no representen ningún peligro para el consumidor en las dosis propuestas, en la medida en que sea posible juzgar los datos científicos de que se dispone.

Por lo tanto, para fijar la dosis máxima a la que los aditivos pueden ser utilizados, las autoridades (europeas e internacionales) consideran dos criterios básicos: tecnológico y toxicológico. En estos criterios se tiene en cuenta, por una parte, la necesidad objetiva de empleo de los aditivos en los alimentos y la dosis que es necesaria tecnológicamente, y por otra, la inocuidad de dichos aditivos.

#### 1.5.1. Criterio tecnológico

La necesidad de que exista un objetivo preciso para la utilización de cualquier aditivo constituye uno de los límites de empleo de los aditivos. La dosis tecnológicamente útil es aquella que permite obtener el efecto deseado con la adición de un determinado aditivo a un alimento. Los ensayos conducentes a la determinación de la dosis tecnológicamente útil han de basarse en las condiciones establecidas en las Buenas Prácticas de Fabricación utilizadas por la

---

industria alimentaria. De esta manera, y puesto que las condiciones de empleo del aditivo han de ser las mínimas necesarias y suficientes para lograr el efecto tecnológico deseado, la cantidad de aditivo será la mínima derivada de ese uso racional del aditivo.

La autorización de uso de un nuevo aditivo no puede acordarse si no puede demostrarse suficientemente una necesidad tecnológica [2]. Con vistas a apreciar esta necesidad se instituye la Comisión de Tecnología Alimentaria en la UE. Esta Comisión reúne además de los miembros por derecho, nueve personalidades científicas reconocidas por su competencia en tecnología alimentaria (prácticas y procedimientos en la fabricación y la conservación de los productos).

#### 1.5.2. Criterio toxicológico

Mientras que la dosis tecnológicamente útil la establece fundamentalmente la industria alimentaria, la ingesta diaria admisible (IDA) se establece por organismos internacionales, como el JECFA y el SCF, después de realizar análisis y consideraciones toxicológicas [5,11].

La evaluación de la toxicidad de los aditivos alimentarios se realiza teniendo en cuenta la dosis que carece de efecto tóxico para los animales o la dosis máxima que, en los estudios toxicológicos a corto y largo plazo, no haya causado un efecto tóxico significativo. La IDA para el hombre se define como la dosis del aditivo que, ingerida diariamente durante una vida entera, carece de riesgo apreciable y se expresa en miligramos de aditivo por kilogramo de peso



corporal (del hombre) y día. La Tabla 1.5.1 resume los valores de la IDA establecidos por el JECFA para los aditivos estudiados en esta Memoria, así como la fecha en que se ha realizado la última evaluación de éstos.

**Tabla 1.5.1.** Ingesta diaria admisible, establecida por el JECFA, para los distintos aditivos estudiados en el desarrollo de esta Memoria.

Nº	Aditivo	Tipo de aditivo	IDA (mg kg <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> )	Última evaluación	Ref.
E-100	Curcumina	Colorante	0 – 1	2001	[13]
E-101i	Riboflavina	Colorante	0 – 0.5	1981	[14]
E-102	Tartrazina	Colorante	0 – 7.5	1964	[15]
E-120	Acido carmínico	Colorante	0 – 5	2000	[16]
E-127	Eritrosina	Colorante	0 – 0.1	1990	[17]
E-132	Carmín de índigo	Colorante	0 – 5	1974	[18]
E-133	Azul brillante FCF	Colorante	0 – 12.5	1969	[19]
E-142	Verde ácido brillante BS	Colorante	no asignada	1974	[18]
E-150a	Caramelo Clase I	Colorante	no asignada	1985	[20]
E-151	Negro brillante BN	Colorante	0 – 1	1981	[14]
E-160a	Trans-β-caroteno	Colorante	0 – 5	2001	[13]
E-200	Acido sórbico	Conservante	0 – 25	1973	[21]
E-210	Acido benzoico	Conservante	0 – 5	2001	[13]
E-214	p-Hidroxibenzoato de etilo	Conservante	0 – 10	1973	[21]
E-216	p-Hidroxibenzoato de propilo	Conservante	0 – 10	1973	[21]
E-218	p-Hidroxibenzoato de metilo	Conservante	0 – 10	1973	[21]
E-307	α-Tocoferol	Antioxidante	0.15 – 2	1986	[22]
E-320	Butil hidroxianisol	Antioxidante	0 – 0.5	1988	[24]
E-321	Butil hidroxitoluol	Antioxidante	0 – 0.3	1995	[25]

La dosis máxima sin efecto perjudicial en los animales de experimentación (NOAEL, Non Observed Adverse Effect Level) se traslada al

hombre, dividiéndola generalmente por diez, como medida de precaución, por si para este tipo de aditivo la especie humana fuera más sensible que las especies animales sobre las que se ha experimentado (variabilidad inter-específica, producida entre especies). Para aumentar el margen de seguridad se considera que, dentro de la especie humana, unos seres pueden ser más sensibles que otros y por ello se introduce un nuevo factor divisor, generalmente también 10 (variabilidad intra-específica, dentro de la misma especie), con lo que el factor divisor entre NOAEL e IDA suele ser 100. Este factor, según la importancia de los posibles efectos dañinos, se puede aumentar a 500, 1000 e incluso 5000. En ocasiones el factor de seguridad de 100 puede disminuirse, por ejemplo, cuando el aditivo alimentario del que se trate es un nutriente esencial o ya es consumido habitualmente por el hombre; un ejemplo es el ácido ascórbico (vitamina C) que se usa como antioxidante, pero que se consume habitualmente en cantidades más elevadas a las que se utilizan como aditivo [5].

Para asegurar que las personas no consuman una cantidad excesiva de productos que contengan un aditivo determinado que lleve a sobrepasar los límites de la IDA, la legislación europea [7–9] impone a los Estados Miembros la realización de estudios de la ingesta que permitan responder a cualquier variación que se presente en los modelos de consumo. Los niveles de IDA pueden compararse con las estimaciones del consumo del conjunto de la población o de un determinado subgrupo. Si ocasionalmente la ingesta diaria sobrepasase la IDA, sería poco probable que se produjera algún daño, dado el amplio margen de seguridad de la misma. Sin embargo, si una de las cifras

referentes al consumo señalase que los niveles regulares de ingesta de determinados sectores de la población sobrepasan la IDA, entonces sería posible que el SCF considerase necesario reducir los niveles permitidos del aditivo en los alimentos o limitar la gama de alimentos en que éste está autorizado. La Comisión de las Comunidades Europeas presentó al Parlamento Europeo y al Consejo un informe sobre la ingesta de aditivos alimentarios en la Unión Europea en Octubre de 2001 [26] en el que concluyó que los resultados obtenidos, aunque preliminares, indican que para la mayoría de los aditivos alimentarios, la ingesta diaria en los distintos países europeos se sitúa por debajo de la IDA.

Hay varios métodos para la estimación de la Ingesta Diaria (ID) que se pueden resumir en los siguientes, los cuales se encuentran ordenados de menor a mayor complejidad y fiabilidad [27]:

- **Método per-capita.** Esta información se obtiene de los datos de producción anual o uso de los aditivos provistos por las industrias de aditivos alimentarios y las industrias manufactureras de alimentos.
- **Registros diarios de alimentos.** Esta información se obtiene de registros que hace cada individuo de los alimentos ingeridos durante el periodo del estudio (normalmente hasta 10 días). Estos datos de consumo se combinan con las concentraciones del aditivo que se espera contenga cada uno de los alimentos y así calcular la ID.

- **Recordatorio de la dieta.** Esta información consiste en la recogida de datos obtenidos a partir de los recuerdos de los alimentos ingeridos por el individuo durante 24 horas. Estos datos se combinan con la concentración esperada de los aditivos en los alimentos.
- **Frecuencia de alimentos.** En este estudio se pregunta a los participantes por la frecuencia mensual o semanal con la que se consume un determinado alimento. Los datos se combinan con las concentraciones esperadas de los aditivos.
- **Inspección dirigida.** En este método se realizan inspecciones analíticas en determinados alimentos que se sabe que contienen el aditivo. Esta información se puede combinar con datos de los consumos nacionales de alimentos para obtener la estimación de la ID.
- **Estudios de dieta duplicados.** En esta aproximación se compran y preparan para el consumo porciones duplicadas de cada uno de los componentes de la dieta de un individuo. Las muestras duplicadas se analizan químicamente para obtener la estimación de la ID del aditivo.
- **Métodos basados en bio-marcadores.** En este método se mide el aditivo de interés, o uno de sus metabolitos, en un fluido corporal (sangre u orina). Inicialmente hay que establecer la relación cuantitativa entre la ID del aditivo y su bio-marcador. Una

vez que esta relación se conoce, la concentración del biomarcador en la muestra se podría utilizar para estimar la ID del componente.

En algunos de estos métodos es necesario el conocimiento de la concentración del aditivo en cada alimento, la cual se estima basándose en la información provista por los fabricantes o, alternativamente, a partir de los resultados obtenidos a partir de publicaciones científicas.

La selección final del método a utilizar para la estimación de la ingesta de aditivos dependerá de un gran número de factores como son: el propósito para el que se quiere la información, los recursos disponibles, si el aditivo se utiliza en distintos tipos de alimentos o su uso está restringido, la concentración de los aditivos en los alimentos, las características químicas y la reactividad de los compuestos así como la disponibilidad de métodos de análisis.

Existen referencias en la bibliografía científica de este tipo de estudios [27–30], normalmente enfocados a poblaciones o países en particular, que proporcionan una información muy importante para que los legisladores puedan establecer o revisar las reglas que armonizan las necesidades tecnológicas con la responsabilidad de protección de la salud pública.

#### **1.6. Procedimientos legales de autorización de empleo de aditivos**

En la UE se ha establecido una estructura legislativa que permite la autorización de uso de nuevos aditivos propuestos, tanto por la UE, como por Estados Miembros individuales. Dicha autorización requiere una evaluación de

---

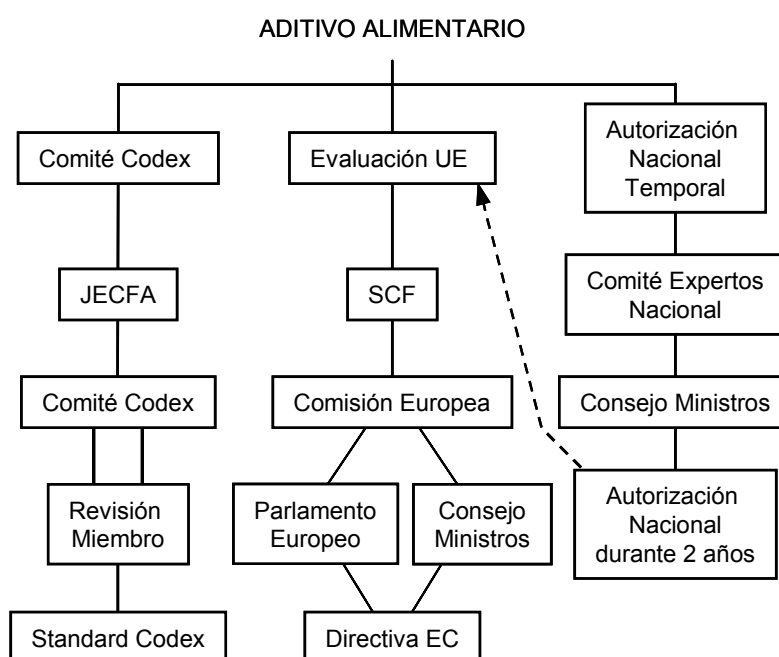
seguridad por parte del SCF, el cual valora la información proporcionada por los fabricantes que proponen el nuevo aditivo alimentario, incluyendo datos de toxicidad y del empleo que se pretende dar al aditivo. Si los datos de seguridad son satisfactorios, el comité establecerá su IDA. La Comisión Europea desarrollará legislación basada en este dato y se presentará al Consejo de Ministros Europeo y al Parlamento Europeo. El resultado final se plasma en una Directiva Comunitaria la cual pide a cada Estado Miembro que haga los cambios necesarios en su legislación nacional con el fin de incluir el nuevo aditivo. De forma alternativa, los fabricantes podrían pedir una autorización nacional a uno o más Estados Miembros, provisionalmente, mientras que la UE autoriza el uso del aditivo. En este caso, la solicitud la revisarían Comités de expertos nacionales, siguiendo procedimientos similares a los utilizados por el SCF. Si se establece una IDA, el aditivo podría aprobarse para su uso en el Estado Miembro por un periodo de dos años, mientras se hace la solicitud a la UE. La solicitud la tiene en cuenta el SCF y, si se aprueba, el aditivo se incorpora en una Directiva Comunitaria. Si el SCF no acepta la solicitud, el aditivo debe retirarse [2].

Toda la legislación relacionada con los aditivos alimentarios autorizados debe contener la siguiente información:

- listas positivas de los aditivos permitidos, incluyendo especificaciones técnicas de pureza,
- los propósitos tecnológicos particulares para los cuales el aditivo podría usarse, y

- restricciones tales como el nivel máximo permitido en un determinado tipo de alimento.

La Figura 1.6.1 resume los procedimientos expuestos para la autorización de empleo de aditivos.



**Figura 1.6.1.** Procedimientos legales de autorización de empleo de aditivos en la UE y en el JECFA.

En EE.UU. el procedimiento de autorización de empleo de un nuevo aditivo alimentario se presenta a la FDA. Una petición para un aditivo o colorante, debe presentar datos acerca de la toxicidad del aditivo, acompañados de pruebas toxicológicas en animales e incluso en humanos. Para decidir si un aditivo debe

ser aprobado, la Agencia primero considera la composición y atributos de la sustancia, la probable cantidad para ser consumida, los posibles efectos a largo plazo y varios factores adicionales de seguridad. Si el uso de un aditivo se aprueba, la FDA publica regulaciones que pueden incluir los tipos de alimentos en que pueden ser usados, las cantidades máximas que se pueden usar y cómo deben ser identificados en las etiquetas de los alimentos.

### **1.7. Legislación de aditivos alimentarios**

La normativa relacionada con el uso de aditivos alimentarios se inició en Europa en los años 60, sufriendo posteriormente numerosas modificaciones. En España, la primera “lista positiva” de aditivos se promulgó en 1981, y la primera Reglamentación Técnico Sanitaria de aditivos alimentarios en 1983. A partir de 1988 se produce la armonización de las legislaciones nacionales de los Estados Miembros de la UE mediante la aprobación de la Directiva 89/107/CE relativa a la aproximación de los Estados Miembros y concerniente a los aditivos que pueden ser utilizados en los productos destinados a la alimentación humana [2].

La legislación europea se recoge en Directivas Comunitarias que se publican en el Boletín Oficial de las Comunidades Europeas (DOCE). Al tratarse de Directivas Comunitarias afectan a todo el ámbito de la UE, marcando un plazo para su transposición a la legislación de cada Estado Miembro, transcurrido el cual, son de obligado cumplimiento en todo el territorio de la UE. A continuación se expone la relación de las Directivas Comunitarias vigentes en la UE a fecha de 1 de Enero de 2003, relativas a listas positivas de los aditivos permitidos,



especificaciones técnicas de pureza, y restricciones respecto al nivel máximo permitido de los aditivos en un determinado tipo de alimento. De este listado se encuentran excluidas las correspondientes a los aditivos de los productos dietéticos y de régimen, a los aditivos que modifican el valor nutricional, a los coadyuvantes tecnológicos y a los aromas, debido a que para estos compuestos hay estatutos especiales, independientes de los de los aditivos alimentarios.

*Legislación Europea: legislación general y listas positivas*

- **Directiva 89/107/CEE** del Consejo, de 21 de diciembre de 1988, relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados Miembros sobre los aditivos alimentarios autorizados en los productos alimenticios destinados al consumo humano [2].
- **Directiva 94/35/CE** del Parlamento Europeo y del Consejo, de 30 de junio de 1994, relativa a los edulcorantes utilizados en los productos alimenticios [7].
- **Directiva 94/36/CE** del Parlamento Europeo y del Consejo, de 30 de junio de 1994, relativa a los colorantes utilizados en los productos alimenticios [8].
- **Directiva 95/2/CE** del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de febrero de 1995, relativa a aditivos alimentarios distintos de los colorantes y edulcorantes [9].
- **Directiva 96/85/CE** del Parlamento Europeo y del Consejo, de 19 de diciembre de 1996, por la que se modifica la Directiva 95/2/CE [31].

- **Decisión 97/292/CE**, del Parlamento Europeo y del Consejo, de 19 de diciembre de 1996, relativa al mantenimiento de las legislaciones nacionales que prohíben la utilización de determinados aditivos en la producción de ciertos productos alimenticios específicos [32].
- **Directiva 98/72/CE** del Parlamento Europeo y del Consejo, de 15 de octubre de 1998, por la que se modifica la Directiva 95/2/CE [33].
- **Directiva 2001/5/CE**, del Parlamento Europeo y del Consejo de 12 de febrero de 2001, por la que se modifica la Directiva 95/2/CE [34].

*Legislación Europea: criterios de pureza*

- **Directiva 95/31/CE** de la Comisión, de 5 de julio de 1995, por la que se establecen criterios específicos de pureza de los edulcorantes que pueden emplearse en los productos alimenticios [35].
- **Directiva 95/45/CE** de la Comisión, de 26 de julio de 1995, por la que se establecen criterios específicos de pureza en relación con los colorantes utilizados en los productos alimenticios [36].
- **Directiva 96/77/CE** de la Comisión, de 2 de diciembre de 1996, por la que se establecen criterios específicos de pureza de los aditivos alimentarios distintos de los colorantes y edulcorantes [37].

- **Directiva 98/86/CE** del Parlamento Europeo y del Consejo, de 11 de noviembre de 1998, por la que se modifica la Directiva 96/77/CE [38].
- **Directiva 99/75/CE** del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de julio de 1999, por la que se modifica la Directiva 95/45/CE [39].
- **Directiva 2000/63/CE** del Parlamento Europeo y del Consejo, de 5 de octubre de 2000, por la que se modifica la Directiva 96/77/CE [40].
- **Directiva 2001/30/CE** del Parlamento Europeo y del Consejo, de 2 de mayo de 2001, por la que se modifica la Directiva 96/77/CE [41].
- **Directiva 2001/50/CE** del Parlamento Europeo y del Consejo, de 3 de julio de 2001, por la que se modifica la Directiva 95/45/CE [42].

*Legislación Europea: otros*

- **Directiva 88/344/CEE** del Consejo, de 13 de junio de 1988, relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados Miembros sobre los disolventes de extracción utilizados en la fabricación de productos alimenticios y de sus ingredientes [43].

Por otra parte, la legislación española sobre aditivos alimentarios se publica en el Boletín Oficial del Estado (BOE), mediante Reales Decretos y Ordenes Ministeriales. La relación de la normativa vigente en el Estado Español a 1 de Enero de 2003 se expone a continuación, excluyéndose las

correspondientes a los aditivos de los productos dietéticos y de régimen, a los que modifican el valor nutricional, a los coadyuvantes tecnológicos y a los aromas.

*Legislación Española: legislación general y listas positivas*

- **Real Decreto 3177/1983**, de 16 de noviembre, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico–Sanitaria de aditivos alimentarios [1].
- **Real Decreto 2001/1995**, de 7 de diciembre, por el que se aprueba la lista positiva de aditivos colorantes autorizados para su uso en la elaboración de productos alimenticios, así como sus condiciones de utilización [44].
- **Real Decreto 2002/1995**, de 7 de diciembre, por el que se aprueba la lista positiva de aditivos edulcorantes autorizados para su uso en la elaboración de productos alimenticios, así como sus condiciones de utilización [45].
- **Real Decreto 1359/1998**, de 26 de junio, por el que se aprueba el procedimiento para incorporar a las listas positivas españolas aditivos autorizados en otros países miembros del Espacio Económico Europeo que no estén contemplados en las listas españolas, o lo están en dosis distintas a las permitidas en estas listas [46].
- **Real Decreto 142/2002**, de 1 de febrero, por el que se aprueba la lista positiva de aditivos distintos de colorantes y edulcorantes

para su uso en la elaboración de productos alimenticios, así como sus condiciones de utilización [47].

*Legislación Española: criterios de pureza*

- **Orden de 28 de julio de 1988** por la que se establecen los criterios de pureza de lecitinas, citratos de calcio y ácido ortofosfórico, utilizados como aditivos en la elaboración de productos alimenticios y del propilengicol utilizado como diluyente de antioxidantes [48].
- **Orden de 28 de julio de 1988** por la que se aprueban las normas de pureza para estabilizantes, emulgentes, espesantes y gelificantes, así como los diluyentes o soportes para carragenanos y pectinas autorizados para su uso en la elaboración de diversos productos alimenticios [49].
- **Real Decreto 2106/1996**, de 20 de septiembre, por el que se establecen las normas de identidad y pureza de los edulcorantes utilizados en los productos alimenticios [50].
- **Real Decreto 2107/1996**, de 20 de septiembre, por el que se establecen las normas de identidad y pureza de los colorantes utilizados en los productos alimenticios [51].
- **Real Decreto 1917/1997**, de 19 de diciembre, por el que se establecen las normas de identidad y pureza de los aditivos alimentarios distintos de colorantes y edulcorantes utilizados en los productos alimenticios [52].

- **Real Decreto 1802/1999**, de 26 de noviembre, por el que se modifica el Real Decreto 1917/1997 [53].

*Legislación Española: otros*

- **Real Decreto 472/1990**, de 6 de abril, por el que se regulan los disolventes de extracción utilizados en la elaboración de productos alimenticios y sus ingredientes [54].

Teniendo en cuenta la legislación presentada, tanto comunitaria como española, se ha elaborado la relación de los límites legales establecidos para los antioxidantes, conservantes y colorantes estudiados en los diferentes tipos de alimentos abordados en esta Memoria, que se encuentran en las Tablas 1.7.1, 1.7.2 y 1.7.3.

**Tabla 1.7.1.** Cantidades permitidas legalmente para los antioxidantes estudiados en los alimentos contemplados en esta Memoria, según la legislación española y comunitaria.

Aditivo	Aceites <sup>a</sup>	Margarinas <sup>a</sup>	Sopas deshidratadas <sup>a</sup>	Mayonesas <sup>a</sup>
E-307 $\alpha$ -Tocoferol	q.s. <sup>b</sup>	q.s. <sup>b</sup>	–	–
E-319 Ter-butilhidroquinona	–	–	–	–
E-320 Butil hidroxianisol	200 <sup>c,d</sup>	200 <sup>c,d</sup>	200 <sup>c,d</sup>	200 <sup>c,d</sup>
E-321 Butil hidroxitoluol	100 <sup>d</sup>	100 <sup>d</sup>	–	–

<sup>a</sup>, mg kg<sup>-1</sup> expresados sobre la grasa.

<sup>b</sup>, q.s., quantum satis: utilización de los aditivos en función de las buenas prácticas de fabricación, a un nivel no superior al necesario para conseguir el objetivo pretendido.

<sup>c</sup>, individualmente o combinados con galatos.

<sup>d</sup>, cuando se utilicen combinaciones de galatos, BHA y BHT, deben reducirse proporcionalmente cada uno de los niveles.

**Tabla 1.7.2.** Cantidades permitidas legalmente para los conservantes estudiados en los alimentos contemplados en esta Memoria, según la legislación española y comunitaria.

Aditivo	Bebidas refrescantes <sup>a</sup>	Yogures <sup>a</sup>	Mermeladas <sup>a</sup>	Salsas tomate <sup>a</sup>
E-200 Acido sórbico	300 <sup>b</sup>	300 <sup>c</sup>	1000 <sup>c</sup>	1000 <sup>c</sup>
E-210 Acido benzoico	150 <sup>b</sup>	300 <sup>c</sup>	1000 <sup>c,d</sup>	1000 <sup>c</sup>
E-214 p-Hidroxibenzoato de etilo	–	–	–	–
E-216 p-Hidroxibenzoato de propilo	–	–	–	–
E-218 p-Hidroxibenzoato de metilo	–	–	–	–
Aditivo	Quesos <sup>a</sup>	Pâtés <sup>a</sup>	Margarinas <sup>a</sup>	Mayonesas <sup>a</sup>
E-200 Acido sórbico	2000	1000 <sup>c</sup>	1000	1000
E-210 Acido benzoico	–	–	–	–
E-214 p-Hidroxibenzoato de etilo	–	1000 <sup>c</sup>	–	–
E-216 p-Hidroxibenzoato de propilo	–	1000 <sup>c</sup>	–	–
E-218 p-Hidroxibenzoato de metilo	–	1000 <sup>c</sup>	–	–

<sup>a</sup>, mg l<sup>-1</sup> o mg kg<sup>-1</sup> expresados sobre el alimento.

<sup>b</sup>, si se encuentran combinados: 250 SOR + 150 BEN.

<sup>c</sup>, individualmente o combinados entre sí.

<sup>d</sup>, 500 si se añade BEN individualmente.

**Tabla 1.7.3.** Cantidades permitidas legalmente para los colorantes estudiados en los alimentos contemplados en esta Memoria, según la legislación española y comunitaria.

Aditivo	Bebidas refrescantes <sup>a</sup>	Golosinas <sup>a</sup>	Sopas <sup>a</sup>	Salsas <sup>a</sup>	Mostazas <sup>a</sup>
E-100 Curcumina	100	300	50	500	300
E-101i Riboflavina	q.s. <sup>b</sup>	q.s. <sup>b</sup>	q.s. <sup>b</sup>	q.s. <sup>b</sup>	q.s. <sup>b</sup>
E-102 Tartrazina	100	300	50	500	300
E-120 Acido carmínico	100	300	50	500	300
E-127 Eritrosina	–	–	–	–	–
E-132 Carmín de índigo	100	300	50	500	300
E-133 Azul brillante FCF	100	300	50	500	300
E-142 Verde ácido brillante BS	100	300	50	500	300
E-150a Caramelo Clase I	q.s. <sup>b</sup>	q.s. <sup>b</sup>	q.s. <sup>b</sup>	q.s. <sup>b</sup>	q.s. <sup>b</sup>
E-151 Negro brillante BN	100	300	50	500	300
E-160a Trans-β-caroteno	q.s. <sup>b</sup>	q.s. <sup>b</sup>	q.s. <sup>b</sup>	q.s. <sup>b</sup>	q.s. <sup>b</sup>
Aditivo	Caldos <sup>a</sup>	Helados <sup>a</sup>	Postres lácteos <sup>a</sup>	Batidos <sup>a</sup>	Yogures <sup>a</sup>
E-100 Curcumina	50	150	150	100	150
E-101i Riboflavina	q.s. <sup>b</sup>	q.s. <sup>b</sup>	q.s. <sup>b</sup>	q.s. <sup>b</sup>	q.s. <sup>b</sup>
E-102 Tartrazina	50	150	150	100	150
E-120 Acido carmínico	50	150	150	100	150
E-127 Eritrosina	–	–	–	–	–
E-132 Carmín de índigo	50	150	150	100	150
E-133 Azul brillante FCF	50	150	150	100	150
E-142 Verde ácido brillante BS	50	150	150	100	150
E-150a Caramelo Clase I	q.s. <sup>b</sup>	q.s. <sup>b</sup>	q.s. <sup>b</sup>	q.s. <sup>b</sup>	q.s. <sup>b</sup>
E-151 Negro brillante BN	50	150	150	100	150
E-160a Trans-β-caroteno	q.s. <sup>b</sup>	q.s. <sup>b</sup>	q.s. <sup>b</sup>	q.s. <sup>b</sup>	q.s. <sup>b</sup>

<sup>a</sup>, mg l<sup>-1</sup> o mg kg<sup>-1</sup> expresados sobre el alimento, individualmente o combinados entre sí.

<sup>b</sup>, q.s., quantum satis: utilización de los aditivos en función de las buenas prácticas de fabricación, a un nivel no superior al necesario para conseguir el objetivo pretendido.



En lo referente a la legislación de aditivos de EE.UU., hay que señalar que se encuentra establecida en el Code of Federal Regulations, Título 21, Capítulo 1, que se divide en las siguientes partes [55]:

- Partes 170 – 173: dedicadas a la regulación general de aditivos.
- Partes 70 – 82: dedicadas a la regulación de los colorantes.
- Partes 174 – 178: dedicadas a la regulación de aditivos indirectos.
- Parte 180: dedicada a la regulación de los aditivos permitidos o que se encuentren pendientes de estudios adicionales.
- Partes 182 – 186: dedicada a la regulación de las sustancias GRAS.
- Parte 189: dedicada a la regulación de las sustancias prohibidas para el uso en alimentos para el consumo humano.

## 2. GRUPOS DE ADITIVOS OBJETO DE ESTUDIO EN ESTA TESIS DOCTORAL

### 2.1. Aditivos de mejora de la conservación

Los alimentos están sujetos a reacciones químicas o bioquímicas que pueden inducir transformaciones que afectan a un conjunto de factores tales como sus características sensoriales, valor nutricional y calidad sanitaria.

En nuestros días la alimentación moderna y la restauración colectiva demandan nuevos productos que, por numerosas razones, exigen una larga conservación. La principal función de los aditivos que mejoran la conservación de los alimentos es asegurar la estabilidad frente a las oxidaciones (antioxidantes) y/o el desarrollo y crecimiento de los microorganismos (conservantes). El empleo de estos aditivos permitirá garantizar a los productos su calidad original.

#### 2.1.1. Antioxidantes

La oxidación de las grasas es la forma de deterioro de los alimentos más importante después de las alteraciones producidas por los microorganismos. La protección de los alimentos grasos contra la oxidación de las grasas es fundamental debido a que la degradación oxidativa de los constituyentes de naturaleza lipídica de los alimentos presenta inconvenientes desde los siguientes puntos de vista [4,6]:

- **sensorial:** ya que esta degradación, conduce al enranciamiento, que tiene como consecuencia la aparición de olores y sabores a rancio y la alteración del color y la textura,

- **nutricional:** la oxidación provoca la destrucción de las vitaminas liposolubles A y E de los alimentos y la degradación de los ácidos grasos poliinsaturados de las familias linólica (n-6) y linolénica (n-3), cuyo consumo es indispensable ya que sus cabezas de serie no pueden ser sintetizados por el organismo animal, e
- **higiénico:** ya que los productos resultantes de la simple oxidación de las materias grasas (productos volátiles, peróxidos, oxiácidos) o de la oxidación unida a la degradación térmica en el curso de su calentamiento (monómeros cíclicos, polímeros) son productos tóxicos.

Las industrias alimentarias intentan evitar la oxidación de los alimentos mediante diferentes técnicas, como por ejemplo el envasado al vacío o en recipientes opacos. Entre las diversas soluciones tecnológicas posibles, la adición de antioxidantes se utiliza por el hombre desde hace mucho tiempo. La mayoría de los productos grasos tienen sus propios antioxidantes naturales, aunque muchas veces éstos se pierden durante el procesado (refinado de los aceites, por ejemplo), pérdida que debe ser compensada. Las grasas vegetales son en general más ricas en sustancias antioxidantes que las animales. También otros ingredientes de los alimentos (ciertas especias, por ejemplo) pueden aportar antioxidantes a los alimentos elaborados con ellos.

Para que los antioxidantes sean efectivos deben ser usados en materias primas de buena calidad sometidas a un procesado adecuado y a condiciones de empaquetado y almacenado correctas, ya que éstos no protegen ni enmascaran las

---

grasas o alimentos grasos que ya se han deteriorado o que son de mala calidad [4,6].

Para el uso efectivo de los antioxidantes es importante el conocimiento del mecanismo de oxidación y las funciones que desarrollan los antioxidantes para contrarrestar este tipo de deterioro.

Por ello se comentan a continuación la reacción de autooxidación, el mecanismo por el cual la sustancia ejerce su función antioxidante y los métodos para determinar la capacidad antioxidante. Se introducen también los antioxidantes que han sido objeto de estudio en esta Memoria.

#### a) Reacción de autooxidación

La porción lipídica de los alimentos que es reactiva y susceptible de oxidarse es bastante pequeña (aproximadamente un 10%) pero da lugar a productos sensorialmente muy desagradables. Las reacciones causantes del deterioro de los lípidos pueden ser cuatro [6]:

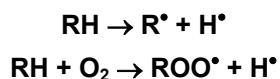
- I. **Hidrólisis:** formación de ácidos grasos libres y glicerol acompañada de sabor a jabón.
- II. **Rancidez:** autooxidación de ácidos grasos insaturados con formación de una mezcla de compuestos volátiles y sabores desagradables.
- III. **Reversión:** oxidación de ácidos tipo linolénico que produce alteraciones en el olor y sabor.

IV. **Polimerización:** reacción debida al entrecruzamiento entre dos átomos de carbono de grasas insaturadas o a los enlaces de oxígeno entre dos cadenas de ácidos grasos en una insaturación.

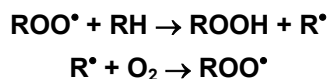
Los antioxidantes son efectivos frente a la rancidez y polimerización pero no afectan a la hidrólisis, ni a la reversión.

La oxidación implica una reacción en cadena, es decir, una vez iniciada continúa acelerándose hasta la oxidación total de las sustancias sensibles. Se pueden considerar tres etapas (que se representan en la Figura 2.1.1.1): iniciación, propagación y terminación. La autooxidación se manifiesta después de un periodo de latencia llamado **periodo de inducción** y rápidamente se acelera como consecuencia de la acción catalítica de los productos formados. A bajas temperaturas se observa un periodo de inducción muy largo, durante el cual hay un deterioro muy pequeño del alimento con una formación muy lenta de hidroxiperóxidos. A temperaturas elevadas el deterioro de las grasas y aceites es relativamente rápido, no encontrándose un periodo de inducción evidente por encima de 150°C debido a que los hidroxiperóxidos formados son muy inestables. También la formación de radicales libres a temperaturas elevadas es lo suficientemente rápida como para permitir el desarrollo de cantidades considerables de productos de polimerización [56–58].

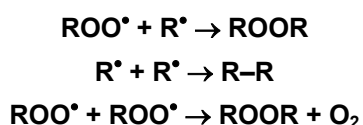
Etapa de iniciación:



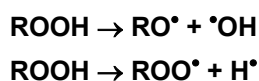
Etapa de propagación:



Etapa de terminación:



Reacciones secundarias de iniciación:



**Figura 2.1.1.1.** Mecanismo de autooxidación de la molécula de un lípido estable (RH).

La **etapa de iniciación** de la reacción consiste en la formación de un radical libre en el momento de la salida de un protón en la parte insaturada de la molécula grasa (RH). Esta reacción se impulsa por la captación de energía, por ejemplo luminosa. El radical libre resultante ( $\text{R}^\bullet$ ), muy sensible al ataque del oxígeno atmosférico, forma un radical libre peróxido inestable ( $\text{ROO}^\bullet$ ). Los radicales libres formados juegan ellos mismos el papel de iniciadores y de catalizadores de oxidaciones posteriores. Esta es la **etapa de propagación** que conduce a la formación de hidroxiperóxidos (ROOH) empleando por ejemplo una nueva molécula de ácido graso (RH). La muestra ya se percibe como rancia antes de que el contenido en hidroxiperóxidos alcance su valor máximo [56–58]. El paso limitante de esta reacción es la etapa de iniciación debido a que la

reacción entre el oxígeno con una molécula lipídica es bastante desfavorable ya que supone un cambio en el momento angular spin del sistema.

La reacción de autooxidación produce alteraciones de las características sensoriales y físicas, del estado químico y provoca una absorción de oxígeno que da lugar a peróxidos. Los peróxidos formados, son poco estables y se descomponen mediante rutas de baja energía, dando lugar por escisión, a compuestos volátiles y frecuentemente malolientes (hidrocarburos, aldehídos, cetonas, alcoholes, ácidos, etc). Los peróxidos pueden así conducir a largos productos oxidados, monómeros, "oxiácidos", así como a monómeros cíclicos y polímeros. La importancia de estas reacciones aumenta cuando la oxidación se produce a temperatura elevada (durante el calentamiento de las grasas) ya que, en estas condiciones, pueden provocar la oxidación de vitaminas, pigmentos y proteínas.

La velocidad y el desarrollo de la autooxidación lipídica, así como los productos finales resultantes, depende del tipo de grasas y de las condiciones de la oxidación, por ejemplo, temperatura, catalizadores, tipo de ácidos grasos, la distribución y la geometría de los dobles enlaces y la cantidad de oxígeno disponible [6]. La reacción se acelera con un incremento en el grado de insaturación de los aceites y grasas y un aumento en la temperatura. En general se trata de un fenómeno espontáneo que se desarrolla en condiciones relativamente débiles durante el procesado o almacenado de los alimentos grasos. En condiciones más drásticas (por ejemplo calentamiento) se puede llegar a estados más avanzados de oxidación en los que pueden intervenir

---

polimerizaciones. La velocidad del deterioro oxidativo es muy sensible a la presencia de impurezas a muy bajas concentraciones, como metales e iones, que acortan el periodo de inducción [56–58].

b) Mecanismo de acción de los antioxidantes: actividad antioxidante

Con el objeto de retardar la autooxidación de los lípidos son posibles dos vías:

- intentar suprimir todos los factores favorables a las reacciones de propagación tales como reducir la presión de oxígeno, la temperatura, la acción de la luz y la concentración de catalizadores,
- utilizar un antioxidante que reduzca la velocidad de autooxidación o que impida la propagación de la reacción en cadena.

Los antioxidantes son muy efectivos a bajas concentraciones para retardar el deterioro de alimentos grasos, pero no pueden prevenirlo. La mayoría de los antioxidantes naturales, como son los tocoferoles, o los antioxidantes sintéticos, son de estructura fenólica y tienen una actividad antioxidante elevada a temperaturas bajas o intermedias [56].

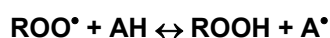
Los antioxidantes pueden actuar por medio de diferentes mecanismos:

- deteniendo la reacción en cadena de oxidación de las grasas,
- eliminando el oxígeno atrapado o disuelto en el producto, o el presente en el espacio de cabeza de los productos envasados,
- eliminando las trazas de ciertos metales que facilitan la oxidación.



Los que actúan por los dos primeros mecanismos son los antioxidantes propiamente dichos, mientras que los que actúan de la tercera forma son **sinérgicos de antioxidantes** o agentes quelatantes. Los antioxidantes frenan la reacción de oxidación, pero a costa de destruirse ellos mismos. El resultado es que la utilización de antioxidantes retrasa la alteración oxidativa del alimento, pero no la evita de una forma definitiva.

Los antioxidantes actúan por donación del átomo de hidrógeno a los radicales alquílicos o peróxidos, con la formación de radicales relativamente estables y de productos no radicales. Los antioxidantes reaccionan con los radicales formando ellos mismos otros radicales, como se observa en las dos primeras reacciones que se muestran en la Figura 2.1.1.2. Con estas reacciones se consiguen productos finales relativamente estables (por resonancia del sistema aromático del anillo fenólico) que no pueden eliminar ningún átomo de hidrógeno de los ácidos grasos insaturados y, por lo tanto, no pueden iniciar la peroxidación lipídica. Los productos finales que se forman en las dos últimas reacciones de la Figura 2.1.1.2. son relativamente estables y en consecuencia la reacción en cadena de autooxidación se interrumpe.



**Figura 2.1.1.2.** Reacciones de las moléculas de un antioxidante (AH) con radicales lipídicos.

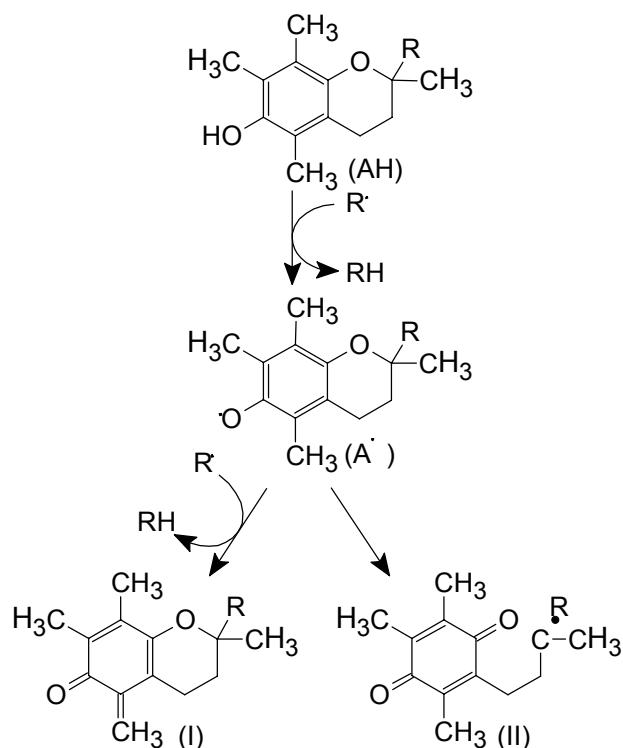
c) Determinación de la actividad antioxidante

El esquema de reacciones mostrado en la Figura 2.1.1.2 muestra que una molécula de antioxidante se combina con dos radicales, por lo tanto, el factor estequiométrico máximo alcanzable para un antioxidante es de  $n=2$ . Este factor estequiométrico es una forma de cuantificación de la actividad antioxidante. Para los antioxidantes que se utilizan en la práctica, se sitúa entre 1 y 2. Constituye una excepción el  $\alpha$ -tocoferol, que "in vivo" es un antioxidante esencialmente mejor ( $n$  próximo a 2) que "in vitro" ( $n = 0 - 0.5$ ), ya que "in vitro" se debilita su acción porque además del producto final estable (I, de la Figura 2.1.1.3) se forma todavía un radical (II, de la Figura 2.1.1.3) que puede continuar la autooxidación [59]. En la Figura 2.1.1.3 se esquematiza el mecanismo de acción antioxidante del  $\alpha$ -tocoferol.

La actividad de un antioxidante se determina mediante adición del antioxidante a un aceite, llevando a cabo tests de conservación de las mezclas y midiendo la extensión de la oxidación resultante del aceite [60,61]. La eficacia del antioxidante se evalúa mediante ensayos comparativos, haciendo uso de un factor antioxidante (AF):

$$AF = \frac{I_A}{I_0}$$

donde  $I_A$ : es el periodo de inducción del producto graso en la presencia del antioxidante,  $I_0$ : es el periodo de inducción de la oxidación de la grasa o aceite sin un antioxidante [59].



**Figura 2.1.1.3.** Mecanismo de acción antioxidante del  $\alpha$ -tocoferol.

Un conjunto de métodos que han sido propuestos y usados para la medida de la extensión de la oxidación de aceites y grasas se señalan a continuación:

- métodos químicos: se miden valores de ácidos, de peróxidos y carbonilos; son métodos de valoración con álcalis, iodométricos o basados en reacciones con reactivos como la 2,4-dinitrofenilhidrazina o el ácido tiobarbitúrico,
- métodos sensoriales: mediante la determinación del olor de los productos de descomposición o del propio antioxidante.

Otros métodos determinan la estabilidad de los aceites o grasas:

- método de la absorción de oxígeno (AOM): consiste en la inyección de aire en un aceite o grasa bajo condiciones controladas de temperatura y de flujo de aire y en la determinación del olor del gas exhausto y del índice de peróxidos a periodos de tiempo determinados,
- test del horno: la muestra se introduce en un horno a una temperatura controlada (63°C) y se mide el tiempo que la muestra tarda en alcanzar un grado de deterioro detectable mediante un test sensorial,
- método gravimétrico: se determinan gravimétricamente los cambios de peso que se producen cuando las muestras se colocan a una temperatura controlada.

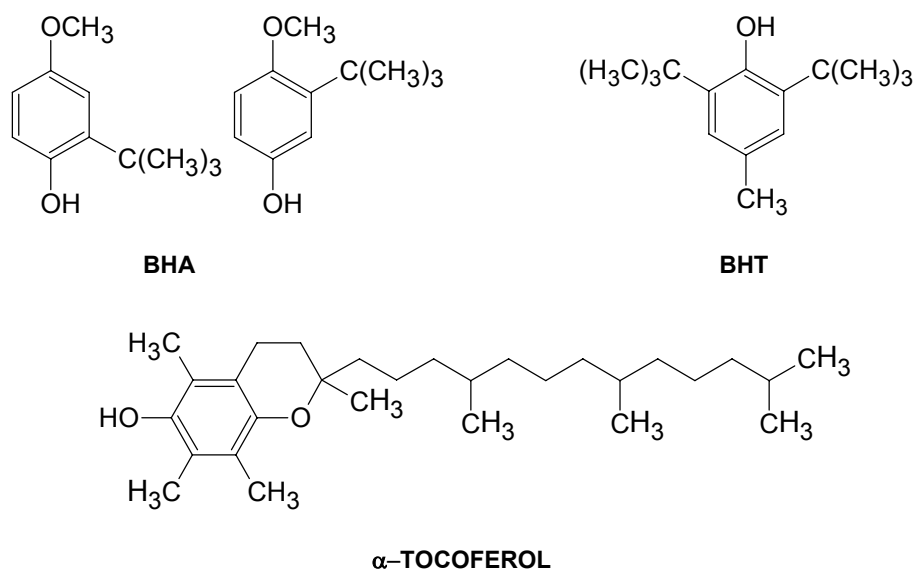
Otros métodos consisten en la medida de la cantidad de oxígeno consumido por el aceite o grasa:

- método de la bomba de la American Society for Testing and Materials (ASTM): la muestra se coloca en una bomba, se inyecta oxígeno a una presión de 690 kPa y se mide continuamente el periodo de inducción mediante determinación de la presión de oxígeno,
- medida de la absorción de oxígeno utilizando un manómetro,
- medida de los cambios en la calidad de grasas mediante quimioluminiscencia,

- test del  $\beta$ -caroteno: se basa en la medida espectrofotométrica de la extensión de la decoloración del  $\beta$ -caroteno debido a la degradación oxidativa de la grasa,
- medida del consumo del ácido linoleico: las muestras se oxidan enzimáticamente mediante adición de lipooxidasa y se mide el ácido linoleico que no reacciona.

d) Antioxidantes estudiados en esta Memoria

Los antioxidantes estudiados en la presente Memoria se pueden dividir en dos grupos: antioxidantes fenólicos o sintéticos como ter-butil-4-hidroxianisol, 2,6-di-ter-butil-p-hidroxitolueno y ter-butilhidroquinona y antioxidantes naturales como  $\alpha$ -tocoferol y  $\alpha$ -tocoferil acetato. En la Figura 2.1.1.4 se muestran las estructuras químicas de algunos de los antioxidantes objeto de estudio en esta Memoria.



**Figura 2.1.1.4.** Estructuras químicas de antioxidantes alimentarios estudiados en esta Memoria.

El BHA o ter-butil-4-hidroxianisol (E-320) solamente es soluble en grasas y no en agua y resulta muy eficaz como protector de las grasas de fritura, ya que no se descompone o evapora durante este proceso, como hacen los galatos o el BHT. Su seguridad ha sido discutida extensamente; no tiene acción mutagénica, pero es capaz de modular el efecto de ciertos carcinógenos sobre animales de experimentación, potenciando o inhibiendo su acción, en función del carcinógeno de que se trate. A dosis elevadas provoca, en la rata, la proliferación anormal de células en ciertos puntos de su tubo digestivo, y lesiones neoplásicas, por un mecanismo no bien conocido. Las diferencias anatómicas hacen que esto no sea extrapolable a la especie humana, aunque la proliferación anormal de células se ha demostrado también en el esófago de monos tratados con BHA

[62,63]. Su utilización está autorizada en la mayoría de los países (la UE y EE.UU. entre ellos), pero no en otros, como por ejemplo Japón. Existe una tendencia mundial a reducir el uso de este antioxidante. Usualmente se utiliza combinado con otros antioxidantes, especialmente con el BHT, ya que potencian mutuamente sus efectos [6,59].

El BHT o 2,6-di-ter-butil-p-hidroxitolueno (E-321) tiene las mismas aplicaciones que el BHA y, en general, las mismas limitaciones legales. Esta sustancia no es mutagénica, pero como el BHA, es capaz de modificar la acción de ciertos carcinógenos. Se elimina por la orina combinado con otras sustancias. A dosis muy altas, produce lesiones hemorrágicas y afecta a la reproducción en ratas y ratones, pero no en otras especies animales. Esto puede ser debido fundamentalmente a que interfiere con el metabolismo de la vitamina K, a cuya carencia son especialmente sensibles estos roedores [62,63]. En función de estos datos, la OMS rebajó en 1995 la IDA de este aditivo [25].

Los tocoferoles son el grupo de antioxidantes naturales más importante y más extendido en los tejidos animales y vegetales. Los aceites vegetales contienen concentraciones mucho más elevadas de antioxidantes naturales, incluyendo los tocoferoles, que las grasas animales y de hecho son mucho más estables frente a la degradación oxidativa. Son aceites amarillo pálidos muy liposolubles debido a su larga cadena lateral. Se oxidan rápidamente a tocoquinonas que no presentan propiedades antioxidantes. Además se degradan fácilmente por el calor, particularmente a las temperaturas empleadas en el refinado y procesado de grasas vegetales. El conjunto de tocoferoles se llama también

---

vitamina E, pero el uso de tocoferoles como antioxidantes en un alimento no autoriza a indicar en su publicidad que ha sido enriquecido con dicha vitamina. Su actividad como antioxidante parece seguir el orden inverso a su actividad biológica como vitamina, siendo el más eficaz el  $\gamma$ -. El menos activo es el  $\delta$ -, que tiene una actividad biológica como vitamina de sólo alrededor del 1% de la del  $\alpha$ - (E-307,  $\alpha$ -T). Los tocoferoles sintéticos tienen una actividad vitamínica algo menor que los naturales al ser mezclas de los isómeros posibles. Los tocoferoles se obtienen industrialmente como un subproducto del refinado de los aceites de germen de trigo, arroz, maíz o soja (E-306) o por síntesis química. Sólo son solubles en las grasas, no en el agua, por lo que se utilizan en alimentos grasos. Son unos protectores muy eficaces de la vitamina A, muy sensible a la oxidación y evitan la formación de nitrosaminas en los alimentos; no obstante, dosis muy elevadas (más de 700 mg de  $\alpha$ -tocoferol por día) pueden causar efectos adversos [58,60,64].

La ter-butilhidroquinona (TBHQ) es un antioxidante no permitido por la legislación de la UE, pero sí por la de los EE.UU. [54]. Se trata de un antioxidante potente especialmente en el retardo del desarrollo de olores a rancio en grasas insaturadas muy difíciles de estabilizar [6].

### 2.1.2. Conservantes o Conservadores

La principal causa de deterioro de los alimentos es el ataque por diferentes tipos de microorganismos (bacterias, levaduras y mohos), calculándose



que más del 20% de todos los alimentos producidos en el mundo se pierden por este motivo. El problema del deterioro microbiano de los alimentos tiene implicaciones económicas importantes, tanto para fabricantes, como para distribuidores y consumidores. Por otra parte, los alimentos alterados pueden resultar muy perjudiciales para la salud del consumidor. Estas razones resaltan la importancia que tiene el evitar este tipo de alteración de los alimentos [4,6,65–68].

Las distintas formas de deterioro de los alimentos causadas por microorganismos se pueden prevenir en gran medida mediante técnicas de conservación, la mayoría de las cuales previenen o ralentizan el crecimiento microbiano. Estas incluyen métodos físicos como la congelación, el calentamiento, la deshidratación, el curado, la irradiación, el envasado bajo atmósferas modificadas o controladas; o pueden emplearse métodos químicos que eviten su crecimiento, como es la adición de aditivos conservantes o conservadores. Es importante señalar que en muchos alimentos existen de forma natural sustancias con actividad antimicrobiana [65,66].

Se comentan a continuación una aproximación general a los conservantes, su mecanismo de acción así como los que son objeto de estudio en esta Memoria.

a) Definición, clasificación y características de los conservantes

Un aditivo conservante se define como una sustancia, no consumida normalmente como alimento, que se incorpora a un alimento para acrecentar su seguridad y estabilidad microbiológicas [69,70].

La expresión “no consumida normalmente como alimento” excluye los productos utilizados tradicionalmente como alimentos que poseen además propiedades conservadoras (vinagre, cloruro sódico, aceites comestibles y azúcares). Sin embargo, esta distinción, de valor legislativo, no impide destacar el interés, en el campo de la conservación, de estos productos o de algunos de sus componentes. Hay que señalar que ciertos aditivos utilizados con funciones conservadoras, pueden presentar también otras propiedades secundarias como ser depresores de la actividad del agua ( $a_w$ ), agentes acidificantes y antioxidantes.

Muchas sustancias se pueden utilizar en alimentos con funciones conservantes, pudiéndose clasificar en distintos grupos [4]:

- Conservantes minerales
  - Cloruros
  - Fosfatos
  - Nitratos y nitritos
  - Anhídrido sulfuroso y sulfitos
  - Anhídrido carbónico y bicarbonatos
  - Peróxido de hidrógeno
- Conservantes orgánicos
  - Ácidos grasos saturados y sus derivados: ácido acético y propiónico

- Ácido sórbico y sorbatos de calcio y potasio
- Ácido benzoico y sus derivados cálcico, sódico y potásico
- Otros ácidos orgánicos: ácido cítrico, ascórbico, tartárico, fumárico y láctico
- Ésteres del ácido p-hidroxibenzoico o parabenos: metílico (M-PHBA), etílico (E-PHBA) y propílico (P-PHBA)
- Antioxidantes fenólicos
- Antibióticos: como la nisina
- Enzimas: como la lisozima

Los conservantes orgánicos que son los que tienen aplicaciones más generalizadas y, por lo tanto son los que se usan más frecuentemente, son el ácido sórbico, el ácido benzoico y sus derivados. El resto de conservantes tienen aplicaciones más especializadas [6].

Los conservantes químicos deben asegurar:

- la inocuidad del alimento, que resulta de la inhibición del desarrollo de los microorganismos patógenos eventualmente presentes (salmonelas, clostridium, estafilococos, diversos mohos) y de la producción de toxinas, y
- la estabilidad sensorial del alimento, que resulta de la inhibición de los microorganismos de alteración.

Además de éstos, a un conservador alimentario se le exigen otros requisitos: ha de ser inocuo; su espectro\* de acción debe ser la más amplio posible; debe resultar suficientemente efectivo frente a los microorganismos

---

\*, espectro de acción de los conservantes: grupo de microorganismos sobre los actúa el conservante.

previsibles en las condiciones existentes en el alimento (pH,  $a_w$ , ...); no debe provocar fenómenos de resistencia; no debe afectar a los procesos microbiológicos deseados en algunos casos; debe mantenerse estable en los alimentos durante el máximo tiempo posible (como mínimo hasta que éstos se consuman); no debe reaccionar con los componentes de los alimentos; no debe reaccionar con el material de los envases ni resultar absorbido por éstos; no debe alterar las características sensoriales; debe resultar fácil de utilizar y debe ser lo más económico posible.

Es importante destacar que los consumidores pueden marcar algunas tendencias en lo que se refiere a la utilización de aditivos en los alimentos, ya que buscan aditivos que les inspiren una confianza total y que se utilicen a dosis lo más limitadas posible. El resultado de esto es el desarrollo de nuevas tendencias que se observan desde hace algunos años:

- En primer lugar hay una utilización, cada vez más generalizada, de conservantes de uso tradicional o también conservantes naturales que normalmente forman parte de la composición de los alimentos. Hay que destacar en este último grupo diversas sustancias naturales contenidas, especialmente en las especias, también con propiedades antimicrobianas [71–75].
- En segundo lugar, hay un esfuerzo cada vez más frecuente tendente a beneficiarse de los efectos sinérgicos entre diferentes agentes conservantes, ya que permiten reducir las dosis de cada uno de ellos para obtener un determinado efecto. Se pueden así

utilizar simultáneamente un agente físico y un conservante químico o también acumular los efectos de diferentes conservantes químicos. Esta tendencia conduce a una concepción nueva de la conservación química, consistente no sólo en proteger el alimento por una sustancia química determinada, sino en crear en el alimento un “ambiente hostil” a los microorganismos nocivos utilizando todos los factores posibles: tratamientos físicos, pH,  $a_w$ , efecto antimicrobiano de aditivos cuya función primordial es otra (antioxidantes), envases plásticos o recubrimientos comestibles que contienen conservantes [66,69,70].

Por último hay que destacar que los microorganismos desarrollan resistencias a los conservantes alimentarios, lo cual tiene consecuencias importantes, tanto económicas como para la salud. Entre los conservantes más frecuentemente utilizados se han descrito resistencias al ácido benzoico, sórbico y ésteres metílico y propílico del ácido p-hidroxibenzoico. Este hecho puede conllevar a que determinadas poblaciones de microorganismos resistan a los procesos de conservación y desinfección [76].

#### b) Espectro y mecanismo de acción de los conservantes

Los aditivos conservantes presentan diferentes espectros de acción frente a mohos, levaduras y bacterias. La mayor parte de estas sustancias son más activas contra mohos y levaduras que contra bacterias, pues presentan escasa

eficacia al pH óptimo de éstas. Los benzoatos y parabenos cubren el espectro de actividad más amplio actuando frente a bacterias, hongos y levaduras [6].

Con la única excepción de los ésteres del ácido p-hidroxibenzoico, los conservantes más ampliamente utilizados y varios de los más especializados son ácidos débiles o sales de ácidos débiles, por lo que presentan su mayor actividad en medio ácido o neutro. A pesar del hecho de que los conservadores químicos han sido usado durante muchas décadas, su modo de acción no se conoce totalmente [77]. La investigación sobre el modo de acción bioquímico de los conservantes alimentarios es compleja debido a que son compuestos relativamente simples que actúan sobre un amplio grupo de microorganismos lo que hace que la reacción entre los conservantes y los sitios de unión de los microorganismos sea débil y no específica [6].

Su actividad se relaciona con la mayor concentración relativa del ácido no disociado a bajos pH. Esta forma no disociada del ácido es capaz de atravesar la membrana de la pared microbiana y acceder al citoplasma [64]. El valor del pKa de los conservantes, que son ácidos débiles, se encuentra en el intervalo comprendido entre 4.2 (ácido benzoico) y 4.9 (ácido propiónico), por lo que a un pH por encima de estos valores la actividad de los conservadores se ve enormemente reducida. Al pH de la mayoría de los alimentos, los microorganismos mantienen un pH interno superior al de su entorno. Consecuentemente, el ácido no disociado, cuando entra en el citoplasma, tiende a disociarse, dando lugar a la formación de aniones cargados y protones que no pueden cruzar la membrana plasmática. Los iones pueden ser exportados por los

microorganismos, pero este proceso demanda energía, por la que el crecimiento del microorganismo se ve limitado. Si el suministro de energía decrece, entonces el pH del citoplasma cae a un nivel demasiado bajo y el crecimiento del microorganismo no continúa. Además, los aniones acumulados podrían tener efectos antimicrobianos específicos [6,66,78].

Los conservadores, además de tener influencia sobre la pared y/o membrana celular, afectan a la actividad enzimática intracelular y a la estructura genética del germen. La inhibición de las enzimas celulares es una causa importante de desorganización celular. El conocimiento actual sobre la interferencia de los conservantes en el mecanismo genético de los microorganismos no es completo [6].

Generalmente, a las dosis en que son empleados, los aditivos antimicrobianos no son bactericidas (no matan a los microorganismos), sino solamente bacteriostáticos (evitan la proliferación de éstos). Por lo tanto, sólo son útiles con materias primas de buena calidad, pudiendo únicamente conservar aquellos productos cuyas características iniciales fueran de calidad aceptable.

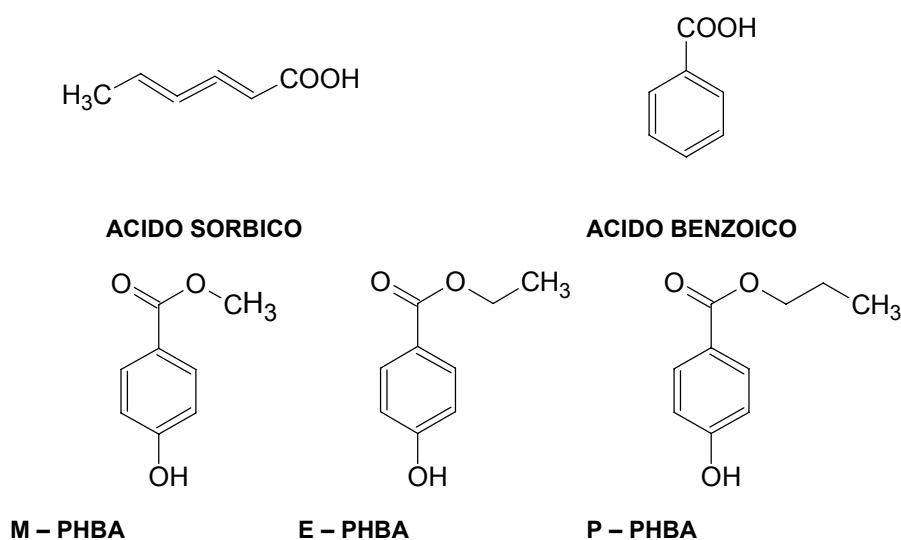
Los conservadores se metabolizan normalmente por las células animales y no tienen efecto tóxico, por lo menos a las dosis utilizadas habitualmente para estos aditivos.

#### c) Conservantes estudiados en esta Memoria

Los conservantes que se estudiaron en esta Memoria han sido los siguientes: ácido benzoico, ácido sórbico, éster metílico del ácido p-

---

hidroxibenzoico (M-PHBA), éster etílico del ácido p-hidroxibenzoico (E-PHBA) y éster propílico del ácido p-hidroxibenzoico (P-PHBA). En la Figura 2.1.2.1 se muestran las estructuras químicas de los conservantes estudiados en esta Memoria.



**Figura 2.1.2.1.** Estructuras químicas de los conservantes alimentarios estudiados en esta Memoria.

De una manera general se ha observado que la presencia de dobles enlaces en los ácidos grasos aumenta su actividad antimicrobiana y que los ácidos grasos poliinsaturados son particularmente eficaces como fungistáticos. En este grupo de compuestos se ha comprobado que el más útil es el ácido sórbico (E-200). Se trata de un ácido graso insaturado, presente de forma natural en algunos vegetales, pero fabricado para su uso como aditivo alimentario por síntesis química. Tiene la ventaja tecnológica de ser activo en un medio poco ácido y de carecer prácticamente de sabor. Sus principales inconvenientes son el



precio y su degradación cuando el alimento alcanza temperaturas elevadas. También se utilizan frecuentemente sus sales potásica (E-202) y cálcica (E-203). Es especialmente eficaz contra mohos y levaduras, y menos contra las bacterias, sobre las que también ejercen efecto a pH próximo a 6. Habitualmente este aditivo se incorpora al alimento junto con el benzoico, consiguiendo así una mayor efectividad antimicrobiana [6,63].

Respecto a las condiciones y mecanismos de acción, hay que señalar que el ácido sórbico no es eficaz sobre los mohos más que a condición de que éstos no sean muy abundantes, pues entonces el aditivo se inhibe [77,79]. Estos mohos metabolizan el ácido sórbico por vía  $\beta$ -oxidativa, de forma similar a como ocurre en los mamíferos. Otro mecanismo de desactivación del ácido sórbico ha sido comprobado especialmente en el *Penicillium roqueforti*, capaz de descarboxilar al aditivo generando un compuesto, el 1,3-pentadieno, carente de poder antimicrobiano y alterante de la calidad del producto por la aparición de olores desagradables. El ácido sórbico es más activo a pH bajo, pero su eficacia se encuentra quizá menos influenciada por el pH que en el caso de otros conservantes ácidos. La acción sobre el crecimiento de los microorganismos se explicaría por una inhibición ejercida sobre las enzimas de la célula microbiana, principalmente participantes en el metabolismo de los hidratos de carbono [65]. Además la membrana celular se ha descrito como el principal sitio de acción del sorbato afectando a la admisión de sustancias activas a través de la membrana celular, o por interferencia directa con el mecanismo de admisión o por influencia sobre el metabolismo energético, particularmente con el potencial electroquímico

---

de la membrana [65]. Otras características a destacar de este tipo de aditivos, y en concreto del sorbato potásico, son su actividad contra *Clostridium botulinum* y su contribución a disminuir la formación de nitrosaminas. Esta acción no está perfectamente explicada y se piensa que el aditivo actuaría en las fases iniciales de la germinación [65,72]. Por este motivo es habitual la asociación sorbatos–nitritos y la búsqueda de las condiciones en que esta asociación se favorece [80–82].

Los sorbatos son muy poco tóxicos siendo metabolizados por el organismo animal. Está considerado como una sustancia GRAS pues a través de diversos estudios se ha observado su seguridad a niveles superiores a los habitualmente presentes en los alimentos [6]. Metabólicamente se comporta en el organismo como los demás ácidos grasos, es decir, se absorbe y se utiliza como una fuente de energía, siendo metabolizado por vía  $\beta$ –oxidativa lo cual conduce a productos finales como CO<sub>2</sub> y agua.

El ácido benzoico (E–210) se encuentra presente en forma natural en algunos productos vegetales como la canela, el clavo, las ciruelas y los arándanos por ejemplo, aunque a nivel industrial se obtiene por oxidación, catalítica o por el O<sub>2</sub> del aire. Debido a que el ácido benzoico es poco soluble en agua, se utilizan más frecuentemente sus sales: el benzoato sódico (E–211), benzoato potásico (E–212) o el benzoato cálcico (E–213), siendo la sal sódica la más utilizada por su mayor hidrosolubilidad [6].

El ácido benzoico es especialmente eficaz en alimentos ácidos, con un pH entre 2.5 – 4, por ser la forma no ionizada del ácido benzoico la que es activa. En

lo que respecta al espectro de acción antimicrobiano, el ácido benzoico y sus sales son muy activos contra levaduras y mohos, microorganismos más frecuentes en productos ácidos, y en menor grado contra las bacterias [78,83]. Dicha actividad es debida a su acción sobre diversas enzimas importantes en el metabolismo de la célula microbiana y sobre la pared celular del microorganismo. El efecto contra las bacterias puede mejorarse mediante combinación con el ácido sórbico. Sus principales inconvenientes son el que tiene un sabor residual astringente poco agradable y su toxicidad, que aunque relativamente baja, es mayor que la de otros conservantes [6]. La ingesta de benzoato sódico con el alimento en cantidades variables, no provoca daño alguno, no teniendo efectos acumulativos ya que se combina con la glicina y se transforma en ácido hipúrico, fácilmente excretable por vía renal. Además tampoco se aprecia ninguna acción mutagénica o carcinogénica. En la actualidad el benzoato sódico está considerado como una sustancia GRAS, demostrándose su baja toxicidad en hombre y animales. Como efecto adverso se han detectado diversas reacciones de hipersensibilidad. Asimismo, son importantes las reacciones cruzadas en pacientes sensibles a analgésicos del tipo de la aspirina, que también lo son a conservantes como el ácido benzoico y el benzoato sódico. La tendencia actual es a utilizarlo cada vez menos substituyéndolo por otros conservantes de sabor neutro y menos tóxico, como los sorbatos.

Los ésteres del ácido p-hidroxibenzoico (parabenos), en particular los ésteres metílico (E-218), etílico (E-214) y propílico (E-216), así como sus derivados sódicos (E-219, E-215 y E-217 para el éster metílico, etílico y

---

propílico respectivamente), son compuestos sintéticos que presentan la doble ventaja de una buena solubilidad y de una débil sensibilidad al pH, lo que permite utilizarlos incluso cerca de la neutralidad. Los más ampliamente utilizados son el éster metílico y el propílico. Por esterificación de su grupo carboxílico, la molécula no disociada puede ser retenida en un intervalo de pH mucho más amplio que el descrito para el resto de los aditivos conservadores [6]. Los ésteres del ácido p-hidroxibenzoico son particularmente eficaces frente a mohos y levaduras. Son menos efectivos frente a las bacterias, especialmente las bacterias gram-negativas. Estos compuestos pueden tener múltiples efectos biológicos, pero generalmente se considera que su efecto inhibitorio se produce a través del transporte a través de la membrana o las funciones de la mitocondria [84]. La actividad antimicrobiana de los parabenos aumenta a medida que aumenta la longitud de la cadena del grupo éster, pero también disminuye su solubilidad a medida que esta aumenta [6,85]. Los parabenos han sido citados como agentes antibotulínicos y podrían presentar cierto interés en este aspecto. En cambio tienen el inconveniente de que incluso a las dosis autorizadas proporcionan a los alimentos un cierto olor y sabor fenólico. Parece demostrado que son poco tóxicos, incluso menos que el ácido benzoico, ya que se absorben rápidamente en el intestino, eliminándose también rápidamente en la orina, sin que se acumulen en el organismo. Su inocuidad no es perfecta: a dosis elevadas presentan una cierta toxicidad que justifica el que no se utilicen más que a dosis débiles y reservarlos para la conservación de alimentos consumidos en pequeña

cantidad. Algunas de las personas alérgicas a la aspirina también pueden ser sensibles a estos aditivos.

## **2.2. Aditivos de mejora de las cualidades sensoriales**

La aceptación o rechazo de un alimento por parte de los consumidores o su preferencia respecto a otro, dependen de la información sensorial que el alimento les transmita. Por este motivo a la tecnología alimentaria le interesa que un alimento sea aceptado y sobre todo preferido por el consumidor y hace uso del análisis sensorial de los alimentos para conocer las razones de las diferencias de aceptación, mejorar las preparaciones y descubrir nuevas fórmulas usando los aditivos que mejoran las cualidades sensoriales de los alimentos.

### **2.2.1. Colorantes**

El color es la primera sensación que se percibe de un alimento, y la que determina el primer juicio sobre su calidad. Es también un factor importante dentro del conjunto de sensaciones que aporta el alimento, y tiende a veces a modificar subjetivamente otras sensaciones como el sabor y el olor. Los alimentos naturales tienen su propio color, por lo que en principio parecería ideal mantenerlo a lo largo del proceso de transformación. Sin embargo, los consumidores prefieren en determinados alimentos un color constante, que no varíe entre los diferentes lotes de fabricación de un producto. La variabilidad natural de las materias primas hace que este color normalizado sólo pueda obtenerse modificándolo de forma artificial. Por otra parte, muchas sustancias

colorantes naturales de los alimentos son muy sensibles a los tratamientos utilizados en el procesado, destruyéndose, por lo que deben sustituirse por otras más estables. Otros alimentos aparecidos recientemente en el mercado no tienen ningún color propio y para hacerlos más atractivos deben colorearse artificialmente. Para obtener una concordancia entre lo que el consumidor espera o se imagina y lo que luego percibe, es necesario, en ocasiones, recurrir a los aditivos que van a lograr la conservación de las propiedades sensoriales iniciales del alimento durante un tiempo más o menos largo [4]. La aceptación del color en un alimento determinado está influenciada por factores culturales, geográficos y sociológicos [86].

A continuación se comenta una aproximación general a los colorantes estudiados en esta Memoria.

#### a) Definición, clasificación y características de los colorantes

La utilización de los colorantes en la alimentación no presenta ningún interés nutritivo puesto que ésta responde a la única preocupación de una mejor presentación. En principio, la adición de colorantes se efectúa para normalizar el color de un alimento, y no debe servir para disimular una alteración o para hacer creer la presencia de un constituyente de calidad. Los colorantes alimentarios se definen como aquellas sustancias que añaden o devuelven color a un alimento e incluyen componentes naturales de sustancias alimenticias y otras fuentes naturales que no son normalmente consumidos como alimentos por sí mismos y no son habitualmente utilizados como ingredientes característicos en

alimentación [8,44]. Hay que diferenciar entre distintos conceptos que se confunden con frecuencia. El término **colorante** es un término general que se utiliza para referirse a cualquier compuesto químico que origina color; un **pigmento** se refiere a constituyentes habituales de las células o tejidos que imparte color, de tal manera que un pigmento podría ejercer otras funciones en la célula además de la colorear; un **tinte** es un colorante que se usa en la industria textil y la utilización de este término no es correcta en la industria alimentaria; una **laca** es un colorante alimentario que se encuentra absorbido en la superficie de un portador inerte [86].

La clasificación de los colorantes puede hacerse en función de diferentes criterios. La clasificación más simple es la que establece una separación según el color: amarillo, rojo, verde–azul–marrón. También se puede tener en cuenta la naturaleza química de los colorantes, lo que permite agruparlos en función de su solubilidad o de su reactividad; se tendrá así los colorantes azoicos (mono–, di– o tri–azoicos), los xantenos, triarilmetanos, quinoleínicos e indigoides [60]. También se puede considerar su origen y distinguir entre colorantes naturales y sintéticos o artificiales.

La clasificación entre colorantes naturales y sintéticos es muy atrayente para la industria alimentaria, debido a la tendencia observada en los últimos años por parte de los consumidores, para los que la palabra “natural” tiene una connotación favorable mientras que la palabra “sintético” la tiene desfavorable [87,88]. Sin embargo, se trata de una noción ambigua ya que frecuentemente la clasificación de un colorante como natural es compleja. Dentro de los colorantes

---

naturales encontramos colorantes que están naturalmente presentes en los productos comestibles, como las clorofilas, carotenoides, antocianos y las betaínas. Hay otros que no se encuentran de forma natural en los alimentos pero que se extraen de un organismo natural, como por ejemplo el ácido carmínico extraído a partir de la cochinilla o los antocianos extraídos de las flores del hibisco. Otros colorantes naturales como el caramelo tienen un proceso de fabricación industrial que hace intervenir varias reacciones químicas, u otros que se fabrican por síntesis en la industria. Además, en la extracción de los colorantes naturales, y para obtener el grado de pureza exigido, se utilizan procedimientos complejos [89]. Hay que destacar que las IDA fijadas por el JECFA para los colorantes naturales no son siempre superiores a las de los colorantes sintéticos (ver Tabla 1.6.1) lo que nos indica que los colorantes naturales no son menos tóxicos que los sintéticos como se puede llegar a pensar [13–20].

Las condiciones que ha de cumplir un colorante desde el punto de vista tecnológico son el tener un poder colorante seguro, estable, reproducible y eficaz. Además se tenderá a utilizar unas dosis lo más débiles posibles tanto por la solubilidad del colorante como por su capacidad de fijarse a las moléculas del alimento. Los aspectos de inocuidad interesan evidentemente a todos y más directamente al consumidor que exige el menor riesgo para un tipo de aditivos que le parece a veces inútil [4].



**b) Características químicas y estabilidad de los colorantes**

Desde el punto de vista tecnológico son muy importantes las características de solubilidad y estabilidad de los distintos colorantes, debido a que estas características son las que van a determinar el uso de un colorante u otro.

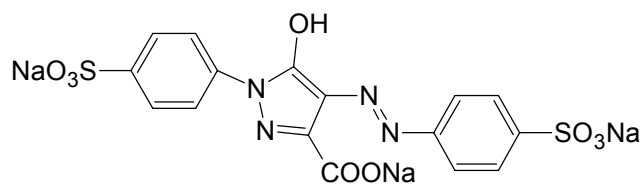
Si no tenemos en cuenta las lacas, todos los colorantes alimentarios permitidos en la UE son solubles en agua en mayor o menor medida e insolubles en aceites y grasas. El grado de solubilidad en agua se determina mediante el número y la posición relativa en la molécula del colorante de los grupos formadores de sales. El más común de estos grupos es el grupo ácido sulfónico ( $-\text{SO}_3\text{H}$ ) y el menos frecuente el grupo carboxílico ( $-\text{CO}_2\text{H}$ ), los cuales dan lugar a colorantes hidrosolubles aniónicos. Los colorantes catiónicos contienen grupos básicos tales como amino ( $-\text{NH}_2$ ) o amino sustituidos ( $-\text{NH}-\text{CH}_3$ ,  $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ) [6,60].

Todos estos colorantes muestran excelente estabilidad cuando se almacenan en condiciones de refrigeración, ausencia de humedad y en la oscuridad. El calor produce pérdidas de color durante el procesado tecnológico del alimento, por lo que los colorantes se añaden lo más tarde posible durante dicho procesado y en aquellos momentos en que la temperatura es más baja. La luz es capaz de inducir cambios fotoquímicos en todos los colorantes, produciendo en algunos casos incluso la pérdida de color. Un factor muy importante es el pH del alimento ya que no todos los colorantes muestran el mismo poder colorante a todos los valores de pH, e incluso algunos colorantes,

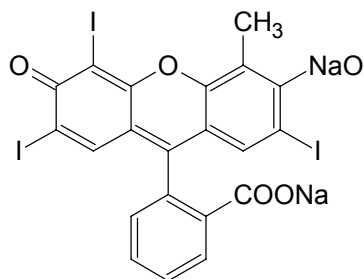
como la eritrosina, pueden precipitar a pH ácidos. Todos los colorantes exhiben una degradación acelerada tanto en condiciones ácidas como alcalinas y en presencia de metales como el zinc, estaño, aluminio, hierro y cobre, especialmente cuando la temperatura es alta. Otros factores como son algunos sistemas de óxido-reducción, y otros ingredientes presentes en los alimentos contribuyen a la estabilidad de los colorantes [6,60].

c) Colorantes estudiados en esta Memoria

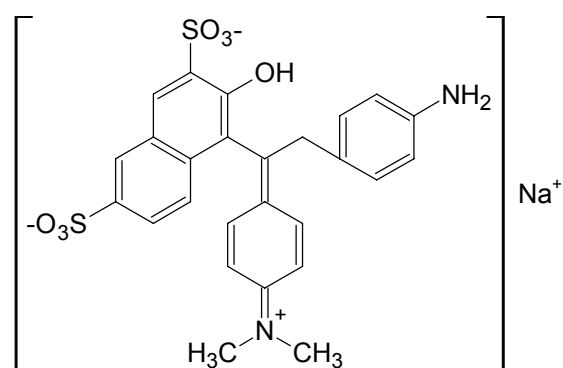
Los colorantes sintéticos elegidos para ser estudiados en esta Memoria han sido: tartrazina, eritrosina, verde ácido brillante BS, carmín de índigo, azul brillante FCF y negro brillante BN. Por otra parte, los colorantes naturales elegidos como representativos fueron: curcumina, riboflavina, trans- $\beta$ -caroteno, ácido carmínico y caramelo. Las Figura 2.2.1.1 y 2.2.1.2 muestran las estructuras químicas de todos los colorantes sintéticos y naturales estudiados en esta Memoria.



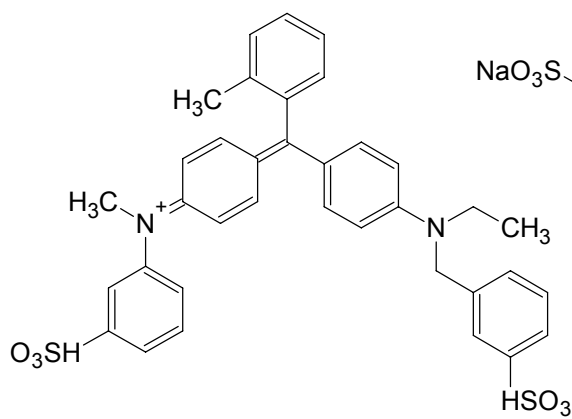
TARTRAZINA



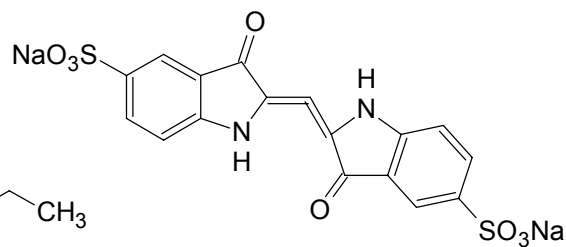
ERITROSINA



VERDE BRILLANTE



AZUL BRILLANTE



CARMIN DE INDIGO

Figura 2.2.1.1. Estructuras químicas de colorantes sintéticos.

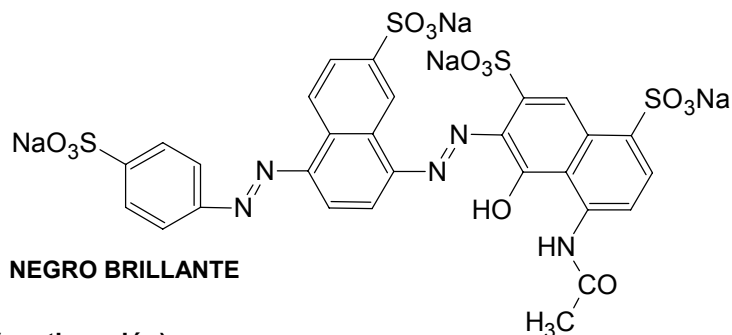


Figura 2.2.1.1. (continuación).

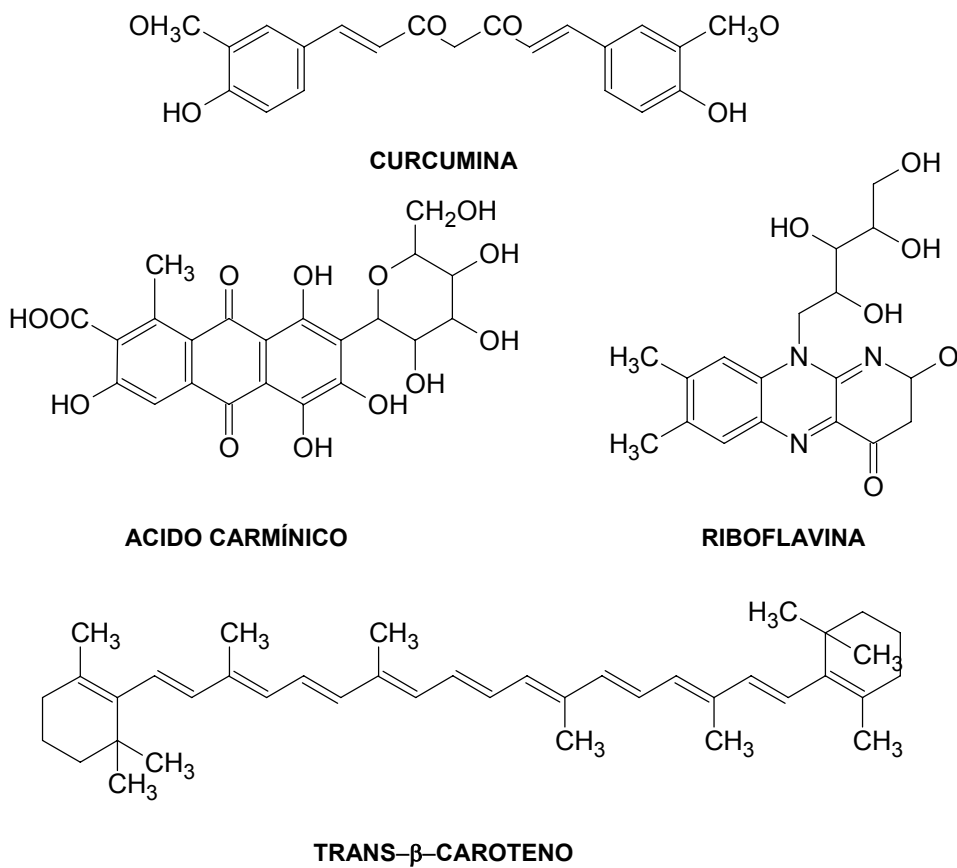


Figura 2.2.1.2. Estructuras químicas de colorantes naturales.

---

La tartrazina (E-102), también conocida como FD&C Yellow No 5 o CI Food Yellow 4, es un colorante amarillo que se presenta bajo forma de polvo amarillo anaranjado. Químicamente es la sal trisódica del ácido 4,5-dihidro-5-oxo-1-(4-sulfofenil)-4-[(4-sulfofenil)azol]-1H-pirazol-carboxílico. Es un colorante ampliamente utilizado, pero que desde el punto de vista toxicológico presenta algunas dudas. La tartrazina es capaz de producir reacciones adversas en un porcentaje de las personas alérgicas a la aspirina (alrededor del 10%). El mecanismo de esta sensibilidad cruzada no se conoce bien, ya que no existe un parentesco químico evidente entre ambas sustancias. Además se ha acusado a la tartrazina de producir trastornos del comportamiento en niños.

La eritrosina (E-127), FD&C Red No 3 o CI Food Red 14, es la sal disódica de la 2,4,5,7-tetraiodofluoresceína. Es un colorante sintético rojo que se presenta en forma de polvo. Desde el punto de vista toxicológico, el principal riesgo sanitario de su utilización es su acción sobre el tiroides, debido a su alto contenido en iodo. Aunque en su forma original se absorbe muy poco, no se conoce bien hasta qué punto el metabolismo de las bacterias intestinales puede producir su descomposición, originando sustancias más sencillas, o iodo libre, que sean más fácilmente absorbibles. Se tiende a limitar algunas de sus aplicaciones, especialmente las dirigidas al público infantil.

El verde ácido brillante (E-142) o CI Food Green 4 es el único colorante verde de síntesis autorizado ya que este color se suele obtener mediante mezcla de colorantes azules y amarillos. Es la sal disódica del ácido N-[4-[[4-(dimetilamino)fenil](2-hidroxi-3,6-disulfo-1-naftalenil)metileno]-2,5-ciclohexadi

---

en-1-ilideno]-N-metilmetanaminio. Se presenta en forma de polvo o gránulos de color verde oscuro o azul oscuro.

La sal disódica del sulfonato de indigotina es un colorante azul llamado también carmín de índigo (E-132) o FD&C Blue No 2, Acid Blue 74 o CI Food Blue 1. Se presenta como un polvo azul oscuro. Se absorbe muy poco en el intestino, eliminándose el absorbido en la orina y no es mutagénico.

El azul brillante FCF (E-133) o FD&C Blue No 1 o Acid Blue 9 o CI Food Blue 2 es un colorante de síntesis azul. Químicamente es la sal disódica de la 4[4-(N-etil-p-sulfobenzil-amino)-fenil-(2-sulfoniofenil-(metileno)-1[1-(N-etil-N-p-sulfo benzil) - $\alpha$  2,5-ciclohexadienimina].

El negro brillante BN (E-151) o negro PN o Food Black 1 es un colorante negro sintético. Es la sal tetrasódica del ácido [(sulfo-4-fenilazo-1)-4' sulfo-7' naftilazo-1'] hidroxiacetil amino-8 naftaleno disulfónico-3,5. Se presenta en forma de polvo o gránulos negros.

La curcumina (E-100), también conocida como CI Natural Yellow 3, es un colorante natural de color amarillo. Se obtiene mediante extracción, con disolventes, de la cúrcuma, es decir, de los rizomas terrestres de *Curcuma longa* L, planta cultivada en Extremo Oriente y Madagascar. Se trata de un producto que consiste fundamentalmente en curcuminas [1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxifenil)-hepta-1,6 dieno-3,5-diona] y sus dos derivados desmetoxilados en distintas proporciones. Pueden estar presentes pequeñas cantidades de aceites y resinas que aparecen de forma natural en la cúrcuma. Se presenta como un polvo cristalino amarillo anaranjado parduzco, con reflejos violáceos. En tecnología de

---

alimentos se utiliza, además del colorante parcialmente purificado, la especia completa y la oleoresina. Este colorante tiene una toxicidad muy pequeña; se absorbe relativamente poco en el intestino, y el que se absorbe se elimina rápidamente por vía biliar.

La riboflavina o lactoflavina o vitamina B<sub>2</sub> (E-101i) se obtiene a partir de fuentes naturales (levaduras, gérmenes de trigo, huevos, hígado de animales) o, industrialmente, por síntesis química o por métodos biotecnológicos. Su denominación química es dimetil-6,7 (D'-1'-ribitol) -9-isoaloxazina. Es un colorante natural amarillo anaranjado. Como colorante tiene la ventaja de ser estable frente al calentamiento, y el inconveniente de que, expuesta a la luz solar o a la procedente de tubos fluorescentes es capaz de iniciar reacciones que alteran el aroma y el sabor de los alimentos. La riboflavina es una vitamina para el hombre y su papel fisiológico se conoce perfectamente: forma parte de la composición de los nucleótidos libres FMN y FAD y, por esta razón, participa en los fenómenos de respiración celular y de fosforilación oxidativa. Cuando se emplea como colorante no pueden hacerse indicaciones acerca del enriquecimiento vitamínico en la publicidad del alimento.

El trans- $\beta$ -caroteno (E-160a), también conocido como CI Food Orange 5, es un colorante natural de color naranja brillante, ampliamente extendido en la naturaleza en numerosos frutos comestibles, hortalizas, flores, estando también presentes en los productos animales como huevos, mariscos y pescados. El aditivo normalmente se obtiene por síntesis química. Químicamente es una cadena de unidades isoprénicas que lleva al final de la cadena un núcleo cíclico. Son

---

compuestos liposolubles pero la industria fabrica preparaciones hidrodispersables formulando dispersiones coloidales, emulsificando los carotenoides o dispersándolos en los coloides apropiados. Además tiene actividad vitamínica A.

El ácido carmínico (E-120) es un colorante rojo natural que se extrae de la hembra de la cochinilla *Dactylopius coccus* Costa, insecto parásito de algunas especies de cactus, que vive principalmente en América del Sur y Central, en África del Norte y también en las Islas Canarias. Mediante extracción se separan los residuos anatómicos que no contienen el colorante de aquellos que lo contienen. El producto obtenido contiene una cierta proporción de ácido carmínico (10 a 20%) que es la materia colorante de un rojo vivo. Normalmente se comercializa en forma de lacas de aluminio del ácido carmínico (carmines). Con el ácido carmínico o ácido 7-β-D-glucopironosil-3,5,6,8-tetrahidroxi-1-metil-9,10-dioxo antraceno-2-carboxílico se obtiene un color rojo vivo en medio ácido y un color violáceo en medio básico. No se conocen efectos adversos para la salud producidos por este colorante, aunque se le asocian ciertas alergias.

El caramelo es un colorante natural de color marrón, de composición compleja y químicamente no bien definido. Se trata de una mezcla compleja de compuestos mal definidos entre los cuales se encuentran el  $C_{24}H_{36}O_{18}$  y el  $C_{36}H_{102}O_{51}$ , que hacen pensar en una polimerización y/o una ciclación de varios azúcares con un reagrupamiento molecular. Se obtiene exclusivamente por calentamiento (temperatura crítica 170°C) de un azúcar comestible como la sacarosa y otros (E-150a). Para reforzar la caramelización se pueden utilizar ácidos de calidad alimentaria, álcalis y sales. Los compuestos derivados del ácido

---



sulfúrico y de sulfitos pueden ser empleados en la fabricación de caramelo de sulfito cáustico (E-150b) y de caramelo al sulfito de amonio (E-150d): ácido sulfúrico y sulfitos y bisulfitos de potasio, de sodio y de amonio. Los compuestos amoniacaes siguientes son igualmente utilizados en la preparación de caramelo amoniacal (E-150c): hidróxido de amonio, carbonato, bicarbonato, fosfato y sulfitos. Aproximadamente la mitad de los componentes del caramelo son azúcares asimilables. Aunque no se conoce con mucha precisión, parece que los otros componentes específicos del caramelo se absorben poco en el intestino.

### **3. METODOLOGIAS PARA LA DETERMINACION DE ADITIVOS ANTIOXIDANTES, CONSERVANTES Y COLORANTES EN ALIMENTOS**

El desarrollo de métodos analíticos para la determinación de aditivos en alimentos responde a la necesidad de controlar la estabilidad de los aditivos durante el procesado y el almacenamiento de los alimentos o, fundamentalmente, a necesidades legales tales como: (a) establecer qué aditivos se encuentran presentes en los alimentos, (b) determinar la concentración de los aditivos que contienen los alimentos y si dicha concentración está por debajo del límite establecido en la legislación y (c) confirmar la ausencia de aditivos que no están permitidos en un determinado tipo de alimento.

En esta revisión bibliográfica se resumen las metodologías desarrolladas para la determinación de antioxidantes, conservantes y colorantes en distintos tipos de alimentos, incluyendo el pretratamiento de las muestras y las técnicas de determinación, separación y detección y confirmación. Las distintas técnicas para el pretratamiento de las muestras se han sistematizado en la Tabla 3.1.1 y las técnicas de determinación, separación y detección y confirmación en la Tabla 3.2.1, 3.2.2, 3.2.3 y 3.2.4. Al final de esta sección se recogen los avances en automatización, miniaturización y screening que se han producido en la determinación de aditivos alimentarios.

#### **3.1. Pretratamiento de la muestra: extracción y limpieza**

El pretratamiento de los alimentos para la determinación de aditivos es muy variable dependiendo de la naturaleza de las muestras (muestras líquidas o

sólidas, muestras con alto contenido en lípidos, proteínas o carbohidratos) o de la técnica analítica para la determinación del aditivo.

En muchos casos, las muestras más sencillas (muestras líquidas) no requieren ningún tipo de tratamiento previo o si existe es muy sencillo [90–98].

La mayoría de los alimentos han de tratarse previamente a la determinación de los aditivos, siendo con frecuencia el primer paso una extracción líquido-líquido (LLE, Liquid-Liquid Extraction), con el objeto de eliminar interferencias. La LLE puede ser simple o repetitiva (con el mismo disolvente y combinando finalmente todos los extractos). El extractante y el método de extracción empleados dependen fundamentalmente de la naturaleza de la muestra. Como se puede observar en la Tabla 3.1.1, la extracción puede realizarse con un solo disolvente, principalmente n-hexano [99–101], agua o agua acidificada [102–105], acetonitrilo [106–108], diclorometano [109–111], etanol o metanol [112,113], éter dietílico o de petróleo [111,114,115], acetona [116] y cloroformo [117], o bien con una mezcla binaria de los mismos [112,118–121] e incluso ternaria [122,123], en la que se combina un disolvente muy polar como agua o un alcohol con otros disolventes menos polares.

**Tabla 3.1.1.** Tratamientos previos utilizados en distintos métodos desarrollados para la determinación de aditivos en alimentos.

Analitos	Muestra	Pretratamiento de la muestra				Ref
		Lixiviación	LLE	SPE	Otros	
Conservantes	Zumos de frutas	–	–	–	–	[90]
Conservante	Bebidas	–	–	–	Reacción	[91]
Antioxidantes sintéticos	Aceites, margarina, mantequilla	–	–	–	–	[92]
Conservantes	Bebidas	–	–	–	–	[93]
Colorantes naturales	Zumos vegetales	–	–	–	–	[94]
Colorante natural	Bebidas	–	–	–	–	[95]
Colorante natural	Bebidas	–	–	–	Reacción	[96]
Colorantes sintéticos	Bebidas	–	–	–	–	[97]
Conservante	Bebidas	–	–	–	–	[98]
Antioxidantes naturales	Aceites, galletas	n-Hexano	n-Hexano	Sílice	–	[99]
Antioxidantes naturales	Bebidas	–	n-Hexano	–	–	[100]
Antioxidante natural	Aceites	–	n-Hexano	–	–	[101]
Conservantes	Bebidas, zumos de frutas, yogur, fruta en conserva	Agua	Agua	RP-C <sub>18</sub>	–	[102]
Colorante natural	Zumos de frutas, gelatina, bebidas, yogur, helados	–	Agua	RP-C <sub>18</sub>	–	[103]
Colorante natural	Alimentos	–	Agua	RP-C <sub>18</sub>	–	[104]
Colorantes sintéticos	Bebidas, gelatina, golosinas, postres lácteos	Agua	Agua	–	Diálisis	[105]
Antioxidantes sintéticos	Aceites, alimentos	–	Acetonitrilo	–	–	[106]
Antioxidantes sintéticos	Golosinas	Acetonitrilo	–	–	–	[107]
Conservantes	Mayonesa	–	Acetonitrilo	–	–	[108]
Antioxidantes, colorantes naturales	Zumos vegetales, bebidas, alimentos infantiles	Dicloro metano	Dicloro metano	–	–	[109]

Tabla 3.1.1. (continuación).

Analitos	Muestra	Pretratamiento de la muestra				Ref
		Lixiviación	LLE	SPE	Otros	
Colorante natural	Aceites	–	Dicloro metano	–	–	[110]
Colorante natural	Disolución caramelo	–	Dicloro metano o éter etílico	–	–	[111]
Antioxidantes sintéticos	Salsas, sopas, pastillas caldo, carne liofilizada	Metanol o n-hexanol+ 2-propanol	Metanol o n-hexano + 2-propanol	–	–	[112]
Antioxidantes naturales	Alimentos	–	Etanol	–	–	[113]
Colorante natural	Bebidas, sopas, pimentón	Eter petróleo	Eter petróleo	–	–	[114]
Conservantes	Bebidas, alimentos	Eter etílico	Eter etílico	–	Reacción	[115]
Antioxidantes, conservantes	Salsas, carne liofilizada, frutas azucaradas	Acetona	Acetona	RP-C <sub>18</sub> o sílice	Destilación	[116]
Conservante	Bebidas	–	Cloroformo	–	–	[117]
Colorantes sintéticos	Bebidas, mermeladas, verduras secas	Agua + metanol	Agua + metanol	–	–	[118]
Colorantes naturales	Embutidos	Cloroformo + metanol	–	–	–	[119]
Colorantes naturales	Verduras liofilizadas	THF + metanol	–	–	–	[120]
Antioxidantes sintéticos y naturales, colorantes naturales	Margarina, alimentos infantiles	t-Butil metil éter + éter petróleo	t-Butil metil éter + éter petróleo	–	–	[121]
Antioxidantes sintéticos	Carne picada	Agua + éter etílico + n-hexano	–	–	–	[122]
Antioxidantes sintéticos	Alimentos	Etanol + 2-propanol + acetonitrilo	–	–	–	[123]
Colorantes sintéticos	Golosinas	–	–	RP-C <sub>18</sub>	–	[126]
Colorantes sintéticos	Bebidas lácteas	–	–	Poliamida	–	[127]
Antioxidantes sintéticos	Alimentos	–	–	RP-C <sub>18</sub>	–	[128]
Colorantes sintéticos	Carne, pescado procesados	–	–	RP-C <sub>18</sub>	–	[129]

**Tabla 3.1.1. (continuación).**

Analitos	Muestra	Pretratamiento de la muestra				Ref
		Lixiviación	LLE	SPE	Otros	
Conservante	Mermeladas	–	–	XAD-2	–	[130]
Colorantes sintéticos y naturales	Bebidas	–	–	RP-C <sub>18</sub> o amino	–	[131]
Colorantes sintéticos	Bebidas, golosinas, salsas, huevo en polvo, mermelada	–	–	Lana	–	[132]
Colorantes sintéticos	Bebidas, golosinas	–	–	XAD-2	–	[133]
Conservantes	Bebidas	–	–	RP-C <sub>18</sub>	–	[134]
Colorante natural	Leche, cereales	–	–	RP-C <sub>18</sub>	MAE + diálisis	[135]
Colorantes sintéticos	Alimentos	–	–	Lana	–	[136]
Conservantes	Bebidas	–	–	Amino	–	[137]
Antioxidante natural	Leche en polvo	–	–	–	SFE	[138]
Antioxidantes naturales	Derivados de la aceituna	–	–	–	SFE	[139]
Antioxidantes sintéticos	Alimentos	–	–	–	SFE	[140]
Colorantes naturales	Zanahoria liofilizada	–	–	–	SFE	[141]
Colorante natural	Curcuma en polvo	–	–	–	CCC	[142]
Colorantes sintéticos	Alimentos	–	–	–	CCC	[143]
Colorante natural	Margarina	–	–	–	GPC	[144]
Antioxidantes naturales	Aceites	–	–	–	Membrana	[145]
Conservantes	Bebidas, productos lácteos	–	–	–	Diálisis	[146]
Antioxidante natural	Huevo en polvo	–	–	–	SME	[147]
Antioxidante sintético	Agua mineral	–	–	–	SPME	[148]
Conservantes	Bebidas, salsas, vinagre	–	–	–	SBSE	[149]

Sin embargo, junto con los analitos también se extraen otros compuestos procedentes de la matriz. Por ello, es necesaria una etapa de limpieza del extracto, la cual depende del sistema de detección empleado. Así, si el detector utilizado es suficientemente selectivo, no se necesita una limpieza demasiado rigurosa del extracto [91,93,94,96–98,100,106–111,113,117,118], pero si no es así, entonces esta etapa debe ser lo suficientemente efectiva para eliminar la mayor parte posible de los co-extractos que pueden interferir en la determinación. Por otra parte, puesto que la concentración de los aditivos en este extracto no permitiría alcanzar los límites establecidos por la legislación, es necesario incluir una etapa de preconcentración de los analitos.

La LLE es una técnica muy conocida y utilizada para la separación de los aditivos de sus co-extractos [115,120]. Sin embargo, las tendencias actuales están reemplazando la LLE a favor de la extracción en fase sólida (SPE, Solid Phase Extraction). La SPE se introdujo a principio de los años 70 para evitar o minimizar los inconvenientes de la LLE. La SPE presenta varias ventajas frente a ésta como son (a) sencillez de uso, (b) la disminución del volumen de muestra y/o extractante requeridos en la extracción, (c) el menor tiempo requerido en el tratamiento, (d) la menor manipulación de las muestras, (e) los mayores factores de preconcentración y (f) se evita la formación de emulsiones [124,125]. Es posible emplear la SPE como única etapa de limpieza [126–137], o bien como una adicional tras la LLE [99,102–104,116]. El uso de la SPE ha sido impulsado por la gran variedad de sólidos sorbentes polares y no polares e intercambiadores iónicos existente. Los sólidos sorbentes que más se utilizan para la

---

preconcentración de antioxidantes, conservantes y/o colorantes se recogen en la Tabla 3.1.1, entre los que destacan: RP-C<sub>18</sub> [102–104,116,126,128,129,131,134,135], gel de sílice [99,116], sorbentes con grupos amino [131,137], sorbente polimérico XAD–2 [130,133], poliamida [127] y lana [132,136].

La extracción con un fluido supercrítico (SFE, Supercritical Fluid Extraction) también es una técnica que se utiliza para la extracción de aditivos en muestras de alimentos [138–141]. Presenta la ventaja de que ahorra tiempo y disolventes, siendo el disolvente más utilizado el dióxido de carbono [138–141] por su temperatura (31°C) y su presión (73 atm) críticas moderadas. Además, el CO<sub>2</sub> no es inflamable, ni tóxico y no es demasiado caro. El metanol se utiliza en algunos casos como modificador para ajustar el poder de disolución del fluido [138,141].

También existen otras técnicas de extracción, relativamente recientes, que están empezando a utilizarse en la determinación de aditivos alimentarios, pero que aún no se encuentran muy extendidas:

- cromatografía a contracorriente (CCC, Counter–Current Chromatography) [142,143]: se trata de un tipo de cromatografía de reparto cuya característica más importante es que la fase estacionaria no se encuentra retenida sobre un soporte sólido,
- cromatografía en gel (GPC, Gel Permeation Chromatography) [144]: es una técnica de limpieza que se emplea para la separación de proteínas y biomoléculas, en base al tamaño molecular, partición o adsorción. Así, las diferentes fracciones del



eluido pueden contener diferentes tipos de compuestos separando los aditivos de sus co-extractos,

- destilación [116]: esta técnica consiste en separar los componentes de una mezcla basándose en las diferencias en los puntos de ebullición de los distintos componentes, para lo cual se produce un aporte energético, en forma de calor, a la mezcla a separar,
- separación a través de membrana [145]: esta técnica se basa en la transferencia de los analitos, que se encuentra en disolución, a través de una membrana que actúa como barrera selectiva (tamaño de poro) al transporte de determinadas sustancias siempre que exista una diferencia de potencial químico entre las dos disoluciones que separa la membrana,
- diálisis [105,135] y microdiálisis [146]: esta técnica se refiere a aquellas separaciones que tienen lugar a través de membrana en las que la fuerza impulsora de la separación es una diferencia de concentración a través de la misma, produciéndose un paso selectivo de los aditivos mientras que los solutos coloidales de mayor peso molecular no atraviesan la membrana,
- extracción con disolventes asistida por microondas (MAE, Microwave Assisted Extraction) [135]: esta técnica utiliza la energía de las microondas para favorecer y acelerar la extracción

con disolventes, siendo más eficaz que la clásica extracción Soxhlet,

- extracción con disolventes asistida por ultrasonidos [102]: al igual que en el caso anterior, esta técnica utiliza la energía de los ultrasonidos para favorecer y acelerar la extracción con disolventes,
- microextracción con disolventes (SME, Solvent Micro-Extraction) [147]: es una LLE que emplea microvolúmenes de un disolvente orgánico para la extracción de analitos desde una fase acuosa,
- microextracción en fase sólida (SPME, Solid Phase Micro-Extraction) [148]: en esta técnica los analitos se adsorben en una fibra recubierta con polímeros, bien al sumergirla en la muestra si ésta es líquida, o bien utilizando la técnica de espacio de cabeza si son sólidas; tiene la ventaja de la introducción directa al cromatógrafo de gases,
- extracción mediante barra de adsorción (SBSE, Stir Bar Sorptive Extraction) [149]: en esta técnica se utiliza una barra agitadora recubierta con polímeros donde se adsorben los analitos, al colocarla dentro de la muestra líquida.

### **3.2. Determinación, separación y detección de aditivos alimentarios**

Para llevar a cabo la determinación de aditivos en alimentos se utilizan una serie de métodos analíticos basados en técnicas espectroscópicas, electroquímicas y de separación con detector incorporado.

Para la determinación de aditivos individuales normalmente se usan distintas técnicas espectroscópicas (ver Tabla 3.2.1): espectrofotometría UV-Visible [150–152], espectrofluorimetría [96,98,153], luminiscencia [91] y espectrometría fotoacústica [154]. En algunos casos, y para incrementar la selectividad del método se utiliza una combinación de técnicas espectroscópicas [155]. Otra alternativa para la determinación de aditivos individuales son las técnicas electroquímicas [110,117]. Sin embargo, normalmente los aditivos se encuentran combinados para complementar y potenciar su actividad antioxidante, antimicrobiana o colorante, por lo tanto es necesario desarrollar métodos analíticos para la determinación de mezclas de aditivos. Aunque se aplican algunos métodos espectroscópicos [100,126,128,132,156,157] y electroquímicos [97,113,158] para la determinación de mezclas de aditivos, con este fin, preferentemente se utilizan métodos de separación.

**Tabla 3.2.1.** Métodos espectroscópicos y electroquímicos desarrollados para la determinación de aditivos en alimentos.

Analitos		Muestra	Método de determinación	Ref
<b>Métodos espectroscópicos</b>				
Conservante	Individual	Bebidas	Luminiscencia	[91]
Colorante natural	Individual	Bebidas	Espectrofluorimetría	[96]
Conservante	Individual	Bebidas	Espectrofluorimetría	[98]
Antioxidantes naturales	Mezcla	Bebidas	Espectrofluorimetría	[100]
Colorantes sintéticos	Mezcla	Golosinas	Espectrofotometría UV-Visible en fase sólida	[126]
Antioxidantes sintéticos	Mezcla	Alimentos	Espectrofotometría UV-Visible en fase sólida	[128]
Colorantes sintéticos	Mezcla	Bebidas, golosinas, salsas, huevo en polvo, mermelada	Espectrofotometría UV-Visible	[132]
Colorante natural	Individual	Alimentos	Espectrofotometría UV-Visible	[150]
Conservante	Individual	Alimentos	Espectrofotometría UV-Visible	[151]
Antioxidante sintético	Individual	Aceites	Espectrofotometría UV-Visible	[152]
Antioxidante sintético	Individual	Alimentos	Espectrofluorimetría	[153]
Colorante natural	Individual	Espicias	Espectrometría fotoacústica	[154]
Colorante natural	Individual	Curcuma en polvo	Espectrofotometría UV-Visible + espectrofluorimetría	[155]
Antioxidantes sintéticos	Mezcla	Alimentos	Luminiscencia	[156]
Colorantes naturales y sintéticos	Mezcla	Alimentos	Espectrometría Raman	[157]
<b>Métodos electroquímicos</b>				
Colorantes sintéticos	Mezcla	Bebidas	Voltametría	[97]
Colorante natural	Individual	Aceites	Voltametría	[110]
Antioxidantes naturales	Mezcla	Alimentos	Culombimetría	[113]
Conservante	Individual	Bebidas	Métodos electroquímicos	[117]
Antioxidantes sintéticos	Mezcla	Aceites y sopas	Amperometría	[158]

La mayor parte de los métodos analíticos para la determinación de antioxidantes, conservantes y colorantes en alimentos se basan en técnicas de separación cromatográficas, aunque también se han desarrollado métodos electroforéticos (en las distintas modalidades de la técnica) para la determinación de dichos aditivos [90,95,127,159], que se resumen en la Tabla 3.2.2.

La cromatografía de capa fina (TLC, Thin Layer Chromatography), en sus modalidades normal y de alta resolución, se utiliza para la separación y cuantificación de estas sustancias con manipulación mínima de la muestra (Tabla 3.2.2). La técnica de detección más extendida es la espectrofotometría UV-Visible [101,131,133,134], aunque también se utilizan otras técnicas como la espectrofluorimetría [123] y la espectrometría de masas (MS, Mass Spectrometry) [136].

**Tabla 3.2.2.** Métodos electroforéticos y de cromatografía de capa fina desarrollados para la determinación de aditivos en alimentos.

Analitos	Muestra	Separación	Detección	Ref
<b>Electroforesis</b>				
Conservantes	Zumos de frutas	Electroforesis capilar de zona	Diodos en fila	[90]
Colorante natural	Bebidas	Electroforesis capilar	–	[95]
Colorantes sintéticos	Bebidas lácteas	Electroforesis capilar	Diodos en fila	[127]
Antioxidantes sintéticos y naturales	Aceite, vino	Cromatografía micelar electrocinética	–	[159]

**Tabla 3.2.2. (continuación).**

Analitos	Muestra	Separación	Detección	Ref
<b>Cromatografía de capa fina</b>				
Antioxidante natural	Aceites	TLC	UV-Visible	[101]
Antioxidantes sintéticos	Alimentos	TLC	Fluorescencia	[123]
Colorantes sintéticos y naturales	Bebidas	TLC alta resolución	Densitometría	[131]
Colorantes sintéticos	Bebidas, golosinas	TLC alta resolución	UV-Visible	[133]
Conservantes	Bebidas	TLC	UV-Visible	[134]
Colorantes sintéticos	Alimentos	TLC	MS	[136]

La cromatografía de líquidos (LC, Liquid Chromatography) es la técnica preferida para la determinación de aditivos en alimentos, los cuales, en general, son poco volátiles y en algunos casos termolábiles. En la mayoría de los métodos desarrollados, la fase estacionaria utilizada para la separación, tanto de antioxidantes, como de conservantes y colorantes, es una fase reversa de sílice con grupos octadecilsilano RP-C<sub>18</sub> [92, 99, 103–106, 108, 114, 116, 118, 120, 130, 135, 137, 141, 146, 160, 161], aunque también se ha hecho uso de otro tipo de fases estacionarias como son fases reversas RP-C<sub>30</sub> [94, 109, 162] y fases de intercambio iónico [93, 102]. La detección de aditivos después de su separación por cromatografía de líquidos se ha llevado a cabo usando detectores UV-Visible [92, 102, 103, 105, 112, 114, 116, 119, 120, 129, 130, 137, 138, 141, 145, 161], de fluorescencia [104, 106, 108, 135, 147], electroquímicos [146, 163], de espectrometría de masas [109, 164] y otros de uso menos generalizado como detectores de cristales de cuarzo piezoeléctricos en serie [93]. En la Tabla 3.2.3

se recogen los métodos de cromatografía de líquidos resumidos, destacando el tipo de fase estacionaria, de cromatografía y de detectores utilizados.

Sin embargo, cuando se intenta separar aditivos con distinta polaridad, la separación mediante cromatografía de líquidos se ve dificultada. La cromatografía de gases (GC, Gas Chromatography), con o sin derivatización, también se utiliza para la determinación selectiva de aditivos alimentarios individuales o en mezclas (Tabla 3.2.4). La separación de antioxidantes, conservantes y colorantes tiene lugar utilizando fases estacionarias no polares compuestas por un 100% poli(dimetilsiloxano) [115], fases de polaridad intermedia compuestas por un 5% difenil–95% dimetilsiloxano [122,148,165,166] o por un 50% difenil–50% dimetilsiloxano [167] y fases polares compuestas por un 100% poli(etilenglicol) [111]. La detección de estos analitos se realiza utilizando el detector de ionización de llama (FID, Flame Ionization Detector), que es selectivo a los compuestos que poseen grupos –CH– [107,122,165,167] o detectores universales como el de espectrometría de masas [111,115,148,149,166].

También se hace uso de otras técnicas cromatográficas para la determinación de aditivos alimentarios, que son de desarrollo relativamente recientes y que aún no se encuentran muy extendidas, como es la cromatografía de fluido supercrítico (SFC, Super–Critical Fluid Chromatography) [139].

### **3.3. Identificación de aditivos alimentarios**

En el análisis de aditivos en alimentos es con frecuencia necesaria la identificación de los analitos que han sido determinados cuantitativamente

---

empleando los detectores anteriormente citados que, aunque proporcionen una elevada sensibilidad (fundamental para alcanzar los límites legales establecidos), no permiten la identificación de dichos compuestos. Con el objeto de la confirmación de los resultados obtenidos se hace uso de dos estrategias: por un lado la utilización de detectores que permitan la identificación inequívoca de los compuestos y por otra la utilización de dos detectores distintos para comparar sus respuestas frente a una misma mezcla de analitos.

La espectrometría de masas es una herramienta excelente que se puede utilizar acoplada tanto a un cromatógrafo de líquidos [94,109,118,162,164] como a un cromatógrafo de gases [107,111,115,148,149,165,166], para la confirmación de la identidad de antioxidantes, conservantes y colorantes en alimentos. Un espectro completo de masas de un aditivo proporciona una información estructural del mismo que sólo le corresponde a él. La mayoría de los estudios que se han realizado hasta el momento utilizan la técnica de ionización por impacto electrónico (EI, Electronic Impact) a una determinada energía (normalmente 70 eV).

La detección mediante un detector de diodos en fila (DAD, Diode Array Detector) se puede utilizar para confirmar la identidad de los aditivos. Este detector se acopla normalmente con un cromatógrafo de líquidos [112,118,119,129,130,160] con el objeto de realizar el espectro UV-Visible de cada uno de los picos cromatográficos para posteriormente ser comparado con los espectros de los compuestos puros. Además se puede comprobar la pureza de cada uno de los picos cromatográficos.



La utilización de dos detectores conectados, en serie o en paralelo, se utiliza ampliamente, tanto en su acoplamiento con un cromatógrafo de líquidos [94,99,118,121,160,162,168] como con uno de gases [107,165].

**Tabla 3.2.3.** Métodos de cromatografía de líquidos desarrollados para la determinación de aditivos en alimentos.

Analitos	Muestra	Columna	Separación	Detección	Ref
Antioxidantes sintéticos	Aceites, margarina, mantequilla	RP-C <sub>18</sub>	LC alta resolución	UV-Visible	[92]
Conservantes	Bebidas	Intercambio iónico	Iónica	Cristales de cuarzo piezoeléctrico	[93]
Colorantes naturales	Zumos vegetales	RP-C <sub>30</sub>	LC alta resolución	UV-Visible + MS	[94]
Antioxidantes naturales	Aceites, galletas	RP-C <sub>18</sub>	LC alta resolución	UV-Visible + fluorescencia	[99]
Conservantes	Bebidas, zumos de frutas, yogur, fruta en conserva	Intercambio iónico	Iónica	UV-Visible	[102]
Colorante natural	Zumos de frutas, gelatina, bebidas, yogur, helados	RP-C <sub>18</sub>	LC alta resolución	UV-Visible	[103]
Colorante natural	Alimentos	RP-C <sub>18</sub>	LC alta resolución	Fluorescencia	[104]
Colorantes sintéticos	Bebidas, gelatina, golosinas, postres lácteos	RP-C <sub>18</sub>	LC alta resolución	UV-Visible	[105]
Antioxidantes sintéticos	Aceites, alimentos	RP-C <sub>18</sub>	LC alta resolución	Fluorescencia	[106]
Conservantes	Mayonesa	RP-C <sub>18</sub>	LC alta resolución	Fluorescencia	[108]
Antioxidantes y colorantes naturales	Zumos vegetales, bebidas, alimentos infantiles	RP-C <sub>30</sub>	LC	MS	[109]
Antioxidantes sintéticos	Salsas, sopas, pastillas caldo, carne liofilizada	-	LC alta resolución	Diodos en fila	[112]
Colorante natural	Bebidas, sopas, pimentón	RP-C <sub>18</sub>	LC alta resolución	UV-Visible	[114]
Antioxidantes, conservantes	Salsas, carne liofilizada, frutas azucaradas	RP-C <sub>18</sub>	LC pares iónicos	UV-Visible	[116]

**Tabla 3.2.3. (continuación).**

Analitos	Muestra	Columna	Separación	Detección	Ref
Colorantes sintéticos	Bebidas, mermeladas, verduras secas	RP-C <sub>18</sub>	Iónica	Diodos en fila + MS	[118]
Colorantes naturales	Embutidos	–	LC alta resolución	Diodos en fila	[119]
Colorantes naturales	Verduras liofilizadas	RP-C <sub>18</sub>	LC alta resolución	UV-Visible	[120]
Antioxidantes sintéticos y naturales, colorantes naturales	Margarina, alimentos infantiles	–	LC alta resolución	UV-Visible + fluorescencia	[121]
Colorantes sintéticos	Carne, pescado procesados	RP-C <sub>18</sub>	LC alta resolución	Diodos en fila	[129]
Conservante	Mermeladas	RP-C <sub>18</sub>	LC alta resolución	Diodos en fila	[130]
Colorante natural	Leche y cereales	RP-C <sub>18</sub>	LC alta resolución	Fluorescencia	[135]
Conservantes	Bebidas	RP-C <sub>18</sub>	LC alta resolución	UV-Visible	[137]
Antioxidante natural	Leche en polvo	–	LC alta resolución	UV-Visible	[138]
Colorantes naturales	Zanahoria liofilizada	RP-C <sub>18</sub>	LC alta resolución	UV-Visible	[141]
Colorantes sintéticos	Alimentos	RP-C <sub>18</sub>	LC alta resolución	UV-Visible	[143]
Antioxidantes naturales	Aceites	–	LC alta resolución	UV-Visible	[145]
Conservantes	Bebidas, productos lácteos	RP-C <sub>18</sub>	LC alta resolución	Electroquímica	[146]
Antioxidante natural	Huevo en polvo	–	LC alta resolución	Fluorescencia	[147]
Colorante natural	Bebidas, productos lácteos	RP-C <sub>18</sub>	LC alta resolución	Diodos en fila + fluorescencia	[160]
Colorantes sintéticos y natural	Alimentos	RP-C <sub>18</sub>	LC alta resolución	UV-Visible	[161]
Antioxidantes naturales	Aceites	RP-C <sub>30</sub>	LC alta resolución	MS + resonancia magnética nuclear	[162]
Antioxidantes sintéticos	Alimentos	–	LC alta resolución	Electroquímica	[163]
Colorante natural	Alimentos	–	LC pares iónicos	MS	[164]

**Tabla 3.2.3. (continuación).**

Analitos	Muestra	Columna	Separación	Detección	Ref
Antioxidantes naturales	Aceites, cereales	–	LC alta resolución	Fluorescencia	[165]
Colorante natural	Alimentos infantiles	–	LC	UV-Visible + fluorescencia	[168]

**Tabla 3.2.4. Métodos de cromatografía de gases desarrollados para la determinación de aditivos en alimentos.**

Analitos	Muestra	Columna	Detección	Ref
Antioxidantes sintéticos	Golosinas	–	FID + MS	[107]
Colorante natural	Disolución caramelo	100% poli(etilenglicol)	MS	[111]
Conservantes	Bebidas, alimentos	100% poli(dimetilsiloxano)	MS	[115]
Antioxidantes sintéticos	Carne picada	5% difenil–95% dimetilsiloxano	FID	[122]
Antioxidante sintético	Agua mineral	5% difenil–95% dimetilsiloxano	MS	[148]
Conservantes	Bebidas, salsas, vinagre	–	MS	[149]
Antioxidantes naturales	Aceites, cereales	5% difenil–95% dimetilsiloxano	FID + MS	[165]
Antioxidante sintético	Golosinas, cereales, carne liofilizada	5% difenil–95% dimetilsiloxano	MS	[166]
Conservante	Alimentos	50% difenil–50% dimetilsiloxano	FID	[167]

### 3.4. Automatización y miniaturización

La Química Analítica actual tiende a la automatización, miniaturización y simplificación de los procesos analíticos. Sin embargo, la mayoría de los métodos desarrollados en el ámbito del análisis de aditivos alimentarios son métodos manuales. La transformación de un método manual en automático, casi siempre lleva implícito un grado más o menos intenso de miniaturización y simplificación. La automatización total o parcial de un proceso analítico implica la eliminación, o reducción, de la intervención humana. Con los sistemas en línea, todas las

etapas del proceso tienen lugar de forma continua y automática, haciendo uso de un módulo de tratamiento automático (MTA) que está conectado directamente (a través de tubos de conexión y válvulas) al instrumento de medida. La mayoría de los sistemas automáticos en línea desarrollados se basan en configuraciones de flujo (FA, Flow Analysis) de alta o baja presión, siendo el elemento clave la interfase.

Existe otra alternativa mixta en la que se utiliza un MTA para desarrollar todas las operaciones previas del proceso analítico, pero sin estar conectado directamente al instrumento, aunque esta última etapa también se puede automatizar utilizando un automuestreador. Esta es la alternativa preferida en los laboratorios de rutina, que suelen dedicar el día de trabajo al tratamiento de las muestras, disponiendo de los extractos finales en los viales del automuestreador para que el instrumento los analice durante la noche.

La aplicación de los MTA en el análisis de aditivos alimentarios supone una serie de ventajas, entre las que se destacan la disminución del coste de reactivos y disolventes, la disminución en el volumen de productos de desecho, así como de la intervención humana y del tiempo necesario para desarrollar el análisis. Todo ello redundará en una disminución del coste del análisis y del riesgo de contaminación del operario [169].

En los últimos años, el análisis en flujo se ha desarrollado enormemente, automatizando operaciones clásicas en química, como son la extracción líquido-líquido, separaciones por precipitación, reacciones de derivatización, extracción en fase sólida y técnicas de preconcentración, que actualmente se pueden llevar

a cabo de forma continua. En este contexto, se puede comprobar que del total de referencias (Fuente: CD-ROM Analytical Abstracts, WinSPIRS Silver Platter Co. 1980–Diciembre 2002) sobre utilización de técnicas automáticas, 54 están relacionadas con la determinación de aditivos en alimentos.

Uno de los primeros trabajos que aparece en la bibliografía sobre la determinación de aditivos en alimentos utilizando métodos automatizados (1981) se debe a Fogg y Bhanot [170] quienes determinaron colorantes sintéticos utilizando un sistema continuo de inyección en flujo en el cual se realizaba, de forma automática, la determinación mediante un método electroquímico.

### **3.5. Sistemas de screening**

Los sistemas de screening o criba proporcionan información analítica con gran rapidez [169,171,172]. Dichos sistemas son una alternativa muy interesante debido a que están diseñados para “filtrar” muestras y seleccionar sólo aquellas en las que el analito está presente por encima de una concentración umbral prefijada [171]. Los sistemas de screening están directamente relacionados con la automatización, miniaturización y simplificación, que son las tendencias básicas comentadas en el apartado anterior. Estos sistemas se caracterizan por:

- presentar un mayor énfasis cualitativo que cuantitativo,
- rapidez,
- ofrecer una respuesta binaria SI/NO que requiere una confirmación, de las muestras que dan una respuesta positiva, mediante la aplicación de una metodología analítica adicional,

- empleo inmediato de la respuesta binaria obtenida para la toma de decisiones.

Los sistemas desarrollados pueden dividirse en dos grandes grupos, dependiendo de cuál sea el objeto del screening:

- sistemas de screening de muestras: se refieren a la identificación y selección de un grupo de muestras en un conjunto de las mismas que tengan un analito (o grupo de los mismos) por encima de un determinado nivel de concentración,
- sistemas de screening de analitos: tienen como objetivo identificar un analito o grupo de los mismos en un determinado tipo de muestras o sistema.

La presente Memoria centra uno de sus objetivos en el desarrollo de métodos automáticos basados en el análisis en flujo para la determinación de aditivos en alimentos. Además, estos métodos han de ser rápidos (screening de muestras y analitos) y eficaces, para ser factible su implantación en laboratorios de rutina, y suficientemente sensibles para alcanzar los límites establecidos en la legislación.

**REFERENCIAS**

- [1] Real Decreto 3177/1983, BOE 310, Madrid, 1983.
- [2] Directiva Comunitaria 89/107/CEE, DO L.40, Comunidad Europea, Bruselas, 1988.
- [3] FAO/WHO, *General principles for the use of food additives*, Codex Alimentarius Volumen 1 Sección 5, Roma, 1992.
- [4] J. L. Multon (Ed.), *Aditivos y auxiliares de fabricación en las industrias agroalimentarias*, 2ª edn., Acribia, S.A., Zaragoza, 2000.
- [5] R. Derache, *Toxicología y Seguridad de los Alimentos*, Omega S.A., Barcelona, 1990.
- [6] T. E. Furia (Ed.), *CRC Handbook of food additives*, 2ª edn., Volumen I y II. CRC Press Inc. Boca Raton, FL, 1981.
- [7] Directiva Comunitaria 94/35/CEE, DO L.237, Comunidad Europea, Bruselas, 1994.
- [8] Directiva Comunitaria 94/36/CEE, DO L.237, Comunidad Europea, Bruselas, 1994.
- [9] Directiva Comunitaria 95/2/CEE, DO L.61, Comunidad Europea, Bruselas, 1995.
- [10] Comisión de las Comunidades Europeas, *Libro Blanco sobre Seguridad Alimentaria*, Bruselas, 2000.
- [11] FAO/OMS, *Principles for the safety assessment of food additives and contaminants in food*, WHO Environmental Health Criteria No. 70, Génova, 1987.

- [12] K. Walton, R. Walker, J. J. M. van de Sandt, J. V. Castell, A. G. A. A. Knapp, G. Kozianowski, M. Roberfroid, B. Schilter, *Food Chem. Toxicol.* 37 (1999) 1175.
- [13] FAO/OMS, *Compendium of food additive specifications, addendum 9. FAO Food and Nutrition Paper*, WHO Technical Report Series No. 52 Add. 9, Roma, 2002.
- [14] FAO/OMS, *Evaluation of certain food additives* (25<sup>th</sup> report JECFA), WHO Technical Report Series No. 669, Génova, 1981.
- [15] FAO/OMS, *Specifications for the identity and purity of food additives and their toxicological evaluation: food colours and some antimicrobials and antioxidants* (8<sup>th</sup> report JECFA), FAO Nutrition Meetings Report Series No. 38, WHO Technical Report Series No. 309, Roma, 1965.
- [16] FAO/OMS, *Evaluation of certain food additives and contaminants* (55<sup>th</sup> report JECFA), WHO Technical Report Series No. 901, Génova, 2001.
- [17] FAO/OMS, *Evaluation of certain food additives and contaminants* (37<sup>th</sup> report JECFA), WHO Technical Report Series No. 806, Génova, 1991.
- [18] FAO/OMS, *Evaluation of certain food additives* (18<sup>th</sup> report JECFA), FAO Nutrition Meetings Report Series No. 54, WHO Technical Report Series No. 557, Roma, 1974.
- [19] FAO/OMS, *Specifications for the identity and purity of food additives and their toxicological evaluation: some food colours, emulsifiers, stabilizers, anticaking agents, and certain other substances* (13<sup>th</sup> report JECFA), FAO



- Nutrition Meetings Report Series No. 46, WHO Technical Report Series No. 445, Roma, 1970.
- [20] FAO/OMS, *Evaluation of certain food additives and contaminants* (29<sup>th</sup> report JECFA), WHO Technical Report Series No. 733, Ginebra, 1986.
- [21] FAO/OMS, *Toxicological evaluation of certain food additives with a review of general principles and of specifications* (17<sup>th</sup> report JECFA), FAO Nutrition Meetings Report Series No. 53, WHO Technical Report Series No. 539, Ginebra, 1974.
- [22] FAO/OMS, *Evaluation of certain food additives and contaminants* (30<sup>th</sup> report JECFA), WHO Technical Report Series No. 751, Ginebra, 1987.
- [23] FAO/OMS, *Evaluation of certain food additives and contaminants* (49<sup>th</sup> report JECFA), WHO Technical Report Series No. 884, Génova, 1999.
- [24] FAO/OMS, *Evaluation of certain food additives and contaminants* (33<sup>rd</sup> report JECFA), WHO Technical Report Series No. 776, Ginebra, 1989.
- [25] FAO/OMS, *Evaluation of certain food additives and contaminants* (44<sup>th</sup> report JECFA), WHO Technical Report Series No. 859, Génova, 1995.
- [26] Comisión de las Comunidades Europeas, *Informe de la Comisión sobre la Ingesta de Aditivos Alimentarios en la Unión Europea*, Bruselas, 2001.
- [27] R. C. Massey, *Food Chem.* 60 (1997) 177.
- [28] M. C. F. Toledo, M. S. Guerchon, S. Ragazzi, *Food Addit. Contam.* 9 (1992) 291.
- [29] C. Leclercq, D. Arcella, A. Turrini, *Food Chem. Toxicol.* 38 (2000) 1075.

- [30] G. C. Maziero, C. Baunwart, M. C. F. Toledo, *Food Addit. Contam.* 18 (2001) 365.
- [31] Directiva Comunitaria 96/85/CE, DO L.86, Comunidad Europea, Bruselas, 1996.
- [32] Decisión Comunitaria 97/292/CE, DO L.48, Comunidad Europea, Bruselas, 1996.
- [33] Directiva Comunitaria 98/72/CE, DO L.295, Comunidad Europea, Bruselas, 1998.
- [34] Directiva Comunitaria 2001/5/CE, DO L.55, Comunidad Europea, Bruselas, 2001.
- [35] Directiva Comunitaria 95/31/CE, DO L.178, Comunidad Europea, Bruselas, 1995.
- [36] Directiva Comunitaria 95/45/CE, DO L.226, Comunidad Europea, Bruselas, 1995.
- [37] Directiva Comunitaria 96/77/CE, DO L.339, Comunidad Europea, Bruselas, 1996.
- [38] Directiva Comunitaria 98/86/CE, DO L.334, Comunidad Europea, Bruselas, 1998.
- [39] Directiva Comunitaria 99/75/CE, DO L.206, Comunidad Europea, Bruselas, 1999.
- [40] Directiva Comunitaria 2000/63/CE, DO L.277, Comunidad Europea, Bruselas, 2000.

- [41] Directiva Comunitaria 2001/30/CE, DO L.146, Comunidad Europea, Bruselas, 2001.
- [42] Directiva Comunitaria 2001/50/CE, DO L.190, Comunidad Europea, Bruselas, 2001.
- [43] Directiva Comunitaria 88/344/CEE, DO L.157, Comunidad Europea, Bruselas, 1988.
- [44] Real Decreto 2001/1995, BOE 19, Madrid, 1996.
- [45] Real Decreto 2002/1995, BOE 11, Madrid, 1996.
- [46] Real Decreto 1359/1998, BOE 161, Madrid, 1998.
- [47] Real Decreto 142/2002, BOE 44, Madrid, 2002.
- [48] Orden de 28 de julio de 1988 (a), BOE 193, Madrid, 1988.
- [49] Orden de 28 de julio de 1988 (b), BOE 193, Madrid, 1988.
- [50] Real Decreto 2106/1996, BOE 250, Madrid, 1996.
- [51] Real Decreto 2107/1996, BOE 250, Madrid, 1996.
- [52] Real Decreto 1917/1997, BOE 17, Madrid, 1997.
- [53] Real Decreto 1802/1999, BOE 286, Madrid, 1999.
- [54] Real Decreto 472/1990, BOE 88, Madrid, 1990.
- [55] Code of Federal Regulations Title 21, Parts 70–189, US Government Printing Office, Washington, DC, 2002 (revisado).
- [56] G. G. Birch, M. G. Lindley (Eds.), *Interactions of food components*, Elsevier Applied Science Publishers, London, 1986.
- [57] J. Giese, *Food Technol.* 50 (1996) 73.

- [58] J. Davídek, J. Velíšek, J. Pokorný (Eds.), *Chemical changes during food processing*, Elsevier Applied Science Publishers, Amsterdam, 1990.
- [59] H. D. Belitz, W. Grosch (Eds.), *Food Chemistry*, 2ª edn., Springer, Berlin, 1999.
- [60] R. Macrae, R. K. Robinson, M. J. Sadler (Eds.), *Encyclopaedia of Food Science, Food Technology and Nutrition*, Volumen I y II, Academic Press, San Diego, CA, 1993.
- [61] C. A. Riceevans, J. Miller, G. Paganga, *Trends Plant Sci.* 2 (1997) 152.
- [62] G. M. Williams, M. J. Iatropoulos, J. Whysner, *Food Chem. Toxicol.* 37 (1999) 1027.
- [63] M. McFarlane, S. C. Price, S. Cottrell, P. Grasso, J. N. Bremmer, E. M. Bomhard, R. H. Hinton, *Food Chem. Toxicol.* 35 (1997) 753.
- [64] P. M. Bramley, I. Elmadfa, A. Kafatos, F. J. Kelly, Y. Manios, H. E. Roxborough, W. Schuch, P. J. A. Sheehy, K. H. Wagner, *J. Sci. Food Agric.* 80 (2000) 913.
- [65] G. W. Gould, *Mechanisms of Action of Food Preservation Procedures*, Elsevier Applied Science, London, 1989.
- [66] G. W. Gould, *Brit. Med. Bul.* 56 (2000) 84.
- [67] V. Loureiro, A. Querol, *Trends Food Sci. Tech.* 10 (1999) 356.
- [68] V. Loureiro, *Food Res. Int.* 33 (2000) 247.
- [69] L. Leistner, *Int. J. Food Microb.* 55 (2000) 181.
- [70] J. H. Han, *Food Technol.* 54 (2000) 56.
- [71] V. Hulin, A. G. Mathot, P. Mafart, L. Dufossé, *Sci. Aliment.* 18 (1998) 563.

- [72] K. A. Hammer, C. F. Carson, T. V. Riley, *J. Appl. Microbiol.* 86 (1999) 985.
- [73] M. Murphy, *Clin. Microbiol. Rev.* 12 (1999) 564.
- [74] S. M. Newton, C. Lau, C. W. Wright, *Phytother. Res.* 14 (2000) 303.
- [75] F. Hadacek, H. Greger, *Phytochem. Anal.* 11 (2000) 137.
- [76] J. S. Chapman, *Int. Biodeter. Biodegr.* 41 (1998) 241.
- [77] S. Roller, *Int. J. Food Microb.* 50 (1999) 151.
- [78] S. Brul, P. Coote, *Int. J. Food Microb.* 50 (1999) 1.
- [79] S. Brul, F. M. Klis, *Fungal Genet. Biol.* 27 (1999) 199.
- [80] C. Ferrand, F. Marc, P. Fritsch, P. Cassand, G. de Saint, *Toxicol. In Vitro* 14 (2000) 423.
- [81] C. Ferrand, F. Marc, P. Fritsch, G. de Saint, *Food Addit. Contam.* 17 (2000) 947.
- [82] C. Ferrand, F. Marc, P. Fritsch, P. Cassand, G. de Saint, *J. Agr. Food Chem.* 48 (2000) 3605.
- [83] C. Higgins, F. Brinkhaus, *J. Appl. Poultry Res.* 8 (1999) 480.
- [84] M. G. Soni, G. A. Burdock, S. L. Taylor, N. A. Greenberg, *Food Chem. Toxicol.* 39 (2001) 513.
- [85] F. Giordano, R. Bettini, C. Donini, A. Gazzaniga, M. R. Caira, G. G. Z. Zhang, D. J. W. Grant, *J. Pharm. Sci.* 88 (1999) 1210.
- [86] O. R. Fennema (Ed.), *Food Chemistry*, 2<sup>a</sup> edn., Marcel Deker, New York, 1985.
- [87] A. Downham, P. Collins, *Int. J. Food Sci. Technol.* 35 (2000) 5.
- [88] A. E. Sloan, *Food Technol.* 56 (2002) 27.

- [89] D. E. Pszczola, *Food Technol.* 52 (1998) 70.
- [90] C. C. Blanco, A. S. Carretero, L. G. Mata, A. F. Gutiérrez, *Chromatographia* 53 (2001) 414.
- [91] M. P. Aguilar–Caballos, A. Gómez–Hens, D. Pérez–Bendito, *Analyst* 124 (1999) 1079.
- [92] J. E. Noguera–Orti, R. M. Villanueva–Camanas, G. Ramis–Ramos, *Anal. Chim. Acta* 402 (1999) 81.
- [93] Y. T. Xie, P. Chen, W. Z. Wei, *Microchem. J.* 61 (1999) 58.
- [94] T. Lacker, S. Strohschein, K. Albert, *J. Chromatogr. A* 854 (1999) 37.
- [95] L. Royle, J. M. Ames, L. Castle, H. E. Nursten, C. M. Radcliffe, *J. Sci. Food Agr.* 76 (1998) 579.
- [96] S. Panadero, A. Gómez–Hens, D. Pérez–Bendito, *Fresen. J. Anal. Chem.* 357 (1997) 80.
- [97] Y. N. Ni, J. L. Bai, *Talanta* 44 (1997) 105.
- [98] F. García–Sánchez, A. Navas–Díaz, L. Sánchez–Feria, *Anal. Lett.* 27 (1994) 2171.
- [99] J. S. Bonvehí, F. V. Coll, I. A. Rius, *J. AOAC Int.* 83 (2000) 627.
- [100] O. Pastor–Ferrer, A. R. Mauri–Aucejo, M. Llobat–Estelles, *Fresen. J. Anal. Chem.* 367 (2000) 485.
- [101] U. Hachula, F. Bushl, *JPC – J. Planar Chromatogr.* 4 (1991) 416.
- [102] Q. C. Chen, J. Wang, *J. Chromatogr. A* 937 (2001) 57.
- [103] L. Merino, U. Edberg, H. Tidriks, *J. AOAC Int.* 80 (1997) 1044.
- [104] M. Hagg, *J. AOAC Int.* 77 (1994) 681.

- 
- [105] G. M. Greenway, N. Kometa, R. Macrae, *Food Chem.* 43 (1992) 137.
- [106] M. Oishi, T. Matsuda, S. Nojiri, K. Saito, *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* 43 (2002) 104.
- [107] M. Ohta, M. Narita, T. Miyoshi, T. Itoyama, M. Kimura, M. Kobayashi, R. Ochi, Y. Sekiguchi, S. Koiguchi, Y. Hirahara, M. Hasegawa, M. Miyata, K. Kamakura, K. Maeda, M. Otomasu, H. Ishiwata, *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* 38 (1997) 78.
- [108] F. Burini, *J. Chromatogr. A* 664 (1994) 213.
- [109] C. Rentel, S. Strohschein, K. Albert, E. Bayer, *Anal. Chem.* 70 (1998) 4394.
- [110] B. V. Pfund, A. M. Bond, T. C. Hughes, *Analyst* 117 (1992) 857.
- [111] I. Pons, C. Garrault, J. N. Jaubert, J. Morel, J. C. Fenyo, *Food Chem.* 39 (1991) 311.
- [112] C. Perrin, L. Meyer, *Food Chem.* 77 (2002) 93.
- [113] S. Uchiyama, Y. Kurokawa, Y. Hasebe, S. Suzuki, *Electroanal.* 6 (1994) 63.
- [114] M. Weissenberg, A. Levy, I. Schaeffler, E. Menagem, M. Barzilai, *Chromatographia* 46 (1997) 399.
- [115] C. De-Luca, S. Passi, E. Quattrucci, *Food Addit. Contam.* 12 (1995) 1.
- [116] B. H. Chen, S. C. Fu, *J. Liq. Chromatogr. R. T.* 19 (1996) 625.
- [117] L. Pezza, A. O. Santini, H. R. Pezza, C. B. Melios, V. J. F. Ferreira, A. L. M. Nasser, *Anal. Chim. Acta* 433 (2001) 281.
- [118] M. R. Fuh, K. J. Chia, *Talanta* 56 (2002) 663.
- [119] J. Oliver, A. Palou, A. Pons, *J. Chromatogr. A* 829 (1998) 393.
- [120] E. J. M. Konings, H. H. S. Roomans, *Food Chem.* 59 (1997) 599.
-

- [121] M. Balz, E. Schulte, H. P. Their, *Fett. Wiss. Technol.* 97 (1995) 445.
- [122] S. Kmostak, D. A. Kurtz, *J. AOAC Int.* 76 (1993) 735.
- [123] C. Gertz, K. Herrmann, *Z. Lebensm. Unters. F. A.* 177 (1983) 186.
- [124] J. S. Fritz, M. Macka, *J. Chromatogr. A* 902 (2000) 137.
- [125] L. A. Berrueta, B. Gallo, F. Vicente, *Chromatographia* 40 (1995) 474.
- [126] L. F. Capitán–Vallvey, M. C. Valencia, E. A. Nicolas, *Mikrochim. Acta* 138 (2002) 69.
- [127] H. Y. Huang, Y. C. Shih, Y. C. Chen, *J. Chromatogr. A* 959 (2002) 317.
- [128] L. F. Capitán–Vallvey, M. C. Valencia, E. A. Nicolas, *Analyst* 126 (2001) 897.
- [129] F. Ishikawa, S. Shigeoka, M. Nagashima, M. Takahashi, H. Kamimura, K. Onishi, M. Nishijima, *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* 41 (2000) 194.
- [130] B. M. Silva, P. B. Andrade, G. C. Mendes, P. Valentao, R. M. Seabra, M. A. Ferreira, *J. Agr. Food Chem.* 48 (2000) 2853.
- [131] S. M. Anderton, C. D. Incarvito, J. Sherma, *J. Liq. Chromatogr. R. T.* 20 (1997) 101.
- [132] K. Hofer, D. Jenewein, *Z. Lebensm. Unters, F. A.* 204 (1997) 32.
- [133] V. Rizova, T. Stafilov, *Anal. Lett.* 28 (1995) 1305.
- [134] M. C. Smith, J. Sherma, *JPC – J. Planar Chromatogr.* 8 (1995) 103.
- [135] G. M. Greenway, N. Kometa, *Analyst* 119 (1994) 929.
- [136] H. Oka, Y. Ikai, T. Ohno, N. Kawamura, J. Hayakawa, K. Harada, M. Suzuki, *J. Chromatogr. A* 674 (1994) 301.



- [137] M. Moros, C. R. R. R. Teixeira, M. Jimidar, D. L. Massart, *Anal. Chim. Acta* 255 (1991) 177.
- [138] C. Turner, L. Mathiasson, *J. Chromatogr. A* 874 (2000) 275.
- [139] E. Ibáñez, J. Palacios, F. J. Señoráns, G. Santa-María, J. Tabera, G. Reglero, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 77 (2000) 187.
- [140] A. Cortesi, I. Kikic, P. Alessi, G. Turtoi, S. Garnier, *J. Supercritical Fluids* 14 (1999) 139.
- [141] M. M. Barth, C. Zhou, K. M. Kute, G. A. Rosenthal, *J. Agr. Food Chem.* 43 (1995) 2876.
- [142] K. Patel, G. Krishna, E. Sokoloski, Y. Ito, *J. Liq. Chromatogr. R. T.* 23 (2000) 2209.
- [143] Y. Kabasawa, T. Tanimura, H. Nakazawa, K. Shinomiya, *Anal. Sci.* 8 (1992) 351.
- [144] G. W. Chase, C. C. Akoh, R. R. Eitenmiller, W. O. Landen, *J. Liq. Chromatogr. R. T.* 18 (1995) 3129.
- [145] A. Sánchez-Pérez, M. M Delgado-Zamarreño, M. Bustamante-Rangel, J. Hernández-Méndez, *J. Chromatogr. A* 881 (2000) 229.
- [146] S. Mannino, M. S. Cosio, *Ital. J. Food Sci.* 8 (1996) 311.
- [147] A. Abdollahi, N. S. Rosenholtz, J. L. Garwin, *J. Food Sci.* 58 (1993) 663.
- [148] N. B. Tombesi, H. Freije, *J. Chromatogr. A* 963 (2002) 179.
- [149] N. Ochiai, K. Sasamoto, M. Takino, S. Yamashita, S. Daishima, A. C. Heiden, A. Hoffmann, *Anal. Biochem. Chem.* 373 (2002) 56.

- [150] K. Zhang, W. H. Ma, R. X. Cai, Z. X. Lin, N. Q. Gan, *Anal. Chim. Acta* 413 (2000) 115.
- [151] K. Hofer, D. Jenewein, *Eur. Food Res. Technol.* 211 (2000) 72.
- [152] C. S. P. Sastry, S. G. Rao, B. S. Sastry, *J. Food Sci. Tech.* 29 (1992) 101.
- [153] C. Cruces–Blanco, A. S. Carretero, E. M. Boyle, A. F. Gutiérrez, *Talanta* 50 (1999) 1099.
- [154] U. Haas, C. A. Vinha, *Analyst* 120 (1995) 351.
- [155] K. Inoue, Y. Yoshimura, H. Nakazawa, *Anal. Lett.* 34 (2001) 1711.
- [156] M. P. Aguilar–Caballos, A. Gómez–Hens, D. Pérez–Bendito, *J. Agr. Food Chem.* 48 (2000) 312.
- [157] E. C. Y. Lichan, *Trends Food Sci. Tech.* 7 (1996) 361.
- [158] M. Luque, A. Ríos, M. Valcárcel, *Anal. Chim. Acta* 395 (1999) 217.
- [159] M. C. Boyce, E. Spickett, *J. Agr. Food Chem.* 47 (1999) 1970.
- [160] P. R. N. Carvalho, C. H. Collins, *Chromatographia* 45 (1997) 63.
- [161] J. J. Berzas–Nevado, C. Guiberteau–Cabanillas, A. M. Contento–Salcedo, *Anal. Lett.* 31 (1998) 2513.
- [162] S. Strohschein, C. Rentel, T. Lacker, E. Bayer, K. Albert, *Anal. Chem.* 71 (1999) 1780.
- [163] J. Riber, C. de la Fuente, M. D. Vázquez, M. L. Tascón, P. S. Batanero, *Talanta* 52 (2000) 241.
- [164] P. A. Clarke, K. A. Barnes, J. R. Startin, F. I. Ibe, M. J. Shepherd, *Rapid Commun. Mass Sp.* 10 (1996) 1781.
- [165] T. S. Shin, J. S. Godber, *J. Chromatogr. A* 678 (1994) 49.

- [166] J. J. Manura, *LC–GC* 11 (1993) 142.
- [167] Y. Guillaume, M. Thomassin, C. Guinchard, *J. Chromatogr. A* 704 (1995) 437.
- [168] G. W. Chase, W. O. Landen, R. R. Eitenmiller, A. G. M. Soliman, *J. AOAC Int.* 75 (1992) 561.
- [169] M. Valcárcel, M. S. Cárdenas, *Automatización y Miniaturización en Química Analítica*, Springer, Barcelona, 2000.
- [170] A. G. Fogg, D. Bhanot, *Analyst* 106 (1981) 883.
- [171] M. Valcárcel, S. Cárdenas, M. Gallego, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 30 (2000) 345.
- [172] M. Valcárcel, S. Cárdenas, M. Gallego, *Trends Anal. Chem.* 18 (1999) 685.



## OBJETIVOS Y RESUMEN DE CONTENIDOS



El objetivo central de esta Memoria se centró en la automatización de las operaciones previas del proceso analítico para la determinación de aditivos en muestras de alimentos, con el fin de conseguir la simplificación y automatización de dicho proceso analítico. Las metodologías desarrolladas se aplicaron a muestras reales sencillas (bebidas) y muestras más complejas (alimentos con alto contenido en azúcares, grasas y/o proteínas). La simplificación y automatización permitirán conseguir ventajas sustanciales respecto a las metodologías convencionales, en términos de calidad informativa (más y mejor) y de calidad productiva (mínimos esfuerzos, costes y riesgos para el operador y el medio ambiente).

Los aditivos estudiados en esta Memoria se dividen en dos grupos: el primer grupo es el de aditivos que se utilizan para mejorar la conservación de los alimentos, entre los que se eligieron los antioxidantes y los conservantes; el segundo grupo es el de aditivos que se utilizan para mejorar las características sensoriales de los alimentos, entre los que se seleccionaron los colorantes.

De este objetivo global, se derivaron algunos objetivos específicos, entre los que destacan los siguientes:

1. Desarrollar analizadores de flujo automáticos basados en la extracción en fase sólida para la limpieza de los extractos y preconcentración de los aditivos alimentarios.
2. Desarrollar metodologías analíticas simples y rápidas que permitan el screening/determinación de estos analitos en muestras de interés alimentario, a niveles de concentración inferiores a los límites establecidos por la legislación.
3. Demostrar la utilidad de la liofilización de muestras con alto contenido en proteínas y grasas en el ámbito de la determinación de aditivos en alimentos.

Los resultados obtenidos en el trabajo realizado para cubrir estos objetivos, se incluyen en los cuatro capítulos que forman la presente Memoria, cuyos contenidos se resumen a continuación:

- En el Capítulo I se describen las herramientas analíticas utilizadas en esta Memoria.
- En el Capítulo II se recogen tres métodos de determinación de antioxidantes, conservantes y el conjunto de antioxidantes y conservantes en distintos tipos de muestras de alimentos mediante cromatografía de gases, con distintos detectores como un detector de ionización de llama y de masas. Todos los métodos incluyen una preconcentración de los analitos y la separación de dichos analitos de la matriz de la muestra mediante extracción en fase sólida.



- En el Capítulo III se recoge un método espectrofotométrico para el screening de colorantes sintéticos y naturales y la validación de dicho método de screening; un método para la confirmación mediante cromatografía de líquidos con un detector de diodos en filas de colorantes sintéticos y naturales en muestras lácteas, después de haber sido sometidas al método de screening; y la aplicación del método de screening y confirmación a muestras que han sido liofilizadas previamente.
- En el Capítulo IV se aborda de forma crítica la discusión de los resultados obtenidos.







## CAPITULO I. HERRAMIENTAS ANALITICAS



Para la realización experimental de esta Memoria se ha recurrido a diferentes herramientas analíticas: reactivos y disolventes, instrumentos analíticos, aparatos y los diferentes componentes que entran a formar parte de los módulos automáticos de flujo continuo optimizados. En este capítulo de la Memoria se enumeran dichas herramientas, señalando sus características más importantes.

## **I.1. ESTANDARES, REACTIVOS Y DISOLUCIONES**

### **I.1.1. Estándares de aditivos utilizados**

Los antioxidantes ter-butil-4-hidroxianisol o butil hidroxianisol (BHA, E-320), 2,6-di-ter-butil-p-hidroxitolueno o butil hidroxitoluol (BHT, E-321),  $\alpha$ -tocoferol y  $\alpha$ -tocoferil acetato ( $\alpha$ -T y  $\alpha$ -TA, E-307) fueron suministrados por Sigma (Madrid, España). La ter-butilhidroquinona (TBHQ) se adquirió a Aldrich (Madrid, España).

Los conservantes ácido sórbico (E-200), ácido benzoico (E-210), éster etílico del ácido p-hidroxibenzoico o p-hidroxibenzoato de etilo (E-PHBA, E-

214), éster propílico del ácido p-hidroxibenzoico o p-hidroxibenzoato de propilo (P-PHBA, E-216) y éster metílico del ácido p-hidroxibenzoico o p-hidroxibenzoato de metilo (M-PHBA, E-218) fueron adquiridos a Sigma.

Los colorantes sintéticos tartrazina (E-102), eritrosina (E-127), verde ácido brillante BS, verde S o verde lisamina (E-142), carmín de índigo o indigotina (E-132), azul brillante FCF (E-133) y negro brillante BN o negro PN (E-151) fueron adquiridos a Sigma-Aldrich (Madrid, España).

Los colorantes naturales curcumina (E-100), riboflavina (E-101), trans- $\beta$ -caroteno (E-160a) y ácido carmínico (E-120) fueron suministrados por Sigma-Aldrich.

La pureza de la mayoría de estos estándares es superior al 99% (97% ter-butilhidroquinona, 95% trans- $\beta$ -caroteno y 90% ácido carmínico, tartrazina y azul brillante FCF), presentándose todos ellos en forma de sólidos, excepto el  $\alpha$ -tocoferol y el  $\alpha$ -tocoferil acetato que se presentan en forma de aceites. Para la correcta conservación de los estándares se mantuvieron en un lugar seco, al abrigo de la luz y a temperatura ambiente, excepto el  $\alpha$ -tocoferol,  $\alpha$ -tocoferil acetato que se almacenaron a 4°C y la curcumina y el trans- $\beta$ -caroteno que se almacenaron a -20°C.

Como el colorante natural caramelo (Clase I, E-150a) no se encontró disponible comercialmente, se obtuvo mediante tratamiento de la glucosa (adquirida a Sigma-Aldrich) tal y como se describe a continuación [1]: se calentaron 100 g de glucosa junto con 10 ml de agua Milli-Q, en un recipiente de



acero inoxidable, a una temperatura superior a 170°C durante 170 minutos, con agitación continua. La formación del colorante se midió a  $\lambda = 610$  nm hasta que se alcanzó una intensidad colorante de 0.010 a 0.140 unidades de absorbancia. La intensidad colorante se define en la legislación [2,3] como la absorbancia de una disolución 0.1% peso/volumen del colorante caramelo sólido en agua, medido en una cubeta de flujo de 1 cm, a una longitud de onda de 610 nm. Cuando se alcanzó el color deseado, se añadieron 50 ml de agua para enfriar el caramelo formado.

### **I.1.2. Estándares internos para cromatografía de gases**

En las determinaciones de antioxidantes y conservantes mediante cromatografía de gases se hizo uso de dos estándares internos:

- 2-ter-butil-4-metilfenol, suministrado por Aldrich y que se utilizó para la cuantificación de los antioxidantes sintéticos (BHA, BHT y TBHQ) y los conservantes, y
- 5- $\alpha$ -colestano, que se utilizó para la cuantificación de los antioxidantes naturales ( $\alpha$ -T y  $\alpha$ -TA) y fue suministrado por Sigma.

### I.1.3. Sólidos sorbentes

En esta Memoria se han ensayado distintos sólidos sorbentes:

- resinas poliméricas del tipo XAD (-2, -4, -7 y -16) en 20 – 60 mesh, suministradas por Sigma,
- resina polimérica de estireno–divinilbenceno LiChrolut<sup>®</sup>–EN, suministrada por Merck (Darmstadt, Alemania),
- octadecilsilano en fase inversa RP–C<sub>18</sub>, de 40 – 63  $\mu\text{m}$  y 20 – 60 mesh, suministrado por Sigma,
- carbón activado granular Darco de 20 – 40 mesh, se adquirió a Aldrich,
- Florisil de 16 – 30 mesh, de Aldrich, y
- gel de sílice de 100 mesh que se adquirió a Merck.

En los métodos de screening y confirmación de colorantes sintéticos y naturales (Capítulo III.1, III.2 y III.3) se utilizaron como sorbentes lana y/o algodón, ambos materiales de origen natural. Para la utilización de estas fibras es imprescindible su lavado con éter de petróleo para eliminar las grasas naturales que puedan contener y el tratamiento de la lana con 1 g l<sup>-1</sup> de sulfato de aluminio y 1.2 g l<sup>-1</sup> de tartrato sódico potásico [4,5].

De todos los sorbentes anteriormente citados, para el desarrollo de esta Memoria, finalmente, se utilizó XAD–7, XAD–2, lana y algodón y RP–C<sub>18</sub>. Con estos sólidos se rellenaron las columnas sorbentes utilizadas en las configuraciones continuas en flujo para realizar el proceso automatizado de la extracción en fase sólida. El sorbente polimérico XAD–7 utilizado en el método

---

desarrollado para la separación y determinación de antioxidantes (Capítulo II.1) fue sometido a un proceso de secado a 80°C durante aproximadamente 12 horas, hasta que alcanzó un peso constante; después se preparó la columna y la resina seca se acondicionó con n-hexano [6].

#### **I.1.4. Otros reactivos**

##### a) Disolventes orgánicos

Se han utilizado para preparar las disoluciones de los estándares y reactivos y sus diluciones, para la dilución de muestras con alto contenido en grasas, para la extracción líquido-líquido de distintos tipos de alimentos utilizados como muestras, como eluyentes de los sistemas de flujo y para limpiar las columnas sorbentes y acondicionarlas antes de hacer pasar por ellas cada muestra y como fase móvil en los métodos de cromatografía de líquidos desarrollados. Estos disolventes, de calidad HPLC y suministrados por Scharlau (Barcelona, España), son: metanol, etanol, 2-propanol, acetona, acetato de etilo, acetonitrilo, éter etílico, éter de petróleo y n-hexano.

##### b) Acidos y bases

En diferentes capítulos de esta Memoria ha sido necesario el ajuste del pH de muestras acuosas o de agua utilizada como fase móvil en los métodos cromatográficos, para lo cual se han empleado disoluciones de ácido nítrico, ácido clorhídrico, ácido ortofosfórico, disolución reguladora 1 mol l<sup>-1</sup> acetato

sódico/ácido acético, hidróxido amónico e hidróxido sódico de concentraciones variables. Todos ellos, de grado analítico o superior, fueron suministrados por la casa comercial Merck.

c) Otros

Bajo este epígrafe se describen una amplia variedad de otros reactivos utilizados en la Memoria tales como:

- agua desionizada obtenida mediante un sistema de purificación Milli-Q,
- perclorato potásico y cloruro sódico, utilizados en el Capítulo II de esta Memoria para favorecer la separación entre fases en la extracción líquido-líquido necesaria en el tratamiento de distintos tipos de alimentos utilizados como muestras,
- sulfato sódico anhidro, suministrado por Merck, para secar las fases orgánicas antes de ser inyectadas en los cromatógrafos de gases utilizados en los métodos desarrollados en el Capítulo II de esta Memoria,
- sulfato de aluminio y tartrato sódico potásico para el tratamiento de la lana utilizada en para el sistema de screening y confirmación de colorantes sintéticos (Capítulo III),
- acetato amónico para la precipitación de proteínas en productos lácteos y ácido ascórbico para proteger los colorantes sensibles a

la luz en el método de screening y confirmación de dichos colorantes en el Capítulo III,

- bromuro de cetil-trimetil amonio (CTAB) como reactivo de interacción iónica en la fase móvil de los métodos cromatográficos para la separación tanto de colorantes sintéticos como de colorantes naturales en el Capítulo III,
- distintos aditivos para el estudio de interferencias en el método de confirmación de colorantes mediante cromatografía de líquidos: edulcorantes (sorbitol, N-L- $\alpha$ -aspartil-L-fenilalanina metil éster o aspartame), antioxidantes (ácido ascórbico, BHA, BHT), acidulantes (ácido málico, ácido cítrico), conservantes (ácido sórbico, ácido benzoico), y
- gas nitrógeno de calidad, suministrado por Air Liquide, para el secado de las columnas sorbentes y el arrastre de los eluyentes en los sistemas de extracción en fase sólida para la separación de antioxidantes y conservantes y en el método de screening y confirmación de colorantes.

#### **I.1.5. Disoluciones**

Las disoluciones estándar de los antioxidantes sintéticos, conservantes y los estándares internos se prepararon a una concentración de 10 g l<sup>-1</sup> en etanol y los antioxidantes naturales se prepararon a la misma concentración en n-hexano.

Las disoluciones estándar menos concentradas se prepararon diariamente mediante dilución exacta de las anteriores con los disolventes adecuados: etanol para los antioxidantes,  $0.1 \text{ mol l}^{-1} \text{ HNO}_3$  para los conservantes y la mezcla de antioxidantes y conservantes y disolución reguladora  $1 \text{ mol l}^{-1}$  acetato sódico/ácido acético para los colorantes.

Las disoluciones estándar de los colorantes sintéticos y naturales se prepararon a una concentración de  $1 \text{ g l}^{-1}$  (tartrazina, eritrosina, verde ácido brillante BS, carmín de índigo, azul brillante FCF, negro brillante BN y caramelo) y  $0.2 \text{ g l}^{-1}$  de riboflavina en agua Milli-Q y  $1 \text{ g l}^{-1}$  de curcumina, trans- $\beta$ -caroteno y ácido carmínico preparadas en etanol.

Las disoluciones se guardaron en tubos de vidrio cerrados con tapas roscadas y se conservaron a  $4^\circ\text{C}$ , protegidas de la luz mediante papel de aluminio para evitar descomposiciones fotoquímicas.

## I.2. COMPONENTES DE LOS SISTEMAS DE FLUJO CONTINUO

Los sistemas de flujo desarrollados en esta Memoria se han enfocado a la automatización de las técnicas de extracción en fase sólida, evitando así procedimientos manuales tediosos que conllevan un mayor gasto de disolventes y tiempo, así como una mayor intervención por parte del operador. En estos sistemas de flujo se han empleado los siguientes componentes:

- bombas peristálticas Gilson–Minipuls–2 y Gilson–Minipuls–3 (Villiers–le–Bel, Francia) para la aspiración de las muestras y reactivos a través de los tubos de bomba,
- tubos de bomba, de cloruro de polivinilo para disoluciones acuosas y Solvaflex para disolventes orgánicos, de diferentes diámetros,
- tubos de conducción de PTFE, de 0.5 mm de diámetro interno (d.i.), que también se utilizaron para fabricar bucles,
- conectores de PTFE Omnifit (Cambridge, United Kingdom), para unir los tubos de conducción de los diferentes componentes del sistema de flujo,
- válvulas de inyección Rheodyne 5041 (Cotati, CA, EE.UU.), de seis vías, donde se insertan las minicolumnas sorbentes o los bucles que fijan el volumen de disolvente utilizado como eluyente, necesario en cada una de las metodologías desarrolladas,
- válvula rotatoria Rheodyne 5060, para la selección del eluyente adecuado para colorantes sintéticos o naturales en el método de confirmación de éstos por cromatografía de líquidos (Capítulo III),

- minicolumnas sorbentes, de fabricación en el laboratorio, a partir de capilares de PTFE de 3 mm d.i., donde se empaqueta el sólido sorbente (XAD-7, XAD-2, lana y algodón y RP-C<sub>18</sub>) y se sellan los extremos con pequeñas porciones de algodón para evitar pérdidas del material sorbente. Los extremos de las columnas se cerraron adaptando tubos de PTFE 30 x 0.5 mm d.i. dentro de un tubo de PTFE 10 x 1 mm d.i. lo que facilitó la inserción dentro del sistema continuo,
- botella de desplazamiento para la elución de los conservantes desde las columnas sorbentes (Capítulo II) con acetato de etilo, disolvente orgánico incompatible con los tubos de bomba,
- unidad de filtración, formada por un filtro comercial de acero inoxidable que se sitúa a la entrada del canal de la muestra para evitar la aspiración de pequeñas partículas sólidas que se encuentren en suspensión, que ocasionalmente pudiesen aparecer en los extractos y que pudieran obstruir el sistema de flujo, y
- célula de flujo, para espectrofotometría Hellma (Jamaica, NY, EE.UU.) utilizada en el sistema para el screening de colorantes descrito en el Capítulo III; el paso de luz es de 10 mm y el volumen interno 18 µl.



### I.3. INSTRUMENTOS

Para el desarrollo de esta Memoria se utilizaron dos cromatógrafos de gases con diferentes detectores, un espectrómetro UV-Visible, un espectrómetro de diodos en fila y un cromatógrafo de líquidos con un detector de diodos en fila.

#### I.3.1. Cromatógrafos de gases

##### a) Cromatógrafo de gases Hewlett-Packard modelo 5890 A

Dicho cromatógrafo de gases se encuentra equipado con un detector de ionización de llama. El volumen de inyección de muestra fue de 2  $\mu\text{l}$ , medido con una jeringa de precisión Hamilton (Hampshire, Inglaterra) de 5  $\mu\text{l}$ , en el modo sin división de flujo y nitrógeno de calidad 2 Air Liquide (Sevilla, España) como gas portador a un caudal de 14.7  $\text{ml min}^{-1}$ . En el caso de la determinación de antioxidantes, la muestra también se inyectó utilizando un inyector on-line siendo el volumen de inyección de 5  $\mu\text{l}$ . El inyector on-line es una válvula de inyección de cromatografía de líquidos de 6 vías modificada Knauer 633200 (Berlín, Alemania) que se coloca sobre el portal de inyección del cromatógrafo de gases. La temperatura del portal de inyección se fijó en 250°C. La separación de los antioxidantes se realizó utilizando una columna semicapilar HP-1, de 15 m x 0.53 mm d.i., de fase estacionaria 100% poli(dimetilsiloxano), con un espesor de película de 3  $\mu\text{m}$ . Se utilizó una precolumna de sílice fundida desactivada de 5 m x 0.53 mm d.i.. Para la separación de conservantes se utilizaron dos columnas cromatográficas semicapilares de distinta polaridad: una columna HP-5 empaquetada con 5%

difenil–95% dimetilsiloxano, con una longitud de 15 m x 0.53 mm d.i. y con un espesor de película de 3  $\mu\text{m}$ , y otra columna HP–50 empaquetada con 50% difenil–50% dimetilsiloxano, con una longitud de 15 m x 0.53 mm d.i. y con un espesor de película de 1  $\mu\text{m}$ . El detector se mantuvo a una temperatura de 250°C. Las señales procedentes del detector fueron recogidas y transducidas por un integrador Hewlett–Packard 3392 A (De–Avondale, PA, EE.UU.). Este cromatógrafo se utilizó para la separación y cuantificación de antioxidantes y conservantes en distintos tipos de alimentos (Capítulo II).

b) Cromatógrafo de gases Thermo Instruments 8000 serie 8035

El cromatógrafo se encuentra equipado con un detector de ionización de llama y un espectrómetro de masas Termo Instruments (Madrid, España) modelo MD 800. El volumen de muestra inyectado fue de 1  $\mu\text{l}$ , empleando una jeringa de precisión Hamilton de 5  $\mu\text{l}$ , y utilizando el modo de división de flujo (1:10) y helio ultrapuro Air Liquide como gas portador a un caudal de 1  $\text{ml min}^{-1}$ . La temperatura de inyección se fijó en 250°C. Se utilizó una columna cromatográfica capilar HP–5, de fase estacionaria 5% difenil–95% dimetilsiloxano, de 30 m x 0.32 mm d.i., con un espesor de película de 1  $\mu\text{m}$ . El detector de ionización de llama se mantuvo a 310°C. Con el fin de confirmar la identidad de los picos eluidos tras la separación cromatográfica, el cromatógrafo de gases se acopló a un espectrómetro de masas. La interfase entre el cromatógrafo de gases y el espectrómetro de masas consiste en una línea de transferencia que introduce el capilar de la columna

cromatográfica en la cámara de ionización del analizador cuadrupolar, la cual se mantuvo a 250°C para evitar la condensación de los analitos. La temperatura de la fuente de electrones fue de 200°C y la energía de ionización de 70 eV. Los espectros de masas se registraron entre 50 y 500 m/z en el modo de impacto de electrones. El instrumento está controlado por el software MassLab, de Termo Instruments, instalado en un ordenador personal donde también se encuentra instalada la biblioteca de espectros NIST. Este cromatógrafo se utilizó como técnica de confirmación y cuantificación de antioxidantes y conservantes separados de forma conjunta a partir de alimentos grasos (Capítulo II.3).

### **I.3.2. Espectrómetros UV–Visible**

#### a) Espectrómetro UV–Visible Shimadzu modelo 160A

El espectrómetro UV–Visible Shimadzu (Kyoto, Japón) 160A tiene un registrador integrado y se equipó con una célula de flujo para espectrometría Hellma con paso de luz 10 mm y volumen interno 18 µl. La absorbancia se registró a 400, 530 y 610 nm para los colorantes amarillos, rojos o verdes–azules–marrones, respectivamente.

#### b) Espectrómetro de diodos en fila UV–Visible Hewlett Packard modelo 8452A

El espectrómetro Hewlett Packard 8452A y se equipó con una célula de flujo Hellma para espectrometría con paso de luz 10 mm y volumen interno 18 µl. El espectrofotómetro se controló mediante el ordenador Hewlett Packard Vectra ES.

La absorbancia se registró a 400, 530 y 610 nm para los colorantes amarillos, rojos o verdes–azules–marrones, respectivamente. Ambos espectrómetros fueron utilizados en el screening de colorantes sintéticos y naturales descritos en el Capítulo III.

### **I.3.3. Cromatógrafo de líquidos**

#### **a) Cromatógrafo de líquidos modular Shimadzu**

El cromatógrafo se encuentra formado por una bomba LC–10 AD, un detector de diodos en fila UV–Visible SPD–M6A, una válvula de inyección Rheodyne Modelo 7725i con un loop de 20  $\mu\text{l}$  y se controla mediante el software Class LC–10 (también de Shimadzu). La separación de los colorantes se hizo utilizando una columna Spherisorb ODS–2 RP–C<sub>18</sub> de 25 cm x 4.6 mm d.i. y un tamaño de partícula de 5  $\mu\text{m}$ , de Alltech (Deerfield, IL, EE.UU.) unida a una precolumna Spherisorb ODS–2 de 7.5 x 4.6 mm d.i. y tamaño de partícula 5  $\mu\text{m}$ . Para los colorantes sintéticos la fase móvil consistió en una mezcla de acetonitrilo y agua que contiene 0.29 g l<sup>-1</sup> ( $8 \times 10^{-4}$  mol l<sup>-1</sup>) de bromuro de cetil–trimetil amonio, y ajustada a pH 5.5 con ácido ortofosfórico. El flujo de fase móvil fue 2 ml min<sup>-1</sup>. Para los colorantes naturales la fase móvil consistió en una mezcla de metanol y agua que contiene 0.07 g l<sup>-1</sup> ( $2 \times 10^{-4}$  mol l<sup>-1</sup>) de bromuro de cetil–trimetil amonio (ajustado a pH 6.0 con ácido ortofosfórico). El flujo de fase móvil fue 1 ml min<sup>-1</sup>. Tanto en la separación de colorantes sintéticos como en el de los naturales, el sistema cromatográfico se acondicionó mediante el paso de la fase

móvil a través de la columna durante 20 minutos a un flujo de  $1 \text{ ml min}^{-1}$  hasta que se obtuvo una línea base estable. Las longitudes de onda utilizadas en el detector de diodos en fila fueron 400, 530 y 610 nm para los colorantes sintéticos y 425, 500 y 610 nm para la detección de colorantes naturales. Los espectros de todos los picos se registraron utilizando longitudes de onda de detección comprendidas entre 375 y 700 nm. En las muestras, la identidad de cada uno de los picos cromatográficos se confirmó comparando las características espectrales en el espectro visible y los tiempos de retención.

#### **I.3.4. Otros instrumentos**

- Balanza analítica de precisión Ohaus (Barcelona, España) modelo Explorer.
- pH-Metro Crison (Barcelona, España) modelo micropH 2000.

#### I.4. APARATOS

Los aparatos empleados en esta Memoria se enumeran a continuación:

- liofilizador Telstar (Barcelona, España) modelo Cryodos-45 equipado con una cámara de liofilización que cuenta con 3 bandejas de distribución y que trabaja a vacío. Para el control de la temperatura y el vacío cuenta con un indicador digital de temperatura y un vacuómetro digital. Este aparato se utilizó en la liofilización de muestras lácteas y salsas utilizadas para la validación del método descrito en el Capítulo III,
- baño de aceite termostatzado Selecta (Barcelona, España) utilizado para la derivatización de los triglicéridos remanentes durante los procedimientos de optimización de métodos para la eliminación de dichos compuestos interferentes de las muestras grasas utilizadas en el Capítulo II,
- evaporador rotatorio Selecta, utilizado para el tratamiento de muestras grasas empleadas para la determinación conjunta de antioxidantes y conservantes tal y como se describe en el Capítulo II,
- placa calefactora con agitador magnético Selecta, utilizada la agitación en la homogeneización de muestras para la determinación de conservantes (yogures desnatados, mermeladas y salsas) en el Capítulo II y la agitación/calefacción en la

automatización de la etapa de extracción de colorantes a partir de muestras liofilizadas en el Capítulo III,

- baño de ultrasonidos Selecta, utilizado para la desgasificación de las bebidas refrescantes empleadas para la determinación de conservantes (Capítulo II) y para el screening de colorantes (Capítulo III), y
- baño de agua Selecta con control de temperatura, utilizado para termostatar las muestras y la columna de algodón/lana utilizada en el sistema de screening y confirmación de colorantes sintéticos en el Capítulo III.

## REFERENCIAS

- [1] V. Ratsimba, J. M. García Fernández, J. Defaye, H. Nigay, A. Voilley, J. *Chromatogr. A* 844 (1999) 283.
- [2] Real Decreto 142/2002, BOE 44, Madrid, 2002.
- [3] Code of Federal Regulations Title 21, Parts 70–189, US Government Printing Office, Washington, DC, 2002 (revisado).
- [4] K. Hofer, D. Jenewein, *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A* 204 (1997) 32.
- [5] Métodos oficiales de análisis Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación MAPA, Volumen II; pp. 309; Secretaría General Técnica del MAPA: Madrid, 1993.
- [6] S. Wybraniec, A. P. de Jong, *Fresenius Z. Anal. Chem.* 356 (1996) 396.



## **CAPITULO II. ANTIOXIDANTES Y CONSERVANTES**



La industria alimentaria utiliza tanto antioxidantes como conservantes para mejorar la conservación de los alimentos. Estos aditivos normalmente se usan en combinación para potenciar su efecto, así como para complementar sus espectros de acción. Esto hace necesario que la mayoría de los métodos analíticos que se desarrollan para la determinación de antioxidantes y conservantes sean capaces de determinar simultáneamente más de un antioxidante o conservante en un solo análisis. Tanto la cromatografía de gases [1–5] como la de líquidos [6–8] son las técnicas que más se utilizan, siendo la última la más extendida. Sin embargo, la separación mediante esta técnica se dificulta cuando se intentan separar aditivos con distinta polaridad, siendo en estos casos más adecuada la cromatografía de gases.

En otro orden de cosas, la determinación de antioxidantes y conservantes por cromatografía de gases en alimentos con un alto contenido en grasas, es compleja. Los aceites y grasas comestibles están formadas casi exclusivamente por triglicéridos ( $\approx 95\%$  de todos los lípidos), ésteres formados por la combinación del glicerol con tres ácidos grasos iguales. El análisis mediante cromatografía de gases de muestras con alto contenido en grasas conlleva la eliminación de los

triglicéridos debido a que éstos se pueden depositar en la columna cromatográfica, dando lugar a resultados erróneos. La técnica utilizada más frecuentemente para la eliminación de estos compuestos interferentes es la saponificación [3]. Esta reacción descompone los triglicéridos, dando nuevamente el glicerol y los ácidos grasos que las constituyen, en una reacción inversa a la de su formación, cuando se las hierva con una disolución de un hidróxido fuerte, como el de sodio o el de potasio. Otras técnicas menos utilizadas para la eliminación de triglicéridos de muestras grasas son la esterificación en presencia de la enzima lipasa [4] y la separación de los analitos de interés mediante cromatografía de líquidos preparativa [5]. El principal inconveniente de estos métodos es que llevan consigo la utilización de grandes cantidades de disolventes y reactivos derivatizadores que son caros y perjudiciales para el operador y el medioambiente.

Por otra parte, la mayoría de los métodos analíticos desarrollados en este campo sólo permiten la determinación de antioxidantes o de conservantes por separado. Sin embargo la determinación conjunta de ambos tipos de aditivos es importante a la hora de determinar la calidad total y la vida comercial de un alimento al que se han añadido para su conservación tanto antioxidantes como conservantes. Con este objetivo se han desarrollado algunos métodos que determinan simultáneamente antioxidantes y conservantes, utilizando la cromatografía de líquidos [9] y técnicas electroforéticas [10,11], pero ninguno haciendo uso de la cromatografía de gases.

En este capítulo de la Memoria se aborda el desarrollo de dos métodos para la determinación de antioxidantes sintéticos y naturales (Capítulo II.1) y conservantes (Capítulo II.2) y un método para la determinación simultánea de antioxidantes y conservantes (Capítulo II.3), en distintos tipos de alimentos. En las metodologías desarrolladas se han introducido módulos de tratamiento automático de las muestras, basados en sistemas de flujo continuo. En los casos de muestras muy sencillas como son aceites y margarinas (Capítulo II.1) y bebidas refrescantes (Capítulo II.2), la muestra se introduce directamente en el módulo de tratamiento automático después de una preparación muy pequeña. En el caso de las muestras más complejas (Capítulo II.1, II.2 y II.3) las muestras requirieron tratamientos previos a su introducción en el módulo de tratamiento automático. En los tres métodos desarrollados se ha empleado la cromatografía de gases para la separación de los analitos, puesto que éstos presentan las características adecuadas para su determinación mediante esta técnica. Además, la cromatografía de gases presenta algunas ventajas respecto a otras técnicas cromatográficas de separación ampliamente utilizadas para la determinación de estos analitos, como es la cromatografía de líquidos: los detectores utilizados en cromatografía de gases son más sensibles y se pueden determinar de forma sencilla analitos con diferencias en su polaridad. El detector utilizado en todos los casos para la determinación cuantitativa de los antioxidantes y conservantes fue el detector de ionización de llama, empleándose la espectrometría de masas como detector alternativo para la cuantificación y como herramienta para la

confirmación de la identidad de los antioxidantes y conservantes detectados en las muestras analizadas en el método desarrollado en el Capítulo II.3.

## REFERENCIAS

- [1] N. B. Tombesi, H. Freije, *J. Chromatogr. A* 963 (2002) 179.
- [2] N. Ochiai, K. Sasamoto, M. Takino, S. Yamashita, S. Daishima, A. C. Heiden, A. Hoffmann, *Anal. Biochem. Chem.* 373 (2002) 56.
- [3] C. Maraschiello, J. A. G. Regueiro, *J. Chromatogr. A* 818 (1998) 109.
- [4] S. Ramamurthi, A. R. McCurdy, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 70 (1993) 287.
- [5] G. Micali, F. Lanuza, P. Curro, *HRC – J. High Res. Chrom.* 16 (1993) 536.
- [6] C. Perrin, L. Meyer, *Food Chem.* 77 (2002) 93.
- [7] A. Schieber, M. Marx, R. Carle, *Food Chem.* 76 (2002) 357.
- [8] Q. C. Chen, J. Wang, *J. Chromatogr. A* 937 (2001) 57.
- [9] B. H. Chen, S. C. Fu, *J. Liq. Chromatogr. R. T.* 19 (1996) 625.
- [10] M. C. Boyce, *Electrophoresis* 22 (2001) 1447.
- [11] M. C. Boyce, *J. Chromatogr. A* 847 (1999) 369.







---

**ANALYTICA  
CHIMICA  
ACTA**

---

Analytica Chimica Acta 359 (1998) 47 – 55

## Continuous-flow determination of natural and synthetic antioxidants in foods by gas chromatography

M. González, E. Ballesteros, M. Gallego and M. Valcárcel\*

*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Córdoba, E-14004 Córdoba, Spain*

Received 27 May 1997; received in revised form 24 October 1997; accepted 28 October 1997

### Abstract

A simple, rapid continuous-flow method with gas chromatographic detection for the simultaneous determination of natural and synthetic antioxidants ( $\alpha$ -tocopherol,  $\alpha$ -tocopheryl acetate, 2,6-di-tert-butyl-p-hydroxytoluene, tert-butyl-4-hydroxyanisole and tert-butylhydroquinone) is proposed. A solid-phase extractor is coupled to the flow system to isolate antioxidants from the sample matrix. During extraction, analytes are released from ca. 70% of the triglycerides present in fats and oils by using XAD-7 sorbent; after selective elution with 400  $\mu$ l of 2-propanol, only ca. 0.7 – 0.8% of total triglycerides originally present in the sample remain in the final extract. XAD-7 adsorbs 70 – 95% of the antioxidants except BHT of which only ca. 30% is adsorbed. The proposed method is considered an effective alternative to earlier procedures.

## 1. INTRODUCTION

Antioxidants containing a phenol group play a prominent role in foods. They are classified in two groups, namely: natural antioxidants, which are represented mainly by tocopherols, and synthetic antioxidants, represented by 2,6-di-tert-butyl-p-hydroxytoluene (BHT); tert-butyl-4-hydroxyanisole (BHA); propyl, octyl and dodecyl gallate; tert-butylhydroquinone (TBHQ) and nordihydroguaiaretic acid [1]. The use of synthetic antioxidants is regulated by governments through controls on the use of food additives. Regulations of allowed levels often vary from country to country [2]. Thus, in North America, the addition of antioxidants is restricted to 0.01% of each individual antioxidant, but two or more may be added provided the total amount does not exceed 0.02% [3]. Similar restrictions are imposed by the European Community, which, in addition, has banned TBHQ [4].

In principle, UV absorption measurements provide an excellent means for quantifying individual phenolic antioxidants [5,6]; however, the technique suffers from non-specificity in food analysis because some compounds in the samples can interfere with their determination. For this reason, spectroscopic techniques have to a large extent been superseded by chromatographic techniques for this purpose [7]. Chromatography in all forms (viz. thin-layer [8], supercritical fluid [9], liquid [10–14] and gas [10,15,16]) has been used to determine antioxidants in foods. Gas chromatography (GC) is an effective choice because it allows one to identify and determine nanogram amounts of complex mixtures in a simultaneous manner; this technique has been used to determine antioxidants in fats, oils, dairy products, breakfast cereals, etc. Liquid chromatography offers most of the advantages of GC

but uses generally less sensitive detectors [7]. Separation of antioxidants from matrix compounds by solvent extraction [7,17] may result in considerable amounts of matrix being co-extracted and clean-up of extracts being necessary. In addition, this technique is labor-intensive and time-consuming, and uses large volumes of toxic organic solvents. More recently, solid phase extraction (SPE) has been used for the preconcentration/isolation of antioxidants [18,19]. The SPE technique is more expeditious, (especially if implemented in an automated fashion); also, it uses small volumes of solvents and avoids the formation of emulsions [20].  $\alpha$ -Tocopherol has been determined in feed-stuffs by liquid chromatography after sample pretreatment, adsorption on a silica gel cartridge and elution of the column by a continuous-flow system. The ensuing method was compared with conventional liquid-liquid extraction and was found to be at least as quantitative and considerably faster [21]. More recently, our group developed an automated gas chromatographic method for the determination of cholesterol,  $\alpha$ -tocopherol and  $\alpha$ -tocopheryl acetate involving continuous transesterification and liquid-liquid extraction for removal of interfering triglycerides from oil samples [22].

The purpose of this work was to determine natural (tocopherols) and synthetic antioxidants (BHT, BHA and TBHQ) in foods containing large amounts of triglycerides. To this end, a straightforward flow system involving separation of the analytes from the sample matrix was used. Traditional liquid-liquid extraction was replaced with solid-phase extraction in order to avoid the subsequent need to remove triglycerides by transesterification. Various sorbent materials were studied in order to ensure the optimum analytical conditions for extracting the antioxidants.

---

Subsequently, the influence of triglycerides on the proposed flow system was investigated.

## 2. EXPERIMENTAL

### 2.1. Chemicals

Tert-butyl-4-hydroxyanisole (BHA), 2,6-di-tert-butyl-p-hydroxytoluene (BHT),  $\alpha$ -tocopherol ( $\alpha$ -T),  $\alpha$ -tocopheryl acetate ( $\alpha$ -TA) and 5- $\alpha$ -cholestane (internal standard) were purchased from Sigma (Madrid, Spain). Tert-butylhydroquinone (TBHQ) and 2-tert-butyl-4-methylphenol (internal standard) were supplied by Aldrich (Madrid, Spain). Ethanol, 2-propanol, acetone, n-hexane and other organic solvents were obtained in HPLC grade from Scharlau (Barcelona, Spain). XAD polymeric sorbents (-2, -4, -7 and -16) were supplied in 20 – 60 mesh by Sigma. Polygosyl-bonded silica reversed-phase sorbent with octadecyl functional groups (RP-C<sub>18</sub>), 40 – 63  $\mu$ m; Darco 20 – 40 mesh granular activated carbon; silica gel 100; and 16 – 30 mesh Florisil were purchased from Sigma, Aldrich, Merck (Darmstadt, Germany) and Aldrich, respectively.

Standard solutions of each antioxidant and internal standards were prepared at a concentration of 10 g l<sup>-1</sup> in ethanol and stored in glass-stopped bottles at 4°C. The optimal GC conditions were established by using a mixture of five antioxidants and both internal standards in ethanol.

## 2.2. Equipment

Analyses were carried out on a Hewlett–Packard 5890 A gas chromatograph equipped with a flame ionization detector and a 15 m x 0.53 mm i.d., 3.0  $\mu\text{m}$  HP–1 [100% crosslinked poly(dimethylsiloxane)] fused–silica column. A deactivated precolumn (5 m x 0.53 mm i.d.) of fused silica for retention gap was inserted in the top of the analytical column. A packed column injection port, heated at 250°C, with a HP series 530  $\mu$ –column liner (glass inserts) was used; the detector temperature was kept at 250°C. The GC oven was programmed from the initial temperature of 100°C (3 min), ramped at a rate of 5°C min<sup>-1</sup> to 130°C (8 min), and at 15°C min<sup>-1</sup> to the final temperature, 255°C, which was maintained for 20 min. Sample injection was done in the splitless mode, using injection volumes of 2 or 5  $\mu\text{l}$  for off–line and on–line analysis, respectively. Nitrogen at a flow–rate of 15.5 ml min<sup>-1</sup> was used as the carrier gas. Peak areas were recorded on a Hewlett–Packard 3392 A integrator.

The continuous flow–system used consisted of a Gilson–Minipuls–2 peristaltic pump fitted with Solvaflex pumping tubes (organic solutions), two Rheodyne 5041 injection valves and poly(tetrafluoroethylene) (PTFE) tubing of 0.5 mm i.d. for coils. Laboratory–made adsorption columns packed with different sorbents were constructed. The columns were made from PTFE capillaries of 3 mm i.d. and their ends capped by fitting 30 mm x 0.5 mm i.d. PTFE tubing into a 10–mm x 1 mm i.d. PTFE tube, which facilitated insertion into the continuous system. Columns were hand–packed with different amounts of sorbent and sealed at both ends with small plugs of cotton wool to prevent material losses. They were

---

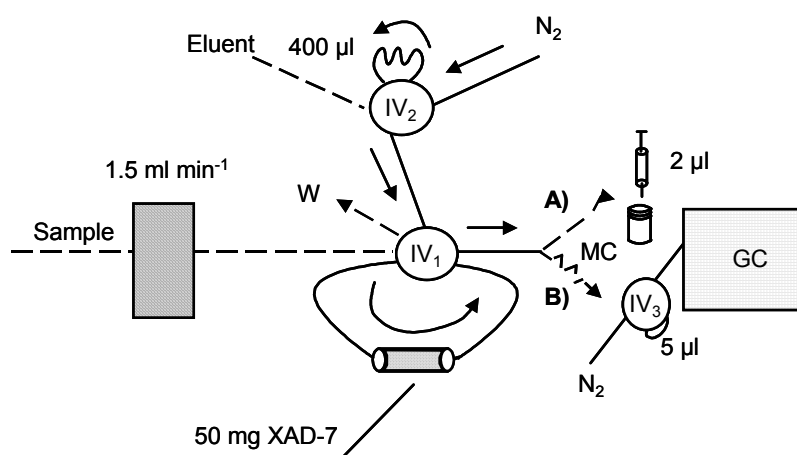
conditioned by passing 4 ml of n-hexane at a flow-rate of 1.5 ml min<sup>-1</sup>. A Knauer 633200 6-port HPLC switching valve mounted over the injection port of the GC (injected volume, 5 µl) was also employed in on-line determinations [22].

### 2.3. Pretreatment of food samples

Solid samples (soups) were placed in a mortar and ground to a fine mesh. A portion of 20 – 30 g of the resulting powder was placed in separatory funnel and mixed with 25 ml of n-hexane. Both internal standards (100 mg l<sup>-1</sup> 5- $\alpha$ -cholestane and 2-tert-butyl-4-methylphenol) were added to the mixture, which was then shaken gently for 5 min. Once the two phases were decanted, the n-hexane phase was transferred to a separatory funnel, 10 ml of an aqueous solution 0.2 mol l<sup>-1</sup> NaCl was added and, once more, the solution was shaken for about 5 min. In this way, water-soluble compounds present in the organic extract were removed, which was visually apparent because the n-hexane phase remained transparent. A volume of 5 ml of the clean-up extract, whether undiluted or diluted four times (for the determination of tocopherols), was introduced into the continuous system for analysis.

For fatty samples (oils and margarines), an amount of 5 to 20 g was spiked with 2.5 mg of both internal standards and dissolved in 25 ml of n-hexane. The diluted sample was directly analyzed in the flow system similarly to the above-described samples. When dilution was required (viz. for the determination of

tocopherols), 5- $\alpha$ -cholestane was added in order to maintain its concentration at 100 mg l<sup>-1</sup>.



**Fig. 1.** Setup used for the continuous isolation of antioxidants from the food matrix (mainly triglycerides) and their determination by gas chromatography using manual (mode A) or automatic injection (mode B). IV = injection valve; W = waste; MC = mixing coil (75 cm x 0.5 mm i.d.); GC = gas chromatograph with FID.

#### 2.4. Procedure

The manifold used for the determination of natural and synthetic antioxidants in foods is depicted in Fig. 1. A volume of 5 ml of the standards or the treated samples, in *n*-hexane, was continuously introduced into the system at 1.5 ml min<sup>-1</sup> and propelled through the sorbent column (XAD-7 dried at 80°C, 50 mg) located inside the loop of the injection valve (IV<sub>1</sub>). Then, the column was dried for 2 min with a stream of nitrogen at 1.0 ml min<sup>-1</sup> introduced via the carrier line of the second valve (IV<sub>2</sub>); simultaneously, the loop of IV<sub>2</sub> was filled with eluent (2-propanol). As IV<sub>2</sub> was switched, 400 µl of eluent was injected into the same stream as used in the drying step, and passed through the column to elute antioxidants and the internal standards

(position shown in the figure). The eluate was collected in glass-vials for manual injection of 2  $\mu\text{l}$  into the port of the gas chromatograph (mode A) or injected continuously into the chromatograph via IV<sub>3</sub> (mode B). After each determination, the sorbent column was cleaned with 1 ml of acetone to remove residual triglycerides and other organic compounds adsorbed; finally, the column was again conditioned with 4 ml of n-hexane.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

The polyhydric nature of gallates reduces their volatility to such an extent that they cannot be determined by GC without derivatization (normally as their trimethylsilyl derivatives); on the other hand, BHA, BHT, TBHQ and tocopherols exhibit good GC properties and may be determined on stationary phases with different polarities [7]. In order to simplify the method, only those antioxidants that can be directly determined by GC were studied.

#### 3.1. Adsorption process

Reagents and sorbents were selected and variables affecting the adsorption of antioxidants were optimized by using a manifold similar to that depicted in Fig. 1. 2  $\mu\text{l}$  of organic extract (ca. 400  $\mu\text{l}$ ) were manually injected into the GC.

A preliminary sorption test was carried out by using a column packed with 50 mg of RP-C<sub>18</sub> sorbent, which has been recommended in the literature [18]. Several solvents (n-hexane, n-pentane, n-heptane and petroleum ether) were tested in order to select the sample preparation medium for optimal sorption. For this purpose,



individual standard solutions containing  $100 \text{ mg l}^{-1}$  of each antioxidant in the above-mentioned solvents were passed through the sorbent column at  $1.5 \text{ ml min}^{-1}$ . After each standard solution was processed, the column was cleaned with 2 ml of ethanol to eliminate sorbed analytes. The sorption efficiency was assessed by comparing the amount of each compound present in the standard solutions before (unsorbed) and after the sorbent column, in terms of peak area and taking dilution factors into account. The results, similar for all solvents studied, were unsatisfactory because the adsorption efficiency was only ca. 50% for TBHQ, even lower for BHA and BHT, and negligible for both tocopherols (see Table 1). The RP-C<sub>18</sub> sorbent was discarded and other sorbents studied in greater detail to increase sorption of antioxidants. Columns packed with 50 mg of different sorbent materials (activated carbon, Florisil, silica gel 100 and XAD-2) were assayed for isolation and preconcentration of the antioxidants. As can be seen in Table 1, the best results were obtained with the polymeric sorbent XAD-2, whichever the solvent. Because differences between solvents were negligible, n-hexane was chosen because it had a less marked deteriorating effect on pumping tubes.

**Table 1.** Adsorption (%) of antioxidants in different columns packed with 50 mg of sorbent material.

Sorbent	BHA	BHT	TBHQ	$\alpha$ -T	$\alpha$ -TA
RP-C <sub>18</sub>	26.1	4.1	51.0	–	–
Silica gel 100	14.5	–	72.3	–	–
Activated carbon	43.1	1.1	63.5	10.3	9.1
Florisil	18.2	–	65.2	–	–
XAD-2	45.7	10.2	70.2	18.4	13.5
XAD-4	17.6	2.0	57.1	3.2	2.7
XAD-16	35.9	1.7	62.5	4.3	2.6
XAD-7	88.9	18.8	74.6	44.1	26.4
XAD-7 <sup>a</sup>	96.1	29.7	76.1	50.9	33.6
XAD-7 <sup>b</sup>	97.0	27.8	76.6	75.8	72.1

<sup>a</sup>, column packed with 100 mg of XAD-7 (corresponding to 250 mg of wet sorbent).

<sup>b</sup>, column packed with 50 mg of dry sorbent.

–, not adsorbed.

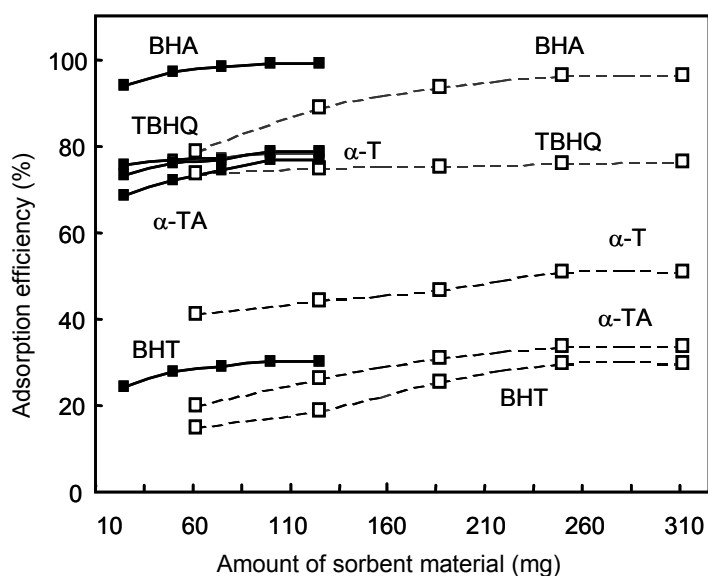
A more exhaustive study involving different copolymer XAD series (XAD-2, XAD-4, XAD-7 and XAD-16) revealed that XAD-7 excelled all other XAD sorbents in adsorption efficiency for the five antioxidants studied. Thus, BHA was adsorbed by ca. 90% and TBHQ by 75%; by contrast, BHT was the least readily adsorbed (Table 1). XAD-7 exhibited the best efficiency, probably because it is a methylmetacrylate copolymer with physical properties different from those of the other XAD variants tested styrene-divinylbenzene copolymers. However, the adsorption efficiency of XAD-7 for tocopherols and BHT is not good. In order to increase it, different amounts of XAD-7 [between 25 and 125 mg, which, taking into account the water content (60%), correspond to 62 – 310 mg of wet material] were packed in several columns. A volume of 5 ml of standard solution containing between 20 and 125 mg

l<sup>-1</sup> antioxidants was passed through the columns and then cleaned with ethanol. As can be seen in Fig. 2 (dashed lines), even a dramatically increased amount of sorbent (viz. 310 mg) had no appreciable effect on the adsorption efficiency for any antioxidant at the concentrations assayed. In addition, the minicolumn packed with 100 mg of sorbent (250 mg of wet material) was very large (7 cm x 3 mm i.d.) and required high eluent volumes. Subsequent experiments were carried out by drying the sorbent material in order to reduce the column dimensions. XAD-7, which contains ca. 60% of water, can be dried up to 150°C without losing its adsorbing properties [23]. The sorbent was dried at 80°C up to constant weight overnight; after the column was prepared, the dry resin was wetted with n-hexane [24]. The optimum amount of sorbent was again determined. As can be seen in Fig. 2 (solid lines), the highest adsorption was obtained above 45 mg; also, the recovery of both tocopherols increased relative to the wet material (see Table 1). However, the adsorption efficiency for BHT was still lower than 30%; this can be ascribed to steric hindrance posed by the -C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> group at positions 2 and 6 of the phenol ring, which impedes adsorption via the hydroxyl function. A 1.8 cm x 3 mm i.d. column containing 50 mg of XAD-7 dry sorbent was selected for further experiments.

The sample flow-rate influences sorption. The effect of flow-rates below 3 ml min<sup>-1</sup> was investigated by introducing a constant volume of a standard solution containing a 100 mg l<sup>-1</sup> concentration of each antioxidant in n-hexane. In all experiments, the column was washed with 4 ml of ethanol. The sample flow-rate had no effect over the range 0.5 to 1.6 ml min<sup>-1</sup>; at higher flow-rates, the sorption

---

efficiency decreased slightly. A sample flow-rate of  $1.5 \text{ ml min}^{-1}$  was chosen in order to ensure a high throughput.



**Fig. 2.** Influence of the amount of sorbent material used (XAD-7) on the adsorption efficiency of antioxidants. Dashed and solid lines correspond to wet (60% of water) and dry sorbent, respectively. Sample, 5 ml of  $100 \text{ mg l}^{-1}$  of antioxidants in *n*-hexane.

### 3.2. Elution process

Various organic solvents (methanol, ethanol, 2-propanol and ethyl acetate) were tested as eluents for the antioxidants retained on XAD-7. A volume of 5 ml of a standard solution containing a  $100 \text{ mg l}^{-1}$  concentration of each antioxidant in *n*-hexane was passed through the sorbent column at  $1.5 \text{ ml min}^{-1}$ ; after retention, the column was dried with nitrogen and retained analytes were eluted by using a nitrogen stream at  $1.0 \text{ ml min}^{-1}$  as eluent carrier; the effluent from the column was manually injected into the chromatograph (mode A in Fig.1). At a constant eluent

volume (400  $\mu$ l), ethanol and 2-propanol were found to be more effective eluents for these organic compounds than the other solvents because the resulting analytical signals were 1.3 times higher relative to those obtained with methanol and ethyl acetate. Ethanol was adopted as eluent because it is a more commonplace organic solvent.

The effect of the eluent volume was studied between 100 and 500  $\mu$ l by using loops of variable length in the injection valve ( $IV_2$  in Fig. 1). Obviously, as the eluent volume was increased, desorption was more efficient (but analytes were also more diluted). Because of these two opposing effects, the only way to correctly determine the most appropriate eluent volume was to dilute extracts to a constant volume with the same solvent. Thus, the column effluent (between 100 and 500  $\mu$ l of ethanol) was always diluted to 800  $\mu$ l with ethanol. Desorption efficiency increased with increasing injected volume up to 350  $\mu$ l, above which the analytical signals for all antioxidants remained constant. The same study was repeated by using different eluent volumes (between 100 and 500  $\mu$ l) without dilution to a constant final volume, however, chromatographic signals increased with increasing volume up to 350  $\mu$ l remained constant between 350 and 400  $\mu$ l, and decreased at higher volumes through increasing dilution of desorbed analytes. An injected volume of 400  $\mu$ l of ethanol was selected as optimal. A second injection with the same eluent volume revealed the absence of carry-over; thus, complete elution of analytes was obtained with one injection of 400  $\mu$ l of ethanol. Flow-rates of nitrogen stream (carrier of the

eluent volume) between 0.2 and 1.5 ml min<sup>-1</sup> had no effect on the antioxidant recoveries, so 1.0 ml min<sup>-1</sup> was chosen for further experiments.

Finally, in order to assess the performance of the proposed method, several internal standards were studied. 2-Tert-butyl-4-methylphenol and 5- $\alpha$ -cholestane were selected because both were adsorbed on XAD-7 resin and eluted in ethanol virtually quantitatively; they were added directly to the standards and samples.

### 3.3. Study of triglyceride interferences

Antioxidants are added to foods in order to inhibit the oxidation of lipids. The GC determination of antioxidants in oils and fats entails removing the overwhelming amount of triglycerides (ca. 95% of all lipids) because they may be deposited in the chromatographic column and give rise to spurious results. Because the proposed method was intended for these types of food, the adsorption and elution efficiency of triglycerides on the XAD-7 sorbent column was studied similarly to those of antioxidants. A sunflower-seed oil sample was chosen for this purpose, because it is allowed to contain added antioxidants. An amount of 20 g of oil was dissolved in 100 ml of n-hexane and a portion of 5 ml were passed through the sorbent column. The sorption efficiency was assessed by comparing the amount of triglycerides present in the sample before (unsorbed) and after introduction into the sorbent column; also, the elution efficiency was evaluated by using 400  $\mu$ l of ethanol or 2-propanol (both were previously found to be the best eluents for the antioxidants). However, triglycerides cannot be directly determined by GC directly and require derivatization in order to increase their volatility. We used the traditional transesterification to fatty

acid methyl esters [25] with 5% acetyl chloride in methanol as derivatizing reagent. The derivatization reaction was manually done by mixing 400  $\mu\text{l}$  of oil solution in n-hexane with 400  $\mu\text{l}$  of derivatizing reagent in a glass vial and heating at 60°C for 5 min in a thermostated water bath; once the mixture was cool, 400  $\mu\text{l}$  of water was added in order to obtain a clean n-hexane phase, 2  $\mu\text{l}$  aliquots of which were injected into the chromatograph.

The sorption study revealed that ca. 30% of triglycerides present in the oil solution were retained on the XAD-7 column and ca. 70% went to waste. In the elution study, the derivatizing reagent was 5% acetyl chloride in ethanol or 2-propanol, depending on the eluent employed; in addition, 400  $\mu\text{l}$  of n-hexane and the derivatizing reagent were added to the effluent. After derivatization, the n-hexane phase was analyzed by GC. Triglycerides were eluted from the sorbent column by ca. 15 or 2.5% using ethanol or 2-propanol as eluent, respectively. In order to avoid the need to transesterify triglycerides, 2-propanol was used as eluent because only ca. 2.5% of triglycerides present in the column (30% of the initial concentration in the oil sample) were eluted (viz. ca. 0.8% of triglycerides in the oil sample). The analysis of oil and fat samples required cleaning the sorbent column between samples with 1 ml of acetone (to ensure complete elution of residual triglycerides). As in the previous experiments, only ca. 0.7 – 0.8% of triglycerides present in the sample remained in the final organic extract, so the transesterification reaction was unnecessary; however, in order to extend the service life of the chromatographic column, a precolumn for retention gap was used.

### 3.4. *On-line injection into the gas chromatograph*

The continuous solid-phase extraction system was fitted to the gas chromatograph via an injection valve (IV<sub>3</sub>) similar to that used elsewhere to couple an extraction system to a gas chromatograph [22]. The loop of the injection valve (5  $\mu$ l) was PTFE and the valve was connected to the instrument via a 10 cm x 0.3 mm i.d. stainless-steel tube with a needle soldered on one end for direct insertion into the septum of the injection port. The carrier gas (nitrogen) stream was split into two lines, one directly connected to a port of valve IV<sub>3</sub> and the other to the chromatographic injection port. The flow-rate of the carrier gas was varied between 10 and 25 ml min<sup>-1</sup> to minimize adsorption in the connecting tube and improve chromatographic resolution of peaks. An overall gas flow-rate of 15.5 ml min<sup>-1</sup> (flow-rates through the valve and injection port 11.1 and 4.4 ml min<sup>-1</sup>, respectively) was selected because neither adsorption of antioxidants in the lines nor disturbed peaks was observed.

### 3.5. *Analytical performance*

The dependence of the signals for the five antioxidants on the concentration was determined at a single integrator sensitivity under the optimum conditions for the system depicted in Fig. 1. Two internal standards, viz. 2-tert-butyl-4-methylphenol (for BHA, BHT and TBHQ) and 5- $\alpha$ -cholestane (for tocopherols), were used in all determinations. Analytical curves for standard solutions containing different concentrations of antioxidants and 100 mg l<sup>-1</sup> of both internal standards in n-hexane were obtained by plotting the analyte-to-internal standard peak area ratio against



the analyte concentration. The analytical figures of merit obtained are summarized in Table 2. The detection limit was calculated as the concentration providing a chromatographic signal three times higher than background noise. The precision of the method (expressed as repeatability,  $n=11$ ) was checked with standards of  $50 \text{ mg l}^{-1}$ . The relative standard deviation ranged from 2.7 to 3.5%.

**Table 2.** Analytical figures of merit of the determination of antioxidants. Sample and eluent volumes, 5 ml and 400  $\mu\text{l}$ , respectively.

Antioxidant	Regression equation <sup>a</sup>	Correl. coef.	Linear range ( $\text{mg l}^{-1}$ )	Detection limit ( $\text{mg l}^{-1}$ )	RSD (%) <sup>b</sup>
BHA	$A = -0.0016 + 0.0100 X$	0.999	5–50	2	2.7
BHT	$A = 0.0060 + 0.0016 X$	0.992	15–200	7	3.4
TBHQ	$A = -0.0097 + 0.0112 X$	0.997	4–50	2	3.3
$\alpha$ -Tocopherol	$A = -0.0023 + 0.0026 X$	0.996	15–200	6	3.2
$\alpha$ -Tocopheryl acetate	$A = 0.0049 + 0.0012 X$	0.999	20–200	8	3.5

<sup>a</sup>, A: relative area (analyte/internal standard peak area); X: concentration, in  $\text{mg l}^{-1}$ .

<sup>b</sup>,  $n=11$  at  $50 \text{ mg l}^{-1}$ .

### 3.6. Determination of antioxidants in food products

The most common synthetic antioxidants added to foods are BHA, BHT, TBHQ and propyl gallate. The current European Community maximum allowable dosage of BHA in soups is  $200 \text{ mg kg}^{-1}$  fat, however, BHT is not permitted. In margarines and seed oils, BHA and BHT are allowed at 200 and  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  fat level, respectively [4]. Tocopherols are allowed at quantum satis.

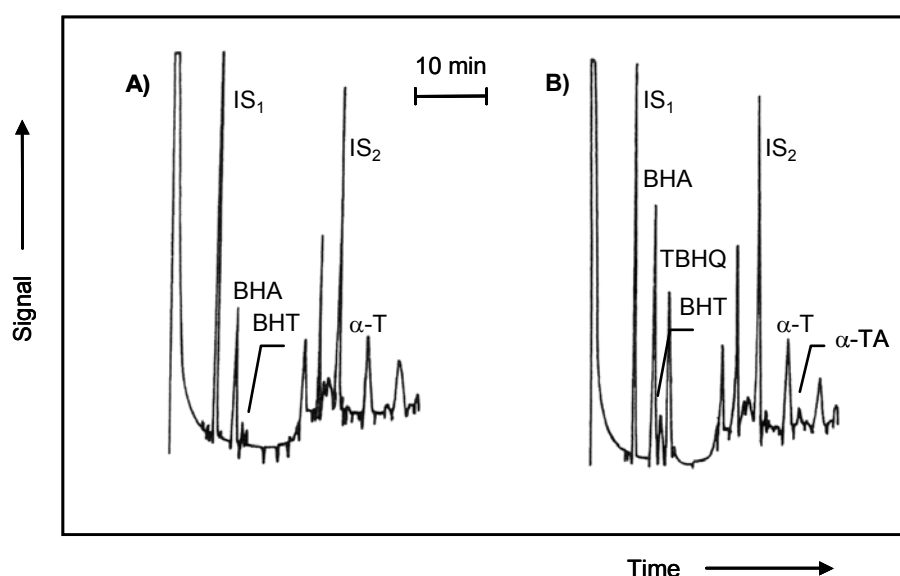
**Table 3.** Concentration ( $\text{mg kg}^{-1}$  fat) of synthetic and natural antioxidants in foods as determined by the proposed method.

Food sample	BHA	BHT	TBHQ	$\alpha$ -T	$\alpha$ -TA
Chicken soup 1	195 $\pm$ 6	–	–	1192 $\pm$ 40	–
Chicken soup 2	375 $\pm$ 11	–	–	6759 $\pm$ 230	–
Vegetable soup 1	193 $\pm$ 6	–	–	960 $\pm$ 35	2647 $\pm$ 102
Vegetable soup 2	192 $\pm$ 6	–	–	1758 $\pm$ 65	–
Sunflower–seed oil	134 $\pm$ 5	58 $\pm$ 2	–	485 $\pm$ 20	–
Corn oil	123 $\pm$ 4	64 $\pm$ 3	–	123 $\pm$ 5	–
Wheat–germ oil	–	–	–	384 $\pm$ 16	2268 $\pm$ 83
Sunflower margarine	150 $\pm$ 5	–	–	125 $\pm$ 5	–
Corn margarine	–	–	–	89 $\pm$ 3	237 $\pm$ 9

$\pm$ , standard deviation (n=15).

The proposed method was applied to the determination of antioxidants in soups, oils and margarines; samples were pretreated as described under Experimental. Table 3 gives the average concentrations for five individual analyses of each food sample; determinations were done in triplicate in the flow system, so the standard deviation for each sample was obtained from fifteen results. As expected, only BHA and tocopherols were present in soup samples; however, the BHA concentration found in chicken soup 2 exceeded the allowed concentration. BHT was detected only in oils. BHA and BHT were not detected in wheat–germ oil or corn margarine, which contained only both tocopherols. Wheat–germ oil, corn margarine and chicken soup 2 contained  $\alpha$ -tocopheryl acetate. As can be expected TBHQ were undetected in all analyzed foods according the European Community norms. Because the samples analyzed did not contain all the antioxidants studied, they were spiked with different amounts of the five before treatment in such a way that their

concentrations in the final extracts lay within the linear range for the method; spiked samples were analyzed in quintuplicate. The recoveries thus achieved ranged from 93.6 and 101.4%. Fig. 3 shows the chromatograms obtained in the analysis of a sunflower–seed oil sample (A) and the same oil spiked with  $125 \text{ mg kg}^{-1}$  fat of five antioxidants (B).



**Fig. 3.** Chromatograms obtained for a sample solution containing 2 g of sunflower–seed oil in 5 ml of n–hexane (A) and same sample spiked with  $125 \text{ mg kg}^{-1}$  fat of five antioxidants (B). IS<sub>1</sub> and IS<sub>2</sub> correspond to the internal standards 2–tert–butyl–4–methylphenol and 5– $\alpha$ –cholestane, respectively.

#### 4. CONCLUSIONS

The objectives of this work were largely fulfilled. The proposed method allows most triglycerides (ca. 70%) present in oils and fatty foods to be removed by using a solid phase extraction procedure; in addition, with 2–propanol as eluent, only ca. 2% of residually adsorbed triglycerides is eluted, which corresponds to ca. 0.8%

of the triglycerides present in fatty foods. The proposed flow system allows the isolation of antioxidants from ca. 99% of triglycerides, so no derivatization is required unlike in other methods [22]. The proposed method is a good alternative against the AOAC-methods for the determination of antioxidants in food products [10] as it involves minimal sample manipulation and solvent consumption; also, it has a high precision and throughput.

### **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors are grateful to the Spanish Dirección General de Investigación Científica y Técnica (Project No. PB95-0977) for financial support.

**REFERENCES**

- [1] H. D. Belitz, W. Grosch (Eds.), *Food Chemistry*, Springer–Verlag, Berlin, 1986.
- [2] T. E. Furia (Ed.), *CRC Handbook of Food Additives*, 2<sup>nd</sup> edn., Volume II, CRC Press, Inc., Florida, 1980.
- [3] C. Warner, J. Modderman, T. Fazio, M. Beroza, G. Schwartzman, K. Fominaya, *Food Additives Analytical Manual*, Volume I, AOAC International, Arlington VA, 1983.
- [4] Diario Oficial de las Comunidades Europeas, No. L.61, 18.3.95, p. 25.
- [5] M. E. Komaitis, M. Kapel, *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 62 (1985) 1371.
- [6] C. S. P. Sastry, S. G. Rao, B. S. Sastry, *J. Food Sci. Technol.* 29 (1992) 101.
- [7] K. Robards, S. Dilli, *Analyst* 112 (1987) 933.
- [8] M. Guldborg, *Fresenius J. Anal. Chem.* 309 (1981) 117.
- [9] A. Staby, C. Borch–Jensen, S. Balchen, J. Mollerup, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 71 (1994) 355.
- [10] K. Helrich (Ed.), *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, 15<sup>th</sup> edn., Association of Official Analytical Chemists, Arlington VA, 1990, pp 1071–1076, 1138–1140.
- [11] C. A. Hall, A. Zhu, M. G. Zeece, *J. Agric. Food Chem.* 42 (1994) 919.
- [12] T. S. Shin, J. S. Godber, *J. Chromatogr. A* 678 (1994) 49.
- [13] D. Ivanovic, M. Medenica, E. Nivaud–Guernet, M. Guernet, *Chromatographia* 40 (1995) 652.
- [14] E. J. M. Konings, H. H. S. Roomans, P. R. Beljaars, *J. AOAC Int.* 79 (1996) 902.

- [15] G. Micali, F. Lanuzza, P. Curro, *J. High Resolut. Chromatogr.* 16 (1993) 536.
- [16] S. Kmostak, D. A. Kurtz, *J. AOAC Int.* 76 (1993) 735.
- [17] Y. Kitada, Y. Ueda, M. Yamamoto, K. Shinomiya, H. Nakazawa, *J. Liq. Chromatogr.* 8 (1985) 47.
- [18] S. S. Yang, M. J. Lee, S. C. Lee, S. J. Su, S. S. Chou, *Anal. Abstr.* 56 (1994) 8H210.
- [19] J. W. Wong, S. E. Ebeler, R. Rivkah–Isseroff, T. Shibamoto, *Anal. Biochem.* 220 (1994) 73.
- [20] L. A. Berrueta, B. Gallo, F. Vicente, *Chromatographia* 40 (1995) 474.
- [21] C. F. Bourgeois, S. H. Hel, J. P. Belliot, P. R. George, C. A. Slomianny, *J. AOAC Int.* 68 (1985) 1121.
- [22] E. Ballesteros, M. Gallego, M. Valcárcel, *J. Chromatogr. A* 719 (1996) 221.
- [23] J. A. Leenheer, *Water Analysis*, Volume III: Organic Species, Chapter 3, R. A. Minear and L. H. Keith (Eds.), Academic Press, Inc., Orlando, 1984.
- [24] S. Wybraniec, A. P. de Jong, *Fresenius J. Anal. Chem.* 356 (1996) 396.
- [25] W. Welz, W. Sattler, H. J. Leis, E. Malle, *J. Chromatogr.* 526 (1990) 319.



## Simultaneous gas chromatographic determination of food preservatives following solid-phase extraction

M. González, M. Gallego and M. Valcárcel\*

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Córdoba, E-14004 Córdoba, Spain

### Abstract

A simultaneous method for the solid-phase extraction of five preservatives is presented. Of the different sorbent materials assayed, styrene-divinylbenzene polymers provided the highest adsorption efficiency. Samples are inserted into the flow system at pH 1, which results in increased selectivity. Elution is made with 150  $\mu\text{l}$  of ethyl acetate and 2  $\mu\text{l}$  aliquots of the eluate are manually injected into a gas chromatograph equipped with flame ionization detection. Of the two chromatographic columns of different polarity, that containing the more polar stationary phase assayed provided the better results by virtue of the acid character of the analytes. The limits of detection achieved range from 0.1 to 0.2  $\text{mg l}^{-1}$ , and the precision is quite high ( $\text{RSD} < 4\%$ ). The potential of the proposed method was assessed by applying it to the determination of sorbic and benzoic acid in foods. Solid samples require pretreatment involving liquid-liquid extraction, evaporation of the extract and dissolution of the residue in 0.1  $\text{mol l}^{-1}$   $\text{HNO}_3$ . Recoveries ca. 95% for p-hydroxybenzoic acid esters can thus be obtained.

*Keywords:* Food analysis; Extraction methods; Benzoic acids; Sorbic acid

## 1. INTRODUCTION

Antimicrobial food additives are used to prevent the proliferation of bacteria, yeasts and moulds; sorbic acid, benzoic acid and p-hydroxybenzoic acid esters are used extensively in this context. Sorbic acid and benzoic acid are widely regarded as the most active against yeasts and moulds, and the least active against bacteria; however, it is difficult to obtain substantial evidence on their relative activity from available studies [1,2]. The alkyl esters (methyl, ethyl and propyl) of p-hydroxybenzoic acid are often referred to as “parabens” and are widely used for their antifungal properties. The preservative effect of parabens tends to increase with increasing molecular mass; the methyl ester is more effective against moulds and the propyl ester against yeasts, (the latter is favored for oils and fats for solubility reasons [2]). Because the maximum permitted concentrations of preservatives in each type of food are controlled by legislation [3], their determination is a mandatory step in routine food analyses.

A variety of analytical methods for determining preservatives have been reported to date. Spectroscopic methods are usually employed for the individual determination of these compounds. Thus, sorbic acid in raw beef [4] has been determined with low recoveries (52 – 84%) by photometry following distillation and extraction. Better recoveries (ca. 100%) and less manipulation are involved the determination of 4-hydroxybenzoic methyl ester in nonalcoholic beverages by the fluorescence technique [5]. However, because the additives can be present in combinations, chromatographic methods are often used for their selective individual or joint determination. Sorbic and benzoic acid preservatives in



beverages have been determined by thin-layer chromatography with minimal sample manipulation [6,7]. High-performance liquid chromatography (HPLC) is often preferred for the determination of mixtures of additives in foods, which are usually scarcely volatile. The simultaneous determination of sweeteners, preservatives and colorings in soft drinks is usually done by HPLC with UV detection [8–10]. Preservatives in yogurt have also been determined by this technique after laborious manipulation of the sample including digestion, filtration, extraction and evaporation prior to injection into the chromatograph [11]. A strategy for selecting the most suitable separation system for the determination of natural compounds (preservatives included) in beverages by using ion-exchange HPLC has been widely discussed [12]. However, the simultaneous separation of additives by HPLC is hindered by polarity differences. Gas chromatography (GC), with or without derivatization, is also employed for the selective determination of food preservatives. The Association of Official Analytical Chemists (AOAC) official GC method [13] for preservatives in foods involves several extractions, evaporation, derivatization to a trimethylsilyl ester and flame ionization detection (FID). Mass spectrometry (MS) is a sensitive, selective technique and is gradually gaining ground in the determination of these additives by GC. The chemical ionization MS mode [14] is more sensitive than the electron impact ionization mode for this purpose [14,15]. Both allow preservatives to be determined with limits of detection of 100 – 500 pg but involve sample pretreatments similar to that of the AOAC method, which is time-consuming.

Solid-phase extraction (SPE) was introduced in the early 1970s to avoid or minimize the shortcomings of liquid-liquid extraction (particularly the large sample/organic solvents volumes required and its slowness) [16]. Since then, this separation technique has superseded other sample preparation alternatives, aided by the variety of polar and nonpolar sorbents, and exchangers, that have been made commercially available. SPE has also been used for determining food additives [9,10]. Preservatives are retained on a quaternary ammonium sorbent cartridge [9] or a Sep-Pak RP-C<sub>18</sub> cartridge [10,17] in a preparation step of the overall analytical process in HPLC. However, off-line SPE involve conditioning and flushing the cartridge, and eluting the analytes by hand [9,10,17]; on the other hand, it allows the simultaneous use of several cartridges. On-line SPE is also used as a precolumn concentration technique, usually coupled with HPLC but rarely with GC [16]. No reference to the use of continuous SPE for determining preservatives by GC appears to exist. The aim of this work was to develop a continuous SPE system for the GC determination of food preservatives. Liquid foods, in a nitric acid medium containing an internal standard, are directly loaded, in a volume-based injection mode, onto the sorbent column for simultaneous enrichment and matrix removal. Solid samples required some pretreatment before the residue is dissolved in 0.1 mol l<sup>-1</sup> HNO<sub>3</sub>. The optimum operating conditions for the proposed method are critically discussed with special emphasis on sensitivity, selectivity and simplicity. The method uses straightforward instruments (FID), requires no derivatization, and is simple and fast to implement.

## 2. EXPERIMENTAL SECTION

### 2.1. Standards and reagents

Preservatives [benzoic acid, sorbic acid, methyl *p*-hydroxybenzoic acid (M-PHBA), ethyl *p*-hydroxybenzoic acid (E-PHBA) and propyl *p*-hydroxybenzoic acid (P-PHBA)] were supplied by Sigma (Madrid, Spain). 2-*tert*-Butyl-4-methylphenol (internal standard) was purchased from Aldrich (Madrid, Spain). Potassium perchlorate and anhydrous sodium sulfate were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Ethanol, ethyl acetate, acetone, *n*-hexane, ethyl ether and other organic solvents were obtained in HPLC grade from Scharlau (Barcelona, Spain). All sample dilutions were made with deionized water of 18 M $\Omega$  cm<sup>-1</sup> resistivity obtained from a Milli-Q water purification system. Polygosyl-bonded silica reversed-phase sorbent with octadecyl functional groups (RP-C<sub>18</sub>), 40 – 63  $\mu$ m and 20 – 60 mesh; XAD-2 and XAD-7 polymeric sorbents; and polymeric styrene-divinylbenzene sorbent (LiChrolut<sup>®</sup>-EN) were supplied from Sigma and Merck, respectively.

Standard stock solutions containing each preservative and the internal standard, at a 10 mg ml<sup>-1</sup> concentration, in ethanol were prepared and stored in glass-stopped bottles at 4°C. The optimum GC conditions were established by using a mixture of 50 mg l<sup>-1</sup> of each additive and the internal standard in ethanol. Standard working-strength solutions of variable concentration were prepared daily by appropriate dilution of aliquots of the stock in 0.1 mol l<sup>-1</sup> HNO<sub>3</sub>.

## 2.2. GC and flow system components

A Hewlett–Packard 5890 A gas chromatograph equipped with FID was used. Two chromatographic fused–silica columns (15 mm x 0.53 mm i.d.) of different polarities were used, one packed with 5% diphenyl–95% dimethylsiloxane, 3  $\mu\text{m}$  film thickness (HP–5), and the other with 50% diphenyl–50% dimethylsiloxane, 1  $\mu\text{m}$  film thickness (HP–50). The oven column temperature was raised from 70°C (2 min) to 150°C at 8°C min<sup>-1</sup>, and then to 160°C at 6°C min<sup>-1</sup>. The injector and detector temperatures were kept at 250°C. Nitrogen was used as carrier gas, at a flow–rate of 14.7 ml min<sup>-1</sup>. Peak areas were measured by using a Hewlett–Packard 3392 A integrator.

A Gilson Minipuls–2 peristaltic pump (France) and two Rheodyne 5041 six–way injection valves were used throughout. Poly(vinyl chloride) and Solvaflex pumping tubes for aqueous and organic solutions, respectively, and poly(tetrafluoroethylene) (PTFE) tubing of 0.5 mm i.d. for coils, were also used. Laboratory–made adsorption columns packed with different sorbents were constructed from PTFE capillaries of 3 mm i.d. and their ends capped by fitting 30 mm x 0.5 mm i.d. PTFE tubing into a 10 mm x 1 mm i.d. PTFE tube, which facilitated insertion into the continuous system. Columns were hand–packed with different amounts of sorbent and sealed at both ends with small plugs of cotton wool to prevent material losses. Initially, the columns were conditioned with 2 ml 0.1 mol l<sup>-1</sup> HNO<sub>3</sub> at a flow–rate of 2 ml min<sup>-1</sup>. To avoid memory effects, the columns were flushed with acetone between samples.

### 2.3. *Sample pretreatment*

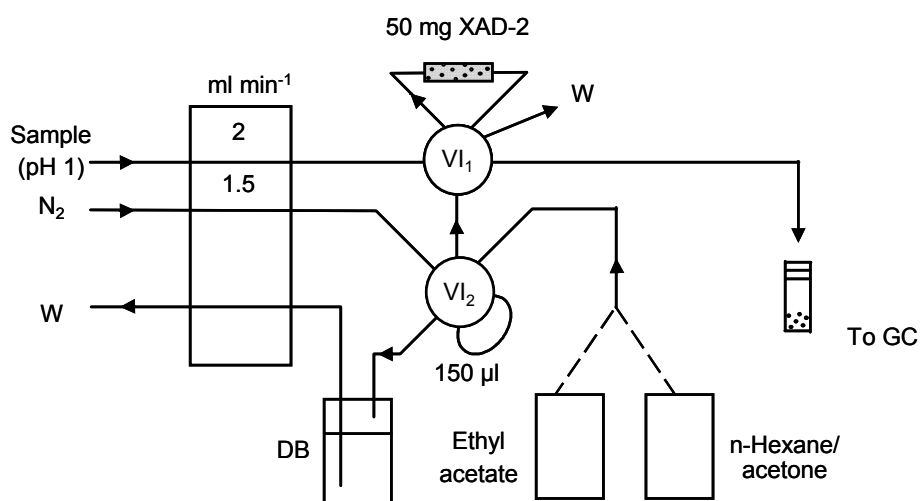
Soft drinks were degassed in an ultrasonic bath. An accurately weighed amount of ca. 1 g was spiked with 0.25 mg of internal standard (2-tert-butyl-4-methylphenol) and diluted in 25 ml of 0.1 mol l<sup>-1</sup> HNO<sub>3</sub>. A 5 ml aliquot of the diluted sample was directly inserted into the continuous-flow system.

The other samples (skim yogurts, jams and sauces) were homogenized by magnetic stirring. Portions of 0.5 to 1 g, and 0.25 mg of the internal standard, were placed in a separatory funnel and mixed with 25 ml of 1 mol l<sup>-1</sup> HCl and 2 ml of saturated potassium perchlorate. The aqueous phase was extracted twice with 10 ml of ethyl ether, for 5 mm, the efficiency of the first and second extraction being 80 and 20%, respectively [14]. The collected ethyl ether phase was pooled (20 ml) and evaporated to dryness; the residue was dissolved in 25 ml of 0.1 mol l<sup>-1</sup> HNO<sub>3</sub> and a 5 ml aliquot was introduced into the SPE system as described below.

### 2.4. *Procedure*

The continuous-flow system used to isolate and preconcentrate the food preservatives is depicted in Fig. 1. In the preconcentration step, 5 ml of the treated sample or 5 ml of a standard solution containing between 0.2 and 25 µg ml<sup>-1</sup> of additives plus 10 µg ml<sup>-1</sup> of internal standard, at pH 1, was continuously pumped into the system at 2 ml min<sup>-1</sup>. The analytes were adsorbed on the XAD-2 column placed in the loop of the injection valve (IV<sub>1</sub>) and the effluent was sent to waste.

Then, the column were flushed with 150  $\mu\text{l}$  of n-hexane (from IV<sub>2</sub>), carried out by N<sub>2</sub> in order to remove residual aqueous phase from the column and connections. Simultaneously, the loop of IV<sub>2</sub> was filled with eluent (ethyl acetate) by aspiration from a displacement bottle (DB). As was switched, 150  $\mu\text{l}$  of ethyl acetate was injected into the N<sub>2</sub> stream at 1.5 ml min<sup>-1</sup> and passed through the column to elute preservatives and the internal standard. The eluate was collected in glass vials containing anhydrous sodium sulfate, and a 2  $\mu\text{l}$  aliquot was manually injected into the chromatograph. Between samples, the column was flushed with acetone (three times, with 150  $\mu\text{l}$  volumes from IV<sub>2</sub>). Finally, the column was conditioned with 2 ml of 0.1 mol l<sup>-1</sup> HNO<sub>3</sub>.



**Fig. 1.** Flow system for the preconcentration/isolation of preservatives from foods. IV = injection valve; W = waste; DB = displacement bottle; GC = gas chromatograph with FID.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1. Development of the SPE system

An SPE system was assembled in order to obtain highly sensitive, accurate and reproducible results, with minimal sample handling and maximal throughput. Commonly used sorbents differ in their capacity to adsorb polar or nonpolar organic compounds. Thus, Amberlite XAD resin is typical material for polar aromatic compounds, while RP-C<sub>18</sub> bonded silica is more suitable for nonpolar ones. In addition to the sorbent properties, the SPE of preservatives is critically influenced by pH in the adsorption step. Because the proposed method was intended for use with food samples (with high moisture contents), standards were dissolved in water. The sample pH should be such that it ensures maximal retention of the analytes and minimal retention of interferents on the column. The effect of this variable was studied by using four columns packed with 50 mg of RP-C<sub>18</sub>, XAD-2, XAD-7, or LiChrolut<sup>®</sup>-EN at pH 2.5, 4 and 7. A manifold similar to that depicted in Fig. 1 was used; the eluent was 5 ml of ethanol and 2  $\mu$ l aliquots were injected into the chromatograph. Volumes of 5 ml of standard solutions containing 25 mg l<sup>-1</sup> of the five additives were passed through each sorbent column. The results are listed in Table 1. If ethanol is assumed to effect quantitative elution, the conclusions can be drawn: first, pH has more marked effects on sorbic acid and benzoic acid than on the esters (the highest adsorption efficiency is obtained at a low pH); second, RP-C<sub>18</sub> is the poorest adsorbent, particularly for more polar compounds; and third, the adsorption efficiency is similar for LiChrolut<sup>®</sup>-EN and XAD-2, but slightly better for the latter. XAD-2 and

---

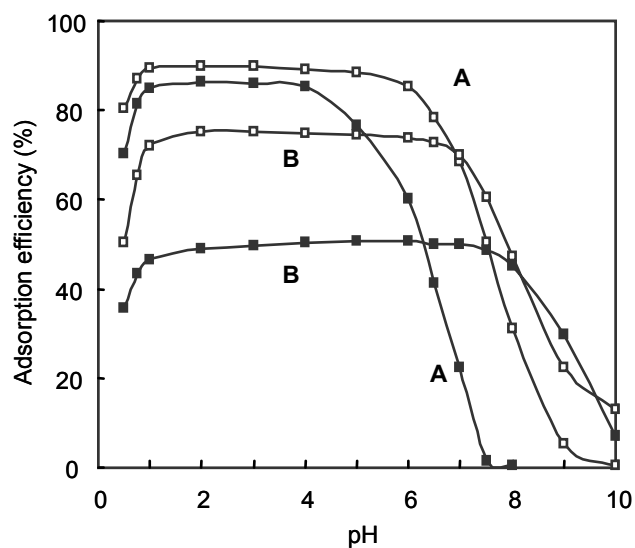
LiChrolut<sup>®</sup>-EN, two hydrophobic styrene-divinylbenzene polymers, exhibited the highest efficiency for the preservatives, so both were initially selected for use. A more exhaustive study of the sample pH was made over the range 0.5 – 10 by adjusting the standard solution with diluted HNO<sub>3</sub> or NaOH. After elution, the column was conditioned with 2 ml of aqueous solution at the same sample pH. The results obtained with the two columns are shown in Fig. 2. The adsorption efficiency of the XAD-2 column for sorbic acid and benzoic acid remained constant over the pH range 1 to 5, which was wider for p-hydroxybenzoic acid esters by virtue of their lower polarity. The adsorption efficiency of the LiChrolut<sup>®</sup>-EN column was lower for all the preservatives, particularly esters. In order to remove aromatic amines and related compounds, which are ionized and hence not retained on the resin at a low pH, a sample pH of 1 was chosen that was also adopted for the conditioning cycle. In subsequent experiments, standard solutions and samples were prepared in 0.1 mol l<sup>-1</sup> HNO<sub>3</sub>. The optimum amount of XAD-2 sorbent was determined; adsorption peaked above 45 mg, so 50 mg selected as optimal. The influence of the sample flow-rate was studied by inserting a standard solution containing 25 mg l<sup>-1</sup> of each antimicrobial additive in 0.1 mol l<sup>-1</sup> HNO<sub>3</sub>. Retained analytes were eluted with 5 ml of ethanol after the column was dried with a N<sub>2</sub> stream. The flow-rate of the sample (5 ml) was varied between 1 and 4 ml min<sup>-1</sup>; changes over the range 1 – 2.5 ml min<sup>-1</sup> were very small; bigger flow-rates decreased the analytical signal through decreased residence times in the sorbent column. A flow-rate of 2 ml min<sup>-1</sup> was selected as optimal to retain the preservatives.



**Table 1.** Percent adsorption of preservatives on various sorbent columns (50 mg) at pH 2.5, 4 y 7.

Preservative	RP-C <sub>18</sub>			XAD-2			XAD-7 <sup>a</sup>			LiChrolut <sup>®</sup> -EN		
	2.5	4	7	2.5	4	7	2.5	4	7	2.5	4	7
Sorbic acid	<10	<10	<10	90	90	70	20	20	15	85	85	20
Benzoic acid	<10	<10	<10	90	85	55	20	20	10	75	60	35
M-PHBA	<10	<10	<10	70	65	50	30	25	20	70	70	65
E-PHBA	25	25	25	70	70	60	30	30	30	60	60	60
P-PHBA	50	50	50	75	75	70	30	30	30	50	50	50

<sup>a</sup>, XAD-7 was previously dried at 80°C.



**Fig. 2.** Effect of pH on the adsorption of two representative preservatives on XAD-2 (□) and LiChrolut<sup>®</sup>-EN (■) sorbent columns. (A) Sorbic acid and (B) propyl p-hydroxybenzoic acid (P-PHBA).

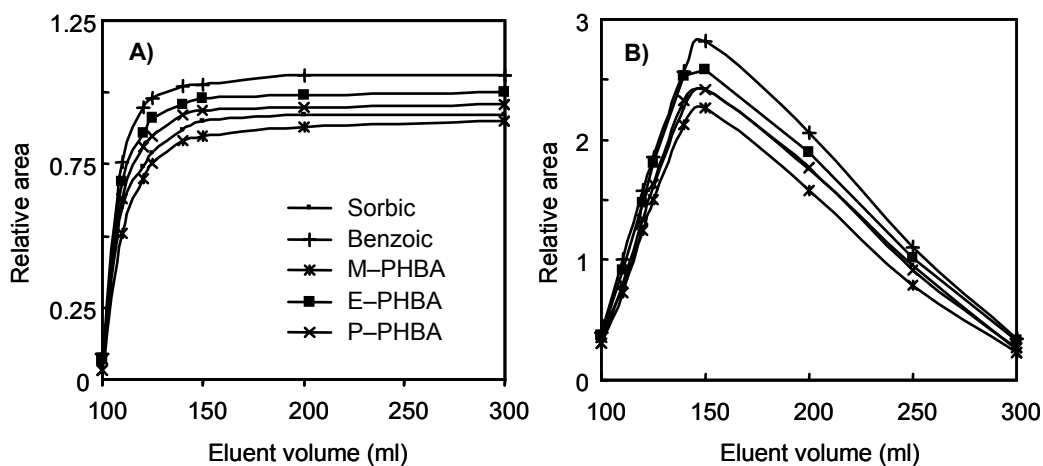
Because the sample was introduced in aqueous medium, the column and flow connectors should be dried in order to remove residual water before elution. Initially, the column was dried with N<sub>2</sub> for 10 min, but some aqueous phase was found to still remain in the system. We thus assayed alternative solvents (n-

hexane, cyclohexane and acetonitrile) for this purpose. n-Hexane was chosen because although it is immiscible with water, it helps remove it while leaving retained analytes untouched. Therefore 150  $\mu\text{l}$  of n-hexane, carried by a  $\text{N}_2$  stream, was used to flush and dry the column.

Several eluents of variable polarity were tested, namely: ethyl acetate, ethanol, methanol, 2-propanol and petroleum ether. Elution was optimized by using a standard solution containing 25  $\text{mg l}^{-1}$  in 0.1  $\text{mol l}^{-1}$   $\text{HNO}_3$  that was passed through the column at 2  $\text{ml min}^{-1}$  for 2.5 min (sample volume, 5 ml); retained preservatives were eluted with 5 ml of each solvent and then analyzed in the chromatograph. Ethyl acetate was found to be the best eluent; the analytical signals were 1.2- or 1.7-times higher than those obtained with ethanol and 2-propanol, or methanol, respectively. The elution efficiency of petroleum ether was lower than 3%. The effect of the eluent volume was studied between 100 and 300  $\mu\text{l}$  by using loops of variable length in the injection valve ( $\text{IV}_2$  in Fig. 1). Obviously, as the eluent volume was increased, desorption was more efficient (but analytes were also more dilute). Because of these two opposing effects, the only way to correctly determine the most appropriate eluent volume was to dilute extracts to a constant volume with the same solvent. Thus, the column effluent (between 100 and 300  $\mu\text{l}$  of ethyl acetate) was always diluted to 500  $\mu\text{l}$  with ethyl acetate (Fig. 3A). The desorption efficiency increased with increasing injected volume up to 150  $\mu\text{l}$  and remained constant above this value. Unless the final extract was made to a constant final volume, the desorption efficiency decreased above 150  $\mu\text{l}$  through

increased dilution of desorbed analytes (see Fig. 3B). An injected volume of 150  $\mu\text{l}$  of ethyl acetate was selected as optimal. A second injection with the same eluent volume revealed the absence of carry-over; thus, complete elution of analytes was obtained with one injection of 150  $\mu\text{l}$  of ethyl acetate. The influence of the flow-rate of the  $\text{N}_2$  stream (the carrier of the eluent volume) was examined between 0.5 and 2  $\text{ml min}^{-1}$ . No effect on preservative recoveries was observed, so 1.5  $\text{ml min}^{-1}$  was selected for further experiments.

Several solvents were assayed to flush the sorbent column following elution and acetone was selected. It was introduced via the loop of  $\text{IV}_2$ , carried by  $\text{N}_2$ ; three sequential injections of 150  $\mu\text{l}$  sufficed to remove unwanted substances and/or avoid memory effects.



**Fig. 3.** Variation of the relative (analyte/internal standard) area with the eluent volume. (A) Dilution of extracts to a final ethyl acetate volume of 500  $\mu\text{l}$ . (B) Undiluted extracts. Sample: a standard solution containing 5  $\text{mg l}^{-1}$  of each additive in 0.1  $\text{mol l}^{-1}$   $\text{HNO}_3$ .

### 3.2. GC behavior

Preservatives are normally determined by GC after derivatization to trimethylsilyl esters [13,15], which entails heating at 60 – 80°C for 15 – 30 min. In this work, we assayed direct injection into a GC of 50 mg l<sup>-1</sup> of benzoic acid, sorbic acid, M-PHBA, E-PHBA and P-PHBA in ethanol, and found no tailing in the chromatographic peaks obtained. Therefore, for simplicity, the analytes were determined underivatized. Benzoic acid and sorbic acid are weakly acidic compounds of higher polarity than p-hydroxybenzoic acid esters. Therefore, their retention on the chromatographic column can be affected by the composition and polarity of the stationary phase. Two chromatographic columns of different polarity were assayed in order to select the better chromatogram, where peaks could be sensitively and selectively, detected without no interference.

A sample volume of 5 ml at pH 1 and the SPE manifold of Fig. 1 were adopted. 2-tert-Butyl-4-methylphenol was used as internal standard because it was found to be compatible with the flow system (ca. 60% adsorption and 100% elution efficiency) and the chromatographic behavior of the analytes. The sensitivity (slope of the calibration graphs) and the linear ranges achieved with both chromatographic columns are shown in Table 2. Correlation coefficients ranged from 0.996 to 0.999. Limits of detection, defined as the minimum concentrations providing a chromatographic signal three times higher than background noise (at the prevailing retention times), are also listed in Table 2. Within-day precision (repeatability), expressed as relative standard deviation, was calculated for 11 standard solutions containing 10 mg l<sup>-1</sup> of each additive and the

---

internal standard, and found to range from 2.5 to 4%. A comparison of the results provided by the two columns (Table 2) allows one to conclude the following: (a) the sensitivity is higher for the HP-50 column (the more polar) than for the HP-5 one; (b) the detection limit is lowest for sorbic acid and benzoic acid with the HP-50 column; and (c) the precision is similar in all instances. Finally, as can be shown in Fig. 4, similar retention times were obtained for both columns, and no tailing peaks. From the foregoing it follows that the HP-50 column is the better choice.

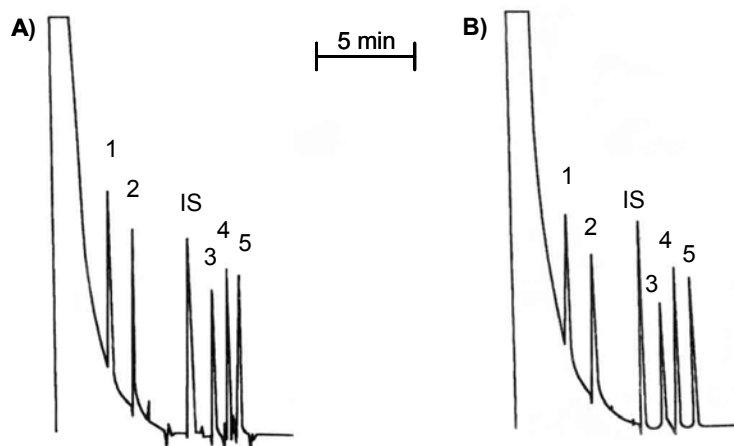
**Table 2.** Analytical figures of merit of the proposed SPE method.

Preservative	Sensibility <sup>c</sup>	Linearity interval (mg l <sup>-1</sup> )	LD (mg l <sup>-1</sup> )	RSD (%)
Sorbic acid <sup>a</sup>	8.4 10 <sup>-2</sup>	0.3 – 25	0.10	3.8
Sorbic acid <sup>b</sup>	7.1 10 <sup>-2</sup>	0.5 – 25	0.20	4.0
Benzoic acid <sup>a</sup>	9.4 10 <sup>-2</sup>	0.2 – 25	0.07	2.9
Benzoic acid <sup>b</sup>	7.5 10 <sup>-2</sup>	0.4 – 25	0.15	3.0
M-PHBA <sup>a</sup>	7.1 10 <sup>-2</sup>	0.5 – 25	0.20	2.8
M-PHBA <sup>b</sup>	6.7 10 <sup>-2</sup>	0.5 – 25	0.20	2.7
E-PHBA <sup>a</sup>	7.6 10 <sup>-2</sup>	0.4 – 25	0.15	2.7
E-PHBA <sup>b</sup>	7.3 10 <sup>-2</sup>	0.4 – 25	0.15	2.6
P-PHBA <sup>a</sup>	7.5 10 <sup>-2</sup>	0.4 – 25	0.15	2.5
P-PHBA <sup>b</sup>	7.1 10 <sup>-2</sup>	0.5 – 25	0.20	2.5

<sup>a</sup>, with an HP-50.

<sup>b</sup>, with an HP-5 chromatographic column.

<sup>c</sup>, (analyte/internal standard peak area ratio)/(mg l<sup>-1</sup>).



**Fig. 4.** Gas chromatograms for preservatives ( $10 \text{ mg l}^{-1}$ ) after on-line enrichment of a 5 ml sample volume, using an HP-50 (A) and an HP-5 (B) chromatographic column. Peaks: 1 = sorbic acid; 2 = benzoic acid; 3 = M-PHBA; 4 = E-PHBA; 5 = P-PHBA; IS = internal standard.

### 3.3. Determination of sorbic and benzoic acid, and *p*-hydroxybenzoic acid esters in foods

The sample pretreatment prior to GC analysis in the determination of preservatives in foods involves liquid-liquid extraction, anion-exchange clean-up, precipitation of proteins etc. The AOAC method [13] is laborious and time-consuming, so it was discarded. We chose the most simple reported sample pretreatment for complex matrices [14], albeit slightly modified as described in Section 2.3. Soft drinks only required degassing of the sample.

The proposed method was applied to the determination of preservatives in soft drinks, jams, and low-fat yogurts and sauces (to avoid the need to previously remove the fat). Following pretreatment (see Section 2.3), the aqueous solution

was introduced into the SPE system and analyzed by GC–FID. The results are given in Table 3; the average concentrations were calculated from five individual amounts of each sample and determinations were done in triplicate in the SPE manifold (n=15).

**Table 3.** Determination of sorbic and benzoic acid in foods (mg kg<sup>-1</sup> food).

Food	Sorbic acid	Benzoic acid
<b>Soft drinks</b>		
Cola	–	130 ± 5
Orange 1	–	120 ± 4
Orange 2	170 ± 7	–
Lemon 1	–	140 ± 5
Lemon 2	190 ± 8	–
Apple	–	145 ± 5
<b>Skim Yogurts</b>		
Strawberry	280 ± 10	–
Apple–plum–cereals	265 ± 10	–
Lime–lemon	250 ± 10	–
Tropical fruits	175 ± 8	–
Forest fruits	270 ± 10	–
<b>Ketchups</b>		
Hot	280 ± 15	255 ± 20
Plain	170 ± 7	485 ± 20
<b>Jams</b>		
Strawberry	–	215 ± 10
Peach	255 ± 15	–
Plum	225 ± 10	190 ± 8

The preservatives contained in each food (sorbic and benzoic acid) were stated on the labels, but their amounts were not. Only plum jam and the ketchups

were found to contain both additives. All the results were below allowed levels in the European Union (EU), both for individual and for mixed additives [3]. EU regulations prohibit the use of p-hydroxybenzoic acid esters in the foods studied, so they could obviously not be detected.

Because only two additives were detected, the potential of the proposed method for determining all five studied was assessed by spiking the foods before treatment with 200 mg kg<sup>-1</sup> of the three p-hydroxybenzoic acid esters studied and analyzing them in quintuplicate. The recoveries thus obtained ranged from 92 to 103%.

#### **4. CONCLUSIONS**

The proposed flow injection on-line SPE method affords high sensitivity and selectivity in preservative determinations and is free of interferences from other concomitants or the solvent peak. It delivers results within 5 min after sample preconcentration/elution, so throughput is limited only by the chromatographic conditions (sample preparation time excluded). The limits of detection achieved are similar to or better than those of the existing standard method, even with liquid extraction. Also, the use of large amounts of expensive and environmentally hazardous organic solvents and derivatizing reagents is avoided. Complex matrices (dairy products, sauces etc) entail converting the sample into an aqueous solution at pH 1 (the lowest of all reported so far). The proposed method can be used by control laboratories to identify and quantify the five preservatives studied in a wide variety of foods.



## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors are grateful to Spain's Dirección General de Investigación Científica y Técnica (Project No. PB95–0977) for financial support.

## REFERENCES

- [1] T. E. Furia (Ed.), *CRC Handbook of Food Additives*, Volume 1, 2<sup>nd</sup> edn. CRC Press, Boca Raton, PL, 1981.
- [2] G. W. Gould, *Mechanisms of Action of Food Preservation Procedures*, Elsevier Applied Science, London, 1989.
- [3] Diario Oficial de las Comunidades Europeas, No. L.61, 18.3.95, pp. 16–19.
- [4] C. Campos, L. N. Gerschenson, S. M. Alzamora, J. Chirife, *J. Food Sci.* 56 (1991) 863.
- [5] F. García–Sánchez, A. Navas–Díaz, L. Sánchez–Feria, *Anal. Lett.* 27 (1994) 2171.
- [6] S. H. Khan, M. P. Murawski, J. Sherma, *J. Liq. Chromatogr.* 17 (1994) 855.
- [7] M. C. Smith, J. Sherma, *J. Planar Chromatogr. TLC* 8 (1995) 103.
- [8] J. T. Hann, I. S. Gilkison, *J. Chromatogr.* 395 (1987) 317.
- [9] M. Moors, C. R. R. R. Teixeira, M. Jimidar, D. L. Massart, *Anal. Chim. Acta* 255 (1991) 177.
- [10] B. H. Chen, S. C. Fu, *Chromatographia* 41(1995) 43.
- [11] F. Olea–Serrano, I. Sánchez–López, G. Noguera–Revilla, *J. Liq. Chromatogr.* 14 (1991) 709.
- [12] H. Klein, R. Leubolt, *J. Chromatogr. A* 640 (1993) 259.
- [13] K. Helrich (Ed.), *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, 15<sup>th</sup> edn. Association of Official Analytical Chemists (AOAC), Arlington, VA, 1990, pp. 1143–1144.
- [14] M. Kakemoto, *J. Chromatogr.* 594 (1992) 253.

- [15] C. De-Luca, S. Passi, E. Quattrucci, *Food Addit. Contam.* 12 (1995) 1.
- [16] L. A. Berrueta, B. Gallo, F. Vicente, *Chromatographia* 40 (1995) 474.
- [17] H. S. Lee, R. L. Rouseff, J. F. Fisher, *J. Food Sci.* 51(1986) 568.





Short communication

Gas chromatographic flow method for the preconcentration  
and simultaneous determination of antioxidant and  
preservative additives in fatty foods

M. González, M. Gallego and M. Valcárcel\*

*Analytical Chemistry Division, Faculty of Sciences, University of Córdoba, E-14004 Córdoba, Spain*

Received 7 December 1998; received in revised form 15 March 1999; accepted 19 March 1999

**Abstract**

A partially automated gas chromatographic method for the simultaneous determination of antioxidants (BHA, BHT, TBHQ,  $\alpha$ -tocopherol and  $\alpha$ -tocopheryl acetate) and preservatives (sorbic acid, benzoic acid and their esters) in fatty foods without derivatization is reported. About 95% of triglycerides from lipid material are avoided by manually extracting the samples with a mixture of solvents and the remaining by using a continuous solid-phase extraction system. By using aqueous sample solutions (in  $0.1 \text{ mol l}^{-1} \text{ HNO}_3$ ), XAD-2 sorbent and selective elution with  $200 \mu\text{l}$  of 2-propanol, only ca. 0.03% of total triglycerides present in the original sample remains in the final extract. Manual injection of the extract into a GC-flame ionization detection allows the additives to be determined at concentrations in the range  $0.5 - 100 \mu\text{g ml}^{-1}$  with a high precision (ca. 3%). Mass spectrometry in the conventional electron impact mode, in conjunction with library search, permits the unequivocal identification of all the additives. Margarine, oil, cheese, pâté and sauce samples were analyzed in this way, all with good results.

*Keywords:* Food analysis; Antioxidants and preservatives; On-line solid phase extraction; Gas chromatography

## 1. INTRODUCTION

Food antioxidants are used to prevent deterioration, rancidity or discoloration through oxidation. Preservatives are also very often added to foods to slow down or inhibit microbial growth [1]. The use of these additives is subject to regulations that establish permitted compounds and their concentration limits [2]. There is a growing need for analytical control of these compounds by checking for the absence of additives banned by the European Union (e.g. TBHQ) and determining those permitted by its regulations. Natural antioxidants are simultaneously determined by HPLC [3,4] and GC [5] and capillary electrophoresis [6]; synthetic antioxidants in dehydrated soups and chewing-gum have been determined by differential-pulse voltammetry [7] and GC-MS [8], respectively. Preservatives in beverages and jams can be determined with minimal sample manipulation by TLC [9], HPLC [10] and GC-MS [11]; more recently, capillary electrophoresis was used in the presence of cyclodextrins for the separation of nine preservatives [12]. Most of these methods only allow food preservatives or antioxidants to be determined; an additional, simultaneous determination, however, is usually required to determine the total quality and shelf-life of the food product concerned. Simultaneous determinations of preservatives and antioxidants are usually done by HPLC [10,13], but not by GC.

Over the last ten years, solid-phase extraction (SPE) has been increasingly used for preparation purposes in the preconcentration/isolation of antioxidants and preservatives in foods [10]. The advantages and disadvantages of automatic system/manual SPE combinations were discussed [14]. Recently,

our group developed on-line SPE methods for the determination of antioxidants [15] and preservatives [16] in foods by GC with flame ionization detection (FID).

In this work, we assessed the potential of continuous solid phase extraction, for reducing human intervention in the isolation of ten additives from complex matrices containing large amounts of lipids prior to manual injection into a GC-FID or GC-MS instrument. For this purpose, the influence of triglycerides on the proposed flow system was investigated. The proposed mass spectrometric method allows confirmation of all additives assayed but provides low sensitivity. Therefore, additives are quantified by FID, which is highly sensitive, inexpensive and available in many laboratories.

## **2. EXPERIMENTAL**

### *2.1. Chemicals and standards*

Antioxidants [tert-butyl-4-hydroxyanisole (BHA), 2,6-di-tert-butyl-p-hydroxytoluene (BHT),  $\alpha$ -tocopherol ( $\alpha$ -T),  $\alpha$ -tocopheryl acetate ( $\alpha$ -TA)], preservatives [benzoic acid, sorbic acid, methyl p-hydroxybenzoic acid (M-PHBA), ethyl p-hydroxybenzoic acid (E-PHBA) and propyl p-hydroxybenzoic acid (P-PHBA)] and 5- $\alpha$ -cholestane (internal standard) were all supplied by Sigma (Madrid, Spain). Tert-butylhydroquinone (TBHQ) and 2-tert-butyl-4-methylphenol (internal standard) were purchased from Aldrich (Madrid, Spain). Organic solvents were obtained in HPLC grade from Scharlau (Barcelona, Spain). All sample dilutions were made in ultrapure (Milli-Q) water. XAD-2 and

LiChrolut<sup>®</sup>-EN (polymeric styrene-divinylbenzene) sorbents, 50 – 100 µm, were supplied by Sigma and Merck (Darmstadt, Germany), respectively.

Additives were identified by using 10 mg ml<sup>-1</sup> standard solutions in ethanol for preservatives (benzoic acid, sorbic acid, M-PHBA, E-PHBA, P-PHBA) and phenol antioxidants (BHA, BHT, TBHQ), and in n-hexane for tocopherols; all were stored in glass-stoppered bottles at 4°C. The optimal conditions for GC were established by using a mixture of 50 µg ml<sup>-1</sup> of each additive and both internal standards in ethanol. Standard working-strength solutions of variable concentration were prepared daily by dilution of appropriate volumes of the stock solutions in 0.1 mol l<sup>-1</sup> nitric acid.

## 2.2. Equipment

Analyses were carried out on a Fisons gas chromatograph (8000 series-8035) equipped with a FID and a fused-silica capillary column, 30 m x 0.32 mm i.d. (coated with a 1 µm thick film of 5% diphenyl-95% dimethylpolysiloxane, HP-5) from Hewlett-Packard (Seville, Spain). The chromatographic conditions were as follows: an initial temperature 125°C (2 min), followed by a gradient of 10°C min<sup>-1</sup> to 315°C, which was held for 2 min. The injector and flame ionization detector temperature were 250°C and 310°C, respectively. Helium (6.0 grade; Air Liquide, Seville, Spain) was used as the carrier gas, at a flow-rate of 1 ml min<sup>-1</sup>. In order to confirm the identity of eluted GC peaks, the gas chromatograph was coupled to a Fisons-800 mass spectrometer (MS). The transfer line and source temperatures were 250 and 200°C, respectively; the ionization energy was 70 eV.



Mass spectra were recorded from  $m/z$  50 to 500 in the electron impact mode. Samples (1  $\mu$ l) were injected in the split mode (1:10 ratio).

The flow-system was constructed as described elsewhere [16]. Laboratory-made adsorption columns were constructed from PTFE capillaries of 3 mm i.d.. Columns were hand-packed with different amounts of sorbent and sealed at both ends with small plugs of cotton wool to prevent material losses. Initially, the columns were conditioned with 1.5 ml 0.1 mol  $l^{-1}$  nitric acid at a flow-rate of 1.5 ml  $min^{-1}$ . To avoid memory effects, the columns were flushed with acetone between successive samples.

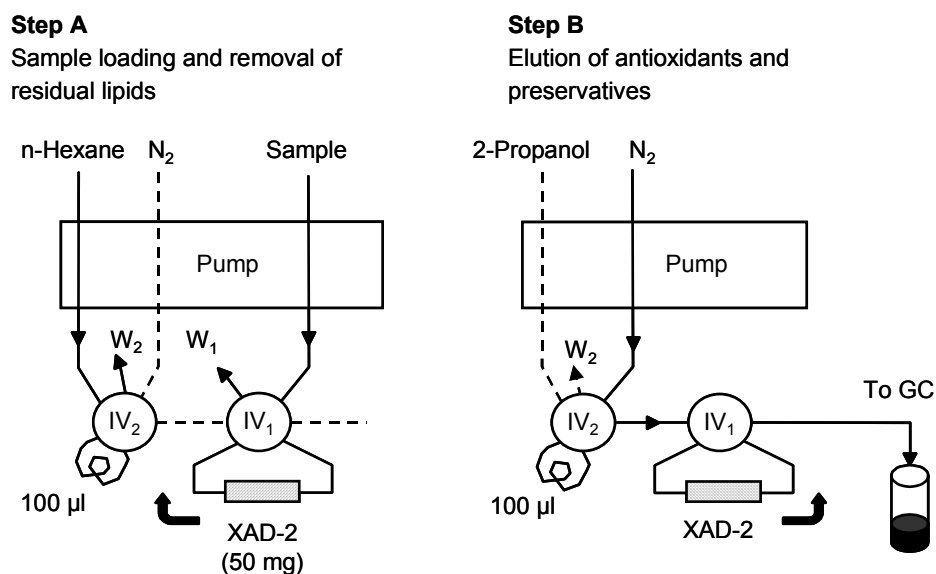
### 2.3. *Sample pretreatment*

An amount of 0.75 – 2.5 g of fatty sample (margarine, oil, fresh cheese, mayonnaise or pâté) was mixed with 2 ml of saturated *n*-hexane (in acetonitrile) containing 0.625 mg of both internal standards (2-*tert*-butyl-4-methylphenol and 5- $\alpha$ -cholestane). The suspension of the sample was then extracted with 10 ml of the saturated acetonitrile (in *n*-hexane):2-propanol:ethanol (2:1:1), with gentle shaking for 5 min. The *n*-hexane phase was discarded and the other frozen at  $-18^{\circ}C$  for 1 h [17] and then filtered. This procedure removed at least 95% of triglyceride in the food sample. The filtrate was placed on a flash evaporator furnished with a water bath at  $\leq 40^{\circ}C$  and concentrated to ca. 0.5 ml within 5 min (rapid evaporation reduced TBHQ losses). Finally the residue was dissolved in 25

ml of  $0.1 \text{ mol l}^{-1} \text{ HNO}_3$  and a 5 ml aliquot was introduced into the SPE system; this afforded 3 – 4 replicated per sample.

#### 2.4. Solid-phase extraction method

The manifold used for the determination of antioxidants and preservatives in foods is depicted in Fig. 1. Initially, 5 ml of standard solution or treated sample containing additives at various concentrations ( $0.5 - 100 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) plus  $25 \mu\text{g ml}^{-1}$  of both internal standard was passed at  $1.5 \text{ ml min}^{-1}$  through the sorbent column (XAD-2, 50 mg) inside the loop of the injection valve ( $\text{IV}_1$ ). Analytes and ca. 25% of triglyceride remaining in the sample after the pretreatment step were retained in the column and the remaining lipid fraction was sent to waste ( $W_1$ ). A volume of  $100 \mu\text{l}$  of n-hexane (from  $\text{IV}_2$ ), carried by a  $\text{N}_2$  stream, was used to flush residual sample from the column and the flow system connectors (Fig. 1A). Then, the loop of the injection valve ( $\text{IV}_2$ ) was filled with eluent (2-propanol). Finally, two sequential injections of  $100 \mu\text{l}$  of 2-propanol (from  $\text{IV}_2$ ) were carried by the  $\text{N}_2$  stream and passed through the minicolumn (in opposite direction to the sample) to elute adsorbed additives (Fig. 1B). The eluate ( $200 \mu\text{l}$ ) was collected in glass vials containing anhydrous sodium sulfate, and a  $1 \mu\text{l}$  aliquot was manually injected into the gas chromatograph. After each determination, the sorbent column was cleaned with  $300 \mu\text{l}$  of acetone to remove residual triglycerides and other adsorbed organic compounds; finally, the column was conditioned with  $0.1 \text{ mol l}^{-1} \text{ HNO}_3$  at  $1.5 \text{ ml min}^{-1}$  for 1 min.



**Fig. 1.** Scheme of the continuous isolation/preconcentration and elution steps for the determination of antioxidants and preservatives in food samples. IV = injection valve; W = waste; GC = gas chromatograph with FID and MS. Sample and eluent flow-rates, 1.5 ml min<sup>-1</sup>.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1. Optimization of the preconcentration process

In previous work, we developed a flow system for the separation of antioxidants [15] and preservatives [16] in foods by gas chromatography with flame ionization detection. XAD-7 and XAD-2 were found to be the most efficient sorbents for antioxidants and preservatives, respectively. In this work, we initially used the previously optimized system [16] for the determination of preservatives; however, a rigorous study was necessary in order to establish the best conditions for the simultaneous determination of antioxidants and preservatives.

The sorbent and the sample solvent were selected by using 5 ml of standard solutions containing  $40 \mu\text{g ml}^{-1}$  of each additives dissolved in n-hexane, ethanol, methanol, petroleum ether or distilled water (pH 5.5). The eluent was 5 ml of ethanol in all instances. Simultaneously, two columns packed with 50 mg of XAD-2 and LiChrolut<sup>®</sup>-EN (hydrophobic styrene-divinylbenzene sorbents) were separately included in the flow system (see Fig. 1). The sorbent material and sample preparation medium were selected by collecting the ethanol extracts of analytes from the column in glass-vials containing anhydrous sodium sulfate and manually injecting  $1 \mu\text{l}$  aliquots into the chromatograph (equipped with an FID). On the assumption that ethanol provided quantitative elution, the following conclusions can be drawn: both sorbents were similarly efficient for preservatives, but XAD-2 was better for antioxidants (the resulting analytical signals were ca. 1.3 times higher than those obtained with LiChrolut<sup>®</sup>-EN); also, the highest adsorption for all analytes with both sorbents was obtained when the additive standard was dissolved in distilled water. Thus, the adsorption efficiency increased from 4.0% for the poorest solvent (ethanol) to 65% for aqueous solutions. Based on these results, and taking into account that the proposed method was intended for use with food samples (with high moisture contents), standards were dissolved in water; in addition, XAD-2 was selected as sorbent.

The effect of pH on additive adsorption was studied over the range 0.5 – 10 by adjusting standard solutions with dilute  $\text{HNO}_3$  or  $\text{NaOH}$ . The results obtained with the XAD-2 column are shown in Table 1. As can be seen, the optimum range was similar for all additives except natural antioxidants. Thus, the

---

maximum additive adsorption was obtained at pH 1 – 5 for preservatives and synthetic antioxidants (BHA, BHT and TBHQ) and 1 – 3 for tocopherols. The pH was found to have marked effects on sorbic acid, benzoic acid, BHA and TBHQ (adsorption efficiency ca. 90%); by contrast, BHT was the least readily adsorbed of all additives (50%). In order to remove aromatic amines and related compounds, which are ionized and hence not retained on the resin at a low pH, a sample pH of 1 was chosen that was also used in the conditioning cycle. In subsequent experiments, standard solutions and samples were prepared in 0.1 mol l<sup>-1</sup> HNO<sub>3</sub>. Several minicolumns packed with different amounts of solid sorbent (25 – 100 mg of XAD-2) were prepared in order to study its effect on the adsorption of the antioxidants and preservatives. The highest adsorption was obtained above 45 mg, so 50 mg was selected as optimal.

The influence of the sample-flow rate on the signal was examined over the range 0.5 – 3 ml min<sup>-1</sup>, using a total standard solution volume of 5 ml (40 µg ml<sup>-1</sup> in each antioxidant and antimicrobial additives, all in 0.1 mol l<sup>-1</sup> HNO<sub>3</sub>). The signal remained constant over the range 0.5 – 1.7 ml min<sup>-1</sup>; at higher flow-rates, the sorption efficiency decreased slightly as a result of the contact time between the analytes and sorbent decreasing with increasing flow-rate. A sample flow-rate of 1.5 ml min<sup>-1</sup> was thus chosen.

**Table 1.** Percent adsorption of preservatives and antioxidants on an XAD-2 sorbent column at a variable pH.

Additive	pH				
	0.5	1–5	6	7	10
Sorbic acid	80	90	70	60	–
Benzoic acid	85	90	60	55	–
M-PHBA	60	75	65	50	25
BHA	85	90	85	75	30
BHT	45	50	40	35	–
E-PHBA	60	75	70	60	25
TBHQ	85	90	90	80	35
P-PHBA	60	75	70	65	–
$\alpha$ -Tocopherol	70	75 <sup>a</sup>	–	–	–
$\alpha$ -Tocopheryl acetate	70	75 <sup>a</sup>	20	–	–

<sup>a</sup>, pH range 1 – 3.

Because the sample was introduced in an aqueous medium, the column and flow connectors must be dried in order to remove residual water (miscible with the eluent) before elution. Initially, the column was dried with nitrogen for 10 min, but some aqueous phase was found to still remain in the system. We thus assayed alternative solvents (n-hexane, cyclohexane and acetonitrile) for this purpose. n-Hexane was finally chosen because, although immiscible with water, it helps remove it while leaving retained analytes untouched. Therefore, 100  $\mu$ l of n-hexane, carried by an N<sub>2</sub> stream, was used to flush and dry the column.

### 3.2. Optimization of the elution process

Different organic solvents (methanol, ethanol, 2-propanol and ethyl acetate) were assayed for elution of preservatives and antioxidants retained on

the XAD-2 sorbent column. A standard solution (5 ml) containing a  $40 \mu\text{g ml}^{-1}$  concentration of additives plus  $25 \mu\text{g ml}^{-1}$  of both internal standards in  $0.1 \text{ mol l}^{-1}$   $\text{HNO}_3$  was passed through the sorbent at  $1.5 \text{ ml min}^{-1}$ . After retention, the column was flushed with  $100 \mu\text{l}$  of n-hexane (from  $\text{IV}_2$ ), carried by  $\text{N}_2$ . Retained analytes were eluted with 5 ml of each assayed solvent and the effluent from the column was analyzed in the chromatograph. 2-Propanol was found to be the most effective eluent for antioxidants, (the analytical signals were 1.3- or 1.7-times higher than those obtained with ethanol and ethyl acetate, or methanol, respectively). Similar results were obtained with ethyl acetate and 2-propanol for preservatives, so 2-propanol was selected as eluent for all additives.

The effect of the eluent volume was studied between  $100$  and  $400 \mu\text{l}$  by using loops of variable length in the injection valve ( $\text{IV}_2$  in Fig. 1). The column effluent (between  $100$  and  $400 \mu\text{l}$  of 2-propanol) was always diluted to  $600 \mu\text{l}$  with 2-propanol in order to avoid dilution of the analytes as the eluent volume was increased. The desorption efficiency increased with increasing injected volume up to  $200 \mu\text{l}$  of 2-propanol. Because higher injected volumes resulted in dilution of the analytes, an eluent volume of  $200 \mu\text{l}$  was selected as optimal. A second injection with the eluent revealed the absence of carry-over. In order to simplify the flow system, the  $100 \mu\text{l}$  loop used to flush with n-hexane was also employed for the eluent; however, this step involved two sequential injections with  $100 \mu\text{l}$  volumes from  $\text{IV}_2$ , so an overall 2-propanol volume of  $200 \mu\text{l}$  was injected.

The flow-rate of the nitrogen stream (eluent carrier) was varied between 0.5 and 2.0 ml min<sup>-1</sup>. No effect on additive recoveries was observed, so 1.5 ml min<sup>-1</sup> was selected.

### 3.3. Study of triglyceride interferences

The GC determination of antioxidants and antimicrobials in fatty samples entails removing the overwhelming amount of triglycerides (ca. 95% of all lipids) because they may be deposited in the chromatographic column and give rise to spurious results. Two methods, recommended in the literature, were assayed for preliminary separation of triglycerides, using a sunflower-seed margarine as sample test. In the first method, 1 g of margarine was dissolved in 5 ml of saturated n-hexane in acetonitrile and extracted with 10 ml of saturated acetonitrile in n-hexane; the extract was concentrated to ca. 0.5 ml ( $\leq 40^{\circ}\text{C}$ , 5 min) [18]. In the second method, following dissolution of the margarine in n-hexane, the extraction was done with 10 ml of 2:1:1 saturated acetonitrile:2-propanol:ethanol with homogenizing for 5 min. After freezing the extract for 1 h at  $-18^{\circ}\text{C}$ , the mixture was filtered and concentrated [17]. The residues obtained with both methods were dissolved in 25 ml of 0.1 mol l<sup>-1</sup> HNO<sub>3</sub>. The triglyceride removal efficiency of both methods was determined from the initial content in the margarine sample. However, triglycerides cannot be directly determined by GC so they require derivatization in order to increase their volatility. We used the traditional transesterification to fatty acid methyl esters [19] with 5% acetyl chloride in methanol as derivatizing procedure. The derivatization reaction was



manually done by mixing 200  $\mu\text{l}$  of treated margarine in 0.1 mol l<sup>-1</sup> HNO<sub>3</sub>, 200  $\mu\text{l}$  of n-hexane and 200  $\mu\text{l}$  of derivatizing reagent in a glass vial and heating in a thermostated water bath at 60°C for 5 min; once the mixture was cool, 200  $\mu\text{l}$  of water was added in order to obtain a clean n-hexane phase, 1  $\mu\text{l}$  aliquots of which were injected into the chromatograph. The study revealed that ca. 65% and 5% of total triglyceride in the margarine were present in samples treated with the first [18] and second [17] method, respectively. Therefore, the second method, which involves extraction with a mixture of solvents and freezing of the extract, was chosen for the preliminary step of sample preparation.

The adsorption and elution efficiency for triglycerides remaining on the XAD-2 column was studied similarly to those of the additives. A 5 ml aliquot of the residue, dissolved in 0.1 mol l<sup>-1</sup> HNO<sub>3</sub>, was passed through the sorbent column. The sorption efficiency was assessed by comparing the amount of triglyceride present (in derivatized form as in the previous study) in the treated sample before (unadsorbed) and after introduction into the sorbent column. The sorption study revealed that ca. 25% of triglyceride present in the margarine treated solution (which contained only 5% of original triglyceride) was retained on the XAD-2 column and that ca. 75% went to waste. In the elution study, the derivatizing reagent was 5% acetyl chloride in 2-propanol (matched to the eluent employed, 200  $\mu\text{l}$  of 2-propanol); in addition, 200  $\mu\text{l}$  of n-hexane and the derivatizing reagent were added to the effluent. After derivatization, the n-hexane phase was analyzed by GC. Triglycerides were eluted from the sorbent column by ca. 2.5% of the

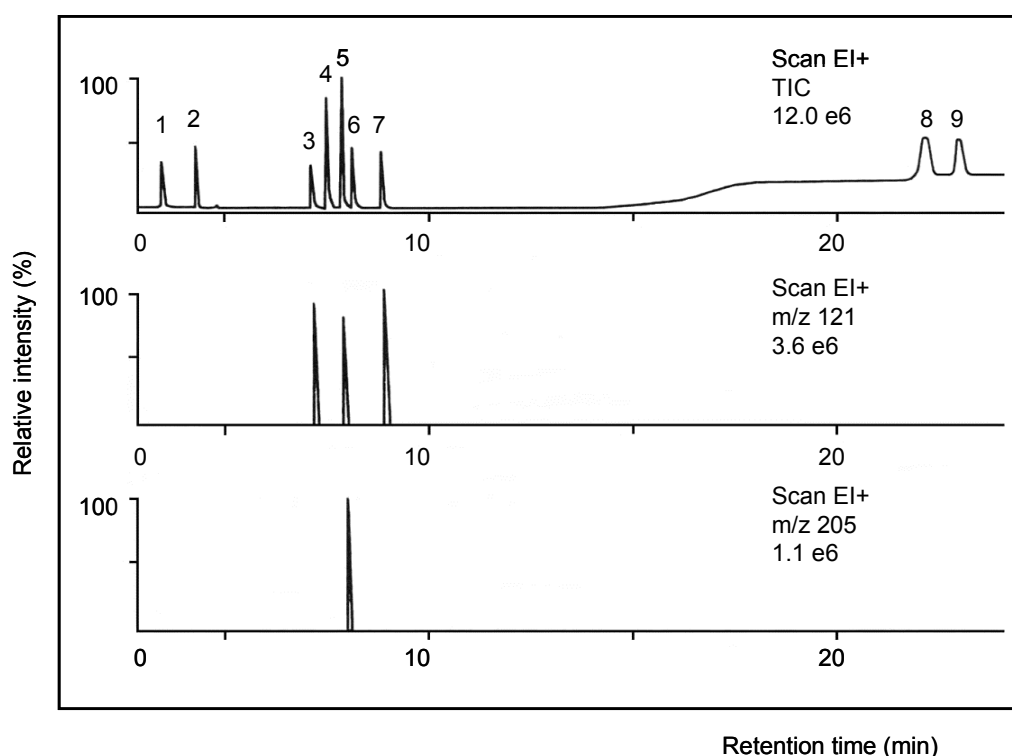
---

adsorbed fraction (viz. ca. 0.03% of triglyceride in margarine samples). In conclusion, the combination of sample pretreatment, which removes 95% of triglyceride, and SPE, which eliminates the remaining triglyceride (ca. 5%), ensures that less than 0.05% of triglyceride present in the fatty sample will remain in the final organic extract, so any interference from this type of compounds will be negligible. In order to extend its service life between samples, the sorbent column was flushed with 300  $\mu$ l of acetone to ensure complete elution of residual triglyceride.

#### 3.4. Gas chromatographic behavior

All the additives studied exhibit good GC properties and can be determined in a direct manner (without derivatization). Only the peaks for two analytes (BHT and E-PHBA) overlapped in the chromatographic separation of the antioxidants and preservatives, which precluded their separation (Fig. 2A). While all the additives can be quantified by conventional FID, their identification must be confirmed by MS. For analyte identification purposes, the following three characteristic ions were monitored for each additive by MS (such peaks always included the strongest in bold, base peak, and that corresponding to the molecular ion,  $M^+$  in italic): m/z values for sorbic acid, 67, **97** and 112; 77, **105** and 122 for benzoic acid; 93, **121** and 152 for M-PHBA; 137, **165** and 180 for BHA; 57, **205** and 220 for BHT; **121**, 137 and 166 for E-PHBA; 123, **151** and 166 for TBHQ; **121**, 138 and 180 for P-PHBA; 165, 205 and **430** for  $\alpha$ -T; and 166, **430** and 472

for  $\alpha$ -TA. As can be seen from Fig. 2, corresponding to a standard solution containing all additives, the two overlapped additives (peak 5) were resolved by using a characteristic ion for each (viz.  $m/z$  205 for BHT and  $m/z$  121 for E-PHBA). For quantitation the strongest peak was employed except to for the compounds: benzoic acid, M-PHBA, BHA and P-PHBA.



**Fig. 2.** Total-ion current chromatograms obtained for a standard solution containing  $250 \mu\text{g ml}^{-1}$  of each additive, without specific monitoring (A) and with selected characteristic ions for E-PHBA (B) and BHT (C). 1 = sorbic acid; 2 = benzoic acid; 3 = M-PHBA; 4 = BHA; 5 = BHT + E-PHBA; 6 = TBHQ; 7 = P-PHBA; 8 =  $\alpha$ -tocopherol and 9 =  $\alpha$ -tocopheryl acetate.

Calibration graphs were obtained by using the SPE system depicted in Fig. 1. A volume of 5 ml of standard solution containing variable concentrations of

additives and two internal standards (2-tert-butyl-4-methylphenol for phenol antioxidants and preservatives, and 5- $\alpha$ -cholestane for tocopherols) in 0.1 mol l<sup>-1</sup> HNO<sub>3</sub> was passed through the sorbent column. Retained analytes were eluted with 200  $\mu$ l of 2-propanol. The sensitivity (slope of the calibration graph), linear range, limit of detection and precision provided by the different detectors are shown in Table 2.

**Table 2.** Analytical figures of merit of the determination of antioxidants and preservatives.

Additive	Sensitivity (10 <sup>3</sup> ) <sup>a</sup>		m/z	Linear range ( $\mu$ g ml <sup>-1</sup> )		LOD ( $\mu$ g ml <sup>-1</sup> )		RSD (%)	
	FID	MS		FID	MS	FID	MS	FID	MS
Sorbic acid	6.0	1.6	97	0.5 – 100	2 – 500	0.20	1.0	3.7	4.0
Benzoic acid	8.7	2.2	105	0.4 – 100	1.5 – 500	0.15	0.8	3.1	3.5
M-PHBA	4.6	1.1	152	0.5 – 100	2 – 500	0.20	1.0	2.8	3.4
BHA	10.0	2.4	180	0.4 – 100	1.5 – 500	0.15	0.8	3.1	3.2
BHT	3.6	0.9	205	0.6 – 100	2.5 – 500	0.25	1.5	2.7	3.8
E-PHBA	4.8	1.2	121	0.4 – 100	1.5 – 500	0.15	1.0	2.6	3.4
TBHQ	5.2	1.3	151	0.5 – 100	2 – 500	0.20	1.0	3.4	4.0
P-PHBA	5.1	1.3	138	0.5 – 100	2 – 500	0.20	1.0	2.5	3.9
$\alpha$ -T	0.8	0.2	430	1 – 100	4 – 500	0.50	2.0	3.6	4.2
$\alpha$ -TA	0.7	0.2	430	1 – 100	4 – 500	0.50	2.0	3.8	4.2

<sup>a</sup>, relative area (analyte/internal standard peak area ratio)/ $\mu$ g ml<sup>-1</sup>.

The limit of detection (LOD) was defined as the minimum concentration providing a chromatographic signal three times higher than background noise (at the m/z value used in MS). The precision of the method (repeatability) was checked on 11 samples containing 40  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> of each additive with FID and 200

$\mu\text{g ml}^{-1}$  with MS detection. Several interesting conclusions can be drawn from these results. First, FID provides a higher sensitivity (ca. 4 times) for all additives than does MS. The linear ranges also differ; thus MS enables detection down to the  $0.5 \text{ mg ml}^{-1}$  level. Also, the limits of detections for all the analytes are lower with FID, probably as the result of its higher sensitivity. Finally, the precision, expressed as relative standard deviation, is similar with both detectors and ranges from 2.5 to 4.2%.

### *3.5. Determination of antioxidants and preservatives in food products*

The determination of preservatives and antioxidants requires pretreatment prior to GC analysis in order to remove proteins and most triglycerides present in fatty samples, which may be deposited on the chromatographic column. We chose a method based on freezing the sample [17], slightly modified as described in Section 2.3. Samples were selected among those with high fat contents (viz. margarines, oils, fresh cheeses, mayonnaises and pâté). They were treated as described under Section 2.3 and the resulting aqueous phase was introduced into the SPE system. In all instances, quantitation was done by FID and confirmation of each additive by MS. Table 3 lists the average results obtained from five individual analyses of each food sample (all determinations in the flow system were in triplicate, so  $n=15$ ). All food products were found to contain at least one antioxidant and one preservative except to for oil sample. P-PHBA and BHT were only present in pâté and oil, respectively. M-PHBA and E-PHBA were detected in none of the samples. As expected, TBHQ was absent from all samples (in

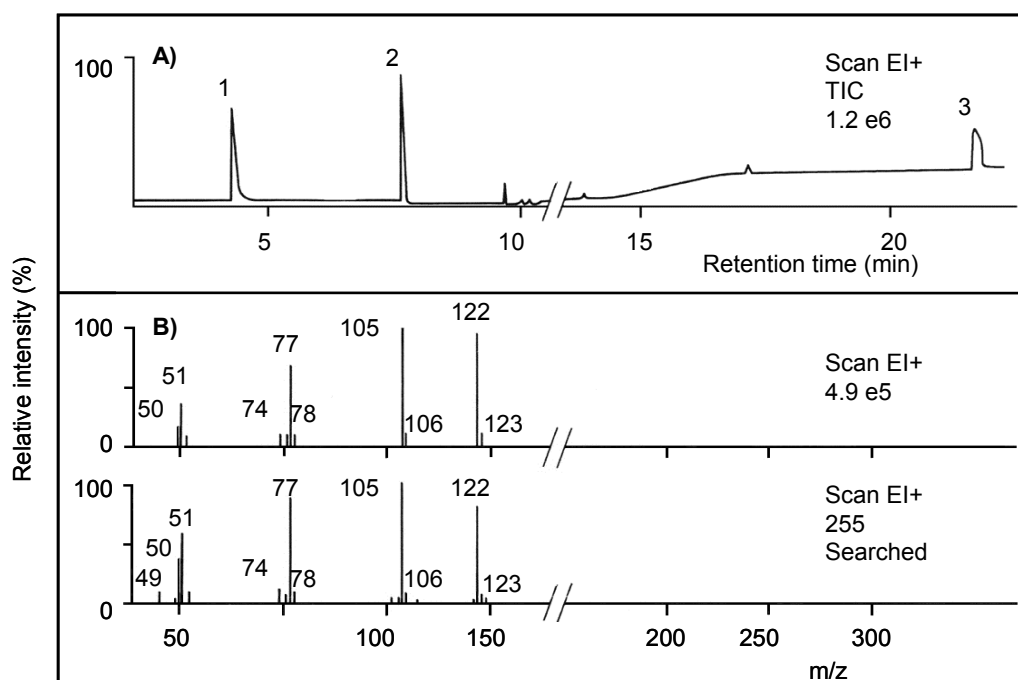
compliance with European Community regulations). All the results are below the European Community allowed levels for both individual and mixed additives [2].

**Table 3.** Antioxidant and preservative contents and percent RSD (n=15) in fatty samples as determined by the proposed SPE–GC–FID method.

Food sample	Content (mg kg <sup>-1</sup> fat)						
	Sorbic acid	Benzoic acid	BHA	BHT	P–PHBA	α–T	α–TA
<b>Margarines</b>							
Sunflower	840 (5.4)	–	170 (4.1)	–	–	150 (4.7)	–
Corn	390 (5.1)	–	–	–	–	110 (4.5)	280 (5.4)
<b>Cheese</b>							
Fresh	745 (4.0)	–	–	–	–	725 (4.8)	–
Light	880 (5.1)	–	–	–	–	480 (5.2)	–
<b>Mayonnaise</b>							
Plain	–	175 (5.7)	190 (5.3)	–	–	1080 (4.2)	–
Garlic	365 (4.1)	625 (4.8)	–	–	–	1765 (4.0)	1100 (4.5)
Light	400 (3.8)	–	–	–	–	1900 (4.7)	–
<b>Oil</b>							
Sunflower –seed	–	–	134 (3.7)	58 (3.5)	–	485 (4.1)	–
<b>Pâté</b>							
Pork	225 (5.3)	–	–	–	840 (5.4)	2100 (4.8)	–

Finally, in order to assess the potential of the proposed method for the determination of antioxidants and preservatives, samples were spiked with the maximum legally allowed amount of the additives in each food type [2] and analyzed in quintuplicate. The recoveries obtained ranged from 92.8 to 102.5%.

Fig. 3A shows the chromatogram for a plain mayonnaise sample, using mass spectrometric detection. No matrix interference was observed owing to the highly selectivity of the proposed method. By way of example, Fig. 3B illustrates the identification of one of the additives by comparing the mass spectrum for the corresponding peak with that in the library. All spectral comparisons resulted in coincidences above 85%.



**Fig. 3.** Chromatogram for antioxidants and preservatives found in a plain mayonnaise sample (A). 1 = benzoic acid; 2 = BHA; and 3 =  $\alpha$ -tocopherol. Electron impact full-scan mass spectra for benzoic acid in the sample and from NIST library (B).

#### 4. CONCLUSIONS

Antioxidants and preservatives as additives jointly spiked to fatty food samples can be determined by GC with no prior derivatization. The problem

posed by the presence of two overlapped peaks for BHT and E-PHBA (their mixture was not found in the studied samples), however can be solved by using characteristic ions for the two in MS. However, the determination of the additives studied by MS is less sensitive than their FID quantitation.

The proposed method is not fully automated as it involves some manual sample preparation to remove the abundant triglycerides in fatty foods. However, as the sorbent column retains only 25% of triglyceride present in the sample and the eluent elutes only 2.5% of the adsorbed fraction, the SPE system can be directly applied to foods with low fat contents.

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors are grateful to the Spain's Dirección General de Investigación Científica y Técnica (Project No. PB95-0977) for financial support. M. González also wishes to thank Dr. Luis Antonio González Mendoza (Department of Chemistry Engineering and Pharmaceutical Technology, University of La Laguna, Spain) for his assistance in this work.



**REFERENCES**

- [1] G. W. Gould, *Mechanisms of Action of Food Preservation Procedures*, Elsevier Applied Science, London, 1989.
- [2] Diario Oficial de las Comunidades Europeas, No. L.61, European Union, Brussels, 18 March 1995, pp 16–19, 25.
- [3] S. Albalá–Hurtado, S. Novella–Rodríguez, M. T. Veciana–Nogues, A. Marine–Font, *J. Chromatogr. A* 778 (1997) 243.
- [4] C. Guo, G. Cao, E. Sofic, R. L. Prior, *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 1787.
- [5] Y. M. Xing, P. J. White, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74 (1997) 303.
- [6] A. Kulomaa, H. Siren, M. L. Riekkola, *J. Chromatogr. A* 781 (1997) 523.
- [7] L. Agui, P. Yáñez–Sedeno, J. M. Pingarrón, *Electroanalysis* 9 (1997) 468.
- [8] M. Ohta, M. Narita, T. Miyoshi, T. Itoyama, M. Kimura, M. Kobayashi, R. Ochi, Y. Sekiguchi, S. Koiguchi, Y. Hirahara, M. Hasegawa, M. Miyata, K. Kamakura, K. Maeda, *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 38 (1997) 78.
- [9] A. El–Bayoumi, M. S. Tawakkol, J. M. Diab, *Spectrosc. Lett.* 30 (1997) 355.
- [10] B. H. Chen, S. C. Fu, *Chromatographia* 41 (1995) 43.
- [11] C. De–Luca, S. Passi, E. Quattrucci, *Food Addit. Contam.* 12 (1995)
- [12] K. L. Kuo, Y. Z. Hsieh, *J. Chromatogr. A* 768 (1997) 334.
- [13] D. Ivanovic, M. Medenica, E. Nivaud–Guernet, M. Guernet, *Chromatographia* 40 (1995) 652.
- [14] J. D. MacFarlane, *J. Autom. Chem.* 19 (1997) 175.
- [15] M. González, E. Ballesteros, M. Gallego, M. Valcárcel, *Anal. Chim. Acta* 359 (1998) 47.

- [16] M. González, M. Gallego, M. Valcárcel, *J. Chromatogr. A* 823 (1998) 321.
- [17] M. Yamada, M. Miyata, Y. Kato, M. Nakamura, M. Nishijima, T. Shibata, Y. Ito, *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 34 (1993) 635.
- [18] B. D. Page, *J. AOAC Int.* 76 (1993) 765.
- [19] W. Welz, W. Sattler, H. J. Leis, E. Malle, *J. Chromatogr.* 526 (1990) 319.

## **CAPITULO III. COLORANTES SINTETICOS Y NATURALES**



Los organismos gubernamentales, los servicios de inspección y los laboratorios de rutina muestran un interés creciente en la obtención de sistemas analíticos que den respuestas si/no rápidas y fiables, más que en una información química detallada. Los sistemas de screening son una alternativa interesante debido a que se diseñan para “filtrar” muestras y seleccionar sólo aquellas en las que los analitos de interés están presentes por encima de una concentración umbral prefijada. Las ventajas de estos sistemas de screening son la reducción de costes, la rapidez, la simplicidad y la minimización de errores que se producen por el retraso entre el muestreo y el análisis. Todo método de screening ha de ir seguido de una técnica de confirmación de las muestras que han resultado positivas [1–3]. No se ha encontrado ninguna referencia de métodos de screening de colorantes sintéticos y naturales en alimentos.

La cromatografía de líquidos es la técnica preferida para la resolución de mezclas de colorantes ya que ofrece gran resolución y su acoplamiento con detectores sensibles y selectivos, como el de diodos en fila, es muy sencillo. El uso de reactivos de interacción iónica junto con la cromatografía de líquidos hace que se incremente la selectividad y sensibilidad de dicha técnica [4–9]. Los

---

métodos desarrollados hacen uso de una fase estacionaria RP-C<sub>18</sub> y una fase móvil consistente en una disolución acuosa o hidro-orgánica de un reactivo de interacción iónica (IIR, Ion-Interaction Reagent). Esta técnica se basa en la modificación de la superficie de la fase estacionaria mediante adsorción de la cadena lipofílica del IIR en ésta, dando lugar a una primera capa cargada positivamente. El anión del IIR también se enlaza a la fase estacionaria a través de fuerzas electrostáticas [5]. La formación de la doble capa eléctrica adsorbida en la fase estacionaria original permite la retención de analitos aniónicos y/o catiónicos, como son los colorantes alimentarios.

Por otra parte, la liofilización es una técnica cuyo objetivo primario es la conservación de los alimentos sin dañarlos, congelando su contenido de agua y luego eliminando el hielo por sublimación, combinándose así las ventajas de la congelación y el desecado para obtener una forma propicia de conservación. La liofilización es de gran importancia para la conservación de productos alimenticios porque detiene el crecimiento de microorganismos, inhibe el deterioro por reacción química o enranciamiento que sufren los alimentos grasos y facilita el almacenamiento ya que no es necesario mantener la cadena de frío. Todos estos aspectos hacen que la liofilización constituya también una alternativa ventajosa en el pretratamiento de alimentos, ya que el alto contenido en agua que generalmente contienen estos alimentos los hace muy perecederos. De hecho, además de todas las ventajas nombradas anteriormente, la liofilización simplifica la metodología analítica de extracción así como aumenta la estabilidad de los colorantes durante el análisis de las muestras, evitando su degradación. La

liofilización se ha utilizado en algunas determinaciones de colorantes naturales en muestras vegetales [10,11].

En este Capítulo III de la Memoria se aborda el desarrollo de un método automático de screening para la discriminación de colorantes sintéticos y naturales en alimentos (Capítulo III.1). Para el desarrollo de este método se ha utilizado un espectrómetro UV-Visible. También se ha desarrollado un método para la discriminación y confirmación de colorantes sintéticos y naturales en muestras lácteas que han dado positivas en un método de screening (Capítulo III.2). Con este fin se utilizó un espectrómetro de diodos en fila y un cromatógrafo de líquidos con un detector de diodos en fila. Por último se optimizó la extracción de colorantes sintéticos y naturales a partir de productos lácteos y alimentos con un alto contenido en grasas, que han sido liofilizados para simplificar el proceso de extracción (Capítulo III.3). Para la determinación de los analitos se utilizó el método cromatográfico desarrollado en el Capítulo III.2.

## REFERENCIAS

- [1] M. Valcárcel, M. S. Cárdenas, *Automatización y Miniaturización en Química Analítica*, Springer, Barcelona, 2000.
- [2] M. Valcárcel, S. Cárdenas, M. Gallego, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 30 (2000) 345.
- [3] M. Valcárcel, S. Cárdenas, M. Gallego, *Trends Anal. Chem.* 18 (1999) 685.
- [4] M. R. Fuh, K. J. Chia, *Talanta.* 56 (2002) 663.
- [5] S. Angelino, A. F. Fell, M. C. Gennaro, *J. Chromatogr. A* 797 (1998) 65.
- [6] J. S. Coffey, H. E. Nursten, J. M. Ames, L. Castle, *Food Chem.* 58 (1997) 259.
- [7] J. J. Berzas–Nevado, C. Guiberteau–Cabanillas, A. M. Contento–Salcedo, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 20 (1997) 3073.
- [8] P. A. Clarke, K. A. Barnes, J. R. Startin, F. I. Ibe, M. J. Shepherd, *Rapid Commun. Mass Sp.* 10 (1996) 1781.
- [9] M. C. Gennaro, C. Abrigo, G. Cipolla, *J. Chromatogr. A.* 674 (1994) 281.
- [10] E. J. M. Konings, H. H. S. Roomans, *Food Chem.* 59 (1997) 599.
- [11] M. M. Barth, C. Zhou, K. M. Kute, G. A. Rosenthal, *J. Agr. Food Chem.* 43 (1995) 2876.





## Automatic screening method for the rapid and simple discrimination between synthetic and natural colorants in foods

Mónica González, Mercedes Gallego and Miguel Valcárcel\*

*Analytical Chemistry Division, Campus de Rabanales, University of Córdoba, E-14071 Córdoba, Spain. E-mail: qa1meobj@uco.es; Fax: +34 957 218606; Tel: +34 957 218616*

Received 28 February 2002; received in revised form 13 May 2002; accepted 30 May 2002

### Abstract

A simple screening method was developed to discriminate between synthetic and natural colorants present in foods in order to reduce the use of expensive instruments such as LC–DAD. A rapid flow system was proposed in which samples containing natural and synthetic colorants in an acetic medium were passed through a wool/cotton column, where only synthetic colorants were retained, being then eluted with dilute ammonia. Yellow, red and green–blue–brown additives can be monitored at  $\lambda = 400, 530$  and  $610$  nm respectively, with a conventional spectrophotometer. Complete discrimination (no false positives) between natural and synthetic colorants can be obtained for concentrations of natural colorants (in absence of synthetic ones) up to 2000 (yellow), 2000 (red) and 10000 (brown) times that of the detection limit (DL) of synthetic additives. The reliability of the method was established at five concentrations (between 0.5 and 3 DL) of the synthetic colorants, tartrazine (yellow), erythrosin B (red) and brilliant black BN (brown). For a cut–off concentration of 2 DL, the percentage of false negatives ranges from 8 to 12%. Finally, the method was applied to the screening of several fruit drinks and candies for the determination of synthetic colorants with a sampling frequency of  $10 \text{ h}^{-1}$ .

*Keywords:* Colorants; Screening method; Photometry

## 1. INTRODUCTION

Since the way food appears has always been as important as how it tastes, modern food-manufacturing has become very concerned with preserving the aspect of foods that have lost their natural colors during processing. By adding colorants, the appearance can be preserved while also reducing batch-to-batch color variations, enhancing the natural color and producing consumer appeal for products that have no natural color [1]. Food colorants are usually classified as either natural (or nature-identical) or synthetic. Natural colorants generally have a lower tinctorial strength than synthetic colorants and are generally more sensitive to light, temperature, pH and redox agents [2]. Because over the last twenty years synthetic colorants have increasingly been perceived as undesirable or harmful by consumers [3] and the European Union and the United States have restricted the use of synthetic colorants as additives in foods, banning the harmful ones, the application of natural pigments has become extremely important to the food industry [4,5]. Simple and rapid methods for the separation and determination of natural and synthetic colorants are required in order to (i) establish whether there are synthetic dyes present in foods and whether they are permitted, (ii) determine their concentrations, (iii) confirm the absence of added dyes in foods where they are not declared and (iv) check on the stability of colorants during processing and storage.

Different methods for separating colorants from foods have been developed using organic solvent extraction procedures [6,8] and solid-phase extraction with RP-C<sub>18</sub> [9-12] or amino materials [12] (for natural and synthetic colorants), and Amberlite XAD-2 (for synthetic colorants) [13], although for qualitative studies the

easiest option is dyeing polyamide [14] or wool [15,16]. The adsorption of synthetic colorants (tartrazine, sunset yellow, ponceau 4R, amaranth and brilliant blue FCF) from drinks and candies, on polyamide sorbent [14] was carried out to pH 4 (adjusted with citric acid) and the elution with an alkaline–ammoniacal solution. In another method, thirteen synthetic food colorants were isolated from foods by adsorption on wool. After desorption with a 10% ammonia solution and gentle warming, a spectrum of the resulting colorant solution was recorded and compared to reference spectra of pure colorants. Linear regression analysis was then used to resolve the mixture spectrum into its constituent components [15]. The Spanish Ministry of Food, Fish and Agriculture's (MAPA) official method for determining synthetic colorants in wine involves manual adsorption on wool after laborious manipulation of the sample including boiling, cooling, neutralization and extraction with ether prior to separation by paper chromatography [16].

The individual determination of colorants in foods is usually carried out using a spectrophotometric detector, [6,14,15,17] but the resolution of complex mixtures requires separation in different extracts [6], the use of dual–wavelength and derivative methods [6,14,17], or chemometric approaches [14,15]. However, for the resolution of mixtures, the usual alternatives are chromatographic techniques such as liquid chromatography (LC) with UV–visible [8,10,11,18–20] detection, paper chromatography [16] or thin–layer chromatography [12,13,21] and capillary electrophoresis [7,9,22].

Government bodies, inspection services and routine laboratories are increasingly interested in obtaining analytical systems that provide rapid and

---

reliable yes/no responses rather than detailed chemical information. Screening systems are an interesting alternative because they are designed to filter samples and select only the ones where the target analytes are present above or below a pre-set concentration threshold [23]. The advantages of sample screening systems include reduction of costs, rapidity and simplicity [24,25]. In this work, the combined use of a continuous flow system and a spectrophotometer for sample screening to discriminate between synthetic and natural colorants is described for the first time. The method is based on the classical characteristics of synthetic colorants and natural colorants: synthetic colorants dye natural materials such as cotton or wool while natural colorants do not. Therefore, a very simple flow system that includes a column packed with those natural materials discriminates between both types of colorants; the natural ones (not retained) can be determined in the first step and synthetic ones (retained) in the second step, after their elution. Natural and synthetic colorants for yellow, red and green-blue-brown were chosen as models, selecting a maximum wavelength for each color (400, 530 and 610 nm, respectively). The use of a diode array detector that measures the three wavelengths simultaneously does not simplify the method because green-blue-brown colorants absorb light at the same wavelengths as yellow and red colorants.

## 2. EXPERIMENTAL

### 2.1. Apparatus

All spectrophotometric measurements were made on a Shimadzu UV–Visible 160A recording spectrophotometer (Kyoto, Japan) equipped with a Hellma (Jamaica, NY, USA) flow cell (pathlength 10 mm, inner volume 18  $\mu$ l). The absorbance was individually recorded at 400, 530 or 610 nm for yellow, red or green–blue–brown colorants, respectively.

The flow system consisted of a Gilson (Villiers–le–Bel, France) Minipuls–3 peristaltic pump furnished with poly(vinyl chloride) pumping tubes, a Rheodyne (Cotati, CA, USA) 5041 injection valve, PTFE tubing of 0.5 mm i.d., and laboratory–made adsorption columns packed with sorbent. The columns were constructed from PTFE capillaries of 3 mm i.d., packed with 80 mg of cotton or wool. A water bath (Selecta, Barcelona, Spain) was also employed.

### 2.2. Reagents and standard solutions

All experiments were performed with analytical–reagent grade chemicals or better. Synthetic colorants (tartrazine, erythrosin B, lissamine green B, brilliant blue FCF, indigo carmine and brilliant black BN), natural colorants (curcumin, riboflavin, trans– $\beta$ –carotene and carminic acid) and glucose were all supplied by Sigma–Aldrich (Madrid, Spain). All other reagents (ammonium hydroxide, acetic acid, sodium acetate, aluminum sulfate, potassium sodium tartrate, petroleum ether and ethanol) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

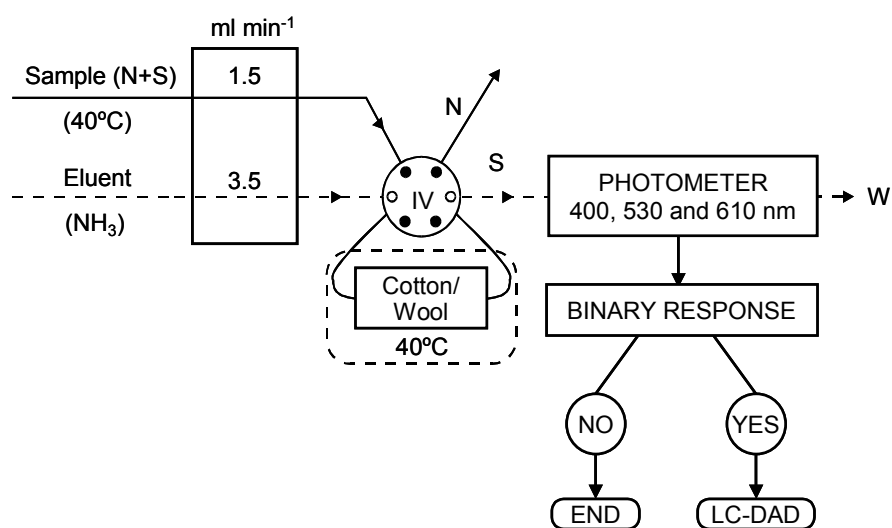
As caramel color (Class I; E-150a) was not commercially available, it was obtained by treatment of glucose as follows: glucose (100 g) in Milli-Q water (10 ml) was heated in a stainless steel vessel up to 170°C for 170 min with continuous stirring [26]; color formation was monitored at 610 nm until color intensity ranged from 0.010 to 0.140 absorbance units. Color intensity was defined as the absorbance of a 0.1% w/v solution of caramel color solid in water in a 1 cm cell at 610 nm. When the color target was reached, additional water (50 ml) was added to cool down the caramel.

All wool and cotton were washed with petroleum ether to eliminate the natural grease of the fibbers [15,16]. In order to increase the adsorption capacity of the wool and the reproducibility of the results, the wool was treated [16] as follows: 10 g of wool were stirred for 1 h with 500 ml of a solution of 1 g l<sup>-1</sup> aluminum sulfate and 1.2 g l<sup>-1</sup> potassium sodium tartrate in Milli-Q water; the mixture was left standing (in repose) for 2 – 3 h and finally washed with water and dried to room temperature.

Stock standard solutions containing 1 mg ml<sup>-1</sup> of individual colorants (tartrazine, erythrosin B, lissamine green B, brilliant blue FCF, indigo carmine, brilliant black BN and caramel) and 0.2 mg ml<sup>-1</sup> of riboflavin were prepared in Milli-Q water and 1 mg ml<sup>-1</sup> of curcumin, trans-β-carotene and carminic acid in ethanol. All stock solutions were stored in glass-stoppered bottles at 4°C in the dark. Solutions of variable concentrations were prepared daily by diluting the stock standard solutions in 1 mol l<sup>-1</sup> of the acetic acid/sodium acetate buffer.

### 2.3. Sample preparation

Fruit drinks and candies were purchased at local markets in Spain. The samples were prepared by the following methods. Fruit drinks were degassed in an ultrasonic bath for 15 min and then 1.5 – 4.0 ml ( $n=5$ ) were diluted in 25–ml of  $1 \text{ mol l}^{-1}$  acetic acid/sodium acetate buffer. Candies were ground in a ceramic mortar and an amount accurately weighed at ca. 0.25 – 0.5 g ( $n=5$ ) was dissolved in 10 ml of the buffer solution by heating at  $60^\circ\text{C}$  for 3 min; when the solution was cool, it was diluted to 25–ml with  $1 \text{ mol l}^{-1}$  buffer. For both types of samples, aliquots of 3 ml were completely aspirated into the flow system shown in Fig. 1.



**Fig. 1.** Manifold for screening synthetic(S)/natural(N) colorants in food samples. IV = injection valve; W = waste; LC-DAD = liquid chromatograph–diode array detector for confirmatory analyses.

#### 2.4. Screening procedure

A continuous flow system coupled on-line to a photometer was used (Fig. 1). A volume of 3 ml of either the natural/synthetic colorant standards mixture or of the treated samples, both in  $1 \text{ mol l}^{-1}$  acetic acid/sodium acetate at pH 4.7, containing  $0.2 - 6.0 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$  of colorant, was gently warmed in a water bath at  $40^\circ\text{C}$  and continuously introduced into the system at  $1.5 \text{ ml min}^{-1}$  and propelled through the sorbent column of wool or cotton, also heated at  $40^\circ\text{C}$ . In this step synthetic colorants were retained in the sorbent column, however, natural colorants were not retained and therefore were able to be directly determined in the effluent. The column was then rinsed with distilled water for 1 min to remove potentially adsorbed interferents and the remainder of natural colors that could have impregnated the column. By switching the injection valve, a  $1 \text{ mol l}^{-1} \text{ NH}_3$  stream was driven toward the column, in the opposite direction of the sample, at a flow rate of  $3.5 \text{ ml min}^{-1}$  to elute the synthetic colorants. The colorants were monitored at 400 (yellow), 530 (red) or 610 (green-blue-brown) nm. The eluent stream ( $1 \text{ mol l}^{-1} \text{ NH}_3$ ) was used as blank, giving negligible absorbance. Peak height was used as the analytical signal. The column was conditioned with 3 ml of  $1 \text{ mol l}^{-1}$  buffer pH 4.7 and occasionally washed with 3 ml of ethanol (viz. after every 10 real samples). Under these conditions, the sorbent column remained active for one week (ca. 400 extractions). To check whether the “yes” response corresponded to one or several compounds of similar colors, a chromatographic technique (LC) is necessary to separate the target compounds, which can be monitored simultaneously at the three mentioned wavelengths.

---



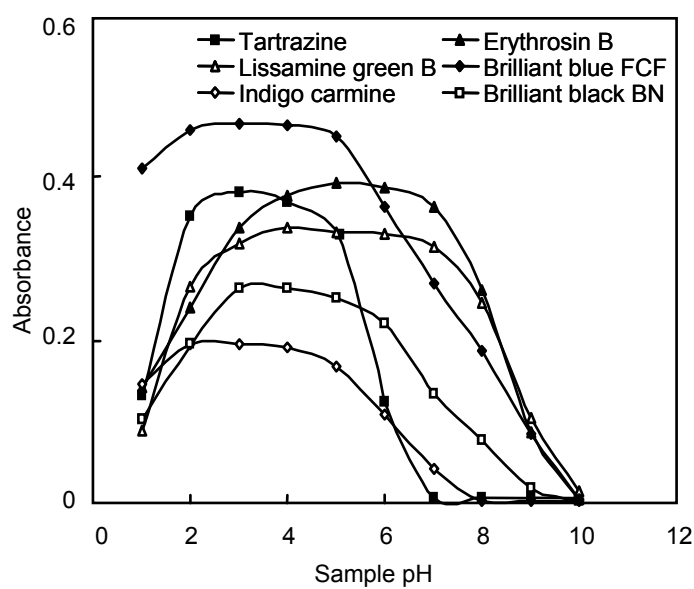
### 3. RESULTS AND DISCUSSION

The proposed method is based on the fact that synthetic colorants dye pure wool or natural cotton while natural colorants do not; although natural colorants might initially adhere to these materials, they are easily washed away with water [16]. However, foods often contain several colorants that combined contribute to the final color: colorants of different colors or colorants that are categorized under the same color. In order to resolve these mixtures of colorants (both natural and synthetic), they are grouped in accordance with the spectra zone where they demonstrate wavelengths of maximum absorption. Preliminary experiments were focused on obtaining the absorption spectra of all synthetic colorants studied in the  $1 \text{ mol l}^{-1} \text{ NH}_3$  medium. For the yellow colorant (tartrazine) the absorption maximum was located at 400 nm, for the red colorant (erythrosin B) at 530 nm and for the green–blue–brown colorants (lissamine green B, brilliant blue FCF, indigo carmine and brilliant black BN), which show similar visible spectra, the absorption maximum was located between 570 and 630 nm. Wavelengths of 400, 530 and 610 nm for the three big groups were selected for this study. The spectrum of natural colorants (curcumin, riboflavin, trans- $\beta$ -carotene, carminic acid and caramel) was obtained in acetic acid/sodium acetate medium and the wavelengths cited above can be also employed. In addition, the 11 colorants studied is permitted and in fact are widely used in a great number of foodstuffs such as dairy products, sauces, mustards, bullion cubes, soft drinks, liquors and candies.

### 3.1. Optimization of the flow system

Optimization studies were carried out for each colorant and from the results compromise values of the experimental variables were selected. The variables influencing the system can be divided into three groups: those related to chemical variables, retention unit and flow variables. The variables were studied by preparing aqueous standard solutions of individual synthetic (tartrazine, erythrosin B, lissamine green B, brilliant blue FCF, indigo carmine and brilliant black BN) and natural (curcumin, riboflavin, trans- $\beta$ -carotene, carminic acid and caramel) colorants and using the flow system of Fig. 1. For each standard, parallel tests were done with a column (100 mg) of treated wool or cotton. To discriminate between synthetic and natural colorants the first variable studied was the sample pH with the aim of obtaining maximum retention of synthetic colorants and minimal retention of natural colorants. For this purpose, 3 ml of colorant standard solutions at concentrations of  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$  were used; in all instances the eluent was a dilute ammonia solution. The effect of pH on the natural and synthetic colorant's sorption was studied over the range 1 – 10 by adjusting each standard solution with dilute  $\text{HNO}_3$  or  $\text{NaOH}$  as required; in all instances the absorbance was measured in the eluate. No natural colorants were retained in the entire range of pH for both columns. On the other hand, as can be seen in Fig. 2, all synthetic colorants studied were completely retained between pH 2 and 5 (adsorption efficiency ca. 100%), the optimum range being shorter for tartrazine and indigo carmine. An acetic acid/sodium acetate buffer at pH 4.7 was selected to ensure a

more precise preparation of the sample with detriment of a slightly decrease in the tartrazine signal.



**Fig. 2.** Effect of sample pH on the adsorption of synthetic colorants on a cotton sorbent column. Sample: a standard solution containing  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$  of each synthetic colorant.

Because natural colorants were not retained in both sorbent materials, they can be identified qualitatively in the effluent of the column (acetic acid/sodium acetate buffer), and therefore the following variables were optimized only for individual synthetic colorants by group of colors (yellow, 400 nm; red, 530 nm and green–blue–brown, 610 nm) at concentrations of  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ . The concentration of the buffer only affected the retention of tartrazine and erythrosin B, which need at least a concentration of  $0.7 \text{ mol l}^{-1}$  for optimal retention. Ammoniacal solutions at variable concentrations were employed as eluent (pH 7 – 12); erythrosin B is the colorant that required the most restricted range (pH 10 – 12) and therefore this

range was selected for all the colorants. So 1.0 mol l<sup>-1</sup> NH<sub>3</sub> (pH 11.5) was chosen as eluent to ensure complete elution of the colorants, or mixtures of colorants, at high concentrations. The optimum range of values as well as the selected values of all chemical variables are listed in Table 1.

**Table 1.** Chemical and flow variables of the colorant screening method.

Variable	Optimum range	Selected value
Sample pH	2 – 5	Acetic acid/sodium acetate buffer pH 4.7
Acetic acid/sodium acetate concentration (mol l <sup>-1</sup> )	0.5 – 2.0	1.0
Eluent (NH <sub>3</sub> ) pH	10 – 12	11.5
Adsorption temperature (°C)	25 – 45	40
Amount of cotton/wool (mg)	60 – 150	80
Sample breakthrough (ml)	0.5 – 3.5	3.0
Sample flow rate (ml min <sup>-1</sup> )	0.2 – 2.0	1.5
Eluent flow rate (ml min <sup>-1</sup> )	2.8 – 4.5	3.5

In previous manual methods the colorants were adsorbed/desorbed on wool by warming or boiling them in water [15,16]; for this reason the influence of temperature on the adsorption of synthetic colorants on cotton or wool was studied. The temperature adsorption was studied in the range of 15 – 60°C by immersing sample and the wool/cotton column in a water bath. The influence of this variable on adsorption proved to be negligible but it was observed that the precision of the results were better at certain temperatures and for this reason both the sample and the column were maintained at 40°C. Various columns containing different amounts of sorbent (20 – 150 mg) were assayed. Neither

sorbent (wool or cotton) nor amount affected the system greatly. No significant changes in absorbance were noted above 60 mg of material but it was observed that changes in the compactness of the columns containing more than 100 mg of sorbent altered the flow of the solutions through the columns. A serious limitation to systems with mini-columns is the small amount of sorbent that they contain, affecting the breakthrough volume, which is defined as the maximum sample volume which can be percolated through the sorbent column with a theoretical recovery of at least 99%. The sample's breakthrough volume was studied by fixing the amount of analytes at three different quantities (2, 5 and 8  $\mu\text{g}$ ) and varying the sample volume (0.5 – 10 ml). For both types of columns and for all synthetic colorants good recoveries were obtained up to 3.5 ml. The values selected for retention unit variables are listed in Table 1.

The influence of the sample flow rate on the sorption efficiency resulted in very small variations for all synthetic colorants up to 2  $\text{ml min}^{-1}$ . The flow rate of the ammoniacal solution (eluent) was varied between 0.5 – 4.5  $\text{ml min}^{-1}$ . At a low flow rate the colorant was more dispersed than at a high flow rate; on the other hand, when the flow rate was very high the residence time of the eluent in the column was not long enough for an efficient elution, therefore a medium range flow rate was employed. This variable had the greatest effect on tartrazine, erythrosin B, lissamine green B and brilliant blue FCF. The selected flow rates are listed in Table 1. Finally, the adsorption efficiency for all synthetic colorants was calculated by using the optimized variables listed in Table 1 and the manifold shown in Fig. 1. First, 3 ml of the individual standard solutions containing 1  $\mu\text{g ml}^{-1}$

---

of each colorant were passed through the sorbent column. After each standard solution was processed, the column (wool or cotton) was cleaned with 3 ml of 1 mol l<sup>-1</sup> NH<sub>3</sub> to eliminate sorbed analytes. The adsorption efficiency was assessed (using absorbance measurements) by comparing the amount of each additive present in the standard solutions before and after passing them through the sorbent column. The adsorption efficiency was 100% for all colorants (excepting tartrazine, 94%).

All the variables were optimized for the two natural sorbents (wool and cotton). The results were similar for both sorbents but reproducibility was slightly worse for wool than for cotton. It is also easier to pack the column with cotton and, once packed, the cotton stays more homogeneous within the column. Moreover, cotton does not require treatment to be used. For these reasons cotton was chosen to calculate the analytical characteristics, selectivity and reliability of the method.

### *3.2. Sensitivity and selectivity of the method*

Under the selected chemical and flow conditions (Table 1), the manifold depicted in Fig. 1 was used to run calibration graphs for the colorants studied. The graphs were constructed by introducing 3 ml of aqueous standard solutions containing variable concentrations of each colorant between 0.2 and 6 µg ml<sup>-1</sup> in the 1 mol l<sup>-1</sup> acetic acid/sodium acetate buffer (pH 4.7); seven standards, each with three replicates, were used for each calibration graph. The results obtained are listed in Table 2. Detection limits (calculated as three times the standard

deviation of the background noise, determined using a stream of  $1 \text{ mol l}^{-1} \text{ NH}_3$ , divided by the slope of each calibration graph) ranged from 6 to  $15 \text{ ng ml}^{-1}$ . The repeatability of the screening method, expressed as relative standard deviation (RSD), was checked on 11 individual samples containing 1 or  $2 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$  of the colorants and was found to be ca. 4.5%.

**Table 2.** Analytical characteristics of synthetic colorant screening.

Analytes	400 nm		530 nm		610 nm		LR <sup>a</sup> ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	DL <sup>a</sup> ( $\text{ng ml}^{-1}$ )	RSD (%)
	Slope	Interc.	Slope	Interc.	Slope	Interc.			
Tartrazine	0.376	0.009	–	–	–	–	0.3 – 3.0	11	2.8
Erythrosin B	–	–	0.392	0.008	–	–	0.3 – 3.0	8	5.4
Lissamine green B	0.080	0.003	0.069	0.002	0.331	0.006	0.3 – 3.5	9	4.7
Brilliant blue FCF	0.128	0.002	0.093	–0.004	0.472	0.006	0.2 – 2.5	6	2.4
Indigo carmin	0.039	–0.003	0.058	0.007	0.194	0.007	0.5 – 6.0	15	5.4
Brilliant black BN	0.143	–0.003	0.205	0.004	0.271	0.004	0.4 – 4.0	11	6.1

<sup>a</sup>, the linear range (LR) and detection limit (DL) correspond to the most sensitive wavelength.

Natural colorants can be determined by color group (yellow, red, green–blue–brown) in the cotton column's effluent because they are not retained in the column itself; however, when present in high concentrations they could be partially retained and not completely eliminated in the washing step. Therefore, the influence of natural colorants in the determination of synthetic colorants of the same color, was investigated. For this purpose three synthetic colorants – tartrazine, erythrosin B and brilliant black BN – were selected as the model. Interferents increased the synthetic colorants absorbance in all instances; the

tolerance limit of each natural colorant was taken as the largest amount yielding a response less than the analytical signal plus three times its standard deviation for  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$  of each synthetic colorant. The natural yellow colorants curcumin, riboflavin and trans- $\beta$ -carotene were tolerated up to concentrations of 150, 100 and  $80 \mu\text{g ml}^{-1}$  respectively, in the determination of  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$  of tartrazine; the natural red colorant carminic acid can be tolerated up to  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$  in the determination of  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$  of erythrosin B; caramel did not interfere in the determination of  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$  of brilliant black BN at high concentration such as  $600 \mu\text{g ml}^{-1}$ . The high selectivity of the method for synthetic colorants versus natural colorants of the same color can be ascribed to the characteristics of the cotton material. In summary, the proposed method can discriminate between natural and synthetic colorants present in a food, however if there are mixtures of synthetic colorants of different colors in the food (yellow with green–blue–brown or red with green–blue–brown) the quantification of the colors must be done with an equations system in agreement with the molar absorptivity (slope of the calibration graphs) of those colorants as indicated in Table 2.

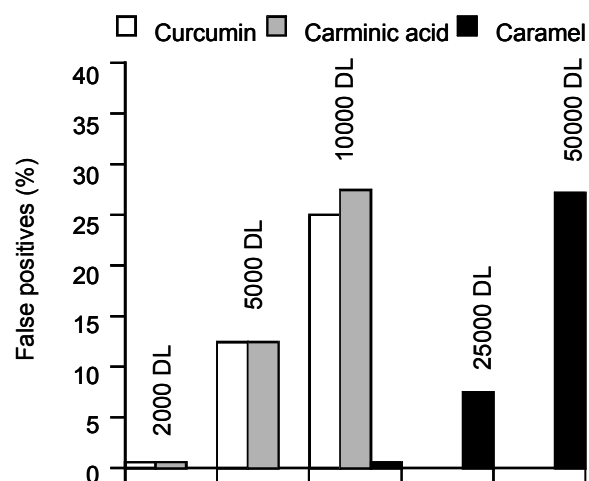
### *3.3. Discrimination between natural and synthetic colorants*

Actually, a substantial portion of the analytical information requested are qualitative responses. Because the evaluation norms (technological and toxicological) that control natural colorants are generally more permissive than those that control synthetic colorants, qualitative responses to yes/no questions



such as “does the sample contain synthetic colorants?”, or “does this food contain a banned synthetic colorant?” have become extremely relevant. The most basic qualitative answer within this screening system is the binary response to the question, “is it synthetic colorant in the food?”. The main error occurs when there is no synthetic colorant in the food but there are natural colorants that give false positives. To avoid false positives, it was necessary to establish at what threshold the concentration of natural colorants might cause an erroneous “yes” response to the presence of synthetic colorants in the food sample. First, it was indispensable to set up an imaginary concentration of synthetic colorants to be the cut-off concentration [27]. The cut-off is the concentration corresponding to double the detection limit (DL) of each synthetic colorant at each wavelength [22 ng ml<sup>-1</sup> for yellow (tartrazine, 400 nm) and brown (brilliant black BN, 610 nm) colorants and 16 ng ml<sup>-1</sup> for red colorants (erythrosin B, 530 nm)]. A false positive arises when the signal yields a “yes” response for a standard solution containing only natural colorants at a concentration above the cut-off value (of synthetic colorants). A systematic study was carried out using 50 standard solutions for each concentration of the three natural colorants chosen (curcumin, carminic acid and caramel as yellow, red and brown respectively). As per the tolerated ratio obtained in the selectivity study, three concentration levels of the natural colorants corresponding to 2000 DL, 5000 DL and 10000 DL for curcumin and carminic acid and 10000 DL, 25000 DL and 50000 DL for caramel were chosen. The results obtained are shown in Fig. 3 where at each concentration level the reliability is given at a confidence level of 95%. As can be observed, the percentage of false

positives was only 12% at 5000 DL (which corresponds to ca. 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) for curcumin and carminic acid and 8% at 25000 DL (which corresponds to ca. 270  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) for caramel. No false positives of synthetics were obtained using up to concentrations of 15 and 20  $\mu\text{g ml}^{-1}$  of natural red and yellow colorants, respectively, or 110  $\mu\text{g ml}^{-1}$  of natural brown colorant. These concentrations are high enough to prove that the screening method is able to accurately discriminate between natural and synthetic colorants.

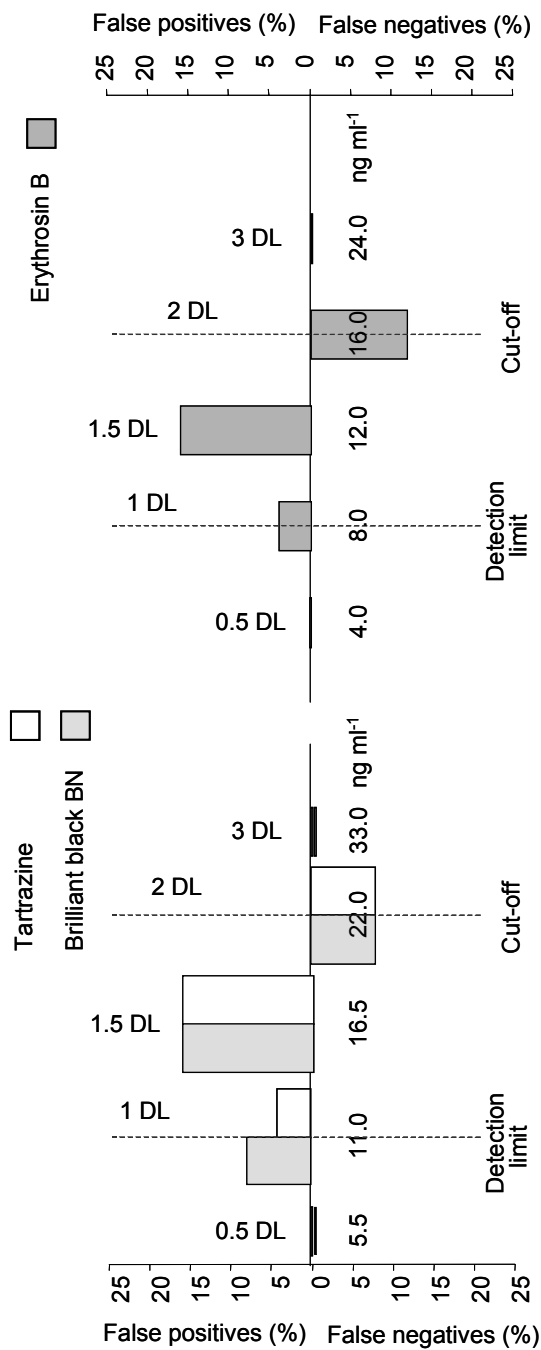


**Fig. 3.** Discrimination between natural and synthetic colorants. Percentage of false positives ( $n=50$ ) obtained for standard solutions containing only individual natural colorants (curcumin, carminic acid and caramel with yellow, red and brown colors, respectively) with regard to the detection limits (DL) of synthetic colorants.

#### 3.4. Reliability of the screening method for synthetic colorants

The confidence level of the proposed sample screening system was established on the basis of the level of false positives and negatives through a simple chemometric study [27], in which only synthetic colorants were present in the sample. As in the aforementioned experiments, the cut-off concentration was

set at double the detection limit. A false positive arises when the signal yields a “yes” response for a standard solution containing the synthetic colorant at a level below the cut-off value and a false negative is produced when a standard solution containing the synthetic colorant at a level above the cut-off level gives an absorbance measurement lower than the cut-off signal. Three synthetic colorants (tartrazine, erythrosin B and brilliant black BN with detection limits of 11.0, 8.0 and 11.0 ng ml<sup>-1</sup>, respectively) were selected for this study, with the objective of determining the reliability of the screening method for each color group at the three wavelengths defined earlier (400, 530 or 610 nm). A systematic study at five concentration levels 0.5 DL, 1 DL, 1.5 DL, 2 DL and 3 DL, was carried out by using 50 samples at each concentration of the three colorants. Fig. 4 shows the distribution of false positives and negatives obtained for each synthetic colorant. The percentage of false positives rose as the concentrations of each food colorant increased, being zero for the three synthetic colorants at 0.5 DL, 4% (for tartrazine and erythrosin B) and 8% (for brilliant black BN) at 1 DL and reaching 16% for the three colorants at 1.5 DL. The confirmation of false positives is not problematic in screening methods because they can be detected in the posterior confirmation method but the existence of false negatives affects the reliability of the method more directly because once qualified as negative a sample is not re-tested. As can be observed in Fig. 4, the percentage of false negatives decreases with the increase in the concentration of the three synthetic colorants, being zero at 3 DL in all instances. At the cut-off concentration of 2 DL the values of false negatives



**Fig. 4.** Graphical summary of the reliability of the screening method. Standard solutions (n=50) contain individual synthetic colorants (tartrazine, erythrosin B and brilliant black BN with yellow, red and brown colors, respectively) at concentrations near the detection limit (DL) for each one.

were higher for erythrosin B (12%) than for the other colorants (8%), probably due to the fact that erythrosin B had the lowest DL value.

### *3.5. Application to food samples*

The proposed method was applied to the screening of synthetic and natural colorants in fruit drinks and candies. These samples gave positive responses for synthetic colorants quantified at 400, 530 or 610 nm according to their color. The labels on the fruit drinks and candies showed what natural or synthetic colorants were contained but not the amounts; the positive list of colorant additives (natural and synthetic) in soft drinks generally limits the concentrations at  $100 \text{ mg l}^{-1}$  while the limit for candies is at  $300 \text{ mg kg}^{-1}$  [4]. Samples that contained either synthetic or natural colorants were selected but only a few were found with a mixture of both (candies). The results of the screening method are listed in Table 3. As can be seen in the table, positive responses were obtained for all samples that contained synthetic colorants and negative responses were obtained for all samples that contained only natural colorants. Individual synthetic colorants were easily quantified using its calibration graph. When there were mixtures of colorants from different color groups present in the samples, as was the case in the apple drink (yellow and blue colorants), absorbance measurements at the wavelengths of each colorant were taken. Next, the concentration of the blue colorant was determined at 610 nm, which was used to calculate its absorbance at the wavelength of the color group of the second colorant in the mixture (yellow at 400 nm) and then subtract the first colorant's

contribution to the global absorbance of the mixture (both yellow and blue colorants); finally the concentration of the second colorant was calculated using its calibration graph. Average concentrations, calculated from five individual amounts of each food sample and analyzed in triplicate (n=15), are listed in Table 3. Natural colorants were not quantified because the cotton column's effluent was not monitored in the photometer.

**Table 3.** Determination of synthetic colorants after food sample screening.

Sample	Colorant that appears on label		Screening response	Concentration found <sup>a</sup>
<b>Fruit drink</b>				
Apple	Synthetic yellow	Tartrazine	Positive	14.0 ± 0.8
	Synthetic blue	Brilliant blue FCF	Positive	6.2 ± 0.4
Pineapple Fruits	Synthetic yellow	Tartrazine	Positive	33 ± 2
	Synthetic green	Lissamine green B	Positive	11 ± 1
Orange	Natural yellow	Trans-β-carotene	Negative	–
Cola	Natural brown	Caramel	Negative	–
Guava	Natural red	Carminic acid	Negative	–
<b>Candy</b>				
Lemon	Synthetic yellow	Tartrazine	Positive	99 ± 5
	Natural yellow	Curcumin	Negative	–
Orange	Synthetic yellow	Tartrazine	Positive	75 ± 3
	Natural red	Carminic acid	Negative	–
Blackberry	Synthetic brown	Brilliant black BN	Positive	65 ± 5

<sup>a</sup>, average values ± standard deviation (n=15) in mg l<sup>-1</sup> for fruit drinks and mg kg<sup>-1</sup> for candies.

As the data were consistent, it can be concluded that the proposed screening method is accurate and can thus be used to determine synthetic colorants according to their family color (viz. yellow, red, green–blue–brown) even

when natural colorants are present although it cannot directly identify the synthetic colorant. As with all screening methods, positive results must be confirmed by other, more sophisticated, techniques – for example, liquid chromatography coupled with either a diode array detector or, ideally, with a mass spectrometer– that are able to separate and identify the colorants.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors gratefully acknowledge financial support from Spain's Dirección General de Investigación Científica y Técnica (Grant BQU2001–1815). M. González also wishes to thank the Department of Chemical Engineering and Pharmaceutical Technology, University of La Laguna, Spain for their support in this research.

## REFERENCES

- [7] T. E. Furia (Ed.). *CRC Handbook of Food Additives*, Volume I, 2<sup>nd</sup> edn.; CRC Press: Boca Raton, FL, 1981.
- [8] R. Macrae, R. K. Robinson and M. J. Sadler (Eds.). *Encyclopaedia of Food Science, Food Technology and Nutrition*, Vol II; Academic Press Inc: San Diego, CA, 1993.
- [9] A. Downham, P. Collins, *Int. J. Food Sci. Tech.* 35 (2000) 5.
- [10] Directiva 94/36 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 30 de junio, Diario Oficial de las Comunidades Europeas, No. L.237, 10.9.94, pp. 13.
- [11] Code of Federal Regulations Title 21, US Government Printing Office, Washington, DC, Revised 1 April, 2001, Parts 70–82.
- [12] J. J. Berzas–Nevado, J. Rodríguez–Flores, M. J. Villaseñor–Llerena, *Fresenius J. Anal. Chem.* 350 (1994) 610.
- [13] M. Pérez–Urquiza, J. L. Beltrán, *J. Chromatogr. A* 898 (2000) 271.
- [14] J. Oliver, A. Palou, *J. Chromatogr. A* 881 (2000) 543.
- [15] C. O. Thompson, V. C. Trenerry, *J. Chromatogr. A* 704 (1995) 195.
- [16] P. Ashkenazi, C. Yarnitzky, M. Casi, *Anal. Chim. Acta* 248 (1991) 289.
- [17] F. E. Lancaster, J. F. Lawrence, *J. Chromatogr. A* 732 (1996) 394.
- [18] S. M. Anderton, C. D. Incarvito, J. Sherma, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 20 (1997) 101.
- [19] V. Rizova, T. Stafilov, *Anal. Lett.* 28 (1995) 1305.
- [20] Y. Ni, X. Gong, *Anal. Chim. Acta* 354 (1997) 163.
- [21] K. Hofer, D. Jenewein, *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A* 204 (1997) 32.



- [22] Métodos oficiales de análisis Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación MAPA, Volume II; pp. 309; Secretaría General Técnica del MAPA: Madrid, 1993.
- [23] C. Cruces–Blanco, A. M. García–Campaña, F. Alés–Barrero, *Talanta* 43 (1996) 1019.
- [24] Q. Chen, S. Mou, X. Hou, J. M. Riviello, Z. Ni, *J. Chromatogr. A* 827 (1998) 73.
- [25] J. J. Berzas–Nevado, C. Guiberteau–Cabanillas, A. M. Contento–Salcedo, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 20 (1997) 3073.
- [26] M. C. Gennaro, C. Abrigo, G. Cipolla, *J. Chromatogr. A* 674 (1994) 281.
- [27] A. P. Gupta, M. M. Gupta, S. Kumar, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 22 (1999) 1561.
- [28] J. S. Coffey, L. Castle, *Food Chem.* 51 (1994) 413.
- [29] M. Valcárcel, S. Cárdenas, M. Gallego, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 30 (2000) 345.
- [30] M. Valcárcel, S. Cárdenas, M. Gallego, *Trends Anal. Chem.* 18 (1999) 685.
- [31] S. Cárdenas, M. Gallego, M. Valcárcel, *Anal. Chim. Acta* 402 (1999) 1.
- [32] V. Ratsimba, J. M. García–Fernández, J. Defaye, H. Nigay, A. Voilley, *J. Chromatogr. A* 844 (1999) 283.
- [33] Analytical Methods Committee, *Analyst* 122 (1997) 495.



## Determination of natural and synthetic colorants in prescreened dairy samples using liquid chromatography–diode array detection

Mónica González, Mercedes Gallego and Miguel Valcárcel\*

*Department of Analytical Chemistry, Campus de Rabanales, University of Córdoba, E-14071 Córdoba, Spain. E-mail: qa1meobj@uco.es; Fax: +34 957 218606; Tel: +34 957 218616*

### Abstract

A simple and novel screening method for food colorants was proposed. Synthetic or natural colorants were discriminated as they were selectively adsorbed on cotton or RP-C<sub>18</sub> sorbent columns, respectively. After elution, each fraction was monitored at 400, 530 and 610 nm for yellow, red and green–blue–brown additives, respectively, with a DAD spectrophotometer. The screening method serves as a filter to indicate whether the target colorants are present above or below the detection limit of the method (6 – 15 or 25 – 10000 ng ml<sup>-1</sup> for synthetic or natural colorants, respectively). Positive samples were discriminated by LC–DAD, using a flow system similar to that of the screening method. The LC–DAD discrimination/confirmation method is very sensitive; it exhibits a linear range of 0.01 – 50 µg ml<sup>-1</sup> (excluding curcumin and caramel which are linear up to 200 and 1500 µg ml<sup>-1</sup>, respectively). The method was applied to the determination of natural and synthetic colorants in dairy samples with good precision.

## 1. INTRODUCTION

Color is often the first quality by which foods are judged. For centuries colorants have been used to make food more attractive and appetizing [1,2]. Because compounds used as color additives and their concentration limits are subject to regulations in different countries, there is a growing need for analytical control of colorants to ensure that banned additives are not present in food and to determine those permitted by regulations [3,4].

To resolve mixtures of colorants, the usual alternatives are chromatographic techniques, such as liquid chromatography [5–19] or thin-layer chromatography [20], and capillary electrophoresis [21]. Liquid chromatography (LC) is often the preferred choice as it provides unrivaled resolution and lends itself readily to easy coupling with sensitive and selective detectors. LC using UV-visible [5–12], fluorescence [6,13–15], mass spectrometry [16,17] or diode-array (DAD) [6,12,14–19] detection has been used to determine natural and synthetic colorants in foods. No reference to the separation of five natural colorants (curcumin, riboflavin, trans- $\beta$ -carotene, carminic acid and caramel) by LC appears to exist. Liquid chromatography using ion-interaction reagents [6,8,9,17,19] is a highly selective, sensitive, flexible and low operational cost technique for studies on ionic or ionizable solutes. The methods developed generally make use of an RP-C<sub>18</sub> stationary phase, with a mobile phase consisting of an aqueous or hydro-organic solution of an ion-interaction reagent (IIR). This technique is based on surface modification of the stationary phase; when the lipophilic chain of the IIR is adsorbed onto the polygosyl-bonded silica reversed-phase sorbent with octadecyl-silane functional groups (RP-C<sub>18</sub>), it gives rise to a

primary positively charged layer. The anion of the ion–interaction reagent is also bound to the stationary phase through electrostatic forces.

The use of liquid chromatographic techniques coupled to a DAD allows the separation and identification of the colorants present in the sample. The equipment required is expensive; however, employing a screening method providing a yes/no response before confirmation can dramatically reduce its usage. The advantages of sample screening systems include reduction of costs, rapidity, simplicity and minimization of the errors caused by delays between sampling and analysis [22,23].

Recently, our group developed a rapid, simple screening method for synthetic food colorants. Samples containing synthetic and natural colorants in an acetic medium were passed through a wool/cotton column, where only synthetic colorants were retained, being then eluted with dilute ammonia. Synthetic colorants were monitored with a conventional spectrophotometer but individual discrimination was not possible [24].

The main purpose of this work was to develop a rapid, simple method for screening both natural and synthetic colorants based on the method already developed for synthetic colorants. This new screening method discriminates synthetic colorants by retaining them on a cotton column and natural colorants by retaining them on an RP–C<sub>18</sub> column. The second aim of this work was to develop two LC–DAD methods, one for synthetic colorants and another for natural colorants; both methods are used to identify and quantify colorants that give a positive response during the screening method. For this purpose, a continuous–flow system was designed that conditions dairy samples in order to remove the sample matrix

and preconcentrate colorants before their discrimination/determination in either LC–DAD method. The chromatographic conditions of each method depended on whether the analytes were natural or synthetic colorants although in both cases the mobile phase contained an ion interaction reagent to ensure complete resolution of the colorants.

## 2. EXPERIMENTAL SECTION

### 2.1. Chemicals and standard solutions

Natural colorants [curcumin (E–100), riboflavin (E–101i), trans- $\beta$ -carotene (E–160a) and carminic acid (E–120)], synthetic colorants [tartrazine (E–102), erythrosin B (E–127), lissamine green B (E–142), brilliant blue FCF (E–133), indigo carmine (E–132) and brilliant black BN (E–151)], cetyl–trimethyl–ammonium bromide, ascorbic acid and glucose were supplied by Sigma–Aldrich (Madrid, Spain). All other reagents (acetic acid, sodium acetate, ammonium hydroxide, ammonium acetate, orthophosphoric acid, sodium hydroxide, petroleum ether, ethanol, n–hexane, and HPLC–grade acetonitrile, methanol and ethyl acetate) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

Since Class I (E–150a) caramel color was not available commercially, it was obtained by treating glucose as follows: 100 g of glucose in 10 ml water was heated in a stainless steel vessel up to 170°C for 170 min while stirring continuously [25]; color formation was monitored at 610 nm until color intensity ranged from 0.010 to 0.140 absorbance units. Color intensity was defined as the absorbance of a 0.1% w/v solution of caramel color solid in water in a 1 cm cell at

610 nm. After reaching the color target, 50 ml of water were added to cool down the caramel.

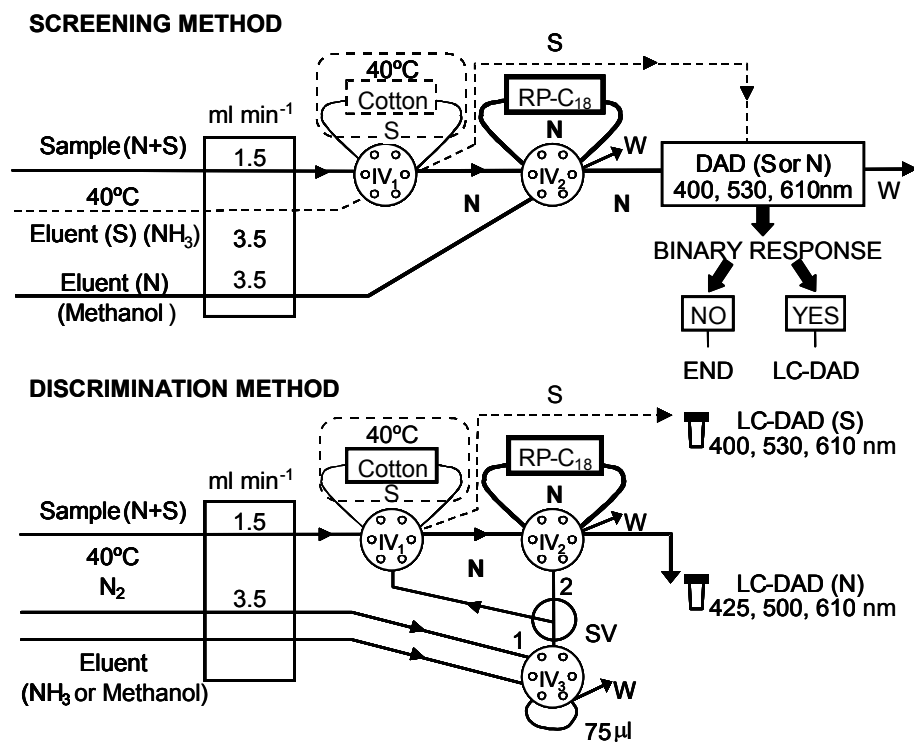
In order to eliminate the natural grease of the fiber, all of the cotton was washed with petroleum ether [26]. Polygosyl-bonded silica reversed-phase sorbent with octadecyl functional groups (RP-C<sub>18</sub>) 40 – 63 μm was supplied by Sigma-Aldrich.

Stock standard solutions containing 1 mg ml<sup>-1</sup> of individual colorants (tartrazine, erythrosin B, lissamine green B, brilliant blue FCF, indigo carmine, brilliant black BN and caramel) and 0.2 mg ml<sup>-1</sup> of riboflavin were prepared in Milli-Q water and 1 mg ml<sup>-1</sup> of curcumin, trans-β-carotene and carminic acid in ethanol. All of these stock solutions were stored in the dark in glass-stoppered bottles at 4°C. Every day, solutions of variable concentrations were prepared by diluting the stock standard solutions in 1 mol l<sup>-1</sup> of the acetic acid/sodium acetate buffer. Aqueous solutions (1 mg ml<sup>-1</sup>) containing the following additives were also used in the interference study: sorbitol, N-L-α-aspartyl-L-phenylalanine methyl ester (aspartame), ascorbic acid, tert-butyl-4-hydroxyanisole, 2,6-di-tert-butyl-p-hydroxytoluene, malic acid, citric acid, sorbic acid and benzoic acid.

## 2.2. Apparatus

The flow systems for the screening and confirmatory procedures (Fig. 1) consisted of two Gilson (Villiers-le-Bel, France) Minipuls-3 peristaltic pumps furnished with poly(vinyl chloride) and Solvaflex pumping tubes, for aqueous and

---



**Fig. 1.** Schematic diagram of the proposed set-up for the screening and discrimination methods of synthetic (S) and natural (N) colorants in dairy samples. IV = injection valve; W = waste; SV = selecting valve: position 1 for the elution of synthetic colorants and position 2 for the elution of natural colorants; DAD = diode-array detector; LC-DAD = liquid chromatograph-diode array detector. See text for details.

methanolic solutions, respectively; five Rheodyne (Cotati, CA) 5041 injection valves, one Rheodyne 5060 rotary valve, PTFE tubing of 0.5 mm i.d., standard connectors and laboratory-made sorbent columns. The sorbent columns for both systems were constructed from PTFE capillaries of 3 mm i.d., hand-packed with 80 mg of cotton or 100 mg of RP-C<sub>18</sub> for sorption of synthetic or natural colorants, respectively. A stainless steel LC filter (for screening and LC-DAD methods) was fitted at the inlet of the aspiration sample channel to prevent clogging the sorbent



columns. A diode array spectrophotometer Hewlett Packard 8452A (De-Avondale, PA) equipped with a Hellma (Jamaica, NY) flow cell (pathlength 10 mm, inner volume 18  $\mu$ l) was coupled on-line to the flow system for the screening procedure. The absorbance was continuously recorded at 400, 530 and 610 nm for yellow, red and green-blue-brown colorants, respectively. A water bath (Selecta, Barcelona, Spain) was also employed.

### *2.3. Liquid chromatographic-diode array conditions*

Confirmatory analysis for both natural and synthetic colorants were done on a Shimadzu modular liquid chromatographic system (Kyoto, Japan), equipped with a LC-10 AD pump, a SPD-M6A UV-visible diode array detector and a Rheodyne Model 7725i injector with a sample loop of 20  $\mu$ l, controlled via Class LC-10 software (also from Shimadzu). A Shimadzu CTO-10A chromatography column oven was used for temperature control when studying the influence of column temperature on the chromatographic separation. Separations were done on a Spherisorb ODS-2 RP-C<sub>18</sub> (5  $\mu$ m, 25 cm x 4.6 mm i.d.) column (Alltech, Deerfield, IL) fitted with a Spherisorb ODS-2 (5  $\mu$ m, 7.5 x 4.6 mm i.d.) guard column. The column was not thermostated; each analysis was performed at room temperature.

For synthetic colorants, the optimized mobile phase consisted of a mixture of an organic modifier (acetonitrile, ACN) and water containing 0.29 g l<sup>-1</sup> ( $8 \times 10^{-4}$  mol l<sup>-1</sup>) of cetyl-trimethyl-ammonium bromide, and adjusted to pH 5.5 with

ortophosphoric acid. The gradient consisted of an initial ACN concentration of 45% increased to 55% in 6.5 min, then immediately increased to 65% and maintained for 1.5 min. The flow rate was 2.0 ml min<sup>-1</sup>. For natural colorants, the mobile phase gradient consisted of an initial mixture of 85% methanol and 15% water containing 0.07 g l<sup>-1</sup> (2 x 10<sup>-4</sup> mol l<sup>-1</sup>) of cetyl–trimethyl–ammonium bromide (and adjusted to pH 6.0 with ortophosphoric acid) held for 3 min. Then the mixture was changed to 20% methanol and 80% ethyl acetate, and maintained for 10 min. The mobile phase flow rate was 1.0 ml min<sup>-1</sup>. The chromatographic system for both synthetic and natural colorants was conditioned by passing the mobile phase through the column until a stable baseline was obtained. To fully condition the system, a flow rate of 1.0 ml min<sup>-1</sup> was applied for about 20 min. This procedure was followed for every new mobile phase used.

Detection wavelengths for the DAD were set at 400, 530 and 610 nm simultaneously for synthetic colorant analyses and 425, 500 and 610 nm simultaneously for natural colorant analyses. The spectra (detection wavelengths from 375 to 625 nm) were recorded for all peaks. The identities of the different chromatographic peaks were confirmed by comparing their visible spectral characteristics to standards and retention times.

#### *2.4. Sample preparation*

Dairy samples (yogurts, ice creams, milk shakes and a dairy dessert) were purchased at local markets in Spain. Dairy samples contain high concentrations of proteins that complicate the extraction of both natural and synthetic colorants and

because the samples are suspensions they contain solid particles that can block the sorbent columns and connections of the flow system. In addition, some colorants (viz. riboflavin, curcumin and trans- $\beta$ -carotene) oxidize easily making it necessary to add a reducing agent such as ascorbic acid to stabilize them. To mitigate these problems, an accurate amount of 0.5 – 4.0 g (n=3) of a dairy sample was mixed with 5 ml of 0.1 mol l<sup>-1</sup> ammonium acetate [14,15] and ascorbic acid (final concentration of 200  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) and magnetically stirred for 5 min. The mixture was then centrifuged at 2000 rpm for 10 min to precipitate the proteins. Next, the supernatant was diluted to 25–ml with 1 mol l<sup>-1</sup> acetic acid/sodium acetate buffer (pH 4.7). Once treated, aliquots of the sample (3 ml) were continuously filtered (through a stainless steel LC filter) and aspirated into the flow system shown in Fig. 1.

To prevent the loss of light sensitive colorants, it was necessary to protect the samples and the standards from light by keeping them in amber-colored flasks.

### *2.5. Screening procedure*

As depicted in Fig. 1, a continuous-flow system coupled on-line to a diode array spectrophotometer was used. A 3 ml volume of either the natural/synthetic colorant standards mixture or the treated samples, both in 1 mol l<sup>-1</sup> acetic acid/sodium acetate at pH 4.7, containing natural and/or synthetic colorants at concentrations 0.2 – 600  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>, was slowly heated in a water bath at

40°C and continuously introduced into the system at 1.5 ml min<sup>-1</sup> and propelled through the cotton column (80 mg) located in the loop of the injection valve IV<sub>1</sub>, which was also heated at 40°C. In this step, synthetic colorants were retained in the cotton column while the natural colorants passed through the cotton column and were retained in the RP-C<sub>18</sub> column (100 mg), located in the loop of the injection valve IV<sub>2</sub>. In this way, both types of colorants were preconcentrated while the sample matrix was sent to waste. Both columns were then rinsed with distilled water for 2 min to remove any adsorbed interfering compounds as well as to free any natural colorants that might have impregnated the cotton column and transport them to the RP-C<sub>18</sub> column. To screen synthetic colorants, a 1 mol l<sup>-1</sup> NH<sub>3</sub> stream was driven toward the column by switching IV<sub>1</sub> in the opposite direction of the sample, at a flow rate of 3.5 ml min<sup>-1</sup>, to elute the synthetic colorants. The cotton column was conditioned with 3 ml of 1 mol l<sup>-1</sup> buffer pH 4.7 and occasionally washed with 3 ml of ethanol (viz. after every 10 real samples). To screen natural colorants, a methanol stream was driven toward the column by switching IV<sub>2</sub> in the opposite direction of the sample, at a flow rate of 3.5 ml min<sup>-1</sup> to elute the natural colorants. The RP-C<sub>18</sub> column was conditioned with methanol (eluent) and with 3 ml of 1 mol l<sup>-1</sup> buffer pH 4.7 and occasionally washed with 1 ml of n-hexane (viz. after every 10 real samples). Fractions of synthetic or natural colorants were monitored at 400 (yellow), 530 (red) and 610 (green-blue-brown) nm and in both cases the eluent stream gave negligible absorbance and was set as blank, and peak height was used as the analytical signal. To determine the

individual concentrations of colorants in the dairy samples, all positive results required discrimination by LC–DAD as described below.

#### *2.6. LC–DAD discrimination procedure*

The flow system used for the discrimination method was similar to that of Fig. 1, although slightly altered to increase sensitivity by using low eluent volumes. Thus, 3 ml of standard solution or a treated sample containing natural and/or synthetic colorants at concentrations  $0.01 - 200 \mu\text{g ml}^{-1}$  (omitting caramel) in  $1 \text{ mol l}^{-1}$  acetic acid/sodium acetate (pH 4.7) was passed through the cotton sorbent column. Both the sample and sorbent column were warmed at  $40^\circ\text{C}$ . Synthetic colorants were retained in the column and the effluent containing natural colorants was passed through an RP– $\text{C}_{18}$  column. A volume of 3 ml of water was employed as carrier to complete sample introduction and to remove any potential interfering compound and other organic compounds adsorbed in both columns. For the discrimination of synthetic colorants, the selection valve (SV) was in position 1 and the  $\text{IV}_3$  ( $75 \mu\text{l}$ ) loop filled with eluent ( $1 \text{ mol l}^{-1} \text{NH}_3$ ). Two sequential injections of  $75 \mu\text{l}$  of  $1 \text{ mol l}^{-1} \text{NH}_3$  (from  $\text{IV}_3$ ) were carried by the  $\text{N}_2$  stream and passed through the cotton column (in the opposite direction of the sample) to elute adsorbed synthetic colorants. Only the eluate of the second injection (containing the highest fraction of colorants) was collected into glass vials and a  $20\text{-}\mu\text{l}$  aliquot was manually injected into the liquid chromatograph. For the discrimination of natural colorants, the SV valve was in position 2 and the  $\text{IV}_3$  loop filled with the

eluent, methanol. Two sequential 75  $\mu\text{l}$  injections of the eluent were also carried by the  $\text{N}_2$  stream and passed through the RP-C<sub>18</sub> column (in the opposite direction of the sample), to elute adsorbed natural colorants. Again only the eluate of the second injection was collected into amber glass vials and a 20- $\mu\text{l}$  aliquot was manually injected into the liquid chromatograph. Then both sorbent columns were conditioned as in the screening method (the RP-C<sub>18</sub> column was previously conditioned with 1.5 ml of methanol) and washed after every 10 real samples. Peak height (as mA units) was used for quantification and a (20- $\mu\text{l}$ ) eluent blank was also used.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

Foods often contain several colorants of different or similar colors, which cannot be discriminated using photometric techniques; a chromatographic technique such as LC is necessary to separate the target compounds, which can be monitored at different wavelengths. Because natural and synthetic colorants are sometimes found mixed in the same food, this study focused on both natural (curcumin, riboflavin, trans- $\beta$ -carotene, carminic acid and caramel) and synthetic (tartrazine, erythrosin B, lissamine green B, brilliant blue FCF, indigo carmine and brilliant black BN) colorants that are most commonly found in different categories of foods. Preliminary experiments attempted to separate the colorants by injecting aqueous standards directly into a liquid chromatograph with DAD and selecting three wavelengths: 400 nm (for yellow), 530 nm (for red) and 610 nm (for green-

blue–brown). The mobile phase composition and gradients were systematically changed across a broad range, but separation was never achieved. For these reasons, a screening method that gives reliable global responses to the presence of natural and synthetic colorants, or mixtures of both, in foods simplifies chromatographic discrimination; it is also quite useful to obtain separate extracts of natural and synthetic colorants before chromatographic determination.

### *3.1. Optimization of the screening method*

The screening method is based on basic characteristics of synthetic colorants and natural colorants: synthetic colorants dye natural materials such as cotton while natural colorants do not. The method exploits this difference in behavior to discriminate between both types of colorants. The proposed automatic screening system of synthetic colorants was optimized elsewhere [22]; the most significant variables are listed in Table 1. The effect of pH on the natural and synthetic colorant's sorption in a cotton column was studied over a 1 – 10 range by using a flow system similar to that depicted in Fig. 1 and  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$  of each colorant. No natural colorants were retained in the entire range of pH studied. On the other hand, all synthetic colorants (tartrazine, erythrosin B, lissamine green B, brilliant blue FCF, indigo carmine and brilliant black BN) studied were completely retained between pH 2.0 and 5.0 (adsorption efficiency ca. 100%). A  $1.0 \text{ mol l}^{-1}$  acetic acid/sodium acetate buffer at pH 4.7 was selected as the medium for sample adsorption and a  $1 \text{ mol l}^{-1}$  ammonia solution at pH 11.5 was selected as eluent. In order to increase the precision of the results both the sample and the

sorbent column needed to be heated at 40°C. The sample's breakthrough volume was studied for all synthetic colorants and good recoveries were obtained up to 3.5 ml. Other variables studied are listed in Table 1.

**Table 1.** Chemical and flow variables of the screening method and chromatographic conditions for the discrimination method.

Variable	Synthetic colorants		Natural colorants	
	Optimum range	Selected value	Optimum range	Selected value
<b>Flow system</b>				
Sample pH	2.0 – 5.0	4.7	2.0 – 5.0	4.7
Acetic acid/sodium acetate concentration (mol l <sup>-1</sup> )	0.5 – 2.0	1.0	0.5 – 2.0	1.0
Eluent	NH <sub>3</sub> ; (pH): 10.0 – 12.0	11.5	Methanol	Methanol
Adsorption temperature (°C)	25 – 45	40	–	–
Amount of sorbent (mg)	60 – 150	80	90 – 150	100
Sample breakthrough volume (ml)	0.5 – 3.5	3.0	0.5 – 3.5	3.0
Sample flow rate (ml min <sup>-1</sup> )	0.2 – 2.0	1.5	0.2 – 2.0	1.5
Eluent flow rate (ml min <sup>-1</sup> )	2.8 – 4.5	3.5	2.8 – 4.5	3.5
Eluent volume (μl) <sup>a</sup>	175 – 225	225	175 – 225	225
Fraction of volume eluent <sup>a</sup>	2 <sup>nd</sup> (75 μl)	2 <sup>nd</sup> (75 μl)	2 <sup>nd</sup> (75 μl)	2 <sup>nd</sup> (75 μl)
N <sub>2</sub> flow rate (ml min <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	1.5 – 4.0	3.5	1.5 – 4.0	3.5
<b>Chromatographic conditions</b>				
Mobile phase composition	Acetonitrile:water		Methanol:water:ethyl acetate	
IIR concentration (mol l <sup>-1</sup> )	7.5 – 20 x 10 <sup>-4</sup>	8 x 10 <sup>-4</sup>	1.2 – 10 x 10 <sup>-4</sup>	2 x 10 <sup>-4</sup>
Mobile phase pH	5.5	5.5	6.0	6.0
Flow rate	2.0	2.0	1.0	1.0
Column temperature (°C)	25 – 30	25	25 – 30	25
Injection volume (μl)	20	20	20	20

<sup>a</sup>, experimental conditions only for discrimination method.



In order to discriminate them, natural colorants were grouped in accordance with the spectra zone where they demonstrate wavelengths of maximum absorption. The spectra of natural colorants were determined in an acetic acid/sodium acetate medium. For the yellow–orange colorants (curcumin, riboflavin and trans- $\beta$ -carotene), which have similar visible spectra, the absorption maximum was located between 425 and 450 nm, for the red (carminic acid) at 500 nm and for the brown (caramel) between 400 and 425 nm. It should be noted that the analysis becoming the reference method for caramel is known as Color Intensity and is defined at a wavelength of 610 nm, as specified in legislation on colorants [3,4]. To simplify the screening procedure, the same wavelengths used for synthetic colorants (400, 530 and 610 nm) were also used for natural colorants. Natural colorants were not retained in the cotton sorbent column of the synthetic screening system and therefore were able to be directly determined in the effluent. However, due to the low sensitivity of direct natural colorant determination, an attempt at increasing the sensitivity of the proposed method was made. For this purpose, preconcentration of natural colorants was assayed on various sorbent materials for the first time. The flow system used in this study includes a second column that retains natural colorants. Four conventional sorbents (column, 120 mg), viz. activated carbon, silica gel 100, Amberlite XAD–2 and RP–C<sub>18</sub> were tested. Activated carbon retained all the natural colorants (ca. 100%) but caused irreversible retention (elution ca. 0%) with all common solvents (ethanol, methanol, n–hexane, petroleum ether, ethyl acetate). The retention was incomplete using silica gel and XAD–2 sorbents (ca.

66% and 28%, respectively) for all colorants. By far the best results were obtained with RP-C<sub>18</sub> (ca. 94% adsorption), which was selected for further experiments. The aforementioned organic solvents were tested as eluent for retained natural colorants but only methanol eluted them completely. The amount of sorbent was varied between 25 and 150 mg (larger amounts increased the pressure inside the flow system). No changes in absorbance were observed above 90 mg. Several solvents (methanol, ethanol, 1 mol l<sup>-1</sup> acetic acid/sodium acetate buffer) were tested in order to select the best for conditioning the RP-C<sub>18</sub> column; methanol was the best but since it was already used as eluent no extra conditioning was necessary. After eluting/conditioning with methanol it was eliminated from the sorbent column by 3 ml of 1 mol l<sup>-1</sup> buffer pH 4.7 (sample medium). Solvents were assayed to flush the sorbent column following elution and n-hexane was selected. 1 ml of n-hexane was used occasionally to remove unwanted substances and/or avoid memory effects. A summary of the other chemicals and flow conditions studied are also listed in Table 1. As can be seen, the same flow system was used for screening of both natural and synthetic colorants because optimal conditions are similar. To check whether the “yes” response corresponds to one or several compounds of similar colors and discriminate between colorants, a chromatographic technique (LC) is necessary to separate the target compound from the synthetic or natural fraction.

### 3.2. Sensitivity and selectivity of the screening method

This screening method provides a reliable response to synthetic and natural colorants because cotton is highly selective, retaining only synthetic colorants. However, if there are mixtures of synthetic or natural colorants of different colors in the food (yellow with red, yellow with green–blue–brown or red with green–blue–brown) the quantification of the colorants must be done by using an equations system in agreement with the molar absorptivity. The graphs were constructed by using 3 ml of aqueous standard solutions containing synthetic colorants between 0.2 and 6.0  $\mu\text{g ml}^{-1}$  and natural colorants between 1 and 600  $\mu\text{g ml}^{-1}$  in acetic acid/sodium acetate medium (Fig. 1). Detection limits (DL) were calculated as three times the standard deviation of the background noise (determined using a stream of 1 mol l<sup>-1</sup> NH<sub>3</sub> or methanol) divided by the slope of each calibration graph and ranged from 6 to 15 ng ml<sup>-1</sup> and from 25 to 10000 ng ml<sup>-1</sup> for synthetic and natural colorants, respectively. The precision (as relative standard deviation) was checked on 11 standards containing 1 or 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  of the colorants and found to be 4.8%.

Natural colorants are not retained in the cotton column itself; however, when present in high concentrations they can be partially adsorbed and not completely transported to the RP–C<sub>18</sub> column in the washing step (water for 2 min). Therefore, the influence of natural colorants in the determination of three synthetic colorants (tartrazine, erythrosin B and brilliant black BN) was studied. In the determination of 1  $\mu\text{g ml}^{-1}$  of tartrazine, the natural yellow colorants curcumin,

---

riboflavin and trans- $\beta$ -carotene were tolerated up to concentrations of 150, 100 and 80  $\mu\text{g ml}^{-1}$  respectively; in the determination of 1  $\mu\text{g ml}^{-1}$  of erythrosin B, the natural red colorant carminic acid was tolerated up to 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ; caramel did not interfere in the determination of 1  $\mu\text{g ml}^{-1}$  of brilliant black BN at high concentrations such as 600  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . The influence of synthetic colorants in the determination of natural colorants was not studied because synthetic colorants were completely retained on the cotton material. In summary, the screening method can discriminate between natural and synthetic colorants and provides an extract of both types of colorants.

### *3.3. Optimization of the LC–DAD method*

Once information about the presence of natural and/or synthetic colorants in the samples is obtained with the screening method, these compounds must be identified. In order to discriminate, liquid chromatography must be used to separate each compound. Synthetic colorants were monitored by simultaneously using 400, 530 and 610 nm wavelengths; natural colorants were monitored at 425, 500 and 610 nm. A flow system similar to that of the screening method was used, however it must be modified so that it is compatible with the chromatographic system. In the screening method the colorants adsorbed in the column are continuously eluted and carried to the flow cell where its signal is measured when the analytes reach maximum concentration. But only a small volume (a few microliters) of the eluent is injected into the chromatograph, making it vital to

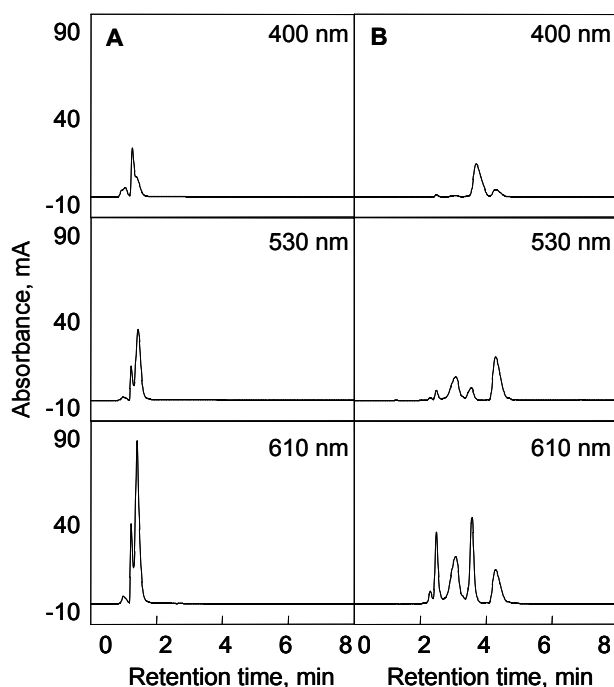
select the fraction of the eluate that has the highest concentration of analytes to increase the sensitivity of the chromatographic method. To ensure higher sensitivity in the proposed flow system, a few small changes are made including the addition of a third injection valve (IV<sub>3</sub>) that allows for elution using only small volumes of eluent (Fig. 1). The eluent, NH<sub>3</sub> for synthetic and methanol for natural colorants, was carried by a N<sub>2</sub> stream and its volume was varied by changing the IV<sub>3</sub> loop. The results are listed in Table 1. Desorption efficiency increased by increasing the injected volume up to 175 μl (diluted to a constant final eluent volume), above which the analytical signals for each colorant remained constant. In a second study of eluent volume without dilution to a constant final volume, chromatographic signals increased by increasing volume up to 175 μl, but only remained constant between 175 and 225 μl, decreasing at higher volumes due to the increased dilution of desorbed analytes. The optimum eluent volume was set at 225 μl. To ensure that there was no carry-over two consecutive injections of 225 μl were injected into the sorbent column and after the first injection no carry-over was detected. In the next experiment the 225 μl eluent volume was divided in three fractions of 75 μl each, this being the percentage of eluted analytes calculated. In the second 75 μl injection about 68% of the synthetic colorants and about 75% of natural colorants were eluted, therefore this fraction was selected as eluate for injection in the chromatograph (20-μl).

### 3.3.1. Chromatographic conditions for synthetic colorants

According to the literature referenced in the bibliography, synthetic and natural colorants are more efficiently separated by adding an ion–interaction reagent (IIR) in the mobile phase because it modifies the RP–C<sub>18</sub> stationary phase [6,8,9,17,19]. The lipophilic chain of the IIR is adsorbed onto the RP–C<sub>18</sub> giving rise to a primary positively charged layer. The anion of the IIR is bound to the RP–C<sub>18</sub> column through electrostatic forces. The formation of an electrical double–layer adsorbed onto the original RP–C<sub>18</sub> material permits the retention of anionic and/or cationic species [19]. In the present work chromatographic conditions were optimized both with and without using an IIR. Experiments performed in reversed–phase mode without IIR did not separate the synthetic colorants because they were poorly retained (demonstrating the importance of ion–interaction mechanisms to retain colorants). Cetyl–trimethyl–ammonium bromide (CTAB) was selected as the IIR to ensure separation of all colorants in a reasonably short total analysis time.

Chemical, hydrodynamic and physical variables were studied by preparing standard solutions of synthetic colorants (tartrazine, erythrosin B, lissamine green B, brilliant blue FCF, indigo carmine and brilliant black BN) in 1 mol l<sup>-1</sup> acetic acid/sodium acetate solution and using the flow system of Fig. 1 (cotton column and NH<sub>3</sub> as eluent). All the solvent mixtures (mobile phase) contained distilled water with CTAB at a concentration of 10 x 10<sup>-4</sup> mol l<sup>-1</sup>, at pH 7.0. Acetonitrile (ACN)–based solvents were preferred to methanol–based solvents because of their higher elution strengths as well as the lower column pressure they created.

The concentration of ACN, greatly affected the retention times ( $t_R$ ) of the colorants and therefore the resolution ( $R_s$ ). In the range of ACN concentrations studied (from 25% to 100%, v/v), increased ACN content reduced the  $t_R$  of the colorants from 24 min to 2.6 min for brilliant black BN (the last colorant eluted). The mobile phase containing 50% ACN and 50% distilled water was considered to be the best. In these conditions, the pH of the mobile phase was studied over the pH range allowed by silica-based stationary phases RP-C<sub>18</sub>, pH 3.0 – 8.0 and adjusted with orthophosphoric acid or sodium hydroxide. A mobile phase buffered at pH 5.5 was considered optimum. Because erythrosin B might precipitate in the acid solution [11] which was chosen for this study and furthermore it is not permitted in dairy samples (used to validate this method) it was not used in further studies. The effect of the IIR concentration on separation was examined over the range  $3 - 50 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ . Within this range, if the amount of IIR was increased, higher number of active sites was available to ion-interact with the analytes, which resulted in longer  $t_R$ . The IIR concentration also influenced the sensitivity, which was much lower at the highest IIR concentration examined. The optimal IIR concentration was  $8 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ . Several gradients of mobile phase were performed to optimize the separation of colorants. The optimal gradient consisted of an initial ACN concentration 45% increased to 55% in 6.5 min, then increased to 65% and finally held for 1.5 min. To confirm that IIR retention mechanisms are really happening, an experiment was performed with the same mobile phase composition, viz. ACN-water (50:50, v/v, pH 5.5), but without IIR (Fig. 2A). Under these conditions the colorants could not be separated and coeluted, as confirmed



**Fig. 2.** Chromatograms for synthetic colorants ( $0.2 \mu\text{g ml}^{-1}$  of lissamine green B and brilliant blue FCF, and  $0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  of indigo carmine, tartrazine and brilliant black BN) eluted with a mobile phase without ion–interaction reagent (A) and with ion–interaction reagent (B). Peaks: (1) lissamine green B, (2) indigo carmine, (3) brilliant blue FCF, (4) tartrazine and (5) brilliant black BN.

by the diode array spectra. Fig. 2B shows the discrimination of the colorants with IIR. It was shown that flow rate significantly influenced the  $t_R$  of the analytes. The best mobile phase flow value was  $2.0 \text{ ml min}^{-1}$  (column pressure  $200 \text{ N m}^{-2}$ ) due to the better  $t_R$  and adequate  $R_s$  for all synthetic colorants. Higher flow rates caused overpressure in the system. To study the role of temperature on the LC separation, experiments were carried out between  $25^\circ\text{C}$  and  $60^\circ\text{C}$ . It was observed that when the temperature increases colorants were exchanged more quickly between stationary and mobile phases. The best temperature range lies



between 25 and 30°C, and 25°C was selected for further experiments. Finally, two injection volumes were tested (5 and 20  $\mu\text{l}$ ), with greater sensitivity using the 20  $\mu\text{l}$  injection volume.

### 3.3.2. Chromatographic conditions for natural colorants

A study, similar to the developed for synthetic colorants, was done for the chromatographic separation of natural colorants. The separation was investigated with and without the use of an ion–interaction reagent (IIR) in the mobile phase. As was the case with synthetic colorants, it was impossible to separate natural colorants without using an IIR.

The variables were studied by preparing standard solutions of natural colorants (curcumin, riboflavin, trans- $\beta$ -carotene, carminic acid and caramel) in 1 mol l<sup>-1</sup> acetic acid/sodium acetate solution and using the Fig. 1 flow system. Different organic solvents, and mixtures of them, were tested as the mobile phase. All the mixtures of solvents contained distilled water with CTAB at a concentration of 5 x 10<sup>-4</sup> mol l<sup>-1</sup>, at pH 7.0. Methanol-based solvents were preferred to ACN-based solvents because analytes were separated more efficiently with this solvent. Based on the retention data and the  $R_s$ , the eluent containing 85% methanol was found to be the best for separating four colorants (curcumin, riboflavin, carminic acid and caramel). Since trans- $\beta$ -carotene is insoluble in water, eluent systems that consisted of ACN or methanol were tested, and ethyl acetate, dichlorometane, 2-propanol or tetrahydrofuran were used as modifiers to

control the eluotropic strength [10]. Adding water to the mobile phase was avoided because of the scant solubility of trans- $\beta$ -carotene in water and, consequently, the possibility of its precipitation in the RP-C<sub>18</sub> column. Adding ethyl acetate to methanol improved the sample's capacity, chromatographic efficiency and column shell life. Systematically modifying the mobile phase to optimize separation of trans- $\beta$ -carotene, led to a significant decrease in the proportion of methanol (20%), mixed with ethyl acetate (80%). In these conditions, the pH of the mobile phase that contained water was studied over the range pH 3.0 – 8.0. The optimum mobile phase pH was 6.0, giving the best  $R_s$  and reasonable total analysis time. The effect of IIR concentration, which is correlated to the extent of surface modification, was examined over the range  $1 - 50 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ . A concentration of  $2 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$  was the optimal combination for  $R_s$  of colorants, together with adequate sensitivity. To confirm that IIR retention mechanisms are really taking place, an experiment was performed with the optimized mobile phase composition but without IIR. Under these conditions results similar to those recorded for synthetic colorants (see Fig. 2A) were obtained: the colorants could not be separated and coeluted, as confirmed by diode array spectra. The best flow value was  $1.0 \text{ ml}^{-1} \text{ min}$  (column pressure  $125 \text{ N m}^{-2}$ ) due to the better  $t_R$  and an adequate  $R_s$  for all the natural colorants. The influence of the column temperature was also studied with similar results as those obtained for synthetic colorants as listed in Table 1.

### 3.4. Analytical features of the LC–DAD discrimination method

By using the manifold depicted in Fig. 1 and the conditions given in Table 1, several calibration curves for ten colorants permitted in dairy products were run. The figures of merit of the calibration graphs are summarized in Table 2. Despite the fact that the volume of the preconcentrated sample (3 ml) and the eluent (75  $\mu$ l, second fraction) were the same, the sensitivity (slope of the calibration graph) is greater for synthetic colorants than for natural colorants. This is because in equal concentrations synthetic colorants are always more intense than natural colorants [2]. Correlation coefficients ranged from 0.990 to 0.999. Detection limits (DL), defined as the minimum concentrations providing a chromatographic signal three times higher than background noise (at the prevailing retention times), are also listed in Table 2; DLs were less than 1  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> for all colorants (omitting caramel). Caramel had the highest DL, despite the fact that the quantitative parameters were calculated at 425 nm (the highest sensitivity zone) and not 610 nm (used in the screening method), but is 20 times less than the recently published results obtained with other methods for the determination of caramel (DL, 100  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) [9]. Within–day precision (repeatability), expressed as relative standard deviation, was calculated for 11 standard solutions containing 1  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> of synthetic colorants and 5  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> (25  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> for caramel) of natural colorants, and ranged from 3.2 to 6.5%. The preconcentration factor of the method was calculated as the ratio between the slopes of the calibration graphs obtained by injecting 20  $\mu$ l of the extract from the flow system or 20  $\mu$ l of standards (in NH<sub>3</sub> or

methanol medium for synthetic or natural colorants, respectively) into the chromatograph. The mean values of these factors were 17 for synthetic and 15 for natural colorants.

**Table 2.** Analytical figures of merit for the determination of synthetic and natural colorants by LC–DAD method.

Synthetic colorants	400 nm		530 nm		610 nm		Linear range <sup>a</sup> ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Detection limit <sup>a</sup> ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	RSD (%)
	Slope	Interc.	Slope	Interc.	Slope	Interc.			
Tartrazine	31.8	-0.2	–	–	–	–	0.09 – 8	0.02	3.2
Lissamine green B	2.3	-0.04	21.2	0.2	161.0	0.4	0.02 – 2	0.006	4.9
Indigo carmine	1.0	-0.03	20.9	-0.02	48.0	-0.5	0.06 – 5	0.02	5.8
Brilliant blue FCF	4.6	-0.1	25.2	0.4	210.6	-0.02	0.01 – 2	0.002	3.2
Brilliant black BN	6.2	0.3	42.5	-0.2	33.1	-0.2	0.09 – 8	0.03	6.5
Natural colorants	425 nm		500 nm		610 nm		Linear range <sup>a</sup> ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Detection limit <sup>a</sup> ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	RSD (%)
	Slope	Interc.	Slope	Interc.	Slope	Interc.			
Riboflavin	10.2	-0.008	5.2	-0.10	1.6	-0.003	0.2 – 20	0.05	3.3
Caramel	0.12	-0.0001	0.05	-0.002	0.006	-0.0002	15 – 1500	5	6.1
Carminic acid	13.4	-0.10	34.7	0.02	6.1	-0.08	0.1 – 10	0.02	3.2
Curcumin	1.4	-0.009	–	–	–	–	2 – 200	0.5	4.8
Trans- $\beta$ -carotene	4.1	0.012	–	–	–	–	0.5 – 50	0.15	3.7

<sup>a</sup>, the linear range and detection limit correspond to the most sensitive wavelength.

Frequently, a variety of additives such as preservatives, acidulants, antioxidants and sweeteners are added into dairy samples. A mixture of commonly used additives including benzoic, sorbic, citric, malic and ascorbic acids, tert-butyl-4-hydroxyanisole, 2,6-di-tert-butyl-p-hydroxytoluene, sorbitol and aspartame, at a concentration of  $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ , was passed through the flow

system and then the extract was injected into the chromatograph under the specified experimental conditions for natural and synthetic colorants. Likewise, a mixture of possible interfering compounds and the ten quantified colorants was analyzed. The interfering compounds did not have an effect in either case, indicating that they do not compete with colorants for active sites on the sorbent columns; moreover, although they could be sorbed and eluted with the analytes they would not be detected in the chromatogram as they do not absorb in the visible zone of the spectrum.

### *3.5. Analysis of dairy samples*

The proposed LC–DAD method was used to confirm and identify the presence of synthetic and/or natural colorants in dairy samples that gave positive responses during screening. The labels on the dairy samples indicated what natural or synthetic colorants were contained but not the amounts; the positive list of colorant additives for dairy products limits the concentrations at 150 mg kg<sup>-1</sup> for all synthetic colorants studied (tartrazine, lissamine green B, brilliant blue FCF, indigo carmine and brilliant black BN), and for curcumin and carminic acid, while riboflavin, trans-β-carotene and caramel were allowed at quantum satis [4]. The results of the screening and discrimination methods are listed in Table 3. Positive samples were quantified using three aliquots of each food sample analyzed in duplicate (n=6). The proposed LC–DAD method allows the individual identification (using each peak's spectra) and quantification of all colorants presented in the

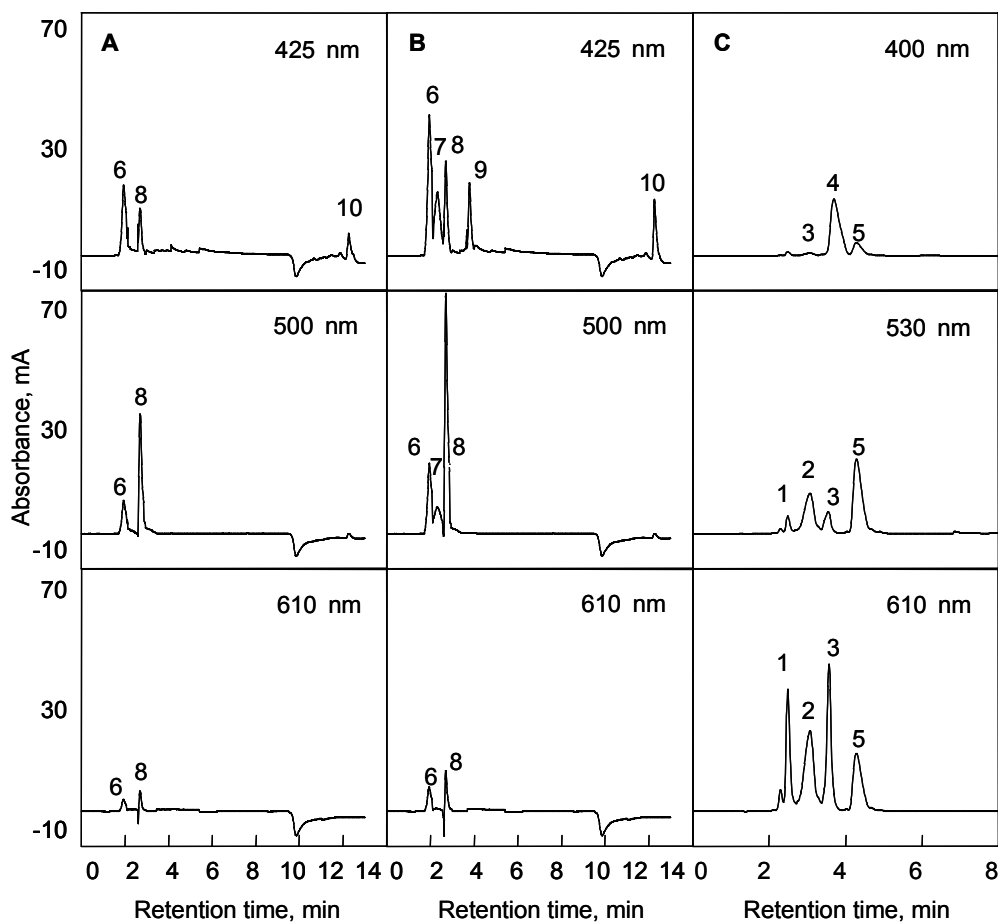
**Table 3.** Application of the screening and discrimination LC–DAD methods to dairy samples.

Sample	Colorant that appears on label		Screening response (synthetic)	Screening response (natural)	Concentration found by LC–DAD <sup>a</sup>
<b>Yogurt</b>					
Lemon	Natural yellow	Curcumin	Negative	Positive	172 ± 9
Peach	Natural yellow	Curcumin	Negative	Positive	205 ± 10
	Natural red	Carminic acid	Negative	Positive	18.5 ± 0.7
Strawberry	Natural red	Carminic acid	Negative	Positive	22 ± 1
Nuts and oats	Natural brown	Caramel	Negative	Positive	653 ± 40
Pineapple	Natural yellow	Trans-β-carotene	Negative	Positive	44 ± 2
Apricot and mango	Natural yellow	Curcumin	Negative	Positive	250 ± 12
	Natural yellow	Trans-β-carotene	Negative	Positive	42 ± 2
<b>Ice cream</b>					
Iced lemon fruit	Synthetic yellow	Tartrazine	Positive	Negative	6.8 ± 0.3
	Synthetic green	Lissamine green B	Positive	Negative	1.6 ± 0.1
Lemon	Synthetic yellow	Tartrazine	Positive	Negative	38 ± 2
Pistachio	Synthetic yellow	Tartrazine	Positive	Negative	28 ± 1
	Synthetic blue	Indigo carmine	Positive	Negative	14.8 ± 0.9
Vanilla	Natural yellow	Riboflavin	Negative	Positive	51 ± 2
	Natural yellow	Trans-β-carotene	Negative	Positive	30 ± 2
Fruits	Natural yellow	Riboflavin	Negative	Positive	50 ± 2
	Natural yellow	Trans-β-carotene	Negative	Positive	37 ± 2
	Natural red	Carminic acid	Negative	Positive	26 ± 1
<b>Milkshake</b>					
Vanilla 1	Natural yellow	Curcumin	Negative	Positive	85 ± 4
	Natural red	Carminic acid	Negative	Positive	24 ± 1
Vanilla 2	Natural yellow	Riboflavin	Negative	Positive	66 ± 3
	Natural yellow	Trans-β-carotene	Negative	Positive	23 ± 1
Strawberry	Natural red	Carminic acid	Negative	Positive	24 ± 1
<b>Dairy dessert</b>					
Yogurt flavor	Synthetic yellow	Tartrazine	Positive	Negative	5.3 ± 0.3
	Synthetic blue	Indigo carmine	Positive	Negative	1.8 ± 0.1

<sup>a</sup>, average values ± standard deviation (n=6) in mg kg<sup>-1</sup> food.

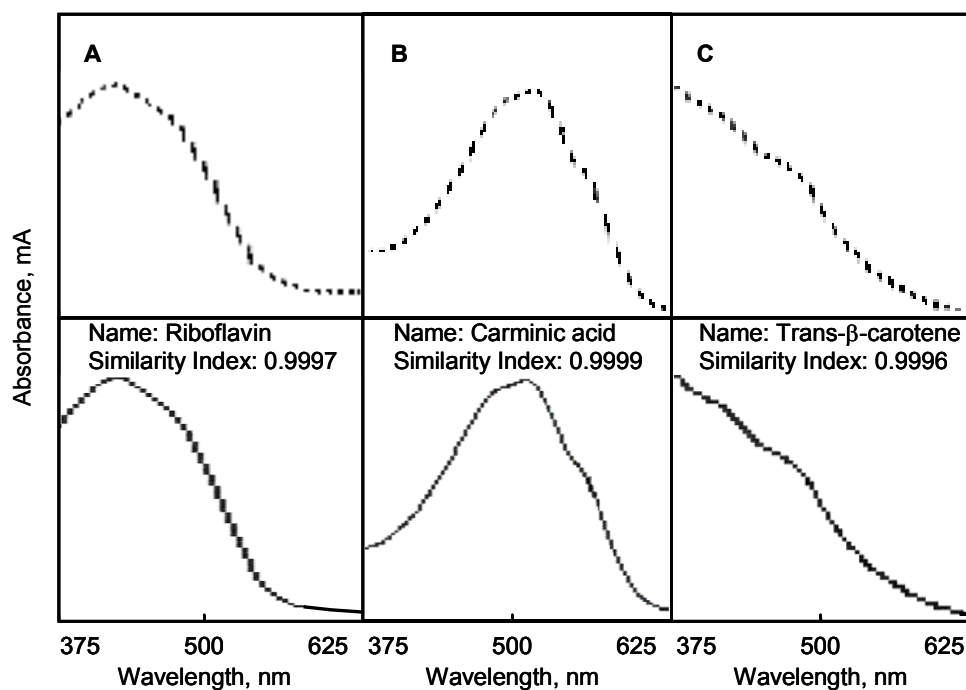
sample. No samples containing mixtures of synthetic and natural colorants were found and in every sample tested the colorants were within the legal limits.

A recovery test was performed with spiked samples to validate the LC–DAD method. Before treatment all the different matrices (yogurts, ice creams, milk–shakes and dairy dessert) were spiked with 5 mg of lissamine green B and brilliant blue FCF, 12.5 mg of tartrazine, indigo carmine and brilliant black BN, 25 mg of carminic acid, 50 mg of riboflavin and trans- $\beta$ -carotene, 500 mg of curcumin and 3750 mg of caramel per kilo of food and then analyzed in quintuplicate. High recoveries were obtained in all instances: mean values ranged from 90.9 to 104.3%. The matrix did not interfere at the wavelengths used for identification and quantification. Fig. 3 shows the chromatograms obtained in the analysis of a fruit ice cream sample and the same sample spiked with all the colorants at the same concentrations used in the recovery test. When the sample was spiked with synthetic colorants, the natural colorants in the sample (riboflavin, trans- $\beta$ -carotene and carminic acid) were not retained on the cotton column, thus they were undetected in the synthetic extract analyzed by LC. In addition the identification of riboflavin, carminic acid and trans- $\beta$ -carotene in this sample was carried out by comparing the UV–visible spectra of the peaks with that obtained from the chromatograph library; as can be seen in Fig. 4, there is at least a 99% similarity between the compared spectra for all of the colorants.



**Fig. 3.** Chromatograms for natural colorants in a fruit ice cream sample (A) and the same sample spiked with five natural colorants (B) and with five synthetic colorants (C). See text for details. Peaks: (1) lissamine green B, (2) indigo carmine, (3) brilliant blue FCF, (4) tartrazine, (5) brilliant black BN, (6) riboflavin, (7) caramel, (8) carminic acid, (9) curcumin and (10) trans- $\beta$ -carotene.



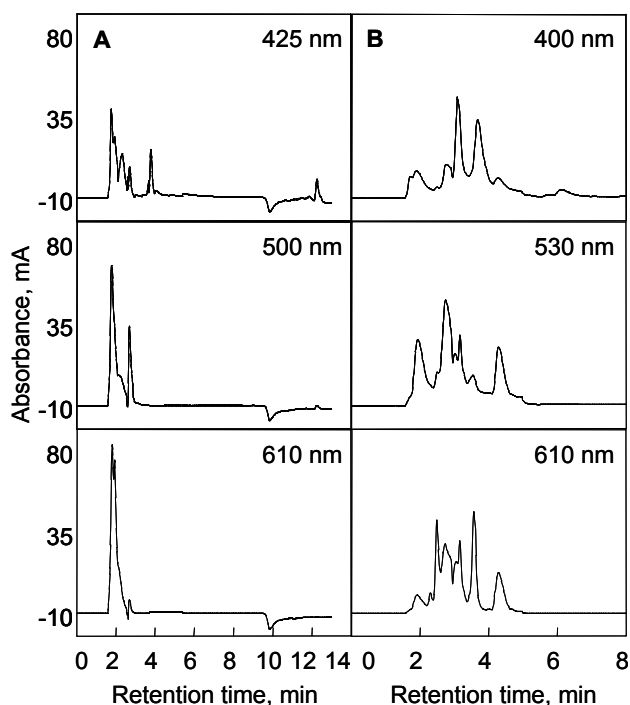


**Fig. 4.** UV-Visible spectra for riboflavin (A), carminic acid (B) and trans-β-carotene (C) in a fruit ice cream sample (whose chromatogram is shown in the Fig. 2) compared with the spectra obtained from the chromatograph library.

#### 4. CONCLUSIONS

A robust and automatic sample screening system which provides a reliable response to natural or synthetic colorants in dairy samples with minimal pretreatment of samples was developed; the binary response is related to the detection limit of the method (6 – 15 or 25 – 10000 ng ml<sup>-1</sup> for synthetic or natural colorants, respectively). If it gives a positive result, the sample is analyzed with the discrimination method. This method discriminates among mixtures of colorants of the same or different colors. In addition, each colorant can be identified by their absorption spectrum using the LC-DAD method. If the screening method confirms

that the sample only contains one type of colorant, the LC–DAD method can be simplified by using only the sorbent column (in the flow system) and mobile phase necessary for that type of colorant. Screening greatly simplifies the LC–DAD method because, as indicated in Fig. 5, when a mixture of the colorants in  $\text{NH}_3$  is injected into the chromatograph using the optimum conditions for either synthetic or natural colorants the mixture is not resolved. Finally, ion – interaction



**Fig. 5.** Chromatograms of a mixture of natural ( $15 \mu\text{g ml}^{-1}$  of carminic acid,  $30 \mu\text{g ml}^{-1}$  of riboflavin and  $\text{trans-}\beta\text{-carotene}$ ,  $300 \mu\text{g ml}^{-1}$  of curcumin and  $2250 \mu\text{g ml}^{-1}$  of caramel) and synthetic ( $4 \mu\text{g ml}^{-1}$  of lissamine green B and brilliant blue FCF and  $\mu\text{g ml}^{-1}$  of tartrazine, indigo carmine and brilliant black BN) colorants eluted with the optimized mobile phase for the complete separation of natural colorants (A) and synthetic colorants (B). See text for details.

chromatography is well suited for the analysis of all colorants, if conditions are chosen in which the ionized analytes are able to form ion-pairs with cetyl-trimethyl-ammonium bromide while minimizing the interference of other compounds. The IIR-LC method offers efficient separation of colorants if the delicate equilibrium between the mobile and stationary phase is carefully controlled: it is necessary to stabilize the flow rate as well as to carefully control the mobile phase pH, which has an important effect on the overall separation process.

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

This work was supported by grant BQU 2001-1815 from Spain's DGICYT. M. González also wishes to thank the Plant Physiology Laboratory, Instituto Canario de Investigaciones Agrarias (I.C.I.A.), Spain for their support in this research.

## REFERENCES

- [1] T. E. Furia (Ed.), *CRC Handbook of Food Additives*, 2<sup>nd</sup> edn., Volume II, CRC Press, Inc., Florida, 1980.
- [2] C. Warner, J. Modderman, T. Fazio, M. Beroza, G. Schwartzman, K. Fominaya, *Food Additives Analytical Manual*, Volume I, AOAC International, Arlington VA, 1983.
- [3] Diario Oficial de las Comunidades Europeas, No. L.237, 10.9.94, pp. 13.
- [4] Code of Federal Regulations Title 21, US Government Printing Office, Washington, DC, Revised 1 April, 2001, Parts 70–82.
- [5] P. Ashkenazi, C. Yarnitzky, M. Casi, *Anal. Chim. Acta* 248 (1991) 289.
- [6] M. C. Gennaro, C. Abrigo, G. Cipolla, *J. Chromatogr. A* 674 (1994) 281.
- [7] F. E. Lancaster, J. F. Lawrence, *J. Chromatogr. A* 732 (1996) 394.
- [8] J. J. Berzas–Nevado, C. Guiberteau–Cabanillas, A. M. Contento–Salcedo, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 20 (1997) 3073.
- [9] J. S. Coffey, H. E. Nursten, J. M. Ames, L. Castle, *Food Chem.* 58 (1997) 259.
- [10] M. Weissenberg, A. Levy, I. Schaeffler, E. Menagem, M. Barzilai, *Chromatographia* 46 (1997) 399.
- [11] Q. C. Chen, S. F. Mou, X. P. Hou, J. M. Riviello, Z. M. Ni, *J. Chromatogr. A* 827 (1998) 73.
- [12] J. Oliver, A. Palou, *J. Chromatogr. A* 881 (2000) 543.
- [13] A. K. Hewavitharana, *Analyst* 121 (1996) 1671.
- [14] R. N. Carvalho, C. H. Collins, *Chromatographia* 45 (1997) 63.

- [15] A. Gliszczynska–Swiglo, A. Koziolowa, *J. Chromatogr. A* 881 (2000) 285.
- [16] X. G. He, L. Z. Lin, L. Z. Lian, M. Lindenmaier, *J. Chromatogr. A* 818 (1998) 127.
- [17] M. R. Fuh, K. J. Chia, *Talanta* 56 (2002) 663.
- [18] E. J. M. Konings, H. H. S. Roomans, *Food Chem.* 59 (1997) 599.
- [19] S. Angelino, A. F. Fell, M. C. Gennaro, *J. Chromatogr. A* 797 (1998) 65.
- [20] F. Miyamoto, M. Saeki, M. Kamijo, H. Kanda, T. Nakaoka, M. Nishijima, Y. Ito, R. Takeshita, *Eisei Kagaku* 37 (1991) 542.
- [21] T. Watanabe, S. Terabe, *J. Chromatogr. A* 880 (2000) 311.
- [22] M. Valcárcel, S. Cárdenas, M. Gallego, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 30 (2000) 345.
- [23] M. Valcárcel, S. Cárdenas, M. Gallego, *Trends Anal. Chem.* 18 (1999) 685.
- [24] M. González, M. Gallego, M. Valcárcel, *Anal. Chim. Acta* 464 (2002) 237.
- [25] V. Ratsimba, J. M. García–Fernández, J. Defaye, H. Nigay, A. Voilley, *J. Chromatogr. A* 844 (1999) 283.
- [26] K. Hofer, D. Z. Jenewein, *Lebensm. Unters. Forsch. A* 204 (1997) 32.



Journal of Agricultural and Food Chemistry (aceptado para publicación)

## Liquid chromatographic determination of natural and synthetic colorants in lyophilized foods using an automatic solid–phase extraction system

Mónica González, Mercedes Gallego and Miguel Valcárcel\*

*Department of Analytical Chemistry, Campus de Rabanales, University of Córdoba, E–14071 Córdoba, Spain. E–mail: qa1meobj@uco.es; Fax: +34 957 218606; Tel: +34 957 218616*

### **Abstract**

Five synthetic and five natural colorants were determined in lyophilized dairy products and fatty foods using an automatic method based on lixiviation and solid–phase extraction process that includes cotton and RP–C<sub>18</sub> columns for the sequential retention of synthetic colorants and natural colorants, respectively. The lyophilization of the sample coupled with the separation procedure provides clean extracts despite the complexity of the matrixes studied. In addition, the lyophilization process preserves the sample for at least two months without changes in the concentrations of the colorants. Identification and determination of synthetic and natural colorants were carried out using a liquid chromatograph equipped with a diode array detector. The detection limits achieved for all the colorants (0.03 – 75 µg per gram of lyophilized sample) allowed their determination within the limits established by the European Union, with good precision ( $\approx$  4.5%). In addition, colorants spiked to different foods provided average recoveries (spiked at three concentration levels in four types of dairy samples and in three types of fatty foods) near  $94 \pm 4\%$ .

**Keywords:** Natural and synthetic colorants; Dairy products and fatty foods; Solid–phase extraction; Liquid chromatography with diode array detection

## 1. INTRODUCTION

For a consumer, the color of food is one of its most important characteristics. Since it predetermines certain expectations of quality and flavor, a product with an unexpected color will be rejected. It is normal practice to add colorants to enhance, homogenize or even change the color of food to make it more attractive to consumers [1]. Food colorants are usually classified as either natural (or nature-identical) or synthetic. Natural colorants generally have a lower tinctorial strength than synthetic colorants and are generally more sensitive to light, temperature, pH and redox agents [2]. Both the compounds used as color additives and their concentration limits are subject to regulations in the European Union and the United States [3,4]. Therefore, the need for analytical control of colorants to ensure that banned additives are not present in food and to determine those permitted by regulations is becoming more important.

Simple and rapid methods for the separation and determination of natural and synthetic colorants are required. The preferred choice for the resolution of mixtures of colorants is often liquid chromatography (LC) [5–22], normally coupled with a diode-array detector (DAD) for confirmation [7,11,14,17–22].

Foods have very complex matrixes; for example, samples that contain high concentrations of proteins or high concentrations of fats can complicate the extraction of both natural and synthetic colorants and some of the particles of the food that pass to the extract can block the sorbent columns of solid phase extraction and chromatographic systems. To provide clean extracts, these foods require a pre-treatment that usually includes extraction or protein precipitation and cleanup



processes that are normally tedious and time-consuming. Basically, a homogenized sample (rich in proteins and/or in fats) is extracted, once or several times, using a single solvent [9,11–13] or a solvent mixture [10,18,21], or the proteins are eliminated by precipitation by adding a solvent [6,11,19,20,22] or by enzymatic treatment [5,8]. Usually, additional cleanup steps such as dialysis [6,9], liquid–liquid extraction [10,12,13,18] and/or solid–phase extraction [5,8,9,19] are necessary, prior to injecting the sample into the liquid chromatograph, to remove co-extractives that could interfere with the colorants during chromatographic separation. The solid–phase extraction (SPE) can be applied on polyamide [5] or on RP–C<sub>18</sub> [8,9,19]. Recently, our group developed a screening method that discriminates between synthetic colorants and natural food colorants [22]. That method uses a continuous–flow system designed to condition dairy samples (previously pretreated manually) in order to remove the sample matrix as well as to pre-concentrate colorants before their discrimination/identification in a liquid chromatographic system.

All the methods that have been developed to date are based on directly extracting colorants from foods. However, pre-treating food samples using lyophilization prior to extraction, has two principal advantages: the first is in sample preservation because lyophilization increases the stability of the samples without loss of analytes; second, the lyophilized sample has a more homogeneous and accessible matrix. In this paper, the SPE system proposed elsewhere [22] for dairy samples screening was initially adopted to determine five synthetic and five natural colorants in dairy samples (with high protein content) and fatty foods (with high fat content) without modifying the procedure in any way for the different

---

sample matrixes. The proposed method implements a sample lyophilization step prior to automatic lixiviation with a single solvent (1 mol l<sup>-1</sup> of acetic acid/sodium acetate buffer) which is then followed by preconcentration and cleanup on a miniaturized cotton column for synthetic colorants and RP-C<sub>18</sub> column for natural colorants. The method is rapid and does not require either laborious sample manipulation or use of a complicated SPE system.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Apparatus

A Shimadzu modular liquid chromatographic system (Kyoto, Japan), equipped with a LC-10 AD pump, a SPD-M6A UV-visible diode array detector, equipped with a low-volume flow cell (pathlength 10 mm, inner volume 8 µl) and a Rheodyne model 7725i injector with a sample loop of 20 µl was used for the chromatographic analysis of both natural and synthetic colorants. This system was controlled via Class LC-10 software (also from Shimadzu). Separations were done using a Spherisorb ODS-2 RP-C<sub>18</sub> (5 µm, 25 cm x 4.6 mm i.d.) column (Alltech, Deerfield, IL) fitted with a Spherisorb ODS-2 (5 µm, 7.5 x 4.6 mm i.d.) guard column. All analysis was performed at room temperature. The mobile phase gradient for natural colorants consisted of an initial mixture of 85% methanol and 15% water containing 0.07 g l<sup>-1</sup> (2 x 10<sup>-4</sup> mol l<sup>-1</sup>) of cetyl-trimethyl-ammonium bromide (as ion-interaction reagent, IIR), adjusted to pH 6.0 with ortophosphoric acid and held for 3 min. Then the mixture was changed to 20% methanol and 80%

ethyl acetate, and maintained for 10 min. The mobile phase flow rate was 1.0 ml min<sup>-1</sup>. For synthetic colorants, the optimized mobile phase consisted of a mixture of acetonitrile (ACN) and water containing 0.29 g l<sup>-1</sup> (8 x 10<sup>-4</sup> mol l<sup>-1</sup>) of cetyl-trimethyl-ammonium bromide (adjusted to pH 5.5 with ortophosphoric acid). The gradient consisted of an initial ACN concentration of 45% increased to 55% in 6.5 min, then immediately increased to 65% and maintained for 1.5 min, and the flow rate was 2.0 ml min<sup>-1</sup>.

The chromatographic system for both synthetic and natural colorants was conditioned by passing the mobile phase through the column until a stable baseline was obtained (20 min at a flow rate of 1.0 ml min<sup>-1</sup>). This procedure was followed for every new mobile phase used. Detection wavelengths for the diode array detector (DAD) were set at 425, 500 and 610 nm simultaneously for natural colorant analyses and 400, 530 and 610 nm simultaneously for yellow, red and green-blue-brown synthetic colorant, respectively, analyses. The spectra (detection wavelengths from 375 to 700 nm) were recorded for all peaks. The identities of the different chromatographic peaks were confirmed by comparing their visible spectral characteristics to standards and retention times. The efficiency of peak separation in samples was checked by the peak purity test carried out at maximum absorbance.

The flow system was made using a Gilson Minipuls-3 peristaltic pumps (Villiers-le-Bel, France) furnished with poly(vinyl chloride) and Solvaflex pumping tubes, for aqueous and methanolic solutions, respectively; three Rheodyne 5041 injection valves (Cotati, CA), one Rheodyne 5060 rotary valve, PTFE tubing of 0.5

---

mm i.d., standard connectors and laboratory-made sorbent columns. The sorbent columns were constructed from PTFE capillaries of 3 mm i.d., hand-packed with 80 mg of cotton or 100 mg of RP-C<sub>18</sub> for sorption of synthetic or natural colorants, respectively. These columns can be reused for at least three months, working daily. To prevent clogging of the sorbent columns, a stainless steel LC filter was fitted at the inlet of the aspiration sample channel.

A Selecta water bath (Barcelona, Spain), a Selecta magnetic stirrer with temperature control and a Telstar laboratory freeze-dryer type Cryodos-45 (Barcelona, Spain) were also employed.

## *2.2. Chemicals and standard solutions*

Synthetic colorants [tartrazine (E-102), lissamine green B (E-142), brilliant blue FCF (E-133), indigo carmine (E-132) and brilliant black BN (E-151)] and natural colorants [curcumin (E-100), riboflavin (E-101i), trans- $\beta$ -carotene (E-160a) and carminic acid (E-120)] were supplied by Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Because caramel color (Class I; E-150a) was not commercially available, it was obtained by treating glucose as follows: glucose (100 g) in Milli-Q water (10 ml) was heated in a stainless steel vessel up to 170°C for 170 min while stirring continuously [23]; color formation was monitored at 610 nm until color intensity ranged from 0.010 to 0.140 absorbance units. Color intensity was defined as the absorbance of a 0.1% w/v solution of caramel color solid in water in a 1 cm cell at 610 nm. When the color target was reached, additional water (50 ml) was added to cool down the caramel.

Cetyl–trimethyl–ammonium bromide, ascorbic acid and glucose were also purchased from Sigma–Aldrich. All other reagents (acetic acid, sodium acetate, ammonium hydroxide, ammonium acetate, orthophosphoric acid, sodium hydroxide, petroleum ether, ethanol, n–hexane, and HPLC–grade acetonitrile, methanol and ethyl acetate) were supplied from Merck (Darmstadt, Germany). Polygosyl–bonded silica reversed–phase sorbent with octadecyl functional groups (RP–C<sub>18</sub>), was obtained from Sigma–Aldrich. Natural cotton was washed with petroleum ether to eliminate the natural grease of the fiber [24].

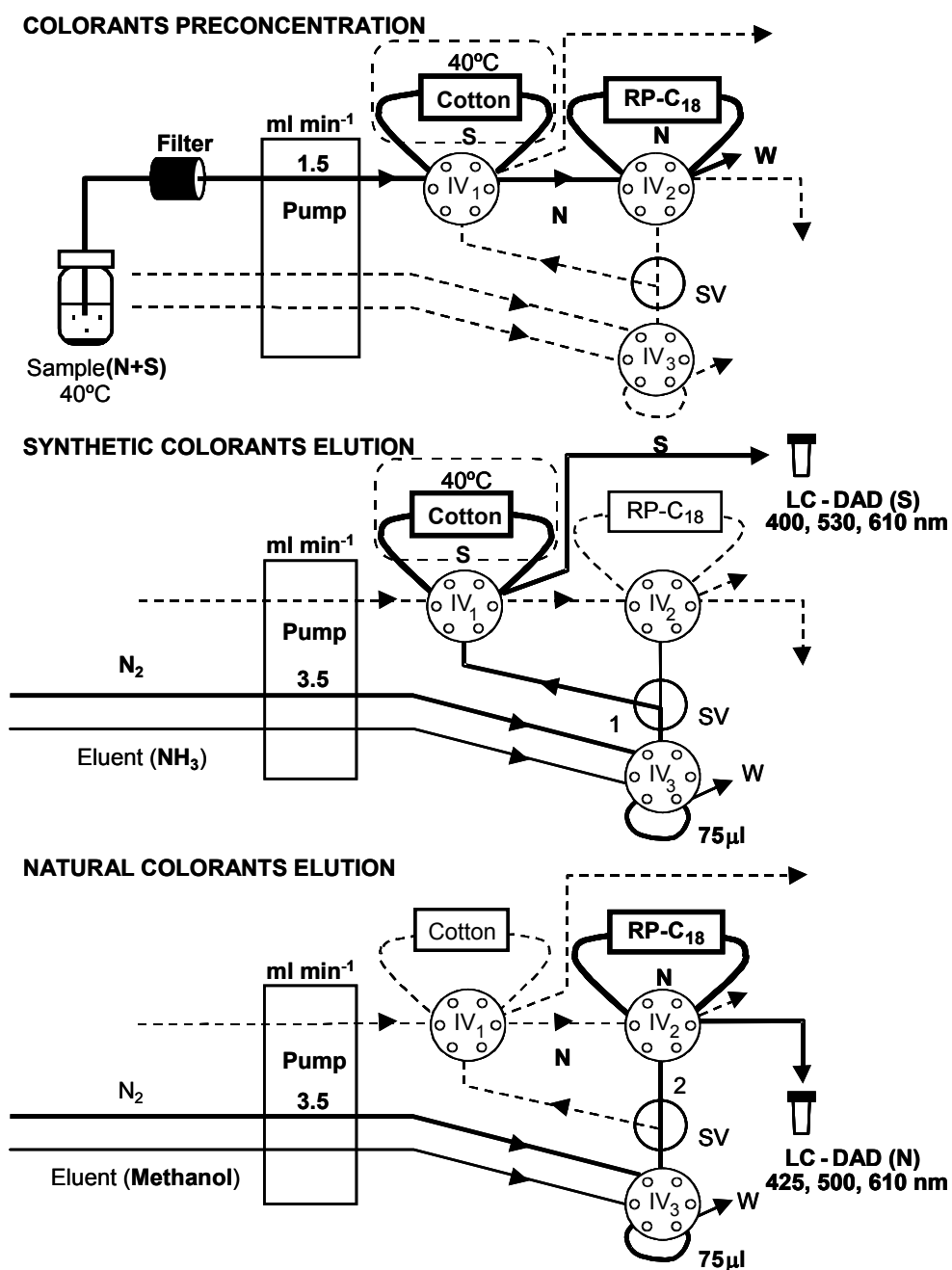
Stock standard solutions containing 1 mg ml<sup>-1</sup> of individual colorants (tartrazine, lissamine green B, brilliant blue FCF, indigo carmine, brilliant black BN and caramel) and 0.2 mg ml<sup>-1</sup> of riboflavin were prepared in Milli–Q water and 1 mg ml<sup>-1</sup> of curcumin, trans– $\beta$ –carotene and carminic acid in ethanol. All stock solutions were stored in glass–stoppered bottles at 4°C in the dark. Solutions of variable concentrations were prepared daily by diluting the stock standard solutions in 1 mol l<sup>-1</sup> of the acetic acid/sodium acetate buffer.

### *2.3. Sample preparation*

Dairy samples (yogurts, ice creams, milkshakes and dairy desserts) and fatty samples (sauces, dehydrated soups and bouillon cubes) were purchased at local markets in Spain. A laboratory sample of  $\approx$  100 g was homogenized in a high–speed blender and fractions of  $\approx$  25 g were lyophilized by freeze–drying at 50 mPa for 24 – 48 h (24 h for the dairy samples and 48 h for sauces). Laboratory

lyophilized samples, dehydrated soups and bouillon cubes were conserved in glass containers, at  $-80^{\circ}\text{C}$  in the dark, until analysis. Under these conditions, the concentration of colorants remained constant for at least two months.

The lyophilized sample was prepared by the following method. An accurately weighed amount of 0.1 – 2.5 g of lyophilized sample ( $n=6$ ) was placed into a 50–ml amber glass bottle (to protect light sensitive colorants) with 15 ml of 1 mol  $\text{l}^{-1}$  acetic acid/sodium acetate buffer. Since trans- $\beta$ -carotene oxidizes easily, when quantifying this colorant optimum results are achieved by adding a reducing agent such as ascorbic acid to the 15 ml of extractant at a concentration of 200  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Once stoppered, the mixture was mechanically shaken for 10 min and allowed to settle. Then, aliquots of the aqueous extract (3 ml) were continuously aspirated and filtered (through a stainless steel LC filter), which filtered the fine particles that were sometimes present in the extract, into the flow system shown in Fig. 1.



**Fig. 1.** Flow injection manifold for the on-line preconcentration of synthetic (S) and natural (N) colorants in dairy and fatty samples and their off-line determination by liquid chromatography. IV = injection valve; W = waste; SV = selecting valve; LC-DAD = liquid chromatograph-diode array detector.

#### 2.4. Analytical Method

Fig. 1 shows the continuous-flow system used for determination of synthetic and natural colorants. In the preconcentration step, 3 ml of a standard solution or a treated sample containing natural and/or synthetic colorants at concentrations  $0.01 - 200 \mu\text{g ml}^{-1}$  (omitting caramel; for lyophilized samples, concentrations between  $0.1 \mu\text{g g}^{-1}$  and  $3 \text{mg g}^{-1}$ ) in  $1 \text{mol l}^{-1}$  acetic acid/sodium acetate (pH 4.7) was passed through the cotton sorbent column. Both the sample and sorbent column were warmed at  $40^\circ\text{C}$ . Synthetic colorants were retained in the cotton column and the effluent containing natural colorants was passed through an RP-C<sub>18</sub> column for their retention. A volume of 1.5 ml of water was employed as carrier to complete sample introduction and to remove any potential interfering compound and other organic compounds adsorbed in both columns.

In the elution step for the discrimination of synthetic colorants the selection valve (SV) was in position 1 and the IV<sub>3</sub> (75  $\mu\text{l}$ ) loop filled with eluent ( $1 \text{mol l}^{-1}$  NH<sub>3</sub>). Two sequential injections of 75  $\mu\text{l}$  of  $1 \text{mol l}^{-1}$  NH<sub>3</sub> (from IV<sub>3</sub>) were carried by the N<sub>2</sub> stream and passed through the cotton column (in the opposite direction of the sample aspiration) to elute adsorbed synthetic colorants (position in bold lines in Fig. 1). Only the eluate of the second injection (containing the highest fraction of colorants) was collected into glass vials and a 20- $\mu\text{l}$  aliquot was manually injected into the liquid chromatograph. The cotton column was conditioned with 3 ml of  $1 \text{mol l}^{-1}$  buffer pH 4.7 and occasionally washed with 3 ml of ethanol (viz. after every 20 real samples). For the discrimination of natural colorants, the SV valve was in



position 2 and the IV<sub>3</sub> loop filled with the eluent, methanol. Two sequential 75 µl injections of the eluent were also carried by the N<sub>2</sub> stream and passed through the RP-C<sub>18</sub> column (in the opposite direction of the sample aspiration), to elute adsorbed natural colorants (position in bold lines in Fig. 1). Again, only the eluate of the second injection was collected into amber glass vials and a 20-µl aliquot was manually injected into the liquid chromatograph. The RP-C<sub>18</sub> column was conditioned with 1.5 ml of methanol and then with 3 ml of 1 mol l<sup>-1</sup> buffer pH 4.7 and occasionally washed with 3 ml of n-hexane (viz. after every 20 real samples). Peak height (as mA units) was used for quantification and a (20-µl) eluent blank was also used.

### 2.5. Statistical analysis

Analysis of variance was used to evaluate the recovery results obtained from the comparison between non-lyophilized and lyophilized samples and from the different type of analyzed samples, different colorants and the different level of spiked colorants used in the recovery test. Fisher's Least-Significant-Difference test (LSD) at the 5% significance level was applied to experimental results to assess intra-pair significant differences. Statistical analyses were carried out with the Systat version 10.2 statistical package (Systat Software Inc., Richmond, CA).

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1. Lyophilization of the foods

Dairy products and fatty foods contain an abundant amount of water (between 55 – 82%), which favors biodegradation and hydrolysis reactions. The lyophilization of samples provides at least three advantages: it facilitates both the storage and conservation of the samples, and simplifies the extraction procedure.

Preliminary experiments were focused on the lyophilization of the samples; pistachio ice cream and peach yogurt were selected as dairy sample tests and a sauce for chicken was selected for the fatty sample test. Each test sample was homogenized and then 1 g was treated according to a previous manual method for dairy samples developed by our group [22]: the sample was directly mixed with 5 ml of 0.1 mol l<sup>-1</sup> ammonium acetate containing 200 µg ml<sup>-1</sup> of ascorbic acid, magnetically stirred for 5 min and then centrifuged at 2000 rpm for 10 min to precipitate proteins; next, the supernatant was diluted to 25–ml with 1 mol l<sup>-1</sup> acetic acid/sodium acetate buffer and aliquots of the sample (3 ml) were aspirated into the flow system shown in Fig. 1. 1 g of each test sample was lyophilized at 50 mPa for 24 – 48 h (24 h for the dairy samples and 48 h for the fatty sample) and then the remainder of the sample was directly extracted with 25–ml of 1 mol l<sup>-1</sup> acetic acid/sodium acetate buffer (each sample lost water due to the lyophilization process leaving the following amounts of dehydrated powder: 0.39 g of pistachio ice cream, 0.19 g of peach yogurt and 0.30 g of sauce for chicken). The results of these experiments were validated by spiking the three homogenized test samples with the 10 colorants studied at concentrations (per

gram of non-lyophilized food) of  $5 \mu\text{g g}^{-1}$  of lissamine green B and brilliant blue FCF,  $12.5 \mu\text{g g}^{-1}$  of tartrazine, indigo carmine and brilliant black BN,  $25 \mu\text{g g}^{-1}$  of carminic acid,  $50 \mu\text{g g}^{-1}$  of riboflavin and trans- $\beta$ -carotene,  $250 \mu\text{g g}^{-1}$  of curcumin and  $1875 \mu\text{g g}^{-1}$  of caramel, and the recoveries for each colorant were calculated. The results of these experiments (repeated four times) were statistically analyzed and provided the following conclusions: (i) the studied synthetic and natural colorants were not evaporated or destroyed during the lyophilization process; (ii) although the percentages of recovery were similar ( $\approx 94\%$ ) in the two parallel sets, the precision was slightly higher in lyophilized samples than in non-lyophilized ones; (iii) the direct extraction of the lyophilized samples with  $1 \text{ mol l}^{-1}$  acetic acid/sodium acetate solution provided cleaner extracts than non-lyophilized samples and did not require the addition of ascorbic acid as reducing agent to minimize the oxidation of some colorants; and (iv) there were no significant differences in the recoveries for either of the sample matrices (dairy and fatty foods). Therefore, in further experiments all samples were lyophilized to simplify their pretreatment.

### *3.2. Solid-phase extraction method*

When a mixture of natural and synthetic colorants is injected into the liquid chromatograph using the optimum conditions for either synthetic or natural colorants the mixture is not resolved [22]. Instead, it is necessary to separate each type of colorant in two different extracts (one for natural and the other for

---

synthetic). For this reason, a solid-phase extraction system was developed elsewhere [22] based on the fact that synthetic colorants dye natural materials such as cotton while natural colorants do not. In order to discriminate colorants, liquid chromatography must be used to separate each compound; synthetic colorants were monitored by simultaneously using 400, 530 and 610 nm wavelengths, while natural colorants were monitored at 425, 500 and 610 nm for yellow, red and green-blue-brown additives, respectively. The most significant variables for the optimized SPE system [22] are listed in Table 1. Natural colorants were not retained on the cotton column between pH 1 – 10 whereas all synthetic colorants (tartrazine, lissamine green B, brilliant blue FCF, indigo carmine and brilliant black BN) studied were completely retained between pH 2.0 and 5.0 (adsorption efficiency ca. 100%); the sorbent column must be heated at 40°C to favor the adsorption of synthetic colorants. Natural colorants (curcumin, riboflavin, trans- $\beta$ -carotene, carminic acid and caramel) present in the effluent of the cotton column, as shown in Fig. 1, were completely retained on the RP-C<sub>18</sub> column also between pH 2.0 and 5.0 (adsorption efficiency ca. 100%). Therefore, a 1.0 mol l<sup>-1</sup> acetic acid/sodium acetate buffer at pH 4.7 was selected as the medium for sample adsorption and this solution was employed as extractant of the lyophilized sample. The best efficiency in the elution step was obtained by using ammoniacal and methanolic solutions for synthetic and natural colorants, respectively. The breakthrough volume of the sample, defined as the sample volume at which the analyte begins to elute from the column sorbent, was evaluated in the optimized SPE system in order to find the maximum sample

---

volume that can be used and, therefore, the maximum preconcentration factor possible. The results of this study showed that 3 ml was the breakthrough volume for both synthetic and natural colorants. A summary of the other chemicals and flow conditions studied are listed in Table 1.

**Table 1.** Chemical variables, flow variables and chromatographic conditions selected for the proposed method.

Variable	Synthetic colorants	Natural colorants
<b>Solid-phase extraction system</b>		
Sample pH	4.7	4.7
Acetic acid/sodium acetate concentration (mol l <sup>-1</sup> )	1.0	1.0
Eluent	NH <sub>3</sub> pH = 11.5	Methanol
Adsorption temperature (°C)	40	–
Amount of sorbent (mg)	80	100
Sample breakthrough volume (ml)	3.0	3.0
Sample flow rate (ml min <sup>-1</sup> )	1.5	1.5
Eluent volume (μl)	75	75
N <sub>2</sub> flow rate (ml min <sup>-1</sup> )	3.5	3.5
<b>Chromatographic conditions</b>		
Mobile phase composition	Acetonitrile:water	Methanol:water:ethyl acetate
IIR concentration (mol l <sup>-1</sup> )	8 x 10 <sup>-4</sup>	2 x 10 <sup>-4</sup>
Mobile phase pH	5.5	6.0
Flow rate	2.0	1.0
Injection volume (μl)	20	20
Wavelength (nm)	400, 530 and 610	425, 500 and 610

The chromatographic conditions selected for the determination of synthetic and natural colorants are shown in Table 1. As can be seen, the composition of the mobile phase varied according to the additive type. Synthetic colorants

needed an acetonitrile mobile phase, while natural colorants needed methanol and a modifier (ethyl acetate) to control the eluotropic strength. Both mobile phases required an ion–interaction reagent (IIR) that modifies the RP–C<sub>18</sub> stationary phase of the chromatographic column. The lipophilic chain of the IIR is adsorbed onto the RP–C<sub>18</sub> giving rise to a positively charged primary layer. The anion of the IIR is bound to the RP–C<sub>18</sub> column through electrostatic forces. The formation of an electrical double–layer adsorbed onto the original RP–C<sub>18</sub> material permits the retention of anionic and/or cationic species [14]. The IIR concentrations varied depending on whether it was the mobile phase for synthetic ( $8 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ) or natural ( $2 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ) colorants. The concentrations were optimized taking into account that colorant resolution was not possible at lower IIR concentrations and sensitivity was lower at higher IIR concentrations. Other chromatographic conditions are listed also in Table 1.

To ensure the applicability of the optimized SPE unit to real samples, 1 g aliquots of four test samples [two dairy samples (pistachio ice cream and peach yogurt) and two fatty foods (sauce for chicken and dehydrated onion soup)] were spiked (per gram of non–lyophilized food) with  $5 \mu\text{g g}^{-1}$  of lissamine green B and brilliant blue FCF,  $12.5 \mu\text{g g}^{-1}$  of tartrazine, indigo carmine and brilliant black BN,  $25 \mu\text{g g}^{-1}$  of carminic acid,  $50 \mu\text{g g}^{-1}$  of riboflavin and trans– $\beta$ –carotene,  $250 \mu\text{g g}^{-1}$  of curcumin and  $1875 \mu\text{g g}^{-1}$  of caramel, and then lyophilized. The lyophilized samples (0.39 g of pistachio ice cream, 0.19 g of peach yogurt, 0.30 g of sauce for chicken or 1.00 g of onion soup) were directly extracted with 25 ml of  $1 \text{ mol l}^{-1}$

acetic acid/sodium acetate buffer for 10 min. 3 ml of the extract were aspirated into the SPE system depicted in Fig. 1. The peaks corresponding to target compounds were correctly separated in the chromatograms from those corresponding to sample matrices, without overlapping. Therefore, the proposed system can be applied to the determination of synthetic and natural colorants in dairy products and fatty foods. Two important variables affecting extraction of synthetic and natural colorants from lyophilized samples, the volume of 1 mol l<sup>-1</sup> acetic acid/sodium acetate buffer (extractant) and the extraction time, were studied. For these purposes, several 1 g aliquots of the four lyophilized test samples were fortified with variable amounts of colorants, depending on the extractant volume, so that the concentration in the extract was constant. Next, they were extracted by mechanical shaking for different lengths of time (from 5 to 20 min), with volumes of 1 mol l<sup>-1</sup> acetic acid/sodium acetate buffer from 12 to 25 ml, taking account that soaking the dry material required at least 3 ml of buffer solution. 3 ml aliquots of the extract containing the same amount of colorants were continuously aspirated into the SPE system (3 µg of lissamine green B and brilliant blue FCF, 7.5 µg of tartrazine, indigo carmine and brilliant black BN, 15 µg of carminic acid, 30 µg of riboflavin and trans-β-carotene, 150 µg of curcumin and 1125 µg of caramel). Aliquots of 20-µl were injected into the LC-DAD instrument. In these experiments complete extraction was accomplished after 8 min for volumes at or above 15 ml. 15 ml of 1 mol l<sup>-1</sup> acetic acid/sodium acetate buffer

was selected as extractant (extraction time 10 min) taking into account the additional preconcentration provided by the lower volume.

Finally, to ensure the accuracy of the results, a parameter influencing the recovery of the natural and synthetic colorants was studied: the optimal spiking time (defined as the time of contact between spiked colorants and sample matrix previous to lyophilization, which is necessary to reproduce binding effects that occur in native colorants). Since no significant differences were observed between the recovery of each synthetic and natural colorant obtained at different spiking times (0, 1, 3, 6 and 24 h), 1 h was established as sufficient.

### *3.3. Features of the proposed automated method*

The colorants studied showed good liquid chromatographic properties. Analytical curves for synthetic and natural colorant standards were obtained by using a sample volume of 3 ml of 1 mol l<sup>-1</sup> acetic acid/sodium acetate buffer containing variable concentrations (0.01 – 200 µg ml<sup>-1</sup>, excluding caramel which was linear up to 1500 µg ml<sup>-1</sup>) and the SPE system depicted in Fig. 1. The sensitivity of the method, expressed as the slope of the calibration graphs, and the linear range, calculated using 1 g of lyophilized lemon mousse dessert which had been spiked with all the colorants at variable concentrations, are summarized in Table 2. The precision, expressed as RSD (n=11), and detection limit are also shown in Table 2. The detection limit (DL) was defined as the minimum concentration providing a chromatographic signal 3 times higher than background noise (at the prevailing retention times). The lowest detection limits were obtained



for synthetic colorants being only  $0.03 \mu\text{g g}^{-1}$  for brilliant blue FCF. Caramel had the highest DL but is 20 times less than the recently published results obtained with other methods for the determination of this colorant [12]. The sensitivity of the method was adequate to determine all colorants at concentrations lower than the limits established by the European Union.

**Table 2.** Analytical figures of merit of the proposed solid-phase extraction method.

Synthetic colorants	Slope			Linear range <sup>a</sup> ( $\mu\text{g g}^{-1}$ lyophilized)	Detection limit <sup>a</sup> ( $\mu\text{g g}^{-1}$ lyophilized)	RSD (%)
	400 nm	530 nm	610 nm			
Tartrazine	31.8	–	–	1.3 – 120	0.3	3.6
Lissamine green B	2.3	21.2	161.0	0.3 – 30	0.1	4.7
Indigo carmine	1.0	20.9	48.0	0.9 – 75	0.3	5.6
Brilliant blue FCF	4.6	25.2	210.6	0.1 – 30	0.03	3.7
Brilliant black BN	6.2	42.5	33.1	1.3 – 120	0.4	6.4
Natural colorants	Slope			Linear range <sup>a</sup> ( $\mu\text{g g}^{-1}$ lyophilized)	Detection limit <sup>a</sup> ( $\mu\text{g g}^{-1}$ lyophilized)	RSD (%)
	425 nm	500 nm	610 nm			
Riboflavin	10.2	5.2	1.6	3 – 300	0.8	3.5
Caramel	0.12	0.05	0.006	220 – 22000	75	6.4
Carminic acid	13.4	34.7	6.1	1.5 – 150	0.3	3.8
Curcumin	1.4	–	–	30 – 3000	7.5	4.5
Trans- $\beta$ -carotene	4.1	–	–	7.5 – 750	2.2	4.1

<sup>a</sup>, the linear range and detection limit correspond to the most sensitive wavelength.

#### 3.4. Analysis of dairy products and fatty foods

Different samples with high protein (dairy samples) and fat content (fatty foods) were analyzed. The labels on the samples indicated what colorants were contained but not the amounts. The positive list of colorant additives limits the

concentrations of the synthetic colorants studied (tartrazine, lissamine green B, brilliant blue FCF, indigo carmine and brilliant black BN) and of two of the natural colorants (curcumin and carminic acid). The limits on these colorants vary depending on the type of food: 150 mg kg<sup>-1</sup> in dairy samples, 500 mg kg<sup>-1</sup> in sauces and bouillon cubes, 300 mg kg<sup>-1</sup> in mustard and 50 mg kg<sup>-1</sup> in dehydrated soups. The other natural colorants (riboflavin, trans- $\beta$ -carotene and caramel) were allowed at quantum satis [3]. Samples were lyophilized as soon as they were received and the results of the analysis of 35 dairy samples (yogurts, milkshakes, desserts and ice creams) and 24 fatty foods (sauces, dehydrated soups and bouillon cubes) are listed in Table 3. Samples were quantified using three aliquots of each food sample analyzed in duplicate (n=6). The proposed method allows the individual identification (using each peak's spectrum) and quantification of all colorants present in the sample. In the samples that only contained synthetic or natural colorants, only the effluents corresponding to the cotton or RP-C<sub>18</sub> columns were analyzed. Only one sample (guacamole sauce) was found to contain mixtures of synthetic and natural colorants. Eight samples were found to have colorant quantities higher than the legal limits. The curcumin concentration was higher than the legal limit (150 mg kg<sup>-1</sup>) in lemon, banana 1 and 3, peach 2 and apricot-mango yogurts, and lemon 1 ice cream. Two yogurt samples, fruit salad and strawberry banana, were found to exceed the legal limit when the quantities of both colorants used (curcumin and carminic acid) were added together, although the individual colorant quantities were lower than the legal limit.

**Table 3.** Synthetic and natural colorants found in lyophilized dairy and fatty foods (SD, n=6).

Dairy sample	Water (%)	Colorant found	Concentration <sup>a</sup> (mg kg <sup>-1</sup> )
<b>Yogurts</b>			
Lemon	80	Curcumin	170 (10)
Banana 1	80	curcumin	164 (11)
Banana 2	80	Trans- $\beta$ -carotene	56 (3)
Banana 3	80	Curcumin	228 (16)
		Carminic acid	38 (2)
Pineapple	80	Trans- $\beta$ -carotene	45 (3)
Strawberry	79	Carminic acid	21 (1)
Cherry	80	Carminic acid	16 (1)
Vanilla	80	Trans- $\beta$ -carotene	37 (2)
Peach 1	81	Trans- $\beta$ -carotene	50 (3)
Peach 2	82	Curcumin	197 (13)
		Carminic acid	18 (1)
Fruit salad	79	Curcumin	144 (10)
		Carminic acid	15 (1)
Nuts-oats	71	Caramel	635 (40)
Forest fruits	79	Carminic acid	27 (2)
Peach-mango	82	Trans- $\beta$ -carotene	55 (3)
Peach-passion fruit	78	Trans- $\beta$ -carotene	28 (2)
Strawberry-banana	81	Curcumin	142 (9)
		Carminic acid	23 (1)
Apricot-mango	78	Curcumin	258 (15)
		Trans- $\beta$ -carotene	44 (3)
<b>Milkshakes</b>			
Strawberry	82	Carminic acid	25 (2)
Vanilla 1	85	Curcumin	87 (6)
		Carminic acid	23 (1)
Vanilla 2	73	Riboflavin	64 (4)
		Trans- $\beta$ -carotene	22 (1)

**Table 3. (continued).**

Dairy sample	Water (%)	Colorant found	Concentration <sup>a</sup> (mg kg <sup>-1</sup> )
<b>Desserts</b>			
Lemon mousse	82	Riboflavin	57 (4)
Lemon yogurt mousse	80	Tartrazine	12.5 (0.8)
Yogurt flavor	84	Tartrazine	5.2 (0.3)
		Indigo carmine	2.0 (0.1)
Caramel custard	80	Caramel	785 (50)
<b>Ice creams</b>			
Lemon 1	60	Curcumin	196 (14)
Lemon 2	65	Tartrazine	36 (3)
Iced lemon fruit	63	Tartrazine	6.6 (0.4)
		Lissamine green B	1.5 (0.1)
Pistachio	61	Tartrazine	27 (2)
		Indigo carmine	15 (1)
Vanilla 1	65	Trans- $\beta$ -carotene	44 (3)
Vanilla 2	60	Riboflavin	49 (3)
		Trans- $\beta$ -carotene	31 (2)
Chocolate	60	Caramel	705 (50)
Orange	65	Trans- $\beta$ -carotene	53 (4)
Cream-strawberry Jam	62	Carminic acid	22 (1)
Vanilla-chocolate- cream	62	Riboflavin	65 (4)
		Trans- $\beta$ -carotene	27 (2)
Fruits	60	Riboflavin	49 (3)
		Trans- $\beta$ -carotene	39 (3)
		Carminic acid	27 (1)

**Table 3. (continued).**

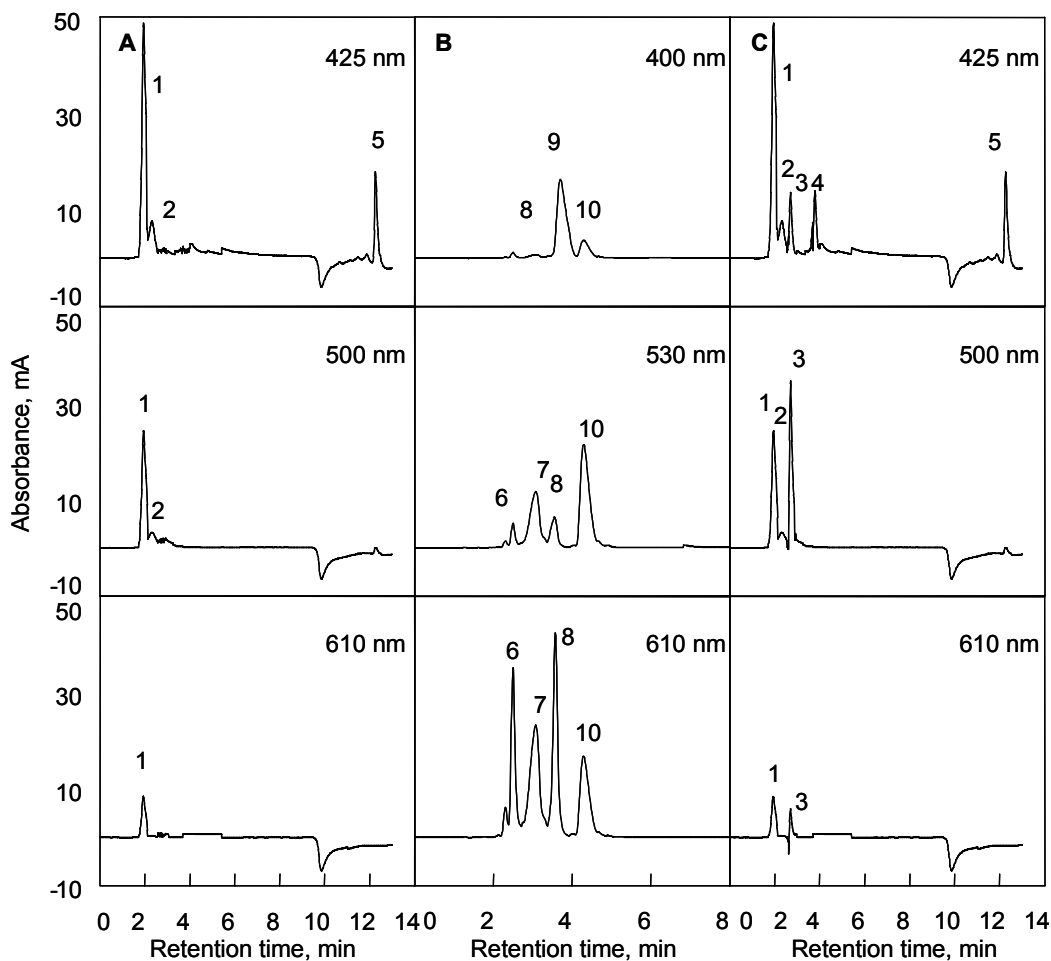
Fatty sample	Water (%)	Colorant found	Concentration <sup>a</sup> (mg kg <sup>-1</sup> )
<b>Sauces</b>			
Vinaigrette	72	Tartrazine	16 (1)
Mustard 1	65	Tartrazine	12.5 (0.9)
Mustard 2	69	Caramel	760 (50)
Tartar	65	Trans- $\beta$ -carotene	65 (4)
"Gaucho"	56	Trans- $\beta$ -carotene	52 (3)
Curry	59	Trans- $\beta$ -carotene	49 (3)
Oysters	61	Caramel	815 (55)
Guacamole	55	Trans- $\beta$ -carotene	56 (4)
For chicken	70	Brilliant blue FCF	2.8 (0.2)
		Trans- $\beta$ -carotene	60 (4)
		Riboflavin	72 (5)
		Caramel	950 (55)
<b>Bouillon cubes</b>			
Chicken gravy 1	–	Caramel	945 (65)
Chicken gravy 2	–	Riboflavin	77 (5)
		Caramel	940 (65)
Beef gravy 1	–	Riboflavin	69 (4)
Beef gravy 2	–	Curcumin	284 (18)
		Caramel	850 (55)
Fish gravy	–	Riboflavin	59 (4)
		Caramel	1000 (65)
<b>Dehydrated soups</b>			
Chicken 1	–	Riboflavin	82 (5)
Chicken 2	–	Riboflavin	69 (4)
		Caramel	890 (60)
Fowl	–	Caramel	930 (65)
Mushrooms	–	Riboflavin	75 (5)
Vegetables 1	–	Riboflavin	88 (6)
Vegetables 2	–	Caramel	875 (60)
Onions	–	Caramel	940 (60)

**Table 3. (continued).**

Fatty sample	Water (%)	Colorant found	Concentration <sup>a</sup> (mg kg <sup>-1</sup> )
<b>Dehydrated soups</b>			
Asparagus	–	Riboflavin	68 (4)
Leeks	–	Riboflavin	80 (5)
		Caramel	965 (60)
Beef	–	Caramel	890 (60)

<sup>a</sup>, amount per kg of non-lyophilized food.

The chromatograms of the different dairy and fatty foods assayed show the high extraction efficiency of colorants (due to lyophilization and the sorbent preconcentration/cleanup system) and also the high selectivity of the proposed method (no interferences from the matrixes studied were found). For example, Fig. 2 shows the chromatograms obtained in the analysis of a sauce for chicken and the same sample spiked with all the colorants that the sample did not contain at the following concentrations: 3 µg of lissamine green B and brilliant blue FCF, 7.5 µg of tartrazine, indigo carmine and brilliant black BN, 15 µg of carminic acid and 150 µg of curcumin per gram of lyophilized sauce.



**Fig. 2.** Liquid chromatogram for lyophilized sauce for chicken (A) and the same lyophilized sample spiked with five synthetic colorants (B) and with two natural colorants (C). See text for details. Peaks: (1) riboflavin, (2) caramel, (3) carminic acid, (4) curcumin, (5) trans- $\beta$ -carotene, (6) lissamine green B, (7) indigo carmine, (8) brilliant blue FCF, (9) tartrazine, (10) and brilliant black BN.

### 3.5. Recovery test

To validate the proposed method, taking into account that there is no appropriate reference material containing both types of colorants in dairy samples

or fatty foods, a recovery test was carried out. Recoveries of analytes were studied in all the dairy and fatty food samples listed in Table 3 (yogurts, milkshakes, desserts, ice creams, sauces, dehydrated soups and bouillon cubes). About 1 g of each food were homogenized and then fortified with the colorants that the sample did not contain at three levels of concentration (per gram of non-lyophilized food): 0.75, 3 and 15  $\mu\text{g g}^{-1}$  of lissamine green B and brilliant blue FCF, 3, 7.5 and 45  $\mu\text{g g}^{-1}$  of tartrazine, indigo carmine and brilliant black BN, 4.5, 15 and 75  $\mu\text{g g}^{-1}$  of carminic acid, 7.5, 30 and 150  $\mu\text{g g}^{-1}$  of riboflavin, 15, 30 and 150  $\mu\text{g g}^{-1}$  of trans- $\beta$ -carotene, 75, 150 and 750  $\mu\text{g g}^{-1}$  of curcumin and 375, 1125 and 4500  $\mu\text{g g}^{-1}$  of caramel from standard solutions in 1 mol l<sup>-1</sup> acetic acid/sodium acetate buffer (1 ml buffer containing from 0.75  $\mu\text{g}$  to 4.50 mg of colorants). After the addition, the mixture was slightly shaken and left to stand for 1 hour and then lyophilized. The lyophilized samples (with quantities ranging between 0.15 g for the sample that contained the most water, vanilla milkshake, and 1 g for bouillon cubes or dehydrated soups) were directly extracted with 1 mol l<sup>-1</sup> acetic acid/sodium acetate buffer and aspirated into the developed SPE system. All the colorants were spiked into different samples in triplicate at each of the levels indicated above (n=3). The levels of colorants were quantified by comparison with standard solutions in 1 mol l<sup>-1</sup> acetic acid/sodium acetate buffer, which were passed through the SPE unit under identical conditions. There were some differences in the recoveries of the spiking levels (low, medium and high). In all samples assayed (35 dairy samples and 24 fatty foods, each one in triplicate,



n=129 – 177 for each spiked level), the amount of colorants recovered increased as the amount spiked increased; the lowest values (92%) corresponding to the amounts spiked at the low level. At higher concentrations, the recoveries were nearly 98% for all the colorants, except indigo carmine, curcumin and trans- $\beta$ -carotene (95%).

Table 4 gives the average recovery values obtained from the three replicates of each colorant at the three concentrations spiked with the colorants that the sample did not contain (n=9) in the different types of samples assayed (n ranges between 3 and 17 samples for milkshakes and yogurts, respectively). The recovery averages were similar for all of the additives (94 – 95%), the lowest being 92% for trans- $\beta$ -carotene. At the same time it was shown that there does not exist any significant statistical differences between the average recovery values of all additives in each type of food, being 94%. This shows that colorant extraction is not influenced by the matrix and is only slightly influenced by the type of additive probably due to the different stability of each colorant. Therefore, the lowest average values are always obtained for trans- $\beta$ -carotene, probably because it partially oxidizes when the sample is treated (lixiviation) with the acetic acid/sodium acetate buffer. Adding ascorbic acid to the extractant could minimize this effect, which increases the trans- $\beta$ -carotene recovery to 94%. However, in order to simplify the proposed method, the addition of this reducing agent is not necessary because the recovery values obtained were satisfactory (92%). In summary, the proposed method gives acceptable recovery averages for all of the

colorants in the different matrixes assayed, making it perfectly valid for its use as a routine analysis method.

**Table 4.** Average recoveries<sup>a</sup> of added colorants at low, medium and high levels to dairy and fatty foods.

Sample	Dairy foods				Fatty foods		
	Yogurt	Milkshakes	Desserts	Ice cream	Sauces	Dehydrated soups	Bouillon cubes
Tartrazine	95 (5, n=153)	96 (5, n=27)	96 (5, n=18)	95 (3, n=72)	96 (4, n=63)	95 (4, n=90)	95 (3, n=45)
Lissamine green B	95 (5, n=153)	94 (3, n=27)	96 (5, n=36)	95 (4, n=90)	95 (3, n=81)	95 (3, n=90)	95 (4, n=45)
Indigo carmine	93 (3, n=153)	94 (3, n=27)	95 (3, n=27)	93 (3, n=90)	93 (3, n=81)	93 (4, n=90)	93 (4, n=45)
Brilliant blue FCF	95 (4, n=153)	95 (4, n=27)	95 (3, n=36)	95 (3, n=99)	96 (4, n=72)	95 (4, n=90)	95 (3, n=45)
Brilliant black BN	95 (4, n=153)	95 (4, n=27)	94 (5, n=36)	95 (4, n=99)	95 (3, n=81)	95 (4, n=90)	95 (3, n=45)
Riboflavin	94 (5, n=153)	94 (5, n=18)	95 (4, n=27)	95 (3, n=72)	94 (4, n=72)	94 (5, n=36)	94 (5, n=18)
Caramel	95 (5, n=144)	95 (4, n=27)	94 (4, n=27)	95 (5, n=90)	95 (3, n=54)	95 (4, n=36)	94 (4, n=9)
Carminic acid	95 (3, n=90)	95 (4, n=9)	94 (3, n=36)	95 (5, n=81)	95 (3, n=81)	95 (4, n=90)	95 (4, n=45)
Curcumin	93 (4, n=90)	94 (5, n=18)	94 (3, n=36)	93 (4, n=90)	93 (5, n=81)	93 (5, n=90)	94 (5, n=36)
Trans- $\beta$ -carotene	91 (6, n=90)	91 (6, n=18)	91 (5, n=36)	91 (5, n=54)	92 (6, n=36)	93 (6, n=90)	93 (5, n=45)

<sup>a</sup>, standard deviations and replicates (n: three spiked concentrations from three replicates for the different samples) are given in parentheses. For experimental details, see text.

## ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by grant BQU 2001–1815 from Spain's DGICYT. M. González also wishes to thank the Plant Physiology Laboratory, Instituto Canario de Investigaciones Agrarias (I.C.I.A.), Spain for their support in this research.

**REFERENCES**

- [1] T. E. Furia (Ed.), *CRC Handbook of Food Additives*, 2<sup>nd</sup> edn., Volume I, CRC Press, Inc., Florida, 1981.
- [2] R. Macrae, R. K. Robinson and M. J. Sadler (Eds.). *Encyclopaedia of Food Science, Food Technology and Nutrition*, Vol II; Academic Press Inc: San Diego, CA, 1993.
- [3] Directiva 94/36 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 30 de junio, Diario Oficial de las Comunidades Europeas, No. L.237, 10.9.94, pp. 13.
- [4] Code of Federal Regulations Title 21, US Government Printing Office, Washington, DC, Revised 1 April, 2001, Parts 70–82.
- [5] M. Jalón, M. J. Peña, J. C. Rivas, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 72 (1989) 231.
- [6] G. M. Greenway, N. Kometa, R. Macrae, *Food Chem.* 43 (1992) 137.
- [7] M. C. Gennaro, C. Abrigo, G. Cipolla, *J. Chromatogr. A* 674 (1994) 281.
- [8] M. Hägg, *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.* 77 (1994) 681.
- [9] G. M. Greenway, N. Kometa, *Analyst* 119 (1994) 929.
- [10] K. Granelli, S. Helmersson, *J. Chromatogr. A* 721 (1996) 355.
- [11] R. N. Carvalho, C. H. Collins, *Chromatographia* 45 (1997) 63.
- [12] J. S. Coffey, H. E. Nursten, J. M. Ames, L. Castle, *Food Chem.* 58 (1997) 259.
- [13] M. Weissenberg, A. Levy, I. Schaeffler, E. Menagem, M. Barzilai, *Chromatographia* 46 (1997) 399.
- [14] S. Angelino, A. F. Fell, M. C. Gennaro, *J. Chromatogr. A* 797 (1998) 65.

- [15] Q. C. Chen, S. F. Mou, X. P. Hou, J. M. Riviello, Z. M. Ni, *J. Chromatogr. A* 827 (1998) 73.
- [16] J. J. Berzas–Nevado, C. Guiberteau–Cabanillas, A. M. Contento–Salcedo, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 20 (1997) 3073.
- [17] X. G. He, L. Z. Lin, L. Z. Lian, M. Lindenmaier, *J. Chromatogr. A* 818 (1998) 127.
- [18] J. Oliver, A. Palou, J. Pons, *J. Chromatogr. A* 829 (1998) 393.
- [19] F. Ishikawa, S. Shigeoka, M. Nagashima, M. Takahashi, H. Kamimura, K. Onishi, M. Nishijima, *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* 41 (2000) 194.
- [20] A. Gliszczynska–Swiglo, A. Koziolowa, *J. Chromatogr. A* 881 (2000) 285.
- [21] M. R. Fuh, K. J. Chia, *Talanta* 56 (2002) 663.
- [22] M. González, M. Gallego, M. Valcárcel, *Anal. Chem.* 75 (2003) 685.
- [23] V. Ratsimba, J. M. García–Fernández, J. Defaye, H. Nigay, A. Voilley, *J. Chromatogr. A* 844 (1999) 283.
- [24] K. Hofer, D. Jenewein, *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A* 204 (1997) 32.

## **CAPITULO IV. RESULTADOS Y CONCLUSIONES**



#### **IV.1. DISCUSION GENERAL DE LOS RESULTADOS**

En esta Memoria se ha abordado la determinación de tres grupos de aditivos alimentarios: antioxidantes, conservantes y colorantes, en diferentes tipos de matrices: bebidas, alimentos grasos, derivados lácteos, y alimentos con alto contenido en azúcares. En todas las metodologías desarrolladas se han utilizado sistemas de flujo que permiten la automatización total o parcial de los procesos analíticos optimizados. Para la determinación y separación de los aditivos se ha utilizado como técnicas analíticas la cromatografía de gases, la espectrometría UV-Visible y la cromatografía de líquidos. En este capítulo se aborda detenidamente una aproximación global y crítica de todos los aspectos relacionados con las muestras implicadas, el pretratamiento de las mismas, los analitos determinados, los sistemas de flujo y de extracción en fase sólida, las separaciones cromatográficas, los sistemas de detección, el tratamiento de los datos obtenidos y, por último, un análisis de dichos resultados dentro de los objetivos marcados en la realización de esta Memoria.

#### IV.1.1. Muestras

Los alimentos se pueden clasificar en función de su composición mayoritaria en proteínas, lípidos o hidratos de carbono; según su función en alimentos energéticos, plásticos o estructurales y reguladores; según su origen en alimentos de origen animal y vegetal; según su aporte energético en hipocalóricos o hipercalóricos. Como una primera aproximación las muestras seleccionadas en esta Memoria se pueden dividir en tres grupos, atendiendo a su estado de agregación:

- muestras sólidas: sopas deshidratadas (Capítulo II.1 y III.3), pastillas de caldo (Capítulo III.3) y caramelos (Capítulo III.1),
- muestras semisólidas: margarinas (Capítulo II.1 y II.3), yogures (Capítulo II.2, III.2 y III.3), salsas (Capítulo II.2, II.3 y III.3), quesos para untar (Capítulo II.3), pâté (Capítulo II.3), helados (Capítulo III.2 y III.3), postres lácteos (Capítulo III.2 y III.3) y mermeladas (Capítulo II.2), y
- muestras líquidas: bebidas (Capítulo II.2 y III.1), aceites (Capítulo II.1 y II.3) y batidos (Capítulo III.2 y III.3).

Cada uno de estos alimentos presenta características que los hace muy diferentes entre sí. El Código Alimentario Español [1], en su Parte Tercera, define cada uno de los grupos de alimentos de forma detallada. Las matrices de todos los alimentos enumerados anteriormente son muy complejas, variando la composición de unos a otros. La presencia de macrocomponentes como grasas, proteínas, azúcares e hidratos de carbono complejos añadidos, dificulta la



separación, detección y determinación de los aditivos objeto de interés en esta Memoria que se encuentran a niveles de concentración mucho más bajos en los alimentos. Por otra parte, la presencia de otros componentes, fundamentalmente vitaminas y otros aditivos como potenciadores del sabor, antiaglomerantes, espesantes, acidulantes, aromas, especias, edulcorantes y gelificantes, hace necesaria la limpieza de los extractos obtenidos durante el pretratamiento de las muestras [2]. A continuación se describen y se clasifican, en función de su composición mayoritaria, aquellos alimentos que han sido utilizados como muestras en esta Memoria.

a) Bebidas

Las bebidas de zumos de frutas y las bebidas de extractos de frutas poseen gran importancia en el mercado, especialmente las que proceden de zumos de cítricos y las de extractos de cola. Los refrescos a base de zumos de fruta se elaboran a partir de zumos, mezclas de zumos o concentrados de los mismos, con o sin adición de azúcares, agua y, en muchos casos, también anhídrido carbónico y/o otros aditivos. Contienen una proporción mínima de zumo de fruta del 6%. Las bebidas refrescantes de esencias de frutas se elaboran a partir de esencias de origen natural, azúcares y ácidos orgánicos, disuelto todo ello en agua que contiene anhídrido carbónico. Todas ellas pueden presentarse coloreadas por la adición de colorantes. En esta Memoria se han analizado bebidas de zumos de frutas (Capítulo III.1) y bebidas refrescantes de extractos de

frutas (Capítulo II.2 y III.1). Este tipo de muestras tiene una matriz sencilla que requiere una manipulación mínima en el análisis.

b) Alimentos grasos

Las grasas están formadas principalmente por triglicéridos que se diferencian entre sí por su composición en ácidos grasos. Los otros componentes de las grasas y aceites, cuyo contenido normalmente es del 3%, son ciertos acil-lípidos, tales como por ejemplo, fosfoglicerolípidos y los componentes del insaponificable. En función de su consistencia se diferencia entre grasas (sólidas) y aceites (líquidas), clasificación poco contundente debido a que el estado de consistencia de estos compuestos depende de la temperatura, exhibiendo muchas grasas una consistencia intermedia o semisólida. El Código Alimentario Español [1] fija la temperatura de 20°C como temperatura de referencia para la separación entre grasas y aceites. La mayoría de los aceites se obtienen por prensado, extracción o fusión de productos que no son materia prima grasa adecuada para su consumo directo. Dependiendo de la materia prima y el tipo de método de obtención utilizado estos aceites contienen fosfolípidos, ácidos grasos libres, sustancias sápidas y olorosas, ceras, pigmentos (clorofilas, carotenoides), compuestos fenólicos y trazas de metales. En esta Memoria se han analizado aceites (Capítulo II.1 y II.3) y distintos productos con un alto contenido en grasas: margarinas (Capítulo II.1 y II.3), salsas (Capítulo II.2, II.3 y III.3), sopas deshidratadas (Capítulo II.1 y III.3), pastillas de caldo (Capítulo III.3) y quesos para untar (Capítulo II.3). Dentro de los derivados de productos cárnicos con alto

contenido en grasas, también se han analizado pâtés o pastas de hígado (Capítulo II.2). La mayor complejidad en el tratamiento de este tipo de muestras radica en la separación de los analitos de interés de la elevada cantidad de triglicéridos que estas muestras contienen.

c) Productos lácteos

La leche es el líquido segregado por las glándulas mamarias de las hembras de los mamíferos. La leche de vaca, que es la que tiene más importancia como alimento, contiene un 3.4% de proteínas, un 4.8% de azúcares y un 3.7% de grasas. Esta composición varía en función del tipo de producto lácteo estudiado. Entre los productos lácteos analizados se establece una diferencia entre leches fermentadas como los yogures (Capítulo II.2, III.2 y III.3), leches adicionadas con aromas y/o estimulantes como los batidos (Capítulo III.2 y III.3) y otros productos lácteos derivados de la leche como los helados (Capítulo III.2 y III.3) y los postres lácteos (Capítulo III.2 y III.3). El elevado contenido en proteínas de estas muestras complica la extracción de los aditivos alimentarios. Un problema adicional es que éstas pueden depositarse en los sistemas analíticos.

d) Alimentos con alto contenido en azúcares

Bajo esta denominación tan amplia se recogen distintos tipos de alimentos. Las mermeladas (Capítulo II.2) y los caramelos (Capítulo III.1) fueron los elegidos para ser analizados en el contexto de esta Memoria.

---

Las mermeladas son productos de consistencia pastosa y untuosa elaborados por cocción de fruta fresca o bien de pulpa de fruta, a la que se añaden grandes cantidades de azúcar. Es habitual la adición de productos tales como frutas con peladura, pectina de frutas, jarabe de almidón y ácidos orgánicos. La composición química de las mermeladas varía en función del proceso de elaboración y del tipo de fruta utilizado, pero el contenido de azúcares puede estar comprendido entre un 45 – 65% expresado como sacarosa. Los componentes esenciales y característicos de los caramelos son la sacarosa y la glucosa concentradas al calor, endurecidas sin cristalizar al enfriarse, quebradizas, aromáticas y coloreadas, bien sea “per se” o por adición de aromas y/o colorantes. El depósito de los azúcares en los sistemas de flujo y en las columnas cromatográficas supondría importantes problemas por lo que su eliminación antes de la determinación de aditivos es imprescindible.

#### **IV.1.2. Analitos**

La selección de los tres grupos de aditivos (antioxidantes, conservantes y colorantes) se hizo en función de su relevancia dentro de la industria alimentaria y su frecuencia de uso.

Los aditivos antioxidantes junto con los conservantes son los más utilizados en la industria alimentaria dentro del grupo de los mismos orientados a la mejora de la conservación de los alimentos. La principal función de estos aditivos es asegurar que los alimentos se mantengan estables frente a las oxidaciones en el primero de los casos y frente al desarrollo y crecimiento de los

microorganismos en el segundo. El objetivo es garantizar la calidad original de los alimentos. La utilización de colorantes en la alimentación no presenta ningún interés nutritivo puesto que ésta responde a la única preocupación de una mejor presentación. Sin embargo el uso de colorantes está ampliamente extendido en la industria alimentaria con el fin de reducir la variación que se produce en el color de los alimentos entre lotes, mejorar el color natural de los alimentos y para producir alimentos más atractivos para el consumidor.

Los aditivos seleccionados en esta Memoria pertenecen al grupo de los antioxidantes, conservantes y colorantes y, dentro de cada uno de los grupos, se han estudiado algunos de los más utilizados en la industria, dentro de aquellos cuyo uso en alimentos está permitido por la legislación europea y española [3,4]. También se incluyó en el Capítulo II.1 y II.3 la *ter*-butilhidroquinona (antioxidante no permitido por la legislación de la UE, pero sí por la de los EE.UU. [5]) ya que, para los laboratorios de rutina, también es importante el control de aquellos aditivos cuyo uso en alimentos no se encuentra permitido. Los aditivos antioxidantes y colorantes pueden ser tanto naturales como artificiales; se han seleccionado compuestos de ambos tipos en esta Memoria.

#### **IV.1.3. Pretratamiento de la muestra**

El pretratamiento de la muestra depende críticamente del estado de agregación de las mismas. Las muestras sólidas y semisólidas requieren un tratamiento más complejo para hacerlas compatibles con el sistema de flujo, mientras que las muestras líquidas necesitan una manipulación menor. El

pretratamiento de las muestras también depende de la técnica cromatográfica de separación, siendo diferente el tratamiento de las muestras si van a ser determinadas mediante cromatografía de gases o mediante cromatografía de líquidos.

El tratamiento de **muestras de bebidas** tanto en la determinación de conservantes (Capítulo II.2) como en la de colorantes (Capítulo III.1), y **muestras de caramelos** para la determinación de colorantes (Capítulo III.1), es mínimo. Las bebidas se desgasificaron mediante ultrasonidos durante 15 minutos y diluyeron en el medio adecuado para su introducción en el respectivo módulo de tratamiento automático. Los caramelos se molieron en un mortero de porcelana y se disolvieron en disolución reguladora  $1 \text{ mol l}^{-1}$  ácido acético/acetato sódico mediante calentamiento a  $60^{\circ}\text{C}$  durante 3 minutos.

Para la determinación de antioxidantes y conservantes en **muestras grasas** mediante cromatografía de gases, se han desarrollado procesos de pretratamiento claramente diferenciados según el tipo de muestras a analizar. Para el análisis de antioxidantes en aceites y grasas (Capítulo II.1) sólo fue necesaria la dilución de la muestra con n-hexano para su posterior aspiración en el módulo de tratamiento automático. En el caso de la determinación de antioxidantes en sopas deshidratadas (Capítulo II.1), la muestra homogeneizada se extrajo con n-hexano seguida de una re-extracción con agua para la eliminación de las interferencias solubles en agua. En este proceso de re-extracción es imprescindible la adición de NaCl (con concentración final  $0.2 \text{ mol l}^{-1}$ ) para una separación correcta entre fases.

En la determinación simultánea de antioxidantes y conservantes en muestras grasas (Capítulo II.3), y debido a la variedad de muestras analizadas (margarinas, aceite, quesos frescos, mayonesas y pâté), se recurrió a un tratamiento previo más complejo para la separación de la mayor parte de los triglicéridos que contienen este tipo de muestras antes de su inserción en el módulo de tratamiento automático de las muestras. Se eligió como muestra representativa una margarina (de girasol) y se ensayaron dos métodos descritos en la literatura. En el primero de estos métodos la margarina se disolvió en n-hexano saturado en acetonitrilo, se extrajo con acetonitrilo saturado en n-hexano y el extracto resultante se concentró [6]. En el segundo de los métodos, la margarina se disolvió en n-hexano saturado en acetonitrilo y se extrajo con acetonitrilo saturado (en n-hexano)-2-propanol-etanol (2:1:1). El extracto se congeló durante 1 hora a  $-18^{\circ}\text{C}$  y, pasado este tiempo, la mezcla se filtró y se concentró [7]. La concentración rápida de los extractos y a baja temperatura (5 minutos en baño de agua a  $\leq 40^{\circ}\text{C}$ ), utilizando un evaporador flash, es imprescindible para reducir las pérdidas de los antioxidantes, que son sensibles a oxidación por el oxígeno del aire. Para comparar la eficacia de cada uno de los métodos en la eliminación de los triglicéridos se determinó el contenido en triglicéridos en la muestra inicial y en los extractos utilizando el método tradicional de transesterificación de los triglicéridos a ésteres metílicos de ácidos grasos [8] con 5% de cloruro de metileno en metanol. La reacción de derivatización se realizó de forma manual calentando a  $60^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos. El estudio indicó que las muestras tratadas según el primer método contenían un 65% de los

triglicéridos que estaban inicialmente en la margarina, mientras que las tratadas según el segundo método sólo contenían un 5%, por lo que se adoptó este último procedimiento.

En el caso de la determinación de conservantes en **yogures, mermeladas y salsas**, se utilizó un método descrito previamente [9]. Las muestras se homogeneizaron mediante agitación magnética y se extrajeron con  $10^{-3}$  mol l<sup>-1</sup> HCl y perclorato potásico saturado. Los analitos se separaron del resto de sustancias interferentes mediante dos extracciones consecutivas de la fase acuosa con éter etílico, siendo la eficacia de la primera y segunda extracción de un 80 y 20%, respectivamente. La fase etérea se evaporó a sequedad y el residuo se redisolvió en el medio adecuado para la introducción de la muestra en el sistema de flujo (0.1 mol l<sup>-1</sup> HNO<sub>3</sub>).

Las **muestras lácteas** analizadas (yogures, helados, batidos y postres lácteos) para la determinación de colorantes en el Capítulo III.2 contienen un elevado porcentaje de proteínas que complica la extracción de los analitos. Además, debido a que las muestras son suspensiones, contienen partículas sólidas que pueden bloquear los componentes del sistema de flujo. Las muestras se extrajeron con 0.1 mol l<sup>-1</sup> acetato amónico y ácido ascórbico (proceso que precipitó las proteínas). El extracto, previa dilución, se introdujo en el módulo de tratamiento automático y se analizó mediante cromatografía de líquidos.

La **liofilización de las muestras** (Capítulo III.3) **con alto contenido en proteínas** (productos lácteos) **y en grasas** (alimentos grasos) para la determinación de colorantes, simplificó notablemente el tratamiento, puesto que



sólo es necesaria una extracción sólido-líquido con disolución reguladora 1 mol l<sup>-1</sup> ácido acético/acetato sódico (pH 4.7) y el extracto se introduce directamente en el sistema de flujo. Previo al empleo de las muestras liofilizadas, se realizó un estudio para garantizar la ausencia de pérdidas de los colorantes a determinar durante el proceso de liofilización. Para ello se seleccionaron diferentes muestras de referencia: productos lácteos (helado de pistacho y yogurt de melocotón) y alimentos grasos (salsa para pollo). Una parte de las muestras se extrajo siguiendo el método desarrollado en el Capítulo III.2 para el tratamiento de productos lácteos. Otra porción de cada una de las muestras se liofilizó (condiciones optimizadas para 50 g de muestra: 24 – 48 horas, 50 mPa), tras lo cual se extrajo según el método desarrollado en el Capítulo III.2. Este proceso se realizó cuatro veces para cada muestra. Los resultados de estos experimentos se validaron mediante fortificación de las muestras de referencia con los 10 colorantes estudiados y se calcularon las recuperaciones para cada uno de ellos. Los resultados reflejaron que no se producía ninguna pérdida de los analitos durante la liofilización de las muestras. En la Tabla IV.1.3.1 están recogidos los valores medios de contenido en agua para cada una de las matrices estudiadas en el Capítulo III.3.

**Tabla IV.1.3.1.** Contenido medio en agua de productos lácteos y alimentos grasos.

Producto lácteo	Contenido en agua (% m/m)	Alimento graso	Contenido en agua (% m/m)
Yogures	79	Salsas	64
Helados	62		
Batidos	83		
Postres lácteos	81		

En la Tabla IV.1.3.2 se indica el medio de preparación de la muestra antes de introducirla en el sistema de flujo, correspondiente a cada uno de los capítulos que constituyen esta Memoria, así como la cantidad de muestra requerida para la determinación analítica.

**Tabla IV.1.3.2.** Medio seleccionado para la retención de los analitos en el sistema continuo de extracción en fase sólida y cantidad de muestra que se puede procesar.

Tipo muestra	Analitos <sup>a</sup>	Capítulo	Medio	Cantidad muestra <sup>b</sup>
Bebidas	CONS	II.2	0.1 mol l <sup>-1</sup> HNO <sub>3</sub> (pH 1)	NL 1 g
	COL	III.1	1 mol l <sup>-1</sup> HAc/Ac <sup>-</sup> (pH 4.7)	NL 1.5 – 4 ml
Mermeladas	CONS	II.2	0.1 mol l <sup>-1</sup> HNO <sub>3</sub> (pH 1)	NL 0.5 – 1 g
Caramelos	COL	III.1	1 mol l <sup>-1</sup> HAc/Ac <sup>-</sup> (pH 4.7)	NL 0.25 – 0.5 g
Aceites	ANT	II.1	n-Hexano	NL 5 – 20 g
	ANT + CONS	II.3	0.1 mol l <sup>-1</sup> HNO <sub>3</sub> (pH 1)	NL 0.75 – 2.5 g
Margarinas	ANT	II.1	n-Hexano	NL 5 – 20 g
	ANT + CONS	II.3	0.1 mol l <sup>-1</sup> HNO <sub>3</sub> (pH 1)	NL 0.75 – 2.5 g
Quesos frescos	ANT + CONS	II.3	0.1 mol l <sup>-1</sup> HNO <sub>3</sub> (pH 1)	NL 0.75 – 2.5 g
Pâtés	ANT + CONS	II.3	0.1 mol l <sup>-1</sup> HNO <sub>3</sub> (pH 1)	NL 0.75 – 2.5 g
Sopas deshidratadas	ANT	II.1	n-Hexano	L 20 – 30 g
	COL	III.3	1 mol l <sup>-1</sup> HAc/Ac <sup>-</sup> (pH 4.7)	L 0.1 – 2.5 g

**Tabla IV.1.3.2. (continuación).**

Tipo muestra	Analitos <sup>a</sup>	Capítulo	Medio	Cantidad muestra <sup>b</sup>	
Salsas	CONS	II.2	0.1 mol l <sup>-1</sup> HNO <sub>3</sub> (pH 1)	NL	0.5 – 1 g
	COL	III.3	1 mol l <sup>-1</sup> HAc/Ac <sup>-</sup> (pH 4.7)	L	0.1 – 2.5 g
Pastillas de caldo	COL	III.3	1 mol l <sup>-1</sup> HAc/Ac <sup>-</sup> (pH 4.7)	L	0.1 – 2.5 g
Mayonesas	ANT + CONS	II.3	0.1 mol l <sup>-1</sup> HNO <sub>3</sub> (pH 1)	NL	0.75 – 2.5 g
Helados	COL	III.2	1 mol l <sup>-1</sup> HAc/Ac <sup>-</sup> (pH 4.7)	NL	0.5 – 4 g
	COL	III.3	1 mol l <sup>-1</sup> HAc/Ac <sup>-</sup> (pH 4.7)	L	0.1 – 2.5 g
Yogures	CONS	II.2	0.1 mol l <sup>-1</sup> HNO <sub>3</sub> (pH 1)	NL	0.5 – 1 g
	COL	III.2	1 mol l <sup>-1</sup> HAc/Ac <sup>-</sup> (pH 4.7)	NL	0.5 – 4 g
	COL	III.3	1 mol l <sup>-1</sup> HAc/Ac <sup>-</sup> (pH 4.7)	L	0.1 – 2.5 g
Postres lácteos	COL	III.2	1 mol l <sup>-1</sup> HAc/Ac <sup>-</sup> (pH 4.7)	NL	0.5 – 4 g
	COL	III.3	1 mol l <sup>-1</sup> HAc/Ac <sup>-</sup> (pH 4.7)	L	0.1 – 2.5 g
Batidos	COL	III.2	1 mol l <sup>-1</sup> HAc/Ac <sup>-</sup> (pH 4.7)	NL	0.5 – 4 g
	COL	III.3	1 mol l <sup>-1</sup> HAc/Ac <sup>-</sup> (pH 4.7)	L	0.1 – 2.5 g

<sup>a</sup>, ANT, antioxidantes; CONS, conservantes; COL, colorantes.

<sup>b</sup>, NL, muestras no liofilizadas; L, muestras liofilizadas.

#### IV.1.4. Sistemas de flujo

Los componentes y las variables hidrodinámicas de los sistemas de flujo empleados en esta Memoria se enumeran en la siguiente tabla (Tabla IV.1.4.1). En esta Tabla se puede observar que el sistema de flujo más complejo de los desarrollados es el descrito en el Capítulo III.2, debido a que incluye dos módulos de tratamiento automático: uno para el screening o discriminación entre colorantes sintéticos y naturales y otro para la confirmación de las muestras que han dado un resultado positivo en el sistema de screening.

**Tabla IV.1.4.1.** Componentes y variables de los sistemas de flujo desarrollados en cada capítulo.

Capítulo	Canales	Bombas	Válvulas <sup>a</sup>		Volumen muestra (ml)	SPE <sup>b</sup>	Caudal muestra (ml min <sup>-1</sup> )	Caudal portador/ eluyente (ml min <sup>-1</sup> )
			VI	VS				
II.1	3	1	2	–	5	Si	1.5	1.0
II.2	3	1	2	–	5	Si	2.0	1.5
II.3	3	1	2	–	5	Si	1.5	1.5
III.1	3	1	1	–	3	Si	1.5	3.5
III.2	6	2	5	1	3	Si	1.5	3.5
III.3	3	1	3	1	3	Si	1.5	3.5

<sup>a</sup>, VI, válvulas de inyección; VS, válvulas de selección.

<sup>b</sup>, SPE, extracción en fase sólida.

Todos los sistemas desarrollados utilizan la extracción en fase sólida, como técnica para la preconcentración y limpieza de los extractos, empleando aire como portador de la muestra en todos los métodos desarrollados y aire (Capítulo III.1) o nitrógeno (Capítulo II.1, II.2, II.3, III.2 y III.3) como portador del eluyente. De forma general los caudales de muestra y de eluyente no influyeron de forma importante en la recuperación de los aditivos. Sin embargo, el caudal de eluyente influyó de forma crítica en el método desarrollado en el Capítulo III.1. En este método los colorantes sintéticos adsorbidos en la columna se eluyeron de forma continua y se determinaron mediante espectrometría UV–Visible, midiendo la señal cuando los analitos alcanzan la máxima concentración. Cuando el caudal de eluyente era muy bajo se produjo una dispersión importante de los colorantes en el eluyente, mientras que cuando el caudal era muy alto el tiempo de residencia del eluyente en la columna no fue suficiente como para que se

produzca la elución. El volumen de preconcentración obtenido en los métodos desarrollados fue suficiente para alcanzar niveles más bajos que los establecidos en la legislación para el uso de los aditivos en alimentos.

#### **IV.1.5. Extracción en fase sólida**

Todos los métodos desarrollados en esta Memoria se basan en la utilización de columnas sorbentes de distinta naturaleza para la retención cuantitativa de los analitos, de forma que se elimine de forma mayoritaria la matriz de la muestra. Con este procedimiento, se consigue preconcentrar los analitos al eluirlos en un volumen más pequeño que el utilizado para la preconcentración y evitar la interferencia de otros componentes de la matriz de la muestra, debido a que éstos tienen menor afinidad que los analitos por los sorbentes empleados. Los métodos desarrollados en esta Memoria (Capítulo II.1 y II.3) para la determinación de antioxidantes y conservantes en muestras grasas sustituyen la tradicional extracción líquido-líquido y posterior derivatización de los triglicéridos co-extraídos [8] por una extracción en fase sólida que elimina más del 99% de los triglicéridos inicialmente contenidos en la muestra. En ambos métodos se llevó a cabo un estudio de las interferencias producidas por los triglicéridos. Para ello se eligieron dos muestras representativas, un aceite de girasol (Capítulo II.1) y una margarina de girasol (Capítulo II.3), y se comparó la eficacia en la eliminación de los triglicéridos en el sistema de extracción en fase sólida. El contenido en triglicéridos se determinó en la muestra inicial y en los extractos después de la preconcentración en la columna sorbente y se utilizó el

método tradicional de derivatización de los triglicéridos [8] previo a la determinación. El estudio indicó que el 30% (Capítulo II.1) o el 25% (Capítulo II.3) de los triglicéridos presentes en la muestra inicial se retuvieron en la columna sorbente (la muestra de referencia utilizada en el Capítulo II.3 estaba tratada previamente y sólo contenía un 5% de los triglicéridos iniciales en la muestra). De los triglicéridos adsorbidos, y gracias a la utilización de un eluyente selectivo, sólo se eluyó el 2.5% en ambos casos [0.8% (Capítulo II.1) y 0.03% (Capítulo II.3) de los triglicéridos contenidos en la muestra inicial]. Estos resultados demostraron que no fue necesaria la reacción de transesterificación previa a la determinación mediante cromatografía de gases.

En la Tabla IV.1.5.1 se resumen las características más destacadas de los sistemas desarrollados.

**Tabla IV.1.5.1.** Características más relevantes de las etapas de sorción/elución de los sistemas de flujo descritos en la Memoria.

Capítulo	Analitos <sup>a</sup>	Columna SPE	Eluyente	Lavado y acondicionamiento	% Retención	% Elución
II.1	ANT	XAD-7 <sup>b</sup> (50 mg)	2-Propanol (400 µl)	1 ml acetona + 4 ml n-hexano	28 – 97	100
II.2	CONS	XAD-2 (50 mg)	Acetato etilo (150 µl)	450 µl acetona + 2 ml 0.1 mol l <sup>-1</sup> HNO <sub>3</sub>	75 – 90	100
II.3	ANT + CONS	XAD-2 (50 mg)	2-Propanol (200 µl)	300 µl acetona + 1.5 ml 0.1 mol l <sup>-1</sup> HNO <sub>3</sub>	50 – 90	100
III.1	COL	Algodón (80 mg)	0.1 mol l <sup>-1</sup> NH <sub>3</sub> –	3 ml etanol + 3 mol l <sup>-1</sup> HAc/Ac <sup>-</sup>	94 – 100	100
III.2	COL	Algodón (80 mg)	0.1 mol l <sup>-1</sup> NH <sub>3</sub> (75 µl)	3 ml etanol + 3 mol l <sup>-1</sup> HAc/Ac <sup>-</sup>	94 – 100	100
		RP-C <sub>18</sub> (100 mg)	Metanol (75 µl)	1 ml n-hexano + 3 mol l <sup>-1</sup> HAc/Ac <sup>-</sup>	90 – 100	100

**Tabla IV.1.5.1. (continuación).**

Capítulo	Analitos <sup>a</sup>	Columna SPE	Eluyente	Lavado y acondicionamiento	% Retención	% Elución
III.3	COL	Algodón (80 mg)	0.1 mol l <sup>-1</sup> NH <sub>3</sub> (75 µl)	3 ml etanol + 3 mol l <sup>-1</sup> HAc/Ac <sup>-</sup>	94 – 100	100
		RP-C <sub>18</sub> (100 mg)	Metanol (75 µl)	1 ml n-hexano + 3 mol l <sup>-1</sup> HAc/Ac <sup>-</sup>	90 – 100	100

<sup>a</sup>, ANT, antioxidantes; CONS, conservantes; COL, colorantes.

<sup>b</sup>, XAD-7, columna empaquetada con sorbente tratado a 80°C/12 horas.

A lo largo de esta Memoria se han empleado distintos tipos de sólidos sorbentes: XAD-7, XAD-2, algodón y RP-C<sub>18</sub>. El sorbente polimérico XAD-7 se sometió a un proceso de secado con el objetivo de reducir las dimensiones de las columnas ya que si el sorbente se utilizara sin secar se requeriría el uso de volúmenes de eluyentes muy grandes y el paso del eluyente crearía presión en el sistema de flujo. El XAD-7, que contiene aproximadamente un 60% de agua, se puede secar a temperaturas inferiores a 150°C sin que pierda sus propiedades sorbentes [10], por lo tanto, el sorbente se secó a 80°C durante aproximadamente 12 horas, hasta que alcanzó un peso constante; después se preparó la columna y la resina seca se acondicionó con n-hexano [11]. En los métodos de screening y confirmación de colorantes sintéticos y naturales (Capítulo III) se utilizaron como sorbentes algodón y/o lana, ambos materiales de origen natural. Estos métodos se basaron en que los colorantes sintéticos se adsorben en las fibras naturales, mientras que los colorantes naturales no presentan esta característica [12]. Para la utilización de algodón o lana como material sorbente es imprescindible su lavado con éter de petróleo para eliminar las grasas naturales que puedan

contener [12,13]. Además, con el objetivo de incrementar la capacidad de sorción de la lana y la reproducibilidad de los resultados, dicho material se trató [12] con  $1 \text{ g l}^{-1}$  de sulfato de aluminio y  $1.2 \text{ g l}^{-1}$  de tartrato sódico potásico en agua Milli-Q.

Las columnas sorbentes utilizadas en esta Memoria fueron preparadas en el laboratorio a partir del contenido activo de cartuchos comerciales. La cantidad de sorbente empaquetado en las minicolumnas estuvo comprendida entre 50 – 100 mg, siendo una cantidad inferior a la contenida en los cartuchos comerciales recomendados para la preconcentración/limpieza de alimentos previa determinación de aditivos (500 mg), lo que permitió preparar entre 5 – 10 minicolumnas con el contenido de un cartucho comercial.

El porcentaje de sorción de antioxidantes y conservantes osciló entre 72 – 97%, excepto en el caso del antioxidante sintético BHT cuyo porcentaje de retención fue del 28% en la columna de XAD-7 (Capítulo II.1) y del 50% en la columna de XAD-2 (Capítulo II.3). Esta baja sorción podría explicarse si se tiene en cuenta el impedimento estérico que se produce debido a los grupos  $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$  en posición 2 y 6 del anillo fenólico de la molécula, los cuales impiden la sorción vía grupo hidroxilo. A pesar de este bajo porcentaje de sorción, la retención fue suficiente para poder determinar este aditivo a los niveles límite establecidos por la legislación para su utilización en alimentos. El porcentaje de sorción de los colorantes estuvo comprendido entre 90 – 100%.

De entre todos los eluyentes ensayados (metanol, etanol, 2-propanol, acetato de etilo, éter de petróleo, n-hexano y  $\text{NH}_3$ ) se seleccionaron aquellos con los que se obtuvo un porcentaje de elución del 100%, para los distintos aditivos



estudiados. Así, se escogió 2-propanol para la determinación de antioxidantes y conservantes de forma simultánea (Capítulo II.3) y del grupo de los antioxidantes (Capítulo II.1), acetato de etilo para la elución de conservantes (Capítulo II.2) y  $0.1 \text{ mol l}^{-1} \text{ NH}_3$  y metanol en el caso de colorantes sintéticos (Capítulo III) y naturales (Capítulo III.2 y III.3), respectivamente. El volumen de eluyente utilizado osciló entre  $75 - 400 \mu\text{l}$ , excepto en el caso del método de screening de colorantes sintéticos y naturales donde la elución se realizó de forma continua con determinación on-line del efluente mediante espectrometría UV-Visible.

El **volumen de ruptura** es el volumen de muestra que puede pasar a través de la columna sorbente a partir del cual sólo se retiene en la columna el 99% de la cantidad inicial de analitos en la muestra. Este parámetro se calculó para los métodos desarrollados para la determinación de colorantes en alimentos (Capítulo III), midiendo la señal correspondiente a la elución después de la preconcentración de muestras que contienen una cantidad fija de analitos (utilizando tres cantidades diferentes: 2, 5 y  $8 \mu\text{g}$ ) y variando el volumen de muestra ( $0.5 - 10 \text{ ml}$ ). Se obtuvo buenas recuperaciones para todos los colorantes sintéticos cuando se utilizó un volumen de muestra inferior a  $3.5 \text{ ml}$ , por lo que se eligió un volumen de  $3 \text{ ml}$ .

Las columnas usadas en el laboratorio pueden utilizarse durante periodos de tiempo comprendidos entre una semana (algodón) y dos meses (XAD-7, XAD-2 y RP-C<sub>18</sub>), suponiendo una media de trabajo de 8 horas diarias, sin más que introducir etapas de limpieza y acondicionamiento de las columnas. Estas etapas se llevan a cabo de forma secuencial en el sistema automático

---

optimizado, dependiendo claramente de la matriz de la muestra, así como del sorbente y del medio en que se lleva a cabo la sorción. En todos los sistemas desarrollados se utilizó como medio de acondicionamiento el mismo en el que se introdujo la muestra en el módulo de tratamiento automático. En todos los casos fue imprescindible introducir una etapa de limpieza de las columnas después del proceso de sorción/elución, para eliminar algunos de los componentes de las matrices alimentarias que también quedaron retenidos en las columnas. Estos componentes no afectaron a la determinación de los aditivos debido a que no se eluyeron con los disolventes seleccionados para la elución de los analitos, pero su eliminación fue imprescindible para aumentar la vida útil de las columnas sorbentes utilizadas. Para la limpieza de las columnas sorbentes se utilizaron distintos disolventes: acetona (antioxidantes y conservantes), etanol (colorantes sintéticos) y n-hexano (colorantes naturales).

#### **IV.1.6. Separación cromatográfica**

Las características de los antioxidantes y conservantes estudiados en esta Memoria, en términos de diferencias de polaridad entre los analitos, hacen que se elija la cromatografía de gases como técnica de separación frente a la cromatografía de líquidos. Además, por lo general, la cromatografía de gases utiliza detectores más sensibles que la cromatografía de líquidos. En el caso de la determinación de colorantes se seleccionó la espectrometría UV-Visible como técnica de screening para la detección de colorantes sintéticos y naturales y la

cromatografía de líquidos con detección UV-Visible para la confirmación y cuantificación de estos analitos.

a) Cromatografía de gases

La mejor resolución cromatográfica para los antioxidantes (Capítulo II.1) se consiguió utilizando una columna semi-capilar de 15 m x 0.53 mm, de fase estacionaria 100% poli(dimetilsiloxano), con un espesor de película de 3.0  $\mu\text{m}$ . Debido a que la muestra tratada contenía todavía un 0.7 – 0.8% de triglicéridos, se utilizó una precolumna de sílice fundida desactivada de 5 m x 0.53 mm, con el objetivo de incrementar la vida útil de la columna cromatográfica. Para la separación de conservantes (Capítulo II.2) se comparó la separación de estos analitos en dos columnas cromatográficas semicapilares de distinta polaridad. Los ácidos benzoico y sórbico son más polares que los ésteres del ácido p-hidroxibenzoico y, por lo tanto, su retención en la columna cromatográfica podría verse afectada por la composición y la polaridad de la fase estacionaria. Se utilizó una columna empaquetada con 5% difenil-95% dimetilsiloxano y otra columna empaquetada con 50% difenil-50% dimetilsiloxano, ambas con una longitud de 15 m x 0.53 mm y con un espesor de película de 1  $\mu\text{m}$ . La comparación de los resultados obtenidos para la separación de conservantes en las dos columnas permitió concluir que la sensibilidad fue mayor cuando se utilizó la columna más polar (50% difenil-50% dimetilsiloxano). Además, los límites de detección para el ácido sórbico y el ácido benzoico fueron más bajos en la columna más polar. En cuanto a la precisión y los tiempos de retención obtenidos fueron similares para ambas

columnas. La mejor resolución en la determinación simultánea de antioxidantes y conservantes (Capítulo II.3) se obtuvo usando una columna capilar de 30 m x 0.32 mm, de fase estacionaria 5% difenil–95% dimetilsiloxano, con un espesor de película de 1 µm.

El volumen de inyección fue de 1 µl (determinación simultánea de antioxidantes y conservantes), 2 µl (determinación off–line de antioxidantes y de conservantes) y 5 µl (determinación on–line de antioxidantes [14]), en el modo splitless (Capítulo II.1 y II.2) y split con la relación 1:10 (Capítulo II.3). El gas portador fue nitrógeno (Capítulo II.1 y II.2) o helio ultrapuro (Capítulo II.3) a un caudal de 14.7 y 15.5 ml min<sup>-1</sup> para las columnas semi–capilares y de 1 ml min<sup>-1</sup> para la columna capilar. La temperatura del inyector, en todos los casos, se fijó en 250°C.

**Tabla IV.1.6.1.** Programas de temperatura óptimos para la separación mediante cromatografía de gases de antioxidantes y conservantes.

Capítulo	Analitos <sup>a</sup>	Detector	Programas de temperatura				
II.1	ANT	FID	100°C 3 min	5°C min <sup>-1</sup> →	130°C 8 min	15°C min <sup>-1</sup> →	255°C 20 min
II.2	CONS	FID	70°C 2 min	8°C min <sup>-1</sup> →	150°C –	6°C min <sup>-1</sup> →	160°C –
II.3	ANT + CONS	FID + MS	125°C 2 min	10°C min <sup>-1</sup> →	315°C 2 min		

<sup>a</sup>, ANT, antioxidantes; CONS, conservantes.

Para la separación de los antioxidantes y conservantes se empleó en todos los casos, la modalidad de gradiente de temperatura, pero incluyendo

etapas isotérmicas. Los programas de temperatura óptimos en cada caso se resumen en la Tabla IV.1.6.1. Se optimizó un programa de temperatura para cada uno de los métodos desarrollados en el Capítulo II de esta Memoria. En todos los programas de temperatura se incluye una etapa final para eliminar de la columna cromatográfica posibles compuestos procedentes de la matriz de la muestra y evitar la aparición de picos fantasma en los cromatogramas.

#### b) Cromatografía de líquidos

Para la separación, tanto de colorantes sintéticos como de naturales (Capítulo III.2 y III.3) mediante cromatografía de líquidos, se utilizó una columna con fase estacionaria de sílice enlazada con grupo funcionales octadecil-silano RP-C<sub>18</sub>, con una longitud de 25 m x 4.6 mm y un espesor de película de 5 µm. Para aumentar la vida de la columna analítica, se utilizó una precolumna que eliminara la materia en suspensión que pudiera quedar después del tratamiento de las muestras y los contaminantes de los disolventes. El volumen de muestra utilizado fue 20 µl. En ningún caso la columna fue termostatazada, realizándose los análisis a temperatura ambiente. El caudal de fase móvil fue de 2 y 1 ml min<sup>-1</sup> para colorantes sintéticos y naturales, respectivamente.

La separación de los colorantes sintéticos y naturales sólo fue posible mediante la adición a la fase móvil de un reactivo de interacción iónica (IIR). El IIR modifica la fase estacionaria RP-C<sub>18</sub> mediante la adsorción de la cadena lipofílica del IIR a ésta, dando lugar a una primera capa con carga positiva. El anión del IIR también se une a la fase estacionaria mediante fuerzas

---

electrostáticas dando lugar a una capa de carga negativa. Por lo tanto, la separación de los colorantes sintéticos y naturales se produjo debido a la capacidad de los analitos para formar pares iónicos con la fase estacionaria modificada, de forma selectiva. En la fase móvil utilizada para la separación de los colorantes se utilizó una mezcla formada por un disolvente orgánico y agua con un IIR que, tanto en la separación de colorantes sintéticos como de colorantes naturales, fue bromuro de cetil-trimetil-amonio (CTAB). El pH de la fase móvil fue de 5.5 y 6.0 (ajustado con ácido ortofosfórico) para la separación de colorantes sintéticos y naturales, respectivamente. La concentración del IIR en la fase móvil para la separación de los colorantes sintéticos fue  $0.29 \text{ g l}^{-1}$  ( $8 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ) y  $0.07 \text{ g l}^{-1}$  ( $2 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ) para la separación de los naturales.

Para la separación de los colorantes se empleó la modalidad de gradiente de composición de fase móvil, incluyendo etapas isocráticas. El programa de composición de fase móvil desarrollado para la separación de colorantes sintéticos fue diferente al optimizado para la separación de los colorantes naturales y se resumen en la Tabla IV.1.6.2. En la separación de colorantes sintéticos y de colorantes naturales el sistema cromatográfico se acondicionó haciendo pasar la fase móvil a través de la columna hasta que se obtuvo una línea base estable. Al comienzo de la jornada de trabajo y para que el acondicionamiento fuera completo, se utilizó un caudal de  $1 \text{ ml min}^{-1}$  durante 20 minutos.

**Tabla IV.1.6.2.** Programas de composición de fase móvil óptimos para la separación mediante cromatografía de líquidos de colorantes sintéticos y naturales.

Capítulo	Analitos <sup>a</sup>	Detector	Programas de composición de fase móvil <sup>b</sup>		
III.2	COL	DAD	45% ACN : 55% H <sub>2</sub> O	6.5 min, lineal	55% ACN : 45% H <sub>2</sub> O
III.3	sintéticos		+CTAB	→	+ CTAB 1.5 min
	COL naturales		85% MeOH : 15% H <sub>2</sub> O +CTAB	0 min →	20% MeOH : 80% acetato etilo 10 min
			3 min		

<sup>a</sup>, COL, colorantes.

<sup>b</sup>, ACN, acetonitrilo; CTAB, bromuro de cetil-trimetil-amonio; MeOH, metanol.

#### IV.1.7. Detección

El detector de ionización de llama (FID) es el más utilizado en cromatografía de gases. Este detector responde proporcionalmente al número de grupos  $-CH_2-$  de la molécula introducidos en la llama del detector, por lo que es un detector adecuado para la cuantificación, tanto de antioxidantes como de conservantes (Capítulo II). La temperatura del FID fue de 250°C para la detección individual de antioxidantes y conservantes (Capítulo II.1 y II.2) y 310°C para la detección simultánea de ambos tipos de aditivos (Capítulo II.3). En el Capítulo II.3 se utilizó la espectrometría de masas (MS) para la identificación y la cuantificación de estos analitos. Las temperaturas de la interfase y de la fuente fueron 250 y 200°C, respectivamente. Los espectros de masas se registraron entre  $m/z$  50 – 500 en el modo de impacto electrónico. En la Tabla IV.1.7.1 se encuentra la relación de los analitos con los valores de  $m/z$  seleccionados para la identificación.

**Tabla IV.1.7.1.** Relación de  $m/z$  característicos de los antioxidantes y conservantes estudiados en esta Memoria, determinados mediante GC–MS.

Analito	$m/z^a$	Analito	$m/z^a$
<b>Antioxidantes</b>			
BHA	137, <b>165</b> , <u>180</u>	$\alpha$ -Tocoferol	165, 205, <b>430</b>
BHT	57, <b>205</b> , 220	$\alpha$ -Tocoferol acetato	166, <b>430</b> , 472
TBHQ	123, <b>151</b> , 166		
<b>Conservantes</b>			
Acido sórbico	67, <b>97</b> , 112	E–PHBA	<b>121</b> , 137, 166
Acido benzoico	77, <b>105</b> , 122	P–PHBA	<b>121</b> , <u>138</u> , 180
M–PHBA	93, <b>121</b> , <u>152</u>		

<sup>a</sup>, los valores de  $m/z$  en cursiva corresponden a los iones moleculares, en negrita a los picos base y los subrayados a los fragmentos seleccionados para la cuantificación.

En la separación cromatográfica de antioxidantes y conservantes de forma simultánea no se pudieron resolver dos analitos, BHT y E–PHBA, cuyos picos se solaparon. Este inconveniente se pudo solventar utilizando, para la cuantificación de cada uno de los analitos, el pico base:  $m/z$  205 para BHT y  $m/z$  121 para E–PHBA.

El uso de un espectrómetro UV–Visible (Capítulo III.1) y un espectrómetro de diodos en fila (Capítulo III.2) como detectores permitió registrar on–line los espectros de los extractos procedentes del sistema de flujo en los sistemas de screening. Los colorantes se agruparon de acuerdo a la zona del espectro donde presentaron la longitud de onda de máxima absorción y se eligió la longitud de onda de máxima absorción para cada uno de los tres grupos de colorantes seleccionados: amarillo, rojo y verde–azul–marrón. Con el objetivo de simplificar



el sistema de screening de colorantes sintéticos y colorantes naturales, se seleccionaron las mismas longitudes de onda en ambos casos.

Además se utilizó un detector de diodos en fila acoplado a un cromatógrafo de líquidos para la cuantificación e identificación de colorantes sintéticos y naturales (Capítulo III.2 y III.3). Los espectros de todos los colorantes se registraron a longitudes de onda comprendidas entre 375 y 625 nm y las identidades de los picos cromatográficos se confirmaron mediante comparación de sus espectros y tiempos de retención con los obtenidos con estándares de cada uno de los colorantes.

Las longitudes de onda seleccionadas, tanto para el método de screening como para la confirmación de los analitos, se recogen en la Tabla IV.1.7.2. Hay que destacar que en la detección y cuantificación de colorantes naturales se utilizó la longitud de onda de 610 nm debido a que el método de referencia para caracterizar el caramelo, descrito en la legislación [4,5], establece la medida de la absorbancia a esta longitud de onda ( $\lambda=610$  nm), que no se encuentra en el intervalo óptimo confirmado en esta Memoria. Ello es debido a la necesidad práctica de cambiar mínimamente el método oficial a efectos de acreditación de laboratorios.

**Tabla IV.1.7.2.** Relación de longitudes de onda óptimas para la detección y cuantificación de los colorantes estudiados en esta Memoria mediante espectrofotometría.

Analito	Intervalo óptimo	$\lambda_{\text{detección}}$ (nm)	
		screening UV-Visible	confirmación LC-DAD
<b>Colorantes sintéticos</b>			
Tartrazina	400	400, 530, 610	400, 530, 610
Eritrosina	530		
Verde ácido brillante BS	570 – 630		
Carmin de índigo	570 – 630		
Azul brillante FCF	570 – 630		
Negro brillante BN	570 – 630		
<b>Colorantes naturales</b>			
Curcumina	425 – 450	400, 530, 610	425, 500, 610
Riboflavina	425 – 450		
Trans- $\beta$ -caroteno	425 – 450		
Acido carmínico	500		
Caramelo	400 – 425		

#### IV.1.8. Tratamiento de datos

Los métodos desarrollados a lo largo de esta Memoria se caracterizaron mediante datos cuantitativos: rectas de calibrado, límites de detección y precisión y datos cualitativos: determinación de falsos positivos y falsos negativos en el sistema de screening.

##### a) Datos cuantitativos

En las metodologías desarrolladas para la separación/determinación de antioxidantes y conservantes por cromatografía de gases se construyeron rectas de calibrado mediante regresión lineal del área del pico cromatográfico del analito

dividida por la del estándar interno frente a la concentración del aditivo. En cuanto a los métodos para la separación/determinación de colorantes sintéticos y naturales mediante cromatografía de líquidos, las rectas de calibrado se obtuvieron representando la señal obtenida para los distintos colorantes (en unidades de absorbancia) frente a la concentración del analito. En ambos casos, los límites de detección (LOD, Limit Of Detection) se calcularon como la concentración mínima de analito que proporcionaba señales cromatográficas tres veces mayores que el ruido de fondo, y la precisión del método, expresada como desviación estándar relativa (% RSD, Relative Standard Deviation), se obtuvo mediante inyección de un mínimo de 11 disoluciones estándar, conteniendo los analitos a concentraciones situadas en la parte media-baja de la recta de calibrado. En el Capítulo III.3 se evaluaron los resultados de las recuperaciones obtenidas para los colorantes sintéticos y naturales, en muestras lácteas y con alto porcentaje en grasas liofilizadas, mediante análisis de varianza (ANOVA, Analysis Of Variance) y un post-análisis utilizando el test LSD (Fisher's Least-Significant-Difference) a un nivel de fiabilidad del 5%.

En el método de screening de colorantes sintéticos y naturales (Capítulo III.1), se determinaron los analitos mediante espectrometría UV-Visible a tres longitudes de onda características (ver Tabla IV.1.7.2). En este método las rectas de calibrado se obtuvieron mediante regresión lineal para mezclas multicomponentes, representando la señal obtenida para los colorantes (en unidades de absorbancia) frente a la concentración del analito. Los LODs se calcularon como tres veces la desviación estándar del ruido de fondo,

determinada utilizando una corriente del eluyente, dividida por la pendiente de la curva de calibrado para cada uno de los colorantes. La precisión del método, expresada como % RSD, se obtuvo a partir de un mínimo de 11 disoluciones estándar, conteniendo los colorantes a concentraciones situadas en la parte media–baja de la recta de calibrado.

b) Datos cualitativos

El nivel de confianza del sistema de screening propuesto se estableció determinando los niveles de falsos positivos y negativos mediante un estudio quimiométrico sencillo, en el cual sólo había colorantes sintéticos en la muestra. El primer paso fue imponer una concentración de colorantes sintéticos que se conoce como concentración de corte (cut–off), que se definió como el doble del LOD de cada colorante sintético a cada longitud de onda. Un falso positivo tuvo lugar cuando la señal obtenida da una respuesta positiva para una disolución estándar que contiene el colorante sintético a un nivel por debajo del cut–off y un falso negativo tuvo lugar cuando una disolución estándar, que contiene el colorante sintético a una concentración superior al cut–off, da una medida de absorbancia inferior a la señal del cut–off. La detección de falsos positivos no es problemática en los métodos de screening porque éstos podrán ser detectados en el posterior método de confirmación, pero la existencia de falsos negativos es mucho más relevante desde un punto de vista práctico, debido a que estas muestras no se confirman posteriormente salvo en actividades de control de calidad. Con el objetivo de determinar la capacidad del método de screening para

cada uno de los grupos de colorantes estudiados, se seleccionó un colorante de cada uno de los grupos: tartrazina, eritrosina y negro brillante BN y se llevó a cabo un estudio sistemático a cinco niveles de concentración (0.5 LOD, 1 LOD, 1.5 LOD, 2 LOD y 3 LOD), utilizando 50 muestras a cada concentración para cada uno de los tres colorantes.

Se utilizó otro método quimiométrico para determinar la concentración umbral de colorantes naturales por encima de la cual éstos eluirían junto con los colorantes sintéticos de la columna sorbente, dando lugar a falsos positivos. En este sentido, un falso positivo tuvo lugar cuando una disolución estándar que sólo contiene colorantes naturales a una concentración superior al valor del cut-off da señal y por lo tanto una respuesta positiva. En este estudio se seleccionó un colorante natural de cada uno de los grupos de colores estudiados: curcumina, ácido carmínico y caramelo y se llevó a cabo un estudio sistemático a tres niveles de concentración en función de la relación de concentraciones toleradas determinadas en un estudio de selectividad (2000 LOD, 5000 LOD y 10000 LOD para la curcumina y el ácido carmínico, y 10000 LOD, 25000 LOD y 50000 LOD para el caramelo). Se utilizaron 50 muestras a cada concentración para cada uno de los tres colorantes.

#### **IV.1.9. Grados de automatización y simplificación**

La automatización de cada uno de los pasos que constituyen los métodos desarrollados en los diferentes capítulos de esta Memoria, así como el grado de simplificación alcanzado en los mismos con relación a los procesos manuales, se

---

intentan plasmar en la Figura VI.1.9.1. De esta forma, se puede tener una primera impresión, clara y directa, de dicho grado, evaluado en función de lo expuesto a continuación.

Capítulo	GRADO DE AUTOMATIZACIÓN Y SIMPLIFICACION			
	Pretratamiento	Sistema de flujo	Detección	Tratamiento de datos
II.1	██████████	██████████	██████████	██████████
II.2	██████████	██████████	██████████	██████████
II.3		██████████	██████████	██████████
III.1	██████████	██████████	██████████	██████████
III.2		██████████	██████████	██████████
III.3	██████████	██████████	██████████	██████████

**Figura IV.1.9.1.** Grado de automatización y simplificación de los diferentes pasos de cada método presentado en esta Memoria.

El mayor grado de automatización en el pretratamiento de la muestra se consiguió en el método desarrollado en el Capítulo III.3, referente a muestras lácteas y grasas liofilizadas, ya que éste consiste solamente en una extracción sólido-líquido automatizada, realizada mediante agitación magnética. Hay que resaltar que, aunque la liofilización suponga un mayor tiempo en el pretratamiento de la muestra, facilita una extracción sólido-líquido eficaz, así como el posterior tratamiento analítico, debido a que los extractos obtenidos son mucho más limpios que cuando las muestras no se liofilizan. Además, hay que tener en cuenta que el proceso de liofilización puede hacerse simultáneamente para un

número elevado de muestras y que, además, supone un método de conservación de las muestras en el que los analitos permanecen inalterables durante al menos dos meses, lo cual es una ventaja teniendo en cuenta el carácter perecedero de algunas de las muestras analizadas.

El pretratamiento de los aceites y margarinas en el Capítulo II.1 fue mínimo, puesto que sólo requiere la adición de los estándares internos y la disolución de la muestra en n-hexano. El siguiente grado de complejidad en el pretratamiento de las muestras se encuentra en las bebidas (Capítulo II.2 y III.1), que necesitaron desgasificación mediante ultrasonidos y posterior dilución con el medio de inserción en el sistema de flujo, y las golosinas (Capítulo III.1), que se molieron manualmente y posteriormente fueron disueltas, en caliente, en el medio de preconcentración de la muestra. El pretratamiento más complejo y menos automatizado fue el realizado para sopas (Capítulo II.1), yogures, mermeladas y salsas (Capítulo II.2), margarinas, aceites, quesos, mayonesas y pâtés (Capítulo II.3) y yogures, helados, batidos y postres lácteos (Capítulo III.2), debido a que la homogeneización, extracción, limpieza de los extractos y cambio de disolvente mediante etapas de evaporación/redisolución se realizó de forma completamente manual.

En cuanto a los sistemas de flujo desarrollados hubo una gran semejanza entre ellos teniendo, como características diferenciadoras, los medios de sorción, elución, limpieza y preconcentración. Los sistemas de flujo desarrollados en el Capítulo II.1, cuando la inyección en el cromatógrafo de gases se realizó on-line

[14], y en el Capítulo III.1 y III.2, donde se unió de forma continua el sistema de flujo con el detector UV–Visible, fueron completamente automatizados.

La detección ha sido totalmente automatizada cuando está en línea con el proceso cromatográfico, así como en el sistema de screening de colorantes (Capítulo III.1) donde la detección se hizo de forma continua en el eluato de la columna de extracción en fase sólida.

Por último, en los métodos desarrollados, el tratamiento de los datos fue simple teniendo en cuenta que en todos los casos los cálculos se llevaron a cabo mediante hojas de cálculo y programas de tratamiento de datos estadísticos, con la rapidez y precisión que ello conlleva.

En resumen, el método más simple y automatizado fue el desarrollado en el Capítulo II.1 cuando se trataron aceites y margarinas y la inyección en el cromatógrafo de gases se realizó on–line. El siguiente método, si tenemos en cuenta la simplicidad, fue el optimizado para el screening de colorantes sintéticos y naturales (Capítulo III.1) en el que se trataron muestras sencillas, como bebidas y golosinas, y la detección se realiza on–line. Por el contrario, los métodos menos simples y automatizados fueron los desarrollados en el Capítulo II.1, II.2, II.3 y III.2, donde el pretratamiento de las muestras fue completamente manual y la detección discontinua.

#### **IV.1.10. Resultados analíticos**

En este apartado de la Memoria se analizan los resultados analíticos que se han obtenido en los métodos desarrollados para la determinación de aditivos



de mejora de la conservación o antioxidantes y conservantes, y de aditivos de mejora de las características sensoriales o colorantes. Se estudian detenidamente las características analíticas de los métodos, los contenidos de aditivos encontrados en las muestras analizadas y los datos de recuperaciones utilizadas para validar los métodos.

#### IV.1.10.1. Antioxidantes y conservantes

##### a) Características analíticas

En la Tabla VI.1.10.1.1 se muestran las características analíticas correspondientes a los límites de detección (LOD), los intervalos de linealidad establecidos para la cuantificación, los coeficientes de correlación y la precisión, obtenidos para cada antioxidante y conservante en cada uno de los métodos desarrollados en el Capítulo II de esta Memoria.

**Tabla IV.1.10.1.1.** Relación de los límites de detección, intervalos de linealidad, coeficientes de correlación y precisión para antioxidantes y conservantes en cada uno de los métodos desarrollados.

Analitos	Capítulo	LOD (mg l <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>	Intervalo linealidad (mg l <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>	Coefficiente correlación r <sup>2</sup>	RSD (%)
<b>Antioxidantes</b>					
BHA	II.1	2.0	5.0 – 150	0.999	2.7
	II.3 <sup>a</sup>	0.15	0.40 – 100	0.993	3.1
	II.3 <sup>b</sup>	0.80	1.5 – 500	0.992	3.2
BHT	II.1	7.0	15 – 200	0.992	3.4
	II.3 <sup>a</sup>	0.25	0.60 – 100	0.999	2.7
	II.3 <sup>b</sup>	1.5	2.5 – 500	0.998	3.8

**Tabla IV.1.10.1.1. (continuación).**

Analitos	Capítulo	LOD (mg l <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>	Intervalo linealidad (mg l <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>	Coefficiente correlación r <sup>2</sup>	RSD (%)
<b>Antioxidantes</b>					
TBHQ	II.1	2.0	4.0 – 150	0.997	3.3
	II.3 <sup>a</sup>	0.20	0.50 – 100	0.994	3.4
	II.3 <sup>b</sup>	1.0	2.0 – 500	0.995	4.0
α-Tocoferol	II.1	6.0	15 – 200	0.996	3.2
	II.3 <sup>a</sup>	0.50	1.0 – 100	0.997	3.6
	II.3 <sup>b</sup>	2.0	4.0 – 500	0.996	4.2
α-Tocoferil acetato	II.1	8.0	20 – 200	0.999	3.5
	II.3 <sup>a</sup>	0.50	1.0 – 100	0.998	3.8
	II.3 <sup>b</sup>	2.0	4.0 – 500	0.995	4.2
<b>Conservantes</b>					
Acido sórbico	II.2 <sup>d</sup>	0.10	0.30 – 25	0.996	3.8
	II.2 <sup>e</sup>	0.20	0.50 – 25	0.998	4.0
	II.3 <sup>a</sup>	0.20	0.50 – 100	0.998	3.7
	II.3 <sup>b</sup>	1.0	2.0 – 500	0.997	4.0
Acido benzoico	II.2 <sup>d</sup>	0.07	0.20 – 25	0.999	2.9
	II.2 <sup>e</sup>	0.15	0.40 – 25	0.999	3.0
	II.3 <sup>a</sup>	0.15	0.40 – 100	0.999	3.1
	II.3 <sup>b</sup>	0.80	1.5 – 500	0.998	3.5
M-PHBA	II.2 <sup>d</sup>	0.20	0.50 – 25	0.999	2.8
	II.2 <sup>e</sup>	0.20	0.50 – 25	0.999	2.7
	II.3 <sup>a</sup>	0.20	0.50 – 100	0.999	2.8
	II.3 <sup>b</sup>	1.0	2.0 – 500	0.997	3.4
E-PHBA	II.2 <sup>d</sup>	0.15	0.40 – 25	0.999	2.7
	II.2 <sup>e</sup>	0.15	0.40 – 25	0.999	2.6
	II.3 <sup>a</sup>	0.15	0.40 – 100	0.997	2.6
	II.3 <sup>b</sup>	1.0	1.5 – 500	0.998	3.4

Tabla IV.1.10.1.1. (continuación).

Analitos	Capítulo	LOD (mg l <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>	Intervalo linealidad (mg l <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>	Coefficiente correlación r <sup>2</sup>	RSD (%)
<b>Conservantes</b>					
P-PHBA	II.2 <sup>d</sup>	0.15	0.40 – 25	0.999	2.5
	II.2 <sup>e</sup>	0.20	0.50 – 25	0.999	2.5
	II.3 <sup>a</sup>	0.20	0.50 – 100	0.996	2.5
	II.3 <sup>b</sup>	1.0	2.0 – 500	0.999	3.9

<sup>a</sup>, detector FID.

<sup>b</sup>, detector MS.

<sup>c</sup>, los LOD y los intervalos lineales están expresados por gramo de muestra fresca.

<sup>d</sup>, columna 50% difenil–50% dimetilsiloxano.

<sup>e</sup>, columna 5% difenil–95% dimetilsiloxano.

Los límites de detección obtenidos no sólo permitieron alcanzar los límites establecidos por la legislación europea y española en cada uno de los tipos de alimentos estudiados [3], sino que, de forma general, fueron equiparables o, en algunos casos mejores que los recogidos en la bibliografía estudiada (0.03 – 3 mg l<sup>-1</sup>) [15–17]. En cuanto a los intervalos de linealidad, éstos fueron lo suficientemente amplios (entre 1 y 2 órdenes de magnitud) y permitieron la cuantificación a niveles de mg kg<sup>-1</sup> (partes por millón). La precisión fue aceptable en todos los casos.

La determinación de antioxidantes y conservantes (Capítulo II.3) cuando se utilizó el detector MS fue menos sensible que cuando se utilizó el FID, como se puede comprobar observando los límites de detección y los intervalos de linealidad. A pesar de ello la cuantificación mediante MS fue imprescindible cuando en las muestras se encontraban BHT y E-PHBA, debido a la

imposibilidad de resolución de estos aditivos durante la separación cromatográfica.

En cuanto a los resultados obtenidos en la comparación de las columnas 50% difenil–50% dimetilsiloxano y 5% difenil–95% dimetilsiloxano para la separación de conservantes (Capítulo II.2), se observó que los límites de detección y los intervalos de linealidad obtenidos con la primera de ellas, para los ácidos sórbico y benzoico y para el éster P–PHBA, fueron mejores que los obtenidos con la segunda.

Si se hace una comparación global de los resultados obtenidos en los distintos métodos se puede observar que el método con el que se obtuvo límites de detección y cuantificación más bajos para la separación/determinación de antioxidantes fue el desarrollado en el Capítulo II.3 cuando se utilizó el FID y la columna capilar 5% difenil–95% dimetilsiloxano. Este hecho podría explicarse si tenemos en cuenta que, aunque en los métodos descritos en el Capítulo II.1 y II.3, el volumen de muestra utilizado en la preconcentración fue el mismo (5 ml) no lo fue el volumen de eluyente utilizado en el sistema de flujo, encontrándose en una relación 2:1. Otra posible causa de esta mejor sensibilidad pudo ser que los porcentajes de retención obtenidos para el BHT y la TBHQ en el Capítulo II.1 fueron sensiblemente menores a los del Capítulo II.3 (28 y 77% frente a 50 y 90%, respectivamente). En cambio, el método que ofreció una mayor sensibilidad en la determinación de conservantes fue el del Capítulo II.2 cuando se utilizó el FID y la columna capilar 50% difenil–50% dimetilsiloxano. Como en el caso anterior, esta diferencia en sensibilidad podría asociarse a que el volumen de eluyente fue inferior en este

método respecto al utilizado en el Capítulo II.3 (relación 1.5:2). Sin embargo, el método que proporcionó intervalos de linealidad más amplios fue, en todos los casos, el del Capítulo II.3 con detección mediante MS.

Por último hay que señalar que los tocoferoles fueron los aditivos cuyos límites de detección e intervalos de linealidad fueron superiores a los del resto de aditivos. Esto fue debido a que presentaron picos cromatográficos anormalmente anchos, lo que dificultó su determinación. Es importante destacar que estos aditivos se encuentran permitidos a niveles quantum satis, mostrando la legislación más permisiva entre los antioxidantes y conservantes estudiados, en los alimentos analizados. Por otro lado, el ácido benzoico fue el analito para el que se obtuvo una sensibilidad más alta.

#### b) Muestras

Los métodos propuestos en el Capítulo II se aplicaron al análisis de antioxidantes y conservantes en un total de 31 muestras de distintos tipos: bebidas refrescantes (Tabla IV.1.10.1.2), alimentos con alto contenido en grasas como aceites, margarinas, quesos, pâtés, sopas y salsas (Tabla IV.1.10.1.3), productos lácteos como yogures (Tabla IV.1.10.1.4) y alimentos con alto contenido en azúcares como mermeladas (Tabla IV.1.10.1.5), expresándose en todos los casos los resultados como medias y desviación estándar obtenidas a partir de 15 determinaciones.

**Tabla IV.1.10.1.2.** Relación de bebidas que contienen los aditivos estudiados y que han sido analizados en esta Memoria.

Muestra	Capítulo	Aditivo	Concentración encontrada (mg l <sup>-1</sup> )	Límite legal UE (mg l <sup>-1</sup> )
<b>Bebidas</b>				
Cola	II.2	Acido benzoico	130 ± 5	150
Naranja 1	II.2	Acido benzoico	120 ± 4	150
Naranja 2	II.2	Acido sórbico	170 ± 7	300
Limón 1	II.2	Acido benzoico	140 ± 5	150
Limón 2	II.2	Acido sórbico	190 ± 8	300
Manzana	II.2	Acido benzoico	145 ± 5	150

**Tabla IV.1.10.1.3.** Relación de alimentos con alto contenido en grasas que contienen los aditivos estudiados y que han sido analizados en esta Memoria.

Muestra	Capítulo	Aditivo	Concentración encontrada (mg kg <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	Límite legal UE (mg kg <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>
<b>Aceites</b>				
Maíz	II.1	BHA	123 ± 4	200
	II.1	BHT	64 ± 3	100
	II.1	α-Tocoferol	123 ± 5	q.s. <sup>b</sup>
Girasol	II.1	BHA	134 ± 5	200
	II.3	BHA	134 ± 4	200
	II.1	BHT	58 ± 2	100
	II.3	BHT	58 ± 4	100
	II.1	α-Tocoferol	485 ± 20	q.s. <sup>b</sup>
Germen de trigo	II.3	α-Tocoferol	485 ± 4	q.s. <sup>b</sup>
	II.1	α-Tocoferol	384 ± 16	q.s. <sup>b</sup>
	II.1	α-Tocoferil acetato	2268 ± 83	q.s. <sup>b</sup>
<b>Margarinas</b>				
Girasol	II.1	BHA	150 ± 5	200
	II.3	BHA	170 ± 4	200
	II.1	α-Tocoferol	125 ± 5	q.s. <sup>b</sup>
	II.3	α-Tocoferol	150 ± 5	q.s. <sup>b</sup>
	II.3	Acido sórbico	840 ± 5	1000 <sup>c</sup>

Tabla IV.1.10.1.3. (continuación).

Muestra	Capítulo	Aditivo	Concentración encontrada (mg kg <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	Límite legal UE (mg kg <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>
<b>Margarinas</b>				
Maíz	II.1	α-Tocoferol	89 ± 3	q.s. <sup>b</sup>
	II.3	α-Tocoferol	280 ± 6	q.s. <sup>b</sup>
	II.1	α-Tocoferil acetato	237 ± 9	q.s. <sup>b</sup>
	II.3	Acido sórbico	190 ± 5	1000 <sup>c</sup>
	II.3	BHA	110 ± 5	200
<b>Quesos</b>				
Fresco	II.3	Acido sórbico	745 ± 4	2000 <sup>c</sup>
	II.3	α-Tocoferol	725 ± 5	q.s. <sup>b</sup>
Fresco bajo en calorías	II.3	Acido sórbico	880 ± 5	2000 <sup>c</sup>
	II.3	α-Tocoferol	480 ± 5	q.s. <sup>b</sup>
<b>Pâté</b>				
Cerdo	II.3	Acido sórbico	225 ± 5	1000 <sup>c,d</sup>
	II.3	P-PHBA	840 ± 5	1000 <sup>c,d</sup>
	II.3	α-Tocoferol	2100 ± 5	q.s. <sup>b</sup>
<b>Sopas</b>				
Pollo 1	II.1	BHA	195 ± 6	200
	II.1	α-Tocoferol	1192 ± 40	q.s. <sup>b</sup>
Pollo 2	II.1	BHA	375 ± 11	200
	II.1	α-Tocoferol	6759 ± 230	q.s. <sup>b</sup>
Verduras 1	II.1	BHA	193 ± 6	200
	II.1	α-Tocoferol	960 ± 35	q.s. <sup>b</sup>
	II.1	α-Tocoferil acetato	2647 ± 102	q.s. <sup>b</sup>
Verduras 2	II.1	BHA	192 ± 6	200
	II.1	α-Tocoferol	1758 ± 65	q.s. <sup>b</sup>
<b>Salsas</b>				
Tomate	II.2	Acido sórbico	280 ± 15 <sup>2</sup>	1000 <sup>c,d</sup>
	II.2	Acido benzoico	255 ± 20 <sup>2</sup>	1000 <sup>c,d</sup>
Tomate picante	II.2	Acido sórbico	170 ± 7 <sup>2</sup>	1000 <sup>c,d</sup>
	II.2	Acido benzoico	485 ± 20 <sup>2</sup>	1000 <sup>c,d</sup>

**Tabla IV.1.10.1.3. (continuación).**

Muestra	Capítulo	Aditivo	Concentración encontrada (mg kg <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	Límite legal UE (mg kg <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>
<b>Salsas</b>				
Mayonesa	II.3	Acido benzoico	175 ± 6	1000 <sup>c,d</sup>
	II.3	BHA	190 ± 5	200
	II.3	α-Tocoferol	1080 ± 4	q.s. <sup>b</sup>
Mayonesa baja en calorías	II.3	Acido sórbico	400 ± 4	1000 <sup>c,d</sup>
	II.3	α-Tocoferol	1900 ± 5	q.s. <sup>b</sup>

<sup>a</sup>, cantidad expresada por kg de grasa en el alimento.

<sup>b</sup>, q.s., quantum satis: utilización de los aditivos en función de las buenas prácticas de fabricación, a un nivel no superior al necesario para conseguir el objetivo pretendido.

<sup>c</sup>, cantidad expresada por kg de alimento.

<sup>d</sup>, utilización individual o en combinación con otros aditivos de su clase, a la cantidad máxima especificada.

**Tabla IV.1.10.1.4. Relación de productos lácteos que contienen los aditivos estudiados y que han sido analizados en esta Memoria.**

Muestra	Capítulo	Aditivo	Concentración encontrada (mg kg <sup>-1</sup> )	Límite legal UE (mg kg <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>
<b>Yogures</b>				
Fresa	II.2	Acido sórbico	280 ± 10	300
Manzana-ciruelas-cereales	II.2	Acido sórbico	265 ± 10	300
Lima-limón	II.2	Acido sórbico	250 ± 10	300
Frutas tropicales	II.2	Acido sórbico	175 ± 8	300
Frutas del bosque	II.2	Acido sórbico	270 ± 10	300

<sup>a</sup>, utilización individual o en combinación con otros aditivos de su clase, a la cantidad máxima especificada.



**Tabla IV.1.10.1.5.** Relación de alimentos con alto contenido en azúcares que contienen los aditivos estudiados y que han sido analizados en esta Memoria.

Muestra	Capítulo	Aditivo	Concentración encontrada (mg kg <sup>-1</sup> )	Límite legal UE (mg kg <sup>-1</sup> )
<b>Mermeladas</b>				
Fresa	II.2	Acido benzoico	215 ± 10	500
Melocotón	II.2	Acido benzoico	255 ± 15	500
Ciruelas	II.2	Acido sórbico	225 ± 10	1000 <sup>a</sup>
	II.2	Acido benzoico	190 ± 8	500

<sup>a</sup>, utilización individual o en combinación con otros aditivos de su clase, a la cantidad máxima especificada.

En las muestras analizadas se encontraron los antioxidantes BHA, BHT,  $\alpha$ -tocoferol y  $\alpha$ -tocoferil acetato y los conservantes ácido sórbico, ácido benzoico y P-PHBA. Los aditivos que se encontraron con mayor frecuencia fueron el ácido sórbico y  $\alpha$ -tocoferol, mientras que el de uso menos frecuente fue el P-PHBA. En ningún alimento se encontró la presencia de los ésteres del ácido p-hidroxibenzoico M-PHBA y E-PHBA. Por otra parte, en ninguna de las muestras analizadas se encontró presente TBHQ, lo cual está de acuerdo con la legislación de la Unión Europea, en la que su uso no está permitido.

Sólo en una de las muestras analizadas, la sopa de pollo (2), se encontró una concentración de BHA superior a la permitida por la legislación para este aditivo, en este tipo de alimento. Esto decir, sólo el 3% de las muestras evaluadas no cumplieron con los requisitos exigidos por la Unión Europea en materia de aditivos antioxidantes y conservantes.

c) Recuperaciones

Para evaluar la aplicabilidad de los métodos desarrollados y dada la imposibilidad de encontrar materiales de referencia certificados de todas las matrices estudiadas con todos los aditivos ensayados, se realizaron estudios de recuperación de los analitos en muestras fortificadas a niveles de concentración medios (teniendo en cuenta el intervalo de linealidad para cada uno de los analitos) en el Capítulo II.1 y II.2 y con las cantidades máximas permitidas por la ley para cada uno de los alimentos analizados en el Capítulo II.3. La Tabla IV.1.10.1.6 recoge los valores medios de dichas recuperaciones obtenidos a partir de cinco réplicas de cada muestra en los distintos tipos de muestra analizados.

**Tabla IV.1.10.1.6.** Recuperaciones de cada antioxidante y conservante en las muestras que han sido analizadas en esta Memoria.

Analitos	Muestra	Capítulo	Recuperación (%)	Media de recuperación (%)
<b>Antioxidantes</b>				
BHA	Aceites	II.1	97 ± 3	99 ± 3
	Aceite	II.3	97 ± 3	
	Margarinas	II.3	99 ± 4	
	Quesos	II.3	101 ± 2	
	Pâté	II.3	99 ± 3	
	Sopas	II.1	98 ± 3	
	Mayonesas	II.3	100 ± 3	
BHT	Aceites	II.1	98 ± 3	99 ± 3
	Aceite	II.3	99 ± 3	
	Margarinas	II.3	97 ± 4	
	Quesos	II.3	100 ± 2	
	Pâté	II.3	99 ± 3	
	Sopas	II.1	97 ± 3	
	Mayonesas	II.3	101 ± 3	
TBHQ	Aceites	II.1	97 ± 3	98 ± 3
	Aceite	II.3	98 ± 3	
	Margarinas	II.3	97 ± 4	
	Quesos	II.3	99 ± 3	
	Pâté	II.3	98 ± 4	
	Sopas	II.1	99 ± 2	
	Mayonesas	II.3	96 ± 2	
α-Tocoferol	Aceites	II.1	96 ± 2	97 ± 3
	Aceite	II.3	96 ± 3	
	Margarinas	II.3	99 ± 2	
	Quesos	II.3	100 ± 3	
	Pâté	II.3	95 ± 2	
	Sopas	II.1	98 ± 3	
	Mayonesas	II.3	96 ± 3	

**Tabla IV.1.10.1.6. (continuación).**

Analitos	Muestra	Capítulo	Recuperación (%)	Media de recuperación (%)
<b>Antioxidantes</b>				
$\alpha$ -Tocoferil acetato	Aceites	II.1	98 ± 3	97 ± 3
	Aceite	II.3	97 ± 4	
	Margarinas	II.3	98 ± 3	
	Quesos	II.3	100 ± 3	
	Pâté	II.3	97 ± 4	
	Sopas	II.1	96 ± 2	
	Mayonesas	II.3	96 ± 3	
<b>Conservantes</b>				
Acido sórbico	Aceite	II.3	98 ± 5	98 ± 4
	Margarinas	II.3	100 ± 3	
	Quesos	II.3	99 ± 4	
	Pâté	II.3	97 ± 4	
	Mayonesas	II.3	97 ± 3	
Acido benzoico	Aceite	II.3	97 ± 4	97 ± 3
	Margarinas	II.3	96 ± 3	
	Quesos	II.3	95 ± 2	
	Pâté	II.3	98 ± 3	
	Mayonesas	II.3	99 ± 3	
M-PHBA	Bebidas	II.2	99 ± 4	97 ± 4
	Aceite	II.3	98 ± 5	
	Margarinas	II.3	96 ± 3	
	Quesos	II.3	97 ± 4	
	Pâté	II.3	95 ± 2	
	Salsas	II.2	96 ± 4	
	Mayonesas	II.3	97 ± 3	
	Yogures	II.2	101 ± 2	
Mermeladas	II.2	97 ± 5		

Tabla IV.1.10.1.6. (continuación).

Analitos	Muestra	Capítulo	Recuperación (%)	Media de recuperación (%)
<b>Conservantes</b>				
E-PHBA	Bebidas	II.2	94 ± 2	97 ± 3
	Aceite	II.3	96 ± 3	
	Margarinas	II.3	97 ± 2	
	Quesos	II.3	96 ± 3	
	Pâté	II.3	97 ± 3	
	Salsas	II.2	101 ± 2	
	Mayonesas	II.3	95 ± 3	
	Yogures	II.2	98 ± 5	
	Mermeladas	II.2	100 ± 3	
P-PHBA	Bebidas	II.2	97 ± 5	97 ± 3
	Aceite	II.3	97 ± 4	
	Margarinas	II.3	96 ± 3	
	Quesos	II.3	96 ± 2	
	Pâté	II.3	97 ± 2	
	Salsas	II.2	98 ± 4	
	Mayonesas	II.3	95 ± 2	
	Yogures	II.2	98 ± 5	
	Mermeladas	II.2	99 ± 4	

Los resultados de las recuperaciones se pueden comentar desde distintos puntos de vista, pero desde una perspectiva general, todos los antioxidantes y conservantes mostraron recuperaciones superiores al 94%. En cuanto a las matrices estudiadas, no hubo diferencias significativas en la aplicación de los distintos métodos a bebidas refrescantes, aceites, margarinas, quesos, pâtés, sopas, salsas, yogures y mermeladas. Por otra parte, no hubo diferencias

significativas entre las recuperaciones obtenidas para los antioxidantes y los conservantes.

A pesar de que los métodos desarrollados proporcionaron extractos bastante limpios, fue inevitable la presencia de algunas especies co-extractos procedentes de las matrices. Sin embargo, los picos cromatográficos de los mismos no interfirieron en la resolución cromatográfica de los analitos.

#### IV.1.10.2. Colorantes

##### a) Características analíticas

Los resultados de las características analíticas correspondientes a límites de detección (LOD), intervalos de linealidad, coeficientes de correlación y precisión obtenidos para cada colorante en cada uno de los métodos desarrollados en el Capítulo III de esta Memoria, se muestran en la Tabla VI.1.10.2.1.

**Tabla IV.1.10.2.1.** Relación de los límites de detección, intervalos de linealidad, coeficientes de correlación y precisión para cada colorante en cada uno de los métodos desarrollados.

Analitos	Capítulo	LOD ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) <sup>a</sup>	Intervalo linealidad ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) <sup>a</sup>	Coefficiente correlación $r^2$	RSD (%)
<b>Colorantes sintéticos</b>					
Tartrazina	III.1	0.30	7.5 – 75	0.996	2.8
	III.2	0.50	2.5 – 200	0.994	3.2
	III.3	0.30	1.3 – 120	0.996	3.6
Eritrosina	III.1	0.20	7.5 – 75	0.996	5.4

Tabla IV.1.10.2.1. (continuación).

Analitos	Capítulo	LOD ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) <sup>a</sup>	Intervalo linealidad ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) <sup>a</sup>	Coefficiente correlación $r^2$	RSD (%)
<b>Colorantes sintéticos</b>					
Verde ácido brillante BS	III.1	0.25	7.5 – 90	0.996	4.7
	III.2	0.15	0.5 – 50	0.993	4.9
	III.3	0.10	0.3 – 30	0.995	4.7
Azul brillante FCF	III.1	0.15	5.0 – 65	0.994	2.4
	III.2	0.05	0.25 – 50	0.998	3.2
	III.3	0.03	0.10 – 30	0.996	3.7
Carmín de índigo	III.1	0.37	15 – 150	0.994	5.4
	III.2	0.50	1.5 – 125	0.997	5.8
	III.3	0.30	0.90 – 75	0.998	5.6
Negro brillante BN	III.1	0.30	10 – 100	0.994	6.1
	III.2	0.75	2.5 – 200	0.995	6.5
	III.3	0.40	1.3 – 120	0.999	6.4
<b>Colorantes naturales</b>					
Curcumina	III.2 <sup>b</sup>	4.2	25 – 15000	0.997	5.2
	III.2 <sup>c</sup>	12.5	50 – 5000	0.999	4.8
	III.3	7.5	30 – 3000	0.996	4.5
Riboflavina	III.2 <sup>b</sup>	1.0	55 – 9000	0.995	3.8
	III.2 <sup>c</sup>	1.2	5.0 – 500	0.992	3.3
	III.3	0.8	3.0 – 300	0.996	3.5
Trans- $\beta$ -caroteno	III.2 <sup>b</sup>	2.0	35 – 10000	0.999	4.5
	III.2 <sup>c</sup>	3.7	12.5 – 1250	0.994	3.7
	III.3	2.2	7.5 – 750	0.997	4.1
Acido carmínico	III.2 <sup>b</sup>	0.6	25 – 5000	0.998	3.6
	III.2 <sup>c</sup>	0.5	2.5 – 250	0.997	3.2
	III.3	0.3	1.5 – 150	0.999	3.8
Caramelo	III.2 <sup>b</sup>	250	625 – 15000	0.995	5.8
	III.2 <sup>c</sup>	125	375 – 37500	0.997	6.1
	III.3	75	220 – 22000	0.994	6.4

<sup>a</sup>, los LOD y los intervalos lineales están expresados por gramo de muestra fresca en el Capítulo III.1 y III.2, y por gramo de muestra liofilizada en el Capítulo III.3.

<sup>b</sup>, método de screening.

<sup>c</sup>, método de confirmación.

Se establecieron las rectas de calibrado para todos los colorantes a cada una de las longitudes de onda seleccionadas para su determinación: 400, 530 y 610 nm para los métodos de screening (Capítulo III.1 y III.2) y para el método cromatográfico de determinación de colorantes sintéticos (Capítulo III.2 y III.3) y 425, 500 y 610 nm para el método cromatográfico de determinación de colorantes naturales. Los valores de los límites de detección y del intervalo de linealidad que se muestran en la Tabla VI.1.10.2.1 son los correspondientes a la longitud de onda para la que se obtuvo la mayor sensibilidad para cada uno de los colorantes.

Los límites de detección obtenidos en los métodos de screening y confirmación de colorantes fueron suficientes para alcanzar los límites establecidos por la legislación europea y española en cada uno de los tipos de alimentos estudiados [4]. Además, fueron equiparables o, en algunos casos mejores que los encontrados en la bibliografía ( $0.01 - 10 \text{ mg l}^{-1}$ ) [18–22]. Los intervalos de linealidad estuvieron comprendidos entre 1 y 2 órdenes de magnitud, permitiendo la cuantificación a niveles de  $\text{mg kg}^{-1}$  (partes por millón). La precisión, en todos los casos, fue aceptable.

Hay que señalar que cuando las muestras fueron alimentos liofilizados (Capítulo III.3), los intervalos de linealidad y límites de detección se calcularon utilizando 1 g de un postre lácteo (mousse de limón, 82% agua) el cual se fortificó con todos los colorantes a concentraciones variables. Para todos los colorantes estudiados, los límites de detección y los intervalos de linealidad



fueron menores cuando se utilizaron muestras liofilizadas que cuando las muestras no estaban liofilizadas.

Tanto en el método de screening (Capítulo III.1), como en los métodos de confirmación para muestras sin liofilizar (Capítulo III.2) y liofilizadas (Capítulo III.3), los límites de detección e intervalos de linealidad para el caramelo fueron los más elevados. Aún así, los resultados obtenidos son 20 veces menores que los obtenidos en otros métodos recientemente publicados [23]. Por otra parte, este colorante se encuentra permitido a niveles quantum satis, es decir que el límite que existe para la utilización del aditivo es una función de las buenas prácticas de fabricación, aunque no debe utilizarse a un nivel superior al necesario para conseguir el objetivo pretendido. La sensibilidad más alta se obtuvo para el colorante sintético azul brillante FCF.

En los métodos de screening y de confirmación de colorantes se hicieron estudios de selectividad. En el método de screening (Capítulo III.1) se estudió el efecto que podrían tener elevadas concentraciones de colorantes naturales en el extracto, ya que éstos, a altas concentraciones, pueden retenerse parcialmente en la columna de algodón. Se estudió el límite de tolerancia de cada colorante natural utilizado, definiéndolo como la cantidad de colorante más alta que originó una respuesta inferior a la señal de cada colorante sintético elegido como modelo a la concentración de  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$  (tartrazina, eritrosina y negro brillante BN) más tres veces la desviación estándar. Los colorantes naturales, curcumina,

---

riboflavina y trans- $\beta$ -caroteno se toleraron en relaciones inferiores a 150:1, 100:1 y 80:1 en la determinación de tartrazina; el colorante natural rojo ácido carmínico se toleró a una relación menor a 100:1 en la determinación de eritrosina y el caramelo no interfirió en la determinación del colorante negro brillante BN cuando la concentración del primero estuvo en una relación inferior a 600:1. También se estudió la posible interferencia que distintos tipos de aditivos como conservantes (ácidos sórbico y benzoico), acidulantes (ácidos cítrico y málico), antioxidantes (ácido ascórbico, BHA y BHT) y edulcorantes (sorbitol y aspartame) podrían producir en la confirmación de colorantes sintéticos y naturales (Capítulo III.2). Ninguno de estos aditivos tuvo efecto, lo que indicó que ninguno de ellos compitió con los colorantes por los sitios activos de las columnas sorbentes y, que en el caso de que algunos de ellos se sorbieran y eluyeran junto con los analitos, no se detectó ninguna interferencia en los cromatogramas, debido a que ninguno de ellos absorbió energía en la zona visible del espectro.

#### b) Muestras

Los métodos propuestos se aplicaron al screening y confirmación de colorantes sintéticos y naturales en 64 muestras de distintos tipos: bebidas (Tabla IV.1.10.2.2), alimentos con alto contenido en grasas como sopas, salsas y pastillas de caldo (Tabla IV.1.10.2.3), productos lácteos como yogures, batidos, postres lácteos y helados (Tabla IV.1.10.2.4) y alimentos con alto contenido en azúcares como caramelos (Tabla IV.1.10.2.5), expresándose en todos los casos

los resultados como medias y desviación estándar obtenidas a partir de 15 determinaciones en el Capítulo III.1 y 6 determinaciones en el Capítulo II.2 y II.3.

**Tabla IV.1.10.2.2.** Relación de bebidas que contienen los colorantes estudiados y que han sido analizados en esta Memoria.

Muestra	Capítulo	Aditivo		Concentración encontrada (mg l <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	Límite legal UE (mg l <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>
<b>Bebidas</b>					
Manzana	III.1	Tartrazina	NL	14.0 ± 0.8	100
	III.1	Azul brillante FCF	NL	6.2 ± 0.4	100
Piña	III.1	Tartrazina	NL	33 ± 2	100
Frutas	III.1	Verde ácido brillante BS	NL	11 ± 1	100

<sup>a</sup>, NL, muestras no liofilizadas.

<sup>b</sup>, utilización individual o en combinación con otros aditivos de su clase, a la cantidad máxima especificada.

**Tabla IV.1.10.2.3.** Relación de alimentos con alto contenido en grasas que contienen los aditivos estudiados y que han sido analizados en esta Memoria.

Muestra	Capítulo	Aditivo		Concentración encontrada (mg l <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	Límite legal UE (mg l <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>
<b>Sopas</b>					
Pollo 1	III.3	Riboflavina	L	82 ± 5	q.s. <sup>c</sup>
Pollo 2	III.3	Riboflavina	L	69 ± 4	q.s. <sup>c</sup>
	III.3	Caramelo	L	887 ± 61	q.s. <sup>c</sup>
Gallina	III.3	Caramelo	L	929 ± 65	q.s. <sup>c</sup>
Verduras 1	III.3	Riboflavina	L	88 ± 6	q.s. <sup>c</sup>
Verduras 2	III.3	Caramelo	L	875 ± 58	q.s. <sup>c</sup>
Champiñones	III.3	Riboflavina	L	75 ± 5	q.s. <sup>c</sup>
Cebolla	III.3	Caramelo	L	938 ± 60	q.s. <sup>c</sup>
Espárragos	III.3	Riboflavina	L	68 ± 4	q.s. <sup>c</sup>
Puerros	III.3	Riboflavina	L	80 ± 5	q.s. <sup>c</sup>
	III.3	Caramelo	L	965 ± 63	q.s. <sup>c</sup>
Carne	III.3	Caramelo	L	892 ± 60	q.s. <sup>c</sup>

Tabla IV.1.10.2.3. (continuación).

Muestra	Capítulo	Aditivo		Concentración encontrada (mg kg <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	Límite legal UE (mg l <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>
<b>Salsas</b>					
Vinagreta	III.3	Tartrazina	L	16.4 ± 1.1	500 <sup>d</sup>
Mostaza 1	III.3	Tartrazina	L	12.5 ± 0.9	300 <sup>d</sup>
Mostaza 2	III.3	Caramelo	L	759 ± 51	q.s. <sup>c</sup>
Tártara	III.3	Trans-β-caroteno	L	65 ± 4	q.s. <sup>c</sup>
Gaucha	III.3	Trans-β-caroteno	L	52 ± 3	q.s. <sup>c</sup>
Curry	III.3	Trans-β-caroteno	L	49 ± 3	q.s. <sup>c</sup>
Ostras	III.3	Caramelo	L	815 ± 55	q.s. <sup>c</sup>
Guacamole	III.3	Azul brillante FCF	L	2.8 ± 0.2	500 <sup>d</sup>
		Trans-β-caroteno	L	56 ± 4	q.s. <sup>c</sup>
Para pollo	III.3	Riboflavina	L	72 ± 5	q.s. <sup>c</sup>
	III.3	Trans-β-caroteno	L	60 ± 4	q.s. <sup>c</sup>
	III.3	Caramelo	L	954 ± 55	q.s. <sup>c</sup>
<b>Pastillas de caldo</b>					
Pollo 1	III.3	Caramelo	L	945 ± 65	q.s. <sup>c</sup>
Pollo 2	III.3	Riboflavina	L	77 ± 5	q.s. <sup>c</sup>
	III.3	Caramelo	L	938 ± 63	q.s. <sup>c</sup>
Carne 1	III.3	Riboflavina	L	69 ± 4	q.s. <sup>c</sup>
Carne 2	III.3	Curcumina	L	284 ± 18	500 <sup>d</sup>
	III.3	Caramelo	L	848 ± 56	q.s. <sup>c</sup>
Pescado	III.3	Riboflavina	L	59 ± 4	q.s. <sup>c</sup>
	III.3	Caramelo	L	998 ± 65	q.s. <sup>c</sup>

<sup>a</sup>, L, muestras liofilizadas.

<sup>b</sup>, cantidad expresada por kg de grasa en el alimento.

<sup>c</sup>, q.s., quantum satis: utilización de los aditivos en función de las buenas prácticas de fabricación, a un nivel no superior al necesario para conseguir el objetivo pretendido.

<sup>d</sup>, utilización individual o en combinación con otros aditivos de su clase, a la cantidad máxima especificada.

**Tabla IV.1.10.2.4.** Relación de productos lácteos que contienen los aditivos estudiados y que han sido analizados en esta Memoria.

Muestra	Capítulo	Aditivo		Concentración encontrada (mg kg <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	Límite legal UE (mg l <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>
<b>Yogures</b>					
Fresa	III.2	Acido carmínico	NL	22 ± 1	150
	III.3	Acido carmínico	L	21 ± 1	150
Frutas del bosque	III.3	Acido carmínico	L	27 ± 2	150
Limón	III.2	Curcumina	NL	172 ± 9	150
	III.3	Curcumina	L	170 ± 10	150
Melocotón 1	III.3	Trans-β-caroteno	L	50 ± 3	q.s. <sup>c</sup>
Melocotón 2	III.2	Curcumina	NL	205 ± 10	150
	III.3	Curcumina	L	197 ± 13	150
	III.2	Acido carmínico	NL	18.5 ± 0.7	150
	III.3	Acido carmínico	L	18.1 ± 1.2	150
Nueces-avena	III.2	Caramelo	NL	653 ± 40	q.s. <sup>c</sup>
	III.3	Caramelo	L	635 ± 43	q.s. <sup>c</sup>
Piña	III.2	Trans-β-caroteno	NL	44 ± 2	q.s. <sup>c</sup>
	III.3	Trans-β-caroteno	L	45 ± 3	q.s. <sup>c</sup>
Albaricoque-mango	III.2	Curcumina	NL	250 ± 12	150
	III.3	Curcumina	L	258 ± 15	150
	III.2	Trans-β-caroteno	NL	42 ± 2	q.s. <sup>c</sup>
	III.3	Trans-β-caroteno	L	44 ± 3	q.s. <sup>c</sup>
Melocotón-mango	III.3	Trans-β-caroteno	L	55 ± 3	q.s. <sup>c</sup>
Melocotón-maracuyá	III.3	Trans-β-caroteno	L	28 ± 2	q.s. <sup>c</sup>
Plátano 1	III.3	Curcumina	L	164 ± 11	150
Plátano 2	III.3	Trans-β-caroteno	L	56 ± 3	q.s. <sup>c</sup>
Plátano 3	III.3	Curcumina	L	228 ± 16	150
	III.3	Acido carmínico	L	38 ± 2	150
Cereza	III.3	Acido carmínico	L	16 ± 1	150
Vainilla	III.3	Trans-β-caroteno	L	37 ± 2	q.s. <sup>c</sup>
Macedonia	III.3	Curcumina	L	144 ± 10	150
	III.3	Acido carmínico	L	15.1 ± 1.1	150

Tabla IV.1.10.2.4. (continuación).

Muestra	Capítulo	Aditivo		Concentración encontrada (mg kg <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	Límite legal UE (mg l <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>
<b>Yogures</b>					
Fresa-plátano	III.3	Curcumina	L	142 ± 9	150
	III.3	Acido carmínico	L	23 ± 1	150
<b>Batidos</b>					
Vainilla 1	III.2	Curcumina	NL	85 ± 4	150
	III.3	Curcumina	L	87 ± 6	150
	III.2	Acido carmínico	NL	24 ± 1	150
	III.3	Acido carmínico	L	23 ± 1	150
Vainilla 2	III.2	Riboflavina	NL	66 ± 3	q.s. <sup>c</sup>
	III.3	Riboflavina	L	64 ± 4	q.s. <sup>c</sup>
	III.2	Trans-β-caroteno	NL	23 ± 1	q.s. <sup>c</sup>
	III.3	Trans-β-caroteno	L	22 ± 1	q.s. <sup>c</sup>
Fresa	III.2	Acido carmínico	NL	24 ± 1	150
	III.3	Acido carmínico	L	25 ± 2	150
<b>Postres lácteos</b>					
Con aroma de yogur	III.2	Tartrazina	NL	5.3 ± 0.3	150
	III.3	Tartrazina	L	5.2 ± 0.3	150
	III.2	Carmín de índigo	NL	1.8 ± 0.1	150
	III.3	Carmín de índigo	L	2.0 ± 0.1	150
Mousse de limón	III.3	Riboflavina	L	57 ± 4	q.s. <sup>c</sup>
Mousse de yogur de limón	III.3	Tartrazina	L	12.5 ± 0.8	150
Natilla de caramelo	III.3	Caramelo	L	785 ± 53	q.s. <sup>c</sup>
<b>Helados</b>					
Sorbete de limón	III.2	Tartrazina	NL	6.8 ± 0.3	150
	III.3	Tartrazina	L	6.6 ± 0.4	150
	III.2	Verde ácido brillante BS	NL	1.6 ± 0.1	150
	III.3	Verde ácido brillante BS	L	1.5 ± 0.1	150
Limón 1	III.2	Tartrazina	NL	38 ± 2	150
	III.3	Tartrazina	L	36 ± 3	150

Tabla IV.1.10.2.4. (continuación).

Muestra	Capítulo	Aditivo		Concentración encontrada (mg kg <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	Límite legal UE (mg l <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>
<b>Helados</b>					
Limón 2	III.3	Curcumina	L	196 ± 14	150
Pistacho	III.2	Tartrazina	NL	28 ± 1	150
	III.3	Tartrazina	L	27 ± 2	150
	III.2	Carmín de indigo	NL	14.8 ± 0.9	150
	III.3	Carmín de indigo	L	14.5 ± 0.9	150
Frutas	III.2	Riboflavina	NL	50 ± 2	q.s. <sup>c</sup>
	III.3	Riboflavina	L	49 ± 3	q.s. <sup>c</sup>
	III.2	Trans-β-caroteno	NL	37 ± 2	q.s. <sup>c</sup>
	III.3	Trans-β-caroteno	L	39 ± 3	q.s. <sup>c</sup>
	III.2	Acido carmínico	NL	26 ± 1	150
Vainilla 1	III.3	Acido carmínico	L	27 ± 1	150
	III.2	Riboflavina	NL	51 ± 2	q.s. <sup>c</sup>
	III.3	Riboflavina	L	49 ± 3	q.s. <sup>c</sup>
	III.2	Trans-β-caroteno	NL	30 ± 2	q.s. <sup>c</sup>
Vainilla 2	III.3	Trans-β-caroteno	L	31 ± 2	q.s. <sup>c</sup>
	III.3	Trans-β-caroteno	L	44 ± 3	q.s. <sup>c</sup>
Chocolate	III.3	Caramelo	L	706 ± 47	q.s. <sup>c</sup>
Naranja	III.3	Trans-β-caroteno	L	53 ± 4	q.s. <sup>c</sup>
Nata-mermelada de fresa	III.3	Acido carmínico	L	22 ± 1	150
Vainilla-nata-chocolate	III.3	Riboflavina	L	65 ± 4	q.s. <sup>c</sup>
	III.3	Trans-β-caroteno	L	27 ± 2	q.s. <sup>c</sup>

<sup>a</sup>, NL, muestras no liofilizadas; L, muestras liofilizadas.

<sup>b</sup>, utilización individual o en combinación con otros aditivos de su clase, a la cantidad máxima especificada.

<sup>c</sup>, q.s., quantum satis: utilización de los aditivos en función de las buenas prácticas de fabricación, a un nivel no superior al necesario para conseguir el objetivo pretendido.

**Tabla IV.1.10.2.5.** Relación de alimentos con alto contenido en azúcares que contienen los colorantes estudiados y que han sido analizados en esta Memoria.

Muestra	Capítulo	Aditivo		Concentración encontrada (mg kg <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	Límite legal UE (mg l <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>
<b>Caramelos</b>					
Limón	III.1	Tartrazina	NL	99 ± 5	300
Naranja	III.1	Tartrazina	NL	75 ± 3	300
Mora	III.1	Negro brillante BN	NL	65 ± 5	300

<sup>a</sup>, NL, muestras no liofilizadas.

<sup>b</sup>, utilización individual o en combinación con otros aditivos de su clase, a la cantidad máxima especificada

Los métodos de screening desarrollados (Capítulo III.1 y III.2) permitieron, en todos los casos discriminar las muestras que contenían colorantes sintéticos y las que contenían colorantes naturales. Además, debido a la imposibilidad de separación cromatográfica de la mezcla de colorantes sintéticos y naturales, el sistema de screening permitió separar las mezclas de colorantes en dos extractos: uno correspondiente al grupo de colorantes sintéticos y otro al de naturales, que se analizaron por separado. En aquellos casos en que las muestras exclusivamente contenían colorantes sintéticos o naturales sólo se analizaron los efluentes de las columnas de algodón o RP-C<sub>18</sub>, respectivamente. Respecto a los métodos de confirmación de colorantes sintéticos y naturales (Capítulo III.2 y III.3) permitieron, en todos los casos, la identificación de cada uno de los colorantes, mediante el espectro UV-Visible de cada uno de los picos cromatográficos, y la cuantificación de todos los colorantes presentes en las muestras.



En las muestras analizadas se encontraron todos los colorantes sintéticos y naturales estudiados, excepto el colorante sintético eritrosina que fue utilizado en la optimización del sistema de screening (Capítulo III.1), cuyo uso no está permitido en ninguno de los alimentos analizados. Sólo en algunos de los alimentos seleccionados se encontró mezcla de colorantes sintéticos y naturales: salsa guacamole y en los caramelos de naranja y de limón. En el caso de los caramelos de naranja y limón (Capítulo III.1) se obtuvo una respuesta positiva en el sistema de screening para los colorantes sintéticos, siendo cuantificados solamente estos colorantes mediante espectrometría UV-Visible y no los naturales. Esto fue debido a que la sensibilidad en la determinación directa de colorantes naturales mediante espectrometría UV-Visible fue muy baja, lo que puso de manifiesto la necesidad de preconcentrar los analitos en una segunda columna sorbente RP-C<sub>18</sub> (Capítulo III.2). Los colorantes naturales se encontraron con mucha más frecuencia que los sintéticos. Dentro de los colorantes naturales, los que se encontraron más frecuentemente fueron el trans-β-caroteno, caramelo y riboflavina, y dentro de los sintéticos el más frecuente fue la tartrazina.

Se encontraron 8 muestras cuyos contenidos en colorantes eran superiores a los permitidos por la legislación. La concentración de curcumina fue superior al valor legislado (150 mg kg<sup>-1</sup>) en el yogur de limón, melocotón (2), albaricoque-mango, plátano (1), plátano (3) y el helado de limón (2). Por otra parte se encontraron dos muestras que, aunque las cantidades individuales de cada uno de los colorantes utilizados (curcumina y ácido carmínico) no superaron

---

el límite legal, la suma de ambos colorantes si superó dicha cantidad: yogur de macedonia y de fresa-plátano. Estos resultados mostraron que el 13% de las muestras analizadas no cumplían con los requisitos exigidos por la Unión Europea para los aditivos colorantes.

c) Recuperaciones

Para evaluar la aplicabilidad de los métodos desarrollados y debido a que no se encontraron materiales de referencia certificados que tuvieran los dos tipos de colorantes estudiados, sintéticos y naturales, en productos lácteos y muestras grasas, se realizaron estudios de recuperación de los analitos en muestras fortificadas a niveles de concentración medios (con relación al intervalo de linealidad obtenido para cada uno de los colorantes) en el Capítulo III.2 y a tres niveles de fortificación, bajo, alto y medio, en el Capítulo III.3. La Tabla IV.1.10.2.6 recoge los valores medios de las recuperaciones obtenidos a partir de cinco réplicas de cada muestra en el Capítulo III.2 (n=5) o a partir de tres réplicas para cada uno de los niveles de fortificación utilizados en el Capítulo III.3 (n=9) en los distintos tipos de muestra analizados.

**Tabla IV.1.10.2.6.** Recuperaciones de cada colorante en las muestras que han sido analizadas en esta Memoria.

Analitos	Muestra	Capítulo	Recuperación (%)	Media de recuperación (%)
<b>Colorantes sintéticos</b>				
Tartrazina	Yogures	III.2	97 ± 4	96 ± 4
	Yogures	III.3	95 ± 5	
	Batidos	III.2	98 ± 5	
	Batidos	III.3	96 ± 5	
	Postres lácteos	III.2	99 ± 4	
	Postres lácteos	III.3	96 ± 5	
	Helados	III.2	98 ± 3	
	Helados	III.3	95 ± 3	
	Salsas	III.3	96 ± 4	
	Sopas	III.3	95 ± 4	
Verde ácido brillante BS	Pastillas de caldo	III.3	95 ± 3	96 ± 4
	Yogures	III.2	98 ± 4	
	Yogures	III.3	95 ± 5	
	Batidos	III.2	97 ± 3	
	Batidos	III.3	94 ± 3	
	Postres lácteos	III.2	97 ± 5	
	Postres lácteos	III.3	96 ± 5	
	Helados	III.2	98 ± 5	
	Helados	III.3	95 ± 4	
	Salsas	III.3	95 ± 3	
Sopas	III.3	95 ± 3		
Pastillas de caldo	III.3	95 ± 4		

**Tabla IV.1.10.2.6. (continuación).**

Analitos	Muestra	Capítulo	Recuperación (%)	Media de recuperación (%)
<b>Colorantes sintéticos</b>				
Azul brillante FCF	Yogures	III.2	98 ± 4	96 ± 3
	Yogures	III.3	95 ± 4	
	Batidos	III.2	98 ± 4	
	Batidos	III.3	95 ± 4	
	Postres lácteos	III.2	97 ± 5	
	Postres lácteos	III.3	95 ± 3	
	Helados	III.2	99 ± 3	
	Helados	III.3	95 ± 3	
	Salsas	III.3	96 ± 4	
	Sopas	III.3	95 ± 4	
Carmín de índigo	Pastillas de caldo	III.3	95 ± 3	95 ± 4
	Yogures	III.2	97 ± 5	
	Yogures	III.3	93 ± 3	
	Batidos	III.2	98 ± 4	
	Batidos	III.3	94 ± 3	
	Postres lácteos	III.2	98 ± 4	
	Postres lácteos	III.3	95 ± 3	
	Helados	III.2	96 ± 5	
	Helados	III.3	93 ± 3	
	Salsas	III.3	93 ± 3	
Sopas	III.3	93 ± 4		
Pastillas de caldo	III.3	93 ± 4		

Tabla IV.1.10.2.6. (continuación).

Analitos	Muestra	Capítulo	Recuperación (%)	Media de recuperación (%)
<b>Colorantes sintéticos</b>				
Negro brillante BN	Yogures	III.2	98 ± 4	96 ± 4
	Yogures	III.3	95 ± 4	
	Batidos	III.2	97 ± 5	
	Batidos	III.3	95 ± 4	
	Postres lácteos	III.2	96 ± 4	
	Postres lácteos	III.3	94 ± 5	
	Helados	III.2	97 ± 6	
	Helados	III.3	95 ± 4	
	Salsas	III.3	95 ± 3	
	Sopas	III.3	95 ± 4	
	Pastillas de caldo	III.3	95 ± 3	
<b>Colorantes naturales</b>				
Curcumina	Yogures	III.2	99 ± 3	95 ± 4
	Yogures	III.3	93 ± 4	
	Batidos	III.2	96 ± 4	
	Batidos	III.3	94 ± 5	
	Postres lácteos	III.2	97 ± 5	
	Postres lácteos	III.3	94 ± 3	
	Helados	III.2	98 ± 3	
	Helados	III.3	93 ± 4	
	Salsas	III.3	93 ± 5	
	Sopas	III.3	93 ± 5	
	Pastillas de caldo	III.3	94 ± 5	

**Tabla IV.1.10.2.6. (continuación).**

Analitos	Muestra	Capítulo	Recuperación (%)	Media de recuperación (%)
<b>Colorantes naturales</b>				
Riboflavina	Yogures	III.2	98 ± 5	95 ± 5
	Yogures	III.3	94 ± 5	
	Batidos	III.2	97 ± 6	
	Batidos	III.3	94 ± 5	
	Postres lácteos	III.2	96 ± 3	
	Postres lácteos	III.3	95 ± 4	
	Helados	III.2	95 ± 5	
	Helados	III.3	95 ± 3	
	Salsas	III.3	94 ± 4	
	Sopas	III.3	94 ± 5	
	Pastillas de caldo	III.3	94 ± 5	
Trans-β-caroteno	Yogures	III.2	96 ± 5	93 ± 5
	Yogures	III.3	91 ± 6	
	Batidos	III.2	97 ± 4	
	Batidos	III.3	91 ± 6	
	Postres lácteos	III.2	95 ± 4	
	Postres lácteos	III.3	91 ± 5	
	Helados	III.2	94 ± 3	
	Helados	III.3	91 ± 5	
	Salsas	III.3	92 ± 6	
	Sopas	III.3	93 ± 6	
	Pastillas de caldo	III.3	93 ± 5	

Tabla IV.1.10.2.6. (continuación).

Analitos	Muestra	Capítulo	Recuperación (%)	Media de recuperación (%)
<b>Colorantes naturales</b>				
Acido carmínico	Yogures	III.2	97 ± 4	96 ± 4
	Yogures	III.3	95 ± 3	
	Batidos	III.2	98 ± 4	
	Batidos	III.3	95 ± 4	
	Postres lácteos	III.2	99 ± 5	
	Postres lácteos	III.3	94 ± 3	
	Helados	III.2	96 ± 4	
	Helados	III.3	95 ± 5	
	Salsas	III.3	95 ± 3	
	Sopas	III.3	95 ± 4	
	Pastillas de caldo	III.3	95 ± 4	
Caramelo	Yogures	III.2	98 ± 4	96 ± 4
	Yogures	III.3	95 ± 5	
	Batidos	III.2	96 ± 4	
	Batidos	III.3	95 ± 4	
	Postres lácteos	III.2	97 ± 5	
	Postres lácteos	III.3	94 ± 4	
	Helados	III.2	98 ± 5	
	Helados	III.3	95 ± 5	
	Salsas	III.3	95 ± 3	
	Sopas	III.3	95 ± 4	
	Pastillas de caldo	III.3	94 ± 4	

Las recuperaciones medias para todos los aditivos fueron similares (93 – 96%), siendo las recuperaciones más bajas las obtenidas para el trans-β-caroteno (93%). Respecto a las matrices estudiadas, no hubo diferencias significativas entre las recuperaciones medias de cada colorante en cada uno de

los alimentos analizados, lo que demuestra que la extracción de colorantes no estuvo influenciada por la matriz del alimento.

Para realizar estudios de recuperación en las muestras liofilizadas, la fortificación se realizó en la matriz del alimento antes de que éste fuera sometido al proceso de liofilización, previo estudio del comportamiento de los analitos estudiados frente a dicho proceso de liofilización.

Si se comparan las recuperaciones de los colorantes estudiados en muestras sin liofilizar (Capítulo III.2) y liofilizadas (Capítulo III.3), se observa que fueron ligeramente superiores en las primeras siendo la diferencia más acusada en algunos colorantes como el trans- $\beta$ -caroteno. Estas diferencias pueden ser debidas a que este colorante se oxidó parcialmente durante el pretratamiento de la muestra (lixiviación) en el método del Capítulo III.3. Este efecto podría minimizarse mediante adición de ácido ascórbico al extractante, igual que en el método desarrollado en el Capítulo III.2. Este efecto es menos marcado en otros aditivos, debido probablemente a las diferencias de estabilidad de los diferentes colorantes.



## IV.2. CONCLUSIONES

Se ha contribuido a la mejora en la determinación de varios tipos de aditivos en una amplia variedad de muestras de alimentos. Los aspectos más relevantes de esta Memoria se resumen a continuación:

- a) Se han hecho aportaciones a la automatización del tratamiento de matrices alimentarias sencillas (bebidas) y complejas (alimentos con alto contenido en grasas, proteínas y azúcares), así como a la simplificación de forma significativa de los procedimientos convencionales establecidos hasta la fecha. Así, se ha reemplazado la extracción líquido-líquido manual de los aditivos en estas muestras por la extracción en fase sólida automática.
- b) Se han desarrollado métodos para la determinación de antioxidantes y conservantes en muestras con elevado contenido graso, en los que los sistemas de extracción en fase sólida optimizados permitieron la separación de dichos analitos sin la necesidad de derivatización convencional previa a su separación mediante cromatografía de gases, que aventajan a los descritos hasta la fecha.
- c) Se ha propuesto, por primera vez, un método para el screening de colorantes sintéticos y naturales en distintos tipos de alimentos, mediante el empleo de la espectrometría UV-Visible, con el objetivo de obtener información rápida y fiable sobre la presencia/ausencia de estos aditivos en alimentos.

- d) Se ha propuesto, por primera vez, un método de determinación de cinco colorantes naturales como son curcumina, riboflavina, trans- $\beta$ -caroteno, ácido carmínico y caramelo, basado en la preconcentración mediante extracción en fase sólida y separación mediante cromatografía de líquidos.
- e) Se ha demostrado la posibilidad de aplicación de la liofilización en la determinación de colorantes sintéticos y naturales, permitiendo un análisis directo de las muestras con alto contenido en grasas y productos lácteos, sin pérdida de los analitos de interés. En este caso se obtienen cromatogramas libres de interferencias debido a que se produce una extracción más selectiva de los analitos desde las muestras liofilizadas y a la inclusión de etapas de extracción simples y eficaces, que se llevan a cabo de forma continua.

### **IV.3. FUTURAS LINEAS DE INVESTIGACION**

A lo largo del desarrollo de esta Memoria de investigación han surgido nuevas líneas de trabajo, como:

- a) Automatización de algunas de las etapas previas para la determinación de aditivos en alimentos que en los métodos optimizados en esta Memoria se han realizado de forma manual.
- b) Utilización de la liofilización como tratamiento previo a la extracción de los alimentos en la determinación de otros aditivos alimentarios (antioxidantes, conservantes, edulcorantes), debido a que en esta Memoria ha quedado demostrada la utilidad de la técnica de liofilización en la conservación de las muestras y la ausencia de pérdidas de los analitos.
- c) Debido a la actual tendencia que lleva a la sustitución de los aditivos sintéticos por aditivos naturales, y a los escasos métodos desarrollados para la determinación conjunta de aditivos naturales, sería necesaria la optimización de nuevos métodos de análisis rápidos y fiables, útiles para su uso en laboratorios de control.
- d) Dada la prioridad de la Unión Europea sobre seguridad alimentaria y en concreto sobre los criterios de pureza aplicables a edulcorantes, colorantes y otros aditivos, es fundamental desarrollar métodos para el control de dichos criterios de pureza.

## REFERENCIAS

- [1] Decreto 2484/1967, BOE del 17 de Octubre de 1967, Madrid, 1967.
- [2] H. D. Belitz, W. Grosch (Eds.), *Food Chemistry*, 2ª edn., Springer, Berlin, 1999.
- [3] Directiva Comunitaria 95/2/CEE, DO L.61, Comunidad Europea, Bruselas, 1995.
- [4] Directiva Comunitaria 94/36/CEE, DO L.237, Comunidad Europea, Bruselas, 1994.
- [5] Code of Federal Regulations Title 21, Parts 70–189, US Government Printing Office, Washington, DC, 2002 (revisado).
- [6] B. D. Page, *J. AOAC Int.* 76 (1993) 765.
- [7] M. Yamada, M. Miyata, Y. Kato, M. Nakamura, M. Nishijima, T. Shibata, Y. Ito, *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 34 (1993) 635.
- [8] W. Welz, W. Sattler, H. J. Leis, E. Malle, *J. Chromatogr.* 526 (1990) 319.
- [9] M. Kakemoto, *J. Chromatogr.* 594 (1992) 253.
- [10] J. A. Leenheer, en: R. A. Minear, L.H. Keith (Eds.), *Water Analysis*, Volumen III, Academic Press, Inc., Orlando, 1984.
- [11] S. Wybraniec, A. P. de Jong, *Fresenius Z. Anal. Chem.* 356 (1996) 396.
- [12] Métodos oficiales de análisis Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación MAPA, Volumen II, Secretaría General Técnica del MAPA, Madrid, 1993.
- [13] K. Hofer, D. Jenewein, *Z. Lebensm., Unters. Forsch. A* 204 (1997) 32.
- [14] E. Ballesteros, M. Gallego, M. Valcárcel, *J. Chromatogr. A* 719 (1996) 221.

- [15] M. Ohta, M. Narita, T. Miyoshi, T. Itoyama, M. Kimura, M. Kobayashi, R. Ochi, Y. Sekiguchi, S. Koiguchi, Y. Hirahara, M. Hasegawa, M. Miyata, K. Kamakura, K. Maeda, M. Otomasu, H. Ishiwata, *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* 38 (1997) 78.
- [16] N. Ochiai, K. Sasamoto, M. Takino, S. Yamashita, S. Daishima, A. C. Heiden, A. Hoffmann, *Anal. Biochem. Chem.* 373 (2002) 56.
- [17] J. J. Manura, *LC–GC* 11 (1993) 142.
- [18] S. Panadero, A. Gómez–Hens, D. Pérez–Bendito, *Fresen. J. Anal. Chem.* 357 (1997) 80.
- [19] G. M. Greenway, N. Kometa, R. Macrae, *Food Chem.* 43 (1992) 137.
- [20] M. R. Fuh, K. J. Chia, *Talanta* 56 (2002) 663.
- [21] P. A. Clarke, K. A. Barnes, J. R. Startin, F. I. Ibe, M. J. Shepherd, *Rapid Commun. Mass Sp.* 10 (1996) 1781.
- [22] G. W. Chase, W. O. Landen, R. R. Eitenmiller, A. G. M. Soliman, *J. AOAC Int.* 75 (1992) 561.
- [23] J. S. Coffey, H. E. Nursten, J. M. Ames, L. Castle, *Food Chem.* 58 (1997) 259.









---

**ANEXO A. ACRONIMOS**

---

ANOVA	Análisis de varianza <b>Analysis Of Variance</b>
BHA	<b>Butil Hidroxi Anisol</b>
BHT	<b>Butil Hidroxi Toluol</b>
CCC	Cromatografía a contracorriente <b>Counter-Current Chromatography</b>
CCFAC	Comité sobre los aditivos alimentarios y los contaminantes del Codex Alimentarius <b>Codex Committee on Food Additives and Contaminants</b>
DAD	<b>Detector de diodos en fila</b> Diode Array Detector
DL	<b>Dosis Letal</b>
DL <sub>50</sub>	<b>Dosis Letal 50</b>
EI	Impacto electrónico <b>Electronic Impact</b>
E-PHBA	Ester etílico del ácido p-hidroxibenzoico <b>Ethyl p-Hydroxy Benzoic Acid</b>
FA/FI	Análisis/Inyección en flujo <b>Flow Analysis/Injection</b>
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura <b>Food and Agriculture Organization of the United Nations</b>
FDA	Agencia norteamericana para la regulación de alimentos y fármacos <b>Food and Drug Administration</b>
FD&C Act	Acta federal de alimentos, drogas y cosméticos <b>Federal Food, Drug and Cosmetic Act</b>
FID	Detector de ionización de llama <b>Flame Ionization Detector</b>

---

## Acrónimos

---

GC	Cromatografía de gases <b>Gas Chromatography</b>
GPC	Cromatografía en gel <b>Gel Permeation Chromatography</b>
GRAS	Sustancias generalmente reconocidas como seguras <b>Generally Recognized As Safe</b>
ID	<b>Ingesta Diaria</b>
IDA	<b>Ingesta Diaria Admisible</b>
IIR	Reactivo de interacción iónica <b>Ion-Interaction Reagent</b>
INS	Sistema internacional de numeración <b>International Numbering System</b>
JECFA	Comité de expertos en aditivos alimentarios de la FAO/OMS <b>Joint FAO/OMS Expert Committee on Food Additives</b>
LC	Cromatografía de líquidos <b>Liquid Chromatography</b>
LLE	Extracción líquido-líquido <b>Liquid-Liquid Extraction</b>
LOD	Límite de detección <b>Limit Of Detection</b>
MAE	Extracción con disolventes asistida por microondas <b>Microwave Assisted Extraction</b>
M-PHBA	Ester metílico del ácido p-hidroxibenzoico <b>Methyl p-Hydroxy Benzoic Acid</b>
MS	Espectrometría de masas <b>Mass Spectrometry</b>
MTA	<b>Módulo de Tratamiento Automático</b>
NOAEL	Dosis máxima sin efecto perjudicial en los animales de experimentación <b>Non Observed Adverse Effect Level</b>
OMS	<b>Organización Mundial de la Salud</b>

---

---

P-PHBA	Ester propílico del ácido p-hidroxibenzoico <b>Propyl p-Hydroxy Benzoic Acid</b>
RSD	Desviación estándar relativa <b>Relative Standard Deviation</b>
SBSE	Extracción mediante barra de adsorción <b>Stir Bar Sorptive Extraction</b>
SCF	Comité científico de la alimentación humana <b>Scientific Committee for Food</b>
SFC	Cromatografía de fluido supercrítico <b>Super-Critical Fluid Chromatography</b>
SFE	Extracción con fluido supercrítico <b>Supercritical Fluid Extraction</b>
SME	Microextracción con disolventes <b>Solvent Micro-Extraction</b>
SPE	Extracción en fase sólida <b>Solid Phase Extraction</b>
SPME	Microextracción en fase sólida <b>Solid Phase Micro-Extraction</b>
TBHQ	<b>Ter-Butil Hidro Quinona</b>
TLC	Cromatografía de capa fina <b>Thin Layer Chromatography</b>
USDA	Departamento de Agricultura de los EE.UU. <b>United States Department of Agriculture</b>

---



## ANEXO B. PRODUCCION CIENTIFICA FRUTO DE ESTA MEMORIA

### Publicaciones científicas

- **Continuous-flow determination of natural and synthetic antioxidants in foods by gas chromatography**  
M. González, E. Ballesteros, M. Gallego, M. Valcárcel  
Analytica Chimica Acta, 359 (1998) 47–55
  
- **Simultaneous gas chromatographic determination of food preservatives following solid-phase extraction**  
M. González, M. Gallego, M. Valcárcel  
Journal of Chromatography A, 823 (1998) 321–329
  
- **Gas chromatographic flow method for the preconcentration and simultaneous determination of antioxidant and preservative additives in fatty foods**  
M. González, M. Gallego, M. Valcárcel  
Journal of Chromatography A, 848 (1999) 529–536
  
- **Automatic screening method for the rapid and simple discrimination between synthetic and natural colorants in foods**  
Mónica González, Mercedes Gallego, Miguel Valcárcel  
Analytica Chimica Acta, 464 (2002) 237–247

- **Discriminating natural and synthetic colorants in prescreened dairy samples using liquid chromatography–diode array detection**

Mónica González, Mercedes Gallego, Miguel Valcárcel

Analytical Chemistry, 75 (2003) 685–693

- **Liquid chromatographic determination of natural and synthetic colorants in lyophilized foods using an automatic solid–phase extraction system**

Mónica González, Mercedes Gallego, Miguel Valcárcel

Journal of Agriculture and Food Chemistry, aceptado para publicación

#### Comunicaciones a Congresos

V Jornadas Andaluzas sobre Avances en Análisis Químico. Torremolinos, Noviembre 1996

- **Determinación automática de antioxidantes naturales y sintéticos**

M. González, E. Ballesteros, M. Gallego, M. Valcárcel

Póster

VII International Conference on Flow Analysis. Piracicaba (Brasil), Agosto 1997

- **Continuous solid–phase extraction system for isolation of food additives and determination by GC**

M. González, M. Gallego, M. Valcárcel

Póster

8<sup>th</sup> Symposium on Handling of Environmental and Biological Samples in Chromatography y 26<sup>th</sup> Scientific Meeting of the Group of Chromatography and Related Techniques of the Spanish Royal Society of Chemistry. Almería, Octubre 1997

- **Determination of preservatives in foods by GC after continuous solid-phase extraction**

M. González, M. Gallego, M. Valcárcel

Póster

23<sup>rd</sup> Stockolm International Youth Science Seminar–Nobel Week. Estocolmo (Suecia), Diciembre 1998

- **Isolation and determination of antioxidants and preservatives in foods**

M. González, M. Gallego, M. Valcárcel

Comunicación oral

