

UNIVERSIDAD DE GRANADA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA



INCREMENTO DE LA CAPACIDAD RESOLUTIVA DE SISTEMAS DE FLUJO
MEDIANTE MINICOLUMNAS MONOLÍTICAS. ANÁLISIS DE ADITIVOS.

TESIS DOCTORAL

JUAN FRANCISCO GARCÍA JIMÉNEZ

GRANADA, 2007

**INCREMENTO DE LA CAPACIDAD RESOLUTIVA DE SISTEMAS DE FLUJO
MEDIANTE MINICOLUMNAS MONOLÍTICAS. ANÁLISIS DE ADITIVOS.**

por

JUAN FRANCISCO GARCÍA JIMÉNEZ

**Departamento de Química Analítica
Universidad de Granada**

VISADO en Granada, a 30 de Marzo
de 2007

MEMORIA presentada para aspirar
al Grado de Doctor en Ciencias
Químicas.
Granada, a 30 de Marzo de 2007

Fdo.-
Prof. Dr. D. **Luis Fermín Capitán
Vallvey**, Catedrático del Departamento
de Química Analítica de la Universidad
de Granada.

Fdo.- **Juan Fco. García Jiménez**,
Licenciado en Ciencias.

Prof. Dr. Dña. **M^a Carmen Valencia
Mirón**, Profesora Titular del
Departamento de Química Analítica

A MI MUJER

AGRADECIMIENTOS

Esta Tesis Doctoral no se podría haber llevado a cabo sin la ayuda y colaboración de muchas personas. Desde aquí me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a todas ellas.

En primer lugar, quiero expresar mi agradecimiento a los directores de esta tesis Dr. D. Luis Fermín Capitán Vallvey y Dra. Dña. M^a Carmen Valencia Mirón, por el esfuerzo y dedicación que les ha supuesto la supervisión de este trabajo, y por sus sabios consejos y sugerencias sin las cuales no hubiera sido posible la elaboración de esta Tesis Doctoral.

Al Departamento de Química Analítica de la Universidad de Granada, por su soporte técnico, por su magnífica disponibilidad y hospitalidad. A cada uno de los docentes e investigadores del Departamento de Química Analítica que de alguna u otra forma han puesto su granito de arena contribuyendo a la realización de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, Pedro, Edu, López, Alex, Clara, Julio, Emilio, Joaquín, Miguel, Younes, Oscar, Roberto, y al resto de compañeros del Departamento, que siempre han estado ahí cuando los he necesitado y con los que he compartido tan buenos momentos durante todo este tiempo.

A mi esposa, por haber aguantado tantos días de malos resultados y depresiones anímicas, por su apoyo incondicional en todos los momentos de mi vida (no solo los laborales), tanto buenos como malos, y por el cariño que me brinda a diario.

A mis padres, hermano y cuñada, y a mi familia en general, por estar siempre preocupados por mi felicidad, por la alegría y cariño que me han proporcionado y por sus palabras alentadoras y reconfortantes en los momentos difíciles.

De forma especial quiero expresar mi agradecimiento al Dr. D. Luis Fermín Capitán Vallvey, a quien considero gran maestro y ejemplo de dedicación, y a la Dra. Dña. Carmen Valencia Mirón que siempre creyó en el buen fin de este trabajo.

La presente Tesis Doctoral se ha realizado en el grupo de investigación "Espectrometría en Fase Sólida" (FQM-118) del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Granada, bajo la dirección de los Drs. D. Luis Fermín Capitán Vallvey y Dña. María del Carmen Valencia Mirón.

La financiación necesaria ha corrido a cargo de los siguientes proyectos de investigación: 1) Desarrollo de sensores de un solo uso en el campo medioambiental y agroalimentario. Dirección General de Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico. Programa Nacional de Promoción General del Conocimiento. Proyecto: BQU2002-00353. 2002-2005; 2) Estudios espectroscópicos de moléculas y desarrollo de sensores ópticos. Convocatoria de Ayudas de Acciones Coordinadas (Orden de 20/julio/2002; BOJA 103 de 3/septiembre/2002 y Orden de 13/mayo/2003; BOJA 110 de 11/junio/2003); 3) Desarrollo de instrumentación portátil multianálisis con sensores de respuesta óptica. Dirección General de Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico. Programa Nacional de Promoción General del Conocimiento. Proyecto Coordinado: CTQ2005-09060-C02-01 y CTQ2005-09060-C02-02. 2006-2008.

Para la realización de esta Tesis Doctoral se ha disfrutado de una beca de Formación de Profesorado Universitario del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (Ref: AP-2002-2736).

Queremos agradecer la ayuda prestada al Ministerio de Educación y Ciencia, a la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía y al Vicerrectorado de Investigación de la Universidad de Granada.

ÍNDICE

OBJETIVOS	1
CAPÍTULO 1	5
1. AUTOMATIZACIÓN	8
1.1. Analizadores	9
1.2. Analizadores automáticos continuos	10
1.2.1. Tipos de analizadores continuos	10
1.3. Características del Análisis por inyección en flujo (FIA)	11
1.4. Componentes de un analizador FIA	12
1.4.1. Módulo de propulsión	12
1.4.2. Sistema de inserción o inyección	12
1.4.3. Sistema de transporte	13
1.4.4. Sistema de reacción	13
1.4.5. Sistema de Detección	13
1.5. Modalidades de Analizadores FIA	14
1.6. Separaciones en Analizadores FIA	15
1.7. Fases sólidas en FIA	15
1.7.1. Sensores de flujo continuo	15
1.7.1.1. Clasificación de los sensores	16
1.7.1.2. Características generales de los sensores de flujo continuo	17
1.7.1.3. Multisensores	19
1.7.1.4. Elementos esenciales en los sensores de flujo continuo	20
1.7.1.5. Tipo de soporte sólido	20
1.7.1.6. Regeneración del sensor	25
1.7.1.7. Características de la célula de flujo	25
1.7.2. Separaciones FIA en Línea	25
1.7.3. Configuraciones FIA con fases sólidas	26
2. SÓLIDOS MONOLÍTICOS	27
2.1. Introducción y antecedentes a las columnas monolíticas	29
2.2. Polímeros orgánicos	31
2.2.1. Para CEC	31

2.2.2. Para HPLC	33
2.3. Polímeros inorgánicos	34
2.3.1. Para CEC	34
2.3.2. Para HPLC	35
3. ADITIVOS	38
3.1. Aspectos Generales	38
3.2. Aditivos en alimentos	39
3.2.1. Aditivos antioxidantes	41
3.2.1.1. Generalidades	41
3.2.1.2. Clasificación	41
3.2.2. Aditivos edulcorantes	42
3.2.2.1. Generalidades	42
3.2.2.2. Clasificación	42
3.2.3. Aditivos conservantes	45
3.2.3.1. Generalidades	45
3.2.3.2. Clasificación de los conservantes	46
3.2.3.3. Métodos de conservación	47
3.2.3.4. Finalidad de uso de los conservantes	48
3.3. Aditivos en cosméticos	48
3.3.1. Aditivos antioxidantes	49
3.3.2. Aditivos edulcorantes	50
3.3.3. Aditivos conservantes	51
4. BIBLIOGRAFÍA	52
CAPITULO 2	57
1. INTRODUCCIÓN	59
2. EXPERIMENTAL	60
2.1. Reactivos y materiales	60

2.2.	Instrumentación y software	61
2.3.	Métodos y procedimientos	63
2.3.1.	Procedimiento básico	63
2.3.2.	Método de referencia	63
2.3.3.	Tratamiento de muestras	64
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	64
3.1.	Variables	65
3.1.1.	Variables de la unidad de retención-detección	65
3.1.2.	Variables químicas	66
3.1.3.	Variables FIA	69
3.2.	Características analíticas	71
3.3.	Interferentes	73
3.4.	Aplicaciones analíticas	74
4.	CONCLUSIONES	75
5.	BIBLIOGRAFÍA	76
CAPITULO 3		77
1.	INTRODUCCIÓN	79
2.	EXPERIMENTAL	80
2.1.	Reactivos y materiales	80
2.2.	Instrumentación y software	81
2.3.	Métodos y procedimientos	82
2.3.1.	Procedimiento básico	82
2.3.2.	Método de referencia	83
2.3.3.	Tratamiento de muestras	83
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	85
3.1.	Variables	86
3.1.1.	Optimización del portador	86

3.1.2. Variables FIA	91
3.2. Características analíticas	93
3.3. Aplicaciones analíticas	94
4. CONCLUSIONES	97
5. BIBLIOGRAFÍA	98
CAPITULO 4	101
1. INTRODUCCIÓN	103
2. EXPERIMENTAL	104
2.1. Reactivos y materiales	104
2.2. Instrumentación y software	105
2.3. Métodos y procedimientos	106
2.3.1. Procedimiento básico	106
2.3.2. Método de referencia	107
2.3.3. Tratamiento de muestras	107
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	108
3.1. Variables	109
3.1.1. Optimización del portador	109
3.1.2. Variables FIA	113
3.2. Características analíticas	114
3.3. Aplicaciones analíticas	116
4. CONCLUSIONES	118
5. BIBLIOGRAFÍA	119
CAPITULO 5	121

1. INTRODUCCIÓN	123
2. EXPERIMENTAL	124
2.1. Reactivos y materiales	124
2.2. Instrumentación y software	125
2.3. Métodos y procedimientos	126
2.3.1. Procedimiento básico	126
2.3.2. Método de referencia	126
2.3.3. Tratamiento de muestras	127
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	128
3.1. Variables	128
3.1.1. Optimización del portador	128
3.1.2. Variables FIA	132
3.2. Características analíticas	133
3.3. Aplicaciones analíticas	135
4. CONCLUSIONES	137
5. BIBLIOGRAFÍA	139
CAPÍTULO 6	141
1. INTRODUCCIÓN	143
2. EXPERIMENTAL	144
2.1. Reactivos y materiales	144
2.2. Instrumentación y software	145
2.3. Métodos y procedimientos	146
2.3.1. Procedimiento básico	146
2.3.2. Método de referencia	146
2.3.3. Tratamiento de muestras	147

3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	148
3.1.	Variables	148
3.1.1.	Optimización del portador	148
3.1.2.	Variables FIA	152
3.2.	Características analíticas	153
3.3.	Aplicaciones analíticas	155
4.	CONCLUSIONES	158
5.	BIBLIOGRAFÍA	159
	CONCLUSIONES	161

OBJETIVOS

OBJETIVOS DE LA TESIS

El objetivo general que se pretende en esta Tesis Doctoral es el desarrollo de métodos rápidos de análisis químico empleando la metodología de análisis por inyección en flujo (FIA), para la determinación de aditivos en diversas matrices alimentarias y cosméticas, que presenten las características de basarse en la medida de propiedades ópticas intrínsecas de los analitos y de permitir su determinación cuantitativa. Como aditivos objetivo se han seleccionado de tres familias: edulcorantes, antioxidantes y conservantes. Con esta Tesis Doctoral se pretende poner a punto procedimientos de análisis rápidos para estos aditivos que sean fáciles de usar, de bajo costo y que no contaminen el medio ambiente.

Para el desarrollo de estos métodos rápidos de análisis se emplearan diferentes esquemas FIA, bien sea mediante un soporte sólido situado en el interior de la propia célula de flujo donde se mide la absorbancia de los analitos, bien mediante el acoplamiento de columnas monolíticas al sistema de flujo.

Los objetivos específicos planteados son:

1. Desarrollar nuevos métodos de flujo ópticos para la determinación selectiva y rápida de aditivos que se basen en diferentes estrategias.
2. Estudiar las posibilidades que ofrecen tanto el uso de los soportes sólidos formados por partículas como el uso de columnas monolíticas.
3. Optimizar el tipo de soporte sólido empleado para realizar la separación efectiva de los aditivos seleccionados.
4. Establecer la mejor composición de la disolución portadora, buscar los componentes más apropiados y optimizar las condiciones de elución para los diferentes analitos y fases sólidas estudiados.
5. Caracterizar analíticamente los diferentes métodos desarrollados y demostrar su utilidad para el análisis de muestras reales, así como su validación mediante su comparación estadística con un método HPLC de referencia.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

La obtención de información de calidad del sistema bajo estudio de forma que presente la mínima incertidumbre (máxima veracidad) y la profundización en la metrología química aplicada siguiendo una adaptación cuidadosa, son tendencias genéricas actuales de la Química Analítica en cualquiera de sus vertientes.

Existen otras tendencias *básicas* más concretas que las genéricas pero ligadas a ellas, de las que destacaremos *los desarrollos de calidad* propiciados tanto por los avances en otras áreas científico-técnicas como por el planteamiento de nuevas necesidades económico-sociales o científico-técnicas. Por otra parte, la *automatización, miniaturización y simplificación* son tendencias que persiguen la reducción de la intervención humana junto con la reducción del tamaño y envergadura de los procesos. Estas tendencias pueden afectar al proceso analítico de forma global o de forma parcial, y tanto a una como a varias de sus etapas. Las tres están interrelacionadas entre sí por lo que si se quiere incrementar alguna de ellas, eso supondrá también una modificación inmediata de las otras dos. Por lo que toda evolución metodológica en el sentido de transformar un método manual en

un sensor supondrá conseguir un aumento de estas tres tendencias técnicas. Su implantación está suponiendo y supondrá una revolución en la Química Analítica, sin embargo ello debe producirse sin disminuir la calidad de la información química originada.

1. AUTOMATIZACIÓN

La automatización implica la sustitución parcial o completa de la participación humana en una operación o secuencia de operaciones. La participación humana puede concretarse en tres aspectos: el esfuerzo que se realiza, uso de los sentidos y la inteligencia necesarios para llevar a cabo un determinado proceso. La sustitución de la acción manual según la IUPAC se materializa en las siguientes definiciones:

- La *mecanización* se refiere a la producción de movimiento en lugar del operador mediante dispositivos mecánicos. Se define como el uso de dispositivos mecánicos para sustituir, mejorar, ampliar o suplementar el esfuerzo humano. Una máquina o aparato puede estar compuesto por varios mecanismos. Un aparato realiza una función pero no genera información, está compuesto de dispositivos.
- *Instrumentación* se refiere a la producción y suministro de información. Un instrumento es un sistema utilizado para medir, observar o comunicar una propiedad (parámetro) que reemplaza, mejora o suplementa la intervención humana a través de los sentidos. Está formado por aparatos y dispositivos. Genera datos primarios relacionados con el analito.
- *Automatización* integra mecanización e instrumentación. Se define como el empleo combinado de dispositivos, aparatos e instrumentos para sustituir, mejorar, ampliar o suplementar el esfuerzo, los sentidos y la inteligencia humana en el desarrollo del proceso. El sistema puede incluir un elemento de decisión no humano denominado de retroalimentación (feed-back) para controlar alguna operación.

De esta definición se deduce la existencia de dos tipos de sistemas automáticos y automatizados:

- *Sistemas automáticos*: realizan acciones previamente programadas por el operador. No tienen sistema de retroalimentación y no toman decisiones por sí mismos.
- *Sistemas automatizados*: son sistemas automáticos con sistema de retroalimentación capaz de tomar decisiones en determinados momentos de la operación sin intervención humana. Ellos se autocontrolan y se autoajustan.

1.1. Analizadores

Para automatizar el proceso analítico es necesario el uso de un *analizador*. Los *analizadores* pueden trabajar sin la presencia de un operador o necesitar la participación humana en algunas partes del proceso. Según como se realiza el tipo de transporte de muestras y reactivos los analizadores pueden ser *discontinuos*, *robotizados* y *continuos*.

Discontinuos

En ellos cada muestra se sitúa en un vial diferente que se mueve por transporte mecánico mientras se llevan a cabo los distintos pasos del proceso analítico hasta pasar por el detector donde se obtienen señales puntuales para las distintas muestras procesadas.

Robotizados

Existe generalmente un brazo articulado rodeado de dispositivos, aparatos e instrumentos que a través de un programa informático lleva a cabo las operaciones del proceso analítico de igual forma que un operador humano.

Continuos

En ellos la muestra se introduce de forma secuencial por aspiración o inyección, en una corriente continua de portador que confluye con otras en las que tienen lugar reacciones y/o procesos de separación y finalmente pasa por el detector donde se registra una señal analítica de tipo transitoria.

1.2. Analizadores automáticos continuos

Dentro de los analizadores continuos se pueden distinguir dos modalidades: de flujo segmentado o no segmentado, dependiendo de que existan o no burbujas de aire ó líquido en el flujo con el fin de evitar la contaminación entre muestras sucesivas.

La modalidad de *flujo segmentado* se caracteriza por una aspiración secuencial de las muestras, situando burbujas de aire que segmentan el flujo y que son eliminadas antes que la muestra pase por el detector. Las burbujas evitan la contaminación entre muestras sucesivas, impiden que el bolo de muestra se disperse y facilitan así la mezcla entre muestra y reactivos y por tanto la consecución del equilibrio físico y químico antes de llegar la muestra al detector.

La modalidad *de flujo no segmentado* se caracteriza por la ausencia de burbujas de aire en el sistema hidrodinámico. Las muestras se introducen de forma secuencial en el analizador, mediante inyección, inserción o aspiración y en el se llevan a cabo las distintas etapas del proceso hasta el paso de la muestra por el detector. Una diferencia fundamental de esta modalidad respecto a los de flujo segmentado es que en el momento de producirse la detección no se ha alcanzado ni el equilibrio físico (homogeneización del flujo) ni químico (desarrollo completo de la reacción analítica).

1.2.1. Tipos de analizadores continuos

Según como se introduce la muestra existen distintos *tipos de analizadores continuos*. Los sistemas donde un volumen de muestra se inserta en el flujo de forma controlada se denominan de

Análisis por Inyección en Flujo (FIA), y si la muestra se aspira de forma continua se trata de analizadores de flujo totalmente continuo.

Si el flujo se detiene en el momento que tiene lugar la medida de la señal con el fin de monitorizar la evolución de la reacción química, se denominan analizadores continuos de flujo detenido y se emplean para llevar a cabo medidas cinéticas.

Existen otras modalidades de analizadores de flujo no segmentado pero destacaremos entre ellas el Análisis por Inyección Secuencial (SIA). Fue introducido por Ruzicka y Marshall¹ en 1990 y está considerado como un sistema de flujo de segunda generación. Consiste en la aspiración secuencial de muestra y reactivo, mediante una válvula de selección múltiple hacia un reactor, en el que a continuación y mediante un cambio en el sentido del flujo, la mezcla se lleva hacia el detector. Posee un control automático y preciso en la manipulación de muestras y reactivos, genera menores desechos y menor gasto de reactivos aunque la instrumentación necesaria es más costosa.

De todos estos métodos nos detendremos en el *Análisis por inyección en flujo (FIA)*, por ser el que usaremos en esta Memoria de Doctorado.

1.3. Características del Análisis por inyección en flujo (FIA)

El FIA es un tipo de análisis de flujo continuo. Presenta varias ventajas con respecto a los métodos de flujo continuos tradicionales: mayores frecuencias de muestreo (normalmente entre 100 y 300 muestras/hora), presenta mejores tiempos de respuesta, mejores tiempos de inicio y parada del sistema, y, exceptuando el sistema de inyección, presenta instrumentación más simple y flexible. Las últimas dos ventajas descritas son muy importantes, ya que hacen que se pueda automatizar de forma económica y factible, ya que el detector monitoriza constantemente la señal (ya sea absorbancia, potencial de electrodo o cualquier otro parámetro físico que se pueda medir de forma continua en la célula de flujo). Cualquier punto del pico obtenido puede usarse para realizar la medida, ya que este punto puede ser obtenido repetidamente de forma muy reproducible, pero normalmente se usa la altura de pico como parámetro analítico porque se puede medir muy fácilmente.

1.4. Componentes de un analizador FIA

Atendiendo a la instrumentación, nos encontramos con que los métodos FIA suelen tener varios módulos: 1) módulo de propulsión, 2) módulo de inserción o inyección, 3) módulo de transporte, 4) módulo de reacción, 5) detector. Ocasionalmente puede tener otros elementos como mezcladores, sistemas separativos, etc. De éstos últimos hablaremos más adelante.

1.4.1. Módulo de propulsión

Normalmente, las disoluciones son propulsadas a través de una bomba peristáltica, en la cual el líquido es presionado a través de unos tubos de plástico o goma al mover unos cilindros que posee. Suelen tener 8 ó 10 cilindros colocados de tal manera que la mitad de ellos está estrangulando el tubo flexible, bombeando así la disolución. La velocidad de flujo se controla de dos formas: 1) modificando la velocidad de giro del rotor, y con ello la de los cilindros y 2) variando el diámetro del tubo flexible. Existen otros tipos de bombas usadas en FIA, como las de pistón, pero generalmente son más caras, y además solo permiten un canal (mientras que las peristálticas suelen permitir cuatro) al mismo tiempo, con lo que se necesitarían varias bombas en caso de necesitar varias corrientes de flujo, incrementando aún más el precio del método. Deben proporcionar un flujo constante y regular al sistema

1.4.2. Sistema de inserción o inyección

El inyector consiste en una válvula de seis vías con un bucle externo acoplado a la misma similar a las empleadas en HPLC. La inserción debe realizarse de forma precisa y reproducible y su uso es fácil, cómodo y rápido. Los volúmenes de muestra insertados, del orden de microlitros, pueden variarse en un amplio rango, lo que aumenta la versatilidad del sistema. Pueden usarse jeringas, como en los primeros estudios de FIA, aunque hoy día se usan válvulas rotatorias de seis vías y un inyector proporcional. Las figuras siguientes muestran el funcionamiento de estos dos sistemas

1.4.3. Sistema de transporte

Es el responsable del llevar las disoluciones y conectar entre sí los diferentes elementos. La configuración elegida en el sistema de transporte produce un determinado grado de dispersión del bolo de muestra y afecta a la señal analítica. Debe conseguirse un flujo constante y reproducible para realizar gran cantidad de experimentos.

Los conductos usados en los esquemas FIA consisten en tubos de plástico, normalmente de PVC o politetrafluoroetileno (PTFE), estrechos y con diámetros internos de 0,1-2,0 mm. Como norma en FIA la longitud de las tuberías debe ser lo menor posible para minimizar el efecto de dilución de la muestra inyectada por efecto de la dispersión. Las conexiones de estas tuberías se hacen a través de conectores de plástico (PEEK).

1.4.4. Sistema de reacción

Es el módulo donde se facilita la mezcla de muestra y reactivos es decir la reacción química. Pueden ser de muchos tipos, generalmente tubos con distintos rellenos. Pero también puede usarse el mismo tubo usado en el transporte enrollado de forma helicoidal. Para conseguir aumentar la velocidad de la reacción química este tubo puede introducirse en baños termostatzados. Su longitud es importante por que afecta a la dispersión del sistema.

1.4.5. Sistema de Detección

El FIA es compatible con cualquier tipo de detector. Una de las causas por las que FIA ha tenido éxito es porque se le puede acoplar cualquier tipo de detector, siempre y cuando éste sea capaz de medir en continuo. Los sistemas de detección en FIA corresponden a cualquiera de los existentes en las diferentes técnicas analíticas, ópticas y electroquímicas.

Los detectores ópticos son los más usados en FIA, debido a la gran cantidad de sustancias orgánicas e inorgánicas que presentan propiedades ópticas detectables. Y a la posibilidad de transformación de especies no detectables en otras que lo son mediante la simple adición de uno o varios reactivos. Las dos técnicas más usadas corresponden a métodos espectroscópicos, como espectrofotometría y luminiscencia molecular, así fluorimétricos o quimioluminiscentes¹.

1.5. Modalidades de Analizadores FIA

La técnica FIA engloba muchas variantes. Así nos encontramos con diversos tipos de analizadores adaptados a resolver determinadas necesidades, como son:

- a) FIA ordinario: consiste en colocar a lo largo de la línea principal de transporte del sistema una corriente de fluido portador constante. Ese portador puede ser una corriente inerte o puede ser un reactivo necesario para que se de una determinada reacción (como es el caso de los métodos quimioluminiscentes). En esa corriente se inyecta la muestra, siendo desplazada hasta el detector.
- b) FIA inverso: se llama así porque en este caso el fluido portador es la muestra, inyectando el reactivo en el sistema de flujo. Este montaje se puede hacer cuando disponemos de mucha cantidad de muestra (por ejemplo, un agua de río).
- c) FIA en sistemas cerrados: la muestra se hace circular en un sistema cerrado total o parcialmente.
- d) FIA de manipulación: la muestra se manipula en un determinado punto con objeto de mejorar los resultados.
- e) FIA miniaturizado: su objetivo es gastar cantidades de muestra lo más pequeñas posible. Puede ser usando capilares como conductos (menores de 0,2 mm de diámetro interno) o usando microconductos integrados (en una placa de un material inerte se hacen los canales correspondientes al sistema de flujo; todo el sistema excepto la bomba y el detector están integrados dentro).
- f) FIA de gradiente: se basa en la medida de la señal analítica en un punto distinto del pico máximo de la señal.

- g) FIA cinético: se mide la evolución de la señal o el cambio de señal al pasar la muestra varias veces por el detector en función del tiempo.

1.6. Separaciones en Analizadores FIA

En las metodologías FIA muchas veces es necesario incluir una etapa de separación para conseguir mejorar la selectividad del método. Existen diversas posibilidades que incluyen separaciones líquido-gas, líquido-líquido y sólido-líquido para dotar al sistema de suficiente selectividad. Las más utilizadas son las que reúnen las características idóneas para poder adaptarse a un proceso en continuo, estas son la diálisis, la extracción líquido-líquido y diversos procesos que tienen lugar con fases sólidas. Vamos a exponer de forma más amplia las posibilidades que ofrecen las fases sólidas en FIA por ser esta modalidad la que se usará en el desarrollo de esta Memoria de Doctorado.

1.7. Fases sólidas en FIA

Cuando se origina una señal analítica óptica en un analizador FIA, su medida será la que relacionaremos con el analito. Cuando se usan fases sólidas en un analizador FIA dependiendo donde estén ubicadas podemos obtener:

1.7.1. Sensores de flujo continuo

Aquellos que se caracterizan porque la fase sólida sensora está situada en la célula de flujo.

Un sensor químico idealmente es un dispositivo analítico que responde de manera directa, reversible, continua, rápida, exacta y precisa a los cambios de concentración de una o varias especies de una muestra². Consta de una microzona sensora donde tiene lugar reacciones químicas y a veces, también, procesos de separación que está conectada con un transductor óptico,

eléctrico, térmico, de masas o acústico. Muchas veces, el término sensor es usado impropriamente y frecuente encontrar trabajos y libros en donde dicho término se aplica a dispositivos que no trabajan realmente según los criterios contemplados en la definición dada.

No obstante, la amplia variedad existente de sensores hace difícil describir su comportamiento en términos generales; no obstante, establecer sus propiedades genéricas, indispensables unas, deseables otras, resulta mucho más fácil. Algunas de ellas coinciden con características analíticas esenciales, como son exactitud, precisión, sensibilidad y selectividad; otras, se refieren al tipo de funcionamiento: reversibilidad, reutilizabilidad en procesos irreversibles o regeneradas. Otras características básicas son aquellas relacionadas con el tiempo: respuesta lo más próxima posible a tiempo real, rapidez en los procesos reversibles y en los de regeneración y estabilidad (duración y tiempo de vida operacional). Finalmente, otras características destacadas son: simplicidad de construcción y operación, robustez, bajo costo, posibilidad de utilización con muestras complejas o sistemas en evolución y, por último, necesidad de no interpretación por parte del operador.

1.7.1.1. Clasificación de los sensores

Dado el gran número y variedad de sensores existentes, la clasificación debe hacerse atendiendo a un amplio conjunto de criterios diferentes. Así, tenemos:

1. Sensores químicos o bioquímicos, según sea el parámetro que miden.
2. Sensores reversibles, irreversibles o desechables y reusables o regenerables, según su naturaleza.
3. Planos, de sonda o de flujo, según su forma externa.
4. Conectados o integrados, según la relación de la zona sensora con el transductor.
5. Discontinuos o continuos, según el modo de medida.
6. Ópticos, eléctricos, térmicos, de masa, acústicos, según la naturaleza del transductor.

7. Monoparámetro o multiparámetro según respondan a un sólo analito o a varios simultáneamente.
8. Simultáneos o secuenciales, según respondan a la vez o sucesivamente a varios analitos.

En la presente Memoria, uno de los capítulos corresponde a un sensor óptico de flujo continuo, es decir, la microzona activa se sitúa en el interior de una célula de flujo, ubicada en el seno de un detector espectroscópico no destructivo. Antes de entrar directamente en el estudio de las características y modalidades de este tipo de sensores, veremos las características genéricas de los sensores químicos de flujo.

1.7.1.2. Características generales de los sensores de flujo continuo

En los sistemas analíticos de flujo continuo, la detección en la célula de flujo, las reacciones químicas y los procesos de separación que implican transferencia de materia entre dos fases tienen lugar en módulos diferentes, que están separados en el espacio, es decir, se llevan a cabo de forma secuencial. Existen cuatro formas genéricas de integrar estos pasos:

1. Integrar la separación con reacciones analíticas.
2. Integrar la reacción química con la detección.
3. Integrar la separación con la detección.
4. Integrar la separación con reacción química y detección.

Los dispositivos que integran estos pasos en una célula de flujo según las modalidades 2, 3 y 4 se pueden considerar sensores, pues poseen los principales requisitos exigibles a éstos.

Hay tres tipos básicos de sensores químicos de flujo según la posición de la microzona sensora en la que tiene lugar la reacción química y/o la separación y su relación con el detector. Dos de ellos son sensores que usan sondas conectadas al instrumento en los que la zona sensora se encuentra incorporada al final de la sonda o colocada en la célula de flujo.

El tercer tipo es un instrumento convencional, en el que la microzona sensora se ubica en una célula de flujo especial. Estos sensores de flujo se diferencian de los sensores tipo sonda, en que, en

estos últimos, el contacto con la muestra se lleva a cabo por inmersión de la sonda en la misma, y no introduciendo ésta por aspiración o inyección en la célula de flujo.

En los sensores de flujo activos la célula de flujo incluye una microzona activa. La interacción fisicoquímica entre dicha microzona y los constituyentes de flujo (líquido o gas) puede llevarse a cabo en forma de una simple reacción química, un proceso de separación, o bien, una combinación de ambos. En general, estos procesos están basados en la retención de uno de los integrantes de una reacción (química), bien sea el analito, el reactivo, el catalizador o el producto de reacción¹ sobre un soporte adecuado. Dicha inmovilización deberá ser permanente en el caso de reactivo o catalizador, si se va usar en gran número de determinaciones, pues si el reactivo se consume en el proceso, el sensor de flujo sólo se podrá usar un número muy limitado de veces. El reactivo inmovilizado debe ser regenerado si no actúa de modo reversible. Esta regeneración se efectúa, generalmente, por eliminación o elución del analito. En el caso de un catalizador no se requiere ninguna acción externa para lograr que el sensor actúe reversiblemente. Cuando lo que se inmoviliza es el analito o el producto de la reacción, dicha retención ha de ser transitoria: el sensor tiene que ser regenerado después de cada determinación, lo que obliga a eliminar la especie retenida de la microzona, es decir, el sensor opera en dos pasos, retención y elución, integrados con la detección.

En algunos casos, la inmovilización sobre la microzona activa puede ser permanente y transitoria, ello ocurre cuando se retienen dos reactivos, dos analitos o un catalizador más el producto de la reacción¹.

Por otra parte, también se usa con frecuencia una doble inmovilización cuando el reactivo previamente inmovilizado retiene al analito y origina una alteración detectable (color, fluorescencia, etc) de la microzona sensora. En este caso ocurren simultáneamente la reacción, la separación y la detección³⁻⁶.

Las reacciones pueden tener lugar en el soporte sólido (cuando el analito o el reactivo es la especie inmovilizada), en la solución del interior de la célula (cuando es el catalizador el que se inmoviliza en el soporte sólido⁷ o en una zona previa, es decir, en un reactor del sistema de flujo⁶⁻⁸⁻¹⁵).

Aquí nos vamos a centrar en sensores de flujo, en los que la microzona sensora está constituida por un soporte sólido que se ubica en la zona de detección de un detector espectroscópico no destructivo, utilizando para ello una célula de flujo adecuada y una configuración de flujo no segmentado, pues una de las características más sobresalientes de los sensores de flujo es su compatibilidad con este tipo de configuraciones, por lo que éstos sensores gozan de las ventajas de aquéllas: automatización, flexibilidad, facilidad de acondicionamiento de la muestra, bajo consumo de reactivos y muestra, escasa intervención humana, etc. De entre dichos sensores, solo se incluye en esta Memoria un sensor que integra la separación (retención) y detección.

Junto a las ventajas ya comentadas, este tipo de sistemas integrados de retención-detección presentan algunos inconvenientes, entre los que cabe destacar principalmente: la dificultad de encontrar sistemas de detección compatibles con el soporte sólido utilizado como microzona sensora, la necesidad de colocar el instrumento cerca del sistema objeto de estudio, lo que contrasta con los sensores tipo sonda que permiten la detección a larga distancia, así como la escasez de sistemas químicos que reúnen las condiciones requeridas, principalmente de reversibilidad o regenerabilidad, para su integración en este tipo de sensores.

1.7.1.3. *Multisensores*

Los sensores que permiten la detección simultánea de más de un analito son técnicamente más complejos que los sensores monoparámetro, principalmente debido a la necesidad de que el detector sea capaz de proporcionar información multidimensional, en un periodo de tiempo compatible con las características del sensor, sin embargo, sus ventajas son indiscutibles. Solo comentaremos aquellos sensores capaces de resolver mezclas complejas de analitos sin necesidad de llevar a cabo una separación previa, obviando aquellos sistemas sensores situados, por ejemplo, a la salida de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución¹⁶.

El primer multisensor de este tipo fue propuesto en 1990 por Fernández Band *et al*¹. El sensor permite la resolución de mezclas de aminas mediante la inyección de la muestra en una configuración monocanal, produciéndose la retención transitoria de los analitos sobre gel de sílice C₁₈, empaquetado en la célula de flujo de un detector de diodos en fila, que registra la absorbancia intrínseca de los mismos, a nueve longitudes de onda, en la zona entre 300-460 nm. La resolución del sistema de

nueve ecuaciones, generado por la medida a las nueve longitudes de onda, permite la resolución de la mezcla.

1.7.1.4. Elementos esenciales en los sensores de flujo continuo

Una determinación analítica basada en la detección óptica de una especie sobre una fase sólida en un sistema de flujo continuo, constituye un sensor espectrofotométrico de flujo, que integra la retención (o reacción y retención) con la detección. Esto se consigue mediante la colocación de un soporte sólido en el interior de una célula de flujo de un detector espectroscópico no destructivo, donde se retiene temporalmente la especie de interés (analito o producto de reacción) y después se eluye éste, regenerándose el sensor.

Este tipo de sensores tiene su más inmediato antecesor en la Espectrofotometría en Fase Sólida, técnica iniciada y desarrollada por Yoshimura et al¹⁷, así como por el grupo de investigación del P.A.I. "Espectrometría en Fase Sólida" del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Granada^{18:19} y los investigadores del Grupo De Química Analítica De La Universidad De Jaén²⁰. Su mayor ventaja, sobre la espectrofotometría convencional, es la elevada sensibilidad que ofrece, permitiendo la determinación de elementos traza mediante espectrofotometría, sin que sea obligado el empleo de una etapa de preconcentración. La técnica consiste en la fijación sobre un soporte sólido de la especie de interés y la medida de su absorbancia en fase sólida, tras la filtración y trasvase de las partículas del soporte a la célula de medida.

1.7.1.5. Tipo de soporte sólido

La elección del soporte sólido entre la gran variedad de materiales sintéticos y naturales que pueden emplearse, constituye una parte esencial del diseño del sensor, ya que sobre la superficie del mismo se va a producir la integración de reacción y/o retención y la detección fotométrica. Consideraremos, únicamente, los cuatro tipos de materiales más usados:

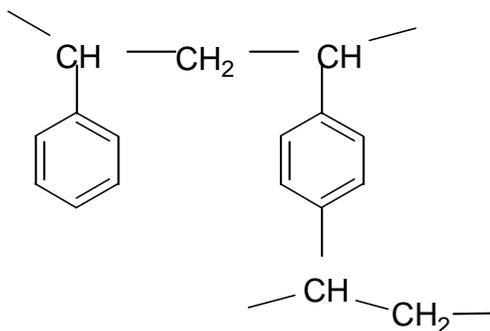
- a) cambiadores iónicos derivados de polímeros de estireno
- b) cambiadores iónicos derivados de polímeros de dextrano

- c) resinas adsorbentes sin grupos funcionales
- d) sílice con fases enlazadas

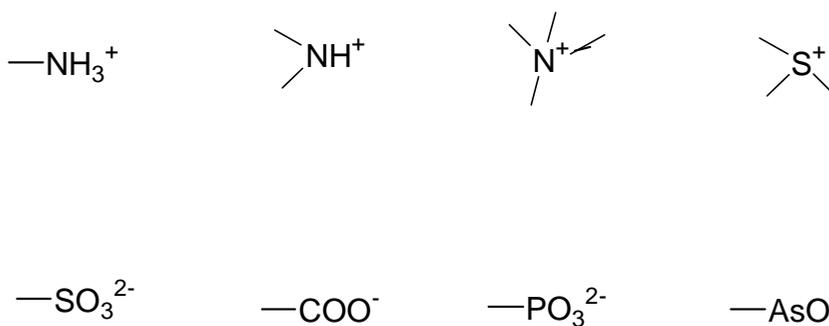
En cualquier caso, el soporte sólido empleado debe reunir ciertos requisitos para su empleo en estos sistemas de flujo no segmentado, como son:

- 1) Su tamaño de partícula debe ser lo suficientemente grande como para permitir que el líquido circule libremente, teniendo en cuenta que una de las mayores ventajas de la técnica FIA es la de trabajar a bajas presiones.
 - 2) Debe de ser mecánicamente resistente al flujo continuo: no debe de producirse la ruptura de las partículas o la aparición de huecos, que provocarían variaciones en la superficie de contacto sólido-disolución, con el fin de garantizar la reproducibilidad de la respuesta del sensor. Debe de ser además, resistente al efecto del barrido, provocado por el flujo continuo del portador, para que no se produzca una pérdida gradual de la actividad del soporte.
 - 3) Ha de ser químicamente inerte frente a los componentes de las disoluciones utilizadas como portador, eluyente y otros reactivos, ya que en caso contrario la vida media del sensor se vería gravemente afectada.
 - 4) Debe ser de un material compatible con la técnica integrada de detección, así, en sensores espectrofotométricos, el soporte debe ser suficientemente transparente como para permitir la medida de la absorbancia.
 - 5) El proceso de retención/elución debe ser suficientemente rápido.
- a) Cambiadores iónicos derivados de polímeros de estireno

Son los polímeros de cambio iónico más extendidos en la actualidad. Están constituidos por una matriz tridimensional hidrófoba, formada por cadenas de poliestireno unidas por puentes de divinilbenceno (tipo Dowex), que puede esquematizarse:



Unidos al anillo aromático, se hallan los grupos cambiadores, que pueden ser ácido fuerte o de ácido débil para los cambiadores canónicos (tipo Dowex 50) y de base fuerte o débil para los cambiadores aniónicos (tipo Dowex 1).



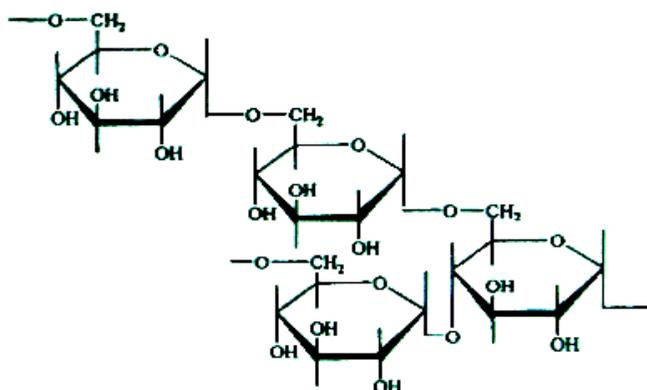
Al ponerse en contacto con agua o cualquier disolvente polar, lo absorben en interior, convirtiéndose en geles, ya que se trata de materiales porosos con numerosos grupos hidrófilos, las características del medio de reacción (pH, fuerza iónica, constante dieléctrica, etc) influyen decisivamente en el grado de hinchamiento. El grado o reticulación de la matriz, relacionado directamente con el porcentaje de divinilbenceno, tiene asimismo una influencia decisiva en las características del cambiador, ya que determina tamaño de los microporos, la capacidad de hinchamiento y la movilidad de los contraiones determinando la velocidad del proceso de cambio iónico. Para el empleo de estos cambiadores en técnicas absorciométricas en fase sólida, hay que tener en cuenta, además, que al aumentar el porcentaje de entrecruzamiento disminuye notablemente la transparencia del soporte.

Desde el punto de vista de su empleo en el desarrollo de sensores, hay que destacar que son muy útiles para la retención/elución de complejos inorgánicos o en el caso de cambiadores catiónicos para la retención irreversible de reactivos orgánicos que formen complejos con cationes. Los cambiadores aniónicos son menos útiles para la retención, irreversible de reactivos, pues si al pH óptimo de la reacción éstos están cargados negativamente el anclaje sobre el cambiador se produce a través de los grupos quelantes, inactivándolos.

La utilización de estos soportes en sistemas que emplean reactivos aromáticos que forman complejos muy estables con cationes o aniones inorgánicos, plantea también numerosos inconvenientes, pues la elución del complejo resulta enormemente difícil.

b) Cambiadores iónicos derivados de polímeros del dextrano

Están formados por polisacáridos obtenidos por entrecruzamiento de dextrano con epoclorhidrina, son por tanto, cambiadores de naturaleza polar, debido a los numerosos grupos hidroxilo existentes en los anillos de la estructura. El esqueleto de polisacárido puede ser representado esquemáticamente:



La
introducción
de grupos

funcionales iónicos da lugar a cambiadores iónicos con carácter ácido fuerte (Sephadex SE y SP), ácido débil (Sephadex CM), base fuerte (Sephadex GE, TEAE y QAE) y base débil (Sephadex DEAE, AE y ECTEOLA).

Estos soportes pueden ser utilizados para la retención de complejos con ligandos tanto orgánicos como inorgánicos, ya que la naturaleza no aromática del cambiador, hace que la retención se produzca mediante interacciones casi exclusivamente electrostáticas, o en cualquier caso débiles, facilitándose mucho la elución. También son muy útiles para la determinación de especies orgánicas por medida de su absorbancia intrínseca en la zona UV, lo que resulta imposible con cambiadores de naturaleza aromática debido a la intensa absorción que presentan.

c) Polímeros adsorbentes sin grupos funcionales

Al igual que las resinas tipo Dowex, están formadas por cadenas de poliestireno entrecruzadas por moléculas de divinilbenceno, pero carecen de grupos cambiadores de iones. Dado que no poseen grupos iónicos hidrofílicos, se afectan por las características del medio de reacción en mucha menor medida que las resinas cambiadoras de iones. Estos soportes permiten retener numerosos reactivos aromáticos, manteniendo intacta su capacidad formadora de complejos, dado que la retención se efectúa por adsorción sobre el esqueleto aromático del soporte, quedando libres los grupos iónicos activos de los reactivos. También existen adsorbentes con esqueleto tipo Sephadex sin grupos funcionales cambiadores de iones que son los más utilizados por su mayor transparencia.

d) Sílice con fases enlazadas

Se trata de soportes constituidos por esferas de sílice que poseen cadenas lineales hidrocarbonadas enlazadas a los grupos silanol exteriores. La cadena más usada aquí suele ser de 2, 8 o 18 átomos de carbono. Son materiales no porosos, por lo que presentan gran resistencia a los cambios físico-químicos del medio. Son soportes extremadamente útiles para la retención de compuestos orgánicos aromáticos o no (ya sean reactivos formadores de complejos o analitos de naturaleza orgánica), ya que retienen débilmente a estos

compuestos, en medio acuoso o hidroorgánico y la elución puede conseguirse fácilmente aumentando el porcentaje de disolvente orgánico del medio.

1.7.1.6. Regeneración del sensor

Para que el sensor sea reutilizable es necesario que una vez desarrollada la señal, la microzona activa se regenere y quede dispuesta para un nuevo análisis. El procedimiento más simple de regeneración de un sensor se da en aquellos casos en los que la propia disolución portadora actúa como eluyente, desplazando al analito (o producto de reacción) de los sitios activos del soporte. Si no se produce esta circunstancia hay que utilizar otra disolución que actúe como eluyente. En caso de que la microzona activa del sensor esté formada por un soporte sólido con un reactivo permanentemente inmovilizado habrá que evitar que el eluyente produzca la deserción del mismo inactivando el sensor.

Los agentes utilizados en la regeneración de sensores varían en función de la naturaleza de las especies retenidas y del tipo de interacción entre dichas especies y el soporte sólido. Pueden utilizarse, entre otros: agentes oxidantes o reductores, tensioactivos, agentes complejantes, disolventes orgánicos e incluso simplemente cambios de pH o fuerza iónica del medio.

1.7.1.7. Características de la célula de flujo

Las células de flujo utilizadas habitualmente para el desarrollo de estos sensores pueden ser adquiridas en las casas suministradoras habituales. Deben tener un camino óptico corto, en general, no superior a 2 mm para evitar que la absorbancia de la línea base sea demasiado alta, lo que provocaría dificultades en la detección. Por otra parte, el depósito interno de la célula de flujo debe ser lo menor posible con objeto de incrementar la sensibilidad, ya que el empleo de grandes cantidades de soporte sólido provoca una disminución de la señal, además de un aumento del tiempo de elución.

1.7.2. Separaciones FIA en Línea

En este caso la fase sólida se encuentra fuera de la célula de flujo, es decir la etapa de detección transcurre secuencialmente a las etapas de reacción-separación. En este caso al no

producirse simultáneamente a la detección serían métodos de separaciones FIA en línea con detección espectrofotométrica.

Nuestro esfuerzo ha estado estos últimos años en el desarrollo de sensores de fase sólida con los soportes convencionales citados anteriormente. Es necesario explorar otras posibilidades utilizando nuevos materiales para conseguir separaciones multianalito sin derivación de estos y a baja presión.

1.7.3. Configuraciones FIA con fases sólidas

Nuestro objetivo no es detallar todas y cada una de las configuraciones FIA que se han empleado usando fases sólidas. Enumeraremos algunas de las configuraciones posibles. Normalmente se basan en la inclusión de una o varias fases sólidas (formada por partículas de un determinado tamaño empaquetadas en el interior de un soporte), situadas en distintos lugares, fuera o dentro de la célula de flujo. Podríamos clasificarlos en:

- a) *Métodos que usan dos zonas de retención.* Una es una microcolumna situada fuera de la célula de flujo, para retener uno de los analitos mientras que la otra se encuentra situada en la célula de flujo y retiene al otro analito. De esta forma se pueden determinar ambos analitos²¹⁻²³.
- b) *Métodos que usan también dos zonas de retención,* solo que uno de los analitos se ve retenido en la microcolumna, antes de célula de flujo así como en el relleno de la célula de flujo, mientras que el otro analito no se retiene en ninguno de los dos, siendo medido cuando fluye a través de los huecos interparticulares del soporte sólido de la célula de flujo²⁴.
- c) Usar solo soporte sólido en la célula de flujo, donde ambos analitos se ven retenidos, pero uno es más retenido que el otro, de forma que mientras éste se encuentra en la zona superior de la célula de flujo, fuera de la zona de medida, el segundo se encuentra en la zona de medida, posteriormente se mide el segundo analito^{25,26}.
- d) Solo una fase sólida en la célula de flujo donde se retiene uno de los analitos mientras que el otro queda en la solución intersticial donde se mide²⁷.

- e) Solo una fase sólida fuera de la célula de flujo en la que uno de los analitos se retiene mientras que el otro que no es retenido se mide directamente al pasar por célula de flujo. El segundo analito se monitoriza una vez eluido²⁸.
- f) Usar aproximaciones quimiométricas sin separación real de los analitos antes de la medida^{29,30}.

Estos métodos son sencillos, baratos y fiables, con buenas características analíticas, pero, como ya se ha mencionado anteriormente. La solución de este problema puede ser el incremento de la cantidad de fase estacionaria presente, de manera que los analitos tengan mayor retención, pudiendo separar así mezclas más complejas al aumentar la eficacia de la zona de retención. Otra posible solución es disminuir el tamaño de partícula del soporte sólido, aumentando así el número de partículas en un mismo volumen, y con ello, la retención de los analitos. Pero, sin embargo, ambas soluciones tienen un gran inconveniente: el aumento de presión, debido, en el primer caso, a la mayor cantidad de fase estacionaria, y en el segundo al mayor empaquetamiento de las partículas de fase sólida, disminuyendo el volumen intersticial por el que fluye la fase móvil. Por lo tanto, usando este tipo de soportes sólidos como sistemas de separación, estos métodos están condenados al análisis de muestras sencillas, y con no más de dos analitos de interés.

2. SÓLIDOS MONOLÍTICOS

Las columnas monolíticas consisten en una única pieza, rígida o semirrígida, de un material con estructura porosa bimodal. Por un lado presentan macroporos a través de los cuales fluye el caudal del portador, y por otro mesoporos, mucho menores en tamaño, que son los responsables de las interacciones entre los analitos y la fase estacionaria. Pueden llevar a cabo análisis rápidos debido a que el flujo pasa a través de los poros que atraviesan la columna a altos caudales y con presiones de trabajo muy bajas, al contrario que las columnas empaquetadas tradicionales

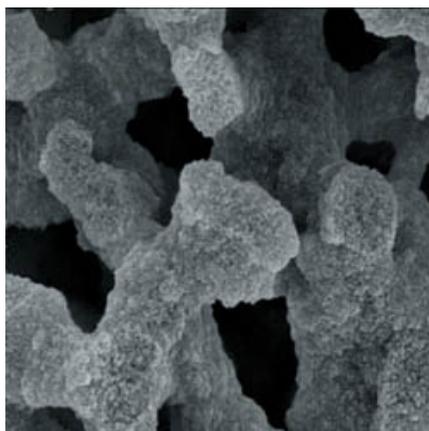


Figura 1.1: Imagen de la estructura porosa bimodal de los sólidos monolíticos

A pesar de que son materiales de reciente aparición (en las últimas décadas), están siendo ampliamente utilizados para diversos fines, y en muy poco tiempo, debido a las excelentes propiedades que presentan, el número de publicaciones referentes a columnas monolíticas ha aumentado casi exponencialmente. En la figura 1.2 podemos ver como ha aumentado este número de publicaciones referentes a columnas monolíticas en los últimos años.

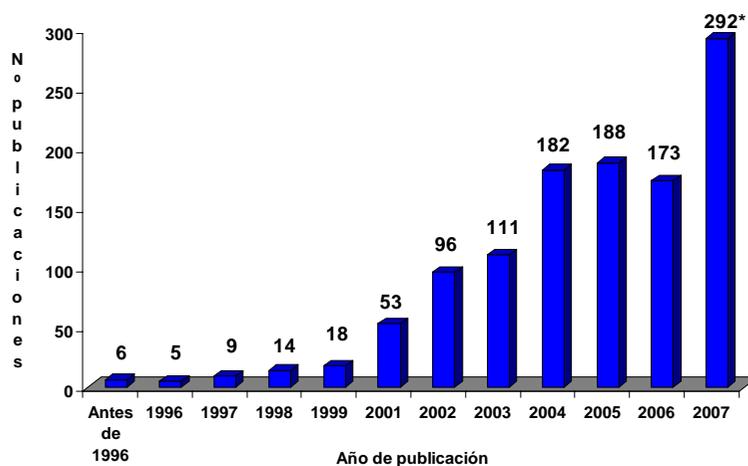


Figura 1.2: Número de publicaciones acerca de columnas monolíticas en cromatografía por año hasta 2007 (obtenido buscando "monolith columns chromatography" en SciFinder Scholar, versión 2006, ACS). *Estimación para 2007 (73 publicaciones hasta Marzo de 2007)

2.1. Introducción y antecedentes a las columnas monolíticas

Una de las tendencias actuales de la química analítica es la miniaturización de las técnicas de análisis, ya que se consigue reducir el consumo de reactivos químicos, se mejoran las separaciones y se obtienen excelentes selectividades, además de reducir el tamaño, aumentando así la portabilidad del dispositivo, y consiguiendo de esta forma el poder realizar medidas in situ. Estas técnicas miniaturizadas emplean el uso de pequeñas cantidades de muestra, con la importancia que ello conlleva, por ejemplo, en técnicas biomédicas. Actualmente uno de los caminos para obtener esta miniaturización en cromatografía líquida es la preparación de columnas unificadas, en lugar de empaquetadas, que se puedan usar en diferentes modos, como, por ejemplo, electrocromatografía capilar (CEC) o micro-HPLC.

En electrocromatografía capilar, una de las opciones desarrolladas para conseguir esta miniaturización es usar capilares rellenos con una fase estacionaria monolítica. Estos monolitos se pueden considerar como una única partícula con estructura porosa que actúa como fase estacionaria. Generalmente estos monolitos poseen mejores prestaciones que las columnas empaquetadas tradicionales, que presentan dos problemas fundamentales: la baja transferencia de masa y las limitaciones causadas por la presión del sistema. En el caso de la cromatografía de gases, el desarrollo de columnas abiertas ofrece una solución a ambos problemas permitiendo usar columnas capilares, donde llegan a alcanzarse casi un número infinito de equilibrios y los analitos son detectados midiendo propiedades específicas de los gases, lo que les confiere alta sensibilidad. Sin embargo esto no se consigue en cromatografía líquida debido a la baja difusión desde la fase móvil a la fase estacionaria y viceversa. Para poder usarlas, estas columnas abiertas en cromatografía líquida deben ser capilares diminutos (entre 10 y 60 μm de diámetro interno) con delgadas películas de fase estacionaria (0,2 μm)³¹, pero esto restringe la cantidad de muestra a analizar, originando dificultades de detección de los analitos.

En un principio, el desarrollo de los monolitos se pensó para ayudar a subsanar las dificultades asociadas a las columnas capilares empaquetadas, obteniendo además otra ventaja fundamental: la eliminación de los toques (o fritas) usados en estas columnas empaquetadas con el fin de retener la fase estacionaria dentro de la columna. Esto hace que la estructura completa de la columna sea

homogénea. En las columnas empaquetadas existen heterogeneidades con diferentes propiedades. Se sabe que las fritas están asociadas con la reducción de la eficiencia de separación de la columna, y son responsables de la formación de burbujas durante el análisis. Además, son difíciles de fabricar dentro del capilar, pudiendo influir en el ensanchamiento de banda, catalizar la formación de burbujas o desestabilizar el flujo osmótico³²⁻³⁴.

Las primeras columnas monolíticas se obtuvieron a partir de espumas de poliuretano en la década de los 70, para cromatografía líquida y gaseosa. Kubin y colaboradores³⁵ fueron los primeros que prepararon una matriz polimérica continua para cromatografía de exclusión por tamaños. Usaron un gel de poli(1-hidroxietil metacrilato) muy hinchado para la separación de proteínas, pero la permeabilidad de este medio continuo era demasiado baja. En 1979 Pretorius y colaboradores introdujeron la primera espuma continua basada en sílice porosa³⁶. El problema es que estas espumas no pudieron ser evaluadas desde el punto de vista cromatográfico ya que el surfactante usado para obtenerlas nunca fue identificado. Posteriormente, en 1989, Hjertén³⁷ investigó sobre los geles ligeros, a los cuales llamó lechos continuos. Tanto las espumas como los geles tenían un problema básico: eran incapaces de resistir las presiones asociadas con caudales elevados, limitando así los análisis rápidos (debido a su debilidad mecánica). Este problema se solventó cuando Svec y colaboradores³⁸ introdujeron los primeros monolitos poliméricos rígidos para electrocromatografía capilar (CEC). Nakanishi y Soga³⁹ describieron una técnica para la obtención de una estructura porosa de sílice monolítica para HPLC. Este monolito tenía una alta permeabilidad, y una estructura biporosa. Sin embargo, debido a las dificultades en su procesamiento su desarrollo se vio retrasado hasta 1996⁴⁰. Además, en ese mismo año, Fields introdujo un segundo método para obtener un monolito silíceo para HPLC⁴¹, pero la heterogeneidad de este monolito limitó su uso. Más tarde, en 2000, los monolitos de sílice para HPLC basados en el método de Nakanishi empezaron a comercializarse por parte de Merck (KGaA, Darmstadt, Alemania)⁴², siendo éstas unas de las columnas monolíticas más empleadas hoy día en cromatografía.

Atendiendo a la naturaleza de la matriz monolítica, podemos clasificar estos materiales en dos grupos: los polímeros orgánicos (basados en polimetacrilatos, poliestirenos o poliacrilamidas) y los polímeros inorgánicos (con esqueleto de sílice). Dentro de cada uno de los grupos se pueden encontrar dos subgrupos, uno para CEC y otro para HPLC, ya que los monolitos se han usado

extensamente como soportes cromatográficos en CEC. De hecho, la mayor parte del desarrollo en el campo de los monolitos se ha hecho dentro de la rama de la CEC, para luego ser extrapolado a la cromatografía líquida (HPLC).

2.2. Polímeros orgánicos

2.2.1. Para CEC

La diferencia entre electroforesis capilar (CE) y electrocromatografía capilar (CEC) es la inclusión en esta última de una fase estacionaria hidrofóbica, normalmente empaquetada en el interior de un capilar, del mismo tipo que los usados en HPLC. Este empaquetamiento de partículas le otorga ciertas ventajas sobre la CE, como son la habilidad de separar moléculas neutras siguiendo el mismo mecanismo que en HPLC en fase reversa, y un incremento en la capacidad de muestra^{43;44}. El resultado es que la CEC presenta unas eficiencias muy elevadas (del orden de 120000 platos/m)⁴⁵. Sin embargo, las columnas para CEC son difíciles de empaquetar, requiriendo, como se ha indicado anteriormente, fritas en los extremos de la columna para retener las partículas.

Para sintetizar uno de estos monolitos orgánicos hay que verter una mezcla de monómeros, iniciador, entrecruzador y disolvente porogénico en un molde (en este caso el molde sería un capilar). El disolvente porogénico actúa como emulsionante, creando poros en la estructura. Para iniciar la polimerización se puede calentar la mezcla o tratarla con luz ultravioleta. El monolito resultante se lava para eliminar los excesos de monómeros y de disolvente y, si es necesario, se funcionaliza con una fase estacionaria apropiada.

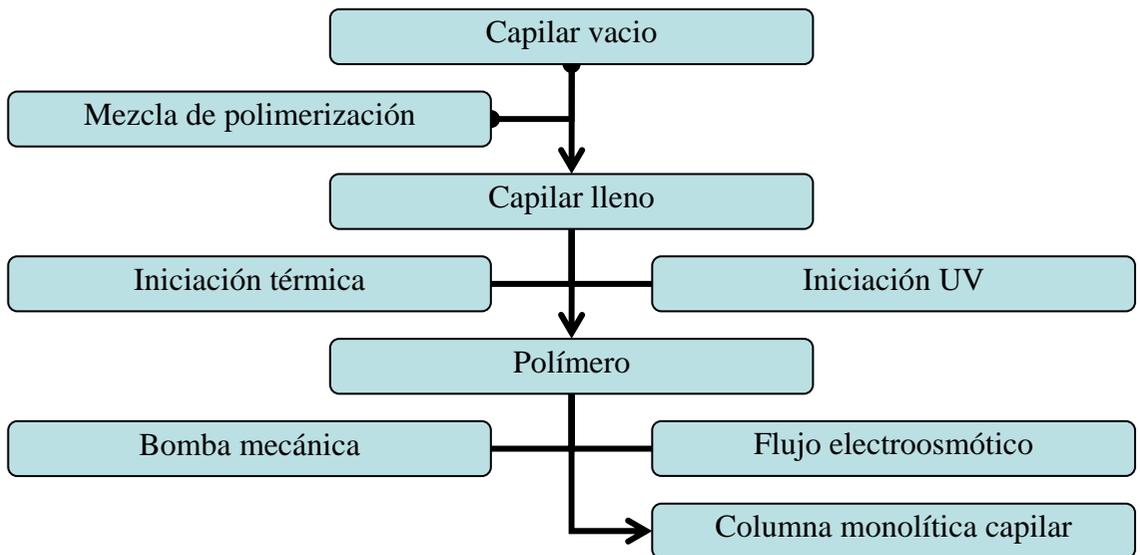


Figura 1.2: Producción esquemática de un monolito orgánico para CEC⁴⁶.

Los tres tipos de monolitos que mayor atención han despertado son:

- a) Polimetacrilatos: son los más comunes en CEC. Fueron desarrollados por Svec y Fréchet en 1995⁴⁷. Estos monolitos tienen grupos epoxi muy reactivos que permiten la funcionalización en línea recta, incluyendo la adición de grupos amino⁴⁷ y grupos cargados para el intercambio aniónico o catiónico^{48,49}.
- b) Poliestirenos: fueron desarrollados por Wang, Svec y Fréchet en 1993⁵⁰. Están basados en un esqueleto fenólico que le da sus características hidrofóbicas, pudiendo usarse sin funcionalización alguna. Sin embargo, estos monolitos carecen de la selectividad de la fase estacionaria por excelencia en HPLC: el octadecilsilano (ODS).
- c) Poliacrilamidas: tanto los geles comprimidos como los monolitos basados en poliacrilamidas se han usado en CEC^{51,52}, en micro HPLC⁵³ y en cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC)⁵¹. Estos monolitos pueden producirse funcionalizados o no.

2.2.2. Para HPLC

Muchos de los monolitos orgánicos desarrollados para CEC han sido ensayados también en condiciones de micro-HPLC^{51,53,54}. Xie creó un monolito orgánico típico para HPLC (4.6 mm de diámetro interno) basado en un polímero de poli(estireno-divinilbenceno) en 1999 para la separación de proteínas⁵⁵. En este trabajo separaron cinco proteínas en menos de 20 segundos. Sin embargo, la separación de cinco péptidos no fue posible, aparentemente, debido a la falta de selectividad de esta fase estacionaria. Por otro lado, Maruska y colaboradores describieron el desarrollo de otro polímero obtenido a partir de poliacrilamidas para micro-HPLC en fase normal que alcanzó los 150000 platos/m⁵⁶.

Al contrario que en CEC, los polímeros orgánicos no van tan bien para las aplicaciones HPLC debido a que HPLC es una técnica separativa de alta presión, y los monolitos orgánicos poseen una resistencia mecánica muy baja, además de sufrir procesos de hinchamiento con los disolventes que normalmente se usan en HPLC.

2.3. Polímeros inorgánicos

2.3.1. Para CEC

La mayoría de los monolitos inorgánicos para CEC están basados en la tecnología sol-gel (adición de silicatos), o en las técnicas de fijación de partículas por calentamiento (sinterizado), y todos presentan una base silicea. Ambos métodos pueden usar partículas cromatográficas (por ejemplo con una fase estacionaria enlazada) para suministrar el mecanismo de separación para analitos neutros mientras los hidroxilos superficiales del esqueleto silíceo suministran flujo electroosmótico. Estos monolitos presentan las partículas de sílice enlazadas dentro de la columna, formando la estructura reticular del monolito.

Como ejemplo de sinterizado, Asiae describió un proceso de sinterizado de partículas en el cual las partículas de sílice eran fijadas dentro de la columna usando un proceso de calentamiento en dos etapas⁵⁷. El capilar se rellenaba con partículas de sílice C₁₈ y se sometía al proceso de calentamiento para obtener el monolito poroso. Después se vuelve a funcionalizar con dimetiloctadecilclorosilano porque debido al proceso de sinterizado se destruye la fase estacionaria. El monolito obtenido poseía mejor estabilidad y fortaleza mecánica que las columnas empaquetadas.

El proceso de sol-gel es, en esencia, la formación de un cristal de sílice a baja temperatura y presión atmosférica. El entramado reticular se obtiene a través de la hidrólisis de un alcoxisilicato seguido de una condensación y de una polimerización⁵⁴. El resultado es un entramado tridimensional de sílice porosa.

Para incorporar las partículas al monolito, hay dos procedimientos:

- a) Atrapando partículas: conlleva inundar un capilar empaquetado (con partículas) con una mezcla de monómeros y dejar que polimerice^{58;59}, obteniendo como resultado una red que atrapa y conecta las partículas, el polímero y la pared del capilar. A partir de que polimerice, ya no es necesario el uso de fritas.

- b) Cargando partículas: conlleva inyectar una mezcla de partículas cromatográficas y agentes gelificantes dentro de un capilar de sílice fundida vacío³³. Zare y colaboradores diseñaron una técnica para cargar partículas creando una matriz inorgánica porosa con partículas de 3 μm usando una suspensión sol-gel⁶⁰. Debido a las heterogeneidades en la red la eficiencia de esta era más baja (80000 platos/m) que las columnas típicas de CEC, mientras que las inconsistencias en la suspensión produjeron baja reproducibilidad intercolumna. En 2000, Tang y Lee crearon una red sol-gel incorporando partículas de 3 μm con eficiencia mucho mayor (175000 platos/m)⁶¹. Sin embargo existían fuertes interacciones con los analitos de carácter básico.

Ishizuka y colaboradores prepararon una red de sílice continua para CEC sin partículas⁶² obteniendo una eficiencia de columna de 128000 platos/m con largos poros a través de la misma.

En resumen, los monolitos inorgánicos para CEC se están investigando, pero solo recientemente han sido capaces de ofrecer la alta selectividad encontrada en los monolitos orgánicos. Aun hoy en día se están desarrollando métodos para la manufactura reproducible de monolitos inorgánicos para CEC.

2.3.2. Para HPLC

En la literatura hay descritos dos tipos de soportes continuos de sílice: xerogeles y silicatos policondensados. En 1996, dos grupos independientes describieron técnicas para obtener monolitos para aplicaciones en cromatografía líquida. Fields y colaboradores⁴¹ introdujeron un xerogel rígido formado a presiones atmosféricas para micro-LC, y Minakuchi y colaboradores⁴⁰ introdujeron la policondensación de silicatos para análisis en HPLC.

El xerogel desarrollado por Fields fue obtenido dentro de un capilar de sílice fundida de 0,32 mm de diámetro interno. Su eficiencia fue estudiada usando benzoato y naftaleno con detección UV. El monolito se creó calentando un silicato potásico dentro del capilar de sílice fundida, y después fue

derivatizado con dimetiloctildecilclorosilano para funcionalizar la fase estacionaria. Sin embargo, el monolito era heterogéneo, presentando malas características cromatográficas (solo 5000 platos/m).

Minakuchi⁴⁰ preparó y evaluó monolitos más largos (7,0x830 mm) creados basándose en el trabajo previo de Nakanishi^{39,63,64}. El proceso es una reacción sol-gel en presencia de polímero soluble en agua. El producto es una columna monolítica consistente en una única pieza de sílice con una distribución porosa bimodal (macroporos a través del monolito y mesoporos) bien definida. Los monolitos se encapsulan después de su producción por un proceso termorretráctil de PTFE (polytetrafluoroetileno)^{40,65} o de PEEK (polieteretercetona)⁶⁶, ambos mediante calor. Una vez encapsulados se funcionalizan con una fase estacionaria de dimetiloctildecilsilano. La estructura de los monolitos consiste en esqueletos de sílice de 0,3-5 μm , poros longitudinales de 0,5-8 μm y mesoporos de 2-20 nm⁴⁰.

El monolito de Minakuchi tiene un esqueleto estructural más regular que el xerogel como se muestra en la Figura 1.3. La porosidad de estas columnas monolíticas ha sido estimada en más del 80%, medida mediante cromatografía de exclusión por tamaños usando tetrahidrofurano como fase móvil y patrones de poliestireno y alquilbenceno como muestra.

Desde 2000 la empresa Merck comercializa un producto basado en el método sol-gel de Nakanishi³⁹ y el método de encapsulamiento de Tanaka⁶⁶. El reciente desarrollo de las columnas monolíticas ofrece nuevas posibilidades para realizar análisis rápidos en HPLC.

En esta Tesis se emplea una de estas columnas monolíticas comercializadas por Merck: Chromolith RP-18 (realmente, precolumnas monolíticas), en fase reversa, con cadenas C-18, y de medidas 5x4,6 mm (especialmente diseñadas para HPLC), y la de discos monolíticos QA (de amina cuaternaria) basados en un monolito de glicidimetacrilato-co-etilenglicoldimetacrilato con grupos de amina cuaternaria enlazados, y de medidas 3x12 mm (disponibles comercialmente de la mano de BIA Separations (Ljubljana, Eslovenia)).

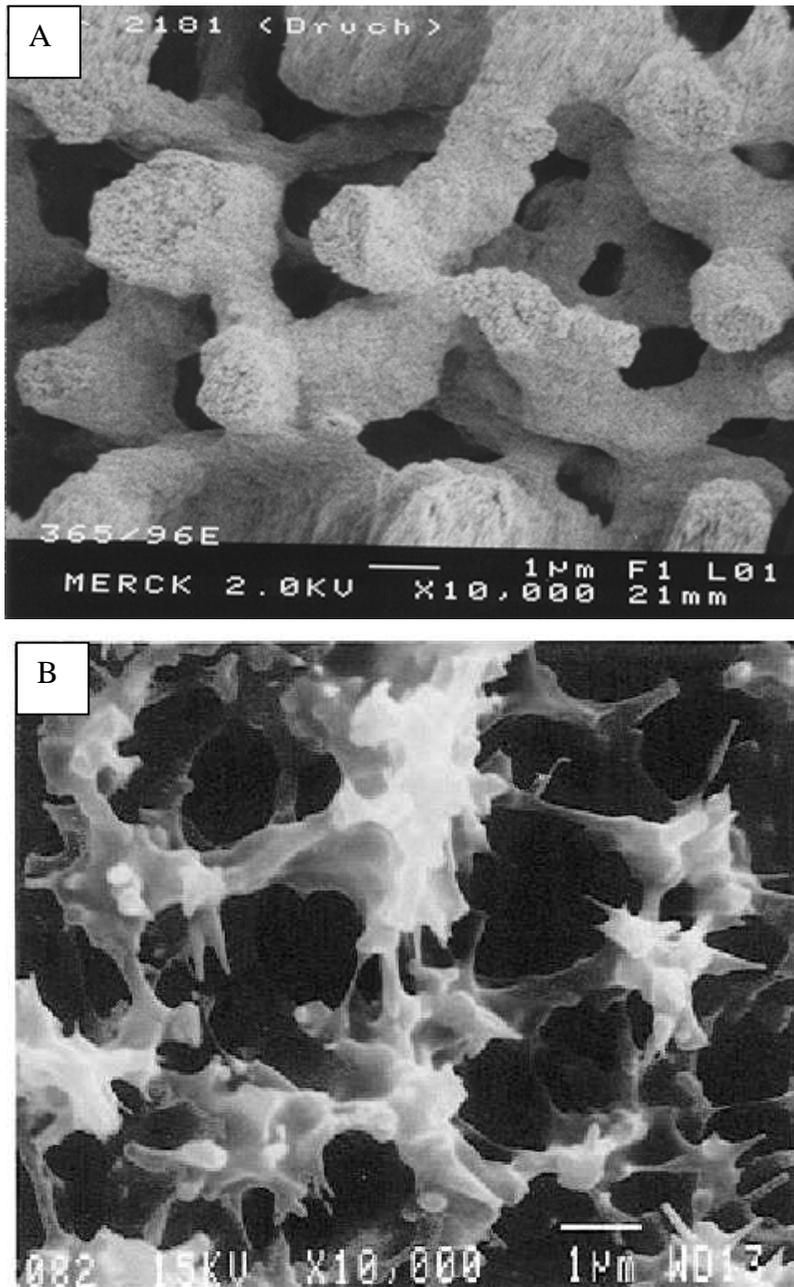


Figura 1.3: Formación de los monolitos vía (A) policondensación (Minakuchi) y (B) silicato (Fields).

3. ADITIVOS

3.1. Aspectos Generales

Aditivo es toda sustancia que normalmente no es consumida como alimento o que no se utiliza como ingrediente de un alimento y que se adiciona intencionadamente en pequeñas cantidades a un alimento o bebida destinada a la alimentación humana con la finalidad de mejorar la apariencia, sabor, textura o el almacenamiento del producto. Son sustancias que se añaden intencionalmente, es decir, conocemos la calidad y la cantidad de que se trata. Así pues, diferenciamos los aditivos de otros compuestos que podemos encontrar en los alimentos o que entran en contacto con la cadena alimenticia en un momento dado: coadyuvantes tecnológicos, sustancias añadidas para aumentar el valor nutritivo (vitaminas), plaguicidas, contaminantes, etc. Además la adición debe de realizarse con una finalidad precisa y determinada lo que requiere una justificación tecnológica, organoléptica o nutricional. La definición que ha sido adoptada por el Codex Alimentarius es: aditivo es toda sustancia que no es normalmente consumida en el alimento, tanto si tiene valor nutritivo como si no, y que se adiciona intencionalmente con una finalidad tecnológica u organoléptica, en una determinada etapa de fabricación, transformación, preparación, tratamiento, empaquetamiento, transporte o almacenamiento de dicho alimento.

El uso de aditivos no solo pretende la conservación de alimentos cuestión que es muy antigua como es el caso de salazones, ahumados, etc., sino que también en diversas prácticas culinarias han favorecido el empleo de aditivos. Inicialmente ocurrió en platos tradicionales, este es el caso de obtener una jalea a partir de un caldo o favorecer una emulsión con yema de huevo, tal la mayonesa, sin embargo estos resultados pueden obtenerse también por utilización de aditivos. El concepto de aditivo químico, asociado al principio a la lista de autorización (1912), surge a partir del siglo pasado para favorecer el trabajo de preparación culinaria, para ganar tiempo, para garantizar la conservación y la presentación de alimentos. Los alimentos se aromatizan, se colorean, se les da textura, se espesan, se protegen, etc, por ello se emplean los aditivos.

3.2. Aditivos en alimentos

Los requerimientos que deben de cumplir los aditivos alimentarios son:

- Deben de ser inocuos
- No tóxicos
- No deben adicionarse para enmascarar la calidad de la materia prima
- No deben adicionarse si se puede evitar su empleo con una buena práctica de fabricación
- No deben de reducir el valor nutritivo de los alimentos
- Nunca debe llevar a un error al consumidor.

Identificación de los aditivos: en la etiqueta del producto alimenticio debe venir recogido el aditivo, junto con la categoría a la que pertenece y su identificación, bien sea por el número, por su nombre químico o por ambos. Aunque parece que el número aporta menos transparencia, para la mayor parte de los consumidores les da igual que ponga E-102 o tartracina o el nombre químico de este colorante.

España, como estado miembro de la Unión Europea, ha incorporado a su legislación (Real decreto de 145/1997 más las modificaciones posteriores hasta el Real Decreto 994/2000) las numeraciones de los aditivos permitidos en los productos alimentarios. Estas numeraciones vienen dadas por la letra "E" seguida de tres números. El número de la centena nos indica la función que ejerce en el alimento. De acuerdo con estas numeraciones:

- 100 colorantes
- 200 conservadores
- 300 antioxidantes
- 400 estabilizantes
- 500 sustancias minerales
- 600 potenciadores de sabor
- 900 edulcorantes y otros

Dosis tecnológica y dosis admisible: por su propia funcionalidad los aditivos tienen una utilidad, por ello podemos hablar de dosis tecnológicamente útil. Este concepto es extremadamente importante, ya que determina la utilización de un determinado producto u otro y fijar los niveles de consumo. La dosis tecnológica es pues la que permitirá obtener el efecto buscado. De hecho aunque exista una modificación tecnológica, dicha dosis puede no ser suficientemente satisfactoria desde el punto de vista toxicológico.

La dosis diaria admisible (DDA) ha sido establecida por organismos internacionales. En el caso de los aditivos alimentarios, por el "Joint FAO/OMS Expert Committee on Food Additives" y por el Comité Científico de la Alimentación Humana de la CEE, después de realizar análisis y consideraciones toxicológicas. Así pues, la DDA se determina a partir de la dosis sin efectos "adversos" en un animal de experimentación, al que se le aplica previamente un factor de seguridad. Actualmente, entran en juego métodos más específicos, que emplean técnicas en el ámbito celular o molecular mejorando la caracterización del umbral tóxico. De este modo se determina la dosis sin efecto, dosis que se divide arbitrariamente por 100 (coeficiente llamado de seguridad) y que se pone con relación al peso corporal. Así por ejemplo, una dosis sin efecto en el animal de 1 g/kg/día equivaldría a una DDA de 10 mg/kg en el hombre.

Este concepto de DDA es aceptado en principio ya que resulta cómodo y relativamente seguro pero es también objeto de diversas críticas. Por ello, una DDA no es un valor absoluto y definitivo y que puede volverse a cuestionar en futuras investigaciones, evolucionando tanto en su determinación como en su aplicación.

Una vez determinada la DDA, el legislador fijará toda su atención en la multiplicación por consumos reiterados, por ejemplo, si un aditivo tiene una DDA de 10 mg/kg en el hombre, esto significa que su consumo medio o normal de una ración cotidiana, con sus variaciones posibles, no debería de exceder de esta cantidad.

Una vez realizada una reflexión general sobre la toxicología de los aditivos en general, nos centraremos en este capítulo en algunos aspectos generales de un grupo determinado de aditivos:

antioxidantes, edulcorantes y conservantes, sin entrar en detalle de aspectos toxicológicos, que no es el objeto de la presente Memoria.

3.2.1. Aditivos antioxidantes

3.2.1.1. Generalidades

La protección contra la oxidación de las grasas, los aceites y alimentos con contenido en lípidos, es frecuentemente necesaria. Esta degradación oxidativa conduce a lo que se denomina enranciamiento, cuyas repercusiones económicas pueden ser importantes puesto que termina con la pérdida de los alimentos.

Se teme que la ingestión de grasas oxidadas tenga repercusiones en el campo de la nutrición y de la seguridad alimentaria. Así pues, en el primero de ellos se debe a la oxidación que produce la destrucción de las vitaminas liposolubles A y E, e igualmente la degradación de los ácidos grasos poliinsaturados pertenecientes a las familias linoléica y linolénica, ya que estos no pueden ser sintetizados por el organismo animal y son los precursores de los prostanoideos (prostaglandinas, protaciclina y tromboxanos, etc.).

En el plano de la seguridad alimentaria, parece que los productos resultantes de la simple oxidación de las materias grasas o de la oxidación unida a la degradación térmica en el curso del calentamiento no están desprovistos de toxicidad.

3.2.1.2. Clasificación

Los antioxidantes se pueden clasificar según su origen, así nos encontramos con antioxidantes de origen natural y antioxidantes artificiales o sintéticos. Los primeros son aquellos que se encuentran en abundancia en una gran variedad de los productos (tales como frutas, hortalizas, etc.) y que se extraen de los mismos para utilizarlos con fines tecnológicos e industriales. En cambio, los segundos son obtenidos químicamente a partir de sustancias que poseen un potencial antioxidante elevado.

Los antioxidantes más empleados en la industria alimentaria se encuentran recogidos en la Tabla 1.1:

Tabla 1.1. Antioxidantes más empleados en la industria alimentaria

Naturaleza	Antioxidante	Poder antioxidante	Obtención
Antioxidantes de origen natural	Ácido ascórbico y sus sales	Alto	Frutas y hortalizas
	Tocoferoles		Frutas y hortalizas
	Lactatos		Derivados lácteos
	Ácido cítrico y sus sales		Frutas y hortalizas
	Ácido tartárico y sus sales		Frutas
Antioxidantes de origen sintético	Ácido málico y sus sales	Muy alto	Frutas
	Galato de propilo, octilo y dodecilo		A partir de fenoles
	Ácido eritórbico y sus sales		Isomerización del ascorbato
	Butilhidroxianisol		A partir del anisol
	Butilhidroxitolueno		A partir del tolueno

3.2.2. Aditivos edulcorantes

3.2.2.1. Generalidades

Las definiciones dadas en los diccionarios para edulcorante y edulcorar tienen poco interés por ser demasiado simples y también ambiguas. La comparación entre edulcorar y endulzar es más interesante: estos dos verbos presentan definiciones casi idénticas y que pudiéramos considerar sinónimas. Por extensión consideraremos que es lo mismo sustancia edulcorante o endulzante.

3.2.2.2. Clasificación

Los edulcorantes pueden, esquemáticamente, dividirse en tres grupos:

- Azúcares: sacarosa, jarabe de glucosa, azúcar invertido, iso-glucosa, dextrosa, etc. Bases de la confitería tradicional.

-
- Azúcares-alcoholes: sorbitol, xilitol, manitol, jarabe de glucosa hidrogenada, etc. Sobre la base de la confitería sin azúcar o hipocariógena.
 - Edulcorantes de alto poder endulzante: provienen, por un lado, de la síntesis química ayudada por la mejora de los conocimientos de quimio-recepción del sabor dulce; por otro, de la investigación de la naturaleza de las especies vegetales que contienen edulcorantes. Estos se clasifican en dos:
 - edulcorantes de origen natural: se trata de extractos vegetales directos o modificados químicamente para que aparezca su poder endulzante o se intensifiquen. Puede dividirse en dos familias:
 - moléculas de naturaleza glicosídica
 - moléculas de naturaleza protéica
 - edulcorantes de síntesis: moléculas sintéticas, fruto de la casualidad o de una investigación racional y que presenta un poder endulzante notorio.

No consideraremos los dos primeros grupos ya que no se les considera como aditivos, pero sí lo hacemos con los edulcorantes del tercer grupo: responden al menos a dos condiciones de la definición dada en el texto legal: tiene un alto poder endulzante y un valor nutritivo escaso o nulo.

En las Tablas 1.2 y 1.3 se recogen los edulcorantes de origen natural y artificiales más utilizados en la alimentación:

Tabla 1.2. Edulcorantes naturales más empleados en la industria alimentaria

Naturaleza	Edulcorante	Poder endulzante	Obtención
Edulcorantes de naturaleza Glicosídica	Glicirricina amoniaca	50	Raíces del regaliz
	Estevióside	300	Extracción con alcohol de planta del Paraguay
	Neohesperidina dihidrocalcona	2000	Semisintetizado a partir de la naringina
	Osladina	3000	Extraída de rizomas Polypodium vulgare
Edulcorantes de naturaleza proteica	Filodulcina	400	Extraída por disolventes de las hojas de Hidrangea Serrata
	Taumatina	1600	Extraído del fruto de Thaumatococcus daniellii

Tabla 1.3. Edulcorantes sintéticos más empleados en la industria alimentaria

Naturaleza	Edulcorante	Poder endulzante	Obtención
Sintéticos	Sacarina	300 - 500	Se usan dos métodos
	Ciclamato	25 - 140	Por sulfonación de la ciclohexilamina
	Acesulfamo-k	130 - 200	A partir de acetoacetato de butilo terciario y del isocianato de fluorsulfonilo
	Aspartamo	160	A partir del ácido aspártico y del éster metílico de la fenilalanina

3.2.3. Aditivos conservantes

3.2.3.1. Generalidades

La principal causa de deterioro de los alimentos es causada por la presencia de diferentes tipos de microorganismos (bacterias, levaduras y mohos). El deterioro microbiano de los alimentos tiene pérdidas económicas sustanciales, tanto para los fabricantes (pérdida de materias primas y de productos elaborados antes de su comercialización, deterioro de la imagen de marca, etc.) como para distribuidores y consumidores (deterioro de productos después de su adquisición y antes de su consumo). Se calcula que más del 20% de todos los alimentos producidos en el mundo se pierden por acción de los microorganismos. Estas alteraciones pueden afectar simplemente a las características organolépticas (color, aroma, sabor, textura) sin que comporten peligro para la salud. Pero si hay una contaminación por microorganismos, además de afectar a la calidad nutricional del alimento, pueden dar lugar a intoxicaciones muy graves. La toxina botulínica, producida por una bacteria, *Clostridium botulinum*, en las conservas mal esterilizadas, embutidos y en otros productos, es una de las sustancias más venenosas que se conocen (miles de veces más tóxica que el cianuro). Las aflatoxinas, sustancias producidas por el crecimiento de ciertos mohos, son potentes agentes cancerígenos. Existen pues razones poderosas para evitar la alteración de los alimentos.

A los métodos físicos, como el calentamiento, deshidratación, irradiación o congelación, pueden asociarse métodos químicos que causen la muerte de los microorganismos o que al menos eviten su crecimiento. Los conservantes limitan, retardan o previenen los procesos de fermentación, enmohecimiento, putrefacción y otras alteraciones provocadas por microorganismos (bacterias, levaduras u hongos) prolongando de este modo la vida útil de los alimentos. En muchos alimentos existen de forma natural sustancias con actividad antimicrobiana. Muchas frutas contienen diferentes ácidos orgánicos, como el ácido benzoico o el ácido cítrico. La relativa estabilidad de los yogures comparados con la leche se debe al ácido láctico producido durante su fermentación. Los ajos, cebollas y muchas especias contienen potentes agentes antimicrobianos, o precursores que se transforman en ellos al triturarlos.

3.2.3.2. Clasificación de los conservantes

Los conservantes se pueden clasificar de muchas maneras, pero la más común es según su naturaleza.

Tabla 1.4: Clasificación de los conservantes

Naturaleza	Conservante	Origen	Actividad	Aplicación
Orgánicos	Ácido sorbico y sus sales	Presente en algunos frutos y bayas		En alimentos ácidos
	Ácido benzoico y sus sales	Presente en algunos frutos	Contra mohos y levaduras	Bebidas y néctares
	Parabenes	Sintético		Alimentos y cosméticos
	Ácido propiónico y propionatos	Frutos y quesos	Contra mohos	Panes y quesos
	Ácido acético	Vinagre	Contra bacterias	Varia
Inorgánicos	Ácido láctico	Lácteos	Contra mohos y levaduras	Lácteos, carnes y panes
	Dióxido de azufre y sulfitos		Antioxidantes y contra microorganismos	Vinos, carnes, manzanas, zumos
	Nitratos y nitritos	Sintético	Contra microorganismos	Carnes y quesos
Otros	Anhidrido carbónico		Contra microbios y mohos	Carnes, pescados, huevos
	Especias y aceites esenciales		Contra microbios	
	Aromas	Natural	Contra bacterias y hongos	Varia
	Ácidos grasos		Contra bacterias	

3.2.3.3. *Métodos de conservación*

Las actuales técnicas de conservación se basan en:

- Destrucción total o parcial de las causas (enzimas, microorganismos): tratamiento térmico, irradiación.
- Estabilización por el frío: refrigeración, congelación.
- Disminución del agua libre: concentración, desecación, liofilización, ahumado, confitado, etc.
- Separación física alimento/oxígeno: vacío, gases inertes.
- Adición de aditivos

Generalmente, se combinan una o varias de estas tecnologías para asegurar la protección frente a la contaminación microbiana. Si a pesar de todo, el alimento corre riesgo de sufrir una recontaminación es cuando se aplicará un aditivo conservante.

Con las dosis autorizadas, ningún aditivo conservante es capaz de contrarrestar una contaminación ya declarada y seria. Tienen un efecto puramente profiláctico y no pueden sustituir el procesado higiénicamente correcto de las materias primas.

Actúan química y bioquímicamente sobre la célula del microorganismo, destruyendo su membrana, bloqueando su actividad enzimática o afectando a su estructura genética.

Dependiendo de la dosis de conservante empleado su acción puede ser bacteriostática o fungistática, es decir que inhiben la multiplicación de bacterias u hongos, o bactericida o fungicida, es decir, que mata las bacterias u hongos.

Ningún aditivo conservante es eficaz sobre todo el espectro contaminante (bacterias, levaduras, mohos). La mayoría de los conservantes son más activos frente a mohos y levaduras que contra bacterias, debido a que carecen de actividad al pH óptimo de desarrollo de las bacterias, que a menudo está en la zona neutra: por ello en la práctica, es necesario combinar la acción de dos o más aditivos para ampliar el espectro de acción e intensificar la actividad antimicrobiana. Ningún

conservante tiene efecto contra todos los microorganismos nocivos. Por ejemplo, las mezclas de ácido sórbico y ácido benzoico son más activas contra muchas bacterias que cualquiera de ellos por separado (sinergismo).

Los ésteres del ácido para-hidroxi-benzóico y sus derivados sódicos, denominados en general parabenos, son compuestos sintéticos especialmente útiles contra mohos y levaduras, y menos contra bacterias. Su principal ventaja es que son activos en medios neutros, al contrario que los otros conservantes, que solo son útiles en medio ácido. En cambio tienen el inconveniente de que incluso a las dosis autorizadas proporcionan a los alimentos un cierto olor y sabor fenólico. Se utilizan fundamentalmente para la protección de derivados cárnicos, especialmente los tratados por el calor, conservas vegetales y productos grasos, repostería, y en salsas de mesa (1 g/Kg. de conservantes totales). Los parabenos se utilizan en muchos países.

3.2.3.4. Finalidad de uso de los conservantes

La finalidad del uso de los conservantes, tanto en alimentos como en cosméticos, es clara: evitar su degradación para asegurar la salud del consumidor, así como alargar la vida del producto.

3.3. Aditivos en cosméticos

Con frecuencia se incorporan aditivos a los cosméticos con el fin de garantizar la conservación o bien mejorar su aspecto frente al consumidor. Son muchos los aditivos empleados actualmente en la elaboración de dichos productos, por ejemplo, tal es el caso del uso de conservantes, espesantes, colorantes, humectantes y edulcorantes en dentríficos mejorando así su consistencia, sabor y color del mismo.

Tanto los aditivos empleados como sus porcentajes permitidos según la legislación, Real Decreto 3.369/1968 de 26 de Diciembre, B.O.E 28 de Enero de 1969, varían dependiendo del destino final del cosmético cuando vaya a ser utilizado por los consumidores. Así por ejemplo, en el caso de las barras de labios, dentríficos y colutorios, las dosis empleadas de los aditivos deben de encontrarse dentro del intervalo permitido ya que puede suponer un riesgo para la salud del consumidor en caso

de que exista un ingesta accidental del mismo. En cambio, los aditivos empleados en la fabricación de productos destinados a la higiene corporal tienen como primera finalidad evitar la alteración del mismo que es causado por acción de agentes externos, y por otra parte resaltar otro tipo de aspectos tales como el color, textura, aspecto, etc.

Se denominan cosméticos especiales los que en su composición contienen alguno de los 46 productos del anexo II de la citada ley más hexaclorofeno adicionado en la disposición anteriormente comentada. Se denominan normales todos los demás. Los tramites a seguir son los siguientes:

- Cosmético normal: declaración a la dirección general de Ordenación Farmacéutica, suscrita por el propietario del producto, con las firmas del fabricante y del técnico responsable, en impresos normalizados en los que constará emplazamiento de la industria, nombre del producto y nombre y condición en la que actúa del propietario, así como del fabricante técnico responsable.
- Cosmético especial: en la declaración ha de constar además de lo exigido a los cosméticos normales, la indicación cuantitativa de los componentes que los hacen incluirse en la categoría de cosmético especial.

3.3.1. Aditivos antioxidantes

Los lípidos insaturados tienden a reaccionar con el oxígeno del aire, formando peróxidos que se descomponen por influencia del calor, luz o catalizadores, dando lugar, por una parte, a la formación de cetonas y aldehídos volátiles con olor y sabor desagradable y por otra, de polímeros peroxidados de color intenso; estos últimos suelen ser el resultado de la interacción de los radicales libres formados a expensas de la peroxidación de los lípidos insaturados, con los aminoácidos de las cadenas proteicas presentes.

Para evitar esta autoxidación de estos lípidos insaturados, se utilizan los llamados antioxidantes cuyo mecanismo de actuación se basa en evitar la formación de peróxidos, mediante

donación de átomos de hidrógeno. El radical de los antioxidantes resultante de la donación del átomo de hidrógeno, se estabiliza por mesomería o resonancia.

Los principales antioxidantes cosméticos empleados hasta el momento son: butilhidroxianisol, butilhidroxitolueno, los galatos de metilo, etilo, propilo y laurico, y tocoferoles.

No existe en la actualidad legislación española sobre las cantidades máximas permitidas del empleo de estos compuestos en cosméticos. Ahora bien, algunas empresas suministradoras ofrecen mezclas de estos productos con pequeñas cantidades de otros preparados con efecto sinérgicos, como los ácidos cítrico, tartárico, etilendiamino tetracético, ascórbico y sus ésteres, aminoácidos, fosfatos, polifosfatos, etc., que elevan considerablemente el efecto antioxidante.

Estos compuestos es frecuente encontrarlos como ingredientes de aceites y lociones de ducha, así como en la elaboración de una gran variedad de productos tales como: desmaquilladores, barra de labios, cremas, etc.

En el caso de los lápices de labios, aceites y lociones de ducha los antioxidantes más empleados son los ésteres derivados del ácido gálico, butilhidroxianisol y butilhidroxitolueno para evitar la oxidación de muchas sustancias que son empleadas en la fabricación de los mismos, protegiendo de esta manera la vida del lápiz. Además para el antioxidante sea satisfactorio debe ser eficaz a bajas concentraciones y conservar toda su actividad durante un periodo prolongado de tiempo.

3.3.2. Aditivos edulcorantes

La sacarina sódica es el edulcorante más empleado en la fabricación de dentífricos y colutorios ya que aporta al producto un sabor dulce que lo hace muy adecuado ante las necesidades del consumidor, ya que por su composición aporta frescor e higiene en la zona bucal dejando un sabor residual dulce.

Actualmente, no existe legislación española sobre la máxima cantidad permitida para este tipo de compuestos en la elaboración de cosméticos, ya que hasta el momento no se ha determinado su potencial cancerígeno en la boca, faringe o laringe de las personas.

3.3.3. Aditivos conservantes

Los parabenes se utilizan como preservadores en miles de productos cosméticos, farmacéuticos y en alimentos. Un estudio sobre 215 productos cosméticos, efectuado en 1995, señaló su presencia en el 99 por ciento de los productos que permanecen en la piel –como las cremas o los desodorantes– y en un 77 por ciento de los que se enjuagan –como los champús–. La mayor parte de los parabenes son rápidamente metabolizados y excretados en la orina, pero una parte tiene la capacidad de almacenarse en tejidos grasos del organismo.

4. BIBLIOGRAFÍA

1. Valcárcel, M.; Luque de Castro, M. D. *Flow-Through (Bio)Chemical Sensors*, Elsevier Science B.V.: 1994.
2. Wolfbeis, O. S. *Fiber optical sensors and biosensors*, CRC Press: Ann Arbor, 1991.
3. Rios, A.; Lazaro, F.; Luque de Castro, M. D.; Valcarcel, M. *Anal.Chim.Acta* **1987**, *199*, 15-27.
4. Wang, K.; Seiler, K.; Rusterholz, B.; Simon, W. *Analyst* **1992**, *117*, 57-60.
5. Liu, R. M.; Liu, D. J.; Sun, A. L. *Talanta* **1993**, *40*, 381-84.
6. De la Torre, M.; Fernandez-Gamez, F.; Lazaro, F.; Luque de Castro, M. D.; Valcarcel, M. *Analyst* **1991**, *116*, 81-83.
7. Linares, P.; Luque de Castro, M. D.; Valcárcel, M. *Anal.Chim.Acta* **1990**, *230*, 199-202.
8. Yoshimura, K. *Bunseki Kagaku* **1987**, *36*, 656.
9. Yoshimura, K. *Analyst* **1988**, *113*, 471-74.
10. Hase, U.; Yoshimura, K. *Analyst* **1992**, *117*, 1501-06.
11. Capitán-Vallvey, L. F.; Valencia Miron, M. C.; Mirón-García, G. *Anal.Chim.Acta* **1994**, *289*, 365-70.
12. Cañizares, P.; Luque de Castro, M. D. *Analyst* **1995**, *120*, 2837-40.
13. Yoshimura, K.; Matsuoka, S.; Waki, H. *Anal.Chim.Acta* **1989**, *225*, 313-21.
14. Chen, D.; Luque de Castro, M. D.; Valcárcel, M. *Anal.Chim.Acta* **1990**, *234*, 345-52.
15. Richter, P.; Luque de Castro, M. D.; Valcárcel, M. *Anal.Chim.Acta* **1993**, *283*, 408-13.
16. Tena, M. T.; Luque de Castro, M. D.; Valcarcel, M. *J.Chromatog.Sci.* **1992**, *30*, 276-79.
17. Yoshimura, K.; Waki, H.; Ohashi, S. *Talanta* **1976**, *23*, 449-54.
18. Orbe Paya, I.; Erenas, Miguel; Capitan-Vallvey, Luis Fermin *Sens.Actuators B* **2006**, *in press*.
19. Capitán-Vallvey, L. F.; Fernández-Ramos, M. D.; De Orbé Payá, I.; Avidad-Castañeda, R. *Analyst* **1995**, *120*, 2421-24.

20. Fernández de Córdoba, M. L.; Molina-Díaz, A.; Pascual-Reguera, M. I.; Capitán-Vallvey, L. F. *Fresenius J.Anal.Chem.* **1994**, *349*, 722-27.
21. Ortega Barrales, P.; Domínguez Vidal, A.; Fernández de Córdoba, M. L.; Molina-Díaz, A. *J.Pharm.Biomed.Anal.* **2001**, *25*, 619-30.
22. Ruedas Rama, M. J.; Ruiz Medina, A.; Molina-Díaz, A. *Anal.Chim.Acta* **2002**, *459*, 235-43.
23. Capitán-Vallvey, L. F.; Valencia Miron, M. C.; Arana Nicolás, E.; García-Jiménez, J. F. *Anal.Bioanal.Chem.* **2006**, *385*, 385-91.
24. Fernández de Córdoba, M. L.; Ortega Barrales, P.; Rodríguez Torne, G.; Molina-Díaz, A. *J.Pharm.Biomed.Anal.* **2003**, *31*, 669-77.
25. Capitán-Vallvey, L. F.; Valencia Miron, M. C.; Arana Nicolás, E. *Anal.Chim.Acta* **2004**, *503*, 179-86.
26. Capitán-Vallvey, L. F.; Valencia Miron, M. C.; Arana Nicolás, E. *J.Food Sci.* **2003**, *68*, 1595-99.
27. Valencia Miron, M. C.; Uroz, F.; Tafersiti, Y.; Capitán-Vallvey, L. F. *Quim.Anal.* **2000**, *19*, 129-34.
28. Capitán-Vallvey, L. F.; Valencia, M. C.; Nicolás, E. Arana. *Mikrochim.Acta* **2002**, *138*, 69-76.
29. Ayora Cañada, M. J.; Pascual-Reguera, M. I.; Molina-Díaz, A.; Capitán-Vallvey, L. F. *Talanta* **1999**, *49*, 691-701.
30. Ortega-Algar, S.; Ramos-Martos, N.; Molina-Díaz, A. *Talanta* **2003**, *60*, 313-23.
31. Svec, Frantisek *LC-GC Europe* **2003**, *16*, 24-28.
32. Colon, Luis A.; Burgos, Glamarie; Maloney, Todd D.; Cintron, Jose M.; Rodriguez, Ramon L. *Electrophoresis* **2000**, *21*, 3965-93.
33. Ratnayake, C. K.; Oh, C. S.; Henry, M. P. *J.Chromatog.A* **2000**, *887*, 277-85.
34. Ratnayake, Chitra K.; Oh, Chan S.; Henry, Michael P. *J.High Res.Chromatog.* **2000**, *23*, 81-88.
35. Kubin, Miroslav; Spacek, Pavel; Chromeczek, Richard *Collection Czechoslov.Chem.Commun.* **1967**, *32*, 3881-87.
36. Pretorius, Victor; Davidtz, J. C.; Desty, D. H. *J.High Res.Chromatog.Chromatog.Commun.* **1979**, *2*, 583-84.
37. Hjerten, Stellan; Liao, Jia Li; Zhang, Rong *J.Chromatogr.* **1989**, *473*, 273-75.

38. Wang, Q. C.; Hosoya, K.; Svec, F.; Frechet, J. M. *Anal Chem* **1992**, *64*, 1232-38.
39. Nakanishi, Kazuki; Soga, Naohiro *J.Am.Ceram.Soc.* **1991**, *74*, 2518-30.
40. Minakuchi, Hiroyoshi; Nakanishi, Kazuki; Soga, Naohiro; Ishizuka, Norio; Tanaka, Nobuo *Anal.Chem.* **1996**, *68*, 3498-501.
41. Fields, Steven M. *Anal.Chem.* **1996**, *68*, 2709-12.
42. Cabrera, Karin; Lubda, Dieter; Eggenweiler, Hans Michael; Minakuchi, H.; Nakanishi, K. *J.High Res.Chromatog.* **2000**, *23*, 93-99.
43. Peters, Eric C.; Petro, Miroslav; Svec, Frantisek; Frechet, Jean M. J. *Anal.Chem.* **1998**, *70*, 2288-95.
44. Peters, Eric C.; Petro, Miroslav; Svec, Frantisek; Frechet, Jean M. J. *Anal.Chem.* **1998**, *70*, 2296-302.
45. Ericson, Christer; Liao, Jia Li; Nakazato, Ken'ichi; Hjerten, Stellan *J.Chromatog.A* **1997**, *767*, 33-41.
46. Svec, Frantisek; Peters, Eric C.; Sykora, David; Yu, Cong; Frechet, Jean M. J. *J.High Res.Chromatog.* **2000**, *23*, 3-18.
47. Svec, Frantisek; Frechet, Jean M. J. *J.Chromatog.A* **1995**, *702*, 89-95.
48. Luo, Q.; Zou, H.; Xiao, X.; Guo, Z.; Kong, L.; Mao, X. *J.Chromatog.A* **2001**, *926*, 255-64.
49. Viklund, Camilla; Svec, Frantisek; Frechet, Jean M. J.; Irgum, Knut *Biotechnology Progress* **1997**, *13*, 597-600.
50. Wang, Q. Ching; Svec, Frantisek; Frechet, Jean M. J. *Anal.Chem.* **1993**, *65*, 2243-48.
51. Xie, Shaofeng; Svec, Frantisek; Frechet, Jean M. J. *J.Chromatog.A* **1997**, *775*, 65-72.
52. Palm, Anders; Novotny, Milos V. *Anal.Chem.* **1997**, *69*, 4499-507.
53. Li, Yi Ming; Liao, Jia Li; Nakazato, Ken'ichi; Mohammad, Jamil; Terenius, Lars; Hjerten, Stellan *Anal.Biochem.* **1994**, *223*, 153-58.
54. Rodriguez, Shirley A.; Colon, Luis A. *Chemistry of Materials* **1999**, *11*, 754-62.
55. Xie, S.; Allington, R. W.; Svec, F.; Frechet, J. M. J. *J.Chromatog.A* **1999**, *865*, 169-74.
56. Maruska, Audrius; Ericson, Christer; Vegvari, Akos; Hjerten, Stellan *J.Chromatog.A* **1999**, *837*, 25-33.

-
57. Asiaie, Reza; Huang, Xian; Farnan, Dell; Horvath, Csaba *J.Chromatog.A* **1998**, *806*, 251-63.
 58. Chirica, Gabriela; Remcho, Vincent T. *Electrophoresis* **1999**, *20*, 50-56.
 59. Tang, Qinglin; Xin, Baomin; Lee, Milton L. *J.Chromatog.A* **1999**, *837*, 35-50.
 60. Dulay, Maria T.; Kulkarni, Rajan P.; Zare, Richard N. *Anal.Chem.* **1998**, *70*, 5103-07.
 61. Tang, Qinglin; Lee, Milton L. *J.High Res.Chromatog.* **2000**, *23*, 73-80.
 62. Ishizuka, Norio; Minakuchi, Hiroyoshi; Nakanishi, Kazuki; Soga, Naohiro; Nagayama, Hisashi; Hosoya, Ken; Tanaka, Nobuo *Anal.Chem.* **2000**, *72*, 1275-80.
 63. Nakanishi, Kazuki; Soga, Naohiro *J.Non-Crystal.Sol.* **1992**, *139*, 1-13.
 64. Nakanishi, Kazuki; Soga, Naohiro *J.Non-Crystal.Sol.* **1992**, *139*, 14-24.
 65. Nakanishi, K.; Minakuchi, H.; Soga, N.; Tanaka, N. *Journal of Sol-Gel Science and Technology* **1997**, *8*, 547-52.
 66. Tanaka, Nobuo; Nagayama, Hisashi; Kobayashi, Hiroshi; Ikegami, Tohru; Hosoya, Ken; Ishizuka, Norio; Minakuchi, Hiroyoshi; Nakanishi, Kazuki; Cabrera, Karin; Lubda, Dieter *J.High Res.Chromatog.* **2000**, *23*, 111-16.

CAPITULO 2

RESOLUCIÓN DE ASPARTAMO Y ACESULFAMO MEDIANTE FIA CON ZONA SENSORIA

RESOLUCIÓN DE ASPARTAMO Y ACESULFAMO MEDIANTE FIA CON ZONA SENSORA

1. INTRODUCCIÓN

En este capítulo se describe el desarrollo de un sensor flujo para aspartamo (N-L- α -aspartil-L-fenilalanina-1-metil ester, E-951) (AS) y acesulfamo potásico (6-metil-1,2,3-oxatiazin-4(3H)-ona-2,2-dioxido, E-950) (AK) basado en la retención transitoria de AK en el intercambiador de aniones Sephadex DEAE A-25, colocado en el interior de la célula de flujo, mientras que AS solo es débilmente retenido. Se propone un esquema FIA muy simple y económico para la separación de esta mezcla de edulcorantes en la misma célula de flujo sin necesidad de ninguna reacción de derivación ya que una de sus propiedades intrínsecas, la absorbancia UV, se usa como señal analítica. La utilidad de este

trabajo ha sido contrastada comparando estadísticamente sus resultados con los de un método HPLC de referencia.

Existen en bibliografía una gran cantidad de métodos de análisis para determinar aspartamo (AS) y acesulfamo (AK), pero su determinación se lleva a cabo, principalmente, a través de métodos separativos. La técnica más habitual para separar y analizar la mezcla AS-AK es HPLC debido a su capacidad para realizar determinaciones multianalito¹⁻³, aunque existen otros métodos cromatográficos descritos, como es la cromatografía iónica⁴ y la cromatografía en capa fina TLC⁵. Por otra parte, se han aplicado también diferentes modos de electroforesis capilar para alcanzar la separación de sacarina y aspartamo, en sus variantes más utilizadas la electroforesis capilar en zona CZE⁶ y la cromatografía electrocinética micelar capilar MEKC^{7,8}.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Reactivos y materiales

Todas las sustancias químicas usadas fueron de calidad analítica. Las disoluciones acuosas se prepararon usando agua obtenida por osmosis inversa, producida por un sistema de purificación Milli-RO 12, así como uno Milli-Q (Millipore, Bedford, MA). En el desarrollo de esta Tesis Doctoral se han empleado siempre estos mismos tipos de agua.

Las disoluciones madre de AS (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España) y AK (Fluka, Madrid, España) fueron de 1000.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, y se prepararon mediante pesada exacta de la cantidad necesaria de patrón y disolución en agua. Se conservaron en el frigorífico a 5°C y demostraron ser espectrofotométricamente estables al menos durante dos meses. Las disoluciones de trabajo se prepararon diluyendo adecuadamente con agua, y fueron ajustadas con las mismas condiciones que el portador para minimizar alteraciones en la medida.

Como fases estacionarias se ensayaron sílice C₁₈ (de Waters, Millipore Corporation, Mildford, MA, EE.UU.) con un tamaño medio de partícula entre 55 y 105 μm , intercambiadores iónicos Sephadex

DEAE A-25, Sephadex CM C-25, Sephadex QAE A-25 y el adsorbente hidrofílico Sephadex G-25 (todos de Sigma Chemical, St. Louis, Mo, EE.UU.).

Como portadores se usaron tampones ácido acético/acetato sódico, ácido ortofosfórico/dihidrogenofosfato sódico y ácido cítrico/citrato sódico (todos de Panreac, Barcelona, España) a diferentes pH, así como disoluciones de ácido clorhídrico e hidróxido sódico.

2.2. Instrumentación y software

Para llevar a cabo las medidas de absorbancia se usó un espectrómetro de diodos en fila marca Hewlett Packard modelo HP-8453, conectado a un ordenador Pentium MMX 200 a través de una tarjeta PCI HP IB, usando como célula de medida una cubeta de flujo Hellma 138-QS de 1 mm de paso de luz. En el interior de la célula de flujo, de 50 μ L de volumen interno, se empaquetó el soporte sólido introduciéndolo como suspensión en agua, o metanol si era hidrofóbico, con la ayuda de una jeringa y usando un tapón de lana de vidrio en el extremo de salida para evitar que la fase estacionaria se vacíe. La cubeta de flujo, una vez preparada, se sitúa en el compartimento de medida del espectrómetro. Las medidas se hicieron siempre en modo cinético, tomando 1 s como tiempo entre medidas. Es decir, es espectrofotómetro tomaba una medida cada segundo. Para obtener los espectros de absorción de los analitos se usó el modo estándar.

Para realizar las medidas de pH se usó un pH-metro Crisol Digit equipado con un electrodo de calomelanos.

Para llevar a cabo las medidas correspondientes a la validación del método se usó un cromatógrafo de líquidos de alta resolución Hewlett-Packard 1100 provisto de detector de diodos en fila y de una columna cromatográfica C₈ Zorbax.

El sistema de flujo consiste en una bomba peristáltica Gilson Minipuls-3 de cuatro canales que bombean un caudal constante durante todo el proceso de medida, y un sistema de válvulas rotatorias de teflón Rheodyne 5041 controlado electromecánicamente⁹.



Figura 2.1: Bomba peristáltica Gilson Minipuls 3.

Las tuberías del sistema FIA fueron tubos PTFE (Omnifit, Cambridge, Inglaterra) de 0,8 mm de diámetro interno y 1,6 mm de diámetro externo, ensambladas con varios conectores (también de Omnifit).

El programa informático usado para medir la señal analítica y su tratamiento fue el UV-visible Chemstation software, suministrado por HP. Para medir otros parámetros de los picos FIA (como el área) se usaron otros programas: Statgraphics versión 6,0 (STSC INC. Statistical Graphics Corporation, Englewood Cliffs, NJ, EE.UU., 1993) y Grams/386 versión 1,0 (Add. Galactic Industries, Salem, EE.UU.). Para trabajos ofimáticos se optó por el paquete integrado Microsoft Office.

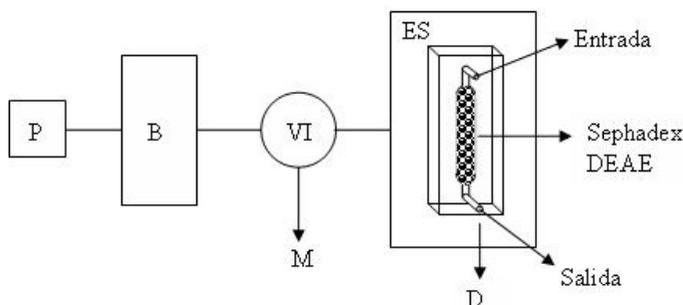


Figura 2.2. Esquema FIA usado. Leyendas: P: portador; B: bomba; VI: válvula de inyección; M: muestra; ES: espectrófotometro; D: desecho.

Durante todo el transcurso de este trabajo se ha empleado el mismo instrumental, tanto de medida de la señal analítica (espectrofotómetro y cromatógrafo), como para la medida de otros parámetros (balanzas, pHmetros, etc), variando en ocasiones la célula de flujo de medida, la bomba o el esquema FIA empleado, en cuyo caso se indica en el capítulo correspondiente. Así mismo, el software empleado también ha sido el mismo en todos los casos.

2.3. Métodos y procedimientos

2.3.1. Procedimiento básico

Un volumen determinado de muestra (652 μL) que contiene una mezcla de los edulcorantes objeto de estudio en una concentración dentro del rango dinámico lineal (esto es entre 10 y 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de AS y entre 40 y 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de AK) en las mismas condiciones que el portador, se inyecta en el flujo de portador (tampón ácido ortofosfórico/dihidrogenofosfato sódico 0,06 M a pH 2,70). Cuando el bolo de muestra alcanza la célula de flujo, que está rellena de Sephadex DEAE A-25 hasta una altura de 25 mm, el AS sufre una retención transitoria por lo que es rápidamente eluido, mientras que AK se ve mucho más retenido, separándose en la misma célula de flujo. AS se determina a 47 s desde la inyección de la muestra a 205 nm y AK a 196 s a 227 nm. Para poder cuantificar la cantidad de AS y AK que hay en las muestras, se relaciona la altura de pico, medida como absorbancia, con la concentración de patrón inyectada mediante regresión por mínimos cuadrados, obteniendo así la recta de calibrado. Todas las muestras fueron inyectadas por triplicado, usando altura de pico como parámetro analítico.

2.3.2. Método de referencia

Como método de referencia hemos modificado ligeramente un método HPLC para la determinación de edulcorantes artificiales². La modificación radica en la selección de la columna cromatográfica, que en nuestro caso fue una columna C_8 (en lugar de C_{18}) con un tamaño de partícula de 5 μm y de medidas 150 x 4.6 mm. Como fase móvil se usó un gradiente desde 3 % de acetonitrilo en 0,02M KH_2PO_4 (pH 5) a 20 % de acetonitrilo en 0,02M KH_2PO_4 (pH 3,5) a caudal constante (1,0

mL min⁻¹). La longitud de onda seleccionada fue 210 nm. La función de calibrado se obtuvo a cinco niveles de concentración diferentes (tres réplicas cada uno), usando el área de pico como señal analítica.

2.3.3. Tratamiento de muestras

Para analizar el contenido de AS y AK en muestras de edulcorante de mesa se llevó a cabo un tratamiento de muestra muy sencillo. Éste consistió en triturar las muestras en un mortero de cristal para después disolver una cantidad adecuada exactamente pesada, entre 200 y 300 mg, en agua, agitando durante 10 minutos. Acto seguido se filtró la disolución a través de un filtro Millipore de 0,45 μm , llevando a continuación a 200 mL con la ayuda de un matraz aforado.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los dos edulcorantes seleccionados son especies que absorben en la región UV, exhibiendo un espectro de absorción muy similar, tanto en disolución como en fase sólida, con las siguientes características:

- AS: presenta el mismo espectro de absorción tanto en agua como en Sephadex DEAE, con un máximo de absorción a 195 nm (coeficiente de absortividad molar $1,67 \cdot 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) con un hombro a 205 nm ($\epsilon: 9,99 \cdot 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).
- AK: presenta una única banda de absorción que difiere poco en agua (227 nm $\epsilon: 5,23 \cdot 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) y en Sephadex DEAE (226 nm $\epsilon: 4,12 \cdot 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Como se observa, los espectros de ambas sustancias se superponen, necesitando separarlas si queremos medirlas. Otra opción sería derivarlas para diferenciar de esa manera los espectros de absorción, pero ese no es nuestro objetivo (que es el usar siempre las propiedades intrínsecas de los analitos). Por tanto, proponemos este sistema para su separación en la propia célula de flujo, rellena de fase estacionaria, basado en las diferentes retenciones que presentan dichos analitos.

3.1. Variables

Para poder obtener las condiciones experimentales adecuadas para la medida se estudiaron y optimizaron diferentes parámetros individualmente. Todos los experimentos se llevaron a cabo realizando tres medidas de cada punto. Las variables que se estudiaron se pueden clasificar en tres grupos: aquellas que afectan a la unidad de retención-detección, variables químicas y variables FIA.

3.1.1. Variables de la unidad de retención-detección

La variable principal es el tipo de soporte sólido que vamos a usar para rellenar la célula de flujo, y en el cual van a verse retenidos nuestros analitos. Para ello, se estudiaron diversas fases sólidas como son: los intercambiadores iónicos Sephadex DEAE A-25, Sephadex QAE A-25 y Sephadex CM C-25; el adsorbente hidrofílico Sephadex G-25 y el adsorbente hidrofóbico C₁₈. Para ver las diferencias en tiempos de retención de los analitos en cada una de estas fases estacionarias se usó como portador agua ajustada a diferentes pH (entre 2 y 8) ajustados con HCl y NaOH.

Al usar el intercambiador de cationes Sephadex CM C-25 ambos analitos presentaban un comportamiento similar, con una retención muy baja de ambos y con tiempos de residencia muy similares. A valores de pH bajos, AS se retiene más que AK debido a que se encuentra cargado positivamente, estableciendo una interacción con la fase estacionaria, aunque la resolución lograda no es suficiente como para poder analizarlos, mientras que a pH elevados no había diferencia alguna en su comportamiento, ya que tanto AS como AK se encuentran cargados negativamente, por lo que no interaccionan con la fase sólida.

El uso del adsorbente hidrofílico Sephadex G-25 no produjo diferencia ninguna en los tiempos de residencia de ambos analitos en el intervalo de pH estudiado. AK no se retuvo en el adsorbente hidrofóbico C₁₈, mientras que AS si presentó una pequeña retención a pH 5-6, debido a que se encontraba en forma neutra, pero no se retuvo lo suficiente como para obtener una buena resolución entre ambos analitos. Los intercambiadores aniónicos (Sephadex DEAE y QAE) si mostraron buenos resultados. Con Sephadex QAE (un intercambiador aniónico fuerte) a pH por debajo de 5, el AK

mostraba una retención muy elevada, mientras que AS no se retenía nada. Se conseguía la separación de ambos analitos, pero con tiempos de análisis muy elevados. El intercambiador aniónico Sephadex DEAE A-25, también a valores de pH por debajo de 5, producía tiempos de retención lo suficientemente diferentes como para poder determinar ambos analitos. Por todo ello, ésta último fue seleccionada como fase estacionaria adecuada para rellenar la célula de flujo.

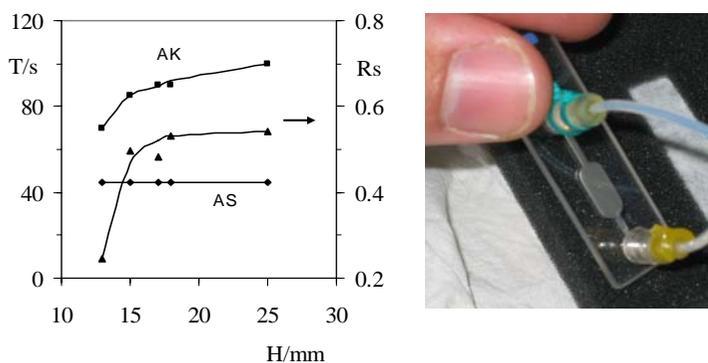


Figura 2.3: Influencia de la altura de Sephadex DEAE en la célula de flujo sobre el tiempo de retención y la resolución de AS y AK.

El siguiente parámetro que se estudió fue la cantidad de soporte sólido, o lo que es lo mismo, la altura de fase sólida que debíamos situar en la célula de flujo. Se estudiaron cinco alturas diferentes, entre 10 mm, que es la altura mínima para que el haz de luz atraviese la fase sólida, y 25 mm.

Como cabe esperar, un incremento en la altura hace que el tiempo de retención de aquellos analitos que se ven retenidos en la fase estacionaria se incremente (este es el caso de AK) mientras que el del que si se ve retenido (como el AS) no varíe. Así mismo, la resolución aumenta cuanto mayor es la altura. Por ello, se seleccionó la máxima altura (25 mm) como óptima.

3.1.2. Variables químicas

La clave en la separación de ambos analitos es el pH del portador usando el intercambiador aniónico Sephadex DEAE como fase sólida. La influencia del pH sobre la retención y elución de ambos analitos se estudió en el rango de pH comprendido entre 2 y 8, ajustados en todos los casos con HCl y

NaOH. En el caso del AS, su retención es altamente dependiente del pH del portador. A valores de pH inferiores a 3, AS presenta tiempos de retención muy pequeños, los cuales aumentan notablemente a valores de pH superiores a 5,5, manteniéndose casi constantes a partir de ahí.

Este comportamiento se puede explicar considerando los valores de pK_a del aspartamo. AS es un dipéptido y como tal posee dos valores de pK (pK_1 3,18; pK_2 7,82; punto isoelectrico 5,25). Por otro lado, AK es un anión proveniente de un ácido fuerte, y, por lo tanto, no posee una estructura dependiente del pH. Como pH óptimo para el portador seleccionamos 2,70 porque a ese pH, AS se encuentra parcialmente cargado positivamente, siendo excluido de la fase sólida Sephadex DEAE, y por tanto siendo muy débilmente retenido. Por otro lado, AK es mucho más retenido por el intercambiador aniónico que AS, obteniendo así tiempos de retención lo suficientemente separados como para poder determinar ambos analitos.

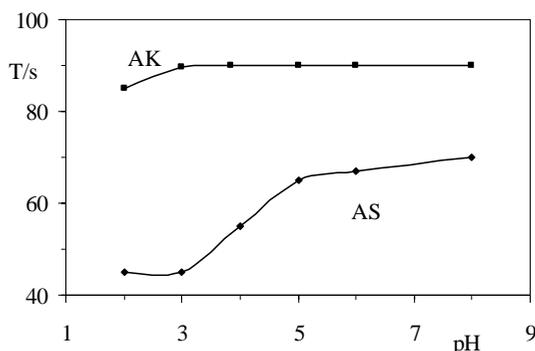


Figura 2.4: Dependencia del pH del portador sobre los tiempos de retención de AS y AK.

El siguiente paso es encontrar un tampón que ajuste el pH seleccionado. Para ello, se estudiaron diferentes tampones: ácido monocloroacético/monocloroacetato sódico (2 %), ácido ortofosfórico/dihidrogenofosfato sódico (73 %), ácido cítrico/citrato sódico (15 %) y ácido clorhídrico (100 %). Para elegir el tampón más adecuado comparamos las alturas de pico obtenidas con todos ellos. Los resultados medios para ambos analitos comparados con el que daba mejor resultado (HCl) son los que se expresan entre paréntesis, expresados como porcentajes. A pesar de que con HCl se

obtienen mejores señales, seleccionamos tampón ácido ortofosfórico/dihidrogenofosfato sódico a pH 2,70 por la necesidad de tamponar y porque la disminución de señal es pequeña.

Otro parámetro de gran importancia en este sistema es la fuerza iónica, y fue utilizada para ajustar la separación de ambos analitos a las necesidades requeridas, es decir, buena resolución y tiempo de análisis lo más bajo posible. Bajo las condiciones de pH elegidas, AS se encuentra parcialmente cargado positivamente, y AK es un anión, por lo que ambos originan interacciones electrostáticas entre sí y con la fase estacionaria, todo lo cual justifica la dependencia de la fuerza iónica. Si no usamos ninguna sal adicional para aumentar la fuerza, podríamos separar ambos analitos, pero el tiempo de análisis sería extremadamente largo debido a la alta retención que presenta AK en este soporte. Un incremento en la fuerza iónica reduce su tiempo de retención, acelerando la elución de AK, mientras que AS no se ve afectado. Se estudió la fuerza iónica (ajustada con NaCl) hasta 1 M.

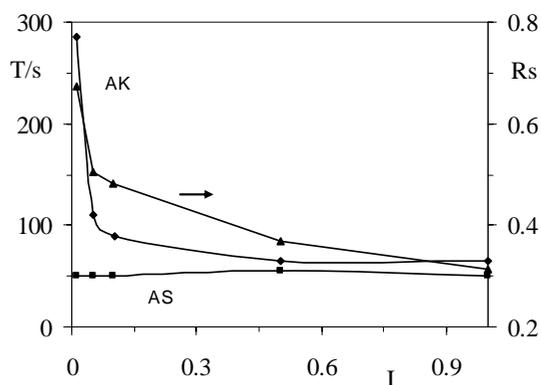


Figura 2.5: Dependencia del tiempo de retención con la fuerza iónica.

La fuerza iónica adecuada resultó ser 0,05 M, ya que es la que permite una mejor resolución de los edulcorantes (0,51), valor suficiente para poder medirlos usando altura como parámetro analítico, y con una frecuencia de muestreo aceptable (24 h⁻¹). La fuerza iónica se ajustó variando la concentración del tampón. Así, se seleccionó una concentración de tampón de 0,06 M, ya que ésta aporta una fuerza iónica de 0,05 M. Se podría seleccionar una fuerza iónica menor, como 0,01 M, lo

que significaría un aumento en el factor de resolución (0,70), pero el tiempo de análisis aumentaría en exceso, obteniendo de esta manera una frecuencia de muestreo de 8 h⁻¹.

En todos los experimentos que se llevaron a cabo, tanto con muestras como con patrones, se ajustaron con las mismas condiciones que el portador, pH y fuerza iónica, para minimizar el efecto negativo que se obtendría al inyectar la muestra en el sistema de flujo.

3.1.3. Variables FIA

Se estudió la influencia de la velocidad de flujo entre 1,0 y 3,9 mL · min⁻¹, usando en todos los casos las mismas condiciones operatorias. Como puede verse en la Figura 2.6, a bajas velocidades de flujo ambos analitos sufren una difusión debida a un efecto de dilución longitudinal, haciendo que los picos sean bajos y anchos. Al incrementar la velocidad, la altura aumenta hasta un máximo (a 1,7 mL · min⁻¹), para luego decrecer de nuevo debido al hecho de que los analitos no tienen tiempo para interactuar con el soporte sólido. Por tanto, se seleccionó 1,7 mL · min⁻¹ como velocidad de flujo óptima.

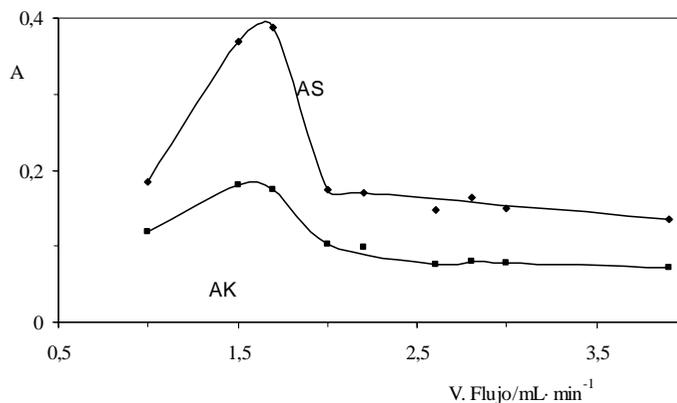


Figura 2.6: Influencia de la velocidad de flujo sobre la señal analítica.



Figura 2.7: Bucle utilizado para la inyección de muestra.

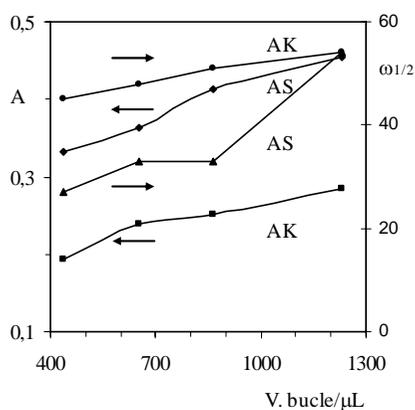


Figura 2.8: Variación de la señal analítica y del ancho de banda con el volumen de bucle.

Como última variable se estudió el volumen de bucle entre 435 y 1231 μL . Al incrementarlo, como es obvio, la señal analítica aumenta como resultado de la mayor cantidad de analito en el sistema, al igual que el ancho de banda. Pero a valores elevados de volumen de bucle aparece una curvatura debida a la saturación de la fase sólida de la célula de flujo. Aunque la señal crece continuamente, hemos seleccionado 652 μL como volumen de bucle óptimo como solución de compromiso entre señal analítica y ancho de banda ($\omega_{1/2}$).

3.2. Características analíticas

Como parámetro analítico se usó la altura de pico de los analitos ya que el uso de área no era posible debido a que ambos analitos no estaban completamente resueltos (R_s : 0,51). El rango dinámico lineal está comprendido entre 10 y 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para AS y entre 0,3 y 7,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para AK cuando se obtienen los datos a partir de la longitud de onda de máxima absorción para ambos analitos (205 nm para AS y 226 nm para AK). La considerable diferencia que existe entre las sensibilidades (expresada mediante la pendiente de la recta de calibrado) para ambos analitos ($1,15 \cdot 10^{-3} \text{ mL} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ para AS y $2,48 \cdot 10^{-2} \text{ mL} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ para AK) se puede deber a dos factores: 1) el efecto de preconcentración que sufre AK (el valor de ϵ aumenta desde $5,23 \cdot 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ en disolución hasta un valor aparente de $4,12 \cdot 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ en Sephadex DEAE A-25) y 2) el efecto de dilución de la propia fase estacionaria en el analito menos retenido (AS) (el valor de ϵ disminuye desde $1,67 \cdot 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ en disolución acuosa hasta un valor aparente de $5,60 \cdot 10^3$ en Sephadex DEAE A-25). Con el objetivo de obtener una sensibilidad similar para ambos analitos (necesaria para poder aplicar el método a las muestras reales) decidimos cambiar la longitud de medida a otra menos sensible pero que no introduzca más incertidumbre. Por ello seleccionamos 265 nm con la que se obtiene una sensibilidad de $1,56 \cdot 10^{-4} \text{ mL} \cdot \mu\text{g}^{-1}$.

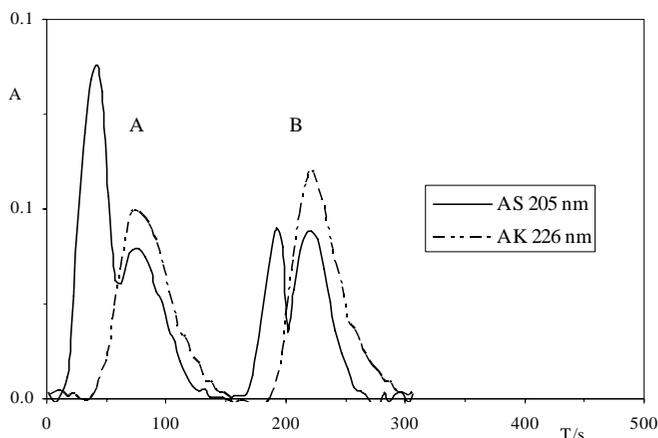


Figura 2.9: Diagrama típico, medido en las condiciones óptimas. A y B son dos inyecciones consecutivas de patrones a diferentes concentraciones. A) 90 $\mu\text{g mL}^{-1}$ AS, 1.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ AK (226 nm); B) 45 $\mu\text{g mL}^{-1}$ AS, 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ AK (226 nm).

El ajuste de los datos analíticos se llevó a cabo mediante regresión lineal, aplicando el test de fallo de ajuste de la linealidad, con siete réplicas para cada punto de calibrado y cinco niveles de concentración de cada analito. La desviación estándar del blanco (DER) necesaria para determinar los límites de detección ($K=3$) y de cuantificación ($K=10$)¹⁰ se obtuvo como resultado medio de 10 determinaciones experimentales. Para AK, la precisión es mejor cuando se mide a su longitud de onda máxima, 226 nm (0,6 % a $50 \mu\text{g mL}^{-1}$) que para AS (3,4 % a $50 \mu\text{g mL}^{-1}$). Además, se pueden hacer más de 150 inyecciones consecutivas en el sistema FIA propuesto con la misma fase sólida sin apreciar derivas de ningún tipo. En la Tabla 2.1 se muestran estos y otros parámetros analíticos.

Se estudió la independencia de las señales de AS y AK entre sí, medidas a 205 y 265 nm respectivamente, mediante la cuantificación de cada edulcorante en presencia de diferentes proporciones del otro edulcorante en seis mezclas diferentes con proporciones dentro del rango 1:10 a 10:4 (con concentraciones de AS comprendidas entre 10 y $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ y de AK entre 40 y $100 \mu\text{g mL}^{-1}$). Cabe destacar que las pendientes de estos calibrados no difieren significativamente, y las ordenadas en el origen no presentan influencia en las señales analíticas (aplicando el test de la hipótesis nula para probarlo).

También se hicieron ensayos de recuperación de los edulcorantes en las muestras reales, obteniendo entre 98,6 % y 103,7 % para AS y entre 97,6 % y 106,8 % para AK, con recuperaciones medias de 100,9 % para AS y 101,6 % para AK.

Tabla 2.1: Parámetros analíticos para el sensor de flujo para AS-AK

Parametros	Unidades	AS		AK
		205 nm	227 nm	265 nm
b	$\text{mL} \cdot \mu\text{g}^{-1}$	$1,15 \cdot 10^{-3}$	$2,48 \cdot 10^{-2}$	$1,56 \cdot 10^{-4}$
S_b	$\text{mL} \cdot \mu\text{g}^{-1}$	$4,00 \cdot 10^{-5}$	$1,48 \cdot 10^{-4}$	$2,52 \cdot 10^{-6}$
a	-----	$4,20 \cdot 10^{-3}$	$2,34 \cdot 10^{-2}$	$2,97 \cdot 10^{-3}$
S_a	-----	$2,50 \cdot 10^{-3}$	$7,30 \cdot 10^{-4}$	$1,23 \cdot 10^{-4}$
r	-----	0,999	0,9998	0,995
Valor P	%	54,54	29,11	8,67
RDL	$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	10,0 – 100,0	0,3-7,0	40,0-100,0
LD	$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	5,65	0,10	11,90
LC	$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	10,0	0,3	39,6
DER	%	3,45	0,59	1,61

b: pendiente; S_b : desviación estándar de la pendiente; a: ordenada en el origen; S_a : desviación estándar de la ordenada en el origen; r: coeficiente de correlación; VP: nivel de probabilidad del test de fallo de ajuste; RDL: rango dinámico lineal; LD: límite de detección; LC: límite de cuantificación; DER: desviación estándar relativa.

3.3. Interferentes

Para evaluar el potencial del sensor de flujo desarrollado decidimos estudiar el efecto que causaban diferentes especies que se encuentran comúnmente junto con los edulcorantes estudiados. Para ello, ensayamos diferentes disoluciones sintéticas que contenían $80 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de ambos edulcorantes y un exceso variable de cada especie interferente (hasta $6000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). El nivel de tolerancia se fijó en la máxima cantidad de especie interferente que produce un error $\leq 5\%$. Así, se estudió la influencia de ciclamato (tolerable hasta $1200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), lactosa (hasta $2100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), glicina, leucina, maltosa, fructosa y sucrosa (todos ellos hasta $2500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), glucosa (hasta $5000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), citrato y ascorbato ($>6000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). No se encontró interferencia alguna causada por glucosa, sucrosa, lactosa, maltosa, fructosa, glicina ni leucina incluso a concentraciones mayores de las habituales en las muestras de edulcorante de mesa analizadas.

3.4. Aplicaciones analíticas

El método propuesto se ha aplicado a diferentes marcas de edulcorantes de mesa, todas ellas adquiridas en diferentes supermercados de Granada. La presencia de los edulcorantes presentes en la etiqueta del producto comercial, se demostró mediante comparación de los tiempos de retención en HPLC². La calidad y precisión del método propuesto se puso de manifiesto mediante adición de patrón^{11;12}. El método es preciso para la determinación de ambos analitos en las muestras analizadas, lo cual se puso de manifiesto comparando estadísticamente las varianzas de estos calibrados. Además, los resultados obtenidos mediante el método propuesto han sido validados mediante una comparación estadística (valor P) con el método HPLC de referencia². En la Tabla 2.2 podemos observar los resultados analíticos de la aplicación y validación del método propuesto a muestras reales.

Tabla 2.2: Resultados obtenidos en muestras reales al aplicar el método propuesto y el de referencia

Muestra	AS / g · kg ⁻¹			AK / g · kg ⁻¹		
	Método propuesto*	Método de referencia*	Valor P (%)	Método propuesto*	Método de referencia*	Valor P (%)
Comprimido 1	371 ± 10	375 ± 7	55,86	-----	-----	-----
Comprimido 2	467 ± 52	448 ± 3	55,88	-----	-----	-----
Comprimido 3	303 ± 62	294 ± 7	82,44	91 ± 2	91 ± 5	95,55
Comprimido 4	10 ± 2	8,42 ± 0,01	17,57	1,90 ± 0,05	2,0 ± 0,1	31,92
Comprimido 5	301 ± 3	300 ± 2	70,71	70 ± 5	71 ± 6	82,64
Comprimido 6	23,3 ± 0,3	23,5 ± 0,1	18,13	9,7 ± 0,1	9,7 ± 0,2	73,37
Comprimido 7	130 ± 5	129 ± 3	79,24	112 ± 2	114 ± 3	48,77

* Media de tres réplicas ± DS. Los datos se expresan en mg de edulcorante por kg de producto. Composición: Comprimido 1: AS, glicina, carboximetilcelulosa (CMC), L-leucina; Comprimido 2: AS, lactosa, CMC, L-leucina; Comprimido 3: AS, AK, glicina, CMC, L-leucina; Comprimido 4: AS, AK, sucrosa; Comprimido 5: AS, AK, lactosa, celulosa, almidón; Comprimido 6: AS, AK, maltodextrina, oligofibras; Comprimido 7: AS, AK, lactosa, CMC, glicina, L-leucina.

4. CONCLUSIONES

Se ha desarrollado un nuevo sensor de flujo para la determinación de los edulcorantes artificiales aspartamo y acesulfamo potásico en muestras de edulcorante de mesa. La separación se hace con un sistema FIA monocanal, sin necesidad de derivación previa de los analitos, usando un intercambiador iónico (Sephadex DEAE A-25) en la célula de flujo como base de la separación basándose en la retención transitoria de AK, mientras AS es débilmente retenido. Ésta investigación proporciona un método práctico, barato, simple y rápido para la determinación simultánea de mezclas de AS y AK a niveles de $\mu\text{g mL}^{-1}$, pudiendo ser usado en análisis de rutina. Los resultados han sido validados quimiométricamente y comparados con un método HPLC de referencia.

5. BIBLIOGRAFÍA

1. Di Pietra, A. M.; Cavrini, V.; Bonazzi, D.; Benfenati, L. *Chromatographia* **1990**, *30*, 215-19.
2. Lawrence, J. F.; Charbonneau, C. F. *J.Assoc. Off. Anal. Chem.* **1988**, *71*, 934-37.
3. Szymczyk, K.; Czerwiecki, L. *Rocz.Panstw.Zakl.Hig.* **1995**, *46*, 373-81.
4. Chen, Qing Chuan; Wang, Jing *J.Chromatog.A* **2001**, *937*, 57-64.
5. Baranowska, Irena; Zydron, Mirosława; Szczepanik, Krzysztof *J.Planar Chromatogr.--Mod.TLC* **2004**, *17*, 54-57.
6. Thompson, C. O.; Trenerry, V. C.; Kemmery, B. *J.Chromatog.A* **1995**, *704*, 203-10.
7. Boyce, M. C. *J.Chromatog.A* **1999**, *847*, 369-75.
8. Thompson, C. O.; Trenerry, V. C.; Kemmery, B. *J.Chromatog.A* **1995**, *694*, 507-14.
9. Capitán-Vallvey, L. F., Valencia Miron, M. C., and Gutiérrez del Moral, G. Método de control electromecánico de válvulas rotatorias para la inserción y mezcla de fluidos. Universidad de Granada. [ES2079308]. 1-1-1996. España.

Ref Type: Patent

10. Analytical Methods Committee *Analyst* **1988**, *113*, 1469.
11. Cuadros Rodriguez, Luis; Garcia Campaña, A. M.; Jimenez Linares, Carlos; Roman Ceba, Manuel *Anal.Lett.* **1993**, *26*, 1243-58.
12. Bosque-Sendra, J. M.; Cuadros Rodriguez, L.; Garcia Campaña, A. M. *Recent.Res.Dev.Pure Appl.Anal.Chem.* **1988**, *1*, 115-31.

CAPITULO 3

DETERMINACIÓN DE EDULCORANTES INTENSOS MEDIANTE FIA CON DISCOS MONOLÍTICOS ANIÓNICOS

DETERMINACIÓN DE EDULCORANTES INTENSOS MEDIANTE FIA CON DISCOS MONOLÍTICOS ANIÓNICOS

1. INTRODUCCIÓN

En el Capítulo anterior se mostró el desarrollo de un método de análisis FIA para determinar dos edulcorantes artificiales: AS y AK. El objetivo de este capítulo es desarrollar un procedimiento de trabajo nuevo, más potente que el anterior, para la determinación de una mezcla de tres edulcorantes artificiales, aspartamo (AS), acesulfamo potásico (AK) y sacarina sódica (SA), mediante el uso de un sistema FIA con una columna aniónica monolítica acoplada al mismo.

Como es habitual cuando se determinan mezclas de analitos, los métodos descritos en bibliografía para la determinación de estos edulcorantes en alimentos y en algunos cosméticos suelen ser métodos separativos, como métodos FIA¹, HPLC^{2,3}, cromatografía iónica⁴ y electroforesis capilar⁵.

Por otro lado, en bibliografía podemos encontrar algunos ejemplos de separaciones de aniones inorgánicos comunes mediante el empleo de columnas monolíticas en fase inversa en sistemas cromatográficos de baja resolución⁶⁻⁸.

Como sistema de separación hemos seleccionado un disco monolítico de intercambio aniónico (disco CIM, Bia Separations, Ljubljana, Eslovenia). Éstos se han usado en diversos sistemas y con distintos fines como para la determinación de proteínas⁹, inmovilización de enzimas^{10,11}, oligo y polinucleótidos¹² o para el análisis de sangre¹³, pero no se han usado para la determinación de edulcorantes. Por lo tanto, este método contribuye con una nueva aplicación de este tipo de material monolítico. Se ha conseguido desarrollar un sistema FIA barato para la determinación de una mezcla de tres edulcorantes sin necesidad de derivación previa.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Reactivos y materiales

El agua empleada en este capítulo para la preparación de las diversas disoluciones se obtuvo mediante el mismo procedimiento descrito en el Capítulo anterior.

Las disoluciones madres de patrón de los analitos se prepararon por separado, con una concentración de 10000,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para cada analito: AS, SA (ambos de Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid) y AK (Fluka, Madrid) por disolución de la cantidad adecuada, exactamente pesada, en agua. Estas disoluciones eran fotométricamente estables al menos durante dos meses cuando se guardaban en botellas oscuras en un frigorífico a 4°C. Para preparar las disoluciones de trabajo se diluyeron las disoluciones madre con agua, ajustando siempre a las mismas condiciones que el portador (tampón TRIS a pH 9, 0,4 M de cloruro sódico y $5\cdot 10^{-3}$ M de NaClO_4) para evitar distorsiones en la línea base al inyectar.

Los discos monolíticos usados como sistema de separación (12 mm de diámetro y 3 mm de espesor, y un volumen activo de 0,34 mL) eran intercambiadores aniónicos basados en un monolito altamente entrecruzado de polímero glicidilmetacrilato-co-etilenglicoldimetacrilato con grupos de amonio cuaternario y suministrados por BIA Separations (Ljubljana, Eslovenia). Se usaron dos unidades para llevar a cabo esta separación dispuestas en un soporte para discos proporcionado por la misma empresa.

Como portador se ensayaron diversos tampones: ácido bórico/borato sódico, hidrogenocarbonato sódico/carbonato sódico y tris(hidroximetil)aminometano (tris) (todos ellos de Sigma-Aldrich).

Como cartuchos de extracción en fase sólida, necesarios para el tratamiento de muestra, se usaron dos: Isolute SAX (de Biotage, Uppsala, Suecia) y Oasis MAX (de Waters, Milford, MA, EE.UU.).

2.2. Instrumentación y software

Toda la instrumentación empleada fue la misma que se describió en el Capítulo 2, a excepción de la célula de flujo, que en este caso fue una de 1 cm de paso de luz Hellma 178.710 QS. La conexión entre el espectrofotómetro y el PC en este caso, y en adelante, fue vía LAN. Por último, la bomba peristáltica, también fue distinta. En este caso fue una bomba Ismatec Reglo Digital (Ismatec S.A., Glattbrugg, Suiza) de cuatro canales trabajando a velocidad constante.



Figura 3.1: Bomba peristáltica Ismatec Reglo Digital.

El esquema FIA empleado en este caso fue ligeramente diferente al anterior, ya que a la salida de la válvula de inyección se conectó el soporte que contiene los discos monolíticos mediante conectores estándar. Como conexiones de flujo se usaron tubos de PTFE (Omnifit, Cambridge, Inglaterra) (0,8 mm diámetro interno y 1,6 mm diámetro externo) lo más cortas posibles para minimizar el efecto de ensanchamiento de banda de los picos.

Por último, el software utilizado también fue el mismo que se detalló en el Capítulo 2.

2.3. Métodos y procedimientos

2.3.1. Procedimiento básico

La muestra (25 μL), conteniendo una cantidad de AS entre 9,5 y 130,0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, de AK entre 2,2 y 600,0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y de SA entre 3,0 y 600,0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, y en las mismas condiciones que el portador (tampón Tris pH 9,0 0,03 M, 0,4 M NaCl y $5\cdot 10^{-3}$ M NaClO_4), fue inyectada en el sistema de flujo. Cuando el bolo de muestra alcanzaba el soporte que contiene los discos monolíticos, los analitos

interaccionaban con los mismos, separándose entre sí en el siguiente orden: AS a 38 s (medido a 205 nm), AK en 254 s (a 226 nm) y SA en 335 s (a 205 nm). Para dejar que la línea base regresara a su estado inicial se dejaba pasar el portador hasta 500 s, medidos desde la inyección. Para realizar la determinación, se relacionaba la concentración de patrón inyectada con la altura de pico medida, estableciendo la función de calibrado univariante por mínimos cuadrados. Las muestras se inyectaron por triplicado en todos los casos, midiendo la altura de pico como parámetro analítico.

2.3.2. Método de referencia

Como método de referencia para validar el que se estudia, se usó, al igual que en el Capítulo anterior, una adaptación del propuesto por Lawrence y Charbonneau¹⁴ para HPLC.

2.3.3. Tratamiento de muestras

Antes de analizar las muestras con el procedimiento propuesto, comprobamos la presencia de los analitos buscados observando la etiqueta del producto y comparando los tiempos de retención obtenidos en HPLC con los de los patrones de los analitos. Las muestras fueron adquiridas en supermercados de la ciudad de Granada.

Cabe destacar que se llevaron a cabo diferentes tratamientos de muestra dependiendo de la composición que tuvieran las mismas. Así, para el análisis de bebidas que no contuvieran AS, como **agua tónica, refrescos de naranja, agua y soda**, una cantidad adecuada (habitualmente entre 5 y 7,5 mL) de muestra se desgasificó y diluyó hasta 10 mL, ajustando en todos los casos a las mismas condiciones que el portador. Por último, se filtraron a través de filtros Millipore de 0,2 μm de tamaño de poro.

En el caso de los **caramelos de fresa**, una cantidad adecuada (habitualmente 7 g) de los mismos fue pesada, pulverizándolos después en un mortero de cristal. Después se disolvieron en agua con la ayuda de un baño de ultrasonidos, se diluyó hasta 50 mL ajustando a las mismas condiciones

que el portador. Se centrifugó a 4500 rpm durante 20 minutos y se filtró a través de un filtro Millipore de 0,2 μm .

Para preparar la muestra de **tomate frito**, la cantidad adecuada (habitualmente 4 g) de producto se pesó y se suspendió en 10 mL de agua para tomar luego 6 mL del homogeneizado y llevarlos a 10 mL ajustando con las mismas condiciones que el portador. Por último, fue centrifugado y filtrado a través de un filtro Millipore de 0,2 μm .

En el caso de que las muestras tengan AS en su formulación, el procedimiento a aplicar para su determinación fue diferente y más complejo. Esto es así porque el AS era muy poco retenido en los discos monolíticos, siendo eluido muy cerca del frente, junto con el resto de interferentes que no se veían retenidos en nuestro sistema de separación.

En todas las muestras que se analizaron que contenían AS también se encontraba presente AK y todas ellas eran bebidas (**refrescos de cola, zumos y te negro**). El caso es que AK podía determinarse sin problemas en todas las muestras sin tratamiento de muestra complicado. El problema lo encontrábamos con el AS, ya que para poder determinarlo era necesario un tratamiento de muestra más complejo. Para ello se pusieron a punto dos soluciones distintas y válidas ambas para solventar este problema:

- 1) Usar un método de medida basado en dos inyecciones: la muestra, tratada de forma similar a la ya descrita anteriormente para bebidas, esto es, filtrar, centrifugar y diluir, inyectar a continuación en el sistema de flujo para medir el contenido de AK. Después, era necesaria una segunda inyección de una disolución de muestra más limpia para poder medir AS. El tratamiento a seguir para obtener esta muestra purificada fue mediante el uso de un cartucho de extracción en fase sólida Oasis MAX. Para ello 2 mL de muestra, acondicionada como el portador, se cargaron en el cartucho, previamente acondicionado con 2 mL de agua y 2 mL de MeOH, y se hacían pasar a través de él a una velocidad de 6 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ aplicando vacío. Acto seguido el cartucho se lavaba con 2 mL de agua, para después eluir AS con 2 mL de MeOH:agua al 90% v:v a la misma velocidad de flujo, recogiendo en un tubo de ensayo. El contenido del mismo se llevaba a sequedad a 30°C

y en corriente de nitrógeno. El residuo seco obtenido se disolvía con 2 mL de portador y luego se inyectaba en el sistema de flujo para medir el contenido de AS de la muestra.

- 2) Usar un método de medida basado en una sola inyección. En este caso era necesario llevar a cabo un proceso de purificación de la muestra, al igual que en el procedimiento anterior, con la diferencia que aquí AK también fue sometido a extracción. En este caso necesitábamos dos cartuchos de extracción diferentes (Isolute SAX y Oasis MAX) acoplados en serie. El primer paso era acondicionar los cartuchos con 2 mL de agua y otros 2 mL de MeOH. Seguidamente se carga la muestra (2 mL) con las mismas condiciones que el portador, y se hace pasar a través de los cartuchos. El resultado fue que en estas condiciones, AK era retenido en el primer cartucho, Isolute SAX, y AS en el segundo, Oasis MAX. Después de lavar los cartuchos con 2 mL de agua se lleva a cabo la elución de AK con 2 mL de portador y de AS con 2 mL de MeOH:agua al 90 % v:v, recogiendo el eluido de ambos consecutivamente. El extracto eluido se evapora hasta sequedad a 30°C en corriente de nitrógeno, y el residuo seco se disuelve en 2 mL de portador para acto seguido introducirlo en el sistema de flujo.

Una vez tratadas las muestras se analizaron de acuerdo con el procedimiento básico.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los tres edulcorantes seleccionados son especies que absorben en la región UV, exhibiendo un espectro de absorción muy similar. Las características espectrales de AS y AK se describieron en el Capítulo anterior. SA muestra una banda de absorción a 205 nm en agua con un coeficiente de absorptividad molar ϵ : $1,54 \cdot 10^2 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Debido a la gran similitud espectral que presentan todos ellos era necesario separarlos para poder determinarlos. Para llevar a cabo la determinación seleccionamos un intercambiador aniónico monolítico, un disco CIM® hecho de un polímero de glicidilmetacrilato-co-etilenglicoldimetacrilato (con dimensiones 12 mm de diámetro y 3 mm de espesor) con grupos amonio cuaternario (QA) en su

estructura, que eran los responsables del intercambio aniónico. Al usar este tipo de soporte como sistema separativo solventamos los problemas normales derivados del uso de bombas de baja presión, como las peristálticas usadas comúnmente en FIA⁶. Se usaron tubos de 0,8 mm de diámetro interno para minimizar la presión de trabajo.



Figura 3.2: Disco monolítico aniónico

3.1. Variables

Para poder obtener las condiciones experimentales adecuadas para la medida se estudiaron y optimizaron diferentes parámetros individualmente. Todos los experimentos se llevaron a cabo realizando tres medidas de cada punto. Podemos considerar que tenemos dos grupos de variables importantes: la optimización del portador y las variables FIA.

3.1.1. Optimización del portador

La composición del portador fue estudiada conjuntamente con la longitud de la columna, en este caso el número de discos monolíticos que se insertaban en el portadiscos, capaz de albergar entre 1 y 4 discos, porque eran parámetros estrechamente relacionados. La metodología de trabajo fue siempre la misma: primero ensayar las separaciones con un disco monolítico y después con dos.

La composición y pH del portador en estos discos QA afectaba a la retención de los edulcorantes y a su resolución. En concreto, el pH fue la clave para obtener una buena separación del AS ya que a valores de pH mayores de 6, AS incrementaba su retención en el disco QA de acuerdo con sus valores de pK (detallados en el Capítulo anterior). Sin embargo, SA (pK_a 1,6) y AK (pK_a -0,28) no variaban su retención con respecto al pH ya que su estructura no era dependiente del valor de pH. Por lo tanto, variando el pH podíamos variar el tiempo de retención de AS.

En la Figura 3.3 podemos ver como variaba el tiempo de retención de AS, AK y SA al variar el pH del portador. En el caso de AS el tiempo de retención presentaba una dependencia sigmoideal. Esto era debido al proceso de desprotonación que sufría el dipéptido al aumentar el pH. Para valores de pH mayores de 10 aparecían dos picos para AS en el fiagrama. Esto era debido, probablemente, a la ciclodeshidratación parcial que sufría AS para originar una dicetopiperacina¹⁵ a valores de pH elevados. Por ello, seleccionamos pH 9 como pH óptimo de trabajo porque a este valor, AS presentaba mayor retención en el disco sin presentar degradación. Desde el punto de vista de los discos monolíticos no había problema con trabajar a valores de pH extremos ya que podían servir en un intervalo de pH entre 2 y 13.

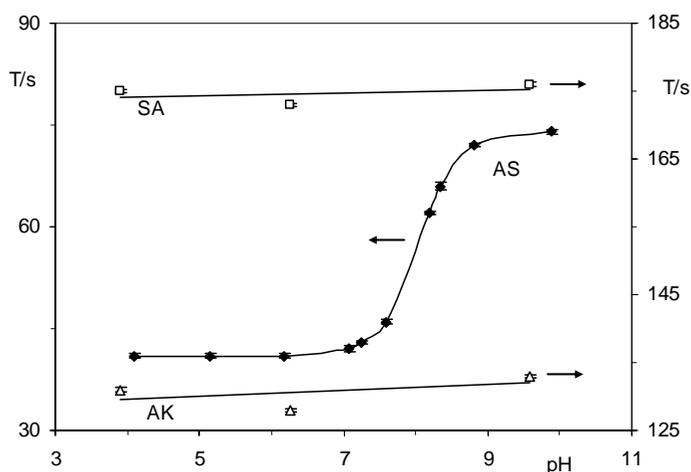


Figura 3.3: Dependencia del tiempo de retención con el pH.

En la Figura anterior puede verse, además, el comportamiento de AK y SA al variar el pH, encontrando, como cabía esperar, que sus tiempos de retención apenas variaban, ya que su estructura no era dependiente del pH como la de AS.

Los datos mostrados en la Figura 3.3 se obtuvieron usando un solo disco monolítico. Con dos discos el resultado fue similar en el sentido de que la curva presentaba las mismas características, pero con valores de tiempo de retención mayores como cabe esperar debido a la mayor longitud de columna.

El pH de trabajo se ajustó usando una disolución tampón. Probamos a usar solo la disolución tampón, variando su concentración para así modificar la fuerza iónica, para intentar resolver la mezcla AK/SA, tanto con un disco como con dos, pero aun usando una concentración de tampón 1 M los analitos no se eluían de la columna, sobrepasando los 2000 s de tiempo de análisis sin eluirse. La fuerza iónica fue muy importante, y sería la que regulara, en función de su concentración, los tiempos de retención de todos los analitos. Debido a esto, seleccionamos la concentración de tampón más pequeña posible, con buena capacidad tampón, para variar la fuerza iónica con otras sales más específicas en un rango de concentraciones mayor.

Para poder llevar a cabo los experimentos de selección del tampón y de su concentración, fue necesario añadir una pequeña cantidad de NaClO_4 (0,01 M) a los portadores para facilitar la elución de los analitos en un tiempo razonable. Como tampones se ensayaron varios con buena capacidad tampón a pH 9 como borato, carbonato y TRIS en distintas concentraciones (entre 0,01 y 0,05 M a 5 niveles). Se seleccionó TRIS como tampón óptimo porque las señales analíticas de los tres edulcorantes fueron, como media, un 15 % mayor que con los otros tampones. La concentración de TRIS seleccionada fue 0,03 M ya que ésta era la mínima concentración que producía un buen efecto tampón (Figura 3.4).

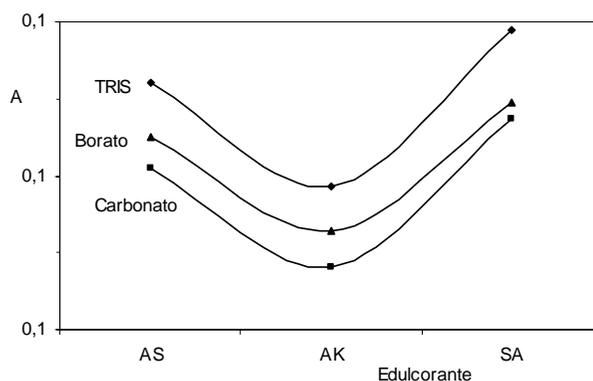


Figura 3.4: Influencia de la naturaleza del tampón en la altura de pico

Para poder llevar a cabo la separación de los tres aniones, recordemos que al pH de trabajo seleccionado AS también se encontraba como anión, se recurrió al uso de la modificación de la fuerza iónica, añadiendo distintas cantidades de diferentes aniones: Na_2SO_4 , NaNO_3 , NaCl y NaClO_4 . Al añadir esas sales al medio lo que conseguimos era acelerar la elución de los analitos de la columna ya que estos aniones agregados para ajustar la fuerza iónica competían con los analitos por las cargas fijas de la columna, acelerando así su salida. Por ello, cuanto mayor sea la fuerza iónica del medio, menor era la retención de los analitos, y menor era, por tanto, su resolución. Con Na_2SO_4 no se obtuvieron los resultados deseados, ya que incluso aumentando la cantidad de sulfato no se consiguió que los analitos se eluyeran de la columna en 2000 s. Con NaNO_3 el resultado fue similar. Sin embargo, con NaCl si se obtuvieron resultados aceptables. La Figura 3.5 muestra la resolución entre AK y SA y el tiempo de análisis al variar la concentración de (A) NaCl y de (B) NaClO_4 .

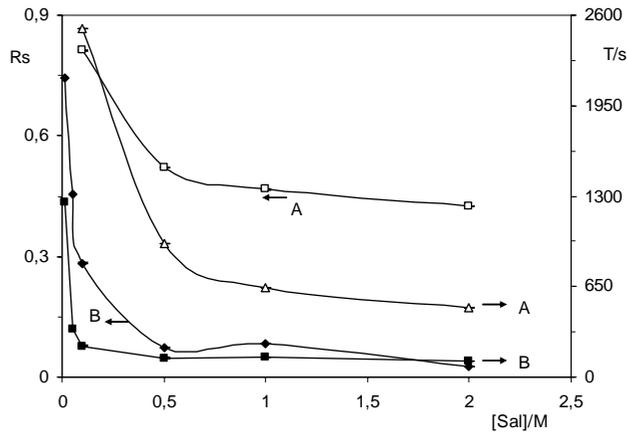


Figura 3.5: Variación de la resolución entre AK y SA y del tiempo de análisis en función de la concentración de NaCl (A) y de NaClO₄ (B) usando un solo disco monolítico.

En el caso del NaCl, utilizando un solo disco, se obtuvo una buena resolución entre los edulcorantes citados (entorno a 0,8) usando concentraciones bajas de NaCl, pero el tiempo de análisis aumentaba demasiado (por encima de los 3000 s). Si empleamos dos discos monolíticos se encontraban resultados similares, aunque a mayores concentraciones de NaCl, recortando el tiempo de análisis. Pero aún así, incluso usando una concentración de 1 M el tiempo de análisis supera los 1000 s, haciéndolo inviable.

En la Figura anterior (B) también podemos observar dicho comportamiento al añadir NaClO₄. En este caso, obteníamos resoluciones mayores que con cloruro, pero con concentraciones menores, como cabe esperar considerando su mayor tamaño. Sin embargo el tiempo de análisis fue, al igual que con cloruro, demasiado elevado usando un disco. Por ejemplo, para una concentración de NaClO₄ de 0,01 M el tiempo de análisis sobrepasaba los 1200 s con una resolución de 0,8 aproximadamente. Con dos discos conseguimos reducir el tiempo de análisis, pero aún así seguía siendo demasiado elevado. Los mejores resultados los obtuvimos al mezclar ambas sales, NaCl y NaClO₄, para dotar al medio de la fuerza iónica adecuada.

Con el objetivo de obtener la mejor proporción de cada sal, estudiamos diferentes mezclas, fijando la concentración de una de estas sales y variando la de la otra. El parámetro que fijamos fue la

concentración de NaClO_4 , a cinco niveles de concentración entre 0,001 M y 0,05 M de NaClO_4 . El motivo de estudiar en este intervalo era porque a mayores concentraciones de 0,05 M de NaClO_4 la resolución entre AK y SA disminuía demasiado (ver Figura 3.5), por lo tanto había que trabajar por debajo de ese límite. Una vez fijada la concentración de perclorato se fue variando la de cloruro, entre 0,1 y 0,6 M, observando como evolucionaba la resolución de los edulcorantes. El resultado no fue malo, pero empleando un solo disco no podíamos separar ambos edulcorantes en un tiempo prudencial. Por ello intentamos hacerlo con dos discos, obteniendo una separación aceptable y un tiempo de análisis no demasiado elevado, seleccionando, pues, dos discos como óptimo. La composición adecuada resultó ser 0,005 M en NaClO_4 y 0,4 M en NaCl , además del tampón. En estas condiciones obtuvimos una resolución aceptable (0,8) para medir los analitos en altura, obteniendo un tiempo de análisis de 800 s, aunque se podía mejorar optimizando los parámetros FIA. Con respecto a AS (del cual no hemos dicho nada hasta aquí porque se eluye muy pronto, separándose por completo de los otros dos edulcorantes), en estas condiciones, se retiene muy débilmente en la columna, siendo eluido cerca del frente, en concreto con un tiempo de retención de 30 s.

3.1.2. Variables FIA

Todas las conexiones se hicieron con tubos de PTFE. Los tubos se cortaron a medida, intentando siempre realizar las conexiones lo más cortas posible para minimizar el efecto del ensanchamiento de pico como consecuencia de la dispersión longitudinal a través del tubo.

Como es habitual, las variables FIA estudiadas fueron el caudal y el volumen del bucle. Se estudió la influencia de la velocidad de flujo sobre la señal analítica, entre 1,1 y 2,0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, a cuatro niveles. No se estudiaron velocidades menores por la imposición de tratar de disminuir en lo posible el tiempo de análisis (así a 1,1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ el tiempo de análisis ya era de 800 s), ni mayores de 2,0 porque la bomba no podía trabajar a mayores caudales por la presión del sistema debida a la presencia de los dos discos monolíticos.

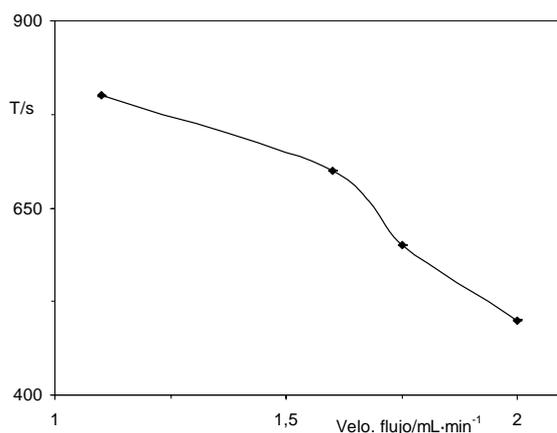


Figura 3.6: Evolución del tiempo de análisis con la variación del caudal.

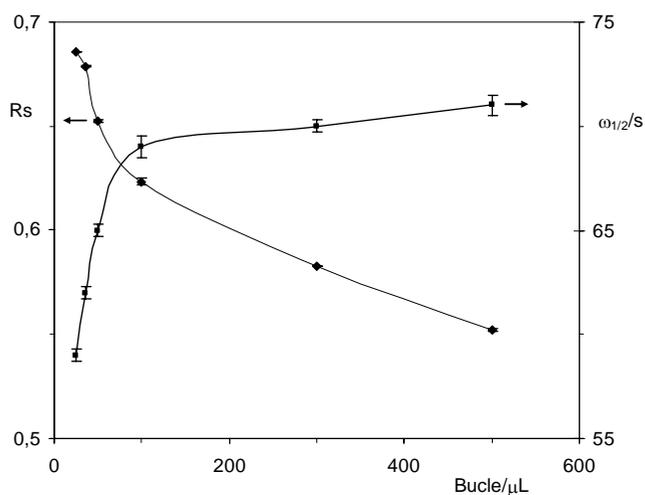


Figura 3.7: Variación de la resolución (AK/SA) y del ancho de banda de AK (SA se comportaba similar) con la variación del tamaño de bucle.

Aparte del tiempo de análisis, el otro parámetro decisivo para seleccionar la velocidad de flujo adecuada fue la resolución entre los edulcorantes. Como cabe esperar con materiales monolíticos, la resolución era prácticamente independiente del caudal de trabajo, mientras que el tiempo de análisis aumentaba cuando decrecía el caudal (Figura 3.6). Por ello seleccionamos la mayor velocidad de flujo

que podíamos alcanzar ($2,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) como caudal óptimo, minimizando así el tiempo de análisis (500 s).

Con respecto al volumen de bucle, un incremento de muestra entre 25 y 500 μL aumentaba, como es natural, la señal analítica, como resultado de una mayor cantidad de analito en el sistema de flujo. En este caso, el factor principal para decidir cual era el tamaño de bucle adecuado fue la resolución de los edulcorantes AK y SA. Al aumentar el tamaño de bucle aumentaba la señal analítica, pero disminuía la resolución de los picos. Las mejores resoluciones se obtuvieron con el tamaño de bucle más pequeño (25 μL) debido al menor ancho de banda ($\omega_{1/2}$) de los picos. Por ello se seleccionó como óptimo 25 μL de bucle.

3.2. Características analíticas

Como parámetro analítico se seleccionó la altura de pico ya que la resolución de AK y SA no fue completa, por lo que el uso de área como parámetro analítico no fue posible. Para AS la función de calibración fue lineal entre 9,5 y 130,0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, para AK entre 2,2 y 600,0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y para SA entre 3,0 y 600,0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Las señales analíticas se tomaron a la longitud de onda de máxima absorción de cada analito gracias al detector de diodos. El ajuste de los datos se hizo mediante regresión por mínimos cuadrados, utilizando el test de fallo de ajuste para verificar la bondad del mismo, con 7 réplicas de cada patrón a 5 niveles de concentración distintos. La desviación estándar del blanco (DER) necesaria para determinar los límites de detección ($K=3$) y de cuantificación ($K=10$)¹⁶ se obtuvo como resultado medio de 10 determinaciones experimentales. La frecuencia de muestreo fue de 7 h^{-1} aproximadamente. En la Tabla 3.1 se muestran estos y otros parámetros analíticos para el método propuesto.

Como resultado de la optimización, el método propuesto presentaba unos resultados satisfactorios para la cuantificación de cada edulcorante en presencia de diferentes proporciones de los otros dos. Para demostrar esta independencia de señales se estudiaron seis mezclas de edulcorantes con proporciones que varían entre 1:20 y 20:1 para AS y entre 1:120 y 120:1 para AK y SA en un nivel de concentración de 10 a 130 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para AS, de 2 a 600 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para AK y de 3 a 600 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para SA.

Tabla 3.1. Parámetros analíticos para el sensor de flujo para AS-AK-SA

Parametros	Unidades	AS	AK	SA
		205 nm	226 nm	205 nm
b	mL·µg ⁻¹	6,26·10 ⁻³	2,91·10 ⁻³	3,42·10 ⁻³
S _b	mL·µg ⁻¹	9,12·10 ⁻⁵	2,22·10 ⁻⁶	3,24·10 ⁻⁶
a	-----	2,58·10 ⁻²	3,62·10 ⁻³	-3,63·10 ⁻³
S _a	-----	6,08·10 ⁻³	7,43·10 ⁻⁴	1,17·10 ⁻³
r	-----	99,83	99,99	99,99
Valor P	%	9,5 – 130,0	2,2-600,0	3,0-600,0
RDL	µg·mL ⁻¹	2,9	1,0	0,9
LD	µg·mL ⁻¹	9,5	0,7	3,0
LC	µg·mL ⁻¹	1,46	0,08	0,09

b: pendiente; S_b : desviación estándar de la pendiente; a: ordenada en el origen; S_a : desviación estándar de la ordenada en el origen; r: coeficiente de correlación; VP: nivel de probabilidad del test de fallo de ajuste; RDL: rango dinámico lineal; LD: límite de detección; CL: límite de cuantificación; DSR: desviación estándar relativa.

3.3. Aplicaciones analíticas

El método propuesto fue aplicado a diferentes muestras, entre las que se encuentran bebidas de bajo poder calórico y algunos alimentos, todas ellas adquiridas en supermercados de la ciudad de Granada. De todas esas muestras, algunas presentaban una mezcla de los tres edulcorantes, pero lo más común era que solo se encontrara uno de ellos o una mezcla binaria. Eso sí, las muestras fueron seleccionadas para conseguir aplicar el método a todas las mezclas binarias posibles, y, cuando era posible, a la mezcla ternaria. La presencia de los edulcorantes en las muestras se puso de manifiesto por la información suministrada por la etiqueta de las mismas, así como comparando los tiempos de retención con patrones de los edulcorantes usando el método de referencia HPLC.

El tratamiento de muestra difería cuando AS se encontraba presente o no. En el caso de que no se encontrara presente el tratamiento era muy simple (ver apartado 2.5.-Tratamiento de muestras). Sin embargo, cuando AS se encontraba presente en las muestras, formando siempre mezclas binarias con AK, era necesario aplicar un procedimiento de extracción desarrollado por nosotros. La muestra necesitaba ser purificada antes de inyectarla para obtener un buen registro FIA libre de interferentes. AS se eluía muy próximo al frente, debido a su baja retención en la columna monolítica. Por ello, las sustancias que tampoco eran retenidas en la columna se eluían con el frente interfiriendo con la señal de AS. Hemos desarrollado un método de extracción nuevo para aquellas muestras que contienen AS porque lo más común para analizar edulcorantes es usar HPLC, técnica que gracias a su alto poder resolutivo no necesita apenas tratamiento de extracción, en el caso de los edulcorantes al menos ^{17;18}.

La purificación de la muestra se hizo con cartuchos de extracción en fase sólida comerciales. En este caso se usaron dos cartuchos de extracción distintos ya que con uno solo no se logró de extraer AS y AK al mismo tiempo. Así, para retener AS se usó un cartucho Oasis MAX, en el cual AS se retiene pero no AK, y para AK un Isolute SAX 500 mg, que retiene AK fuertemente y no AS. Para ambos cartuchos trabajamos en las condiciones adecuadas para obtener una buena retención aniónica, acondicionando las muestras del mismo modo que el portador. Para conseguir la elución de los analitos de los cartuchos se ensayaron diversas disoluciones. Así, para Isolute SAX, el agua no eluía AK, por lo que se podía usar para lavar el cartucho, mientras que la disolución portadora si lo eluía, por lo que se usó como disolución eluyente. En el caso del Oasis MAX se probaron diferentes mezclas hidroalcohólicas (MeOH:H₂O) desde 10 % hasta 100 % obteniendo que el agua pura no lo eluía, luego se podía usar para limpiar este cartucho también, mientras que con MeOH al 90 % si se eluía, seleccionándolo como disolución eluyente. Trabajando de esta manera se encontraron recuperaciones cercanas al 100 % (103,8% a 101,4% para AS, de 98,2% a 102,5% para AK y de 97,6% a 103,4% para SA, con una media de 102,6% para AS, de 100,4% para AK y de 100,5% para SA). Además, para minimizar el tiempo de tratamiento de muestra era posible (y así se hizo) usar ambos cartuchos en serie.

Hay una segunda manera de analizar las muestras que contienen AS, con un solo cartucho, pero necesitaríamos hacer dos inyecciones en el sistema de flujo para poder analizar ambos edulcorantes (AS y AK). En este caso, la muestra, desgasificada, diluida, filtrada y acondicionada como el portador, se debería inyectar en el sistema de flujo para medir la señal de AK y determinar su concentración. Acto seguido, esa misma muestra (otra alícuota) se haría pasar por un cartucho Oasis MAX con el mismo procedimiento ya explicado para extraer AS de la muestra, inyectando después la disolución purificada y determinando así la concentración de AS en la muestra. Ambos métodos de extracción son válidos (se verificaron los resultados), pero nosotros seleccionamos el primero (con una única inyección) porque es más rápido, reduciendo así el tiempo de análisis e incrementando la frecuencia de muestreo.

Tabla 3.2: Resultados obtenidos en muestras reales al aplicar el método propuesto y el de referencia

Muestra	AS/ mg·L ⁻¹			AK/ mg·L ⁻¹			SA/ mg·L ⁻¹		
	Método	Método	Valor P	Método	Método	Valor P	Método	Método	Valor P
	FIA*	HPLC*	(%)	FIA*	HPLC*	(%)	FIA*	HPLC*	(%)
Cola light 1	252 ± 7,74	254 ± 7,77	79,93	66 ± 1,33	67,2 ± 0,38	6,53	-----	-----	-----
Cola light 2	62 ± 2,08	58 ± 2,59	13,23	126 ± 1,36	125 ± 1,30	53,08	-----	-----	-----
Zumo	144 ± 6,08	141 ± 4,35	51,69	31 ± 1,58	32,5 ± 0,42	24,47	-----	-----	-----
Zumo manzana	34,5 ± 0,92	34,6 ± 0,13	88,33	30,2 ± 0,58	29,44 ± 0,01	15,92	17,2 ± 0,39	16,81 ± 0,05	30,26
Te negro	31 ± 1,48	33 ± 1,01	62,84	56,6 ± 0,68	56,1 ± 0,11	27,97	-----	-----	-----
Agua tónica	-----	-----	-----	243 ± 1,72	245 ± 1,04	12,02	57,8 ± 0,40	55 ± 1,98	9,04
Refresco naranja 1	-----	-----	-----	118 ± 1,90	116,8 ± 0,32	32,34	55,8 ± 0,59	56,10 ± 0,05	41,07
Agua	-----	-----	-----	36 ± 1,12	37,3 ± 0,12	22,17	-----	-----	-----
Refresco naranja 2	-----	-----	-----	255 ± 1,74	254,2 ± 0,28	62,53	-----	-----	-----
Soda	-----	-----	-----	-----	-----	-----	93 ± 2,92	92 ± 1,31	61,68
Tomate frito**	-----	-----	-----	105,4 ± 0,68	106,0 ± 0,47	38,14	54 ± 1,11	54,05 ± 0,05	73,07
Caramelos de fresa**	-----	-----	-----	156 ± 2,45	156,9 ± 0,32	50,48	161 ± 2,10	161,9 ± 0,49	78,97

* Media de tres determinaciones ± DS. **Resultados expresados en mg·L⁻¹, excepto el tomate frito y los caramelos de fresa que se expresan en mg·Kg⁻¹.

Los resultados obtenidos se validaron mediante una comparación estadística con los obtenidos con el método de referencia (HPLC) ¹⁴, mostrando los resultados en la Tabla 3.2. En esta Tabla se incluyen los valores medios de tres determinaciones para cada muestra, la desviación estándar de

estas medidas y el valor de probabilidad (valor P) del test de fallo de ajuste entre los resultados obtenidos mediante ambos métodos. Como se puede observar los resultados son estadísticamente similares, concluyendo que no existen diferencias significativas entre ambos métodos.

El método propuesto presenta diversas ventajas (frente a los métodos HPLC habituales): su uso es muy simple, es rápido, instrumentación barata y precisión similar. La pega es que posee menor poder resolutivo, aunque es suficiente para realizar estas determinaciones.

4. CONCLUSIONES

Se propone un nuevo método multianalito de flujo para la determinación de mezclas de aspartamo, acesulfamo potásico y sacarina sódica empleando un disco intercambiador aniónico monolítico comercial como base de la separación. La separación se ha llevado a cabo, usando un esquema FIA monocanal sin la necesidad de realizar ninguna derivación previa de los analitos, gracias a la retención transitoria de AK y SA en la fase estacionaria mientras AS es débilmente retenido. Este procedimiento proporciona un nuevo método simple, práctico, rápido y barato para la determinación simultánea de mezclas de AS, AK y SA a niveles de $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ que puede ser empleado en análisis de rutina, pudiendo ser aplicado a muestras de alimentos comerciales. Los resultados se validaron estadísticamente comparándolos con los obtenidos mediante un método de referencia HPLC. Los resultados son aceptables, viéndose el método limitado por la elección del soporte monolítico, ya que no está diseñado para su acoplamiento a sistemas de flujo (esto se pone de manifiesto cuando se ven sus dimensiones, por ejemplo). La solución pasa por el diseño y desarrollo de nuevos soportes monolíticos por personal especializado.

5. BIBLIOGRAFÍA

1. Garcia-Jimenez, J. F.; Valencia Miron, M. C.; Capitán-Vallvey, L. F. *Anal.Lett.* **2006**, *39*, 1333-47.
2. Matsumoto, Hiroko; Hagino, Kayo; Sakamaki, Narue; Kasuya, Yoko; Nagayama, Toshihiro *Tokyo-to Kenko Anzen Kenkyu Senta Kenkyu Nenpo* **2006**, *56*, 153-56.
3. Jia, Yuzhu; Luo, Hedong; Lin, Jian *Zhongguo Weisheng Jianyan Zazhi* **2005**, *15*, 448-49.
4. Zhu, Yan; Guo, Yingying; Ye, Mingli; James, Frits S. *J.Chromatog.A* **2005**, *1085*, 143-46.
5. Herrmannova, Michaela; Krivankova, Ludmila; Bartos, Martin; Vytras, Karel *J.Sep.Sci.* **2006**, *29*, 1132-37.
6. Pelletier, Sarah; Lucy, Charles A. *J.Chromatog.A* **2006**, *1118*, 12-18.
7. Connolly, Damian; Victory, Danielle; Paull, Brett *J.Sep.Sci.* **2004**, *27*, 912-20.
8. Victory, Danielle; Nesterenko, Pavel; Paull, Brett *Analyst* **2004**, *129*, 700-01.
9. Rucevic, Marijana, Clifton, James G., Huang, Feilei, Li, Xuesong, Callanan, Helen, Hixson, Douglas C., and Josic, Djuro. Use of short monolithic columns for isolation of low abundance membrane proteins. *Journal of Chromatography A* 1123[2], 199-204. 2006.
Ref Type: Journal (Full)
10. Vodopivec, Martina; Podgornik, Ales; Berovic, Marin; Strancar, Ales *J.Chromatog.B* **2003**, *795*, 105-13.
11. Podgornik, Helena and Podgornik, Ales. Characteristics of LiP immobilized to CIM monolithic supports. *Enzyme and Microbial Technology* 31[6], 855-861. 2002.
Ref Type: Journal (Full)
12. Jerman, Sergej; Podgornik, Ales; Cankar, Katarina; Cadez, Neza; Skrt, Mihaela; Zel, Jana; Raspor, Peter *J.Chromatog.A* **2005**, *1065*, 107-13.
13. Gupalova, T. V.; Lojkina, O. V.; Palagnuk, V. G.; Totolian, A. A.; Tennikova, T. B. *J.Chromatog.A* **2002**, *949*, 185-93.
14. Lawrence, J. F.; Charbonneau, C. F. *J.Assoc.Off.Anal.Chem.* **1988**, *71*, 934-37.
15. Capitán-Vallvey, L. F. *Handbook of Food Analysis*, Nollet, L. M. L., Ed.; 2 ed.; Marcel Dekker Inc.: New York, 2004; Chapter 43.

16. Analytical Methods Committee *Analyst* **1988**, *113*, 1469.
17. Galletti, G. C.; Bocchini, P. *J.Chromatog.A* **1996**, *729*, 393-98.
18. Hannisdal, A. *Z.Lebensm.Unters.Forsch.* **1992**, *194*, 517-19.

CAPITULO 4

SEPARACIÓN DE ANTIOXIDANTES MEDIANTE FIA CON MINICOLUMNAS MONOLÍTICAS APOLARES

SEPARACIÓN DE ANTIOXIDANTES MEDIANTE FIA CON MINICOLUMNAS MONOLÍTICAS APOLARES

1. INTRODUCCIÓN

En el Capítulo anterior ya estudiamos la posibilidad de emplear columnas monolíticas acopladas a sistemas de flujo de baja presión, como es FIA. En este nuevo Capítulo queremos estudiar el comportamiento en este tipo de técnica con otro tipo de columna monolítica: una columna apolar. El objetivo principal de este estudio es desarrollar un método FIA basado en un esquema sencillo con una columna monolítica acoplada, para ser aplicado al análisis de tres antioxidantes comúnmente usados en alimentos y cosméticos: butilhidroxitolueno (3,5-di-tert-butil-4-hidroxitolueno, E-321) (BT), butilhidroxianisol (2- y 3-tert-butil-4-hidroxianisol, E-320) (BA) y n-propilgalato (n-propilester del ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico, E-310) (PG). El segundo objetivo de este trabajo es caracterizar y validar este procedimiento mediante su comparación con un procedimiento HPLC y su aplicación a muestras comerciales de alimentos y cosméticos.

Para determinar mezclas de estos antioxidantes en alimentos y bebidas se han empleado diferentes aproximaciones¹. Una de las técnicas elegidas frecuentemente es HPLC con detección UV^{2,3} o bien electroquímica^{4,5}, aunque la electroforesis capilar (EC) ofrece también buenos resultados^{6,7}. Otra posibilidad es realizar reacciones de derivación de los analitos para poder analizar los antioxidantes por cromatografía de gases⁸ o por cromatografía de gases con detección espectrométrica de masas⁹. También se han empleado métodos voltamétricos con técnicas quimiométricas para determinar mezclas de estos antioxidantes fenólicos¹⁰⁻¹². Por otro lado, una estrategia también utilizada para su determinación es el empleo de técnicas cinéticas¹³. Dentro de las técnicas de inyección en flujo (FIA) se han empleado métodos con detección electroquímica para BA y PG⁵. Además, previamente, nosotros hemos estudiado la resolución de mezclas binarias de antioxidantes usando métodos FIA con detección espectrofotométrica con el empleo de soportes sólidos incluidos en la misma célula de medida^{14,15}, obteniendo procedimientos con buenas características analíticas aunque con una baja capacidad resolutive.

El trabajo presentado en este capítulo para determinar mezclas de antioxidantes comunes estaba basado en el empleo de columnas monolíticas muy cortas (5 mm), lo que hizo posible el desarrollo de una metodología de flujo simple y barata para el análisis de antioxidantes sin la necesidad de derivación previa de los analitos o de complejos esquemas de flujo.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Reactivos y materiales

Todas las sustancias químicas que se han usado en éste trabajo han sido de calidad analítica, y el agua empleada para preparar las disoluciones acuosas ha sido la misma que se ha descrito en capítulos anteriores.

Las disoluciones madre de patrón de los analitos se prepararon por separado, con una concentración de 1000,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para cada analito: BA y BT (ambos de Fluka, Madrid) y PG (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid) por disolución de la cantidad adecuada, exactamente pesada, en metanol (Labscan, Dublin, Irlanda, 99,9% v/v, grado HPLC). Estas disoluciones fueron

fotométricamente estables al menos durante dos meses cuando se guardaban en botellas oscuras en un frigorífico a 4°C. Para preparar las disoluciones de trabajo se diluyeron las disoluciones madre con agua, manteniendo siempre un 42 % v/v de metanol para evitar distorsiones en la línea base al inyectar.

Como columna se usó una precolumna Chromolith RP-18 (5 mm de longitud y 4,6 mm de diámetro interno) con su carcasa original (ambos de Merck, Darmstadt, Alemania).

Como disoluciones portadoras se usaron mezclas metanol/agua y acetonitrilo (Panreac Química S.A., Barcelona, grado HPLC)/agua en diferentes proporciones. Todas las disoluciones fueron filtradas a través de filtros de 0,45 μm GH Polypro (Pall Corporation, Nueva York, EE.UU.) antes de usarlas.

2.2. Instrumentación y software

Toda la instrumentación empleada fue la misma que se describió en el Capítulo 3, a excepción de la célula de flujo, que en este caso fue una de 1 mm de paso de luz Hellma 138 QS y del tipo de conexión entre el espectrofotómetro y el PC, que en este caso y en adelante fue vía LAN.

El sistema FIA fue el mismo descrito en el Capítulo anterior con la salvedad de que ahora la columna es diferente, así como el portacolumnas.



Figura 4.1: Detalle de la columna monolítica apolar y del portacolumnas.

Además, en este caso, se emplearon dos válvulas rotatorias de teflón de seis vías Rheodyne 5041 controladas electromecánicamente por un procedimiento descrito por nosotros¹⁶, una de ellas usada como válvula de inyección y la otra habilitada como válvula de selección de portador, así como dos disoluciones portadoras distintos. A la salida de la válvula de inyección se le conectó el soporte que contenía la columna monolítica mediante conectores estándar. Como conexiones de flujo se usaron tubos de PTFE (Omnifit, Cambridge, Inglaterra) (0,8 mm diámetro interno y 1,6 mm diámetro externo) lo más cortos posibles para minimizar el efecto de ensanchamiento de banda de los picos.

Por último, el software utilizado también fue el mismo que se detalló en el Capítulo 2.

2.3. Métodos y procedimientos

2.3.1. Procedimiento básico

La disolución de muestra (50 μL), con la mezcla de antioxidantes PG, BA y BT con concentraciones comprendidas dentro del rango dinámico lineal de cada uno, es inyectada en el sistema de flujo a través de una válvula de inyección en las mismas condiciones que el portador. El portador, a una velocidad de 2,4 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, se cambia desde su composición inicial, 42 % $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ v/v, hasta un 70 % de metanol treinta segundos después de la inyección a través de una válvula de selección. Cuando el bolo de muestra alcanza la minicolumna monolítica, los analitos son separados

de acuerdo a su polaridad. El primero en ser detectado es PG (con un tiempo de retención de 15 s, a 273 nm), seguido de BA (47 s a 288 nm) y, por último, BT (74 s a 279 nm). Acto seguido el sistema de flujo se acondiciona de nuevo con el primer portador durante 30 s. Para cuantificar a los analitos presentes en la muestra se establece la relación entre concentración y área de pico con patrones externos mediante regresión por mínimos cuadrados. Las muestras se inyectaron siempre por triplicado, midiendo el área de pico como parámetro analítico.

2.3.2. Método de referencia

Como método de referencia se empleó una modificación del método para HPLC con detección de UV propuesto por Perrin y Meyer³. La columna empleada fue una Zorbax C₈ con un tamaño de partícula de 5 µm y de dimensiones 150 x 4,6 mm. La fase móvil empleada consistía en un gradiente desde 72 % del portador A (agua a pH 3,0, acidificada con ácido fosfórico al 1 % v/v) y 28 % de portador B (metanol:acetonitrilo 1:1) a 10 % de portador A y 90 % de portador B, a 1,0 mL min⁻¹ de velocidad de flujo. Los cromatogramas fueron obtenidos a la longitud de onda óptima de cada analito (273 nm para PG, 288 nm para BA y 279 nm para BT). Para obtener las funciones de calibrado se analizaron cinco niveles de concentración y tres réplicas diferentes para cada analito, utilizando el área de pico como parámetro analítico.

2.3.3. Tratamiento de muestras

Antes de analizar las muestras con el procedimiento propuesto, comprobamos la presencia de los analitos buscados en la etiqueta de los productos y, además, comparando los tiempos de retención obtenidos en HPLC con los de los patrones de los analitos. Las muestras fueron adquiridas en supermercados de la ciudad de Granada.

El método propuesto fue aplicado al análisis de antioxidantes en muestras comerciales de alimentos (caldo concentrado de pollo, sopas deshidratadas y chicle) y cosméticos (aceite corporal).

Para el análisis del aceite corporal, la cantidad apropiada, normalmente 25 g, se diluyó con 100 mL de hexano. La disolución resultante se extrajo tres veces con 20 mL de metanol al 70 % durante 10 minutos cada una. Los tres extractos se mezclaron, filtrando la disolución resultante a través de filtros de 0,25 μm , llevándolos finalmente a 100 mL.

Para el análisis de chicle, una cantidad apropiada (normalmente 5 g) fue pesada y troceada finamente para aumentar la superficie de contacto con el disolvente. La extracción se llevó a cabo, por triplicado, añadiendo 25 mL de metanol, y agitando con la ayuda de un agitador magnético durante 10 minutos cada vez. Los extractos combinados se sometieron a centrifugación a 2500 rpm durante 15 minutos, y se llevaron a sequedad con un rotavapor, redisolviendo finalmente con metanol, y llevándolos a 25 mL.

Para analizar el caldo de pollo y las sopas deshidratadas se pesó la cantidad adecuada (normalmente 5 g), se trituró en un mortero, se homogeneizó, y se extrajo por triplicado con 25 mL de una mezcla de hexano:2-propanol 1:1 durante 10 minutos cada vez. Los extractos se combinaron, y se centrifugaron a 2500 rpm durante 15 minutos. El líquido sobrenadante se volvió a extraer por triplicado con 25 mL de metanol puro. Los extractos metanólicos se combinaron, y la disolución resultante se evaporó a sequedad en un rotavapor y se disolvió con metanol, llevándola hasta un volumen final de 10 mL.

Una vez tratadas las muestras se analizaron de acuerdo con el procedimiento básico descrito.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los tres antioxidantes seleccionados son especies que absorben en la región UV, exhibiendo un espectro de absorción muy similar. Las características espectrales de estos analitos son:

- PG en ACN presenta un máximo a 217 nm, ϵ : $5,30 \cdot 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, y otro a 273 nm, ϵ : $2,10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.
- BA presenta, en ACN, tres máximos a 196 nm, ϵ : $6,76 \cdot 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, a 227 nm, ϵ : $1,10 \cdot 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ y a 288 nm, ϵ : $6,47 \cdot 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

- BT presenta, en ACN, tres máximos a 200 nm, ϵ : $1,65 \cdot 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, a 223 nm, ϵ : $1,91 \cdot 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ y a 279 nm, ϵ : $4,49 \cdot 10^2 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Las longitudes de onda seleccionadas no fueron las de máxima absorción porque lo que buscábamos era la mayor diferenciación espectral.

Debido a la gran similitud espectral que presentan todos ellos fue necesario separarlos para poder determinarlos. Para llevar a cabo la separación seleccionamos una columna monolítica en fase inversa Chromolith RP-18 (con dimensiones 4,6 mm de diámetro y 5 mm de espesor). Al usar este tipo de soporte como sistema separativo también solventamos los problemas normales derivados del uso de bombas de baja presión, como las peristálticas usadas comúnmente en FIA¹⁷. Se usaron tubos de 0,8 mm de diámetro interno para minimizar la presión de trabajo.

3.1. Variables

Podemos considerar que tenemos dos grupos de variables importantes: la optimización del portador y las variables FIA.

3.1.1. Optimización del portador

Cuando se usan fases estacionarias en fase inversa la variable principal en la separación de los componentes de la muestra en dicha fase estacionaria es la composición del portador utilizado. Normalmente este está compuesto por una disolución reguladora de pH y una determinada cantidad de disolvente orgánico miscible en medios acuosos para ajustar la polaridad del portador. En este caso específico el pH, estudiado entre 2 y 6, no fue relevante para la elución de los analitos sometidos a estudio porque no presentaban propiedades dependientes del pH, esto es, no tienen carácter ácido-base. Como portadores se ensayaron diferentes mezclas hidroalcohólicas, obteniendo los mejores resultados con mezclas ACN:H₂O y MeOH:H₂O.

En la Figura 4.1 podemos ver la variación del tiempo de retención de los analitos en función de la composición del portador. En todos los casos los valores representados son el tiempo de retención medio resultado de medidas por triplicado, mientras que las barras de error representan el ancho de banda del pico, esto es, el tiempo que pasa desde que aparece el pico hasta que la señal retorna a la línea base. Los patrones se inyectaron siempre en las mismas condiciones que el portador para evitar distorsiones de la línea base. El tiempo de retención de los analitos estaba de acuerdo con sus polaridades ($PG > BA > BT$). Sin embargo, a pesar de que se separaban, las diferencias de polaridad entre ellos hacía imposible la obtención de buenas resoluciones en tiempos razonables.

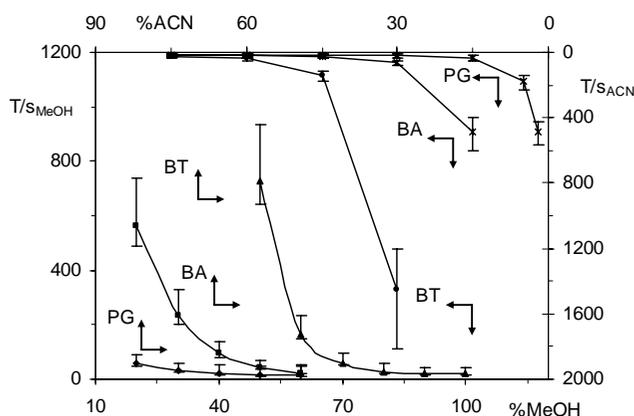


Figura 4.2: Variación del tiempo de retención con el porcentaje de metanol o de acetonitrilo del portador. Las flechas indican en que ejes deben leerse las gráficas

Para solventar ese problema se ensayaron mezclas ternarias de ACN, MeOH y H₂O, fijando la cantidad de uno de ellos (metanol) y variando la de los otros dos, obteniendo los resultados mostrados en la Figura 4.3. De los resultados representados en la Figura 4.2 seleccionamos 30 % de metanol como porcentaje máximo para las mezclas ternarias con el objetivo de evitar solapamientos entre los picos, y variamos la composición de ACN entre 10 y 70 %, mientras que el resto hasta 100 % era agua. Los patrones inyectados se prepararon siempre con la misma composición que los portadores a estudiar. Se observó que cuando la cantidad de agua era superior al 60 %, los analitos empezaban a precipitar. En la Figura 4.3A puede observarse que cuando la cantidad de ACN es 20 % la resolución entre PG y BA disminuía por debajo de 1,5, superponiéndose los picos. Por lo tanto, no podíamos

usar mayores cantidades de ACN. Por debajo del 20 % de ACN ya no había superposición, pero los tiempos de análisis superaban los 1000 s.

También se ensayó con menor cantidad de metanol (10 %) como puede verse en la Figura 4.3B. Con esta cantidad de metanol se fue variando el porcentaje de ACN entre 60 y 90 %, ya que la cantidad máxima de agua no podía pasar del 30 % para evitar precipitaciones. En este caso, a mayores concentraciones de ACN del 70 % disminuía la resolución entre PG y BA por debajo de 1,5, siendo el tiempo de análisis superior a 900 s, y por debajo, ocurría que el tiempo de análisis era mucho mayor. Como conclusión, podemos decir que no era posible la separación completa de todos los analitos con tiempos de análisis pequeños.

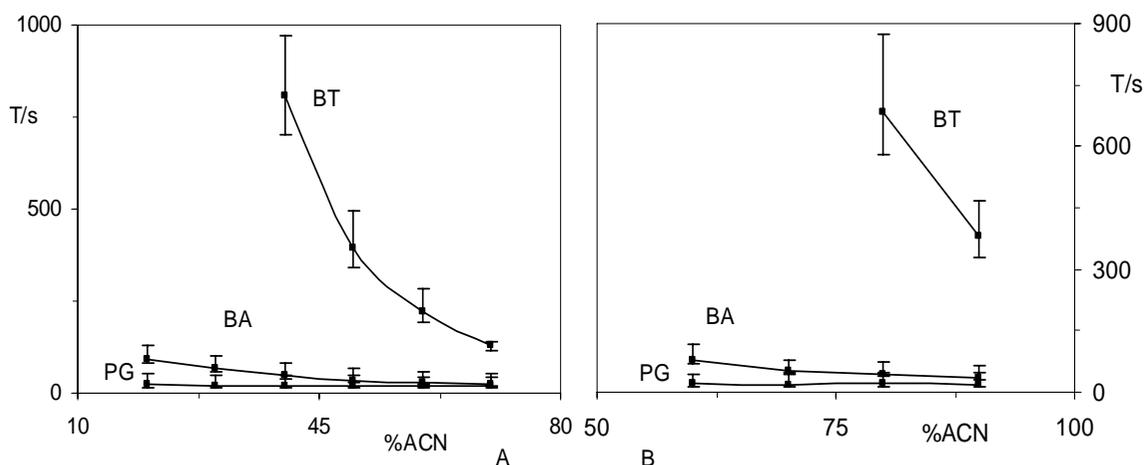


Figura 4.3: Dependencia del tiempo de retención con la composición ternaria del portador. A) 30 % de metanol. B) 10 % de metanol.

Para conseguir separaciones completas en tiempos de análisis razonables, decidimos cambiar la composición del portador durante la medida, aunque no de forma gradual tipo gradiente de elución, sino mediante un cambio de un portador a otro con menor polaridad con el uso de una válvula de inyección, que actuaba como válvula de selección de portador. De acuerdo con los resultados obtenidos en el estudio de las mezclas binarias (Figura 2.1), se dedujo que los dos analitos más polares, PG y BA, podían separarse obteniendo una resolución mayor de 1,5 usando mezclas hidroalcohólicas, siempre por debajo del 45 % de MeOH. Seleccionamos 42 % de MeOH como

portador A, tras estudiar más detenidamente entre el 40 y el 45 %, porque es el mayor porcentaje, y por lo tanto con el que menor tiempo de análisis, que permitía la separación completa de PG y BA. La composición del portador B necesaria para la elución del analito más apolar (BT) fue otra mezcla hidroalcohólica con el objetivo de minimizar la alteración producida, en la línea base, como consecuencia del cambio de portador durante la medida.

Además de la composición del portador B era necesario seleccionar un tiempo de cambio (TC) del portador A al B, siendo necesario optimizar ambos parámetros al mismo tiempo porque estaban relacionados. En la Figura 4.4 podemos ver el tiempo de retención de los tres analitos al variar el porcentaje de metanol del portador B con un tiempo de cambio de 80 s. Inicialmente se seleccionó un tiempo de cambio de 80 s porque en esas condiciones era el tiempo necesario para que BA fuera eluido de la columna.

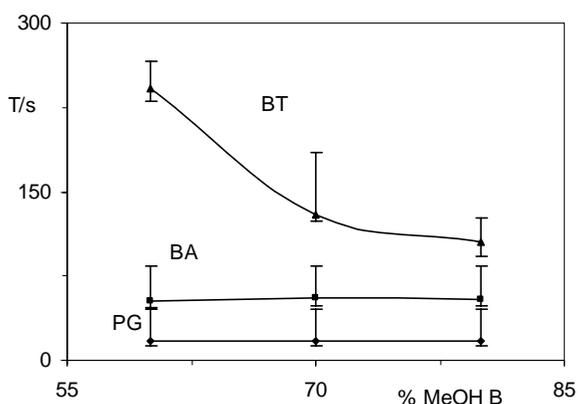


Figura 4.4: Variación del tiempo de retención con la composición del portador B con un tiempo de cambio de 80 s.

A primera vista parece que la composición adecuada para el portador B es 80 % de metanol, pero no es así ya que, como se ha indicado anteriormente, el cambio de portador producía una distorsión en la línea base, similar a un pico fantasma. Esta distorsión solapaba fuertemente con la señal de BT si se seleccionaba el 80 % de metanol. Por ese motivo se seleccionó 70 % de MeOH como composición óptima del portador B.

El efecto que la variación del tiempo de cambio producía fue estudiado variándolo entre 19 y 80 s (Figura 4.5). La alteración de la línea base, con tiempos de cambio pequeños, afectaba incluso a

las señales de BA o a PG. Por otro lado, tiempos de cambio grandes incrementaban el tiempo de análisis. Al final seleccionamos 30 s como tiempo de cambio óptimo porque de esta forma la distorsión de la línea base aparecía justo después de la señal de BA y antes, como era de esperar, que la de BT.

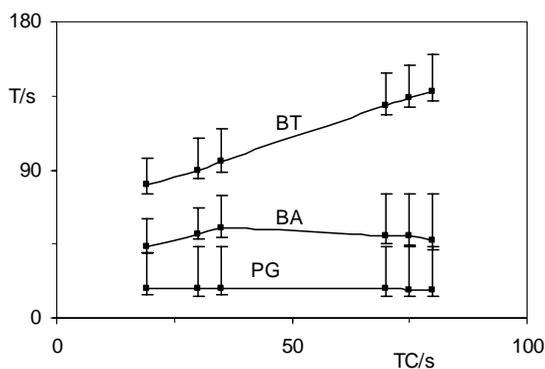


Figura 4.5: Dependencia del tiempo de cambio (TC) entre portadores en el tiempo de retención.

3.1.2. Variables FIA

Las variables FIA estudiadas fueron la velocidad de flujo y el volumen de bucle. La velocidad de flujo se estudió entre 1,3 y 2,4 mL·min⁻¹, ya que caudales mayores eran difíciles de alcanzar. No usamos caudales menores porque uno de los objetivos buscados era minimizar el tiempo de análisis, haciendo así el método lo más rápido posible. Debido a la inclusión de la columna monolítica en el sistema, la presión del mismo aumentaba, aunque no demasiado, cosa que se puso de manifiesto al comprobar que la velocidad de flujo con y sin columna era prácticamente la misma. Como cabía esperar, el tiempo de retención de los analitos disminuía cuando aumentaba el caudal (Figura 4.5). Además, el área disminuía (16,5 % para BT, 16,2 % para BA y 15,8 para PG), la altura de pico apenas se vio modificada (+6,5 % para BT, -6,4 % para BA y +1,1 % para PG), el ancho de banda a media altura disminuía (13,8 % para BT, 22,9 % para BA y 11,0 % para PG) y, por otra parte, el factor de asimetría permanecía prácticamente constante. Así, el caudal seleccionado fue 2,4 mL·min⁻¹ porque el tiempo de análisis obtenido era el más pequeño (solo 85 s).

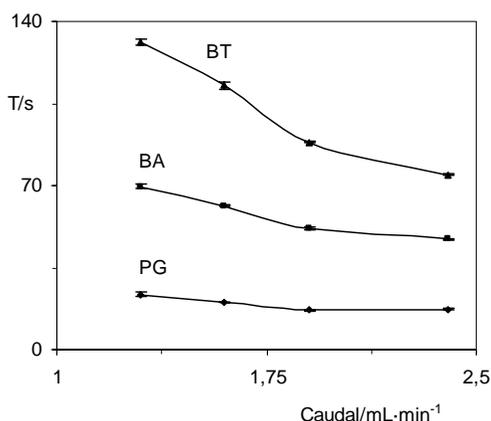


Figura 4.6: Influencia del caudal sobre el tiempo de retención.

Al aumentar el volumen de muestra, entre 10 y 250 μL , como cabe esperar, aumentaba la señal analítica para todos los antioxidantes como resultado de la mayor cantidad de analito en el sistema de flujo. El tiempo de retención experimentaba un ligero aumento cuando se incrementaba el volumen de bucle (3,1 % para BT, 5,0 % para BA y 1,2 % para PG). El área de pico aumentaba un 8,3 % para BT, 14,9 % para BA y 20,1 % para PG, mientras que la altura de pico un 11,6 % para BT, 13,3 % para BA y 18,2 % para PG. El ancho de banda prácticamente no se veía afectado (aumentaba 1,9 % para BT, 8,1 % para BA y 3,6 % para PG), y el factor de asimetría crecía (14,8 % para BT, 29,7 % para BA y 4,7 % para PG). Así, se seleccionó un volumen de bucle óptimo de 50 μL porque era el mayor volumen, y por tanto con el que se obtenía mayor señal analítica, que no reducía la simetría de los picos, con tiempos de retención no demasiado elevados.

3.2. Características analíticas

Como señal analítica, en este caso, se podía elegir la altura o el área de pico. Seleccionamos el área porque ofrecía mejores características analíticas (Tabla 4.1). Para PG, el calibrado fue lineal desde 2,77 hasta 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para BA desde 1,51 hasta 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y para BT desde 1,65 hasta 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ cuando los datos fueron obtenidos a sus longitudes de onda óptimas (Figura 4.7).

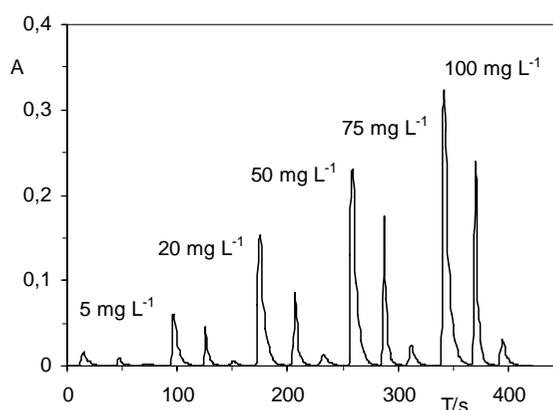


Figura 4.7: Diagrama típico a 5 niveles de concentración para PG, BA y BT en las condiciones del Procedimiento Básico.

Tabla 4.1. Parámetros analíticos para el método de flujo para PG-BA-BT

Parámetro	Unidades	Altura de pico			Área de pico		
		PG	BA	BT	PG	BA	BT
		273 nm	288 nm	279 nm	273 nm	288 nm	279 nm
b	mL · μg ⁻¹	2,71 · 10 ⁻³	1,42 · 10 ⁻³	3,72 · 10 ⁻⁴	20,56	7,91	7,17
S _b	mL · μg ⁻¹	2,90 · 10 ⁻⁵	3,84 · 10 ⁻⁵	5,16 · 10 ⁻⁶	0,17	0,05	0,07
a	-----	9,69 · 10 ⁻³	4,47 · 10 ⁻³	3,21 · 10 ⁻⁴	-58,79	-9,28	1,69
S _a	-----	3,38 · 10 ⁻³	3,38 · 10 ⁻³	2,14 · 10 ⁻⁴	16,94	6,15	3,24
R ²	%	99,56	97,37	99,71	99,78	99,84	99,81
Valor P	%	9,70	6,82	10,81	42,20	49,74	15,98
RDL	μg mL ⁻¹	3,42-300	4,52-300	4,80-100	2,77-300	1,51-300	1,65-100
LD	μg mL ⁻¹	0,51	0,71	1,65	0,005	0,05	0,0005
LC	μg mL ⁻¹	3,42	4,52	4,80	2,77	1,51	1,65
DER	%	3,81	2,96	2,53	2,84	2,70	2,22

b: pendiente; S_b : desviación estándar de la pendiente; a: ordenada en el origen; S_a : desviación estándar de la ordenada en el origen; r: coeficiente de correlación; VP: nivel de probabilidad del test de fallo de ajuste; RDL: rango dinámico lineal; LD: límite de detección; LC: límite de cuantificación; DER: desviación estándar relativa

El cálculo de las características analíticas se llevó a cabo mediante regresión lineal por mínimos cuadrados, aplicando el test de fallo de ajuste (con tres réplicas de cada patrón y a diez niveles de concentración distintos). La desviación estándar de la línea base obtenida a partir de medidas del blanco, necesaria para estimar el límite de detección (K=3) y de cuantificación (K=10) de

la IUPAC¹⁸, fue obtenida como promedio de diez determinaciones y denotada como DER en la Tabla 4.1. En ésta tabla podemos ver los parámetros analíticos calculados para este procedimiento. La frecuencia de muestreo fue de 36 h⁻¹.

El método propuesto mostró resultados satisfactorios para la cuantificación de cada antioxidante en presencia de diferentes proporciones de los antioxidantes que coexistían con él. Así, para comprobar la independencia de las señales, se ensayaron once mezclas de antioxidantes en proporciones entre 1:100 y 100:1 a niveles entre 3 y 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para PG y entre 1,5 y 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para BA y BT.

3.3. Aplicaciones analíticas

El método de flujo propuesto se aplicó a la determinación de antioxidantes en muestras comerciales de alimentos (caldos concentrados de pollo, sopas deshidratadas y chicle) y cosméticos (aceite corporal), obtenidos de diferentes supermercados de Granada. Estos productos comerciales contenían en todos los casos un máximo de dos antioxidantes de los tres sometidos a estudio. Se seleccionaron las muestras de forma que tuviéramos todas las mezclas binarias posibles de los tres antioxidantes. Para ensayar el método decidimos fortificar una de las muestras (caldo concentrado de pollo) con el antioxidante que le faltaba (BT).

De los métodos de extracción de antioxidantes propuestos en bibliografía seleccionamos el indicado por Perrin y Meyer³, con las pequeñas modificaciones indicadas en el apartado Tratamiento de Muestras. A través de la adición de cantidades conocidas de antioxidantes a las muestras, conseguimos demostrar que los procesos de extracción usados proporcionaban resultados cuantitativos, obteniendo recuperaciones entre 95,4 % y 98,2 % para PG, entre 96,0 % y 98,4 % para BA y entre 95,2 % y 96,5 % para BT (usando área en todos los casos). En la Tabla 4.2 mostramos los resultados obtenidos con el método propuesto y con el de referencia (HPLC)³. En la tabla se incluyen los valores medios de tres determinaciones para cada muestra, la desviación estándar de las medidas y el valor P de probabilidad del test usado para comparar los resultados obtenidos por ambos

métodos. Como puede apreciarse, los resultados de ambos métodos fueron significativamente similares.

El método propuesto muestra algunas ventajas sobre los métodos HPLC usuales como son: instrumentación muy simple, rápida y barata, obteniendo resultados de precisión similar. La desventaja principal es el poder de resolución, menor que el de los métodos HPLC, aunque es suficiente para realizar la determinación de los antioxidantes estudiados.

Tabla 4.2. Resultados obtenidos en muestras reales al aplicar el método propuesto y el de referencia

Muestra	PG / mg kg ⁻¹ ; S / %			BA / mg kg ⁻¹ ; S / %			BT / mg kg ⁻¹ ; S / %		
	Método propuesto	Método referencia	Valor P(%)	Método propuesto	Método referencia	Valor P(%)	Método propuesto	Método referencia	Valor P(%)
Aceite corporal	53,7; 0,22	54,1; 0,50	12,19	-	-	-	505,0; 0,67	504,60; 0,04	83,26
Chicle	-	-	-	24,2; 0,37	24; 1,43	35,60	139; 1,70	139; 1,30	78,43
Sopa deshidratada 1	273,3; 0,42	273,9; 0,55	65,66	143; 2,68	143; 2,52	96,80	-	-	-
Sopa deshidratada 2	263; 1,55	266,5; 0,35	18,53	257; 3,35	258; 2,51	80,66	-	-	-
Sopa deshidratada 3	11; 3,30	11; 3,01	89,20	27; 2,59	27; 2,67	97,37	-	-	-
Caldo concentrado	36; 2,70	36; 4,64	79,37	24; 3,12	24; 1,24	73,67	-	-	-
Caldo concentrado fortificado con BT*	36; 1,30	35,9; 0,23	21,45	24; 1,80	24; 1,22	51,12	197; 1,66	194,1; 0,51	10,22

* Fortificada con 200 mg kg⁻¹

4. CONCLUSIONES

El acoplamiento de pequeñas columnas monolíticas (5 mm) a técnicas FIA se muestra como una aproximación interesante para incluir una etapa de separación en los métodos de flujo de baja presión. El método FIA con la columna monolítica fue desarrollado de forma satisfactoria para la determinación de los tres antioxidantes comunes estudiados, PG, BA y BT a niveles de concentración del orden de $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ en muestras de alimentos y cosméticos, pudiendo usarse en análisis de rutina. El procedimiento estaba basado en la retención transitoria de los analitos sobre la columna monolítica de sílice C_{18} situada en línea en el sistema de flujo. El uso de las propiedades intrínsecas de los antioxidantes, como es su absorción UV, unido al acoplamiento de la columna monolítica, hizo posible la separación y determinación de estos antioxidantes con un esquema FIA muy simple, y sin necesidad de reacciones de derivación previa de los analitos.

5. BIBLIOGRAFÍA

1. Diaz, Teresa Galeano; Cabanillas, Agustina Guiberteau *Food Sci.Technol.* 2004, 138, 1577-642.
2. Sasaki, Tamao; Ogushi, Kyouko; Miyano, Takamitsu; Nakashima, Mie; Fukuda, Yutaka; Yamana, Masashi; Sueda, Yoshihiro; Yamamoto, Osamu; Matsui, Shunji; Hasegawa, Hiroyuki *Hiroshima-shi Eisei Kenkyusho Nenpo* 2003, 22, 40-43.
3. Perrin, Christian; Meyer, Liliane *Food Chem.* 2002, 77, 93-100.
4. Ruiz, M. A.; Garcia-Moreno, E.; Barbas, C.; Pingarron, J. M. *Electroanal.* 1999, 11, 470-74.
5. Riber, J.; de la Fuente, C.; Vazquez, M. D.; Tascon, M. L.; Sanchez Batanero, P. *Talanta* 2000, 52, 241-52.
6. Delgado-Zamarreno, M. M.; Gonzalez-Maza, I.; Sanchez-Perez, A.; Carabias Martinez, R. *Food Chem.* 2006, 100, 1722-27.
7. Guan, Yueqing; Chu, Qingcui; Fu, Liang; Ye, Jiannong *J.Chromatog.A* 2005, 1074, 201-04.
8. Gonzalez, M.; Ballesteros, E.; Gallego, M.; Valcarcel, M. *Anal.Chim.Acta* 1998, 359, 47-55.
9. Facino, R. Maffei; Carini, M.; Aldini, G.; Marinello, C.; Traldi, P.; Seraglia, R. *Rap.Commun.Mass Spec.* 1997, 11, 1329-34.
10. Ni, Y.; Wang, L.; Kokot, S. *Anal.Chim.Acta* 2000, 412, 185-93.
11. Ceballos, Claudio; Fernandez, Hector *Food Res.Intern.* 2000, 33, 357-65.
12. Galeano Diaz, T.; Guiberteau Cabanillas, A.; Alexandre Franco, M. F.; Salinas, F.; Vire, J. C. *Electroanal.* 1998, 10, 497-505.
13. Paz Aguilar-Caballos, Maria; Gomez-Hens, Agustina; Perez-Bendito, Dolores *J.Agric.Food Chem.* 2000, 48, 312-17.
14. Capitán-Vallvey, L. F.; Valencia Miron, M. C.; Arana Nicolas, E. *J.Food Sci.* 2003, 68, 1595-99.
15. Capitán-Vallvey, L. F.; Valencia Miron, M. C.; Arana Nicolas, E. *Anal.Chim.Acta* 2004, 503, 179-86.
16. Capitán-Vallvey, L. F., Valencia Miron, M. C., and Gutiérrez del Moral, G. Método de control electromecánico de válvulas rotatorias para la inserción y mezcla de fluidos. Universidad de Granada. Patente ES2079308. 1996.

17. Pelletier, Sarah; Lucy, Charles A. *J.Chromatog.A* 2006, 1118, 12-18.
18. Analytical Methods Committee *Analyst* 1988, 113, 1469.

CAPITULO 5

MÉTODO FIA MULTIANALITO PARA EL ANÁLISIS DE PARABENES

MÉTODO FIA MULTIANALITO PARA EL ANÁLISIS DE PARABENES

1. INTRODUCCIÓN

Los parabenos, o alquil ésteres del ácido p-hidroxibenzóico, se han utilizado como conservantes antimicrobianos en alimentos, bebidas, cosméticos y fármacos desde hace muchos años¹ a causa de su efectiva actividad antibacteriana y anti hongos, siendo la mezcla formada por metilparaben (MP) y propilparaben (PP) la más usada, ya que juntos poseen un efecto sinérgico². Las actividades antimicrobianas de los parabenos aumentan con la longitud de la cadena alquílica del ester, pero al mismo tiempo cuanto mayor es esa cadena menor es su uso debido a su menor solubilidad en medios acuosos.

Su presencia en cosméticos, sobre todo para aquellos consumidores que los usan a diario y en grandes cantidades, puede inducir al desarrollo de una dermatitis alérgica^{3,4}. Por ello, su uso está regulado por la Union Europea en la Cosmetic Directive 76/768/EEC para cantidades hasta una

concentración máxima de 0,4 % en el producto final para un éster y hasta 0,8 % para mezclas de ésteres ⁵.

En este Capítulo queremos incrementar el número de analitos a separar, con respecto al Capítulo anterior, empleando la misma columna para ver su poder resolutivo. El objetivo principal de este estudio es abordar la resolución de cuatro parabenos mediante una columna monolítica apolar acoplada al sistema FIA midiendo una propiedad intrínseca de estos compuestos sin reacciones de derivación previa. Se han elegido cuatro parabenos, en concreto, metilparaben, etilparaben, propilparaben y butilparaben, que son frecuentemente utilizados como conservantes en cosméticos. El segundo objetivo es caracterizar y validar el procedimiento propuesto mediante su comparación con un método HPLC de referencia, y su aplicación a muestras cosméticas comerciales.

En cuanto a su determinación, los procedimientos más comunes para parabenos se basan en HPLC ^{1:6-8}, aunque también se han empleado otras técnicas, como electroforesis⁹ o análisis por inyección en flujo (FIA)¹⁰.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Reactivos y materiales

Todas las sustancias químicas que se han usado en éste trabajo han sido de calidad analítica, y el agua empleada para preparar las disoluciones acuosas ha sido la misma que se ha descrito en capítulos anteriores.

Las disoluciones madre de patrón de analito se prepararon por separado, con una concentración de $1,6 \cdot 10^{-2}$ M para cada analito (MP (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid) y EP, PP y BP (Fluka, Madrid, 99 %)) por disolución de la cantidad adecuada, exactamente pesada, en acetonitrilo (ACN) (Panreac Química S.A, Barcelona, 99.9 % v/v grado HPLC). Estas disoluciones eran fotométricamente estables al menos durante dos meses cuando se guardaban en botellas oscuras en un frigorífico a 4 °C. Para preparar las disoluciones de trabajo se diluyeron las disoluciones madre con

agua, ajustando siempre a las mismas condiciones que el portador (12 % ACN en agua) para evitar distorsiones en la línea base al inyectar.

Como columna se usó una precolumna Chromolith RP-18 (5 mm de longitud y 4,6 mm de diámetro interno) con su carcasa (ambos de Merck, Darmstadt, Alemania).

Como disoluciones portadoras se usaron mezclas metanol/agua y acetonitrilo/agua en diferentes proporciones. Todas las disoluciones fueron filtradas a través de filtros de 0,45 μm GH Polypore (Pall Corporation, Nueva York, EE.UU.) antes de usarlas.

2.2. Instrumentación y software

Toda la instrumentación empleada fue la misma que se describió en el Capítulo 2, a excepción del tipo de conexión entre el espectrofotómetro y el PC, que fue vía LAN.

El sistema FIA difería ligeramente con respecto al del Capítulo 2 ya que consistía en una bomba peristáltica Gilson Minipuls-2 de cuatro canales trabajando a velocidad constante pero con dos válvulas de inyección rotatoria de teflón de seis vías Rheodyne 5041 controladas electromecánicamente¹¹, una usada como válvula de inyección y la otra habilitada como válvula de selección de portador, y con dos portadores. A la salida de la válvula de inyección se le conectó el soporte que contenía la columna monolítica mediante conectores estándar. Como conexiones de flujo se usaron tubos de PTFE (Omnifit, Cambridge, Inglaterra) (0,8 mm diámetro interno y 1,6 mm diámetro externo) lo más cortos posibles para minimizar el efecto de ensanchamiento de banda de los picos.

Por último, el software utilizado también fue el mismo que se detalló en el Capítulo 2.

2.3. Métodos y procedimientos

2.3.1. Procedimiento básico

La disolución de muestra (50 μL) conteniendo la mezcla de MP, EP, EP y PP con una concentración dentro del rango dinámico lineal para cada analito, es inyectada en el sistema de flujo en las mismas condiciones que el portador a una velocidad de flujo de $2,6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. La composición del portador se cambia, a través de una válvula de selección de portador, desde el valor inicial, 12 % ACN:H₂O v/v (portador A) hasta un 27 % ACN:H₂O v/v (portador B), 75 segundos después de abrir la válvula de inyección. El orden de elución de los analitos es el que cabe esperar atendiendo a sus polaridades: MP (29 s), EP (65 s), PP (104 s) y BP (125 s), todos ellos medidos a 254 nm. Una vez que el último analito, el más apolar, es eluido de la columna, lo que ocurre 150 s después de abrir la válvula de inyección, el sistema de flujo se vuelve a acondicionar de nuevo con el portador A durante 30 s. Tanto la altura como el área de pico pueden usarse como parámetro analítico, pero nosotros seleccionamos área porque con ella se obtienen mejores características analíticas. La relación entre área de pico y concentración se establece mediante regresión por mínimos cuadrados con patrones de los analitos. Las muestras se inyectan siempre por triplicado, utilizando el área de pico como parámetro analítico.

2.3.2. Método de referencia

Se usó una adaptación del método propuesto por Borremans y colaboradores⁶ como método de referencia para validar el propuesto. Como fase estacionaria se empleó una columna Zorbax de sílice C₈ con partículas de 5 μm y de dimensiones 150 x 4,6 mm. La disolución portadora en modo isocrático se compuso de una mezcla H₂O:ACN:MeOH:THF (60:25:10:5) a una velocidad constante de flujo de $1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Los cromatogramas se obtuvieron a una longitud de onda de 254 nm. Para establecer las funciones de calibrado se analizaron cinco niveles de concentración distintos con tres réplicas cada uno de disoluciones patrón, usando el área de pico como parámetro analítico relacionado con la concentración mediante regresión lineal.

2.3.3. Tratamiento de muestras

Para certificar la veracidad del método propuesto, se aplicó al análisis de parabenos en muestras de cosméticos (espuma de cabello, toallitas limpiadoras y gel limpiador), comparando los resultados obtenidos con los del método de referencia.

Antes de analizar las muestras con el procedimiento propuesto, comprobamos la presencia de los analitos buscados en la etiqueta de los productos y comparando los tiempos de retención obtenidos en HPLC con los de los patrones de los analitos. Las muestras fueron adquiridas en supermercados de la ciudad de Granada.

Para analizar la espuma de cabello, la cantidad adecuada de producto (normalmente 15 g) fue pesada con exactitud dentro de un embudo de decantación. Se le añadieron 1 mL de HCl 1:1 y 10 mL de una disolución saturada de NaCl. Se extrajo tres veces con 50 mL de éter dietílico durante 10 minutos. Los tres extractos se combinaron y la disolución resultante se limpió con NaCl saturado, para secarla después con 10 g de Na_2SO_4 . A continuación se filtró, se evaporó hasta sequedad y luego se disolvió y enrasó con ACN hasta 50 mL¹⁰.

Para el análisis de las toallitas limpiadoras se usó una adaptación del método propuesto por Saas¹². Una cantidad adecuada (normalmente 3 g) se pesó con exactitud, y se troceó para mejorar la superficie de contacto con el disolvente. Acto seguido se le agregaron 25 mL de ACN y se depositó en un baño de ultrasonidos durante 30 minutos a 50°C. La mezcla fue filtrada después a través de filtros de 0,45 μm . Por último, la disolución se evaporó hasta sequedad y se disolvió con 10 mL de ACN.

Para el análisis del gel limpiador, la cantidad adecuada (normalmente 1 g) se pesó con exactitud, y se diluyó con 5 mL de MeOH. La disolución resultante se sometió a un baño de ultrasonidos durante 10 minutos y se filtró a través de filtros de 0,45 μm ⁷. Una cantidad adecuada de la disolución resultante se diluyó hasta 10 mL y se inyectó para su análisis

Por último, se aplicó el procedimiento básico a las muestras. Todas ellas se analizaron por triplicado, usando el valor medio del área de pico como parámetro analítico.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los parabenos son especies absorbentes en la región ultravioleta. Por ello, decidimos usar esta propiedad intrínseca de los mismos como parámetro de medida. Debido a que la estructura absorbente es idéntica y solo difieren en un grupo metileno, los parabenos tienen el mismo espectro de absorción, variando solo los coeficientes de absortividad molar. Presentan dos máximos: uno a 209 nm (ϵ : $1,471 \cdot 10^4$ L·mol⁻¹·cm⁻¹ para MP, ϵ : $1,443 \cdot 10^4$ L·mol⁻¹·cm⁻¹ para EP, ϵ : $1,354 \cdot 10^4$ L·mol⁻¹·cm⁻¹ para PP y ϵ : $1,133 \cdot 10^4$ L·mol⁻¹·cm⁻¹ para BP) y otro a 254 nm (ϵ : $1,572 \cdot 10^4$ L·mol⁻¹·cm⁻¹ para MP, ϵ : $1,556 \cdot 10^4$ L·mol⁻¹·cm⁻¹ para EP, ϵ : $1,503 \cdot 10^4$ L·mol⁻¹·cm⁻¹ para PP y ϵ : $1,231 \cdot 10^4$ L·mol⁻¹·cm⁻¹ para MP) en ACN. Por ello, para medirlos en el sistema de flujo necesitamos un sistema de separación acoplado al mismo.

3.1. Variables

Como columna monolítica seleccionamos una precolumna comercial Chromolith RP-18 (de 5 mm de longitud y 4,6 mm de diámetro). Usando esta minicolumna se pueden solventar los problemas derivados del uso de sistemas de bombeo de baja presión. Además, la presión de trabajo se minimizó usando tuberías de 0,8 mm de diámetro interno, incluso trabajando a caudales altos (2,6 mL·min⁻¹).

3.1.1. Optimización del portador

Como ya se comentó en el Capítulo anterior, la composición del portador es crítica para la separación, siendo los componentes principales, con este tipo de columnas, un tampón para regular el pH de la disolución portadora y una determinada cantidad de disolvente orgánico para regular la polaridad de la misma. El pH estudiado en este caso fue el comprendido entre 2 y 6, debido a las propias características de la columna empleada. Como cabía esperar, no se encontraron

dependencias entre la separación de los parabenos estudiados y el pH del portador, pues estas especies no presentaban propiedades dependientes del pH. Por ello, el factor principal era polaridad regulada por la proporción de disolvente orgánico en el portador. Para estudiar el comportamiento de los parabenos se ensayaron diversos disolventes orgánicos, obteniendo los mejores resultados con mezclas de ACN:H₂O y MeOH:H₂O. Los resultados obtenidos se pueden apreciar en la Figura 5.1.

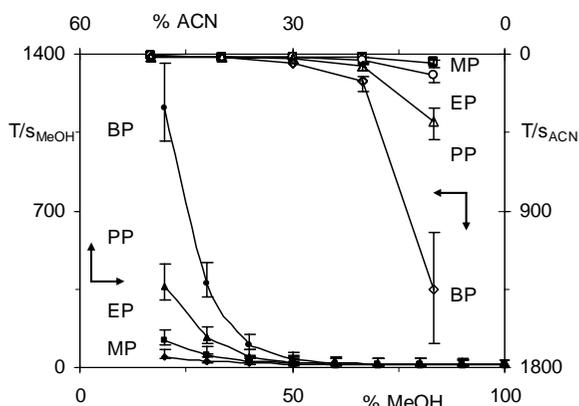


Figura 5.1: Variación del tiempo de retención con el porcentaje de metanol o de acetonitrilo del portador. Las flechas indican en que ejes deben leerse las gráficas

Los valores representados fueron en todos los casos los valores medios de tres determinaciones, incluyendo el tiempo de aparición y el tiempo en el que la señal regresa a la línea base (expresados en el gráfico como barras de error, pero representando realmente el ancho de banda de los picos). Como cabía esperar, el orden de elución de los analitos estaba de acuerdo con su polaridad: MP<EP<PP<BP (cuanto mayor es el número de grupos metileno, menor es su polaridad, y por tanto, mayor su tiempo de retención). Comparando ambos disolventes, MeOH y ACN, nos decidimos por ACN porque con menor cantidad del mismo podíamos conseguir el mismo efecto que MeOH, reduciendo así el consumo de reactivos. Esto no solo era una ventaja desde el punto de vista medioambiental, sino también desde el económico.

Como puede verse en la Figura 5.1, la resolución de los cuatro parabenos seleccionados podía llevarse a cabo en modo isocrático (12 % ACN), pero el tiempo de análisis se eleva en exceso (más de

900 s). La primera solución ensayada fue aumentar el caudal de trabajo. Estudiamos seis niveles de caudal entre 1,5 y 3,0 mL min⁻¹.

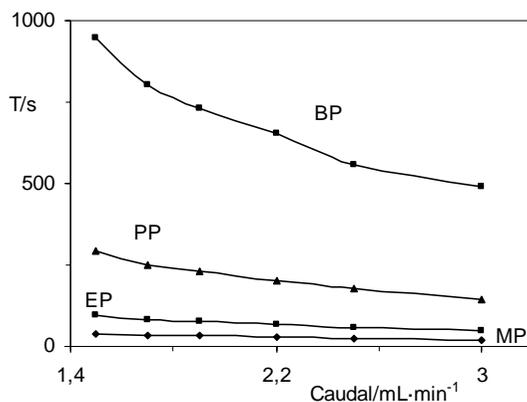


Figura 5.2: Dependencia del tiempo de retención con la velocidad de flujo.

Como puede apreciarse, incluso trabajando con el mayor caudal posible, el tiempo de análisis seguía siendo demasiado elevado (600 s), aunque la resolución entre los analitos era independiente del caudal, como es normal cuando se trabaja con columnas monolíticas. El caudal seleccionado no fue el mayor ensayado, ya que el sistema de flujo se veía demasiado forzado trabajando a 3,0 mL min⁻¹, deteriorándose muy pronto las gomas de la bomba peristáltica. Por ello, se seleccionó uno menor, 2,6 mL min⁻¹, pero que es el máximo que permitía sistema para trabajar en condiciones adecuadas.

Con el objetivo de disminuir el tiempo de análisis, decidimos acelerar la elución de los analitos menos polares disminuyendo la polaridad del portador, es decir, aumentando la proporción de disolvente orgánico. El portador B seleccionado fue otra disolución de ACN en agua con el objetivo de minimizar en lo posible los efectos de distorsión de la línea base como consecuencia del cambio de portador en mitad del análisis. Esta disminución de la polaridad del portador la hicimos a través de un cambio de portador mediante una válvula de inyección habilitada como válvula de selección. El cambio no fue gradual, tipo gradiente de elución como en HPLC, sino un cambio directo entre ambos portadores. De acuerdo con los resultados mostrados en la Figura 5.1, el portador A debía tener una proporción de ACN cercana al 10 %. Por ello, estudiamos esa región más detenidamente, encontrando

que con un 12 % de ACN en el portador A podíamos separar los dos primeros parabenos de la serie, MP y EP, con una resolución superior a 1,5. En consecuencia, se fijó la composición del portador A en 12 % de ACN. La composición del portador B debía ajustarse al mismo tiempo que otra variable importante: el tiempo de cambio (TC) entre ambos portadores. En las condiciones en las que estábamos trabajando hasta el momento, es decir, caudal de $2,6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ y 12 % ACN como portador A, EP necesitaba 80 s para eluirse por completo de la columna. Seleccionamos como TC 75 s porque el portador B tardaba unos 5 s en llegar a la célula de detección. De esta manera, la alteración de la línea base, similar a los picos fantasma asociados a las eluciones en gradiente de HPLC, aparecía justo entre las señales de EP y PP.

Una vez seleccionado el TC, debíamos seleccionar la composición del portador B. Estudiamos un rango de concentraciones comprendido entre 15 y 30 % de ACN.

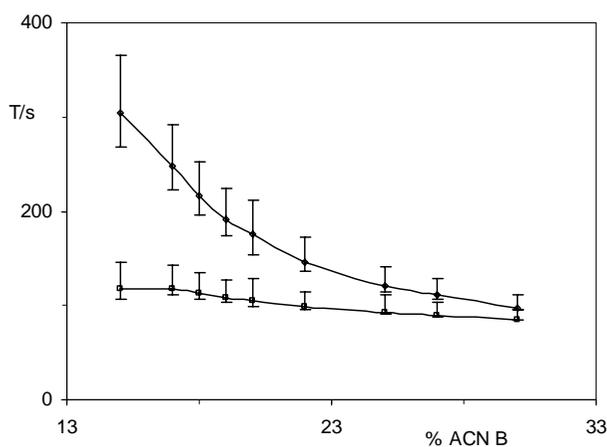


Figura 5.3: Variación de los tiempos de retención en función del porcentaje de ACN en el portador B.

A primera vista puede parecer que la composición óptima para el portador B era 30 %, pero la alteración de la línea base originada solapaba fuertemente con la señal de PP. Por ello, utilizamos un porcentaje menor, 27 % de ACN, para evitar que la distorsión interfiriera en la medida de algún pico. De esta forma, trabajando en estas condiciones, conseguíamos separar los cuatro parabenos con una resolución mayor de 1,5 y con un tiempo de análisis total de solo 150 s.

Para estudiar de qué forma podría influenciar la fuerza iónica del medio, añadimos distintas cantidades de NaCl al portador, a seis niveles entre 0 y 0,25 M. Como cabía esperar, no se observó ninguna variación significativa en el comportamiento de los analitos al variar la fuerza iónica, ya que las especies estudiadas no poseían propiedades especialmente dependientes de la fuerza iónica, y por ende, los mecanismos de interacción entre ellos y la columna tampoco. Sin embargo, existían pequeñas variaciones en la altura de pico: para MP, PP y BP la altura de pico aumentaba un 2,1 %, un 7,6 % y un 7,6 %, respectivamente, y para EP disminuía un 5,1 %.

También se estudió la influencia de pequeñas adiciones de modificadores orgánicos, como trietilamina o ácido acético, al portador, pero no se encontraron mejoras apreciables en la simetría de los picos analíticos.

3.1.2. Variables FIA

Las variables de flujo estudiadas fueron el caudal, mencionado y optimizado anteriormente (ver Figura 5.2) y el volumen de bucle. El volumen de bucle estudiado estuvo comprendido entre 20 y 315 μL , a siete niveles. Como cabía esperar, cuando el volumen de bucle aumentaba el tiempo de retención también aumentaba (34,4 % para MP, 22,5 % para EP, 52,9 % para PP y 47,7 % para BP), así como la altura de pico (73,4 % para MP, 177,4 % para EP, 267,0 % para PP y 282,0 % para BP), el área (397,1 % para MP, 415,5 % para EP, 429,3 % para PP y 427,6 % para BP), el ancho de banda (193,3 % para MP, 108,0 % para EP, 42,9 % para PP y 39,1 % para BP) y el tiempo de análisis (44,4 %). Tuvimos que aceptar una solución de compromiso entre todas estas variables, ya que cuanto mayor fuera el volumen de bucle, mayor sería la señal analítica, pero también lo sería el tiempo de análisis y el ancho de banda. En este caso, el factor principal para decidir cual era el volumen de bucle adecuado fue el ancho de banda, aunque el tiempo de análisis y la señal analítica también eran importantes.

Si seleccionábamos un volumen de bucle mayor de 150 μL , el ancho de banda era demasiado grande, resultando en un solapamiento entre los picos. Al final, se seleccionó 50 μL como tamaño de

bucle adecuado porque era el máximo volumen, y por tanto, se obtenía la máxima señal, con el que obteníamos valores aceptables para tiempo de análisis y ancho de banda.

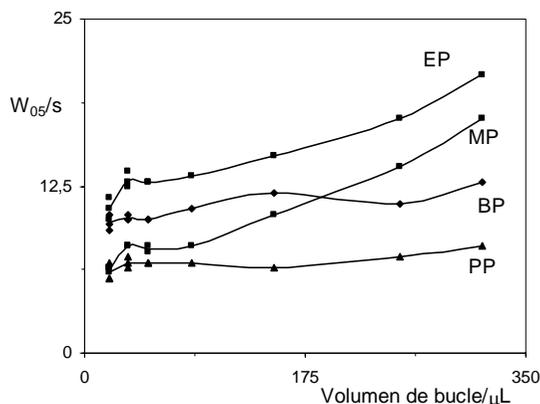


Figura 5.4: Variación del ancho de banda con el tamaño de bucle.

3.2. Características analíticas

Debido a que la separación de los analitos era completa, se podía usar como parámetro analítico tanto el área como la altura. Sin embargo, existía una peculiaridad en la señal de PP debido a que la alteración que sufría la línea base aparecía justo antes que la señal de PP, solapando un poco con ella. En principio, podría pensarse que solo se podría medir PP en altura, pero usando área, los parámetros analíticos eran mejores que usando altura de pico. Esto era debido a que la contribución a la señal analítica de la alteración de la línea base era baja y constante, siendo casi despreciable cuando se trabajaba con los niveles de concentración de PP habituales. Desde el punto de vista de las características analíticas, debido a que esta contribución era constante, solo representaba una pequeña contribución en la ordenada en el origen (ver Tabla 5.1). Por ello, podíamos trabajar tanto con área como con altura de pico. Finalmente, seleccionamos área porque obteníamos mejores parámetros analíticos para el método.

Para MP el calibrado fue lineal desde $1,61 \cdot 10^{-5}$ hasta $1,07 \cdot 10^{-3}$ M, para EP desde $3,74 \cdot 10^{-5}$ hasta $1,97 \cdot 10^{-3}$ M, para PP desde $3,92 \cdot 10^{-5}$ hasta $1,97 \cdot 10^{-3}$ M y para BP desde $6,00 \cdot 10^{-5}$ hasta $1,97 \cdot 10^{-3}$ M, cuando las señales se tomaban a la longitud de onda máxima (254 nm). El ajuste de los datos analíticos se llevó a cabo mediante regresión lineal, aplicando el test de fallo de ajuste a la linealidad (a trece niveles de concentración y tres réplicas cada uno). La desviación estándar de la línea base obtenida a partir de medidas del blanco, necesaria para estimar el límite de detección ($K=3$) y de cuantificación ($K=10$) de la IUPAC¹³, fue obtenida como promedio de diez determinaciones y denotada como DER en la Tabla 5.1. En esta tabla podemos ver los parámetros analíticos para el método propuesto.

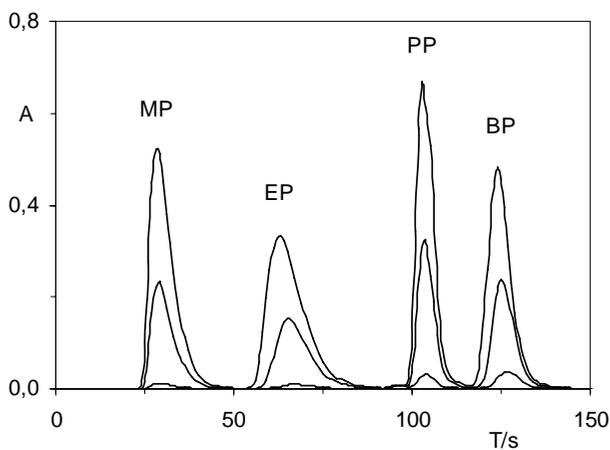


Figura 5.5: Diagrama típico a tres niveles de concentración: $3,3 \cdot 10^{-6}$ M, $2,63 \cdot 10^{-4}$ M y $6,6 \cdot 10^{-4}$ M. La pequeña distorsión de la línea base aparece justo antes de la señal de PP.

Tabla 5.1. Parámetros analíticos para el método de flujo para MP-EP-PP-BP

Parámetro	MP		EP		PP		BP	
	254 nm		254 nm		254 nm		254 nm	
	Altura	Área	Altura	Área	Altura	Área	Altura	Área
b/M ⁻¹	7,75 · 10 ²	5,94 · 10 ⁶	5,01 · 10 ²	5,71 · 10 ⁶	9,08 · 10 ²	5,45 · 10 ⁶	5,88 · 10 ²	5,78 · 10 ⁶
S _b /M ⁻¹	6,12	2,02 · 10 ⁴	6,08	2,55 · 10 ⁴	1,03 · 10 ¹	2,57 · 10 ⁴	9,05	4,04 · 10 ⁴
a	1,39 · 10 ⁻²	88,59	1,08 · 10 ⁻²	145,84	3,62 · 10 ⁻²	117,15	5,46 · 10 ⁻²	204,57
S _a	2,48 · 10 ⁻³	9,65	1,95 · 10 ⁻³	21,49	5,29 · 10 ⁻³	21,58	6,65 · 10 ⁻³	35,06
R ² /%	99,84	99,97	99,66	99,93	99,64	99,94	99,25	99,88
RDL/M	3,17 · 10 ⁻⁵	1,61 · 10 ⁻⁵	3,84 · 10 ⁻⁵	3,74 · 10 ⁻⁵	5,77 · 10 ⁻⁵	3,92 · 10 ⁻⁵	1,12 · 10 ⁻⁴	6,00 · 10 ⁻⁵
a	a	a	a	a	a	a	a	a
	8,23 · 10 ⁻⁴	1,07 · 10 ⁻³	6,58 · 10 ⁻⁴	1,97 · 10 ⁻³	1,07 · 10 ⁻³	1,97 · 10 ⁻³	1,97 · 10 ⁻³	1,97 · 10 ⁻³
LD/M	6,73 · 10 ⁻⁴	4,83 · 10 ⁻⁴	1,15 · 10 ⁻⁵	1,12 · 10 ⁻⁵	1,73 · 10 ⁻⁵	1,18 · 10 ⁻⁵	3,37 · 10 ⁻⁵	1,80 · 10 ⁻⁵
LC/M	3,17 · 10 ⁻⁵	1,61 · 10 ⁻⁵	3,84 · 10 ⁻⁵	3,74 · 10 ⁻⁵	5,77 · 10 ⁻⁵	3,92 · 10 ⁻⁵	1,12 · 10 ⁻⁴	6,00 · 10 ⁻⁵
DER/%	1,44	0,65	2,72	1,21	2,64	1,19	3,55	1,78

b: pendiente; S_b: desviación estándar de la pendiente; a: ordenada en el origen; S_a: desviación estándar de la ordenada en el origen; r: coeficiente de correlación; RDL: rango dinámico lineal; LD: límite de detección; LC: límite de cuantificación; DER: desviación estándar relativa

La frecuencia de muestreo fue de 20 h⁻¹ aproximadamente. El método propuesto mostró resultados satisfactorios para la cuantificación de cada paraben en presencia de diferentes proporciones de los parabenos coexistentes. Para verificar la independencia de señales se ensayaron nueve mezclas de parabenos en proporciones entre 1:250 y 250:1 y a niveles entre 1,61 · 10⁻⁵ M y 1,07 · 10⁻³ M para MP, entre 3,74 · 10⁻⁵ M y 1,97 · 10⁻³ M para EP, entre 3,92 · 10⁻⁵ M y 1,97 · 10⁻³ M para PP y entre 6,00 · 10⁻⁵ M y 1,97 · 10⁻³ M para BP.

3.3. Aplicaciones analíticas

El método propuesto fue aplicado a distintas muestras de cosméticos (espuma de cabello, toallitas limpiadoras y gel limpiador) comúnmente encontrados en supermercados de Granada. Algunos de estos productos comerciales contenían tres parabenos de los estudiados y otros los cuatro. Ensayamos estudios de recuperación, adicionando cantidades conocidas de parabenos a las muestras, para todas las muestras, con el objetivo de comprobar que los métodos de extracción eran válidos.

De los diferentes métodos de extracción propuestos en bibliografía para la extracción de los parabenos en muestras de productos cosméticos, seleccionamos algunos^{7;10;12} con las pequeñas

modificaciones descritas en el apartado dedicado a Tratamiento de muestras. Hemos demostrado que los procesos de extracción dieron resultados cuantitativos mediante adiciones de cantidades conocidas de parabenos a las muestras. Los experimentos de recuperación dieron unos resultados comprendidos entre 89,0 y 103,3 % para MP, entre 91,2 y 100,6 % para EP, entre 93,7 y 101,4 % para PP y entre 85,5 y 97,7 % para BP (usando área en todos los casos como parámetro analítico). La Tabla 5.2 muestra los resultados obtenidos usando el método propuesto y el método HPLC de referencia⁶. La tabla incluye los valores medios de tres réplicas para cada muestra, las desviaciones estándar de las medidas y el valor de probabilidad (valor P) resultante de la comparación entre los resultados de ambos métodos.

Como puede verse, los resultados obtenidos para ambos métodos fueron estadísticamente similares. El método propuesto presenta algunas ventajas con respecto a los métodos HPLC: su uso es mucho más sencillo, la instrumentación empleada es más rápida y barata, y la precisión es similar. Las desventajas de este método se deben a la limitada capacidad de separación debido al uso de una columna tan corta, aunque es suficiente para la determinación de estos parabenos.

Tabla 5.2. Resultados obtenidos en muestras reales al aplicar el método propuesto y el de referencia

Muestra	*MP/mg g ⁻¹ ; CV.(%)		
	Método propuesto	Método referencia	Valor P (%)
Espuma de pelo	0,5; 2,20	0,5; 3,26	92,31
Toallitas	0,7; 1,65	0,7; 1,90	23,65
Gel limpiador	0,7; 0,81	0,7; 0,06	15,04
*EP/mg g ⁻¹ ; CV.(%)			
Espuma de pelo	0,1; 2,42	0,1; 0,89	6,73
Toallitas	0,2; 1,40	0,2; 1,26	66,10
Gel limpiador	0,2; 1,09	0,2; 0,07	11,91
*PP/mg g ⁻¹ ; CV.(%)			
Espuma de pelo	0,06; 2,87	0,06; 1,92	19,67
Toallitas	0,2; 0,74	0,2; 1,01	92,35
Gel limpiador	0,2; 2,31	0,2; 0,05	72,17
*BP/mg g ⁻¹ ; CV.(%)			
Espuma de pelo	0,2; 1,06	0,2; 0,84	10,21
Toallitas	----	----	----
Gel limpiador	0,2; 4,82	0,2; 0,11	21,32

* Media de tres determinaciones ± CV. Los datos están expresados en mg de paraben por gramo de producto.

4. CONCLUSIONES

En este Capítulo hemos propuesto un nuevo método de flujo con detección espectrofotométrica para la determinación simultánea de mezclas de cuatro parabenos, MP-EP-PP-BP, en muestras de cosméticos usando una configuración FIA simple de doble canal sin la necesidad de ninguna reacción de derivación previa ya que usamos las propiedades intrínsecas de los analitos. El método se basa en la diferente retención transitoria de estos analitos sobre una minicolumna monolítica (5 mm) en fase inversa (C₁₈).

El método descrito es práctico, simple, rápido y barato y puede usarse para determinar parabenos a niveles de $\mu\text{g mL}^{-1}$ en muestras de cosméticos, pudiendo usarse en análisis de rutina. Los resultados obtenidos fueron quimiométricamente validados mediante su comparación con un método HPLC de referencia.

5. BIBLIOGRAFÍA

1. Kang, S. H.; Kim, H. *J Pharm Biomed Anal* 1997, 15, 1359-64.
2. Kreuz, Dawn M.; Howard, Angela L.; Ip, Dominic *J.Pharm.Biomed.Anal.* 1999, 19, 725-35.
3. Nettis, E.; Marcandrea, M.; Colanardi, M. C.; Paradiso, M. T.; Ferrannini, A.; Tursi, A. *Allergy* 2003, 58, 1304-07.
4. Schnuch, A.; Uter, W.; Geier, J.; Gefeller, O. *Contact Dermatitis* 2002, 47, 32-39.
5. Scientific Committee on Consumer Products. Extended Opinion on the Safety Evaluation of Parabens. SCCP/0873/05, 2005.
6. Borremans, M.; van Loco, J.; Roos, P.; Goeyens, L. *Chromatographia* 2004, 59, 47-53.
7. Zhang, Qunlin; Lian, Mei; Liu, Lijuan; Cui, Hua *Anal.Chim.Acta* 2005, 537, 31-39.
8. Hajkova, R.; Solich, P.; Pospisilova, M.; Sicha, J. *Anal.Chim.Acta* 2002, 467, 91-96.
9. Fujii, Toshiko; Kawabe, Satoko *Kawasaki J.Med.Welf.* 2001, 7, 33-41.
10. Myint, Aung; Zhang, Qunlin; Liu, Lijuan; Cui, Hua *Anal.Chim.Acta* 2004, 517, 119-24.
11. Capitán-Vallvey, L. F., Valencia Miron, M. C., and Gutiérrez del Moral, G. Método de control electromecánico de válvulas rotatorias para la inserción y mezcla de fluidos. Universidad de Granada. [ES2079308]. 1-1-1996. España.
Ref Type: Patent
12. Saad, Bahruddin; Bari, Md; Saleh, Muhammad Idiris; Ahmad, Kamarudzaman; Talib, Mohd *J.Chromatog.A* 2005, 1073, 393-97.
13. Analytical Methods Committee *Analyst* 1988, 113, 1469.

CAPÍTULO 6

DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE ADITIVOS EDULCORANTES, ANTIOXIDANTES Y CONSERVANTES

DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE ADITIVOS EDULCORANTES, ANTIOXIDANTES Y CONSERVANTES

1. INTRODUCCIÓN

Una de las tendencias actuales en la industria de los alimentos y de los cosméticos es mezclar una serie de aditivos para además de que cumplan su función específica obtener la ventaja de conseguir efectos sinérgicos entre ellos, como ocurre con los edulcorantes, los conservantes y los antioxidantes, obteniendo una mezcla compleja y difícil de analizar. En este Capítulo queremos llevar un paso más allá la aplicación de columnas monolíticas a sistemas de baja presión, resolviendo esta mezcla compleja acoplando una minicolumna monolítica a un esquema FIA y desarrollando un método versátil para la determinación de edulcorantes, antioxidantes y conservantes, ya sean juntos o por separado, aprovechando las propiedades intrínsecas de los analitos para llevar a cabo la medida. De esta forma también queremos comprobar el poder de resolución de estas columnas monolíticas acopladas a esquemas FIA. Hemos resuelto una mezcla compleja de 8 analitos usando una columna monolítica de 5 mm de longitud acoplada a un sistema FIA. Los analitos elegidos fueron: edulcorantes

(AS y AK o alternativamente SA), conservantes (MP, EP, PP y BP) y antioxidantes (PG y BA). El segundo objetivo de este capítulo es la caracterización y validación del procedimiento propuesto mediante su comparación con un método HPLC de referencia y su aplicación a muestras comerciales de alimentos y cosméticos.

En bibliografía existen algunos métodos para determinar mezclas de aditivos. Algunos usan HPLC ¹⁻³, otros electroforésis⁴ y otros electrocromatografía micelar (MEC) ⁵, pero, hasta la fecha, ninguno FIA, debido a la complejidad que presenta la resolución de este problema analítico y a la habitualmente limitada capacidad resolutoria de los métodos FIA.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Reactivos y materiales

Todas las sustancias químicas que se han usado en éste trabajo han sido de calidad analítica, y el agua empleada para preparar las disoluciones acuosas ha sido la misma que se ha descrito en capítulos anteriores.

Las disoluciones madre de patrón de analito se prepararon por separado, con una concentración de 16000,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para cada analito. Los patrones de AS, SA (ambos de Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid) y AK (Fluka, Madrid) se prepararon por disolución de la cantidad adecuada en agua. El resto de patrones, BA, EP, PP, BP (todos de Fluka, 99 %), PG y MP (ambos de Sigma-Aldrich Química S.A.), se prepararon por disolución de la cantidad adecuada, exactamente pesada, en acetonitrilo (ACN) (Panreac Química S.A, Barcelona, 99,9 % v/v grado HPLC). Estas disoluciones fueron fotométricamente estables al menos durante dos meses cuando se guardaban en botellas oscuras en un frigorífico a 4 °C. Para preparar las disoluciones de trabajo se diluyeron las disoluciones madre con agua, manteniendo siempre un 4 % v/v de ACN y 10 mM de tampón fosfato a pH 6 para evitar distorsiones en la línea base al inyectar.

Como columna se usó una precolumna Chromolith RP-18 (5 mm de longitud y 4,6 mm de diámetro interno) con su carcasa (ambos de Merck, Darmstadt, Alemania).

Como disoluciones portadoras se usaron mezclas metanol/agua y acetonitrilo/agua en diferentes proporciones. Todas las disoluciones fueron filtradas a través de filtros de 0,45 μm GH Polypro (Pall Corporation, NY, EE.UU.) antes de usarlas.

Como cartucho de extracción en fase sólida, necesario para el tratamiento de muestra, se usó un Waters Vac C-18 Sep-Pak (de Waters, Milford, MA, EE.UU.).

2.2. Instrumentación y software

Toda la instrumentación empleada fue la misma que se describió en el Capítulo 3, a excepción de la bomba. En este caso se empleó una bomba de pistón Ismatec MCP-Z Process (Ismatec S.A., Glattburgg, Suiza) con un cabezal modelo RH00 trabajando a velocidad constante. Al igual que en capítulos anteriores, se emplearon dos válvulas de inyección rotatorias de teflón de seis vías Rheodyne 5041 controladas electromecánicamente⁶, una de ellas usada como válvula de inyección y la otra habilitada como válvula de selección de portador y dos portadores. A la salida de la válvula de inyección se le conectó el soporte que contiene la columna monolítica mediante conectores estándar. Como conexiones de flujo se usaron tubos de PTFE (Omnifit, Cambridge, UK) de 0,8 mm diámetro interno y 1,6 mm diámetro externo, lo más cortos posibles para minimizar el efecto de ensanchamiento de banda de los picos.



Figura 6.1: Frontal de la bomba de pistón usada.

Por último, el software utilizado también fue el mismo que se detalló en el Capítulo 2.

2.3. Métodos y procedimientos

2.3.1. Procedimiento básico

La muestra (125 μL), que contiene la mezcla compleja de aditivos con concentraciones dentro del rango dinámico lineal (ver Tabla 6.1) para cada analito, con las mismas condiciones que el portador, es insertada en la corriente de portador (4 % ACN con 10 mM de tampón fosfato pH 6) a una velocidad de flujo de 3,5 mL \cdot min⁻¹. A un tiempo de 200 s después de abrir la válvula de inyección, el portador es cambiado por otro con menor polaridad (30 % MeOH:H₂O), mediante una válvula de selección, para acelerar la salida de los analitos más apolares. Una vez que el último analito ha sido eluido, el portador A es bombeado de nuevo durante unos 30 s para acondicionar el sistema para una nueva inyección. El orden de elución de los analitos es el esperado atendiendo a su polaridad: AK (tiempo de retención 13 s, medido a 226 nm), SA (13 s, 205 nm), AS (36 s, 205 nm), MP (63 s, 254 nm), PG (116 s, 273 nm), EP (182 s, 254 nm), PP (291 s, 254 nm), BA (339 s, 288 nm) y BP (382 s, 254 nm). La relación entre la concentración de los analitos y la señal analítica fue establecida mediante calibración univariante con patrones. Las muestras se inyectan siempre por triplicado, usando la altura de pico como parámetro analítico.

2.3.2. Método de referencia

Como método de referencia se usó una adaptación del método de cromatografía de pares iónicos propuesto por Chen y Fu². La columna empleada fue una de sílice C₈ con partículas de 5 μm , de dimensiones 150 x 4,6 mm. Como portador se empleó una disolución acuosa de ACN con 50 mM de ácido α -hidroxi-isobutírico (pH 4,5), conteniendo 2,5 mM de bromuro de hexadeciltrimetilamonio a una velocidad de flujo constante de 1,0 mL \cdot min⁻¹. Las medidas se obtuvieron a 233 nm de longitud de onda. Para establecer la función de calibrado se midieron seis niveles de concentración distintos por triplicado, usando el área de pico como parámetro analítico.

2.3.3. Tratamiento de muestras

Para la aplicación del método propuesto, se analizaron diferentes muestras de alimentos, bebidas y cosméticos, obtenidas todas de supermercados de la ciudad de Granada. No encontramos muestras que contuvieran todas las familias de aditivos que hemos estudiado. Seleccionamos las muestras de forma que pudiéramos chequear la máxima variedad de familias posible. Así, elegimos **sopas deshidratadas** para determinar antioxidantes, un **refresco de cola** y **pasta de dientes** para edulcorantes y **toallitas limpiadoras**, **espuma de cabello** y **pasta de dientes** para los conservantes.

Antes de analizar las muestras con el procedimiento propuesto, comprobamos la presencia de los analitos buscados en la etiqueta de los productos y comparando los tiempos de retención obtenidos en HPLC con los de los patrones de los analitos.

Para el análisis de las **sopas deshidratadas**, una cantidad adecuada (normalmente 5 g) fue pesada con exactitud, pulverizada, homogeneizada y tratada tal y como se detalla en el apartado Tratamiento de muestras del capítulo 4⁷.

Para el análisis de los edulcorantes en el **refresco de cola** (sin cafeína) aplicamos un método desarrollado por nosotros. Se empleó un cartucho de extracción en fase sólida Waters Vac C-18 Sep-Pak. Para acondicionarlo se usaron 2 mL de ACN y 2 mL de agua. Después se cargaron 2 mL de muestra (ajustando el pH a 1,5 con disolución de HCl) en el cartucho. El extracto fue acondicionado de la misma forma que el portador. En el caso del análisis de la **pasta de dientes** se pesaron con exactitud unos 0,2 g de muestra y se mezcló con 10 mL de portador. La mezcla se agitó durante 50 minutos y se filtró a través de un filtro de 0,2 μm .

Para el análisis de las **toallitas limpiadoras**⁸ y de la **espuma de cabello**⁹ se aplicaron los mismos procedimientos descritos en el apartado de Tratamiento de muestras del Capítulo 5.

Por último, se aplicó el procedimiento básico a las muestras. Todas ellas se analizaron por triplicado, usando el valor medio del área de pico como parámetro analítico.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todos los analitos presentes en esta mezcla compleja son especies absorbentes en la región UV. Por ello seleccionamos esta propiedad para evitar el uso de reacciones previas de derivación. En capítulos anteriores hemos detallado las características espectrales de todos los aditivos seleccionados como analitos para este trabajo.

3.1. Variables

Las variables a optimizar, al igual que en capítulos anteriores, son la composición del portador y las variables FIA.

3.1.1. Optimización del portador

La columna seleccionada para este estudio fue, como en otros capítulos, una columna monolítica en fase inversa debido a la naturaleza de los analitos. Como ya se ha comentado en capítulos anteriores, la retención de los analitos en este tipo de columnas depende fuertemente de la composición del portador. Suele estar compuesto por un tampón, para regular el pH del medio, y un disolvente apolar miscible con agua, para regular la polaridad del portador.

Para estudiar como influía la concentración del disolvente orgánico en el sistema se probaron diferentes disolventes, resultando ser ACN y MeOH los más recomendables. Se ensayaron diferentes curvas de retención de los analitos en función de la cantidad de ACN y de MeOH. Finalmente seleccionamos ACN como disolvente orgánico porque podíamos conseguir, con menor cantidad de disolvente, el mismo resultado que con MeOH, reduciendo así el desecho al medioambiente y el costo del método.

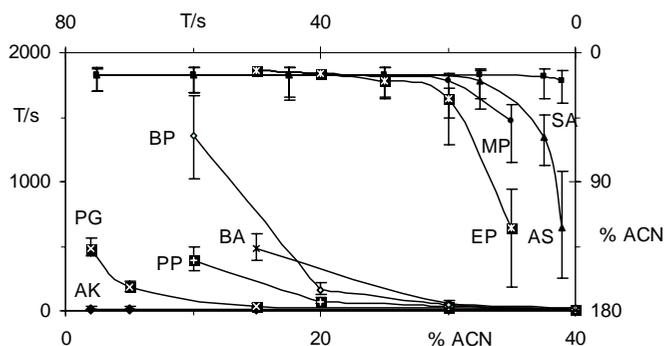


Figura 6.2: Dependencia del tiempo de retención de los analitos en función de la concentración de ACN.

Como puede verse, los analitos con carga permanente, como son los edulcorantes AK y SA, no fueron retenidos en la columna, como cabía esperar debido a su naturaleza iónica, independientemente del porcentaje de disolvente orgánico ensayado. Intentamos separarlos formando pares iónicos mediante el empleo de cationes orgánicos de gran tamaño, como tetraetilamonio, tetrabutilamonio, tetradeciltrimetilamonio, benciltrimetilamonio, benzalconio y bencetonio, y mediante la formación de micelas usando surfactantes, como SDS y LAS. Ensayamos diferentes concentraciones de todos estos productos, llegando a separar los edulcorantes citados lo suficiente como para poder medirlos en altura, pero sus señales solapaban con las de AS y MP. Por ello, rechazamos la opción de separar AK y SA con este procedimiento FIA, aunque si era posible la determinación de uno u otro en mezclas con los otros siete analitos estudiados como el primer analito en ser eluido de la columna, opción esta última que fue la usada en este trabajo.

Trabajando con bajos porcentajes de ACN, cerca del 5 %, la minicolumna fue capaz de separar los primeros cinco analitos (AK/SA, AS, MP, PG, EP). Por ello, estudiamos detenidamente esa concentración de ACN entre 1 y 9 % a nueve niveles, concluyendo que con un 4 % de ACN se podían separar estos cinco primeros analitos con una resolución superior a 1,1 en todos los casos.

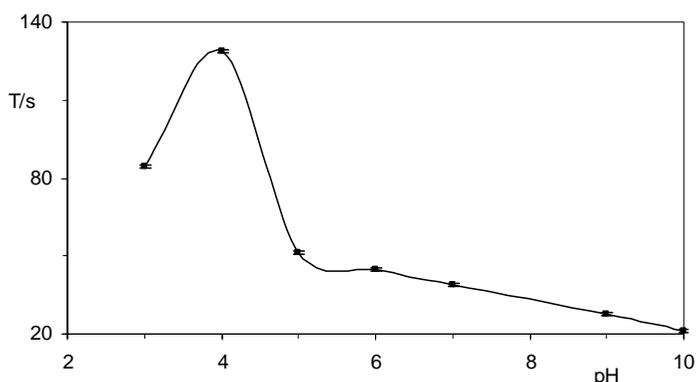


Figura 6.3: Dependencia del tiempo de retención de AS en función de pH del portador.

El segundo factor que debía ser optimizado de la composición del portador es el pH. Los edulcorantes, debido a su estructura molecular, son más difíciles de separar en columnas de fase inversa, ya que dos de ellos (SA y AK) son aniones, y el tercero (AS) es un dipéptido (ver valores de pK en el Capítulo 2). En este caso el pH del portador juega un papel importante en la separación ya que AS posee una estructura que varía su polaridad en función del pH del medio. Se estudió la influencia del pH sobre la retención y la elución de todos los analitos en el rango comprendido entre 3 y 10, a ocho niveles distintos, ajustado con HCl o NaOH. Como cabía esperar, solo AS presentó dependencia del pH porque era el único analito con propiedades dependientes del pH. El pH del portador fue la clave de la separación de AS; a valores de pH superiores a 8, AS se encuentra cargado negativamente, mientras que a valores inferiores de 4, positivamente, presentando, en ambos casos, poca retención en la columna de C₁₈.

Como era predecible, a pH 4 la retención de AS es la mayor, pero finalmente seleccionamos pH 6 como óptimo porque a este valor de pH la retención de AS era la adecuada para que su tiempo de retención fuera tal que el pico de AS apareciera entre las señales del primer analito en ser eluido (AK o SA) y el tercero (MP).

El pH del portador fue ajustado con tampón fosfato. Se estudió la influencia de la concentración del tampón a seis niveles entre 10 mM y 500 mM. La concentración óptima fue 10 mM porque era la mínima concentración de tampón que mostraba buena capacidad tamponadora. Si se aumentaba la

concentración de tampón aumentaba la señal analítica, pero también el tiempo de retención y, por ende, el tiempo de análisis. Como ejemplo, en la Figura 6.4 se muestra como varía el tiempo de retención de AS con la concentración del tampón.

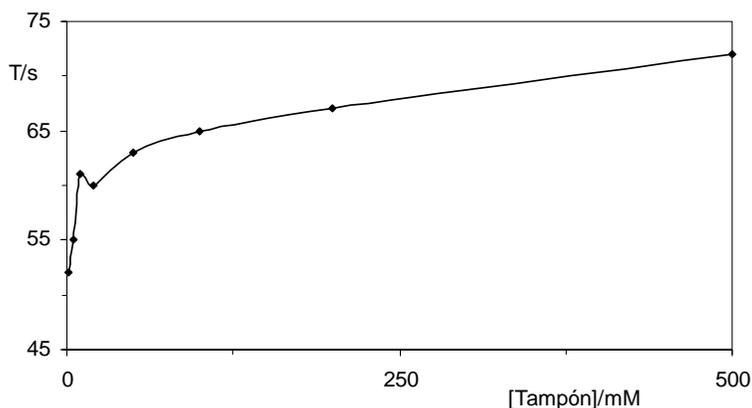


Figura 6.4: Variación del tiempo de retención de AS con la concentración del tampón.

También se estudió la influencia de la fuerza iónica entre 1 y 100 mM ajustada con NaCl, pero no produjo resultados relevantes para la separación de la mezcla problema ya que ni los analitos ni el mecanismo de retención en la columna se veían muy afectados por la fuerza iónica del medio.

En estas condiciones, 4 % ACN con 10 mM de tampón fosfato pH 6,0, era posible separar los cinco primeros analitos, pero el resto (PP, BA y BP) necesitaban mucho más tiempo, más de 2000 s, para eluirse de la columna si trabajábamos en modo isocrático.

La primera solución que ensayamos fue aumentar el caudal de trabajo. Probamos entre 1,5 y 4,5 mL·min⁻¹, pero incluso con la mayor velocidad de flujo posible para el sistema (4,5), el tiempo de análisis seguía siendo demasiado elevado (1000 s). La segunda opción fue disminuir la polaridad del portador aumentando la concentración de disolvente orgánico del mismo mediante un cambio de portador. El cambio de portador durante la medida producía una alteración en la línea base, que dependía tanto de la concentración del portador B como del tiempo de cambio (TC) desde el portador A al B. El TC depende de la velocidad de flujo. Por ello, en principio el TC no se fijó de forma absoluta, sino relativa al tiempo que tardaba en eluirse EP (que es el quinto analito, justo antes del cambio de

portador); es decir, TC se fijó justo después de que el quinto analito fuera eluido. El TC fue optimizado con posterioridad, junto con la velocidad de flujo, pero siempre después de que EP fuera eluido. Así, ensayamos diferentes porcentajes de ACN y MeOH como portador B. Los mejores resultados los obtuvimos con MeOH, ya que con ACN como portador B, a pesar de que la alteración de la línea base era menor, no fuimos capaces de obtener buenas separaciones de los analitos restantes dentro de un tiempo de análisis prudencial. Ensayamos concentraciones de MeOH comprendidas entre 20 y 80 % a siete niveles, concluyendo que 30 % de MeOH era la concentración óptima, ya que PP era eluido justo después de la alteración de la línea base, solapando un poco con ella, pero separado suficientemente como para poder medirlo usando altura como señal analítica. El resto de analitos (BA y BP) eran eluidos después que PP con factores de resolución mayores de 1,2. Así, una disolución acuosa con un 30 % de MeOH fue seleccionado como portador B.

3.1.2. Variables FIA

Las variables FIA estudiadas fueron el tamaño de bucle y la velocidad de flujo. El volumen de bucle se estudió entre 20 y 500 μL a nueve niveles. Como cabía esperar, la señal analítica, tanto en área como en altura, aumenta al aumentar el volumen de bucle, pero la resolución entre los analitos disminuía. Por ello, debíamos adoptar una solución de compromiso, siendo la resolución el factor decisivo para seleccionar el volumen de bucle óptimo.

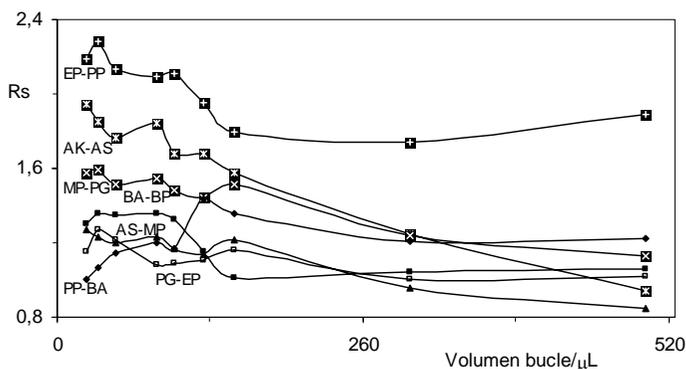


Figura 6.5: Dependencia del factor de resolución al variar el volumen de bucle.

Como podemos ver la resolución en todos los casos fue buena y siempre por encima de 0,85. Finalmente seleccionamos 125 μL como volumen de bucle óptimo porque era el volumen máximo que producía factores de resolución mayores de 1,1 para todos los analitos, valor suficiente para medir en altura.

Por último, la velocidad de flujo se optimizó variando esta entre 1,5 y 4,5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ a siete niveles. La resolución de los picos fue buena en todos los casos e independiente del caudal, como cabe esperar con este tipo de materiales monolíticos. Obviamente, cuando aumentábamos el caudal, el tiempo de retención disminuían (entre un 54,5 y un 66,8 %) y el ancho de banda (entre un 50,4 y un 66,7 %), así como la altura aumentaba (entre un 9,5 y un 38,7 %). Entre paréntesis se expresan los porcentajes mínimo y máximo para todos los analitos. En principio podríamos seleccionar la velocidad de flujo más alta, 4,5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, para minimizar el tiempo de análisis (que en este caso sería menor de 350 s), pero finalmente seleccionamos 3,5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ como caudal óptimo porque es el caudal máximo con el cual el sistema trabajaba adecuadamente.

3.2. Características analíticas

El ajuste de los datos analíticos (medidos en altura) se llevó a cabo mediante regresión lineal, aplicando el test de fallo de ajuste a la linealidad, con 11 niveles de concentración y cinco réplicas de cada uno. La desviación estándar de la línea base obtenida a partir de medidas del blanco, necesaria para estimar el límite de detección ($K=3$) y de cuantificación ($K=10$) de la IUPAC¹⁰, fue obtenida como promedio de diez determinaciones y denotada como DER en la Tabla 6.1A y Tabla 6.1B. En ésta tabla podemos ver los parámetros analíticos calculados para este procedimiento. La señal de cada analito se recogió a la longitud de onda del máximo.

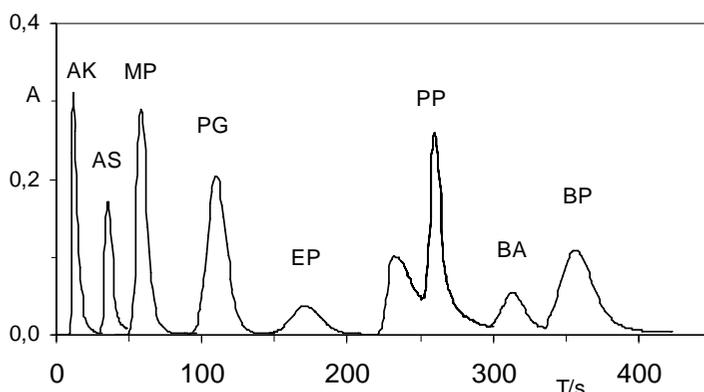


Figura 6.6: Diagrama típico al medir en las condiciones del procedimiento básico.

Tabla 6.1A. Parámetros analíticos para AS, AK, SA, MP y PG

Parámetro	Unidades	AS	AK	SA	MP	PG
		205 nm	226 nm	205 nm	254 nm	273 nm
b	$\text{mL} \cdot \mu\text{g}^{-1}$	$2,78 \cdot 10^{-2}$	$3,14 \cdot 10^{-2}$	$4,06 \cdot 10^{-3}$	$3,05 \cdot 10^{-2}$	$2,24 \cdot 10^{-2}$
S_b	$\text{mL} \cdot \mu\text{g}^{-1}$	$1,70 \cdot 10^{-4}$	$2,59 \cdot 10^{-4}$	$5,59 \cdot 10^{-5}$	$1,59 \cdot 10^{-4}$	$1,79 \cdot 10^{-4}$
a	-----	$1,13 \cdot 10^{-2}$	$2,62 \cdot 10^{-2}$	$-4,10 \cdot 10^{-4}$	$1,42 \cdot 10^{-2}$	$1,48 \cdot 10^{-2}$
S_a	-----	$4,46 \cdot 10^{-3}$	$6,41 \cdot 10^{-3}$	$2,01 \cdot 10^{-3}$	$4,77 \cdot 10^{-3}$	$7,77 \cdot 10^{-3}$
R^2	-----	99,90	99,81	99,41	99,95	99,82
RDL	$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	0,94 – 45,0	0,03-45,0	2,43-80,0	0,08-60,0	0,07-80,0
LD	$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	0,32	0,01	0,73	0,03	0,02
LC	$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	0,94	0,03	2,43	0,08	0,07
DER	%	1,15	1,50	0,93	1,14	2,82

b: pendiente; S_b : desviación estándar de la pendiente; a: ordenada en el origen; S_a : desviación estándar de la ordenada en el origen; r: coeficiente de correlación; RDL: rango dinámico lineal; LD: límite de detección; LC: límite de cuantificación; DER: desviación estándar relativa

Tabla 6.1B. Parámetros analíticos para EP, PP, BA y BP

Parámetro	Unidades	EP	PP	BA	BP
		254 nm	254 nm	288 nm	254 nm
b	$\text{mL} \cdot \mu\text{g}^{-1}$	$1,17 \cdot 10^{-2}$	$2,65 \cdot 10^{-2}$	$5,83 \cdot 10^{-3}$	$1,10 \cdot 10^{-2}$
S_b	$\text{mL} \cdot \mu\text{g}^{-1}$	$5,82 \cdot 10^{-5}$	$4,15 \cdot 10^{-4}$	$6,60 \cdot 10^{-5}$	$1,36 \cdot 10^{-4}$
a	-----	$8,23 \cdot 10^{-3}$	$4,93 \cdot 10^{-2}$	$1,27 \cdot 10^{-2}$	$1,48 \cdot 10^{-2}$
S_a	-----	$2,50 \cdot 10^{-3}$	$1,08 \cdot 10^{-2}$	$2,94 \cdot 10^{-3}$	$6,05 \cdot 10^{-3}$
R^2	-----	99,94	99,53	99,75	99,56
RDL	$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	0,38-80,0	1,01-80,0	4,75-80,0	2,52-80,0
LD	$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	0,13	0,35	1,60	0,85
LC	$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	0,38	1,01	4,75	2,52
DER	%	1,60	2,49	2,10	2,78

b: pendiente; S_b : desviación estándar de la pendiente; a: ordenada en el origen; S_a : desviación estándar de la ordenada en el origen; r: coeficiente de correlación; RDL: rango dinámico lineal; LD: límite de detección; LC: límite de cuantificación; DER: desviación estándar relativa

La frecuencia de muestreo fue de 9 h⁻¹. El método propuesto mostró resultados satisfactorios para la cuantificación de cada analito en presencia de diferentes proporciones de los aditivos que coexistían con él. Así, para demostrar la independencia de las señales analíticas, se ensayaron diez mezclas de aditivos en proporciones entre 1:80 y 80:1 a niveles entre 0,94 y 45,0 µg·mL⁻¹ para AS, entre 0,03 y 45,0 µg·mL⁻¹ para AK, entre 2,43 y 80,0 µg·mL⁻¹ para SA, entre 0,08 y 60,0 µg·mL⁻¹ para MP, entre 0,07 y 80,0 µg·mL⁻¹ para PG, entre 0,38 y 80,0 µg·mL⁻¹ para EP, entre 1,01 y 80,0 µg·mL⁻¹ para PP, entre 4,75 y 80,0 µg·mL⁻¹ para BA y entre 2,52 y 80,0 µg·mL⁻¹ para BP. La recuperación de los antioxidantes estaba dentro del rango de 100,8 a 102,1 % para AS, 99,5 a 103,1 % para AK, 95,9 a 97,6 % para SA, 95,8 a 105,5 % para MP, 91,5 a 97,4 % para PG, 93,1 a 101,0 % para EP, 90,7 a 104,4 % para PP, 95,7 a 96,7 % para BA y de 86,5 a 95,3 % para BP, con recuperaciones medias de 101,5 % para AS, 101,3 % para AK, 96,8 % para SA, 100,7 % para MP, 94,5 % para PG, 97,1 % para EP, 97,6 % para PP, 96,2 % para BA y 90,9 % para BP.

3.3. Aplicaciones analíticas

El método propuesto se aplicó a numerosas muestras que contenían los analitos sujetos a estudio, adquiridas en diversos supermercados de Granada. Las muestras contenían los analitos en grupos de familias, como edulcorantes, antioxidantes o conservantes. Lo más común era encontrar muestras que contuvieran solo una familia de aditivos, aunque a veces alguna muestra pueda contener más. Nosotros seleccionamos las muestras para tener todas las posibilidades con mezclas binarias, y siempre buscando que tuvieran el máximo número de los aditivos estudiados. Además, hicimos estudios de recuperación con todas las muestras para verificar que los métodos de extracción seleccionados eran válidos mediante la adición de cantidades conocidas de aditivos patrón para fortificar las muestras. La presencia de los aditivos buscados se puso de manifiesto leyendo la etiqueta de los productos, así como comparando los tiempos de retención obtenidos en HPLC con los de los patrones.

De los diferentes métodos para la extracción de aditivos en este tipo de muestras publicados en bibliografía, para el análisis de antioxidantes y conservantes seleccionamos los métodos de Perrin y colaboradores⁷, el de Saad⁸ y el de Myint⁹ con las ligeras modificaciones indicadas en el apartado de

tratamiento de muestra. Sin embargo, para la extracción de los edulcorantes desarrollamos un método propio. Para el análisis de refrescos de cola se usó un cartucho de extracción en fase sólida Waters Vac C-18 Sep-Pak. Bajo las condiciones seleccionadas nuestros edulcorantes no eran retenidos (ver los valores de pK en el apartado Variables). Sin embargo el benzoato, que era un interferente en nuestro caso y solía estar presente en las muestras de refrescos, tiene un pK_a de 4,18, luego al pH de trabajo se encontraba en su forma ácida (por lo tanto, protonado y sin carga), siendo retenido en el cartucho de extracción y separado de nuestros analitos. De esta forma conseguimos separar los interferentes de la muestra, purificándola. Este procedimiento se ensayó con patrones, verificando en todos los casos que la extracción era correcta, con recuperaciones cercanas al 100 % para todos los edulcorantes (tanto con muestras como con patrones). Para el análisis de pasta de dientes se usó un método mucho más simple. Consistió simplemente en mezclar la muestra con nuestro portador, homogeneizar, filtrar e inyectar.

Los resultados obtenidos con nuestro método de referencia fueron validados mediante su comparación estadística con los obtenidos con el método HPLC de referencia, y se muestran en las Tablas 6.2, 6.3 y 6.4.

Tabla 6.2. Resultados obtenidos para edulcorantes en muestras reales al aplicar el método propuesto y el de referencia

Muestra	Refresco de cola	Pasta de dientes
AK/mg·L ⁻¹	Método propuesto	66 ± 2,70
	Método referencia	67,1 ± 0,83
	Valor P	38,9
*SA/mg·kg ⁻¹	Método propuesto	419 ± 4,61
	Método referencia	426 ± 4,43
	Valor P	66,4
*AS/mg·L ⁻¹	Método propuesto	253 ± 1,06
	Método referencia	253,5 ± 0,40
	Valor P	79,2

*Media de tres determinaciones ± CV.

Tabla 6.3. Resultados obtenidos para antioxidantes en muestras reales al aplicar el método propuesto y el de referencia

Muestra	Sopa deshidratada 1	Sopa deshidratada 2	
*PG/mg·kg ⁻¹	Método propuesto	276 ± 2,40	11 ± 1,11
	Método referencia	277 ± 1,15	10,8 ± 0,82
	Valor P	75,8	95,5
*BA/mg·kg ⁻¹	Método propuesto	139 ± 7,12	27 ± 1,13
	Método referencia	142 ± 3,61	27,4 ± 0,64
	Valor P	87,9	83,2

*Media de tres determinaciones ± CV.

Tabla 6.4. Resultados obtenidos para conservantes en muestras reales al aplicar el método propuesto y el de referencia

Muestra	Pasta de dientes	Toallitas	Espuma de cabello	
*MP/mg·kg ⁻¹	Método propuesto	1668 ± 2,24	744 ± 2,26	537 ± 2,15
	Método referencia	1704,5 ± 0,34	746,70 ± 0,04	536 ± 1,33
	Valor P	17,5	81,2	78,6
*EP/mg·kg ⁻¹	Método propuesto	-----	216 ± 5,86	117 ± 5,92
	Método referencia	-----	204,38 ± 0,07	123 ± 5,00
	Valor P	-----	19,5	27,6
*PP/mg·kg ⁻¹	Método propuesto	2311 ± 3,53	212 ± 3,59	56 ± 4,01
	Método referencia	2336,7 ± 0,23	200,08 ± 0,08	56,9 ± 0,91
	Valor P	62,2	5,1	70,0
*BP/mg·kg ⁻¹	Método propuesto	-----	-----	150 ± 2,66
	Método referencia	-----	-----	146 ± 1,04
	Valor P	-----	-----	22,8

*Media de tres determinaciones ± CV.

El método propuesto muestra diversas ventajas frente a los métodos HPLC habituales: su uso es muy simple, utiliza instrumentación rápida y más barata, y tiene una precisión similar. Por contra, HPLC posee mucho mayor poder de separación que nuestro método, aunque en nuestro caso es suficiente para la determinación de esta mezcla de aditivos.

4. CONCLUSIONES

Las columnas monolíticas son herramientas poderosas que permiten obtener muy buenas separaciones, incluso de mezclas complejas. Por otro lado FIA es una técnica consolidada que presenta numerosas ventajas como su velocidad, bajo costo y simplicidad. Acoplando ambas (FIA con columnas monolíticas) se obtiene una nueva técnica muy equilibrada que presenta las ventajas de ambos: buenas separaciones de mezclas de analitos en tiempos muy cortos con el uso de instrumentación sencilla y barata y obteniendo resultados comparables con los de técnicas mucho más complejas, como HPLC.

Se ha desarrollado un nuevo método basado en una configuración FIA, sin necesidad de reacciones de derivación previas al análisis, que hace posible la separación en una columna monolítica de diversos aditivos, basándose en la retención de los mismos, excepto SA y AK, los cuales son muy débilmente retenidos. El uso de las propiedades intrínsecas de los aditivos, como su absorción UV, unido al acoplamiento de una minicolumna de sílice C₁₈ monolítica hace que la separación y la determinación sea posible sin necesidad de reacciones de derivación.

5. BIBLIOGRAFÍA

1. Zhao, Rong; Wu, Guohua; Xue, Ying *Zhongguo Weisheng Jianyan Zazhi* **2005**, *15*, 693-95.
2. Chen, B. H.; Fu, S. C. *Chromatographia* **1995**, *41*, 43-50.
3. Chen, Qing Chuan; Wang, Jing *J.Chromatog.A* **2001**, *937*, 57-64.
4. Frazier, R. A.; Inns, E. L.; Dossi, N.; Ames, J. M.; Nursten, H. E. *J.Chromatog.A* **2000**, *876*, 213-20.
5. Boyce, Mary C. *J.Chromatog.A* **1999**, *847*, 369-75.
6. Capitán-Vallvey, L. F., Valencia Miron, M. C., and Gutiérrez del Moral, G. Método de control electromecánico de válvulas rotatorias para la inserción y mezcla de fluidos. Universidad de Granada. Patente ES2079308. 1996.
7. Perrin, Christian; Meyer, Liliane *Food Chem.* **2002**, *77*, 93-100.
8. Saad, Bahruddin; Bari, Md; Saleh, Muhammad Idris; Ahmad, Kamarudzaman; Talib, Mohd *J.Chromatog.A* **2005**, *1073*, 393-97.
9. Myint, Aung; Zhang, Qunlin; Liu, Lijuan; Cui, Hua *Anal.Chim.Acta* **2004**, *517*, 119-24.
10. Analytical Methods Committee *Analyst* **1988**, *113*, 1469.

CONCLUSIONES

Conclusiones

Como resultado del trabajo realizado en esta Tesis Doctoral, se han obtenido las siguientes conclusiones:

1. Se han diseñado y optimizado diferentes métodos de flujo para determinar la concentración de diversos aditivos. Estos métodos se basan en la medida de absorción de radiación en la región visible-ultravioleta en la célula de flujo y ofrecen buenas características analíticas, pudiéndose considerar como una alternativa económica para obtener información analítica.
2. Se ha propuesto un método de flujo para la determinación de edulcorantes artificiales (AS y AK) en muestras de edulcorante de mesa, haciendo uso de un esquema FIA simple y de

una fase sólida como relleno de la célula de medida para hacer posible la separación de los dos edulcorantes. La medida de la absorbancia en la célula de flujo permite cuantificar AS y AK por medidas directa de absorción de radiación. Ajustando las variables relativas a la composición del portador y al propio sistema FIA podemos obtener una sensibilidad adecuada al tipo de problema que se presenta, llegando a los niveles requeridos para las muestras analizadas.

3. Se ha desarrollado un método de flujo para la determinación simultánea de edulcorantes artificiales (AS, AK y SA) en diversas muestras de alimentos y bebidas basado en el empleo de un disco monolítico como sistema de separación. El esquema analítico emplea un sistema de flujo simple con dos discos monolíticos acoplados al mismo. La separación de estos edulcorantes se hace posible debido a las diferentes retenciones transitorias que sufren los analitos en el disco monolítico. Éste es de naturaleza aniónica, al igual que los edulcorantes AK y SA. Sin embargo AS es un dipéptido, que, en función del pH del medio, puede encontrarse como catión, neutro o como anión. No fue posible la separación completa de AK y SA, pero si lo suficiente como para medirlos usando altura como parámetro analítico. El método se ha aplicado a diversas muestras comerciales de alimentos y bebidas, y comparado con uno de referencia HPLC, concluyendo que el método es veraz y preciso.
4. Se ha optimizado un nuevo método de flujo para la determinación de diversos antioxidantes (PG, BA y BT) ampliamente empleados en alimentos y cosméticos para evitar la oxidación lipídica. Para su determinación simultánea hemos acoplado un nuevo tipo de columna monolítica, en fase inversa, al sistema de flujo. De esta forma, optimizando la composición del portador hemos podido realizar la separación completa de los analitos. Para ello, ha sido necesario hacer un cambio de portador durante la medida para disminuir la polaridad y hacer así que los analitos más apolares se eluyeran de la columna. El método se ha aplicado satisfactoriamente en muestras reales de cosméticos y alimentos.
5. Se ha caracterizado un método para la determinación simultánea de los cuatro primeros parabenos de la serie: MP, EP, PP y BP. Su estructura es muy similar y su espectro de absorción es idéntico en cuanto a longitud de onda se refiere. Por ello es necesaria su

separación previa a su determinación, lo que se ha logrado acoplado una columna monolítica en fase reversa al sistema FIA. Al igual que en el anterior, en este caso también fue necesario realizar un cambio de portador para acelerar la salida de los aditivos más apolares. El método se aplicó satisfactoriamente a muestras de cosméticos.

6. Se ha desarrollado un método de análisis en flujo para la determinación de una mezcla compleja de aditivos (edulcorantes, antioxidantes y parabenos) en muestras de tipo alimentario y cosmético. En este caso la columna seleccionada para llevar a cabo la separación ha sido la misma que en el caso anterior: en fase inversa. Fue necesario realizar un cambio de portador en mitad de la medida con el mismo objetivo que en los casos anteriores. Cabe destacar que debido a la dificultad de separar aniones, como algunos edulcorantes, en una columna en fase inversa, hemos tenido que discriminar algún aditivo. Sin embargo, finalmente el método desarrollado es capaz de determinar de forma simultánea una mezcla de ocho aditivos, de los cuales uno (AK) puede ser cambiado por otro (SA) si la muestra lo requiere sin repercusión para los demás.
7. Los métodos desarrollados en la presente Memoria se han aplicado a la determinación de los diferentes aditivos (edulcorantes, antioxidantes y conservantes) en muestras comerciales de tipo alimentario o cosmético, con necesidad de tratamiento previo de las muestras para purificarlas, además de la dilución y adición de disolución reguladora del pH en algunos casos.
8. En todos los casos las columnas empleadas han sido de dimensiones muy pequeñas, y se han desarrollado métodos capaces de determinar 3, 4 y 8 aditivos con columnas muy pequeñas. Esto ha sido posible gracias a las características de dichos monolitos. Por otro lado, gracias a las características FIA los métodos desarrollados son rápidos y baratos. De esta forma, acoplado ambos se consigue separar mezclas complejas con técnicas baratas y rápidas.
9. En conclusión, el acoplamiento de las nuevas columnas monolíticas a sistemas de flujo de baja presión, como FIA con bombas peristálticas, es posible, resultando además en el

desarrollo de una nueva metodología de trabajo que produce resultados de precisión similar a los de técnicas más complejas, como HPLC, pero haciendo uso de instrumentación mucho más simple y barata.

ANEXO 1

PUBLICACIONES

IMPROVED MULTIANALYTE DETERMINATION OF THE INTENSE SWEETENERS ASPARTAME AND ACESULFAME-K
WITH A SOLID SENSING ZONE IMPLEMENTED IN AN FIA SCHEME

J.F. García-Jiménez, M.C. Valencia and L.F. Capitán-Vallvey

*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, Campus Fuentenueva,
University of Granada, Granada 18071 (Spain).*

ABSTRACT

A multianalyte flow-through sensor is proposed for the simultaneous determination of aspartame (AS) and acesulfame-K (AK) in tabletop sweeteners. The procedure is based on the transient retention of AK in the ion exchanger Sephadex DEAE A-25 placed in the flow-through cell of a monochannel FIA set-up using pH 2.70 orthophosphoric acid/sodium dihydrogen phosphate buffer 0.06 M as carrier. In these conditions AS is very weakly retained which makes it possible to measure the intrinsic UV absorbance of first AS and then AK after desorption by the carrier itself. The applicable concentration range, the detection and the relative standard were the following: for AS, from 10 to 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 5.65 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 3.45 %; and for AK, between 40 and 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 11.9 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and 1.61 %. The method was applied and validated satisfactorily for the determination of AS and AK blends in tabletop sweeteners, comparing the results against an HPLC reference method.

Keywords: Biparameter sensor; Aspartame and acesulfame-K mixtures; Flow-through optical sensor; Tabletop sweeteners;

* Corresponding author; e-mail: lcapitan@ugr.es

INTRODUCTION

Intense or high potency sweeteners offer a way to enjoy the taste of sweetness with little or no energy intake. They comprise a wide variety of organic molecules with one common property: their capacity to stimulate the taste receptor cells in the mouth{Capitan-Vallvey, 2004 4104 /id}. The number of intense sweeteners, synthetic or natural, known up to now may surpass several hundred, but only very few are allowed for use in food and beverages due to toxicity and other problems they present. The food industry needs intense sweeteners that have adequate characteristics for use, including sensory qualities, solubility, safety, low cost, compatibility with other food ingredients, and stability in different food environments{Nofre, 2001 4105 /id}. A common practice in the food industry is to blend intense sweeteners, bringing about a synergy of sweetness, which makes lower usage levels and a lower cost possible and can improve the overall sweet taste.

Acesulfame-K (6-methyl-1,2,3-oxathiazin-4(3H)-one-2,2-dioxide; E-950) (AK) is used as a sweetening agent in the form of potassium salt. This sweetener is characterised by a rapid taste onset, a bitter and metallic aftertaste and a sweetness of higher

quality than that of saccharin. The taste does not linger or persist longer than the intrinsic taste of the food. Blends of acesulfame-K with other bulk or intense sweeteners are common, because they can synergise the sweetness potential, improve properties, and make it possible to use minor amounts, which has an economic impact in production. It has a synergistic effect when combined with other intense sweeteners, especially in mixtures with aspartame (N-L- α -aspartyl-L-phenylalanine-1-methyl ester; E-951) (AS) (ca. 1:1 by weight) and with sodium cyclamate (ca. 1:5 by weight), whereas only a slight taste enhancement is perceived in mixtures with saccharin. Quantitative sensory studies show that up to 30% synergy may be seen in aspartame-acesulfame K blends in water, although this depends on the food system used (O'Brien Nabors, 2001 4125 /id).

Although a great variety of methods have been applied to the determination of this sweetener mixture in different matrices, its determination has been mainly by means of separative methods. HPLC is the most popular system for separating and analysing aspartame and acesulfame-K mixtures due to its multianalyte ability and because it adjusts itself better to the physicochemicals in sweeteners (Di Pietra, 1990 4131 /id; Lawrence, 1988 86 /id; Szymczyk, 1995 4132 /id), although other chromatographic procedures have been described, such as ionic chromatography (Chen, 2001 4127 /id; Chen, 1997 4128 /id) and TLC (Baranowska, 2004 4126 /id). Different modes of capillary electrophoresis have been applied to achieve the separation of saccharin and aspartame and major protocols include CZE (Thompson, 1995 4129 /id) and MEKC (Boyce, 1999 4120 /id; Thompson, 1995 4130 /id).

The analysis of analyte mixtures by means of flow-through optosensors has been accomplished in different ways: (1) use of a microcolumn after flow cell to retain preferentially one analyte, the other being transiently retained in the solid support placed in the flow-through cell (Ortega Barrales, 2001 4115 /id; Ruedas Rama, 2002 4114 /id); (2) use of differences in transient retention for both analytes at the flow cell. The transient retention of one analyte in the upper part of the flow cell, away from the measuring area, makes it possible to measure what is less retained and thus its resolution (Capitan-Vallvey, 2004 4122 /id; Capitan-Vallvey, 2003 4123 /id) and (3) retention of only one analyte in the solid phase that fills the flow cell, while the second analyte is measured when it flows along the interstitial solution through the particles (Fernandez de Cordova, 2003 4111 /id).

The development of a flow-through sensor for AK and AS based on the transient retention of AK on ion-exchanger Sephadex DEAE A-25 placed in the flow cell against the very weak retention of AS is described. Here, a very simple and cheap FIA scheme is proposed for the separation this sweetener mixture in the same flow cell without the need for any derivatization reaction, since an intrinsic property of both analytes is used as its UV absorption. The potential usefulness of the procedure is checked in tabletop sweetener analysis against an HPLC reference procedure.

1.1. EXPERIMENTAL

Reagents and Chemicals

The chemicals used were of analytical-reagent grade and all aqueous solutions were prepared using reverse-osmosis type quality water produced by a Milli-RO 12 plus Milli-Q purification system (Millipore, Bedford, MA).

Aspartame (AS) (1000.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, Spain) and potassium acesulfame (AK) (1000.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (Fluka, Madrid, Spain) stock solutions in water were prepared by exact weighing. Both solutions were spectrophotometrically stable when protected from light and kept in the refrigerator at 5°C for up to two months. Working solutions were prepared by appropriate dilutions with water.

C₁₈ bonded silica (Waters, Millipore Corporation, Milford, MA, USA) with average particle sizes of 55-105 μm , ion exchangers Sephadex DEAE A-25, Sephadex CM C-25, Sephadex QAE A-25 and hydrophilic adsorbent Sephadex G-25 (Sigma Chemical, St. Louis, Mo, USA.) were tested as a solid support.

As carrier, the buffers acetic acid/sodium acetate, orthophosphoric acid/sodium dihydrogen phosphate and citric acid/sodium citrate (all from Panreac, Barcelona, Spain) of different pH and a solution of HCl of different concentration were used.

Apparatus, Software and Flow Diagram

Absorption measurements were made with a Hewlett Packard HP-8453 diode array spectrophotometer (Norwalk, CT, USA), interfaced to a Pentium MMX 200 microcomputer via an HP IB interface board, and equipped with a Hellma 138-QS flow glass cell with 1 mm light path. The flow-through cell with 50 μL inner volume was packed with the solid support by introducing it as a water suspension with the aid of a syringe and then placed in the cell compartment of the spectrophotometer with the aid of a painted black plastic spacer. A Crison Digit pH-meter equipped with a combined glass-calomel electrode was used. A Hewlett-Packard 1100 series liquid chromatograph with DAD detector provided with a C₈ Zorbax column was used to validate the proposed method.

The flow analysis set-up consisted of a Gilson Minipul-2 four channel peristaltic pump working at a constant flow-rate and three variable volume Rheodyne 5041 teflon rotary valves controlled electromechanically (Capitán-Vallvey, 1996 3033 /id). Both were connected to the spectrophotometers cited above to a conventional microprocessor that controlled the pump, the valves and the spectrophotometer using software designed by us, written in BASIC language. This set-up was interfaced to a microprocessor using RS-232C interfaces. PTFE tubing (Omnifit, Cambridge, England) (0.8 mm i.d. and 1.6 mm o.d.) and various end-fittings and connectors of different diameters (Omnifit) were used.

As software for the acquisition and manipulation of the spectral data, the UV visible Chemstation software package supplied by HP was used. Software programs used for the measurements of FIA peak and area were: Statgraphics software package, ver.6.0 STSC Inc. Statistical Graphics Corporations, Englewood Cliffs, NJ, USA, 1993, and Grams/386 software package ver.1.0, Add. Galactic Industries, Salem, USA and the software program used for validation purposes was Data Leader software package, Beckman, Fullerton, CA, USA, 1987.

Procedures

Basic Procedure

The sample volume (652 μL) containing between 10 and 100 mg L^{-1} of AS and between 40 and 100 mg L^{-1} of AK, with the same pH as the carrier, was inserted into the carrier stream (pH 2.70 orthophosphoric acid/sodium dihydrogen phosphate 0.06 M). Upon reaching the flow cell containing Sephadex DEAE filled to 25 mm, AS suffered a faster transient retention than AK thus making its separation and determination possible. AS was determined at 47 s from injection, measuring at 205 nm and AK at 196 s and 227 nm, after AS desorption by the carrier itself. In all cases, 150 s was enough for the carrier to return to baseline. The relationship between the concentration of AS or AK and height (measured in absorbance units) was established by conventional calibration with external standards.

Reference procedure

As a reference method, an adaptation of the HPLC-DAD method proposed by Lawrence and Charbonneau (Lawrence, 1988 86 /id) was used. A 5 μm C₈ silica in a 150 x 4.6 mm column with 5 μm was used as a stationary phase and a mobile phase a

gradient ranging from 3% acetonitrile in 0.02M KH_2PO_4 (pH 5) to 20% acetonitrile in 0.02M KH_2PO_4 (pH 3.5) at a constant flow rate of 1.0 mL min^{-1} was used. The chromatograms were obtained at a wavelength of 210 nm. In order to obtain the calibration function, 5 different concentration levels and 3 replicates of each one of the standard solutions were analysed using peak area as the analytical parameter.

Treatment of samples

For the analysis of AS and AK in tabletop sweeteners, several tablets were thoroughly crushed in a glass mortar and an adequate amount (typically 200-300 mg) was weighed, dissolved in water stirring for 10 min, filtered through a $0.45\text{-}\mu\text{m}$ Millipore filter, and then diluted to 200 mL.

RESULTS AND DISCUSSION

The two intense sweeteners in this study are absorbing species in the UV region and exhibit similar absorption spectra both in solution and in solid phase with the following characteristics: AS: maximum absorption in water: 195 nm (molar absorptivity ϵ : $1.67 \cdot 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) and a shoulder at 205 nm (ϵ : $9.99 \cdot 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$); AK: 227 in water (ϵ : $5.23 \cdot 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) and 226 nm in Sephadex DEAE A-25 solid phase (ϵ : $4.12 \cdot 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Since these spectra overlap strongly, it is necessary to separate or, alternatively, derivatize them in order to solve the binary mixtures. In this case, we propose their on-line separation in the flow cell itself filled with a solid phase based on differences in the transient retention of each sweetener.

In order to obtain the right experimental conditions to achieve the differential transient retention in the solid phase, different parameters were studied and optimised individually. All experimental data were obtained from three replicates. The variables influencing the system fall into three groups: those related to the retention-elution unit, chemical and flow-injection variables. Optimisation studies were carried out for each individual constituent and compromise values of the experimental variables were chosen.

In order to select a solid phase that makes on-line separation possible, several types of solid phases were tested to fill the flow-through cell and achieve a differential retention of AS and AK, namely the ion-exchangers Sephadex DEAE A-25, Sephadex QAE A-25, and Sephadex CM C-25; the hydrophilic adsorbent Sephadex G-25 and the hydrophobic adsorbent C_{18} silica, using aqueous solutions with pH ranging between 2 and 8 as carrier in all cases.

The use of the cationic-exchanger solid phase (Sephadex CM C-25) resulted in very low retention for both sweeteners and similar residence times. At low pH, AS was more retained than AK, but the resolution was not enough for analysis purposes, while at high pH there were no differences between the two sweeteners. With the hydrophilic Sephadex G-25 there were no differences in residence times of the two sweeteners at any pH studied. The hydrophobic C_{18} silica produced a low retention and slow elution of the analytes by the carrier itself and a small difference in residence times both at low and high pH values. When the pH was near neutrality, the residence times were different, but not enough to allow analysis. The anion-exchangers (Sephadex DEAE and QAE) gave off a higher analytical signal than the hydrophilic adsorbents, with differences in residence times. With the strong anion-exchanger Sephadex QAE at pH values below 5, AK is strongly retained while AS is not retained, which results in very high analysis times. The weak anion-exchanger Sephadex DEAE A-25, also at pH values below 5, produces residence times that are different enough for determination. Consequently, this last solid phase was selected to fill the flow-through cell.

The level of the solid phase in the flow cell should be that needed to fill it up to a sufficient height (10-12 mm measured from the glass-wool plug in the outlet), allowing the radiation beam to pass completely through the solid layer. The height of the solid support above this minimum value considerably influences the separation of both sweeteners. As the height increases from 13 to 25 mm, the residence time T of AK increases (Fig. 1) as a consequence of the greater amount of solid phase present, while the less retained AS is not affected. The best resolution in FIA peaks for AS and AK was obtained for the maximum amount allowed in the flow cell, thus 25 mm was used for the subsequent experiments.

Figure 1

The pH of the carrier is the key chemical variable in the separation of these sweeteners using the weak ion-exchanger Sephadex DEAE as solid phase. The influence of pH on the retention and elution of AS and AK was studied in the range 2-8, adjusted with HCl or NaOH. In the case of AS, the retention time is highly dependent on carrier pH. At pH under 3, AS has a low retention time, which increases gently up to pH 5.5, and then maintains nearly constant (Fig. 2). This is coherent with pK_a values of dipeptide aspartame (pK_1 3.18; pK_2 7.82; isoelectric point 5.25). Additionally, AK is as an anion coming from a strong acid, and thus is not pH dependent. We selected 2.7 as pH for the carrier because at this pH AS is partially with a positive charge, and consequently sufficiently excluded from the Sephadex DEAE anion ion-exchanger, being only very slightly retained by adsorption in the filled flow-through cell. At the same time, the anionic AK is more strongly retained in these conditions by the DEAE solid phase, showing enough difference in retention time between the two sweeteners to achieve resolution when in mixtures.

Figure 2

The tested carriers were made of monochloroacetic acid/sodium monochloroacetate, orthophosphoric acid/sodium dihydrogen phosphate, citric acid/sodium citrate buffers and hydrochloric acid. Finally, a phosphoric acid/sodium dihydrogen phosphate buffer pH 2.7 was found to be the most appropriate for the determination of AS-AK mixtures.

The ionic strength of the carrier was used to adjust the separation of both sweeteners, because in the selected pH conditions, AS is mainly a cation that is excluded from an anionic ion exchanger, although the possibility of interaction of AS with the backbone of the solid phase by adsorption cannot be excluded. However, anionic AK is strongly retained and its residence time is high. An increase in the ionic strength of the carrier reduces its residence time, in this way speeding up AK, while AS is not affected (Fig. 3). We chose a concentration of buffer of 0.06 M, which means an ionic strength of 0.05, because it gives off a resolution value of 0.51 between AS and AK, enough for their determination using height as the analytical parameter, with a sampling rate of 24 h^{-1} . It could be possible to select an ionic strength of 0.01 to improve the resolution (R_s 0.7) but this value worsens the sampling rate to some 8 h^{-1} . In this case, it is important to emphasize that the presence of an organic solvent to achieve the separation of the sweeteners is not necessary.

Figure 3

The pH of the samples injected into the flow system was an important variable for obtaining a good FIA record, because this could modify the behaviour of AS in the solid phase, due to the modification of the pH in the proximity of the sample plug, and also in the baseline stability. Thus, the samples were conditioned with the same pH buffer as that used in the carrier.

The influence of the flow-rate on the signal was studied between 1.0 and 3.9 $mL\ min^{-1}$ using the same concentration of the analytes. At a low flow-rate (Fig. 4), both analytes suffer an effect of dilution by longitudinal diffusion, making the peak height low, increasing as the flow-rate increases up to a maximum nearly at 1.7 $mL\ min^{-1}$ and then decreasing due to the fact that the sweeteners have no time to interact with the solid support. Thus, a flow-rate of 1.7 $mL\ min^{-1}$ was selected.

Figure 4

An increase in the sample volume between 435 and 1231 μL increases, as expected, the analytical signal as a result of the larger amount of analyte in the flow system. At high sample volumes a small curvature is observed due to saturation of the solid phase in the flow cell. Although the signal grows continuously, we selected as our working volume 652 μL as a compromise due to the concomitant increase in bandwidth $\omega_{1/2}$ (Fig. 5). However, the sensitivity of the procedure could be varied with the sample volume injected, increasing the residence times and width peaks, as is characteristic of this type of flow-through sensor.

Figure 5

Analytical features

We used FIA peak height as analytical signal because the complete resolution of both peaks is not totally possible. The calibration graphs were linear for AS in the range 10.0-100.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and in the range 0.3-7.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for AK when analytical signals were collected at the wavelength of the maximum for both sweeteners. The considerable differences in sensitivity, expressed as the slope of the calibration function, between both calibrations ($1.15 \cdot 10^{-3} \text{ mL } \mu\text{g}^{-1}$ AS and $2.48 \cdot 10^{-2} \text{ mL } \mu\text{g}^{-1}$ AK) could be ascribed to two factors: (1) the preconcentration effect for AK (the ϵ value increases from $5.23 \cdot 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ in aqueous solution to $4.12 \cdot 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ in Sephadex DEAE A-25) and (2) the dilution effect of the same solid phase on the almost non-retained AS (the ϵ value decreases from $1.67 \cdot 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ in aqueous solution to an apparent value of $5.60 \cdot 10^3$ in Sephadex DEAE A-25). In order to get a similar sensitivity needed for the intended application—tabletop sweeteners—we changed the measurement wavelength to one that is less sensitive but does not introduce more uncertainty due to the wavelength. Namely, we chose 265 nm, which produces a sensitivity of $1.56 \cdot 10^{-4} \text{ mL } \mu\text{g}^{-1}$.

The adjustment of the analytical data was carried out by linear regression, with the lack-of-fit test applied to test the linearity (7 replicates of each standard and 5 standards for each calibration graph). The standard deviation of the background signal measured for the blank, which is necessary for the estimation of the IUPAC detection limit ($K = 3$) and the quantification limit ($K = 10$) (Analytical Methods Committee, 1988 3011 /id), was taken as the average of ten determinations and noted as RSD units. Table 1 shows those and others analytical parameters.

Table 1

The mutual independence of the analytical signals for AS and AK, measured at 205 and 265 nm, respectively, were tested through the quantification of each sweetener in the presence of different ratios of the other sweetener. Six AS-AK mixtures with ratios in the range 1:10 to 10:4 were added at levels of 10 to 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for AS and 40 to 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for AK. The slopes of these calibration graphs do not change essentially and the intercepts have no influence on the measured analytical signals. The null hypothesis test was applied to the experimental data to prove these facts. Recovery of intense sweeteners was in the range of 98.6% to 103.7% for AS and 97.6% to 106.8% for AK with mean recovery of 100.9% for AS and 101.6% for AK.

Effect of foreign species

To assess the potential for the flow-through sensor, the effect of several common concomitants of AS and AK in the real application was studied. Different synthetic sample solutions containing 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of both sweeteners and variable excess amounts of each foreign species were studied up to 6000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The maximum concentration of foreign species producing an

error $\leq 5\%$ was taken as the tolerance level. Interfering substances such as cyclamate, were tolerable up to $1200\ \mu\text{g mL}^{-1}$, $2100\ \mu\text{g mL}^{-1}$ for lactose, $2500\ \mu\text{g mL}^{-1}$ for glycine, leucine, maltose, fructose and sucrose; $5000\ \mu\text{g mL}^{-1}$ for glucose; and $>6000\ \mu\text{g mL}^{-1}$ for citrate and ascorbate.

No interference was caused by glucose, sucrose, lactose, maltose, fructose, glycine, and leucine even when present in concentrations higher than those commonly found in the tabletops analysed.

Analytical applications

The proposed method was applied to several brands of tabletop sweeteners commonly found in different supermarkets in the town of Granada (Spain). Some of the commercial products contain a blend of these sweeteners and a few contain only AS as indicated on the label and demonstrated by the comparison of the HPLC retention times (Lawrence, 1988 86 /id).

The quality and accuracy of the proposed methods for AS and AK were tested using the statistical protocol based on standard addition methodology (Cuadros Rodriguez, 1993 3037 /id; Bosque-Sendra, 1988 3038 /id), which involves two different calibrations: with standards and by mean standard addition. From the statistical comparison of the variances of these calibrations it was concluded that the method was accurate for the determination of both analytes in the analysed sample. Subsequent Youden calibrations showed that there is no systematic error. Additionally, the results obtained by our method have been validated by statistical comparison (P-value) with a reference method HPLC method (Lawrence, 1988 86 /id) (Table 2). The proposed method shows several advantages against the usual HPLC procedure (Lawrence, 1988 86 /id): it uses very simple, fast instrumentation that is cheaper and has similar precision. The disadvantage is that the other procedure has a better resolution than our procedure, as expected with HPLC, although ours is sufficient for determination.

CONCLUSION

An optical flow-through multianalyte sensor has been developed for aspartame and acesulfame-K mixtures using an ion-exchanger in the flow as the basis for separation. A simple FIA configuration with a single channel, with no previous derivatization reaction of analytes, makes its separation possible in the flow cell filled with Sephadex DEAE A-25 based on the transient retention of AK while AS is very weakly retained. This paper provides a practical, simple, rapid, and inexpensive method for the simultaneous determination of AS-AK mixtures at $\mu\text{g mL}^{-1}$ levels that may be employed in routine analysis. The described sensor makes it possible to analyse this high potency sweetener mixture in commercial tabletop sweeteners. The results were chemometrically validated and compared with an HPLC reference method.

ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge financial support from the *Ministerio de Educación y Cultura, Dirección General de Enseñanza Superior* (Spain) (Project No. BQU2002-00353).

REFERENCES

1. Capitan-Vallvey, L. F. Intense Sweeteners. In *Handbook of Food Analysis*, 2 ed.; Marcel Dekker Inc.: New York, 2004, 1643-1739.
2. Nofre, C.; Tinti, J.M. Neotame: discovery, properties, utility. *Food Chem.* 2001, *69*, 245-57.
3. O'Brien Nabors, L. *Alternative Sweeteners*, 3 ed.; Marcel Dekker: New York, 2001, -572.
4. Di Pietra, A.M.; Cavrini, V.; Bonazzi, D.; Benfenati, L. HPLC analysis of aspartame and saccharin in pharmaceutical and dietary formulations. *Chromatographia* 1990, *30*, 215-19.
5. Lawrence, J.F.; Charbonneau, C.F. Determination of seven artificial sweeteners in diet food preparations by reverse phase liquid chromatography with absorbance detection. *J.Assoc.Off.Anal.Chem.* 1988, *71*, 934-37.
6. Szymczyk, K.; Czerwiecki, L. Use of HPLC technique for determination of aspartame and acesulfam-K in processed fruit products. *Rocz.Panstw.Zakl.Hig.* 1995, *46*, 373-81.
7. Chen, Q.C.; Wang, J. Simultaneous determination of artificial sweeteners, preservatives, caffeine, theobromine and theophylline in food and pharmaceutical preparations by ion chromatography. *J.Chromatog.A* 2001, *937*, 57-64.
8. Chen, Q.C.; Mou, S.F.; Liu, K.N.; Ni, Z.M.; Yang, Z. Separation and determination of four artificial sweeteners and citric acid by high-performance anion-exchange chromatography. *J.Chromatog.A* 1997, *771*, 135-43.
9. Baranowska, I.; Zydron, M.; Szczepanik, K. TLC in the analysis of food additives. *J.Planar Chromatogr.--Mod.TLC* 2004, *17*, 54-57.
10. Thompson, C.O.; Trenerry, V.C.; Kemmery, B. Determination of cyclamate in low joule foods by capillary zone electrophoresis with indirect ultraviolet detection. *J.Chromatog.A* 1995, *704*, 203-10.
11. Boyce, M.C. Simultaneous determination of antioxidants, preservatives and sweeteners permitted as additives in food by mixed micellar electrokinetic chromatography. *J.Chromatog.A* 1999, *847*, 369-75.
12. Thompson, C.O.; Trenerry, V.C.; Kemmery, B. Micellar electrokinetic capillary chromatographic determination of artificial sweeteners in low-joule soft drinks and others foods. *J.Chromatog.A* 1995, *694*, 507-14.

13. Ortega Barrales, P.; Dominguez Vidal, A.; Fernandez de Cordova, M.L.; Molina Diaz, A. Simultaneous determination of thiamine and pyridoxine in pharmaceuticals by using a single flow-through biparameter sensor. *J.Pharm.Biomed.Anal.* 2001, 25, 619-30.
14. Ruedas Rama, M.J.; Ruiz Medina, A.; Molina Diaz, A. Use of a solid sensing zone implemented with unsegmented flow analysis for simultaneous determination of thiabendazole and warfarin. *Anal.Chim.Acta* 2002, 459, 235-43.
15. Capitan-Vallvey, L.F.; Valencia, M.C.; Arana Nicolas, E. Solid-phase ultraviolet absorbance spectrophotometric multisensor for the simultaneous determination of butylated hydroxytoluene and co-existing antioxidants. *Anal.Chim.Acta* 2004, 503, 179-86.
16. Capitan-Vallvey, L.F.; Valencia, M.C.; Arana Nicolas, E. Simple resolution of butylated hydroxyanisole and n-propyl gallate in fatty foods and cosmetics samples by flow-injection solid-phase spectrophotometry. *J.Food Sci.* 2003, 68, 1595-99.
17. Fernandez de Cordova, M.L.; Ortega Barrales, P.; Rodriguez Torne, G.; Molina Diaz, A. A flow injection sensor for simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim by using Sephadex SP C-25 for continuous on-line separation and solid phase UV transduction. *J.Pharm.Biomed.Anal.* 2003, 31, 669-77.
18. Capitán-Vallvey, L.F.; Valencia, M.C.; Gutiérrez del Moral, G. Método de control electromecánico de válvulas rotatorias para la inserción y mezcla de fluidos. Patent no. ES2079308, 1-1-1996.
19. Analytical Methods Committee. *Analyst* 1988, 773, 1469.
20. Cuadros Rodriguez, L.; Garcia Campaña, A.M.; Jimenez Linares, C.; Roman Ceba, M. Estimation of performance characteristics of an analytical method using the data set of the calibration experiment. *Anal.Lett.* 1993, 26, 1243-58.
21. Bosque-Sendra, J.M.; Cuadros Rodriguez, L.; Garcia Campaña, A.M. Validation of analytical procedures using added samples as reference materials. *Recent.Res.Dev.Pure Appl.Anal.Chem.* 1988, 7, 115-31.

Table 1. Analytical performance for AS and AK biparameter flow sensor

Parameters	Units	AS	AK	
		205 nm	227 nm	265 nm
b	mL μg^{-1}	$1.15 \cdot 10^{-3}$	$2.48 \cdot 10^{-2}$	$1.56 \cdot 10^{-4}$
S _b	mL μg^{-1}	$4.00 \cdot 10^{-5}$	$1.48 \cdot 10^{-4}$	$2.52 \cdot 10^{-6}$
a	-----	$4.20 \cdot 10^{-3}$	$2.34 \cdot 10^{-2}$	$2.97 \cdot 10^{-3}$
S _a	-----	$2.50 \cdot 10^{-3}$	$7.30 \cdot 10^{-4}$	$1.23 \cdot 10^{-4}$

r	-----	0.999	0.9998	0.995
P value	%	54.54	29.11	8.67
LRD	$\mu\text{g mL}^{-1}$	10.0 – 100.0	0.3-7.0	40.0-100.0
DL	$\mu\text{g mL}^{-1}$	5.65	0.10	11.90
QL	$\mu\text{g mL}^{-1}$	10.0	0.3	39.6
RSD	%	3.45	0.59	1.61

b: slope; S_b : standard deviation slope; a: intercept; S_a : standard deviation intercept; r: correlation coefficient; PL: Probability level test-lack-of-fit; LRD: Linear range dynamic; DL: Detection limit; QL: Quantification limit; RSD: relative deviation standard.

Table 2. Results obtained for the mixture by reference and proposed methods

Sample	AS / g kg ⁻¹			AK / g kg ⁻¹		
	Proposed Method *	Reference method *	P-value (%)	Reference Method *	Proposed Method *	P-value (%)
Tabletop 1	371 ± 10	375 ± 7	55.86	-----	-----	-----
Tabletop 2	467 ± 52	448 ± 3	55.88	-----	-----	-----
Tabletop 3	303 ± 62	294 ± 7	82.44	91 ± 2	91 ± 5	95.55
Tabletop 4	10 ± 2	8.42 ± 0.01	17.57	1.90 ± 0.05	2.0 ± 0.1	31.92
Tabletop 5	301 ± 3	300 ± 2	70.71	70 ± 5	71 ± 6	82.64
Tabletop 6	23.3 ± 0.3	23.5 ± 0.1	18.13	9.7 ± 0.1	9.7 ± 0.2	73.37
Tabletop 7	130 ± 5	129 ± 3	79.24	112 ± 2	114 ± 3	48.77

* Mean of three determinations ± SD. The data are expressed in mg of sweeteners per kg product. Composition: Tabletop 1: AS, glycine, carboxymethylcellulose (CMC), L-leucine; Tabletop 2: AS, lactose, CMC, L-leucine; Tabletop 3: AS, AK, glycine, CMC, L-leucine; Tabletop 4: AS, AK, sucrose; Tabletop 5: AS, AK, lactose, cellulose, starch; Tabletop 6: AS, AK, maltodextrine, oligofiber; Tabletop 7: AS, AK, lactose, CMC, glycine, L-leucine.

Figure captions

Figure 1. Influence of the height of Sephadex DEAE in the flow-through cell on the retention time and the resolution of both sweeteners.

Figure 2. Dependence on the pH of the retention time for AS and AK. Conditions: carrier: HCl at different pH, height of DEAE: 25 mm, sample volume 500 μL , flow rate 1.0 mL min⁻¹.

Figure 3. Ionic strength optimisation. Dependence of retention time and resolution of the studied sweeteners on ionic strength. Conditions: carrier: Phosphate buffer pH 2.70, height of DEAE: 25 mm, sample volume 500 μL , flow rate 1.0 mL min⁻¹.

Figure 4. Influence of the flow-rate on the analytical signal. Conditions: carrier: phosphate buffer 0.06 M pH 2.70, height of DEAE: 25 mm, sample volume 500 μL , flow rate 1.0 mL min⁻¹.

Figure 5. Influence of sample volume on analytical signal and bandwidth. Conditions: carrier: phosphate buffer 0.06 M pH 2.70, height of DEAE: 25 mm, variable sample volume, flow rate 1.7 mL min⁻¹.

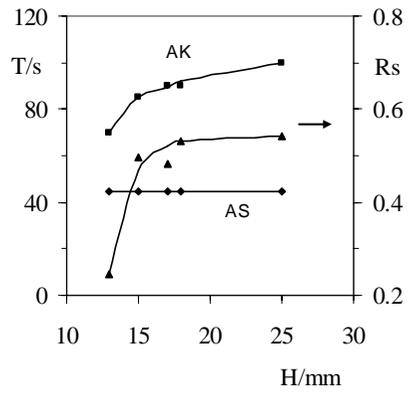


Figure 1

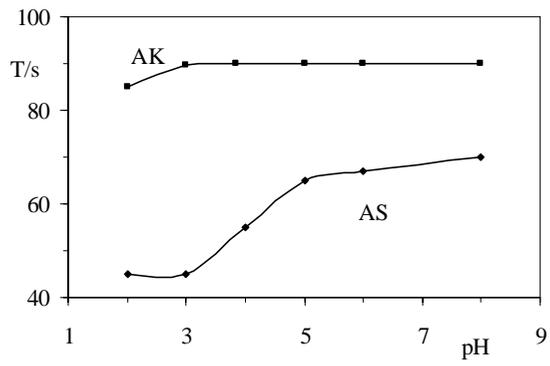


Figure 2

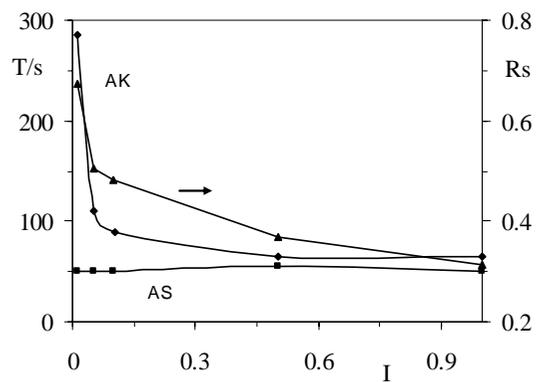


Figure 3

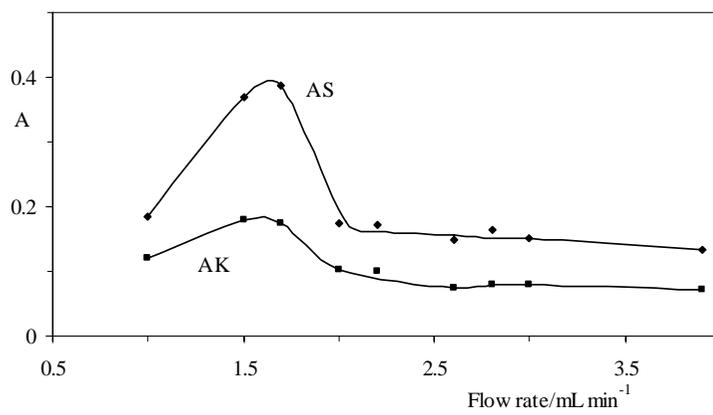


Figure 4

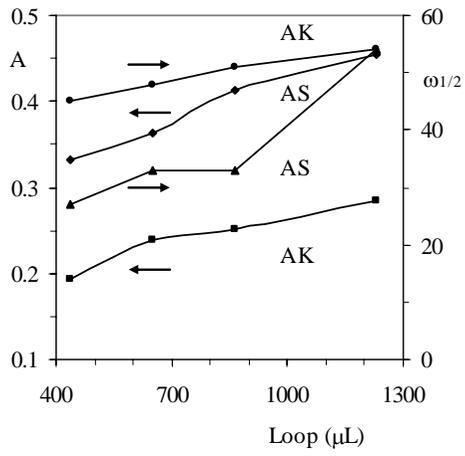


Figure 5

INTENSE SWEETENER MIXTURE RESOLUTION BY FLOW INJECTION METHOD WITH ON-LINE MONOLITHIC ELEMENT

J.F. García Jiménez, M.C. Valencia and L.F. Capitán-Vallvey
Solid Phase Spectrometry Research Group, Department of Analytical Chemistry,
Campus Fuentenueva, Faculty of Sciences, University of Granada,
E-18071 Granada, Spain.

ABSTRACT

A multianalyte flow-through method is proposed for the simultaneous determination of aspartame (AS), acesulfame-K (AK) and saccharin (SA) in several food and soft drink samples. The procedure is based on the transient retention of the three sweeteners in a commercial quaternary amine ion exchanger monolithic column placed in its specific holder and allocated in a monochannel FIA set-up using pH 9.0 Tris buffer 0.03 M, NaCl 0,4 M and NaClO₄ 0,005 M as carrier. In these conditions AS is very weakly retained, while AK and SA are more strongly retained, making it possible to measure the intrinsic UV absorbance of first AS and then AK and SA after desorption by the carrier itself. The applicable concentration range, the detection limit and the relative standard deviation were the following: for AS, from 9.5 to 130.0 µg mL⁻¹; 2.87 µg mL⁻¹; 1.46 % (at 65 µg mL⁻¹); for AK, between 2.2 and 600.0 µg mL⁻¹; 1.0 µg mL⁻¹ and 0.08 % (at 300 µg mL⁻¹); and for SA, between 3.0 and 600.0 µg mL⁻¹; 0.9 µg mL⁻¹ and 0.09 % (at 300 µg mL⁻¹). The method was applied and validated satisfactorily for the determination of AS, AK and SA in foods and soft drink samples, comparing the results against an HPLC reference method.

Keywords: Sweetener determination; Flow-through optical; aspartame, acesulfame and saccharin mixture; monolithic minicolumn; Foods and soft drinks

* Corresponding author; e-mail: lcapitan@ugr.es

INTRODUCTION

Flow injection analysis (FIA) methods present many advantages versus other methods of analysis such as speed, simplicity, cost and analytical figures. FIA methods can include separative steps to improve their capabilities (Valcárcel, 1994 1718 /id). Commonly, the separative FIA systems based on solid phase supports can only separate binary mixtures by different ways: 1) the use of microcolumns to retain one analyte, although both analytes are transiently retained in the solid support that fills the flow cell after they pass or are eluted (Ortega Barrales, 2001 4115 /id; Ruedas Rama, 2002 4114 /id; Capitán-Vallvey, 2006 4565 /id); 2) the use of microcolumns to retain one analyte which is also retained in the solid support placed in the flow cell, while the other analyte is measured when it flows amid the interstitial solution through the particles (Fernández de Córdoba, 2003 4111 /id); 3) the use of the differences in the transient retention of both analytes in the flow cell. The transient retention of one analyte in the upper part of the flow cell, away from the measuring area, makes it possible to measure the one that is less retained and thus its resolution (Capitán-Vallvey, 2004 4122 /id; Capitán-Vallvey, 2003 4123 /id); 4) the use of a chemometric approach without separation of the analytes prior to the detection step (Ayora Cañada, 1999 2018 /id; Ortega-Algar, 2003 2145 /id). These systems have many problems such as irregular packing, high back pressure and low flow rates. One solution to these problems could be the use of monolithic columns. Monoliths are continuous stationary phases that are cast as a homogeneous column in a single piece and prepared in various dimensions with agglomeration-type or fibrous microstructures. These relatively new type of separative columns are based on a high cross-linked porous monolithic polymer, with well-defined, bimodal pore-size

distribution, providing excellent separation power and offering exceptional chemical stability and flow characteristics. They are characterized by flow-independent resolution separations and a flow-independent binding capacity, which allows high flow rates. They exhibit low backpressure, even at high flow-rates{Connolly, 2004 4598 /id;Cabrera, 2004 4192 /id;Satinsky, 2003 4561 /id;Zeng, 2006 4556 /id}.

The separation of common inorganic anions has been achieved using several reverse phase monolithic systems in low-pressure ion chromatography systems {Pelletier, 2006 4560 /id;Connolly, 2004 4598 /id;Victory, 2004 4579 /id}.

The aim of this work is to develop a new procedure for the determination of three intense sweeteners: aspartame (AS), acesulfame-K (AK) and sodium saccharine (SA) using an anionic monolithic disk embedded in a flow system.

Intense or high potency sweeteners are used to include the sweetness characteristic in food and beverages with very little or no energy intake. Although there are a high number of organic molecules with the property of stimulating taste receptor cells in the mouth{Capitán-Vallvey, 2004 4104 /id}, only a few are allowed for use in food and beverages due to toxicity and other problems they present. A common practice in the food industry is to blend intense sweeteners, bringing about a synergy of sweetness, which makes lower usage levels and a lower cost possible and can improve the overall sweet taste.

Acesulfame-K (6-methyl-1,2,3-oxathiazin-4(3H)-one-2,2-dioxide; E-950) (AK) is used as a sweetening agent in the form of potassium salt. It has a synergistic effect when combined with other intense sweeteners, especially in mixtures with aspartame (N-L- α -aspartyl-L-phenylalanine-1-methyl ester; E-951) (AS) (ca. 1:1 by weight) and with sodium cyclamate (ca. 1:5 by weight), whereas only a slight taste enhancement is perceived in mixtures with saccharin. Saccharin (1,2-benzisothiazol-3(2H)-one-1,1-dioxide; E-954) (SA), is used in the form of sodium or calcium salt, a common high potency sweetener. Its bitter metallic aftertaste becomes more noticeable as the concentration increases. At concentrations for normal use, the aftertaste is detectable by about 25% of the population. One choice in order to reduce or eliminate this aftertaste is to blend SA with other sweeteners such as AS or AK.

Although a great variety of methods have been applied to the determination of this sweetener mixture in different matrices, its determination has been mainly by means of separative methods. HPLC{Lehr, 1993 4256 /id;Hannisdal, 1992 4118 /id} is the most popular system for separating and analysing these sweeteners mixtures due to its multianalyte ability and because it adjusts itself better to the physicochemicals in sweeteners, although other chromatographic procedures have been described, such as ionic chromatography and TLC{Baranowska, 2004 4126 /id}. Different modes of capillary electrophoresis have been applied to achieve the separation these mixtures and major protocols include CZE {Schnierle, 1998 4121 /id} and MEKC {Boyce, 1999 4120 /id}.

CIM monolithic disks have been used for purification and determination of proteins{Rucevic, 2006 4605 /id}, for immobilization of enzymes{Vodopivec, 2003 4606 /id;Podgornik, 2002 4604 /id}, oligo- and polynucleotide{Jerman, 2005 4600 /id} or blood analysis{Gupalova, 2002 4603 /id}, but to the best of our knowledge never for sweeteners analysis. So, this method contributes to a new application of this type of commercial support. A very simple and cheap FIA scheme is proposed for the analysis of this sweetener mixture without the need for any derivatization reaction. The potential usefulness of the procedure is checked in real samples analysis of food and beverages against an HPLC reference procedure.

1.2. EXPERIMENTAL

Reagents and Chemicals

The chemicals used were of analytical-reagent grade and all aqueous solutions were prepared using reverse-osmosis type quality water produced by a Milli-RO 12 plus Milli-Q purification system (Millipore, Bedford, MA).

Aspartame (AS) (10000.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$), saccharin sodium salt (SA) (10000.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (both from Sigma-Aldrich Quimica S.A., Madrid, Spain), and acesulfame potassium salt (AK) (10000.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (Fluka, Madrid, Spain) stock solutions were prepared by

exact weighing and dissolution in water. Those solutions were spectrophotometrically stable for at least two months stored under refrigeration at 4 °C in dark bottles. Solutions of lower concentrations were prepared by dilution with water maintaining in all instances the pH constant at 9, 0.4 M in NaCl and $5 \cdot 10^{-3}$ M in NaClO₄ (these are the same conditions as the carrier).

The monolithic quaternary ammonium anion exchange (disks 12 mm in diameter and 3 mm thick) is based on a rigid highly cross-linked monolithic glycidylmethacrylate-co-ethyleneglycoldimethacrylate polymer CIM with quaternary amine groups supplied by BIA Separations (Ljubljana, Slovenia) was used to achieve the separation.

The disc dimensions were 12 mm in inner diameter and 3 mm in thickness, with a total active bed volume of just 0.34 mL. As carrier solutions the 1 M buffers boric acid/sodium borate, sodium hydrogen carbonate/sodium carbonate and tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) (all from Sigma-Aldrich) were tested. As solid phase extraction cartridges, Isolute SAX (from Biotage, Uppsala, Sweden) and Oasis MAX (from Waters, Milford, MA, US) were used in the treatment of samples.

Apparatus and Software

Absorption measurements were made with a Hewlett Packard HP-8453 diode array spectrophotometer (Norwalk, CT, USA), interfaced to a personal computer via LAN interface, and equipped with a Hellma 178.710-QS flow cell with 10 mm light path. A Hewlett-Packard 1100 liquid chromatograph with DAD detector provided with a C₈ Zorbax column were used to validate the proposed method.

The flow set-up consisted of an Ismatec Reglo Digital four channel peristaltic pump working at a constant flow-rate and a variable volume Rheodyne 5041 teflon rotary valves controlled electromechanically (Capitán-Vallvey, 1996 3033 /id). The outlet of the injection valve was connected directly to the anion exchange monolithic disk through a disk housing holder that contains the monolithic disk and connects it to the flow line through standard connectors. Minimum PTFE tubing (Omnifit, Cambridge, England) (0.8 mm i.d. and 1.6 mm o.d.) was used to reduce back pressures and extra-column band broadening.

As software for the acquisition and manipulation of the spectral data, the UV visible Chemstation software package supplied by HP was used. Software programs used for the measurements of FIA peak and area were: Statgraphics software package, ver. 5.0 STC Inc. (Statistical Graphics Corporations, Englewood Cliffs, NJ, USA), CSW32 v 1.3.3 1999-2001, and Microsoft Office 2003.

Procedures

Basic Procedure

The sample volume (25 µL) containing between 9.5 and 130.0 µg L⁻¹ of AS, between 2.2 and 600.0 µg L⁻¹ of AK and between 3.0 and 600.0 µg L⁻¹ of SA, with the same pH as the carrier and adjusted with the same buffer (pH 9.0 Tris buffer 0.03 M, 0.4 M NaCl and $5 \cdot 10^{-3}$ M NaClO₄) is inserted into the carrier stream. When the sample arrives at the disk housing holder containing two monolithic disks, the analytes are separated in the order: AS, AK and SA being measured in the following conditions: AS at 38 s and 205 nm; AK at 254 s and 226 nm, and SA at 335 s and 205 nm. Then the flow system is conditioned with the carrier up to 500 s to return to baseline. The relationship between the concentration and peak height is established by conventional calibration with external standards.

Reference procedure

As a reference method, an adaptation of the HPLC-DAD method proposed by Lawrence and Charbonneau (Lawrence, 1988 86 /id) was used. A 5 µm C₈ silica in a 150 x 4.6 mm column was used as a stationary phase and a mobile phase a gradient ranging

from 3% acetonitrile in 0.02M KH_2PO_4 (pH 5) to 20% acetonitrile in 0.02M KH_2PO_4 (pH 3.5) at a constant flow rate of 1.0 mL min^{-1} were used. The chromatograms were obtained at a wavelength of 210 nm. In order to obtain the calibration function, 6 different concentration levels and 3 replicates of each one of the standard solutions were analysed using peak area as the analytical parameter.

Treatment of samples

Before the analysis of samples, the presence of AS, AK and SA was tested by an HPLC method (Lawrence, 1988 86 /id) comparing the retention times of the problem with those obtained with standard solutions.

For the analysis of beverages in samples containing AK and/or SA, an adequate amount (typically between 5 and 7.5 mL) was taken, degassed and diluted to 10 mL adjusting the same conditions as the carrier. Finally, they were filtered through a 0.2 μm Millipore filter. For the analysis in juices, the sample (typically 7.5 mL) was diluted to 10 mL adjusting the same conditions as the carrier, centrifuged if necessary and finally filtered through a 0.2 μm Millipore filter. In the case of strawberry sweets, an adequate amount (typically 7 g) was weighed and thoroughly crushed in a glass mortar, then dissolved in water (50 mL) with the aid of an ultrasonic bath, adjusting the same conditions as the carrier. After that it was centrifuged (4500 rpm for 20 minutes) and filtered through a 0.2 μm Millipore filter. In the case of tomato sauce, the amount (typically 4 g) was suspended in 10 mL of water, and then 6 mL were diluted to 10 mL, centrifuged and adjusted with the same conditions as the carrier, and finally, filtrated through a 0.2- μm Millipore filter. Next the Basic Procedure was applied.

For the analysis of samples containing AS, the procedure applied for sample preparation is different because AS is weakly retained, eluting next to the front, where all the substances not retained in the column appear. All analysed samples that contain AS are in mixture with AK. AK content can be determined with the proposed procedure without problems, but the analysis of AS requires a further purification step. Thus, two possible approaches can be used for samples containing AS and AK: 1) The two-injection approach: the sample treated as indicated above is injected first, measuring the AK content. Then, a second injection is performed from a cleaned solution of the problem to determine AS. The clean-up procedure is: 2 mL of liquid sample (with the same conditions as the carrier) is loaded at a flow rate of 6 mL min^{-1} in an Oasis MAX cartridge previously conditioned with 2 mL of water and 2 mL of MeOH. The cartridge is then washed by passing 2 mL of water. The AS is eluted with 2 mL of 90 % MeOH:water at a flow rate of 6 mL min^{-1} and collected in a glass vial. The eluate is evaporated to dryness on a hot-block at a temperature not exceeding 30 °C under a gentle stream of nitrogen. The residue is solved in 2 mL carrier and analysed, applying the Basic Procedure. 2) One-injection approach: the sample is purified before injection with two solid phase cartridges in series, first an Isolute SAX cartridge and then an Oasis MAX cartridge. The cartridges are conditioned with 2 mL water and 2 mL MeOH. Then, 2 mL of the sample (with the same conditions as the carrier) are passed through the cartridges; the resulting AK is retained in the first cartridge and AS in the second cartridge. After washing the cartridges by passing 2 mL water, the elution is performed with 2 mL carrier (AK is eluted from 1) and 2 mL 90 % of MeOH:water (AS is eluted from 2) consecutively. The extract is evaporated to dryness on a hot-block at a temperature not exceeding 30 °C under a gentle stream of nitrogen, the residue solved in 2 mL carrier and analysed.

RESULTS AND DISCUSSION

Variables

The three sweeteners under study, AS, AK and SA show very similar absorption spectra with maximums near 200 nm and similar molar absorptivities (AS: maximum absorption in water: 195 nm, molar absorptivity ϵ : $1.67 \cdot 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, and a shoulder at 205 nm, ϵ : $9.99 \cdot 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; AK: 227 in water, ϵ : $5.23 \cdot 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, and SA: 205 nm, ϵ : $1.54 \cdot 10^2 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). This means they must be separated to resolve the mixture. We previously studied the resolution of the sweetener mixture of AS and SA including a minicolumn filled with C_{18} silica (300 mg, bead size 20-80 μm) in the flow setup (Capitan-Vallvey, 2006 4565 /id), but this has the disadvantages of high back pressure and low separative power. The aim of this study is to explore the possibilities offered by commercial ion-exchange monolithic disks for the separation of organic compounds using an FIA scheme.

As monolithic disk minicolumn, we selected a CIM® disk made up of a glycidylmethacrylate-co-ethyleneglycoldimethacrylate polymer (12 mm in diameter and 3 mm thick) with quaternary amine groups QA). Working with this very short separative element, we were able to solve the usual problem when using low-pressure pumps such as peristaltic pumps {Pelletier, 2006 4560 /id}, as is our case, for separations on monolithic columns. In this case, the system back pressure is reduced using tubing with 0.8 mm i.d. and the maximum flow rate attained was 2.0 mL·min⁻¹.

Eluent conditions

The eluent composition is studied together with the length of the column because both are interdependent. The working methodology was always the same: first, test separations with one monolithic disc in the minicolumn holder and next with two discs.

The composition and pH of the carrier used affect the retention and resolution of the sweeteners on the QA disk minicolumn. The carrier pH is the key factor for separation; at a pH value higher than 6, AS retention is increased in the QA disk in accordance with the pK_a values of AS dipeptide (pK₁ 3.18; pK₂ 7.82; isoelectric point 5.25). The retention of SA (pK_a 1.6) and AK (pK_a -0.28) are not pH dependent. The retention time of AS on the QA disk (Figure 1) increases at pH values higher than 7 up to pH 9, as is predictable. At pH values higher than 10 two peaks appear in the diagram, probably due to the partial cyclodehydration of AS to form a diketopiperazine{Capitán-Vallvey, 2004 4104 /id}. Consequently, we selected pH 9 as the as working pH, because it permits the retention of AS in the disk and its separation from the other sweeteners without any degradation. This pH value is available with monolithic disks because its working range pH is between 2 and 13.

Figure 1

The data in Figure 1 were obtained by using one monolithic disk. With two discs the curve is similar, but with higher retention times, as could be expected, because of the longer column length.

The working pH was adjusted with a buffer, although the simple use of a buffer did not enable the resolution of the AK/SA mixture; even with a 1 M buffer concentration, the analytes did not leave the column in 2000 s, either with one or two monolithic discs. Consequently, we adjusted the pH with the minimum amount required of buffer containing NaClO₄ (0.01 M) in order to facilitate the elution of analytes. As buffer we tested pH 9 borate, carbonate and TRIS with a concentration ranging between 0.01 and 0.05 M (5 levels). Finally, we selected TRIS as a buffer because the analytical signals for the three sweeteners studied were, on average, 15 % higher than the signals with the other buffers. Additionally, the buffer concentration selected was 0.03 M because it was the minimum concentration that shows good buffering capacity.

As noted before, it is not possible to resolve the AK/SA couple with buffer alone. Consequently we tried to improve the resolution, testing different eluent anions by adding several salts to the buffer, namely Na₂SO₄, NaNO₃, NaCl and NaClO₄. With Na₂SO₄ we did not obtain good results: we tested different concentration levels and the sweeteners did not elute up to 2000 s. Similar results were obtained with NaNO₃. Better results were obtained with NaCl. Figure 2A shows the AK-SA resolution with the NaCl concentration. The minimum resolution (around 0.8) was achieved using one monolithic disc at a low NaCl concentration, but the analysis time increased up to unacceptable values (up to 3000 s). By using two discs, similar behaviours were encountered at higher NaCl concentrations; thus, with 1 M NaCl the analysis time was higher than 1000 s, and thus, it was not useful.

Figure 2

The influence of NaClO_4 (Figure 2B) on AK-SA resolution is higher than chloride, as can be expected considering its higher size. However, the analysis time was, as with chloride, very high (for example, with NaClO_4 0.01M the analysis time is greater than 1200 s with resolution around 0.8) using one disc. With two discs, the analysis time is shortened but even very high. Better results were obtained using binary mixtures of NaCl and NaClO_4 . To select the best eluent, we studied carriers containing NaClO_4 ranging from 0.001 M to 0.05 M (5 concentration levels), because at higher concentration levels the resolution of AK and SA dropped (see figure 2B). At all those NaClO_4 levels, we tested several concentrations of NaCl (5 levels between 0.1 and 0.6 M), but using only one disc it was not possible to achieve enough resolution to measure them and an acceptable analysis time. However the use of two discs improved the AK/SA separation and it was possible to achieve a compromise between analysis time and resolution. The optimum composition was 0.005 M NaClO_4 and 0.4 M NaCl plus the buffer; and under this conditions, the resolution was sufficient (0.8) to measure FIA peaks in height with an acceptable analysis time (around 800 s). Under these conditions, the sweetener AS is weakly retained and is eluted near the front because composition is eluted quickly with this carrier (average retention time 30 s).

The FIA variables studied were flow-rate and loop volume. The influence of the flow-rate on the signal was studied between 1.1 and 2.0 mL min^{-1} , because at lower flow-rates, the analysis time increased up to 800 s, and using a peristaltic pump and two monolithic disks the maximum flow rate attained was 2.0 mL min^{-1} . The main factors in selecting the optimum flow rate were the resolution and the analysis time. Resolution, as can be expected with monolithic columns, is independent of the flow-rate, while the analysis time increases with the decrease in flow rate (Figure 3). Thus, the maximum flow rate tested -- the maximum flow rate that the system is able to support -- was selected as optimum (2.0 mL min^{-1}) in order to minimise the analysis time (500 s).

Figure 3

An increase in the sample volume between 25 and 500 μL increases, as can be expected, the analytical signal as a result of the larger amount of analyte in the flow system. The main factor selecting the appropriate loop volume was the resolution between AK and SA. Increasing loop volume increases the analytical signal but decreases the resolution of the peaks. Better resolution was achieved with the minimum loop volume, 25 μL , due to the lower bandwidth ($\omega_{\%}$); thus, 25 μL was selected as the optimum loop volume.

Figure 4

Analytical features

The peak height was used as analytical signal because the resolution of AK and SA is not sufficient to use the area as signal. For AS, the calibration function was linear between 9.5 and 130.0 $\mu\text{g L}^{-1}$, for AK from 2.2 to 600.0 $\mu\text{g L}^{-1}$, and for SA from 3.0 to 600.0 $\mu\text{g L}^{-1}$, these being the analytical signals collected at the wavelength of the maxima for each sweetener. The adjustment of the analytical data was carried out by linear regression, using the lack-of-fit test to test the linearity (7 replicates of each standard and 5 standards for each calibration function). The standard deviation of the background signal measured for the blank, which is necessary for the estimation of the IUPAC detection limit ($K = 3$) and the quantification limit ($K = 10$) (Analytical Methods Committee, 1988 3011 /id), was taken as the average of ten determinations and noted as RSD units. Table 1 shows these and other analytical parameters. The sampling frequency is 7 h^{-1} . The proposed method shows satisfactory results for quantification of each sweetener in the presence of different ratios of the co-existing sweeteners. Six sweetener mixtures with ratios in the range 1:20 to 20:1 for AS, between 1:120 to 120:1 for AK and SA were added at levels of 10 to 130 $\mu\text{g L}^{-1}$ for AS, at levels of 2 to 600 $\mu\text{g L}^{-1}$

for AK and at levels of 3 to 600 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for SA. Recovery of sweeteners was in the range of 103.8% to 101.4% for AS, 98.2% to 102.5% for AK and of 97.6% to 103.4% for SA, with mean recovery of 102.6% for AS, 100.4% for AK and 100.5% for SA.

Table 1

Analytical applications

The proposed method was applied to different beverages and food samples, which contain the sweeteners under study, commonly found in different supermarkets in the town of Granada (Spain). Some of the commercial products contain the three sweeteners, but most commonly, the samples contained only one of them or at most, binary mixtures. We chose these samples in order to evaluate all the possibilities in binary mixtures, and, when possible, the ternary sweetener mixtures. The presence of the sweeteners is indicated on the label, and demonstrated by the comparison with the HPLC retention times.

When AS was not present in the sample, the treatment of sample was very simple (see Treatment of Samples). When AS was present in the sample, we applied an extraction method developed by us. The sample needs to be purified in order to obtain a clean FIA record. Because AS is weakly retained, it is eluted next to the front, and, consequently, non-retained substances present in the sample cause interference with the AS signal. Therefore, samples with AS need to be purified. As is usual with HPLC, it is not necessary to purify the sample (most papers only degas and dilute the sample{Galletti, 1996 4599 /id;Hannisdal, 1992 4118 /id}) and we have developed a clean-up procedure for samples containing AS. The clean-up is based on solid phase extraction. Different SPF cartridges were tested for retention of AS and AK but we were not able to find one cartridge for this purpose that shows good recoveries. In the end, we selected two different cartridges, one for each sweetener: Namely with the anion exchange cartridges Oasis MAX (hydrophilic-lipophilic-balanced water-wettable copolymer) for the retention of AS, although not for AK; and Isolute SAX 500 mg (silica quaternary amine based) in which AK is strongly retained while AS is weakly retained. For both cartridges we worked in conditions to obtain a good anionic retention (samples were conditioned with the same conditions as the FIA carrier). For the elution of analytes from cartridges, several eluents were tested in order to obtain the correct eluent. For Isolute SAX, water did not elute AK and so, it was selected as the cleaning solution, while the carrier did so, because of its composition, and consequently was selected as the eluent for AK. For AS, several hydro-methanolic carriers (from 10 % to 100 %) were tested in order to study the AS elution behaviour. Water did not elute it and then it was also selected as cleaning solution. An increase in the MeOH percentage, increases the elution power for AS, finding that MeOH 90% elutes AS from the column completely, and so it was used as eluent. Working in these conditions, the recovery found for both sweeteners was near 100%. It is possible to use both cartridges in series in order to shorten the analysis time.

There is another possibility for measuring samples containing AS and AK using only one cartridge, but two injections were necessary. Firstly, the sample (degassed, diluted, filtered and conditioned like the carrier) was injected in the flow system in order to measure the AK. Next, the previously injected sample was subject to a further purification to measure AS using an Oasis MAX cartridge (conditioned, cleaned and eluted as indicated before). Both measurement methods were viable, and tested with good results, but in the end, the first (with one injection and two cartridges) was selected because it is faster.

Additionally, the results obtained by the proposed procedure were validated by statistical comparison with a reference method HPLC method{Lawrence, 1988 86 /id} (Table 2). This table includes the mean values from 3 determinations of each sample, standard deviations of these measurements and the probability value (P_{val}) of the test used for the comparison of the results obtained for both methods. As can be observed, the results obtained with both methods are statistically similar.

Table 2

The proposed method shows several advantages against the usual HPLC procedure: it uses very simple, fast instrumentation that is cheaper and has similar precision. The disadvantage is that the other procedure has a better resolution than our procedure, as expected with HPLC, although ours is sufficient for determination.

CONCLUSION

An optical flow-through multianalyte method has been developed for aspartame, acesulfame-K and sodium saccharine mixtures using a commercial ion-exchanger monolithic disk in the flow as the basis for separation. A simple FIA configuration with a single channel, with no previous derivatization reaction of the analytes, makes separation possible in disk based on the transient retention of AK and SA while AS is very weakly retained. This paper provides a practical, simple, rapid and inexpensive method for the simultaneous determination of AS-AK-SA mixtures at $\mu\text{g mL}^{-1}$ levels which may be employed in routine analysis. The method described here makes it possible to analyse this high potency sweetener mixture in commercial samples. The results were chemometrically validated and compared with an HPLC reference method. The results are good enough, but the method is limited by the choice of monolithic support. The limit is due to fact that the properties of the monolithic support are not the best to couple it to a flow system (such as its dimensions, for example). Currently, we are working on the development of new monolithic supports, with the aid of specialised personnel.

ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge financial support from the *Ministerio de Educación y Cultura, Dirección General de Enseñanza Superior* (Spain) (Projects CTQ2005-09060-CO2-01 and CTQ2005-09060-CO2-02).

REFERENCES

1. Valcárcel, M.; Luque de Castro, M.D. *Flow-Through (Bio)Chemical Sensors*, Elsevier Science B.V.: 1994.
2. Ortega Barrales, P.; Dominguez Vidal, A.; Fernández de Córdoba, M.L.; Molina-Díaz, A. Simultaneous determination of thiamine and pyridoxine in pharmaceuticals by using a single flow-through biparameter sensor. *J.Pharm.Biomed.Anal.* 2001, 25, 619-30.
3. Ruedas Rama, M.J.; Ruiz Medina, A.; Molina-Díaz, A. Use of a solid sensing zone implemented with unsegmented flow analysis for simultaneous determination of thiabendazole and warfarin. *Anal.Chim.Acta* 2002, 459, 235-43.
4. Capitan-Vallvey, L.F.; Valencia Miron, M.C.; Arana Nicolas, E.; Garcia-Jimenez, J.F. Resolution of an intense sweetener mixture by use of a flow injection sensor with on-line solid-phase extraction. *Anal.Bioanal.Chem.* 2006, 385, 385-91.

5. Fernández de Córdova, M.L.; Ortega Barrales, P.; Rodríguez Torne, G.; Molina-Díaz, A. A flow injection sensor for simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim by using Sephadex SP C-25 for continuous on-line separation and solid phase UV transduction. *J.Pharm.Biomed.Anal.* 2003, *31*, 669-77.
6. Capitán-Vallvey, L.F.; Valencia Miron, M.C.; Arana Nicolas, E. Solid-phase ultraviolet absorbance spectrophotometric multisensor for the simultaneous determination of butylated hydroxytoluene and co-existing antioxidants. *Anal.Chim.Acta* 2004, *503*, 179-86.
7. Capitán-Vallvey, L.F.; Valencia Miron, M.C.; Arana Nicolas, E. Simple resolution of butylated hydroxyanisole and n-propyl gallate in fatty foods and cosmetics samples by flow-injection solid-phase spectrophotometry. *J.Food Sci.* 2003, *68*, 1595-99.
8. Ayora Cañada, M.J.; Pascual-Reguera, M.I.; Molina-Díaz, A.; Capitán-Vallvey, L.F. Solid-phase UV spectroscopic multisensor for the simultaneous determination of caffeine, dimenhydrinate and acetaminophen by using partial least squares multicalibration. *Talanta* 1999, *49*, 691-701.
9. Ortega-Algar, S.; Ramos-Martos, N.; Molina-Díaz, A. A flow-through fluorimetric sensing device for determination of [alpha]- and [beta]-naphthol mixtures using a partial least-squares multivariate calibration approach. *Talanta* 2003, *60*, 313-23.
10. Connolly, D.; Victory, D.; Paull, B. Rapid, low pressure, and simultaneous ion chromatography of common inorganic anions and cations on short permanently coated monolithic columns. *J.Sep.Sci.* 2004, *27*, 912-20.
11. Cabrera, K. Applications of silica-based monolithic HPLC columns. *J.Sep.Sci.* 2004, *27*, 843-52.
12. Satinsky, D.; Solich, P.; Chocholous, P.; Karlíček, R. Monolithic columns-a new concept of separation in the sequential injection technique. *Anal.Chim.Acta* 2003, *499*, 205-14.
13. Zeng, H.L.; Li, H.F.; Wang, X.; Lin, J.M. Development of a gel monolithic column polydimethylsiloxane microfluidic device for rapid electrophoresis separation. *Talanta* 2006, *69*, 226-31.
14. Pelletier, S.; Lucy, C.A. Achieving rapid low-pressure ion chromatography separations on short silica-based monolithic columns. *J.Chromatog.A* 2006, *1118*, 12-18.
15. Victory, D.; Nesterenko, P.; Paull, B. Low-pressure gradient micro-ion chromatography with ultra-short monolithic anion exchange column. *Analyst* 2004, *129*, 700-01.

16. Capitán-Vallvey, L. F. Intense Sweeteners. *Handbook of Food Analysis*, 2 ed.; Marcel Dekker Inc.: New York, 2004, 1643-1739.
17. Lehr, M.; Schmid, W. Solid-phase extraction in the determination of sweeteners in foods by HPLC. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 1993, 89, 43-45.
18. Hannisdal, A. Analysis of acesulfame-K, saccharin and preservatives in beverages and jams by HPLC. *Z.Lebensm.Unters.Forsch.* 1992, 194, 517-19.
19. Baranowska, I.; Zydron, M.; Szczepanik, K. TLC in the analysis of food additives. *J.Planar Chromatogr.--Mod.TLC* 2004, 17, 54-57.
20. Schnierle, P.; Kappes, T.; Hauser, P.C. Capillary electrophoretic determination of different classes of organic ions by potentiometric detection with coated-wire ion-selective electrodes. *Anal.Chem.* 1998, 70, 3585-89.
21. Boyce, M.C. Simultaneous determination of antioxidants, preservatives and sweeteners permitted as additives in food by mixed micellar electrokinetic chromatography. *J.Chromatog.A* 1999, 847, 369-75.
22. Rucevic, Marijana, Clifton, James G., Huang, Feilei, Li, Xuesong, Callanan, Helen, Hixson, Douglas C., and Josic, Djuro. Use of short monolithic columns for isolation of low abundance membrane proteins. *J.Chromatog.A* 2006, 1123, 199-204.
23. Vodopivec, Martina, Podgornik, Ales, Berovic, Marin, and Strancar, Ales. Characterization of CIM monoliths as enzyme reactors. *J.Chromatog.B* 2003 795, 105-113.
24. Podgornik, Helena and Podgornik, Ales. Characteristics of LiP immobilized to CIM monolithic supports. *Enzyme Microb. Technol.* 2002, 31, 855-861.
25. Jerman, Sergej, Podgornik, Ales, Cankar, Katarina, Cadez, Neza, Skrt, Mihaela, Zel, Jana, and Raspor, Peter. Detection of processed genetically modified food using CIM monolithic columns for DNA isolation. *J. Chromatog.A* 2005, 1065, 107-113.
26. Gupalova, T.V.; Lojkina, O.V.; Palagnuk, V.G.; Totolian, A.A.; Tennikova, T.B. Quantitative investigation of the affinity properties of different recombinant forms of protein G by means of high-performance monolithic chromatography. *J. Chromatogr.A* 2002, 949, 185-93.
27. Capitán-Vallvey, L.F.; Valencia Miron, M.C.; Gutiérrez del Moral, G. Método de control electromecánico de válvulas rotatorias para la inserción y mezcla de fluidos. Patent no. ES2079308, 1996.
28. Lawrence, J.F.; Charbonneau, C.F. Determination of seven artificial sweeteners in diet food preparations by reverse phase liquid chromatography with absorbance detection. *J.Assoc.Off.Anal.Chem.* 1988, 71, 934-37.

29. Analytical Methods Committee. Use (Proper and Improper) of Correlation Coefficients. *Analyst* 1988, 113, 1469.
30. Galletti, G.C.; Bocchini, P. High-performance liquid chromatography with electrochemical detection of aspartame with a post-column photochemical reactor. *J.Chromatog.A* 1996, 729, 393-98.

Table 1. Analytical performance for AS, AK and SA flow methods

Parameters	Units	AS	AK	SA
		205 nm	226 nm	205 nm
b	mL · μg ⁻¹	6.26 · 10 ⁻³	2.91 · 10 ⁻³	3.42 · 10 ⁻³
S _b	mL · μg ⁻¹	9.12 · 10 ⁻⁵	2.22 · 10 ⁻⁶	3.24 · 10 ⁻⁶
a	-----	2.58 · 10 ⁻²	3.62 · 10 ⁻³	-3.63 · 10 ⁻³
S _a	-----	6.08 · 10 ⁻³	7.43 · 10 ⁻⁴	1.17 · 10 ⁻³
R ²	-----	99.83	99.99	99.99
LRD	μg mL ⁻¹	9.5 – 130.0	2.2-600.0	3.0-600.0
DL	μg mL ⁻¹	2.9	1.0	0.9
QL	μg mL ⁻¹	9.5	0.7	3.0
RSD	%	1.46	0.08	0.09

b: slope; S_b : standard deviation slope; a: intercept; S_a : standard deviation intercept; r: correlation coefficient; PL: Probability level lack-of-fit test; LRD: Linear range dynamic; DL: Detection limit; QL: Quantification limit; RSD: Relative standard deviation.

Table 2. Results obtained for the mixture by reference and proposed methods*

Sample	AS/ mg L ⁻¹			AK/ mg L ⁻¹			SA/ mg L ⁻¹		
	Proposed method*	Reference method*	P-value (%)	Proposed method*	Reference method*	P-value (%)	Proposed method*	Reference method*	P-value (%)
Cola light 1	252 ± 7.74	254 ± 7.77	79.93	66 ± 1.33	67.2 ± 0.38	6.53			
Cola light 2	62 ± 2.08	58 ± 2.59	13.23	126 ± 1.36	125 ± 1.30	53.08			
Fruit Juice	144 ± 6.08	141 ± 4.35	51.69	31 ± 1.58	32.5 ± 0.42	24.47			
Apple Juice	34.5 ± 0.92	34.6 ± 0.13	88.33	30.2 ± 0.58	29.44 ± 0.01	15.92	17.2 ± 0.39	16.81 ± 0.05	30.26
Black tea	31 ± 1.48	33 ± 1.01	62.84	56.6 ± 0.68	56.1 ± 0.11	27.97			
Tonic water				243 ± 1.72	245 ± 1.04	12.02	57.8 ± 0.40	55 ± 1.98	9.04
Orange drink				118 ± 1.90	116.8 ± 0.32	32.34	55.8 ± 0.59	56.10 ± 0.05	41.07
Water				36 ± 1.12	37.3 ± 0.12	22.17			
Orange drink				255 ± 1.74	254.2 ± 0.28	62.53			
Soda							93 ± 2.92	92 ± 1.31	61.68
Tomato sauce**				105.4 ± 0.68	106.0 ± 0.47	38.14	54 ± 1.11	54.05 ± 0.05	73.07
Strawberry Sweets*				156 ± 2.45	156.9 ± 0.32	50.48	161 ± 2.10	161.9 ± 0.49	78.97

* Mean of three determinations ± SD. **Results are expressed in mg L⁻¹, except in the case of tomato sauce and strawberry sweets which are expressed in mg Kg⁻¹.

Figure captions

Figure 1. pH dependence on the retention time of AS. Samples have the same conditions as the carrier. Conditions: HCl at different pH, sample loop 125 μL , flow rate 1.0 mL min^{-1} , AS concentration 10 $\mu\text{g L}^{-1}$, NaClO_4 concentration 0.01 M. Error bars coming from three replicate measurements.

Figure 2. A) Evolution of the resolution of AK-SA and the analysis time with the NaCl concentration. Conditions: pH 9.0 Tris buffer 0.03 M, NaCl variable, analyte concentration 10 $\mu\text{g L}^{-1}$. B) Evolution of the resolution of AK-SA and the analysis time with the NaClO_4 concentration. Conditions: pH 9.0 TRIS buffer 0.03 M, NaClO_4 variable, analyte concentration 10 $\mu\text{g L}^{-1}$. Error bars coming from three replicate measurements.

Figure 3. Optimisation of flow rate: evolution of analysis time. Conditions: pH 9.0 Tris buffer 0.03 M, 0.4 M NaCl, 0.005 M NaClO_4 , analyte concentration 10 $\mu\text{g L}^{-1}$, flow-rate variable. Error bars coming from three replicate measurements.

Figure 4. Evolution of the resolution (R_s) of AK and SA and the bandwidth ($t_{1/2}$) with the loop volume. Conditions: pH 9.0 Tris buffer 0.03 M, 0.4 M NaCl, 0.005 M NaClO_4 , analyte concentration 10 $\mu\text{g L}^{-1}$, flow rate 2.0 mL min^{-1} , loop volume variable. Error bars coming from three replicate measurements.

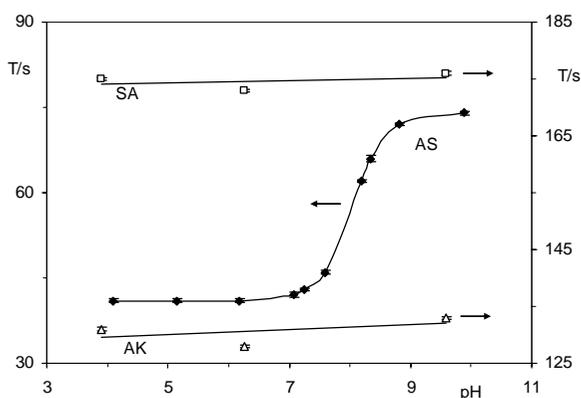


Figure 1

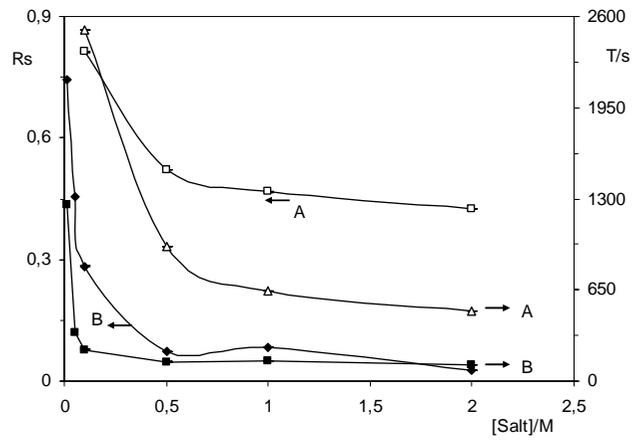


Figure 2

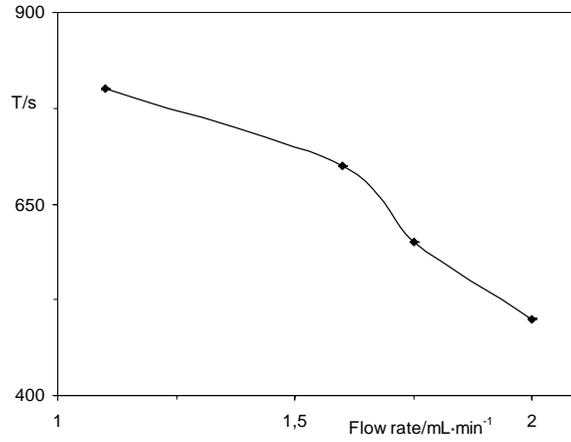


Figure 3

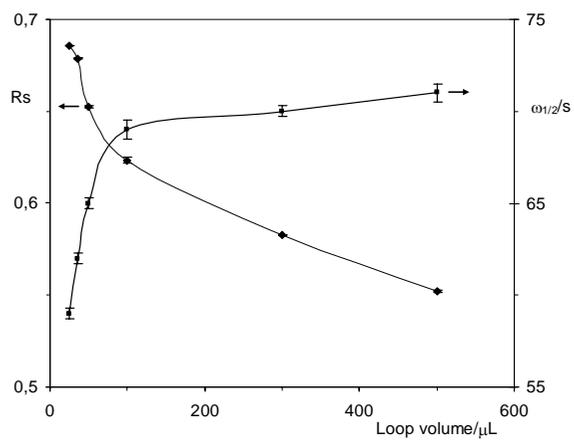


Figure 4

IMPROVING SEPARATION BY COUPLING MONOLITHIC COLUMNS WITH FLOW INJECTION TECHNIQUE. ANALYSIS OF ANTIOXIDANTS

J.F. García-Jiménez, M.C. Valencia and L.F. Capitán-Vallvey
Solid Phase Spectrometry Research Group, Department of Analytical Chemistry,
Campus Fuentenueva, Faculty of Sciences, University of Granada,
E-18071 Granada, Spain.

Abstract

New multiparameter methods for the determination of three common antioxidants (propylgallate (PG), butylhydroxyanisole (BA) and butylhydroxytoluene (BT)) have been developed. The procedure is based on the different retention of the antioxidants on a short monolithic silica-based reverse phase minicolumn (5 mm long). Due to the wide variety of polarities of the analytes, we use two different carriers (carrier A methanol/water 42% and carrier B methanol/water 70%) changed by means of a selection valve. In these conditions the combination of both carriers was able to separate the analytes in only 85 seconds. The applicable concentration range, the detection and the relative standard were: for PG, from 2.77 to 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 0.005 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 2.84 %; for BA, between 1.51 and 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 0.05 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and 2.70 %; and for BT, between 1.65 and 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 0.0005 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and 2.22 %. The method was applied and validated satisfactorily for the determination of PG, BA and BT in food and cosmetic samples, comparing results against an HPLC reference method.

*Contact information for Corresponding Author

L. F. Capitán-Vallvey, Department of Analytical Chemistry. Faculty of Sciences. University of Granada. 18071. Granada (Spain). Telephone: +34 958248436; Fax: +34 958243328; E-mail: lcapitan@ugr.es

Key words. Antioxidants determination; Flow-through optical sensor; Propylgallate, butylhydroxyanisole and butylhydroxytoluene mixture; monolithic minicolumn; Foods and cosmetics

INTRODUCTION

In some cases, the use of liquid chromatography like HPLC or UPLC with their high separation potential is not necessary. There are a high number of real situations where the number of analytes is not high and simpler solutions can be used, as with flow injection procedures (FIA). The resolutions of binary mixtures of analytes based on this scheme have been usually accomplished in different ways: 1) Separation using an on-line minicolumn placed just before the flow cell next to the transient retention of analytes in the solid phase filling this flow cell. Both solid phases, minicolumn and flow cell can be the same or different {Ortega Barrales, 2001 4115 /id; Ruedas Rama, 2002 4114 /id; Capitán-Vallvey, 2006 4565 /id}; 2) use of a minicolumn to retain one analyte along with retention of this analyte once it is eluted in the solid phase filling the flow cell, while the second is measured when it flows among the interstitial solution through the particles {Fernández de Córdoba, 2003 4111 /id}; 3) use of the differences in the transient retention of both analytes in the flow cell. The transient retention of one analyte in

the upper part of the flow cell, away from the measuring area, makes it possible to measure the one that is less retained and thus its resolution {Capitán-Vallvey, 2004 4122 /id;Capitán-Vallvey, 2003 4123 /id}; 4) use of a chemometric approach without separation of the analytes prior to the detection step {Ayora Cañada, 1999 2018 /id;Ortega-Algar, 2003 2145 /id}.

The use of short columns filled with large particulated solids to minimize the pressure drops results in cheaper methods but with low resolution power, usually no more than two analytes. A good alternative could be the insertion of monolithic columns in the FIA setup. A monolithic material is a continuous piece of a macroporous material (as much organic polymers as silica-based) obtained by polymerization of monomers. The resulting high permeable monolith exhibits a three-dimensional network with a high superficial area with mesopores (1 – 8 μm) for retention and macropores, i.e. larger channels (0.5 – 2 μm diameter) for through-flow and its functionality can be tailored according their use {Kobayashi, 2006 4553 /id}. They are available in different formats (disks or columns) and present good efficiency and low pressure drops. Their high permeability and short length enable good separations at low pressure which is necessary in flow injection analysis.

Relatively recent materials {Calleja, 2003 2716 /id;Cabrera, 2004 4192 /id} have found a wide application in separation sciences, such as in chromatography including GC, HPLC, and CEC {Svec, 2003 4555 /id} both in conventional instruments and in microfluidic devices {Zeng, 2006 4556 /id}. They have also been implemented in non-chromatographic applications such as solid-phase extraction (SPE) and preconcentration {Svec, 2006 4558 /id}.

The main goal of this study was to develop a simple setup consisting of an FIA scheme with a monolithic column applied to the analysis of three common antioxidants, namely butylated hydroxytoluene (3,5-di-tert-butyl-4-hydroxytoluene; E-321) (BT), butylated hydroxyanisole (2- and 3-tert-butyl-4-hydroxyanisole; E-320) (BA) and n-propylgallate (3,4,5-trihydroxybenzoic acid n-propyl ester; E-310) (PG), which are frequently used in food and cosmetics to prevent oxidation. The second goal of this work was the characterization and validation of this procedure by comparison with HPLC and its application in commercial foods and cosmetics.

Different approaches have been used to determine antioxidant mixtures in foods and cosmetics {Diaz, 2004 4570 /id}. HPLC using UV {Sasaki, 2003 4593 /id;Perrin, 2002 4592 /id} or electrochemical detection {Ruiz, 1999 4573 /id;Riber, 2000 4577 /id} is the technique of choice for those compounds, although EC also offers good results {Delgado-Zamarreno, 2006 4594 /id;Guan, 2005 4595 /id}. The use of derivatization reactions makes it possible to analyze antioxidants by gas chromatography {Gonzalez, 1998 4574 /id} and gas chromatography-mass spectrometry {Facino, 1997 4575 /id}. Voltammetric methods have also been employed for phenolic antioxidant mixtures in connection with chemometric techniques {Ni, 2000 4567 /id;Ceballos, 2000 4568 /id;Galeano Diaz, 1998 4569 /id}. Kinetic methodology also offers a way to determine synthetic antioxidant mixtures in foods and cosmetics {Paz Aguilar-Caballo, 2000 4576 /id}. Flow injection analysis with electrochemical detection has been used for BHA - PG mixtures in foods {Riber, 2000 4577 /id}. Additionally, we have studied the resolution of binary antioxidant mixtures using FIA schemes using flow cells filled with solid supports {Capitán-Vallvey, 2003 4123 /id;Capitán-Vallvey, 2004 4122 /id} which results in procedures with good analytical characteristics but with low resolution capacity.

The flow approach used in this paper to determine common antioxidant mixtures based on the use of very short monolithic columns (5 mm) makes it possible to develop simple and inexpensive methodology for the analysis of antioxidants that do not need derivatization reactions or complicated flow schemes.

EXPERIMENTAL

Reagents and Chemicals

All chemicals used were of analytical-reagent grade. Aqueous solutions were prepared using reverse-osmosis type quality water produced by a Milli-RO 12 plus Milli-Q purification system (Millipore, Bedford, MA).

Butylated hydroxyanisole (BA) (1000.0 mg L⁻¹) (Fluka, Madrid, Spain, 98.8 %), n-propylgallate (PG) (1000.0 mg L⁻¹) (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, Spain, ≥98%) and butylated hydroxytoluene (BT) (1000.0 mg L⁻¹) (Fluka, 99 %) stock solutions were prepared by exact weighing of each compound and dissolution in methanol (Lab-Scan, Dublin, Ireland, 99.9 % v/v HPLC grade). Those solutions were spectrophotometrically stable when protected from light and kept in the refrigerator at 5°C for at least two months. Working solutions were prepared by appropriate dilutions with water while maintaining 42 % (v/v) methanol in all instances.

For the column, Chromolith guard cartridges RP-18 endcapped (5mm×4.6mm I.D.) with cartridge holder (Merck, Darmstadt, Germany) was used. As carrier solutions methanol (HPLC grade Lab-Scan)/water mixture and acetonitrile (Panreac Química S.A., Barcelona, Spain, HPLC-gradient grade)/water mixtures at different ratios were used. All the solutions were filtered through 0.45 µm GH Polypro hydrophilic polypropylene membrane filters (Pall Corporation, New York, USA) prior to use.

Apparatus and Software

The absorption measurements were made with a Hewlett Packard HP-8453 diode array spectrophotometer (Nortwalk, CT, USA), interfaced to a Pentium MMX 200 microcomputer via an HP IB interface board, and equipped with a Hellma 138-QS flow glass cell with 1 mm light path. The monolithic minicolumn was included in the flow line, before the flow cell, which was placed in the cell compartment of the spectrophotometer. A Hewlett-Packard 1100 series liquid chromatograph with DAD detector provided with a C₈ Zorbax column was used to validate the proposed method.

The flow analysis set-up consisted of a Gilson Minipuls-2 four channel peristaltic pump working at a constant flow-rate and two variable volume Rheodyne 5041 teflon rotary valves controlled electromechanically by a method developed in our laboratory. This set-up was interfaced using RS-232C interfaces to a microprocessor. PTFE tubing (Omnifit, Cambridge, England) (0.8 mm i.d. and 1.6 mm o.d.) and various end-fittings and connectors of different diameters (Omnifit also) were used.

As software for the acquisition and manipulation of the spectral data, the UV visible Chemstation software package supplied by HP was used. Software programs used for the treatment of the data were: Statgraphics software package, ver.6.0 STSC Inc. Statistical Graphics Corporations, USA, 1993 and CSW32 v 1.3.3 1999-2001, Microsoft Office 2003.

Procedures

Basic Procedure

The sample solution (50 µL) containing a mixture of PG, BA and BT in concentrations comprising between 2.77 to 300 µg mL⁻¹ for PG, between 1.51 to 300 µg mL⁻¹ for BA and between 1.65 to 100 µg mL⁻¹ for BT is inserted into the flow analysis system (through an injection valve), with the same composition as the carrier. The carrier stream (42% MeOH:H₂O v/v) at a flow-rate of 2.4 mL min⁻¹ is changed from 42% to 70% methanol thirty seconds after the injection valve is opened through the selection valve. When the sample plug reaches the monolithic minicolumn, the analytes are separated according to their polarity. The first analyte to be detected is PG (retention time 15 s at 273 nm), followed by BA (47 s at 288 nm) and BT (74 s at 279 nm). Then the flow system is conditioned with the carrier A for 85 s. The relationship between the concentration and peak area is established by conventional calibration with external standards.

Reference procedure

As reference method, an adaptation of the HPLC-DAD method proposed by Perrin and Meyer {Perrin, 2002 4592 /id} was used. A 5 μm C_8 silica in a 150 x 4.6 mm column was used as a stationary phase. As a mobile phase a gradient ranging from 72% of carrier A (water at pH 3.0 acidified with phosphoric acid 1% v/v) and 28% of carrier B (methanol/acetonitrile 1/1) to 10% of carrier A and 90 % of carrier B at a constant flow rate of 1.0 mL min^{-1} was used. The chromatograms were acquired at a wavelength of 273 nm for PG, 288 nm for BA and 279 nm for BT. In order to obtain the calibration functions, 5 different concentration levels and 3 replicates of each one of the standards were analysed using peak area as the analytical parameter.

Treatment of samples

The proposed procedure was applied to the antioxidant analysis in foods (chicken bouillon cubes, dehydrated soups, gum) and in cosmetics (body oil). For the analysis of body oil, an adequate amount (typically 25 g) was diluted with 100 mL of hexane. The solution was extracted with 20 mL of methanol 70 % (v/v) three times for 10 minutes each. The three combined hydroalcoholic extracts were filtered through a Millipore filter of 0.25 μm and were finally levelled to 100 mL. The Basic Procedure was then applied.

For the analysis of gum, an adequate amount (typically 5 g) was weighed and finely cut in order to improve the contact surface with the solvent, and treated with magnetic stirring with 25 mL of methanol three times for 10 minutes each. Then the combined extracts were centrifuged at 2500 rpm for 15 minutes, rotaevaporated and re-solved with 25 mL of methanol. Then the Basic Procedure was applied.

For the analysis of bouillons and dehydrated soups, an adequate amount (typically 5 g) was weighed, crushed, homogenised, and extracted with 25 mL of hexane/2-propanol (1/1) three times for ten minutes each. The combined extracts were centrifuged at 2500 rpm for 15 minutes, and re-extracted another three times with 25 mL of methanol each. The combined methanolic extracts were rotaevaporated and diluted up to 10 mL with methanol. As above the Basic Procedure was then applied.

RESULTS AND DISCUSSION

Variables

We have previously worked with different FIA systems coupled with minicolumns packed with large particulate solids {Capitán-Vallvey, 2000 1305 /id;Capitan-Vallvey, 2006 4565 /id}, but these systems have two disadvantages: high back pressure and low separative power. An increase in the separative power through the increase in the column length could lead to an increase in the pressure drop across the columns, in such a way that avoids the use of peristaltic pumps. The main aim of this study is to explore the possibilities offered by short silica-based monolithic columns for the separation of organic compounds using an FIA scheme. As monolithic separative minicolumn we selected the Chromolith commercial guard cartridges (C_{18} reverse phase silica 5 mm in length and 4.6 mm diameter). Working with this very short column we were able to solve the usual problem with using low-pressure pumps such as peristaltic pumps {Pelletier, 2006 4560 /id}, as is our case, for separations on monolithic columns. In this case the system back pressure was reduced using tubing with 0.8 mm i.d. and the maximum flow rate attained was 2.4 mL min^{-1} .

Eluent conditions

With reverse phase materials the main variable that influences the elution order is the composition of the carrier used, which is usually composed of a buffer to adjust the pH and a percentage of organic solvent to adjust the polarity. In this specific case, the pH, studied between 2 and 6, is not relevant because the analytes under study are not pH dependent. We tested as carriers different hydro-organic mixtures, obtaining the best results with ACN/water and MeOH/water mixtures.

Figure 1 shows the retention behaviour with carrier composition for both mixtures. In all cases the values plotted are the retention times and are the average of three replicates. The bars represent the appearance time of the peak, i.e., the time passed between the injection and the return to the baseline. The standards were diluted with the same hydro-organic percentage as the carrier. The behaviour of the analytes followed their order according to their polarity (PG>BA>BT). However, their big differences in polarity make it impossible to obtain a good resolution within a reasonable analysis time.

Figure 1

The use of ACN/MeOH/H₂O ternary mixtures was studied by settling the percentage of one component and modifying the two others, obtaining the results shown in Figure 2. From prior results we adjusted the MeOH percentage to a constant 30% and studied the behaviour of the analytes in different carriers ranging between 10 and 70% ACN. The antioxidant standards were prepared with the same carrier composition each time and only when the water percentage was higher than 60% did the analytes begin to precipitate. Figure 2A shows that with an ACN percentage of 20% the resolution between PG and BA decreases below 1.5, so, those peaks overlap. In these conditions, with an ACN percentage lower than 20%, the analysis times is greater than 1000 s and an increase in the constant MeOH percentage up to 40% results in shorter retention times but greater overlapping.

Additionally, the use of a constant 10% of MeOH (Figure 2B) was studied up to 40% water due to the precipitation of analytes. In this case, percentages of ACN higher than 70% decreased the resolution between PG and BA to below 1.5, with the analysis time in this specific case (70% ACN) being 900 s. As a conclusion, it is not possible separate the three antioxidants by using the ternary carriers cited with good resolution and short analysis time.

Figure 2

To reduce the analysis time we changing the carrier composition during the FIA analysis, although not in a continuous way (gradient elution type) but changing from one carrier to another with less polarity through a selection valve. According to the results of the study of binary mixture carriers (Figure 1), the two most polar antioxidants (PG and BA) can be separated with enough resolution using mixtures MeOH/water up to 45% MeOH. We selected 42% MeOH as carrier A because it is the highest percentage that permits a good resolution between PG and BA. The carrier B composition needed for the elution of the least polar analyte (BT) was another MeOH/water mixture in order to minimize the baseline alteration due to the change of the carrier in the analysis run. The MeOH percentage and the time of change (CT) of the carrier B were two interrelated parameters. Figure 3 shows the retention time for all three analytes with methanol percentage at 80 s changing time from carrier A to carrierB, because this time is enough to remove BA from the column.

At a first glance, it seems that a carrier B with 80% methanol is the best option, but the carrier change produces a baseline distortion, similar to a chromatographic ghost peak. This distortion overlaps strongly with the BT signal and for this reason we chose a 70% methanol/water as the optimum carrier B composition.

Figure 3

The effect of the change time from carrier A to carrier B was studied between 19 and 80 s (Figure 4). With short CT values the baseline modification could affect BA or even PG signals. On the contrary, large CT values increased the analysis time. We selected 30 s as working CT because the baseline alteration appears just after the BA signal and before, as can be expected, the BT signal.

Figure 4

The FIA variables are flow rate and loop volume. The flow rate was varied between 1.3 and 2.4 mL min⁻¹ using the same concentration of analytes because higher flow rates are difficult to achieve. We did not use lower flow rates because our main objective was to obtain the quickest possible method. Because of the inclusion of the monolithic column in the flow line, the back pressure increases, but the maximum flow rate reachable with and without column is practically the same. As could be expected, the retention time decreases when the flow rate increases (Figure 5). Additionally, the area decreases (16.5 % for BT, 16.2 for BA and 15.8 for PG), the peak height is scarcely modified (+6.5 % for BT, -6.4% for BA, and +1.1 % for PG), the bandwidth at the middle of the peak decreases (13.8 % for BT, 22.9 % for BA and 11.0 for PG) and the asymmetry factor remains practically constant. Thus, a flow-rate of 2.4 mL min⁻¹ was selected because the analysis time is the shortest (85 seconds).

Figure 5

An increase in the sample volume, studied between 10 and 250 µL, means an increase, as could be expected, in the analytical signal for all the analytes as a result of the larger amount of analytes in the flow system. The retention time suffers a slight increase when loop volume increases (3.1 % for BT, 5.0 % for BA and 1.2 % for PG). The analytical signal in the area increases 8.3 % for BT, 14.9 % for BA and 20.1 % for PG, and in FIA the height increases 11.6 % for BT, 13.3 % for BA and 18.2 % for PG. The bandwidth is practically not affected (it increases 1.9 % for BT, 8.1 % for BA and 3.6 % for PG), and the asymmetry factor increases 14.8 % for BT, 29.7 for BA and 4.7 % for PG. Thus, we selected 50 µL as the optimum sample volume, because it is the greatest volume (and thus represents the biggest analytical signal) that does not reduce the asymmetry of the peaks with a retention time that is not very high.

Analytical features

The area of the FIA peak was used as the analytical signal because it shows better analytical features than height (Table 1). For PG, the calibration graph was linear from 2.77 to 300 µg mL⁻¹, for BHA from 1.51 to 300 µg mL⁻¹, and for BHT from 1.65 to 100 µg mL⁻¹ when analytical signals were collected at the wavelength of the maxima for each of them (Figure 6). The adjustment of those analytical data was carried out by linear regression, with the lack-of-fit test applied to test the linearity (three replicates of each standard and ten standards for each calibration graphs). The standard deviation of the background signal measured for the blank, which is necessary for the estimation of the IUPAC detection limit ($K = 3$) and the quantification limit ($K = 10$) (Analytical Methods Committee, 1988 3011 /id), was taken as the average of ten determinations and noted as RSD units. Table 1 shows the analytical parameters for the proposed procedure. The sampling frequency is 36 h⁻¹. The proposed method shows satisfactory results for quantification of each antioxidant in the presence of different ratios of the co-existing antioxidant. Eleven antioxidant mixtures with ratios in the range 1:100 to 100:1 were added at levels of 3 to 300 mg L⁻¹ for PG, and at levels of 1.5 to 300 mg L⁻¹ for BA and BT. Recovery of antioxidants was in the range of 100.3% to 105.3% for PG, and 97.3% to 101.6% for BA and of 98.5% to 102.5% for BT, with mean recovery of 102.9% for PG, 99.8% for BA and 100.5% for BT.

Table 1

Figure 6

Applications

The proposed flow-through method was applied to the determination of antioxidants in foods (chicken bouillons, dehydrated soups, gum) and cosmetics (body oil), obtained from different supermarkets in the town of Granada (Spain). These commercial products contain two antioxidants (PG and BT in the body oil; BA and BT in the chewing gum and dehydrated soup and PG and BA in bouillon cube). In order to check the method we powered one of these (bouillon cubes) with the antioxidant that does not contain (BT).

Of the different extracting procedures proposed in literature for extraction of antioxidants in foods and cosmetic commercial products, we selected that indicated by Perrin and Meyer (Perrin, 2002 4592 /id) with minor modifications and described in the *Treatment of Samples* section. We demonstrated that the extraction step used gives quantitative results through the addition of known amounts of each antioxidant. The recovery experiments produced results ranging between 95.4 and 98.2 % for PG, between 96.0 and 98.4% for BA and between 95.18 and 96.5 % for BT (using area). Table 2 shows the results obtained using the proposed procedure with an HPLC procedure (Perrin, 2002 4592 /id) used as a reference. This table includes the mean values from 3 determinations of each sample, standard deviations of these measurements and the probability value (P_{val}) of the test used for the comparison of the results (P-value) obtained for both methods. As can be seen, the results obtained for both methods are statistically similar.

The proposed method shows several advantages against the usual HPLC procedure; it uses very simple, fast instrumentation that is cheaper and has similar precision. The disadvantage is that the other procedure has a better resolution than our procedure, as expected with HPLC, although ours is sufficient for determination.

Conclusion

The coupling of a short monolith column (5 mm) with an FIA manifold results in a interesting approach to implement the separation step in low-pressure flow methods. The FIA method with monolithic column was developed successfully for the determination of three common antioxidants, PG, BA and BT at $\mu\text{g mL}^{-1}$ level in food and cosmetics products and it may be employed in routine analysis. The procedure is based on the transient retention of the analytes on a C_{18} silica monolithic column placed on-line in the flow set-up. The use of an intrinsic property of the antioxidants, as is UV absorption, next to a short silica based monolithic column makes it possible to separate and determine the antioxidants with a simple single channel FIA configuration without any prior derivatization reaction.

The FIA method presented here has several advantages over the usual chromatographic methodologies. The main advantage is the possibility of performing the analysis without expensive instrumentation like HPLC. Other advantages are the short analysis time, low consumption of organic solvents and low cost per analysis. The drawbacks of this methodology concern to its limited capacity for separation due to the column length.

ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge financial support from the *Ministerio de Educación y Cultura, Dirección General de Enseñanza Superior* (Spain) (Projects CTQ2005-09060-CO2-01 and CTQ2005-09060-CO2-02).

REFERENCES

1. P. Ortega Barrales, A. Dominguez Vidal, M.L. Fernández de Córdoba and A. Molina-Diaz, *J.Pharm.Biomed.Anal.*, 25 (2001) 619.
2. M.J. Ruedas Rama, A. Ruiz Medina and A. Molina-Diaz, *Anal.Chim.Acta*, 459 (2002) 235.
3. L.F. Capitan-Vallvey, M.C. Valencia Miron, E. Arana Nicolas and J.F. Garcia-Jimenez, *Anal.Bioanal.Chem.*, 385 (2006) 385.
4. M.L. Fernández de Córdoba, P. Ortega Barrales, G. Rodriguez Torne and A. Molina-Diaz, *J.Pharm.Biomed.Anal.*, 31 (2003) 669.
5. L.F. Capitán-Vallvey, M.C. Valencia Miron and E. Arana Nicolas, *Anal.Chim.Acta*, 503 (2004) 179.
6. L.F. Capitán-Vallvey, M.C. Valencia Miron and E. Arana Nicolas, *J.Food Sci.*, 68 (2003) 1595.
7. M.J. Ayora Cañada, M.I. Pascual-Reguera, A. Molina-Diaz and L.F. Capitán-Vallvey, *Talanta*, 49 (1999) 691.
8. S. Ortega-Algar, N. Ramos-Martos and A. Molina-Diaz, *Talanta*, 60 (2003) 313.
9. H. Kobayashi, T. Ikegami, H. Kimura, T. Hara, D. Tokuda and N. Tanaka, *Anal.Sci.*, 22 (2006) 491.
10. G. Calleja, R. Van Grieken and J.A. Melero, *Anal.Quim.*, Octubre-Diciembre (2003) 31.
11. K. Cabrera, *J.Sep.Sci.*, 27 (2004) 843.
12. F. Svec, *LC-GC Europe*, 16 (2003) 24.
13. H.L. Zeng, H.F. Li, X. Wang and J.M. Lin, *Talanta*, 69 (2006) 226.
14. F. Svec, *J.Chromatog.B*, 841 (2006) 52.
15. T.G. Diaz, A.G. Cabanillas, *Food Science and Technology* (New York, NY, United States), 138 (2004) 1577.
16. T. Sasaki, K. Ogushi, T. Miyano, M. Nakashima, Y. Fukuda, M. Yamana, Y. Sueda, O. Yamamoto, S. Matsui and H. Hasegawa, *Hiroshima-shi Eisei Kenkyusho Nenpo*, 22 (2003) 40.
17. C. Perrin, L. Meyer, *Food Chem.*, 77 (2002) 93.
18. M.A. Ruiz, E. Garcia-Moreno, C. Barbas and J.M. Pingarron, *Electroanal.*, 11 (1999) 470.
19. J. Riber, C. de la Fuente, M.D. Vazquez, M.L. Tascon and P. Sanchez Batanero, *Talanta*, 52 (2000) 241.
20. M.M. Delgado-Zamarreno, I. Gonzalez-Maza, A. Sanchez-Perez and R. Carabias Martinez, *Food Chem.*, 100 (2006) 1722.

21. Y. Guan, Q. Chu, L. Fu and J. Ye, *J.Chromatog.A*, 1074 (2005) 201.
22. M. Gonzalez, E. Ballesteros, M. Gallego and M. Valcarcel, *Anal.Chim.Acta*, 359 (1998) 47.
23. R.M. Facino, M. Carini, G. Aldini, C. Marinello, P. Traldi and R. Seraglia, *Rap.Commun.Mass Spec.*, 11 (1997) 1329.
24. Y. Ni, L. Wang and S. Kokot, *Anal.Chim.Acta*, 412 (2000) 185.
25. C. Ceballos, H. Fernandez, *Food Res.Intern.*, 33 (2000) 357.
26. T. Galeano Diaz, A. Guiberteau Cabanillas, M.F. Alexandre Franco, F. Salinas and J.C. Vire, *Electroanal.*, 10 (1998) 497.
27. M. Paz Aguilar-Caballos, A. Gomez-Hens and D. Perez-Bendito, *J.Agric.Food Chem.*, 48 (2000) 312.
28. L.F. Capitán-Vallvey, M.C. Valencia Miron and E. Arana Nicolas, *Fresenius J.Anal.Chem.*, 367 (2000) 672.
29. S. Pelletier, C.A. Lucy, *J.Chromatog.A*, 1118 (2006) 12.
30. Analytical Methods Committee, *Analyst*, 113 (1988) 1469.

Table 1. Analytical parameters for the mixtures BHA, BHT and PG

Parameter	Height			Area		
	PG	BA	BT	PG	BA	BT
	273 nm	288 nm	279 nm	273 nm	288 nm	279 nm
b	$2.71 \cdot 10^{-3}$	$1.42 \cdot 10^{-3}$	$3.72 \cdot 10^{-4}$	20.56	7.91	7.17
S _b	$2.90 \cdot 10^{-5}$	$3.84 \cdot 10^{-5}$	$5.16 \cdot 10^{-6}$	0.17	0.05	0.07
a	$9.69 \cdot 10^{-3}$	$4.47 \cdot 10^{-3}$	$3.21 \cdot 10^{-4}$	-58.79	-9.28	1.69
S _a	$3.38 \cdot 10^{-3}$	$3.38 \cdot 10^{-3}$	$2.14 \cdot 10^{-4}$	16.94	6.15	3.24
R ² (%)	99.56	97.37	99.71	99.78	99.84	99.81
PL (%)	9.70	6.82	10.81	42.20	49.74	15.98
LDR ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	3.42 to 300	4.52 to 300	4.80 to 100	2.77 to 300	1.51 to 300	1.65 to 100
DL ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0.51	0.71	1.65	0.005	0.05	0.0005
QL ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	3.42	4.52	4.80	2.77	1.51	1.65
RSD (%)	3.81	2.96	2.53	2.84	2.70	2.22

b Slope; S_b Standard Deviation of Slope; a Intercept; S_a Standard Deviation of Intercept; R Correlation Coefficient; PL Probability level of lack-of-fit test; LDR Limit Dynamic Range; DL detection limit; QL Quantification Limit; RSD Relative Standard deviation.

Table 2. Results obtained by proposed and reference procedures in foods and cosmetic samples

Sample	PG / mg kg ⁻¹ ; S / %			BA / mg kg ⁻¹ ; S / %			BT / mg kg ⁻¹ ; S / %		
	Proposed Method	Reference Method	P-value (%)	Reference Method	Proposed Method	P-value (%)	Proposed Method	Reference Method	P-value (%)
Body oil	53.7; 0.22	54.1; 0.50	12.19	----	----	----	505.0; 0.67	504.60; 0.04	83.26
Chewing gum	----	----	----	24.2; 0.37	24; 1.43	35.60	139; 1.70	139; 1.30	78.43
Dehydrated soup 1	273.3; 0.42	273.9; 0.55	65.66	143; 2.68	143; 2.52	96.80	----	----	----
Dehydrated soup 2	263; 1.55	266.5; 0.35	18.53	257; 3.35	258; 2.51	80.66	----	----	----
One-minute soup	11; 3.30	11; 3.01	89.20	27; 2.59	27; 2.67	97.37	----	----	----
Bouillon cube	36; 2.70	36; 4.64	79.37	24; 3.12	24; 1.24	73.67	----	----	----
Bouillon cube spiked with BT*	36; 1.30	35.9; 0.23	21.45	24; 1.80	24; 1.22	51.12	197; 1.66	194.1; 0.51	10.22

* Spiked with 200 mg kg⁻¹

Figure captions

Figure 1: Variation of the retention time vs. % MeOH. Conditions: carrier: variable methanol percentage. Standards: 50 µg mL⁻¹ of all antioxidants. Flow rate: 1.5 mL min⁻¹. Loop volume: 500 µL. Arrows indicates the axis.

Figure 2: Retention time with ternary carriers ACN/MeOH/water. A. At 10 % MeOH constant. B. At 30 % MeOH constant. Conditions: 50 µg mL⁻¹ of all antioxidants. Flow rate: 1.5 mL min⁻¹. Loop volume: 500 µL.

Figure 3: Dependence on the retention time of the percentage of carrier B at constant change time 80 s. Conditions: carrier A: 42 % methanol/water, carrier B: variable, from 60 % to 80 % of methanol/water. Change time: 80 s. Standards: 50 µg mL⁻¹ of all antioxidants. Flow rate: 1.5 mL min⁻¹. Loop volume: 500 µL.

Figure 4: Dependence on the retention time of the change time (CT) from carrier A to carrier B. Conditions: carrier A: 42 % methanol/water, carrier B: 70 % of methanol/water. Change time: variable. Standards: 50 µg mL⁻¹ of all antioxidants. Flow rate: 1.5 mL min⁻¹. Loop volume: 500 µL.

Figure 5: Influence of the flow-rate on the retention time of the antioxidants. Conditions: carrier A: 42 % methanol/water, carrier B: 70 % of methanol/water. Change time: 30 s. Standards: 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of all antioxidants. Flow rate: variable. Loop volume: 500 μL .

Figure 6. Diagram at 5 concentration levels for PG, BA and BT in the conditions given in Basic Procedure.

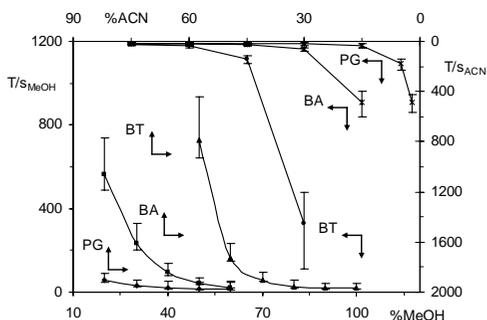


Figure 1

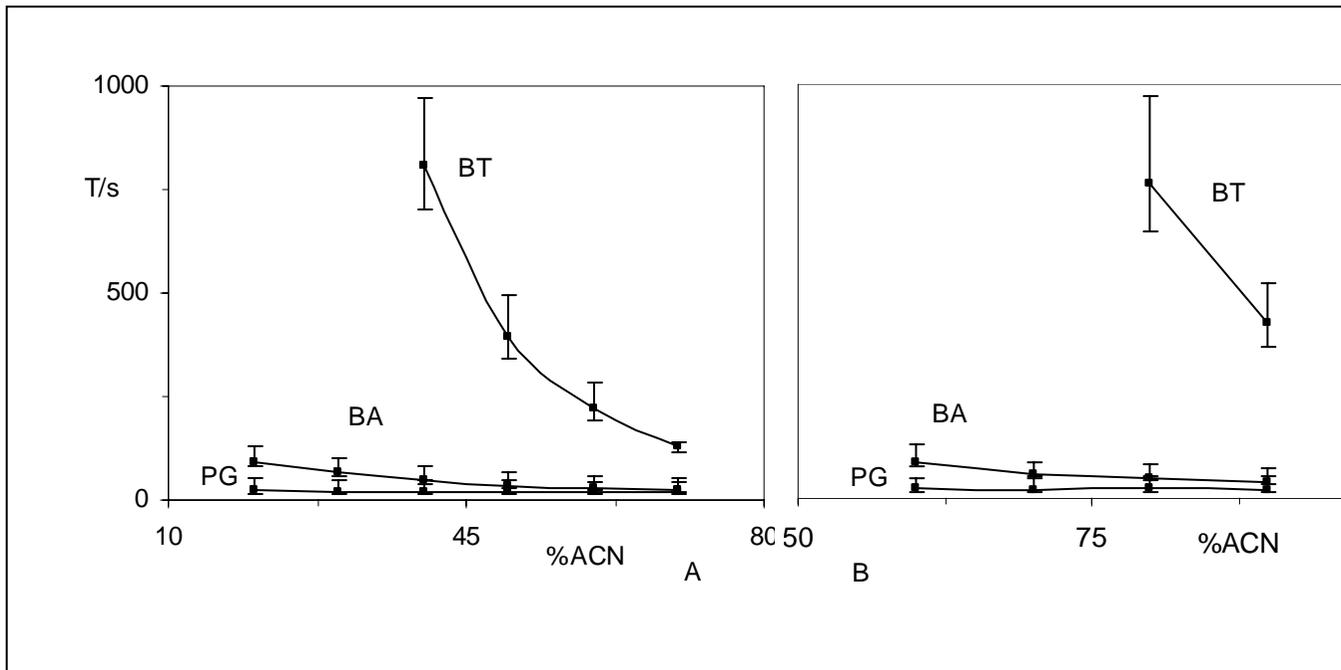


Figure 2

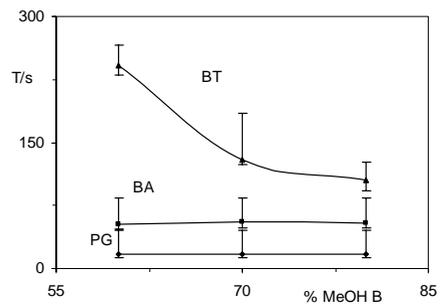


Figure 3

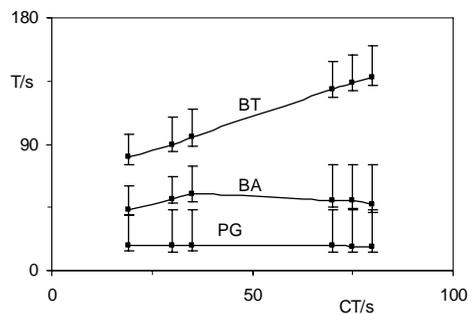


Figure 4

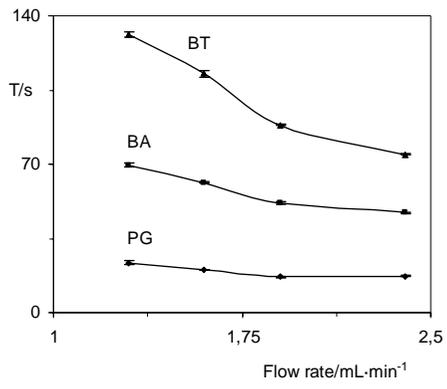


Figure 5

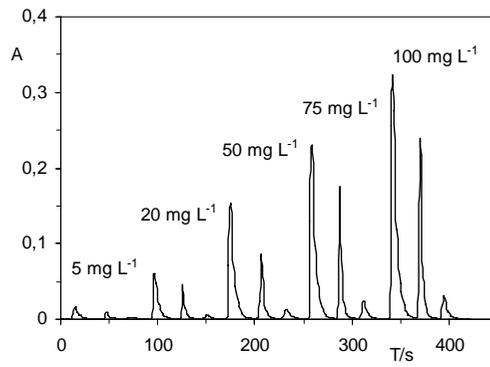


Figure 6

ANALYSIS OF PARABENS IN COSMETIC PRODUCTS BY FLOW INJECTION ANALYSIS COUPLED TO A MONOLITHIC COLUMN

J.F. García Jiménez, M.C. Valencia and L.F. Capitán-Vallvey
Solid Phase Spectrometry Research Group, Department of Analytical Chemistry,
Campus Fuentenueva, Faculty of Sciences, University of Granada,
E-18071 Granada, Spain.

Abstract

A new application of monolithic columns is presented in this paper, the development of a flow-through procedure for the determination of four parabens (methylparaben (MP), ethylparaben (EP), propylparaben (PP) and butylparaben (BP)). The procedure is based on the different retention of the parabens on a monolithic reverse phase column. The separation is carried out using two carriers, A and B, consisting of a mixture of ACN:water in different proportions. The described procedure is able to separate the analytes in only 150 seconds. The applicable concentration range, the detection and the relative standard deviation were the following: for MP from $1.61 \cdot 10^{-5}$ M to $1.07 \cdot 10^{-3}$ M; $4.83 \cdot 10^{-4}$ M; 0.65 %; for EP between $3.74 \cdot 10^{-5}$ M to $1.97 \cdot 10^{-3}$ M; $1.12 \cdot 10^{-5}$ M; 1.21 %; for PP between $3.92 \cdot 10^{-5}$ M to $1.97 \cdot 10^{-3}$ M; $1.18 \cdot 10^{-5}$ M; 1.19 %; and for BT between $6.00 \cdot 10^{-5}$ M to $1.97 \cdot 10^{-3}$ M; $1.80 \cdot 10^{-5}$ M; 1.78 %. The method was applied and validated satisfactorily for the determination of these parabens in commercial cosmetics samples, comparing the results against an HPLC reference method.

Key words. Parabens determination; Flow injection procedure; methylparaben, ethylparaben, propylparaben and butylparaben mixture; monolithic minicolumn; Cosmetics

* Corresponding author. E-mail: lcapitan@ugr.es

INTRODUCTION

Parabens (alkyl esters of p-hydroxybenzoic acid) have been used as antimicrobial preservatives in foods, beverages, cosmetics and pharmaceuticals for many years{Kang, 1997 4749 /id} because of their effective antibacterial and antifungal activity, with methylparaben (MP) and propylparaben (PP) being the most commonly used parabens, especially given their synergistic effects{Kreuz, 1999 4739 /id}. The antimicrobial activities of the parabens seem to increase with the chain length, although those with a longer chain are less commonly used due to their lower solubility in water.

Their presence in cosmetics, especially for consumers that use them on a daily basis and in large quantities, can induce allergic contact dermatitis{Nettis, 2003 4753 /id; Schnuch, 2002 4754 /id}. Their use is regulated by Cosmetic Directive 76/768/EEC in amounts up to a maximum concentration of 0.4% in the finished product for 1 ester and up to 0.8% for mixtures of esters{Scientific Committee on Consumer Products, 2005 4755 /id}.

The most common procedures for the determinations of those preservatives rely on HPLC{Borremans, 2004 4737 /id;Zhang, 2005 4742 /id;Hajkova, 2002 4748 /id;Kang, 1997 4749 /id} although others such as capillary electrophoresis{Fujii, 2001 4738 /id} or flow injection analysis (FIA){Myint, 2004 4740 /id} have been reported.

FIA methods present many advantages versus other methods of analysis such as simplicity, cost, versatility, speed, and, usually, good analytical figures. FIA methods can include separative steps to improve their capabilities{Valcárcel, 1994 1718 /id}. Some of the separative FIA systems are based on solid phase supports placed on microcolumns before the flow cell{Fernández de Córdoba, 2003 4111 /id} or directly on the flow cell{Capitan-Vallvey, 2006 4565 /id;Ruedas Rama, 2002 4114 /id}. These FIA systems using solid supports have many problems such as irregular packing, high back pressure and low flow rates. One solution to these problems could be the use of monolithic columns.

Monoliths are continuous stationary phases that are cast as a homogeneous column in a single piece and prepared in various dimensions with agglomeration-type or fibrous microstructures. These relatively new types of separative materials{Calleja, 2003 2716 /id;Cabrera, 2004 4192 /id} are based on a high cross-linked porous monolithic polymer, with well-defined, bimodal pore-size distribution, providing excellent separation power and offering exceptional chemical stability and flow characteristics. They are characterized by flow-independent resolution separations and a flow-independent binding capacity, which allows high flow rates. They exhibit low backpressure, even at high flow-rates{Connolly, 2004 4598 /id;Cabrera, 2004 4192 /id;Satinsky, 2003 4561 /id;Zeng, 2006 4556 /id}.

Monolithic materials have found a wide application in separation sciences, such as in chromatography including GC, HPLC, and CEC{Svec, 2003 4555 /id} both in conventional instruments and in microfluidic devices{Zeng, 2006 4556 /id}. Also they have been used in flow techniques such as the sequential injection technique (SIA){Chocholous, 2006 4581 /id;Satinsky, 2003 4561 /id}. They have also been implemented in non-chromatographic applications such as solid-phase extraction (SPE) and preconcentration Svec, 2006 4558 /id}. To the best of our knowledge, there are very few reports of the use of monolithic columns in flow techniques for analysis, namely SIA, of some parabens, such as the naphazoline and methylparaben mixture{Chocholous, 2006 4581 /id}, ambroxol, methylparaben and benzoic acid{Satinsky, 2006 4583 /id} or methylparaben, propylparaben, and sodium diclofenac{Satinsky, 2003 4561 /id}.

The main goal of this study was to develop a simple setup consisting of a simple FIA scheme with a monolithic column applied to the analysis of four parabens, namely methylparaben, ethylparaben, propylparaben and butylparaben, which are frequently used in cosmetics as antimicrobial preservatives. The second objective was the characterization and validation of this procedure by comparison with HPLC and its application to cosmetics analysis.

EXPERIMENTAL

Reagents and Chemicals

All chemicals used were of analytical-reagent grade. Aqueous solutions were prepared using reverse-osmosis type quality water produced by a Milli-RO 12 plus Milli-Q purification system (Millipore, Bedford, MA, USA).

Methylparaben (MP) ($1.6 \cdot 10^{-2}$ M) (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, Spain, 99%), ethylparaben (EP) ($1.6 \cdot 10^{-2}$ M), propylparaben (PP) ($1.6 \cdot 10^{-2}$ M), and butylparaben (BP) ($1.6 \cdot 10^{-2}$ M) (last three from Fluka, Madrid, Spain, 99%) stock solutions were prepared by exact weighing of each compound and dissolution in acetonitrile (ACN) (Panreac Química S.A, Barcelona, Spain, 99.9 % v/v HPLC grade). These solutions were spectrophotometrically stable when protected from light and kept in the refrigerator at

5°C for at least two months. Working solutions were prepared by appropriate dilutions with water while maintaining 12 % (v/v) ACN in all instances.

The C₁₈ monolithic precolumn (Chromolith Guard Cartridge RP-18 endcapped) (5mm×4.6mm I.D.) used was from Merck (Merck & Co., Inc., Darmstadt, Germany). As carrier solutions methanol (HPLC grade Lab-Scan, Dublin, Ireland, 99.9 % v/v HPLC grade)/water mixture and acetonitrile/water mixtures at different ratios were used. All solutions were filtered through 0.45 µm GH Polypro hydrophilic polypropylene membrane filters (Pall Corporation, New York, USA) prior to use.

Apparatus and Software

Absorption measurements were made with Hewlett Packard HP-8453 diode array spectrophotometer (Nortwalk, CT, USA), interfaced to a Pentium MMX 200 microcomputer via an HP IB interface board, and equipped with a Hellma 138-QS flow glass cell with 1 mm light path. The monolithic mini column was included in the flow line, before the flow cell, which was placed in the cell compartment of the spectrophotometer. An Agilent 1100 series liquid chromatograph with DAD detector provided with a C₈ Zorbax column was used to validate the proposed method.

The flow analysis set-up consisted of a Gilson Minipuls-2 four channel peristaltic pump working at a constant flow-rate and two variable volume Rheodyne 5041 teflon rotary valves (one as injection valve and one as selection valve) controlled electromechanically by a method developed in our laboratory. PTFE tubing (Omnifit, Cambridge, England) (0.8 mm i.d. and 1.6 mm o.d.) and various end-fittings and connectors of different diameters (Omnifit also) were used.

As software for the acquisition and manipulation of the spectral data, the UV visible Chemstation software package supplied by HP was used. Software programs used for the treatment of the data were: Statgraphics software package, ver.6.0 STSC Inc. Statistical Graphics Corporations, USA, 1993 and CSW32 v 1.3.3 1999-2001, Microsoft Office 2003.

Procedures

Basic Procedure

The sample solution (50 µL) containing between $1.61 \cdot 10^{-5}$ M to $1.07 \cdot 10^{-3}$ M for MP, between $3.74 \cdot 10^{-5}$ M to $1.97 \cdot 10^{-3}$ M for EP, between $3.92 \cdot 10^{-5}$ M to $1.97 \cdot 10^{-3}$ M for PP and between $6.00 \cdot 10^{-5}$ M to $1.97 \cdot 10^{-3}$ M for BP was inserted into the analysis system, with the same acetonitrile percentage as the carrier (12 %) at a flow rate of 2.6 ml min⁻¹. The carrier composition was changed from 12 % ACN:H₂O (v:v) (carrier A) to 27% ACN:H₂O (carrier B) 75 s after the injection valve was opened, through the selection valve. The elution order was as to be expected, according to the polarity of the analytes: MP (29 s, detection wavelength 254 nm), EP (65 s, 254 nm), PP (104 s, 254 nm) and BP (125 s, 254 nm). When the last peak arrived at the baseline (150 s after the injection valve was opened) the flow system was conditioned with carrier A for 30 s. As analytical signal height or area can be used, although the use of area produces better analytical parameters. The relationship between the concentration and analytical parameter was established by conventional calibration with external standards.

Reference procedure

As reference method, an adaptation of the HPLC-DAD method proposed by Borremans et al. {Borremans, 2004 4737 /id} was used. A 5 µm C₈ silica in a 150 x 4.6 mm column with 5 µm as a stationary phase next to an isocratic mobile phase composed of water:acetonitrile:methanol:tetrahydrofuran (60:25:10:5) at a constant flow rate of 1.0 mL min⁻¹ were used. The chromatograms were obtained at a wavelength of 254 nm. In order to obtain the calibration function, 5 different concentration levels and 3 replicates of each of the standard solutions were analyzed using peak area as the analytical parameter.

Treatment of samples

The proposed procedure was applied to the analysis of parabens in cosmetics (hair foam, cleaning towels and cleaning gel). For the analysis of hair foam an adequate amount (typically 15 g) was weighed into an extraction flask, 1 mL of 1:1 HCl and 10 mL of saturated NaCl were added. The solution was extracted with 50 mL of diethyl ether three times for 10 minutes each. The three combined extracts were cleaned with saturated NaCl and then three times with 30 mL of $1 \cdot 10^{-2}$ g mL⁻¹ NaHCO₃. Then, the extract was dried with 10 g of Na₂SO₄, filtered, evaporated to dryness and then dissolved with ACN up to 50 mL (Myint, 2004 4740 /id).

For the analysis of cleaning towels, an adaptation of the procedure proposed by Saas *et al.* (Saad, 2005 4741 /id) was applied. An adequate amount (typically 3 g) was weighed and cut into strips to improve contact with the solvent. Then 25 mL of ACN were added and placed in an ultrasonic bath during 30 min at 50 °C. Then the mixture was filtered through 0.45 μm filters. Finally, the solution was evaporated to dryness and dissolved with 10 mL of ACN.

For the analysis of the cleaning gel an adequate amount (typically 1 g) was weighed, and diluted with 5 mL of MeOH. The solution was sonicated for 10 minutes and filtered through 0.45 μm filters (Zhang, 2005 4742 /id). An adequate amount of this filtrate was diluted to 10 mL and injected. The Basic Procedure was then applied to the samples. Samples were measured in triplicate and the mean peak area values were used for data acquisition.

RESULTS AND DISCUSSION

Variables

Alkyl hydroxybenzoates are absorbing species in the UV region and we used this intrinsic property to measure them. As expected, the molecular structure of parabens only differs in a methylene group while their UV spectra are identical with two maxima: one at 209 nm ($\epsilon=1.471 \cdot 10^4$ L mol⁻¹ cm⁻¹ for MP, $\epsilon=1.443 \cdot 10^4$ L mol⁻¹ cm⁻¹ for EP, $\epsilon=1.354 \cdot 10^4$ L mol⁻¹ cm⁻¹ for PP and $\epsilon=1.133 \cdot 10^4$ L mol⁻¹ cm⁻¹ for BP) and another at 254 nm ($\epsilon=1.572 \cdot 10^4$ L mol⁻¹ cm⁻¹ for MP, $\epsilon=1.556 \cdot 10^4$ L mol⁻¹ cm⁻¹ for EP, $\epsilon=1.503 \cdot 10^4$ L mol⁻¹ cm⁻¹ for PP and $\epsilon=1.231 \cdot 10^4$ L mol⁻¹ cm⁻¹ for MP) in ACN. Therefore, the resolution of a mixture of the four parabens selected by means of flow analysis requires a separation module.

We previously studied the resolution of the binary mixtures of the antioxidants butylated hydroxytoluene, n-propyl gallate, and butylated hydroxyanisole (Capitán-Vallvey, 2003 4123 /id; Capitán-Vallvey, 2004 4122 /id) using FIA systems. The methods are based on the different residence times of each antioxidant in the flow cell packed to a height of 25 mm with silica C₁₈. These systems have two disadvantages: low efficiency and high pressure drop. We can improve the efficiency of the separation using a minicolumn placed before the flow cell, but the increase in the amount of solid support also increases the pressure drop, which can hinder the use of normal peristaltic pumps. The aim of this study is to explore the possibilities offered by commercial monolithic columns for the separation of four parabens using an FIA scheme.

As monolithic column we selected a commercial Chromolith RP-18 guard column (5mm in length and 4.6mm in diameter). With these very short columns we can solve the problem derived for the use of low-pressure pumps (like peristaltic pumps) (Pelletier,

2006 4560 /id}. Additionally, the system back pressure was minimized using tubing with 0.8 mm i.d., even working at high flow-rates (2.6 mL min⁻¹).

Eluent conditions

Normally, with reverse phase columns, the main factors in the separation of the analytes are column and carrier composition. Once the monolithic column is selected, the main variable that influences the elution order is the composition of the carrier used, which is usually composed of a buffer to adjust the pH and a percentage of organic solvent to adjust the polarity. The analytes studied here, parabens, are molecules that are not pH dependent, therefore, pH (studied between 2 and 6) is not a decisive variable. Consequently, we tested different hydro-organic mixtures as carrier, obtaining the best results with ACN/water and MeOH/water mixtures. The retention behaviour of the analytes was studied for both mixtures (MeOH:water and ACN:water) as seen in Figure 1.

Figure 1

In all cases, the values plotted were the mean of three replicates and include the appearance time and the time when the signal returns to the baseline, information represented as errors bars. The retention time behaviour of analytes, for each carrier composition, as expected, is according to their polarity: MP<EP<PP<BP (the more methylene groups the molecule has, the bigger its retention time). Comparing both carriers, we conclude that the ACN carrier is stronger than the MeOH carrier. So, ACN was selected because with a lower percentage of ACN we can obtain the same results, reducing its waste in the environment. The resolution of the four analytes is possible working in isocratic mode, but the analysis time is too long (up to 900 s). The first solution tested was to increase the flow rate. We tested six levels between 1.5 and 3.0 mL min⁻¹.

Figure 2

Figure 2 shows that even at the highest flow rate tested of 2.6 mL min⁻¹, the analysis time is too high (up to 600 s). However, as the resolution of the separated analytes are independent of the flow rate, as is usual with monolithic columns, we selected 2.6 mL min⁻¹ as working flow rate.

In order to reduce the analysis time, we try to speed up the elution of the analytes by decreasing the polarity of carrier, that is, increasing the ACN percentage in the carrier. This was performed by changing the carrier composition during the FIA analysis through an injection valve used as a selection valve. According to the results shown in Figure 1, the most polar analytes (MP and EP) can be separated with a carrier composed of an ACN percentage ranging from 10% to 30%. We carefully studied this composition interval at seven levels concluding that 12% ACN was the maximum ACN percentage to achieve a good resolution (R_s up to 1.2) of MP and EP, the two first analytes that leave the column. Thus, the carrier A composition was fixed to 12% ACN:water. Due to the fact that any change during the run of analysis produces an alteration in the signal, the carrier B composition was another ACN:water mixture in order to minimize this alteration. The carrier B composition must be fitted at the same time as another important parameter: the time of change (CT) from carrier A to carrier B. To select the optimum CT, two parameters have to be considered: the time that EP needs to be eluted from the column (80 s) and the appearance of the baseline alteration. Thus, we fixed the CT at 75 s so that a constant alteration of the baseline would appear right between the EP and PP peaks.

Next, the ACN percentage of carrier B was studied between 15 and 30% at nine different levels. At a first glance (Figure 3), it seems that a carrier B with 30% ACN is the best choice, but the carrier change produces a baseline distortion, similar to a chromatographic ghost peak, that overlaps strongly with the PP signal. For this reason we chose ACN 27 %/ water as carrier B. The ghost peak using this selected carrier overlaps weakly with the PP signal; however, the PP can be measured without problems both in area and in height because the baseline alteration is a constant factor that only affects the intercept (when area

is used as analytical parameter). Working under these conditions (12% ACN in carrier A, 27% ACN in carrier B, 75 s CT and 2.6 mL min⁻¹) the analysis time is reduced to only 150 s, obtaining a complete resolution of the four analytes (Rs greater than 1.2 in all cases).

Figure 3

Ionic strength was studied by adding several quantities of NaCl to the carrier (ranging between 0 M and 0.25 M, six levels) in order to check if this affects the results. As can be expected, no variation was observed in retention times because the analytes under study are not ionic species and show only a very small dependence on ionic strength. However, little variation in the peak height was observed (for MP, PP and BP the height increases 2.1 %, 7.6 % and 7.6 %, respectively, and for EP it decreases 5.1 %). Moreover, the addition of common organic modifiers (triethylamine and acetic acid) did not improve the symmetry of peaks. The FIA variables studied were the flow-rate, previously mentioned (Figure 2) and loop volume. The loop volume studied ranged between 20 and 315 μ L (seven levels). As can be expected, when the loop volume is increased, the retention time (34.4% for MP, 22.5% for EP, 52.9% for PP and 47.7% for BP), height (73.4% for MP, 177.4% for EP, 267.0% for PP and 282.0% for BP), area (397.1% for MP, 415.5% for EP, 429.3% for PP and 427.6% for BP), bandwidth (193.3% for MP, 108.0% for EP, 42.9% for PP and 39.1% for BP) and analysis time (44.4%) will increase. We have to accept a compromise between these variables. In this case, the main factor to select the optimum loop is bandwidth (Figure 4), though we have to consider the signal and the analysis time. If we select a loop volume greater than 150 μ L the peaks will expand, resulting in strong overlapping. Thus, 50 μ L was selected as the loop volume because with this we obtain good values for analytical signal, analysis time and bandwidth.

Figure 4

Analytical features

MP, EP, PP and BP can be measured using area or height, but PP has a peculiarity: due to the change of carrier, the baseline alteration appears just before the PP signal, showing some overlapping with it. At first, it seems that only height can be used for the PP measurement, but, if we use area, both the analytical parameter and the linear regression are better than using height. The contribution due to the baseline alteration is low and constant, being almost negligible at the usual PP concentrations if we work with area. From the point of view of the analytical features, due to its constant value, it means a small intercept (see Table 1). So, we can use either area or peak height as the analytical signal. We selected area because it produces better analytical parameters for the method.

Figure 5

Table 1

For MP, the calibration graph was linear from $1.61 \cdot 10^{-5}$ to $1.07 \cdot 10^{-3}$ M, for EP it was from $3.74 \cdot 10^{-5}$ to $1.97 \cdot 10^{-3}$ M, for PP it was from $3.92 \cdot 10^{-5}$ to $1.97 \cdot 10^{-3}$ M and for BP it was from $6.00 \cdot 10^{-5}$ to $1.97 \cdot 10^{-3}$ M when the analytical signals were collected at the wavelength of the maxima (254 nm). The adjustment of those analytical data was carried out by linear regression, with the lack-of-fit test applied to test linearity (three replicates of each standard and thirteen standards for each calibration graph). The standard deviation of the background signal measured for the blank, which is necessary for estimating the IUPAC detection limit ($K = 3$) and the quantification limit ($K = 10$) (Analytical Methods Committee, 1988 3011 /id), was taken as the average of ten determinations and noted as RSD units. Table 1 shows the analytical parameters for the proposed procedure. The sampling frequency is approx. 20 h⁻¹. The proposed method shows satisfactory results for quantification of each paraben in the presence of different ratios of the co-existing parabens. Nine paraben mixtures with ratios in the range 1:250 to 250:1 were added at levels of $1.61 \cdot 10^{-5}$ M to $1.07 \cdot 10^{-3}$ M for MP, at levels of $3.74 \cdot 10^{-5}$ M to $1.97 \cdot 10^{-3}$ M for EP, at levels of $3.92 \cdot 10^{-5}$ M to $1.97 \cdot 10^{-3}$ M for PP and at levels of $6.00 \cdot 10^{-5}$ M to $1.97 \cdot 10^{-3}$ M for BP. The recovery of the parabens was in the range of 89.0 to 103.3 % for MP, of 91.2 to 100.6 %

for EP, of 93.7 to 101.4 % for PP and of 85.5 to 97.7 % for BP, with a mean recovery of 96.2 % for MP, 95.9 % for EP, 97.6 % for PP and 91.6 % for BP.

Analytical applications

The proposed method was applied to several cosmetic samples (hair foam, cleaning towels and cleaning gel) commonly found in different supermarkets in the town of Granada (Spain). Some of these commercial products contain three parabens (the cleaning towels) and others have all of them (the hair foam and the cleaning mousse). Thus, we tried recuperation assays with all the samples in order to test that the extraction methods were valid, adding the paraben to spike the sample.

Of the different extracting procedures proposed in the literature for extraction of parabens in cosmetic commercial products, we selected some {Saad, 2005 4741 /id;Myint, 2004 4740 /id;Zhang, 2005 4742 /id} with minor modifications as described in the *Treatment of Samples* section. We have demonstrated that the extraction step used gives quantitative results through the addition of known amounts of each paraben. The recovery experiments produced results ranging between 89.0 and 103.3 % for MP, between 91.2 and 100.6 % for EP, between 93.7 and 101.4 % for PP and between 85.5 and 97.7 % for BP (using area in all cases). Table 2 shows the results obtained using the proposed procedure and an HPLC reference procedure{Borremans, 2004 4737 /id}. This table includes the mean values from 3 determinations of each sample, standard deviations of these measurements and the probability value (P_{val}) of the test used to compare the results (P-value) obtained for both methods. As can be seen, the results obtained for both methods are statistically similar.

The proposed method shows several advantages against the usual HPLC procedure; it uses very simple, fast instrumentation that is cheaper and has similar precision. The drawbacks of this methodology concern its limited capacity for separation due to the column length, although it is enough for the determination of these parabens.

Table 2

Conclusion

In this paper we have proposed a flow method using DAD spectrophotometric detection for the simultaneous determination of the mixture of four parabens MP-EP-PP-BP using a simple FIA configuration of a single/double channel without the need for any prior derivatization reaction, using intrinsic analytical properties. This method is based on different transient retentions of the analytes on a 5-mm high C_{18} silica monolithic column and makes it possible to determine the first four parabens simultaneously.

The described method is practical, simple, rapid and inexpensive and can determine parabens at $\mu\text{g mL}^{-1}$ level in cosmetics products and may be employed in routine analysis. The results were chemometrically validated and compared with an HPLC reference method.

References

1. Kang S H, Kim H (1997) J Pharm Biomed Anal 15:1359-1364
2. Kreuz D M, Howard A L, Ip D (1999) J.Pharm.Biomed.Anal. 19:725-735

3. Nettis E, Marcandrea M, Colanardi M C, Paradiso M T, Ferrannini A, Tursi A (2003) *Allergy* 58:1304-1307
4. Schnuch A, Uter W, Geier J, Gefeller O (2002) *Contact Dermatitis* 47:32-39
5. Scientific Committee on Consumer Products. Extended Opinion on the Safety Evaluation of Parabens (2005).
SCCP/0873/05: 1-11
6. Borremans M, van Loco J, Roos P, Goeyens L (2004) *Chromatographia* 59:47-53
7. Zhang Q, Lian M, Liu L, Cui H (2005) *Anal.Chim.Acta* 537:31-39
8. Hajkova R, Solich P, Pospisilova M, Sicha J (2002) *Anal.Chim.Acta* 467:91-96
9. Fujii T, Kawabe S (2001) *Kawasaki Journal of Medical Welfare* 7:33-41
10. Myint A, Zhang Q, Liu L, Cui H (2004) *Anal.Chim.Acta* 517:119-124
11. Valcárcel M, Luque de Castro M D (1994) *Flow-Through (Bio)Chemical Sensors*, Elsevier Science B.V.:
12. Fernández de Córdova M L, Ortega Barrales P, Rodríguez Torne G, Molina-Díaz A (2003) *J.Pharm.Biomed.Anal.*
31:669-677
13. Capitan-Vallvey L F, Valencia Miron M C, Arana Nicolas E, Garcia-Jimenez J F (2006) *Anal.Bioanal.Chem.*
385:385-391
14. Ruedas Rama M J, Ruiz Medina A, Molina-Díaz A (2002) *Anal.Chim.Acta* 459:235-243
15. Calleja G, Van Grieken R, Melero J A (2003) *Anal.Quim.* Octubre-Diciembre:31-42
16. Cabrera K (2004) *J.Sep.Sci.* 27:843-852
17. Connolly D, Victory D, Paull B (2004) *J.Sep.Sci.* 27:912-920
18. Satinsky D, Solich P, Chocholous P, Karlicek R (2003) *Anal.Chim.Acta* 499:205-214

19. Zeng H L, Li H F, Wang X, Lin J M (2006) Talanta 69:226-231
20. Svec F (2003) LC-GC Europe 16:24-28
21. Chocholous P, Satinsky D, Solich P (2006) Talanta 70:408-413
22. Satinsky D, Huclova J, Ferreira R L C, Montenegro M C, Solich P (2006) J.Pharm.Biomed.Anal. 40:287-293
23. Saad B, Bari M, Saleh M I, Ahmad K, Talib M (2005) Journal of Chromatography, A 1073:393-397
24. Capitán-Vallvey L F, Valencia Miron M C, Arana Nicolas E (2003) J.Food Sci. 68:1595-1599
25. Capitán-Vallvey L F, Valencia Miron M C, Arana Nicolas E (2004) Anal.Chim.Acta 503:179-186
26. Pelletier S, Lucy C A (2006) J.Chromatog.A 1118:12-18
27. Analytical Methods Committee (1988) Analyst 113:1469

Table 1. Analytical parameters for the mixture MP-EP-PP-BP

Parameter	MP		EP		PP		BP	
	254 nm		254 nm		254 nm		254 nm	
	Height	Area	Height	Area	Height	Area	Height	Area
b/M ⁻¹	7.75 · 10 ²	5.94 · 10 ⁶	5.01 · 10 ²	5.71 · 10 ⁶	9.08 · 10 ²	5.45 · 10 ⁶	5.88 · 10 ²	5.78 · 10 ⁶
S _b /M ⁻¹	6.12	2.02 · 10 ⁴	6.08	2.55 · 10 ⁴	1.03 · 10 ¹	2.57 · 10 ⁴	9.05	4.04 · 10 ⁴
a	1.39 · 10 ⁻²	88.59	1.08 · 10 ⁻²	145.84	3.62 · 10 ⁻²	117.15	5.46 · 10 ⁻²	204.57
S _a	2.48 · 10 ⁻³	9.65	1.95 · 10 ⁻³	21.49	5.29 · 10 ⁻³	21.58	6.65 · 10 ⁻³	35.06
R ² /%	99.84	99.97	99.66	99.93	99.64	99.94	99.25	99.88
LDR/M	3.17 · 10 ⁻⁵ to 8.23 · 10 ⁻⁴	1.61 · 10 ⁻⁵ to 1.07 · 10 ⁻³	3.84 · 10 ⁻⁵ to 6.58 · 10 ⁻⁴	3.74 · 10 ⁻⁵ to 1.97 · 10 ⁻³	5.77 · 10 ⁻⁵ to 1.07 · 10 ⁻³	3.92 · 10 ⁻⁵ to 1.97 · 10 ⁻³	1.12 · 10 ⁻⁴ to 1.97 · 10 ⁻³	6.00 · 10 ⁻⁵ to 1.97 · 10 ⁻³
DL/M	6.73 · 10 ⁻⁴	4.83 · 10 ⁻⁴	1.15 · 10 ⁻⁵	1.12 · 10 ⁻⁵	1.73 · 10 ⁻⁵	1.18 · 10 ⁻⁵	3.37 · 10 ⁻⁵	1.80 · 10 ⁻⁵
QL/M	3.17 · 10 ⁻⁵	1.61 · 10 ⁻⁵	3.84 · 10 ⁻⁵	3.74 · 10 ⁻⁵	5.77 · 10 ⁻⁵	3.92 · 10 ⁻⁵	1.12 · 10 ⁻⁴	6.00 · 10 ⁻⁵
RSD/%	1.44	0.65	2.72	1.21	2.64	1.19	3.55	1.78

b Slope; S_b Standard Deviation of Slope; a Intercept; S_a Standard Deviation of Intercept; R Correlation Coefficient; PL Probability level test-lack-of-fit; LDR Limit Dynamic Range; DL detection limit; QL Quantification Limit; RSD Relative Standard deviation.

Table 2. Results obtained for the mixture by reference and proposed methods

Sample	MP/mg g ⁻¹ ; CV.(%)			EP/mg g ⁻¹ ; CV.(%)			PP/mg g ⁻¹ ; CV.(%)			BP/mg g ⁻¹ ; CV.(%)	
	Proposed method*	Reference method *	P-value (%)	Proposed method*	Reference method *	P-value (%)	Proposed method*	Reference method *	P-value (%)	Proposed method*	Reference method *
Air foam	0.5; 2.20	0.5; 3.26	92.31	0.1; 2.42	0.1; 0.89	6.73	0.06; 2.87	0.06; 1.92	19.67	0.2; 1.06	0.2; 0.84
Cleaning towels	0.7; 1.65	0.7; 1.90	23.65	0.2; 1.40	0.2; 1.26	66.10	0.2; 0.74	0.2; 1.01	92.35	-----	-----
Cleaning mousse	0.7; 0.81	0.7; 0.06	15.04	0.2; 1.09	0.2; 0.07	11.91	0.2; 2.31	0.2; 0.05	72.17	0.2; 4.82	0.2; 0.11

* Mean of three determinations \pm CV. The data are expressed in mg of paraben per gram of product.

Figure captions

Figure 1: Dependence of the retention time on the percentage of MeOH and CAN in different mixtures with water. All points are three replicates. Bars represent the appearance time (of the peak), the retention time and the outlet time. Conditions: carrier: variable MeOH and ACN percentage, respectively. Standards: diluted at the same carrier conditions, 12.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of all standards. Flow rate: 1.4 mL min^{-1} . Loop volume: 150 μL .

Figure 2: Variation of the retention time with the flow rate. Conditions: carrier: 12% ACN. Flow rate: variable. Standards: diluted with the same carrier conditions, 12.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of all standards. Loop volume: 150 μL .

Figure 3: Variation of the carrier B ACN percentage versus retention time. Conditions: carrier A: 12 % ACN, carrier B: variable. Flow rate: 2.6 mL min^{-1} . Standards: diluted at the same carrier conditions, 12.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of all standards. Loop volume: 150 μL .

Figure 4: Behaviour of the bandwidth with the increase of the loop volume. Conditions: carrier A: 12% of ACN, carrier B: 27% of ACN. Flow rate: 2.6 mL min^{-1} . Standards: diluted with the same carrier conditions, 12.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of all standards. Loop volume: variable.

Figure 5: Analytical at three levels of concentration: analytical signal for $3.3 \cdot 10^{-6}$ M for all standards, for $2.63 \cdot 10^{-4}$ M for all standards and for $6.6 \cdot 10^{-4}$ M for all standards. Conditions: carrier A: 12% of acetonitrile, carrier B: 27% of acetonitrile. Flow rate: 2.6 mL min^{-1} . Loop volume: 50 μL . The small baseline alteration appears just before the PP peak.

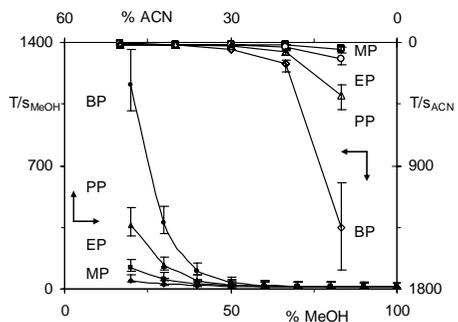


Figure 1

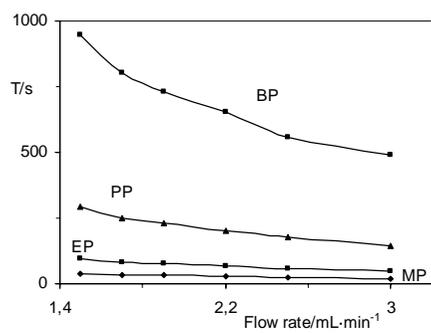


Figure 2

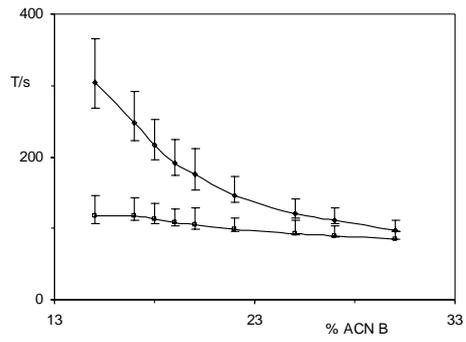


Figure 3

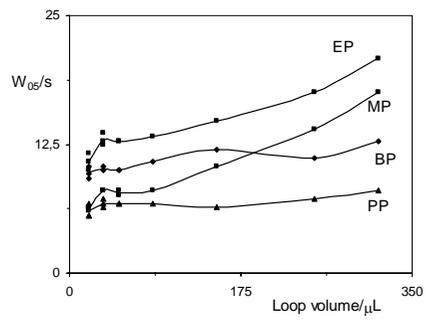


Figure 4

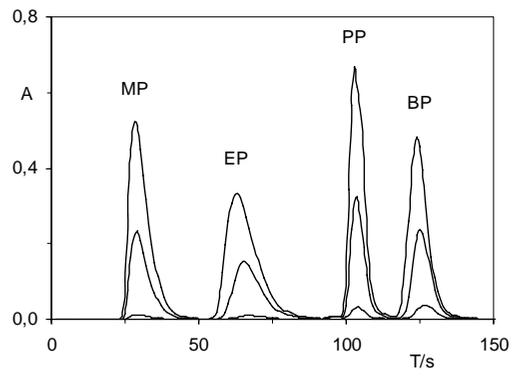


Figure 5

SIMULTANEOUS DETERMINATION OF ANTIOXIDANTS, PRESERVATIVES AND SWEETENER ADDITIVES IN FOOD AND COSMETICS BY FLOW INJECTION ANALYSIS COUPLED TO A MONOLITHIC COLUMN

J.F. García-Jiménez, M.C. Valencia and L.F. Capitán-Vallvey

*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, Campus Fuentenueva,
University of Granada, Granada 18071 (Spain).*

ABSTRACT

Today it is common to find samples with various additives from several families. This is the case of sweeteners, preservatives and antioxidants. We have selected a set of additives broadly used in foods and cosmetics with an ample variety of polarities, namely: aspartame (AS), acesulfame (AK)/saccharin (SA), metylparaben (MP), ethylparaben (EP), propylparaben (PP), butylparaben (BP), propylgallate (PG) and butylhydroxyanysole (BA). The monolithic column used as separative system is a 5 mm commercial precolumn of silica C18 coupled to a flow injection manifold working with a peristaltic pump. The mixture was separated in only 400 seconds with resolution factors greater than 1.2 in all cases. To achieve the separation in the FIA system we used two carriers: first, a mixture of acetonitrile/water buffered with 10 mM pH 6.0 phosphate buffer and second, a methanol:water mixture to improve the carrier strength and speed up the more apolar analytes at 3.5 mL min⁻¹. Detection is accomplished by means of a diode array spectrometer at the respective wavelength of each compound. The comparison of the analytical parameters obtained for this procedure with a standard HPLC method validates our new method, obtaining a method that is quick, with high repeatability and reproducibility and with good resolution between analytes. We have successfully applied the method to real food and cosmetics samples.

Keywords: Food and cosmetics analysis; Antioxidants; Preservatives; Intense sweeteners; Flow injection procedure; monolithic minicolumn

* Corresponding author; e-mail: lcapitan@ugr.es

INTRODUCTION

One of the current trends in the food and cosmetics industry is to mix several kinds of additives in order to obtain synergistic effects between them as with sweeteners, preservatives and antioxidants. Artificial sweeteners are found forming part of mixtures, bringing about a synergy of sweetness, which makes lower usage levels and a lower cost possible and can improve the overall sweet taste. This is the case, for example, with saccharin (1,2-benzisothiazol-3(2H)-one-1,1-dioxide; E-954) (SA) which presents a bitter metallic aftertaste that increases with concentration. One choice in order to reduce or eliminate this aftertaste is to blend SA with other sweeteners such as AS (N-L- α -aspartyl-L-phenylalanine-1-methyl ester; E-951) (AS) or acesulfame-K (6-methyl-1,2,3-oxathiazin-4(3H)-one-2,2-dioxide; E-950) (AK), creating a synergistic effect, making it possible to keep the concentration of saccharin below its bitterness threshold. Several methods have been developed to determine sweeteners in food and in some cosmetics, including FIA methods (García-Jiménez, 2006 4456 /id), HPLC (Matsumoto, 2006 4776 /id; Jia, 2005 4777 /id), ion chromatography (Zhu, 2005 4778 /id) and capillary electrophoresis (Herrmannova, 2006 4779 /id).

Preservatives, like parabens (alkyl esters of parahydroxybenzoic acid) are used as antimicrobial preservatives in foods, beverages, cosmetics and pharmaceuticals [Kang, 1997 4749 /id] because they present an effective antibacterial and antifungal activity. The antimicrobial activities of parabens seem to increase with the chain length, although they are less used due to their lower solubility in water. The more used mixture is methylparaben with propylparaben because it produces a synergic effect [Kreuz, 1999 4739 /id]. Parabens have been widely determined by several techniques such as HPLC [Saad, 2005 4741 /id; Borremans, 2004 4737 /id; Zhang, 2005 4742 /id; Hajkova, 2002 4748 /id; Kang, 1997 4749 /id], capillary electrophoresis [Fujii, 2001 4738 /id] or flow injection analysis (FIA) [Myint, 2004 4740 /id].

Antioxidants, like butylated hydroxytoluene (3,5-di-tert-butyl-4-hydroxytoluene; E-321) (BT), butylated hydroxyanisole (2- and 3-tert-butyl-4-hydroxyanisole; E-320) (BA) and n-propylgallate (3,4,5-trihydroxybenzoic acid n-propyl ester; E-310) (PG), are frequently used in food and cosmetics [Diaz, 2004 4570 /id] to retard lipid oxidation. They have been determined by many methods like HPLC using UV [Sasaki, 2003 4593 /id; Perrin, 2002 4592 /id] and electrochemical detection [Ruiz, 1999 4573 /id; Riber, 2000 4577 /id], EC [Delgado-Zamarreno, 2006 4594 /id; Guan, 2005 4595 /id]. On the other hand, the use of derivatization reactions makes it possible to analyze antioxidants by gas chromatography [Gonzalez, 1998 4574 /id] and gas chromatography-mass spectrometry [Facino, 1997 4575 /id]. Voltammetric methods have also been employed for phenolic antioxidant mixtures in connection with chemometric techniques [Ni, 2000 4567 /id; Ceballos, 2000 4568 /id; Galeano Diaz, 1998 4569 /id]. The kinetic methodology also offers a way to determine synthetic antioxidant mixtures in foods and cosmetics [Paz Aguilar-Caballos, 2000 4576 /id]. Flow injection analysis with electrochemical detection has been used for BA-PG mixtures in foods [Riber, 2000 4577 /id]. Additionally, we have studied the resolution of binary antioxidant mixtures using FIA schemes using flow cells filled with solid supports [Capitán-Vallvey, 2003 4123 /id; Capitán-Vallvey, 2004 4122 /id].

It is difficult to find samples which contains all of these additive families (sweeteners, antioxidants and preservatives), but it is common to find some with binary mixtures, such as sweeteners and preservatives. Some methods to determine complex additives mixtures have been developed. There are some HPLC methods [Zhao, 2005 4784 /id; Chen, 1995 4780 /id; Chen, 2001 4781 /id], EC methods [Frazier, 2000 4782 /id] and MEC methods [Boyce, 1999 4783 /id], but there are not any FIA methods, due to the complexity of the problem. We approach the analysis of this mixture by FIA including a monolithic minicolumn in the FIA manifold. In this way, we have solved a multianalyte complex mixture containing 8 analytes using a 5 mm length monolithic column coupled to a FIA system. The chosen analytes are: sweeteners (potassium acesulfame (AK), or alternatively sodium saccharin (SA), and aspartame (AS)), preservatives (methylparaben (MP), ethylparaben (EP), propylparaben (PP) and butylparaben (BP)) and antioxidants (propylgallate (PG) and butylhydroxyanisole (BA)). A second objective was the characterization and validation of this procedure by comparison with HPLC and its application to food and cosmetics analysis.

1.3. EXPERIMENTAL

Reagents and Chemicals

The chemicals used were of analytical-reagent grade and all aqueous solutions were prepared using reverse-osmosis type quality water produced by a Milli-RO 12 plus Milli-Q purification system (Millipore, Bedford, MA).

Aspartame (AS), sodium saccharin (SA) (both from Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, Spain) and potassium acesulfame (AK) (Fluka, Madrid, Spain) stock solutions were prepared by exact weighing and dissolution in water. Butylated hydroxyanisole (BA), ethylparaben (EP), propylparaben (PP), butylparaben (BP) (all four from Fluka, 99 %), n-propylgallate (PG) and methylparaben

(MP) (all two from Sigma) stock solutions were prepared by exact weighing of each compound and dissolution in acetonitrile (Panreac Quimica S.A, Barcelona, Spain, 99.9 % v/v HPLC grade). The concentration of all standards were 16000.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. These solutions were spectrophotometrically stable when protected from light and kept in the refrigerator at 5°C for up two months. Working solutions were prepared by appropriate dilutions with water to make them as similar as possible to the carrier (4 % ACN in water with 10 mM phosphate buffer pH 6).

The C₁₈ monolithic precolumn (Chromolith Guard Cartridge RP-18 endcapped) (5mm×4.6mm I.D.) used was from Merck (Merck & Co., Inc., Darmstadt, Germany). As carrier, solutions of methanol (HPLC grade Lab-Scan)/water mixture and acetonitrile/water mixtures at different ratios were used. All solutions were filtered through 0.45 μm GH Polypro hydrophilic polypropylene membrane filters (Pall Corporation, New York, USA) prior to use.

Apparatus and Software

Absorption measurements were made with a Hewlett Packard HP-8453 diode array spectrophotometer (Nortwalk, CT, USA), interfaced to a Pentium MMX 200 microcomputer via an HP IB interface board, and equipped with a Hellma 178.010-QS flow glass cell with 10 mm light path. The monolithic mini column was included in the flow line, before the flow cell, which was placed in the cell compartment of the spectrophotometer. A Crison Digit pH-meter equipped with a combined glass-calomel electrode was used. A Hewlett-Packard 1100 series liquid chromatograph with DAD detector provided with a C₈ Zorbax column was used to validate the proposed method.

The flow analysis set-up consisted of an Ismatec MCP-Z Process gear pump with RH00 pump-head working at a constant flow-rate and two variable volume Rheodyne 5041 teflon rotary valves controlled electromechanically by a method developed in our laboratory. PTFE tubing (Omnifit, Cambridge, England) (0.8 mm i.d. and 1.6 mm o.d.) and various end-fittings and connectors of different diameters (Omnifit also) were used.

As software for the acquisition and manipulation of the spectral data, the UV visible Chemstation software package supplied by HP was used. Software programs used for the treatment of the data were: Statgraphics software package, ver.6.0 STSC Inc. Statistical Graphics Corporations, USA, 1993 and CSW32 v 1.3.3 1999-2001, Microsoft Office 2003.

Procedures

Basic Procedure

The sample volume (125 μL) with concentrations ranging in the linear dynamic range (see Table 1) for each analyte, with the same pH and composition as the carrier, was inserted into the carrier stream (4% ACN 10 mM phosphate buffer pH 6.0) at a flow rate of 3.5 mL min^{-1} . 200 s after the injection, the carrier was changed by a rotary valve, acting like a selection valve, to let the second carrier (30% MeOH/water) enter the flow system in order to speed up the less polar analytes. Once the last analyte had been eluted from the column, carrier A was pumped again to condition the flow system for a new injection. The elution order was as expected for reverse phase columns: AK (retention time 13 s from injection, measuring at 226 nm), SA (13 s at 205 nm), AS (36 s at 205 nm), MP (63 s at 254 nm), PG (116 s at 273 nm), EP (182 s at 254 nm), PP (291 s at 254 nm), BA (339 s at 288 nm) and BP (382 s at 254 nm). The relationship between the concentration of the analytes and analytical parameter was established by conventional calibration with external standards.

Reference procedure

As a reference method, an adaptation of the ion-pair liquid chromatography method proposed by Chen and Fu{Chen, 1995 4780 /id} was used. A 5 μm C_8 silica in a 150 x 4.6 mm column with 5 μm was used as a stationary phase and a mobile phase of acetonitrile-50 mM aqueous α -hydroxy-isobutyric acid solution (pH 4.5) containing 2.5 mM hexadecyltrimethylammonium bromide at a constant flow rate of 1.0 mL min^{-1} was used. The chromatograms were obtained at a wavelength of 233 nm. In order to obtain the calibration function, six different concentration levels and three replicates of each of the standard solutions were analysed using peak area as the analytical parameter.

Treatment of samples

For the application of the method, several food, beverage and cosmetics samples (all of them obtained from local markets) were analysed. We did not find samples which contained all the analytes being studied, but we selected samples in order to check the maximum variety of additive mixtures. Thus, we selected dehydrated soups, a cola drink, cleaning towels, hair mousse and toothpaste.

For the analysis of dehydrated soups, an adequate amount (typically 5 g) was weighed, crushed, homogenised, and extracted with 25 mL of hexane/2-propanol (1/1) three times for ten minutes each. The combined extracts were centrifuged at 2500 rpm for 15 minutes, and re-extracted another three times with 25 mL of methanol each. The combined methanolic extracts were rotaevaporated and diluted up to 10 mL with ACN{Perrin, 2002 4592 /id}. Then, the Basic Procedure was applied.

For sweetener determination in cola drinks (without caffeine) a method developed by us was applied. A Waters Vac C-18 Sep-pak was used as solid phase extractor. Two mL of ACN and two mL of water were used to condition the cartridge. Then, two mL of sample (adjusted to pH 1.5 with HCl if necessary) was inserted into the cartridge. The extract was conditioned according to the carrier and the Basic Procedure was then applied. In the case of the toothpaste analysis, around 0.2 g of the sample was weighed and mixed with 10 mL of carrier. The mixture was shaken for 50 minutes and filtered through a paper filter and then through a 0.2 μm filter. Next, the clear filtrate was injected into the system.

For the analysis of cleaning towels, an adaptation of the procedure proposed by Saas *et al.*{Saad, 2005 4741 /id} was applied. An adequate amount (typically 3 g) was weighed and cut into strips to improve contact with the solvent. Then 25 mL of ACN was added and placed in an ultrasonic bath for 30 min at 50 $^{\circ}\text{C}$. Then the mixture was filtered through 0.45 μm filters. Finally, the solution was evaporated to dryness and dissolved with 10 mL of ACN, diluted and adjusted to the carrier conditions and the Basic Procedure was applied.

For the analysis of hair mousse an adequate amount (typically 15 g) was weighed in an extraction flask, 1 mL of 1:1 HCl and 10 mL of saturated NaCl aqueous solution was added. The solution was extracted with 50 mL of diethyl ether three times for 10 minutes each. The three combined extracts were cleaned with saturated NaCl and then three times with 30 mL of $1 \cdot 10^{-2}$ g mL^{-1} NaHCO_3 . Next the extract was dried with 10 g of Na_2SO_4 , filtered, evaporated to dryness and then dissolved with ACN up to 50 mL {Myint, 2004 4740 /id}. Finally the sample was adjusted and diluted to the same conditions of carrier and the Basic Procedure was then applied.

RESULTS AND DISCUSSION

Variables

We have previously studied the resolution of binary mixtures of antioxidants PG, BA and BT{Capitán-Vallvey, 2003 4123 /id;Capitán-Vallvey, 2004 4122 /id} and sweeteners AS, AK and SA{García-Jimenez, 2006 4456 /id;Capitán-Vallvey, 2006 4565 /id} using FIA systems. These methods are based on the different residence times of each antioxidant in the flow cell packed with solid supports, such as silica C18 or Sephadex DEAE. These systems present two disadvantages: low efficiency and high pressure drop.

The main goal of this work is to improve the efficiency of the separation and develop a simple analysis method for a complex mixture of eight additives based on flow injection analysis and using an intrinsic property to measure them. To achieve the separation of the analytes we included an on-line separation element in the FIA manifold, namely a non-polar C-18 very short monolithic column (5 mm). Combining the use of a short column and its monolithic composition we were able to solve the common problem when using low-pressure pumps like peristaltic pumps, such as the increase in the pressure drop across the columns{Pelletier, 2006 4560 /id}. In this case the system's back pressure is reduced using tubing with 0.8 mm i.d. and the maximum flow rate attained in this case was 3.5 mL·min⁻¹.

The analytical property used here is the intrinsic UV absorption of the analytes. They exhibit similar spectral properties. Namely, AS: maximum absorption (H₂O): 195 nm; molar absorptivity ϵ : $1.67 \cdot 10^4$ L mol⁻¹ cm⁻¹ and a shoulder at 205 nm (ϵ : $9.99 \cdot 10^3$); AK: (H₂O) 227; $5.23 \cdot 10^3$; SA: (H₂O) 205; $1.54 \cdot 10^2$; n-PG (ACN), 217; $5.30 \cdot 10^4$ and 273; $2 \cdot 10^4$; BA (ACN) 196; $6.76 \cdot 10^4$; 227; $1.10 \cdot 10^4$ and 288; $6.47 \cdot 10^3$; parabens (ACN): 209 (MP $1.471 \cdot 10^4$; EP $1.443 \cdot 10^4$; PP $1.354 \cdot 10^4$; BP $1.133 \cdot 10^4$) and 254 (MP $1.572 \cdot 10^4$; EP $1.5565 \cdot 10^4$; PP $1.503 \cdot 10^4$; BP $1.231 \cdot 10^4$).

Eluent conditions

In this study we selected a reverse phase monolithic column to achieve the separation of the analyte mixture taking into account its nature. As can be expected the interactions in the column depended strongly on the carrier composition. Normally, this is composed by a buffer to adjust the pH and a hydro-organic mixture to adjust its polarity. To achieve the differential transient retention in the monolithic column, different parameters were studied and optimised individually. All experimental data were obtained from three replicates.

In order to study the influence of the presence of organic solvent in the system, different curves of retention time versus ACN and MeOH percentage were established. From these results it is possible to estimate the organic solvent percentage used as a carrier to achieve a good resolution of analytes. We chose ACN as organic solvent because it achieves the same result as with MeOH, but with less organic percentage, reducing, in this way, waste in the environment.

Figure 1

As can be seen, the analytes with a permanent charge, such as sweeteners AK and SA, are not retained in the column due to their nature, irrespective of the percentage of organic solvent used. We tried to separate both sweeteners in the column as ionic pairs with large organic cations (such as tetraethylammonium, tetrabutylammonium, tetradecyltrimethylammonium, benzyltrimethylammonium, benzalconium, and benzethonium) or as a micelle by using some surfactants (such as SDS and LAS). We studied the different concentrations of chemicals indicated and it was possible to increase the retention time of both sweeteners but their resolution in this column was not sufficient and the FIA peaks overlapped with those of AS and MP.

Consequently we rejected the option of separating AK and SA with this FIA manifold, since it was possible to analyze AK or SA in mixture with the other seven analytes as the first peak leaving the column.

Working with a low ACN percentage, near 5 %, the minicolumn was able to separate the first five analytes (AK/SA, AS, MP, PG, EP). Therefore, we carefully studied the influence of the ACN percentage at nine levels between 1 and 9 %, finding 4 % of ACN as optimum, with the five most polar analytes separated with an R_s factor greater than 1.1 in all cases.

The second factor to be optimised in the carrier composition is pH. Due to their molecular structure, sweeteners are the most difficult to separate with reverse phase columns because two of them are anions in the full pH range (AK and SA) and the third (AS) is a dipeptide (SA: pK_a 1.6; AK: pK_a -0.28; AS: pK_1 3.18; pK_2 7.82; isoelectric point 5.25). In this case, the pH of the carrier plays an important role in the separation because AS species are modified with pH. The influence of pH on the retention and elution for all analytes was studied in the range 3-10 (at eight levels of concentration), adjusted with HCl or NaOH. As was expected, only AS presents dependence with pH because it is the one pH dependent analyte. The carrier pH is the key factor for separation of AS; at a pH value higher than 8, AS is negatively charged, and positively charged at pH values lower than 4; with retention of AS decreasing in the C18 column in both cases.

Figure 2

As could be expected, at pH 4 the retention time for AS is the highest, but in the end pH 6 was selected as optimum because the retention time is the appropriate for the AS, leaving between the first analyte (AK or SA) and the third (MP). In this case, ionic strength had no influence on the retention of analytes in the range 1 and 100 mM, adjusted with NaCl.

The carrier pH was adjusted with phosphate buffer. The influence of the concentration of the buffer was studied at six levels between 10 mM and 500 mM. The optimum buffer concentration was 10 mM because it was the minimum concentration that shows good buffering capacity. If we increase the buffer concentration, the absorbance and retention time of all analytes increase.

With these conditions (4 % ACN with 10 mM phosphate buffer pH 6.0) it is possible to separate five analytes ($R_s > 1.1$). The rest of the analytes (PP, BA and BP) need much more time (up to 2000 s) to be eluted from the column if we work in isocratic mode. The first solution tested was to increase the flow rate from 1.5 to 4.5 mL min^{-1} but even at this high flow rate the less polar analytes need too much time to be eluted (up to 1000 s). Therefore, the method used to quickly achieve its elution was to decrease the polarity of the carrier (that is, increasing the amount of the organic solvent) through a change in the carrier (carrier B). This change of carrier in the middle of the run means altering the baseline of the analytical signal, which depends strongly on the composition of carrier B and on the change time (CT) from carrier A to carrier B. CT depends on the flow rate. Because of this, the CT was fixed just after the EP signal (that is, the fifth analyte, the one just before changing the carrier). CT was optimized later, together with the flow rate optimization. We tried different percentages of ACN and MeOH as the second carrier, and the best results were obtained with MeOH (with ACN as the second carrier, the baseline alteration was lower, but we were not able to obtain a good resolution of all the analytes in a prudent analysis time). We made tests from 20% to 80% (seven levels) of MeOH obtaining 30% as optimal because PP is eluted before the baseline alteration, overlapping to some extent but resolved enough to measure it using height. The rest (BA and BP) are eluted after PP and with resolution factors greater than 1.2. Thus, 30% MeOH was selected as carrier B.

The next group of variables that needed to be optimized were related to FIA parameters: loop volume and flow rate. Several loops were assayed in order to optimize the optimum loop volume (from 20 to 500 μL at nine levels). As can be expected, the analytical signal (both area and height) increased when the loop volume was increased, but the resolution factor decreased when the loop volume was increased. So, we had to find a compromise between them. The decisive factor in selecting the optimum loop volume was the resolution factor.

Figure 3

As seen in Figure 3, for all the analytes the resolution factor was great (always up to 0.85) and depended on the loop volume. We selected 125 μL as the optimum value for the loop volume because it is the highest loop volume (and therefore the highest analytical signal) that maintains good resolution factors for all the analytes (always greater than 1.1), sufficient to measure the analytes in height.

Finally, the flow rate was optimized. We tested flow rates between 1.5 and 4.5 mL min^{-1} at seven levels. The resolution of the peaks was good in all cases, as can be expected with this type of columns, which have the characteristic of maintaining the resolution of analytes while varying the flow rate. Obviously, when we increased the flow rate, the retention time and bandwidth decreased (between 54.5 and 66.8 % for retention time, and between 50.4 and 66.7 % for bandwidth) and the height increased a bit (between 9.5 and 38.7 %). The minimum and the maximum variation for all analytes are expressed in brackets. Mainly, we could have selected the fastest flow rate (4.5 mL min^{-1}) in order to minimize the analysis time (less than 350 s) but we selected 3.5 mL min^{-1} as the optimum value because it is the fastest flow rate with which our flow system works well.

Analytical features

The adjustment of the analytical data (measured as height) was carried out by linear regression, with the lack-of-fit test applied to test the linearity (5 replicates of each standard and 11 standards for each calibration graph). The standard deviation of the background signal measured for the blank, which is necessary to estimate the IUPAC detection limit ($K = 3$) and the quantification limit ($K = 10$) {Analytical Methods Committee, 1988 3011 /id}, was taken as the average of ten determinations and noted as RSD units. Each analyte signal was collected at its maximum wavelength (Figure 4). Table 1 shows those and other analytical parameters for the proposed procedure.

Table 1

Figure 4

The sampling frequency was approx. 9 h^{-1} . The proposed method shows satisfactory results for quantification of each additive in the presence of different ratios of the co-existing additives. Ten additive mixtures with ratios in the range of 1:80 to 80:1 were added at levels from 0.94 to 45.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for AS, at levels from 0.03 to 45.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for AK, at levels from 2.43 to 80.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for SA, at levels from 0.08 to 60.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for MP, at levels from 0.07 to 80.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for PG, at levels from 0.38 to 80.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for EP, at levels from 1.01 to 80.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for PP, at levels from 4.75 to 80.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for BA, and at levels from 2.52 to 80.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for BP. Recovery of additives was in the range of 100.8 to 102.1 % for AS, 99.5 to 103.1 % for AK, 95.9 to 97.6 % for SA, 95.8 to 105.5 % for MP, 91.5 to 97.4 % for PG, 93.1 to 101.0 % for EP, 90.7 to 104.4 % for PP, 95.7 to 96.7 % for BA and 86.5 to 95.3 % for BP, with an average recovery of 101.5 % for AS, 101.3 % for AK, 96.8 % for SA, 100.7 % for MP, 94.5 % for PG, 97.1 % for EP, 97.6 % for PP, 96.2 % for BA and 90.9 % for BP.

Analytical applications

The proposed method was applied to several kinds of samples containing the analytes in the study, commonly found in different supermarkets in the town of Granada (Spain), in groups of families of analytes, i.e., sweeteners, antioxidants or preservatives. Some of the commercial products contained the three sweeteners being studied, others the two antioxidants and others the four parabens, but it was most common to find that the samples contained one of them, binary mixtures or ternary mixtures. We selected the samples to have all the possibilities in binary mixtures and with the maximum number of additives. Thus, we tested recuperation assays with all samples to check that the extraction methods were valid, adding the additive standards to spike the sample. The presence of the sweeteners, antioxidants and preservatives was indicated on the label, and demonstrated by the comparison of the HPLC retention times with the standards.

From the different methods present in the bibliography for additive extraction we chose Perrin et al. (Perrin, 2002 4592 /id), Saad et al. (Saad, 2005 4741 /id) and Myint et al. (Myint, 2004 4740 /id) slightly modified as described in Treatment of Sample Section for the analysis of antioxidants and preservatives. For sweetener extraction, an extraction method developed by us was used. For the cola drink samples a solid phase cartridge was used (Waters Vac C-18 Sep-Pak). Under these conditions our analytes were not retained (see pK values in *Eluent conditions*), but benzoate, which is an important interferent, with pK_a 4.18 is in its acidic form (protonated and neutral) retained into the cartridge and separated from our analytes. In this way, interferents were retained in the cartridge, purifying the sample. This simple procedure was developed with standards, checking in all cases that the extraction was good, with recoveries near 100 % for all sweeteners (both for standards and samples). For the toothpaste analysis, a simpler method was used: the sample was only suspended in our carrier, filtered and injected.

The results obtained by our method were validated by statistical comparison (P-value) with a HPLC reference method (Table 2). The proposed method shows several advantages against the usual HPLC procedure: it uses very simple, fast instrumentation that is cheaper and has similar precision. The disadvantage is that the HPLC procedure has a better resolution than our procedure, as could be expected, although ours is sufficient for determination.

Table 2

Conclusion

Monolithic columns are powerful tools to achieve very good resolutions of complex mixtures. FIA is a consolidated flow method that presents several advantages such as speed, low cost and simplicity. Coupling both (monolithic columns and FIA systems) we obtained an equilibrated technique that shows the advantages of both: good separations of several analytes in very short time working with cheap instruments and obtaining results comparable to more complex techniques like HPLC.

A simple FIA configuration with a single channel, with no prior derivatization reaction of the analytes, makes it possible to separate analytes in a column based on the transient retention of additives, except SA and AK which are very weakly retained. The use of an intrinsic property of the antioxidants, such as their UV absorption, next to short silica based monolithic column makes separation and determination possible.

Table 1. Analytical parameters for the mixture of additives

Parameters	Units	AS	AK	SA	MP	PG	EP	PP	BA	
		205 nm	226 nm	205 nm	254 nm	273 nm	254 nm	254 nm	288 nm	288 nm
b	mL μg^{-1}	$2.78 \cdot 10^{-2}$	$3.14 \cdot 10^{-2}$	$4.06 \cdot 10^{-3}$	$3.05 \cdot 10^{-2}$	$2.24 \cdot 10^{-2}$	$1.17 \cdot 10^{-2}$	$2.65 \cdot 10^{-2}$	$5.83 \cdot 10^{-3}$	1.7
S _b	mL μg^{-1}	$1.70 \cdot 10^{-4}$	$2.59 \cdot 10^{-4}$	$5.59 \cdot 10^{-5}$	$1.59 \cdot 10^{-4}$	$1.79 \cdot 10^{-4}$	$5.82 \cdot 10^{-5}$	$4.15 \cdot 10^{-4}$	$6.60 \cdot 10^{-5}$	1.3
a	-----	$1.13 \cdot 10^{-2}$	$2.62 \cdot 10^{-2}$	$-4.10 \cdot 10^{-4}$	$1.42 \cdot 10^{-2}$	$1.48 \cdot 10^{-2}$	$8.23 \cdot 10^{-3}$	$4.93 \cdot 10^{-2}$	$1.27 \cdot 10^{-2}$	1.4
S _a	-----	$4.46 \cdot 10^{-3}$	$6.41 \cdot 10^{-3}$	$2.01 \cdot 10^{-3}$	$4.77 \cdot 10^{-3}$	$7.77 \cdot 10^{-3}$	$2.50 \cdot 10^{-3}$	$1.08 \cdot 10^{-2}$	$2.94 \cdot 10^{-3}$	6.0
R ²	-----	99.90	99.81	99.41	99.95	99.82	99.94	99.53	99.75	9
LRD	$\mu\text{g mL}^{-1}$	0.94 – 45.0	0.03-45.0	2.43-80.0	0.08-60.0	0.07-80.0	0.38-80.0	1.01-80.0	4.75-80.0	2.5
DL	$\mu\text{g mL}^{-1}$	0.32	0.01	0.73	0.03	0.02	0.13	0.35	1.60	0
QL	$\mu\text{g mL}^{-1}$	0.94	0.03	2.43	0.08	0.07	0.38	1.01	4.75	0
RSD	%	1.15	1.50	0.93	1.14	2.82	1.60	2.49	2.10	0

b: slope; S_b : standard deviation slope; a: intercept; S_a : standard deviation intercept; r: correlation coefficient; PL: Probability level test-lack-of-fit; LRD: Linear range dynamic; DL: Detection limit; QL: Quantification limit; RSD: relative standard deviation.

Table 2. Results obtained for the additive mixture by reference and proposed methods

Sample		Cola drink	Toothpaste	Cleaning towel	Hair mousse	Dehydrated sou 1
AK/mg L ⁻¹	Proposed method	66 ± 2.70	-----	-----	-----	-----
	Reference method	67.1 ± 0.83	-----	-----	-----	-----
	P-value	38.9	-----	-----	-----	-----
SA/mg kg ⁻¹	Proposed method	-----	419 ± 4.61	-----	-----	-----
	Reference method	-----	426 ± 4.43	-----	-----	-----
	P-value	-----	66.4	-----	-----	-----
AS/mg L ⁻¹	Proposed method	253 ± 1.06	-----	-----	-----	-----
	Reference method	253.5 ± 0.40	-----	-----	-----	-----
	P-value	79.2	-----	-----	-----	-----
MP/mg kg ⁻¹	Proposed method	-----	1668 ± 2.24	744 ± 2.26	537 ± 2.15	-----
	Reference method	-----	1704.5 ± 0.34	746.70 ± 0.04	536 ± 1.33	-----
	P-value	-----	17.5	81.2	78.6	-----
EP/mg kg ⁻¹	Proposed method	-----	-----	216 ± 5.86	117 ± 5.92	-----
	Reference method	-----	-----	204.38 ± 0.07	123 ± 5.00	-----
	P-value	-----	-----	19.5	27.6	-----
PP/mg kg ⁻¹	Proposed method	-----	2311 ± 3.53	212 ± 3.59	56 ± 4.01	-----
	Reference method	-----	2336.7 ± 0.23	200.08 ± 0.08	56.9 ± 0.91	-----
	P-value	-----	62.2	5.1	70.0	-----

BP/mg kg ⁻¹	Proposed method	-----	-----	-----	150 ± 2.66	-----	
	Reference method	-----	-----	-----	146 ± 1.04	-----	
	P-value	-----	-----	-----	22.8	-----	
PG/mg kg ⁻¹	Proposed method	-----	-----	-----	-----	276 ± 2.40	1
	Reference method	-----	-----	-----	-----	277 ± 1.15	10
	P-value	-----	-----	-----	-----	75.8	
BA/mg kg ⁻¹	Proposed method	-----	-----	-----	-----	139 ± 7.12	2
	Reference method	-----	-----	-----	-----	142 ± 3.61	2
	P-value	-----	-----	-----	-----	87.9	

* Mean of three determinations ± CV.

Figure captions

Figure 1. Dependence of the retention time of AS versus pH of the carrier. All points are three replicates. Conditions: carrier 4 % ACN percentage. Standards: diluted in the same carrier conditions, 12.5 µg mL⁻¹ for all standards. Flow rate: 1.5 mL min⁻¹. Loop volume: 150 µL.

Figure 2. Variation of the retention time versus ACN percentage. All points are three replicates. Bars represent the appearance time (of the peak), the retention time and the outlet time. Conditions: carrier: variable ACN. Standards: diluted in the same carrier conditions, 12.5 µg mL⁻¹ for all standards. Flow rate: 1.5 mL min⁻¹. Loop volume: 150 µL.

Figure 3. Variation of the resolution factor with loop volume for all additives. Conditions: carrier: 4% ACN 10 mM phosphate buffer pH 6. Standards: diluted in the same carrier conditions, 12.5 µg mL⁻¹ for all standards. Flow rate: 1.5 mL min⁻¹. Loop volume: variable.

Figure 4. Analytical signal for all additives. Each additive was measured at its maximum absorbent wavelength. Conditions: carrier: 4% ACN 10 mM phosphate buffer pH 6. Standards: diluted in the same carrier conditions, 12.5 µg mL⁻¹ for all standards. Flow rate: 3.5 mL min⁻¹. Loop volume: 125 µL.

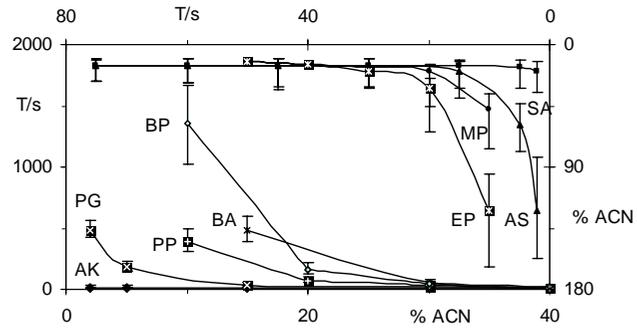


Figure 1

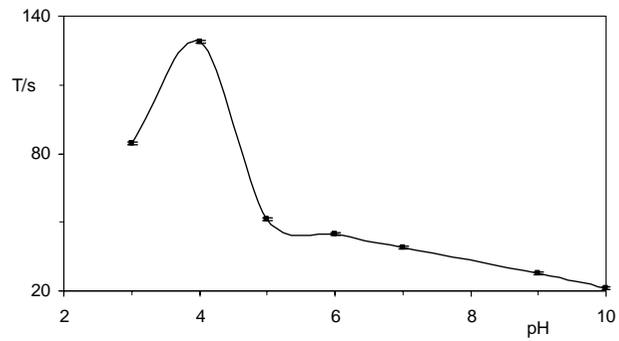


Figure 2

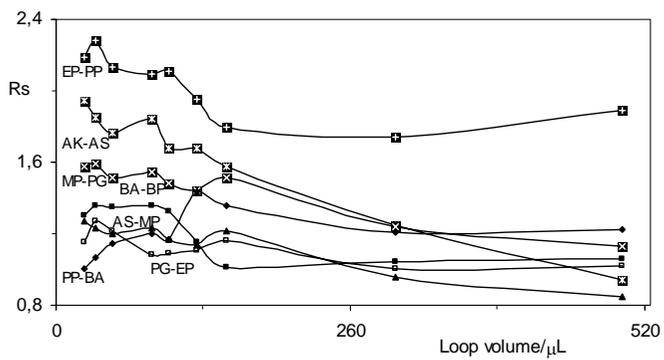


Figure 3

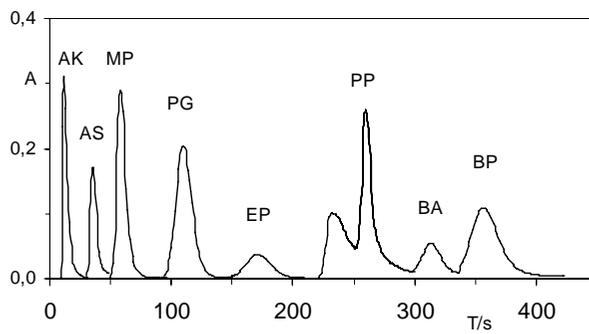


Figure 4