

# Determinación de sorbato potásico y benzoato sódico en alimentos por HPLC

<b>Apellidos, nombre</b>	Fuentes López, Ana ( <a href="mailto:anfuelo@upv.es">anfuelo@upv.es</a> ) García Martínez, Eva ( <a href="mailto:evgamar@tal.upv.es">evgamar@tal.upv.es</a> ) Fernández Segovia, Isabel ( <a href="mailto:isferse1@tal.upv.es">isferse1@tal.upv.es</a> )
<b>Departamento</b>	Tecnología de Alimentos
<b>Centro</b>	Universitat Politècnica de València



## 1 Resumen de las ideas clave

Los sorbatos y benzoatos son aditivos muy utilizados en alimentos para inhibir el crecimiento de microorganismos. Hay diferentes métodos de análisis para determinar el contenido de sorbatos y benzoatos en los alimentos, entre estas técnicas destaca el uso de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) ya que permite determinar simultáneamente ambos aditivos de forma rápida y sencilla.

## 2 Introducción

Los conservantes son sustancias que se añaden a los productos para protegerlos de alteraciones biológicas como fermentaciones, enmohecimiento y putrefacción. Entre los agentes conservantes autorizados para su uso en alimentos en la Unión Europea (Reglamento (CE) nº 1333/2008 sobre aditivos alimentarios), merecen especial atención el ácido sórbico (E200) y sus sales de sodio, potasio y calcio (E201, E202, E203), así como el ácido benzoico (E210) y sus sales de sodio, potasio y calcio (E211, E212, E213), por su extendido uso. Ambos se emplean por ser muy efectivos inhibiendo el crecimiento de mohos y levaduras, siendo también efectivos contra algunas bacterias. Su actividad antimicrobiana es mayor a pH ácido, llegando a ser ineficaces en alimentos con pH neutro.

El ácido sórbico y sus sales (sorbatos) son ampliamente utilizados por su baja toxicidad y por no poseer olor ni sabor a las concentraciones a las que se utiliza como aditivo alimentario. Se emplean principalmente en productos de panadería, lácteos, zumos de frutas, mermeladas, frutos secos, pescado, salsas y vino.

El ácido benzoico se encuentra de forma natural en plantas y frutas, pero para su uso industrial se obtiene habitualmente mediante síntesis química. El ácido benzoico y sus sales se emplean como aditivos en productos grasos como margarina, mayonesa y productos elaborados a base de huevo y también en frutas, verduras y bebidas. El ácido benzoico es muy eficaz en alimentos ácidos (pH entre 2,5 y 4,0) y es más barato que otros conservantes. Sin embargo, su uso puede producir algunos efectos adversos sobre la salud. Hay personas sensibles a estas sustancias que por simple contacto con la piel manifiestan síntomas típicos de una alergia, principalmente en forma de urticaria. Este aditivo también se ha asociado a la irritación de la mucosa gástrica y a la aparición de otras reacciones alérgicas. El Comité Mixto FAO/OMS estima como límite una ingesta diaria (IDA) de ácido benzoico y benzoato de sodio de 5 mg/kg de peso y día.

Hay diferentes métodos de análisis para determinar el contenido de sorbatos y benzoatos en los alimentos como son la cromatografía en capa fina, espectrofotometría ultravioleta (UV), la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y la cromatografía de gases (GC). Aunque tradicionalmente la técnica analítica más utilizada para estas determinaciones ha sido la espectrofotometría UV, en los últimos años los métodos cromatográficos han adquirido una mayor importancia debido a su mayor sensibilidad y especificidad. En concreto, la técnica de HPLC ha demostrado ser la más adecuada para estas determinaciones, ya que evita resultados anómalos como consecuencia de ciertas interferencias con otros componentes del alimento, y es más exacta y precisa que otras técnicas analíticas.



### 3 Objetivos

Mediante el presente artículo se pretende que el alumno sea capaz de:

- Llevar a cabo la determinación de sorbato potásico y benzoato sódico en un alimento.
- Calcular la concentración de estos aditivos en un alimento a partir de resultados obtenidos en el análisis cromatográfico.

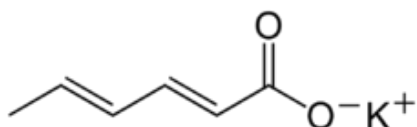
### 4 Desarrollo

A continuación vamos a describir la determinación de sorbato potásico y benzoato sódico en una muestra de mermelada.

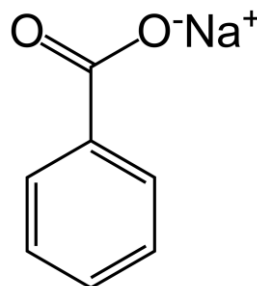
#### 4.1 Fundamento

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplada con detección por UV-visible es la técnica analítica más utilizada para la determinación de sorbatos y benzoatos en alimentos. Este análisis permite la determinación simultánea de ambos aditivos en diferentes tipos de matrices alimentarias.

A



B



**Figura 1.** Estructura química del sorbato potásico (A) y del benzoato sódico (B)

Este procedimiento precisa como fase de preparación de la muestra únicamente la disolución de la misma en agua, lo que convierte este método en un análisis simple y rápido.

#### 4.2 Material y reactivos

##### Material e instrumentación:

- Balanza analítica
- Matracas aforados de 10 mL
- Vaso de precipitados de 100 mL



- Varilla de vidrio y varilla magnética para agitación
- Agitador magnético
- Embudo de vidrio
- Lana de vidrio
- Matraz Erlenmeyer de 50 mL.
- Micropipetas de 10 y 1 mL
- Jeringa y filtros de jeringa de nylon de 0,45  $\mu\text{m}$ .
- Embudo Butchner y Kitasatos para la filtración de la fase móvil
- Sistema de desgasificación de la fase móvil: baño ultrasonidos
- Viales de inyección
- Equipo cromatográfico: HPLC con detector UV-visible

#### **Reactivos químicos:**

- Sorbato potásico
- Benzoato sódico
- Acetato de amonio
- Acetonitrilo
- Agua ultrapura

## **4.3 Procedimiento experimental**

### **1. Preparación de disoluciones patrón de sorbato potásico y benzoato sódico**

- Pesarse exactamente 100 mg de sorbato potásico o benzoato sódico. Pasarlo a un matraz aforado de 100 mL y enrasar con agua ultrapura (disolución madre). A partir de ambas disoluciones madre, preparar disoluciones de sorbato potásico y benzoato sódico a 500, 400, 300, 200 y 100 ppm. Cada disolución patrón contiene los dos aditivos simultáneamente.
- Tomar 1 mL de cada una de estas disoluciones patrón y enrasar hasta un volumen final de 10 mL con la fase móvil en un matraz aforado. De este modo se obtienen disoluciones patrón de ambos aditivos de 50, 40, 30, 20 y 10 ppm respectivamente.

### **2. Preparación del extracto de muestra**

- Pesarse 10 g de mermelada dentro de un vaso de precipitados de 100 mL y añadir 46 mL de agua destilada. De este modo se asume que el volumen de la disolución es 50 mL.
- Homogeneizar con una varilla de vidrio y mantenerlo en agitación empleando un agitador magnético durante 4 min. Dejar reposar durante 5 min.
- Decantar la solución acuosa obtenida a través de un embudo que contenga lana de vidrio y recogerla en un erlenmeyer de 50 mL.
- Tomar 1 mL del extracto y aforar hasta 10 mL con la fase móvil.

### **3. Inyección de las muestras y de las disoluciones patrón**

- Filtrar el sobrenadante procedentes de la extracción de la muestra y los patrones a través de un filtro de jeringa de nylon de 0,45  $\mu\text{m}$ .
- Recoger el filtrado en un vial de inyección.
- Introducir el vial en el muestreador automático.



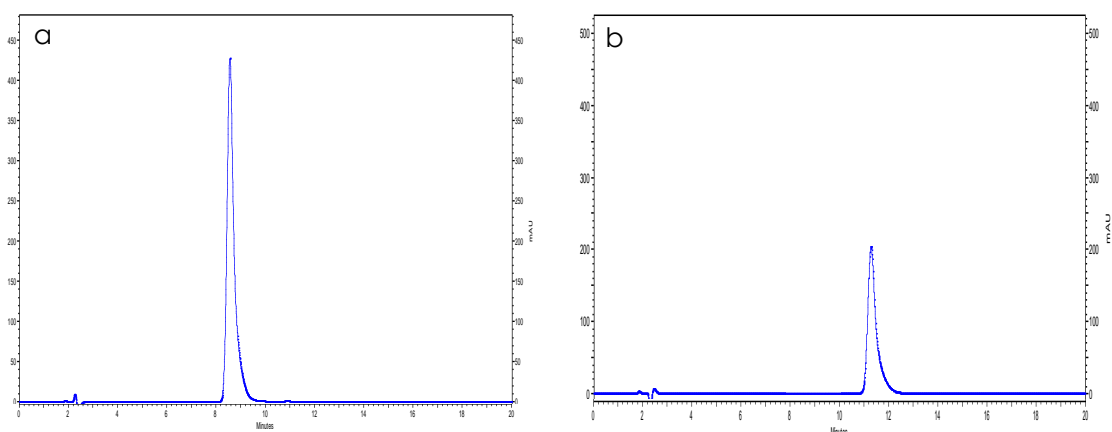
#### 4. Condiciones cromatográficas

- Columna C18 (150 x 4,6 mm x 0,45  $\mu$ m).
- Detector UV-vis a 225 nm.
- Fase móvil: 80% Tampón acetato de amonio (pH=4.2) y 20% acetonitrilo.
- Flujo: 0,8 mL/min.
- Volumen de inyección: 20  $\mu$ L.
- Tiempo de adquisición: 20 min.

### 4.4 Interpretación de los resultados

#### 1. Identificación

- En primer lugar se inyectan en el sistema cromatográfico las disoluciones madre (1000 ppm) de benzoato sódico y sorbato potásico. Los cromatogramas obtenidos nos permiten comprobar el tiempo de retención ( $t_R$ ) de cada uno de los compuestos (Figura 1).



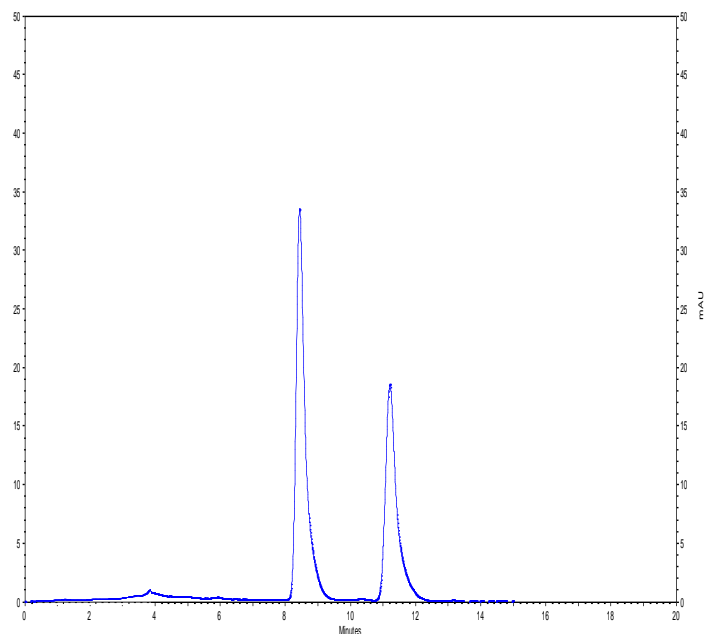
**Figura 1.** Cromatograma de la disolución madre de benzoato sódico (a) y sorbato potásico (b)

- En este caso, se obtiene que el tiempo de retención para el benzoato sódico es de 8.4 y para el sorbato potásico es 11.2.
- La posterior identificación de los aditivos en las disoluciones patrón y en las muestras se realiza por comparación de los  $t_R$  del sorbato potásico y benzoato sódico con los picos de los cromatogramas obtenidos.

#### 2. Cuantificación

La determinación del contenido de sorbato y benzoato en las muestras se lleva a cabo por el método del patrón externo.

- Para ello, en primer lugar se inyectan las disoluciones patrón de 50, 40, 30, 20 y 10 ppm de benzoato sódico y sorbato potásico (Figura 2).



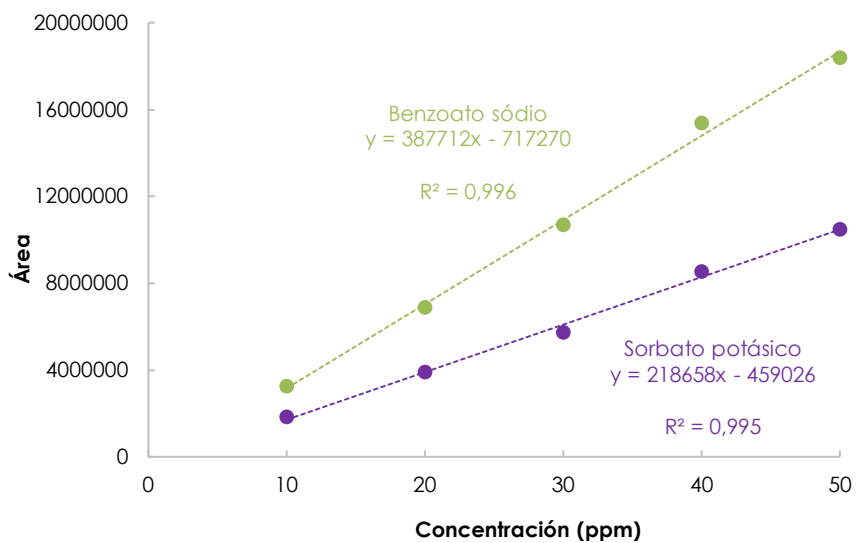
**Figura 2.** Cromatograma de la disolución patrón de 30 ppm de benzoato sódico y sorbato potásico.

- A partir de los cromatogramas obtenidos se calculan las áreas de los picos correspondientes a ambos compuestos (Tabla 1).

**Tabla 1.** Tiempo de retención y área de los picos del cromatograma de los patrones de benzoato sódico y sorbato potásico.

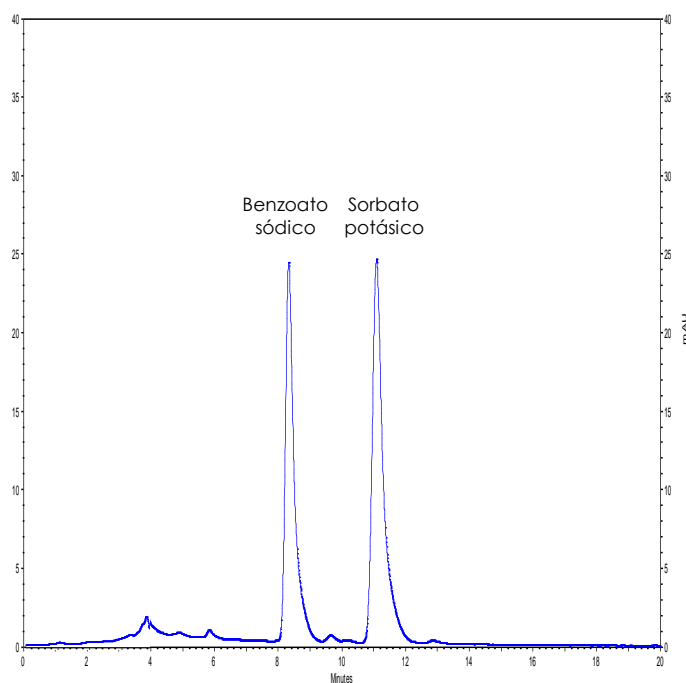
Patrón (ppm)	Benzoato sódico		Sorbato potásico	
	$t_R$	Área	$t_R$	Área
10	8,42	3251269	11,19	1845124
20	8,44	6881444	11,21	3912714
30	8,46	10675106	11,23	5746637
40	8,48	15370136	11,25	8529373
50	8,50	18392537	11,26	10469681

- La representación de las áreas de los picos de estos compuestos frente a los valores de concentración nos permite obtener las rectas de calibrado para cada compuesto, que serán utilizadas para calcular la concentración de estos compuestos en las muestras (Figura 3).



**Figura 3.** Recta de calibrado obtenida con los datos de la Tabla 1.

- A continuació, se analitza l'extracte de la mostra. En el cromatograma podem identificar els pics corresponents al benzoato sódico i al sorbato potásico.



**Figura 3.** Cromatograma de la mostra.



- La integración de los picos correspondientes al sorbato potásico y al benzoato nos permite obtener los valores de las áreas para ambos aditivos:

	$t_R$	Área (y)
Mermelada	8,333	9155204
	11,190	9195228

- Sustituyendo el valor de las áreas en las ecuaciones de las rectas de calibrado correspondientes podemos calcular la concentración de los aditivos en el extracto inyectado en el cromatógrafo:

Benzoato sódico:

$$\text{Área (y)} = 9255204 \rightarrow y = 387712x - 717270 \rightarrow \text{concentración (x)} = 25,721 \text{ mg/L}$$

Sorbato potásico:

$$\text{Área (y)} = 9195228 \rightarrow y = 218658x - 459026 \rightarrow \text{concentración (x)} = 44,152 \text{ mg/L}$$

- Para determinar la concentración de estos aditivos en la muestra de mermelada tenemos que considerar los diferentes pasos realizados en el protocolo analítico:

$$\text{Benzoato sódico} = 25,721 \text{ mg/L} \times \left( \frac{0,05\text{L disolución}}{0,010 \text{ Kg muestra}} \right) \times \left( \frac{10 \text{ mL}}{2 \text{ mL}} \right) = 257,21 \text{ mg/kg}$$

$$\text{Sorbato potásico} = 19,368 \text{ mg/L} \times \left( \frac{0,05\text{L disolución}}{0,010 \text{ Kg muestra}} \right) \times \left( \frac{10 \text{ mL}}{2 \text{ mL}} \right) = 441,52 \text{ mg/kg}$$

## 5 Cierre

A lo largo de este objeto de aprendizaje hemos visto cómo llevar a cabo la determinación analítica del contenido en sorbatos y benzoatos en un alimento mediante la técnica de HPLC. Con ayuda de un ejemplo hemos visto cómo determinar la concentración de estos aditivos en una muestra de mermelada.

## 6 Bibliografía

[1] Pylypiw H.M., Grether, M.T. (2000). "Rapid high-performance liquid chromatography method for the analysis of sodium benzoate and potassium sorbate in foods". *Journal of Chromatography A*, 883: 299–304.

[2] Reglamento (CE) N° 1333/2008 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 16 de diciembre de 2008 sobre aditivos alimentarios.