

T 8/23

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA**



**RESOLUCIÓN DE COLORANTES**  
**SOLUBLES E INSOLUBLES EN ALIMENTOS**  
**POR ESPECTROFOTOMETRÍA EN FASE SÓLIDA**

**TESIS DOCTORAL**

<b>BIBLIOTECA UNIVERSITARIA</b>
<b>GRANADA</b>
N.º Documento <u>613377735</u>
N.º Copia <u>15955515</u>

**M<sup>a</sup> DOLORES FERNÁNDEZ RAMOS**  
**Granada, 1997**

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA



**RESOLUCIÓN DE COLORANTES  
SOLUBLES E INSOLUBLES EN ALIMENTOS  
POR ESPECTROFOTOMETRÍA EN FASE SÓLIDA**

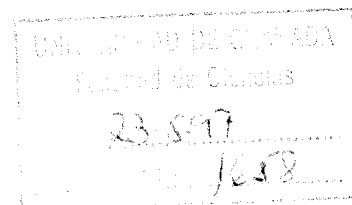
**TESIS DOCTORAL**

**M<sup>a</sup> Dolores Fernández Ramos**  
**Granada, 1997**

**RESOLUCIÓN DE COLORANTES  
SOLUBLES E INSOLUBLES EN ALIMENTOS  
POR ESPECTROFOTOMETRÍA EN FASE SÓLIDA**

por

M<sup>a</sup> Dolores Fernández Ramos



**Departamento de Química Analítica  
Universidad de Granada**

Visado en Granada, Julio de 1997.

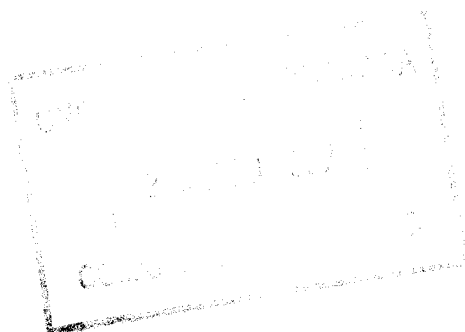
Two handwritten signatures in black ink. The first signature is on the left, and the second is on the right, extending further across the page.

**Fdo.- Prof.Dr. D. Luis Fermín Capitán  
Vallvey**, Catedrático del Departamento de  
Química Analítica de la Universidad de  
Granada y **Prof.Dr. D.Ramiro Avidad  
Castañeda**, Profesor Titular del mismo  
Departamento.

Memoria presentada para aspirar  
al grado de Doctor en Ciencias, Sección  
de Químicas. Granada, Julio de 1997.

A very faint handwritten signature, possibly "M. Dolores Fernández Ramos", located below the text of the thesis submission.

**Fdo.- M<sup>a</sup> Dolores Fernández Ramos**  
Licenciada en Ciencias, Sección Químicas



**A mis padres.**

Deseo expresar mis más sincero agradecimiento a los directores de esta Memoria Dr. D. Luís Fermín Capitán Vallvey y al Dr. D. Ramiro Avidad Castañeda por su generosidad, confianza, constante apoyo y dedicación incondicional. Al Dr. D. Ignacio de Orbe Payá por introducirme en el campo de la investigación y por sus constantes consejos. Al Dr. D. Alberto Navalón Montón por su desinteresada ayuda. Al Dr. D. José Luís Vilchez Quero por su constante ánimo.

A todos los miembros del Departamento de Química Analítica que durante estos años han estado a mi lado haciendo más llevadera esta tarea, especialmente a Rosi, Brigi, Gloria, Francis y Belén, por escucharme y animarme en todo momento.

Especial mención a Mounir por su ayuda.

A mis tios, a Rosi, M<sup>a</sup> del Mar y Juan Antonio.

A todos mis amigos de Berja.

*A TODOS GRACIAS.*

**OBJETIVOS DE LA TESIS**

El objeto de esta Memoria de Doctorado es la puesta a punto de métodos para la determinación de colorantes alimentarios sintéticos. La legislación comunitaria vigente solo permite muy pequeñas cantidades de colorante no sulfonado para su uso alimentario. La ausencia de procedimientos analíticos sencillos nos ha llevado a plantearnos la resolución de mezclas de colorantes sulfonados en presencia de bajas cantidades de sus homólogos sulfonados.

La metodología experimental seleccionada es la espectrofotometría en fase sólida que tiene capacidad para aislar y preconcentrar los analitos de interés, en conjunción con dos metodologías de tratamiento de datos, calibración univariante y multivariante.

Se han seleccionado para su estudio cinco colorantes sintéticos y sus homólogos no sulfonados por la amplitud de su uso en alimentación (recogidos en la Introducción). Los objetivos que nos hemos planteado para su resolución son:

- 1.- Determinación de Amarillo Anaranjado y de su homólogo no sulfonado Sudan I en materias primas usadas en alimentación.
- 2.- Determinación de Carmoisina y Escarlata 4R junto con sus correspondientes no sulfonados 1-naftilazo-1-naftol y 1-naftilazo-2-naftol en materias primas y productos alimentarios.
- 3.- Aplicación de la espectrofotometría derivada en fase sólida a la resolución de la mezcla formada por Amarillo Anaranjado, Amarillo de Quinoleina y sus correspondientes insolubles Sudan I y Amarillo de Quinoleina insoluble, en productos alimentarios.
- 4.- Aplicación de los métodos multivariantes junto con la espectrofotometría en fase sólida a la resolución de mezclas de colorantes binarias (Amarillo Anaranjado- Amarillo de Quinoleina) y ternarias (Tartracina-Escarlata 4R-Amarillo Anaranjado) aplicados al análisis de alimentos.



ÍNDICE



**ÍNDICE**

<b>OBJETO DE LA TESIS</b> .....	1
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	5
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>METODOLOGÍA DE TRABAJO</b> .....	47
1.- TÉCNICAS ANALÍTICAS .....	47
1.1.- Espectrofotometría en fase sólida .....	47
1.2.- Medidas en fase resina .....	49
1.3.- Condiciones instrumentales para la medida en fase sólida .....	51
1.4.- Espectrofotometría derivada en fase sólida .....	52
2.- METODOLOGÍA DE TRABAJO .....	53
3.- METODOLOGÍA PARA EL TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS ANALÍTICOS .....	54
3.1.- Modelo de regresión univariante .....	55
3.1.1.- Estimación de los parámetros del modelo con el criterio de mínimos cuadrados .....	56
3.1.2.- Validación del método lineal establecido .....	57

3.1.3.- Comprobación del cumplimiento de las hipótesis matemáticas establecidas .....	57
3.1.4.- Comprobación del grado de acoplamiento del modelo a los puntos experimentales .....	58
3.1.5.- Comparación de las pendientes de dos rectas de calibrado .....	59
3.1.6.- Parámetros de fiabilidad .....	60
3.1.6.1.- Límite de detección y cuantificación .....	60
3.1.6.2.- Rango dinámico lineal .....	61
3.1.6.3.- Linealidad .....	61
3.1.6.4.- Precisión .....	61
3.1.6.5.- Sensibilidad .....	63
3.1.6.6.- Exactitud .....	63
3.2.- Modelos de regresión multivariante .....	63
3.2.1.- Regresión por mínimos cuadrados parciales, PLS .....	65
3.2.3.- Selección del número óptimo de factores .....	66
3.2.4.- Detección de muestras sospechosas .....	68
4.- VALIDACIÓN DEL PROCESO ANALÍTICO .....	69
4.1.- Comparación de las medias de dos conjuntos de resultados .....	69
4.2.- Protocolos de validación para comprobar la exactitud. Método de adición de patrón .....	71
5.- EXPERIMENTAL .....	72
5.1.- Disoluciones y soportes empleados .....	72
5.2.- Instrumentación y material de laboratorio .....	76
5.4.- Metodología y tratamiento de las muestras .....	78
5.4.1.- Refrescos .....	79
5.4.2.- Golosinas líquidas y sorbetes .....	79
5.4.3.- Colorantes alimentarios .....	80
5.4.4.- Caramelos, gominolas y gelatinas .....	81
6.- SÍNTESIS DEL GEL DE SÍLICE C-18 Y DE LOS ANALITOS 1-NAFTILAZO-1- NAFTOL Y 1-NAFTILAZO-2-NAFTOL .....	82
6.3.- Síntesis del gel .....	82

6.3.1.- Método de Little .....	83
3.3.2.- Método de Sander y Wise .....	83
6.4.- Identificación y caracterización .....	86
6.5.- Sítesis de 1-naftilazo-1-nafto y 1-naftilazo-2 naftol .....	90

## CAPÍTULO II

### DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE AMARILLO ANARANJADO Y SUDAN I POR ESPECTROFOTOMETRÍA EN FASE SÓLIDA .....

Optimización de las variables experimentales .....	102
1.- Elección del soporte sólido .....	102
2.- Optimización de las variables químicas que afectan a la fijación de Amarillo anaranjado y Sudan I .....	104
2.1.- Factores que influyen sobre el proceso de fijación .....	104
2.1.1.- Influencia del pH .....	104
2.1.2.- Elección de la disolución reguladora del pH y de su cantidad óptima .....	104
2.1.3.- Influencia de la fuerza iónica .....	106
2.1.4.- Influencia de la cantidad del gel .....	107
2.2.- Factores que influyen sobre la cinética del proceso de fijación .....	110
2.2.1.- Influencia del tiempo de equilibración del gel .....	110
2.2.2.- Influencia de la velocidad de agitación .....	111
2.2.3.-Influencia del contenido de etanol .....	112
2.3.- Factres que influyen en la medida de la señal analítica .....	114
2.3.1.- Influencia del volumen de disolución empleado .....	114
2.3.2.- Influencia del tiempo de secado en la determinación de Sudan I .....	115
2.3.3.- Influencia del tiempo de centrifugación .....	116
3.- Resumen de la optimización de variables para Amarillo Anaranjado y Sudan I ..	117
4.- Parámetros analíticos .....	119
4.1.- Cumplimiento de la ley de Lambert-Beer y parámetros de fiabilidad para Amarillo Anaranjado .....	119
4.2.- Cumplimiento de la ley de Lambert-Beer y parámetros de fiabilidad para Sudan I .....	127
5.- resumen de los parámetros de fiabilidad para ambos métodos .....	134

6.- Verificación de la independencia de las señales analíticas .....	135
7.- Aplicaciones analíticas .....	136

### **CAPÍTULO III**

#### **DETERMINACIÓN DE CARMOISINA Y SU PRODUCTO NO SULFONADO EN ALIMENTOS MEDIANTE LA ESPECTROFOTOMETRÍA EN FASE SÓLIDA .....**

Optimización de las variables experimentales .....	156
1.- Elección del soporte sólido .....	156
2.- Optimización de las variables químicas que afectan a la fijación de armoisina y 1-naftilazo-1-naftol .....	157
2.1.1.- Influencia del pH .....	157
2.1.2.- Influencia de la fuerza iónica .....	159
2.1.3.- Influencia de la cantidad de gel .....	160
2.2.- Factores que influyen sobre la cinética del proceso de fijación .....	162
2.2.1.- Influencia del tiempo de equilibración del gel .....	162
2.2.2.-Influencia del contenido de etanol .....	163
2.3.- Factres que influyen en la medida de la señal analítica .....	165
2.3.1.- Influencial del volumen de disolución empleado .....	165
2.3.2.- Influencia del tiempo de secado en la determinación de 1-naftilazo-1.naftol .....	166
2.3.3.- Influencia del tiempo de centrifugación .....	167
3.- Parámetros analíticos .....	168
3.1.- Cumplimiento de la ley de Lambert-Beer y parámetros de fiabilidad para Carmoisina .....	168
3.2.- Cumplimiento de la ley de Lambert-Beer y parámetros de fiabilidad para 1-naftilazo-1-naftol .....	174
4.- resumen de los parámetros de fiabilidad para ambos métodos .....	185
5.- Verificación de la independencia de las señales analíticas .....	185
6.- Aplicaciones analíticas .....	187

**CAPÍTULO IV****DETERMINACIÓN DE ESCARLATA 4R Y SU PRODUCTO NO SULFONADO EN ALIMENTOS MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRÍA EN FASE SÓLIDA . 209**

Optimización de las variables experimentales . . . . .	209
1.- Elección del soporte sólido . . . . .	209
2.- Optimización de las variables químicas que afectan a la fijación de escarlata 4R y 1-naftilazo-2-naftol . . . . .	211
2.1.- Factores que influyen sobre el proceso de fijación . . . . .	211
2.1.1.- Influencia del pH . . . . .	211
2.1.2.- Influencia de la fuerza iónica . . . . .	212
2.1.3.- Influencia de la cantidad del gel . . . . .	213
2.2.- Factores que influyen sobre la cinética del proceso de fijación . . . . .	215
2.2.1.- Influencia del tiempo de equilibración del gel . . . . .	215
2.2.2.-Influencia del contenido de etanol . . . . .	216
2.3.- Factres que influyen en la medida de la señal analítica . . . . .	218
2.3.1.- Influencial del volumen de disolución empleado . . . . .	218
2.3.2.- Influencia del tiempo de secado en la determinación de 1-naftilazo-2naftol . . . . .	219
2.3.3.- Influencia del tiempo de centrifugación . . . . .	219
3.- Resumen de la optimización de variables para Escarlata 4R y 1-naftilazo-2-naftol . . . . .	220
4.- Parámetros analíticos . . . . .	221
4.1.- Cumplimiento de la ley de Lambert-Beer y parámetros de fiabilidad para Escarlata 4R . . . . .	221
4.2.- Cumplimiento de la ley de Lambert-Beer y parámetros de fiabilidad para 1-naftilazo-2-naftol . . . . .	226
4.2.1.- Método para 100 ml . . . . .	227
4.2.2.- Método para 500 ml . . . . .	231
5.- Verificación de la independencia de las señales analíticas . . . . .	237
6.- Aplicaciones analíticas . . . . .	238

**CAPÍTULO V****DETERMINACIÓN CONJUNTA DE MEZCLAS DE COLORANTES EN ALIMENTOS MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRÍA DERIVADA**

<b>EN FASE SÓLIDA</b> .....	273
1.- Elección del soporte sólido .....	274
2.- Optimización de las variables experimentales .....	274
2.2.1.- Influencia del pH .....	274
2.2.2.-Influencia del contenido de etanol para Amarillo de Quinoleina soluble e insoluble .....	276
2.2.3.- Influencia del volumen de disolución empleado para Amarillo de Quinoleina soluble e insoluble .....	277
2.2.4.- resumen de las variables optimizadas para Amarillo Anaranjado, Amarillo de Quinoleina, Sudan I y Amarillo de Quinoleina insoluble .....	278
3.- Determinación conjunta de Amarillo Anaranjado, Amarillo de Quinoleina, Sudan I y Amarillo de Quinoleina insoluble por espectrofotometría derivada en fase sólida . . .	279
3.1.- Obtención de los espectros derivados de ambas mezclas binarias . . . . .	280
3.2.- Selección de las condiciones instrumentales óptimas .....	282
3.2.1.- Influencia de la velocidad de barrido .....	282
3.2.2.- Influencia del factor de filtrado .....	283
4.- Parámetros analíticos .....	284
4.1.- Cumplimiento de la ley de Lambert-Beer y parámetros de fiabilidad para Amarillo Anaranjado, Amarillo de Quinoleina, Sudan I y Amarillo de Quinoleina insoluble .....	284
5.- Verificación de la independencia de las señales analíticas .....	290
6.- Aplicaciones analíticas .....	293

**CAPÍTULO VI****DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE LOS COLORANTES AMARILLO ANARANJADO Y AMARILLO DE QUINOLEINA MEDIANTE REGRESIÓN POR MÍNIMOS CUADRADOS PARCIALES** .....

1.- Optimización de la matriz de calibración .....	322
2.- Determinación de ambos colorantes en mezclas sintéticas aplicando el método PLS-2 .....	325

3.- Aplicación del método PLS-2 a la resolución de la mezcla Amarillo Anaranjado y Amarillo de Quinoleína en productos alimentarios comerciales . . . . .	327
4.- Validación del método mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución . . . . .	329
4.1.- Calibrados para Cromatografía Líquida de Alta Resolución . . . . .	330
4.3.- Determinación del contenido en Amarillo Anaranjado y Amarillo de Quinoleína de las muestras reales mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución . . . . .	331
4.3.- Comparación de los resultados obtenidos mediante Espectrofotometría y Cromatografía Líquida de Alta Resolución . . . . .	332

## **CAPÍTULO VII**

### **DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE LOS COLORANTES TARTRACINA, ESCARLATA 4R Y AMARILLO ANARANJADO MEDIANTE REGRESIÓN POR MÍNIMOS CUADRADOS PARCIALES . . . . .**

339

1.- Estudio de las variables experimentales . . . . .	340
1.1.- Influencia del pH . . . . .	340
2.- Función de calibrado para Tartracina, Escarlata 4R y Amarillo Anaranjado . . . . .	341
3.- Optimización de la matriz de calibración . . . . .	342
4.- Determinación de ambos colorantes en mezclas sintéticas aplicando el método PLS-1 . . . . .	347
5.- Aplicación del método PLS-1 a la resolución de la mezcla Tartracina, Escarlata 4R y Amarillo Anaranjado en productos alimentarios comerciales . . . . .	350
6.- Validación del método mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución . . . . .	354
7.- Comparación de los resultados obtenidos mediante Espectrofotometría y Cromatografía Líquida de Alta Resolución . . . . .	356

BIBLIOGRAFÍA . . . . .	367
------------------------	-----

CONCLUSIONES . . . . .	376
------------------------	-----



## INTRODUCCIÓN



## *INTRODUCCIÓN*

Según el Código Alimentario Español y la Reglamentación Técnico-Sanitaria vigente, se llaman **aditivos** a todas aquellas sustancias que se añaden intencionadamente a los alimentos y bebidas sin el propósito de cambiar su valor nutritivo, con la finalidad de modificar sus caracteres, sus técnicas de elaboración o conservación y para mejorar su adaptación al uso al que van destinados.

El origen de la utilización de los aditivos en alimentación se encuentra en el comienzo del presente siglo ya que, como consecuencia del rápido crecimiento de la población mundial, la producción y consumo de alimentos pasó de ser una actividad netamente familiar o de comunidades pequeñas a ser una actividad a escala industrial de grandes proporciones, con una distribución no sólo nacional sino incluso internacional. Hoy en día los alimentos producidos en un determinado lugar pueden ser consumidos en países muy distantes y después de transcurridos largos periodos de tiempo desde el momento en que fueron preparados. Por tales motivos los alimentos elaborados han de ser debidamente conservados con objeto de garantizar sus

condiciones alimenticias y sanitarias y de ahí surgió la necesidad de utilizar los aditivos como sustancias que permitiesen esta conservación.

Posteriormente los aditivos fueron utilizándose cada vez con mayor profusión y pasaron de ser sustancias añadidas para conservar los alimentos a ser sustancias con las que se trataba de mejorar el aspecto y las cualidades organolépticas del producto elaborado con objeto de hacerlo más atractivo para el consumidor. En consecuencia los aditivos alimentarios no pueden considerarse como sustancias alimenticias ni tampoco como ingredientes necesarios para la elaboración del producto sino como sustancias que pueden modificar sus características, sus técnicas de elaboración, su conservación y/o su uso.

Como ocurre en tantas ocasiones, con el transcurso del tiempo, las causas por las que inicialmente se introducen modificaciones en los usos y costumbres humanas evolucionaron y así lo que en un principio tenía como única finalidad la conservación de determinados alimentos, para que pudiesen ser consumido en el lugar y fecha deseados, ha terminado siendo una práctica común en todo proceso de fabricación de alimentos, no sólo para permitir su conservación sino también para modificarles su sabor, color, olor y textura, así como para conseguir productos de menor precio, al sustituir determinados ingredientes por otros más económicos a los que basta añadir un saborizante, un colorante o un espesante para que se obtenga un producto alimenticio de sabor, color, olor o textura idénticos a los que se obtendrían utilizando el ingrediente original de la receta culinaria.

Es evidente que, dadas las funciones asignadas a los aditivos alimentarios y teniendo en cuenta que entran a formar parte del producto que se va a consumir, la primera condición que han de cumplir estos aditivos es la de ser sustancias inofensivas para la salud de la población humana que ha de consumir los alimentos en los que se encuentran, cosa que, como veremos más adelante, no siempre es cierta.

Inicialmente se pensó que los aditivos utilizados eran inocuos para la salud, pero el paso del tiempo ha demostrado que existen aditivos que presentan una cierta peligrosidad ya que resultan tóxicos cuando son ingeridos en grandes cantidades o en dietas continuadas durante un largo periodo de tiempo. Por ello la utilización de estos aditivos, tanto en cuanto a tipo como a cantidad, pasó de ser una cuestión puramente discrecional por parte del fabricante a ser una cuestión sanitaria totalmente reglamentada por las autoridades de los distintos países en los que

se producen y consumen este tipo de alimentos. En la actualidad son cada vez más los países que disponen de normas legales que regulan la utilización de los aditivos alimentarios.

La legislación española, adaptada en su momento a la legislación comunitaria europea, clasifica los aditivos alimentarios, de acuerdo con la finalidad que con ellos se persigue, estableciendo los siguientes grupos:

- \* Aditivos que modifican las características organolépticas del alimento:

Aromatizantes	Potenciadores del sabor
Colorantes	Edulcorantes artificiales

- \* Aditivos que mejoran las características físicas del alimento:

Estabilizantes	Humectantes
Emulgentes o emulsionantes	Espesantes
Antiaglutinantes	Gelificantes
Antiapelmazantes	

- \* Aditivos que evitan las alteraciones químicas o biológicas que pueda sufrir el alimento durante su almacenamiento y transporte:

Conservantes	Antioxidantes
Sinérgicos de antioxidantes	

- \* Aditivos que modifican las propiedades del alimento:

Acidulantes	Alcalinizantes
Neutralizantes	Gasificantes

Además de estos aditivos propiamente dichos, la legislación vigente considera como tales los diluyentes o soportes que acompañan a los aditivos que son sustancias inertes cuya misión es disminuir la concentración de los verdaderos aditivos para facilitar su empleo y dosificación, pero no considera como aditivos los coadyuvantes tecnológicos que son sustancias

añadidas intencionadamente, durante la elaboración del producto, con el fin de lograr un tratamiento tecnológico adecuado de los ingredientes, ni tampoco considera como aditivos los productos no deseados que se originen ocasionalmente durante el proceso de fabricación, almacenamiento o transporte o que se introduzcan involuntariamente debido a la contaminación de las materias primas utilizadas, tanto si estos productos son tóxicos como si no lo son.

Entre los aditivos que generalmente entran a formar parte de los alimentos elaborados se encuentran los **colorantes**. En general, se entiende por colorante toda sustancia coloreada, natural o sintética, que al fijarse o mezclarse con la materia que deseamos colorear, bajo unas condiciones apropiadas, modifica, potencia o le confiere una determinada coloración con objeto de hacerla más atractiva y sugerente.

Es obvio decir que las razones por las que se utilizan los colorantes en la industria de la alimentación son puramente estéticas y no obedecen a causas nutricionales o sanitarias, como ocurre en el caso de los antioxidantes o de los conservantes. Sin embargo, su uso se ha extendido de tal manera que incluso los productos farmacéuticos de ingestión (cápsulas, comprimidos, jarabes, etc.) suelen contenerlos en su composición. Las razones que aducen los industriales farmacéuticos son: su mejor identificación (el paciente que tiene que ingerir diferentes medicamentos en distintas horas del día los identifica por los colores) y una presentación más atractiva.

En el caso de la industria alimentaria las razones por las que se utilizan los colorantes son las siguientes:

- Proporcionar la coloración apropiada en el caso de elaboración de sucedáneos de productos naturales. Por ejemplo, en la elaboración de sucedáneos de salmón se utilizan colorantes rojos-anaranjados con objeto de proporcionar al producto, la coloración característica del salmón.
- Proporcionar una coloración uniforme a productos naturales. Por ejemplo, en el caso de zumos de limón, la adición del colorante evita la falta de uniformidad en la coloración del zumo ya que esta depende del tipo, madurez, procedencia, etc. de los limones utilizados. La adición de pequeñas cantidades de colorante produce la uniformidad de la coloración en las diferentes partidas o lotes de fabricación.

- Reforzar o realzar la coloración del producto natural. En determinadas ocasiones la adición del colorante es motivada por la necesidad de resaltar el color del producto natural utilizado en su elaboración. Por ejemplo, en la elaboración de un halado de pistacho, su débil coloración y la pequeña proporción en la que se encuentra en el producto final, darían como consecuencia una coloración verde apenas imperceptible, razón por la cual se realza su colorido mediante la adición del colorante apropiado.
- Ocultar un defecto del producto, cosa que, salvo que se trate de defectos leves, no debe hacerse.

### Breve historia de los colorantes

Aunque el empleo de los colorantes como aditivos alimentarios es relativamente reciente, sin embargo, el uso de estas sustancias con otros fines (artísticos, ornamentales, textiles...) es algo casi consustancial al hombre. Desde la prehistoria hasta nuestros días, la atracción del hombre por el color le ha llevado a utilizar sustancias coloreadas con el fin de hacer más atractivo el objeto destinatario de la sustancia coloreada. El hombre prehistórico utilizó sustancias orgánicas -tanto de origen vegetal como animal- así como sustancias inorgánicas, para representar escenas de su vida cotidiana, para teñir los utensilios y adornos que usaba con fines ceremoniales o religiosos, en su propio cuerpo o para policromar obras de arte que, afortunadamente, han pervivido hasta nuestros días.

En jeroglíficos del Antiguo Egipto se encuentran descripciones detalladas acerca de la forma de extraer colorantes minerales y vegetales y la forma de aplicarlos para fines tan diversos como la tinción de textiles o la decoración de piezas cerámicas. Colorantes naturales como el índigo, obtenido a partir de la planta *Indigofera tintórea* originaria de Asia, la púrpura cuya extracción fue puesta a punto por los fenicios a partir del .... *Murex* o la alizarina de la que se obtiene el rojo Turquía son, entre otras, sustancias conocidas y ampliamente utilizadas por el hombre desde tiempos remotos hasta nuestros días.

Estos colorantes naturales han sido durante muchos siglos la única fuente de la que ha dispuesto el hombre para colorear sus utensilios, sin embargo, desde mediados del siglo XIX, diversas razones entre las que cabe destacar las económicas y las estratégicas derivadas de las condiciones geopolíticas, obligaron a los industriales textiles europeos a investigar acerca de la

obtención de colorantes artificiales de más bajo costo que los naturales, cuyo suministro no dependiese de terceros países geográficamente alejados de los centros industriales textiles de nuestro continente. Es por ello por lo que desde 1856 la naturaleza, procedencia y utilización de los colorantes ha sufrido una profunda transformación.

En la actualidad, aunque se siguen utilizando algunos de los colorantes naturales conocidos desde antiguo, la mayoría de los colorantes usados en las diferentes industrias de fabricación de productos manufacturados, son colorantes artificiales obtenidos a escala industrial mediante procesos de síntesis en los que las materias primas son productos aromáticos intermedios derivados de la destilación de la hulla.

Pero no es solo la obtención del colorante lo único que ha cambiado a lo largo de estos últimos años sino, como se ha dicho anteriormente, la utilización y las aplicaciones que de él se hacen. Hoy día además de los usos tradicionales que ya hemos mencionado, se utilizan en la elaboración de fármacos, productos cosméticos, alimentos ó plásticos, por citar algunas de sus aplicaciones más recientes. Si tenemos en cuenta que cualquiera de los objetos que nos rodean, incluidos los alimentos, presentan coloración y pensamos que, en la mayoría de los casos, las materias primas con las que están fabricados estos objetos no presentan coloración o la presentan muy débil, nos daremos cuenta de la enorme cantidad de colorantes que la industria actual necesita y consume, hecho este que sólo es posible gracias a la producción de colorantes artificiales.

Aunque el primer colorante artificial para teñir la seda fue el ácido pícrico (1849), la síntesis de colorantes podemos decir que comenzó en 1856 cuando el químico inglés Williams H. Perkin obtuvo de forma fortuita el colorante denominado mauveína (del francés mauve, malva) partiendo de anilina. Perkin había emprendido unos estudios encaminados a la síntesis de la quinina y en una de sus experiencias calentó anilina en presencia de dicromato potásico. Se formó un precipitado negro que contenía aproximadamente un 5% de una sustancia de color violeta brillante que tenía la propiedad de teñir la seda y la lana. El propio Perkin comenzó la fabricación industrial de este colorante al que denominó anilina púrpura y al cabo de un año su precio era semejante al del platino. Curiosamente la quinina, que fue indirectamente la causa de este descubrimiento, no se sintetizó hasta el año 1944, es decir, 88 años después.

Los resultados obtenidos por Perkin, cuyo principal mérito fue la obtención a nivel industrial del colorante sintético, animaron a los químicos a proseguir la investigación en este campo y tres años después Nathanson, Hoffmann y Verguin obtuvieron independientemente la fuchsina para el tintado de sedas. Un avance importante en el desarrollo de este tipo de compuestos lo consiguió Nicholson en 1862 al calentar azul de anilina en presencia de ácido sulfúrico concentrado, obteniendo así los derivados sulfonados del trifenilmetano que son colorantes solubles en agua. Dependiendo de las condiciones de trabajo, se podían obtener por este procedimiento diferentes colorantes azules como son el azul de álcali, el azul de metilo o el nuevo azul Hoechst. El principal avance consistió en el descubrimiento de los colorantes solubles en agua y en ácidos que tenían facilidad para teñir la lana.

El siguiente hito importante en la historia de los colorantes fue la síntesis de los azocompuestos. En 1863 Martins desarrolló el bismarck brown o pardo bismarck que fue el primer colorante sintético de esta serie de los azocompuestos, siendo la firma inglesa Read Holliday la que en 1880 presentó un procedimiento para la formación de azocolorantes insolubles sobre la misma fibra que se deseaba teñir. Mediante este procedimiento la fibra era primeramente impregnada con una disolución alcalina de  $\alpha$ -naftol y posteriormente se introducía en un baño de disolución de p-nitroanilina diazotada, para desarrollar un color rojo. A la operación de fijar sobre la fibra el  $\alpha$ -naftol se le dio el nombre de mordentado. Durante este mismo año de 1880 también se consiguió la síntesis del índigo tras haber sido explicada su estructura por A.V. Bayer (1868). A partir de entonces, el número de colorantes de síntesis creció rápidamente y en la actualidad se obtienen a escala industrial más de 3.000 sustancias sintéticas con capacidad colorante. El avance experimentado por la industria de síntesis de colorantes ha sido tan espectacular que podemos decir la industria química de fabricación de pigmentos y materias colorantes es una de las de mayor volumen de facturación nuestros días.

### **Clasificación de los colorantes**

Por su naturaleza los colorantes y pigmentos los podemos clasificar en dos grandes grupos:

- Inorgánicos.
- Orgánicos.

Los primeros, a su vez, se pueden subdividir en: naturales, entre los que cabe destacar los óxidos metálicos, cuya principal aplicación es su utilización en pintura y cerámica y los artificiales entre los que se encuentran las sales de hierro, cromo, mercurio, plomo, cobalto y cobre, entre otras, y cuya principal aplicación es la fabricación de esmaltes, papeles, tejidos y cerámica. Algunos de estos colorantes inorgánicos, aquellos que son inocuos para la salud, también se usan en alimentación. Los colorantes orgánicos, por su parte, los podemos clasificar, según su procedencia, en los siguientes grupos:

- Colorantes orgánicos naturales de origen vegetal.
- Colorantes orgánicos naturales de origen animal.
- Colorantes orgánicos artificiales o de síntesis.

Entre los colorantes de origen vegetal cabe destacar, además del anteriormente citado índigo (añil), el pastel procedente, por extracción, de la *Isalis tinctoria*, el azafrán (*Crocus sativus*), el campeche extraído de la *Haemateuxylum campechanicum* o el palo de Brasil procedente de la *Caesalpinia sappan*, como los de mayor uso. Todos estos colorantes han perdido hoy en día su interés industrial al ser sustituidos por los colorantes de síntesis cuya variedad, disponibilidad y propiedades superan con creces a las de los colorantes naturales siendo a la vez de menor costo. Entre los colorantes orgánicos de origen animal de mayor aplicación en su momento, nos encontramos con el rojo cochinilla, extraído de la cochinilla *Kermes vermilio*, el rojo púrpura, obtenido de los caracoles marinos *Púrpura haemastoma*, *Murex brandis* y *Aplysia*, el amarillo indio extraído de vacas alimentadas con hojas de mango o el colorante sepia obtenido de la *Jibia tinctoria*. Estos colorantes, al igual que los de origen vegetal, han sido prácticamente sustituidos por los colorantes sintéticos en la mayor parte de sus aplicaciones.

Finalmente nos quedan los colorantes orgánicos de origen artificial que constituyen la principal y casi única fuente de sustancias orgánicas colorantes de las que dispone la industria en la actualidad, razón por la cual vamos a dedicarle una mayor extensión en este apartado. Tradicionalmente los colorantes orgánicos de síntesis se clasifican de acuerdo con dos criterios, el primero de ellos es su estructura química y el segundo su utilidad y áreas de aplicación. Al establecer una clasificación de acuerdo con su estructura química, a pesar de sus imperfecciones y lagunas, la clasificación se hace atendiendo a la naturaleza de los grupos cromóforos que confieren la coloración al colorante. Nos resultan así los siguientes grupos:



- Colorantes nitrosados.
- Colorantes del di- y trifenilmetano.
- Colorantes de la acridina.
- Colorantes perilénicos.
- Colorantes indigoides o tioindigoides.
- Colorantes azínicos, oxa- y tiazínicos.
- Colorantes azoporfirínicos y quinoftalonas.
- Colorantes nitrados.
- Colorantes del xanteno.
- Colorantes tiazólicos.
- Colorantes metínicos o polimetínicos.
- Colorantes azoicos.
- Colorantes antraquinónicos.

El segundo criterio de clasificación nos permite hacer otras clasificaciones atendiendo a las propiedades que los colorantes presentan, o bien al empleo que de ellos se pueda hacer. De esta forma podemos clasificar los colorantes, de acuerdo con su solubilidad, en tres grandes grupos:

- Colorantes hidrosolubles (solubles en agua).
- Colorantes liposolubles (solubles en grasas).
- Colorantes insolubles.

Entre los colorantes hidrosolubles se encuentran principalmente los derivados sulfonados de los azocolorantes, que constituyen el grupo fundamental de los colorantes utilizados en alimentación, cuyo estudio es el objetivo general de esta Memoria de Tesis.

Si tenemos en cuenta el color que transfieren al objeto que se desea colorear, podemos dividir los colorantes en dos grupos:

- Colorantes cromáticos.
- Colorantes neutros o no cromáticos.

Los primeros son aquellos que comunican un verdadero color al objeto que se desea colorear. Pertenecen a este grupo las sustancias que presentan cualquiera de los colores que componen el espectro visible de la luz blanca, mientras que en el segundo grupo se incluyen los colorantes blancos y negros o cualquiera de sus combinaciones que forman las tonalidades grises.

De acuerdo con sus aplicaciones los podemos dividir en:

- Pigmentos o colorantes de cuerpo que serán sustancias insolubles introducidas en la masa del objeto a colorear (o en su superficie), generalmente junto a un aglutinante con el que se mezcla. Un ejemplo de este tipo de colorantes lo constituyen los que se usan en algunas técnicas pictóricas como el óleo.
  
- Colorantes solubles, que pueden ser hidro- o liposolubles, cuya característica es la de ser solubles en el material en el que se van a emplear. Por ejemplo, los colorantes utilizados para dar coloraciones transparentes a lacas o plásticos.
  
- Colorantes textiles, que a su vez los podemos clasificar, de acuerdo con la forma de aplicarlos, en los siguientes grupos:
  
- Colorantes que son solubles en agua y que se emplean en disolución para impregnar directamente la fibra textil.
  
- Colorantes que primeramente son sustancias solubles pero que posteriormente se hacen insolubles al fijarse sobre la fibra que se desea teñir. En este grupo nos encontramos con dos subgrupos:
  
- Colorantes de tina, que son sustancias sulfuradas.
  
- Colorantes con mordiente, entre los que se encuentran algunos de los colorantes azoicos a los que hemos hecho referencia anteriormente.
  
- Colorantes que se desarrollan sobre la propia fibra que se desea teñir y cuyas sustancias de partida son compuestos solubles en agua.
  
- Colorantes insolubles en agua que se presentan en suspensión.
  
- Colorantes insolubles fijados sobre aglutinantes o pigmentos para fibras textiles.

Estos colorantes textiles, que suponen aproximadamente el 70% del consumo mundial de colorantes, también los podemos clasificar, atendiendo a sus propiedades y áreas de aplicación, resultando así los siguientes grupos:

- Colorantes básicos o catiónicos. Son colorantes solubles en agua tras la adición de un ácido orgánico. Se caracterizan por su vivacidad de color y poder de coloración y su utilización primordial es el teñido de seda natural, lana y fibras acrílicas en medio neutro o acético. Por el contrario no se fijan en celulosa ni algodón a menos que se utilice previamente un mordiente.
  
- Colorantes ácidos o aniónicos. El interés de estos colorantes reside en los siguientes puntos: facilidad de utilización, ya que tiñen directamente la lana, amplia gama de colores, ausencia de efectos no deseados en el tejido tintado (no pierde textura ni sufre alteraciones al tacto) y, finalmente, su económico precio. Generalmente se aplican en baño de pH neutro ó débilmente ácido, conseguido con ácido acético o ácidos minerales diluidos.
  
- Colorantes para mordientes. Se utilizan en su forma libre y se fijan con el uso de un catión metálico para que se forme un complejo lana-metal-colorante. El complejo del metal se forma durante la operación del teñido siendo el cromo el metal más utilizado, obteniéndose así una coloración muy sólida.
  
- Colorantes metalíferos. Forman complejos con metales generalmente cromo o cobalto y dichos complejos son fijados sobre la fibra con lo cual se evita la operación de mordentado que es necesaria para los colorantes del tipo anterior.
  
- Colorantes directos o sustantivos. Forman una clase de colorantes que presentan carácter aniónico y son hidrosolubles, siendo su principal aplicación el teñido directo de fibras celulósicas en baño neutro del colorante.
  
- Colorantes derivados del azufre o colorantes al azufre. Estos colorantes presentan la particularidad de no ser fijados directamente sobre la fibra celulósica sin antes haber sido reducidos mediante sulfuro sódico. Una vez reducidos se fijan sobre la fibra y posteriormente sufren la oxidación bien por su exposición al aire o bien mediante una sustancia oxidante que se añade, quedando así fijados sobre la fibra con su coloración primitiva correspondiente.

- Colorantes de cuba. Son pigmentos insolubles en agua que necesitan de un agente reductor que los transforme en sus leucoderivados sódicos o potásicos solubles que presentan afinidad por la fibra a teñir. Posteriormente son oxidados por el aire o por un aditivo químico. Al baño alcalino se le denominó cuba y de ahí el nombre que recibe este grupo de colorantes cuyas principales características son la solidez y la amplia gama de colores que pueden suministrar al algodón.
  
- Colorantes de cuba solubilizados. Son el resultado de una transformación química de los anteriores de forma que son solubles directamente en agua. Su elevado precio es el principal inconveniente que presentan por lo que solo se usan en determinadas ocasiones para colorear intensamente las fibras de algodón.
  
- Colorantes de oxidación. Se forman al oxidar determinadas aminas sobre la propia fibra que se desea colorear. El principal uso de estos colorantes es la formación del negro de anilina partiendo de esta amina aromática.
  
- Colorantes reactivos. Son productos hidrosolubles y constituyen la clase más reciente de colorantes utilizados en la industria textil para fibras celulósicas. Su molécula contiene un grupo químico capaz de reaccionar con los grupos hidroxilos de la celulosa, de forma que se crea un enlace covalente irreversible entre la fibra y el colorante lo que confiere al color una extremada solidez ante la humedad.
  
- Colorantes plastosolubles. Son colorantes que no contienen ningún grupo hidrófilo pero son dispersables en agua formando una suspensión estable en los baños de tintura. Son muy utilizados en la tintura de fibras sintéticas como las de acetato, poliacetatos, poliamidas y poliésteres.
  
- Colorantes pigmentarios. Son colorantes totalmente insolubles que se fijan sobre la fibra por impresión de la pieza con una dispersión del pigmento en un ligante que se fija sólidamente sobre el tejido, bien por secado, bien por condensación o bien por tratamiento térmico.
  
- Colorantes azoicos insolubles. Son colorantes que se suelen formar sobre la fibra que se desea colorear impregnándola primero de un agente copulante, por ejemplo --

naftol, en disolución alcalina y sumergiendo posteriormente la fibra impregnada en un baño de una amina diazotada. Son los colorantes que se suelen denominar al hielo ya que es necesario enfriar la segunda disolución para que tenga lugar la reacción.

De todos estos tipos de colorantes, es evidente, que la mayoría de ellos solo se utilizan en aplicaciones textiles, decorativas, artísticas o de cualquier otro tipo que no implique la ingestión o absorción, a través de la piel, del producto coloreado, por parte de seres vivos. En la actualidad los más utilizados en las industrias alimentaria, farmacéutica y cosmética son los siguientes:

- Colorantes orgánicos naturales tanto de origen vegetal como animal:
  - Curcumina. Colorante amarillo procedente del extracto de la cúrcuma.
  - Lactoflavina o riboflavina. Colorante amarillo de origen natural que se encuentra en numerosos productos naturales como leche, huevos, levaduras, hígado y diversos vegetales. Este colorante también se sintetiza.
  - Rojo cochinilla. Es un colorante que se extrae del insecto *Kermes Vermilio* y que dado su elevado costo ha sido sustituido por el colorante de origen sintético Ponceau 4R o rojo cochinilla A.
  - Carotenoides. Que forman una familia de colorantes cuya coloración depende del tipo de vegetal del que son extraídos. A esta numerosa familia pertenecen, entre otros, los siguientes:
    - alfa-, beta- y gamma- carotenos.
    - Capsantina
    - Bixina, norbixina y annato
    - Licopeno
    - Beta-apo-8'-carotenal y su éster etílico.
  - Xantofilas. Que al igual que los anteriores constituyen un grupo numeroso químicamente derivados de los carotenos. Entre ellos los más importantes son:
    - Flavoxantina.
    - Luteina

- Criptoxantina.
- Violoxantina.
- Cantaxantina.
- Rubixantina.
- Rodoxantina.

- Clorofilas y sus complejos cúpricos y las clorofilinas. Colorantes procedentes de las partes verdes de las plantas de las que se extraen químicamente. La sustitución del magnesio de la clorofila por cobre hace que sea soluble en grasas.

- Caramelo. Obtenido por calentamiento de la sacarosa o de otros azúcares.

- Betanina. Obtenido por maceración de la remolacha es de color rojo.

- Antocianos. De colores rojos violetas y azules se encuentran en las hojas, flores y frutos de plantas.

• Colorantes orgánicos de síntesis. Son los más usados en la actualidad tanto en la industria alimentaria como en la farmacéutica dado su menor precio y, en ocasiones, mejores propiedades tanto físico-químicas como sanitarias. Su composición química es muy variada y pueden pertenecer a cualquier grupo químico de los que hemos citado anteriormente. Así pues, existen colorantes artificiales que por su estructura química pertenecen a cualquiera de los siguientes grupos: azoicos, xanténicos, quinolénicos, trifenilmetánicos, ftalocianínicos o indigoides por citar sólo los grupos más frecuentes. De todos ellos los más utilizados en alimentación son los siguientes:

- Tartrazina (E-102).
- Amarillo óxido de hierro (E-172).
- Amarillo naranja S (E-110).
- Amaranto (E-123).
- Eritrosina (E-127).
- Azul brillante FCF (E-133).
- Negro brillante BN (E-151).
- Amarillo de quinoleína (E-104).
- Amarillo 2G (E-107).
- Azorrubina (E-122).
- Rojo Ponceau 4R (E-124).
- Azul patente V (E-131).
- Indigotina (E-132).
- Verde ácido G (E-142).

De estos catorce colorantes 7 son azoicos y los restantes derivados pertenecientes a diversos tipos de compuestos como son indigotina, trifenilmetano, fuchsina, ...

### **Características de los colorantes de síntesis**

Las características exigidas a un colorante sintético para que pueda utilizarse en la industria alimenticia las podemos resumir en los siguientes puntos:

- Ser totalmente inocuo para la salud.
- Ser una especie química pura y definida.
- Poseer una gran capacidad para tinter el objeto deseado a fin de poder emplear cantidades mínimas de colorante asegurando los resultados apetecidos.
- Ser fácilmente incorporable al producto, es decir, que presente una buena solubilidad en las sustancias que constituyen los ingredientes del alimento.
- Ser estable a los agentes externos tales como luz, humedad o calor durante largos periodos de tiempo.
- Ser compatible con los productos que se desean teñir.
- No presentar olor o sabor desagradables.
- Ser estable frente a agentes oxidantes, reductores y pH.
- Ser económico.

Por lo general, los colorantes naturales no cumplen todos estos requisitos ya que suelen ser menos estables que los de síntesis, suelen tener menor capacidad de coloración, son generalmente más caros y menos estables ante los agentes externos. Por el contrario, los colorantes sintéticos además de ser más baratos y poseer mayor capacidad para colorear el producto deseado, son más estables no sólo a los agentes externos (luz, calor, oxidantes, reductores y pH) sino que también son más estables a los tratamientos que los alimentos tienen que sufrir durante su elaboración. Por todo ello podemos decir que no es cierta la creencia, bastante extendida, según la cual los colorantes naturales, desde el punto de vista de su utilización en la industria alimentaria, son de mejor calidad que los artificiales. En general los colorantes naturales no cumplen todos los requisitos a los que hemos aludido y de ahí que hayan sido sustituidos prácticamente por los de síntesis.

Aunque anteriormente hemos dicho que la primera característica que debe poseer un colorante es la de ser inocuo para la salud y aunque también es cierto que se efectúan continuas investigaciones para determinar la toxicidad de un colorante, no es menos cierto que la utilización de estos compuestos conlleva un determinado riesgo sanitario. Aparición de alergias, tumoraciones malignas, rinitis, asma, sensibilizaciones, etc. son algunos de los riesgos sanitarios a los que estamos expuestos, si hacemos un uso indiscriminado de los colorantes o no establecemos una limitación en su empleo. Dada su potencial toxicidad es por lo que, cualquier colorante que vaya a ser introducido en la industria alimentaria, debe ser sometido a un riguroso estudio que especifique sus propiedades físicas y químicas, estructura química, áreas de aplicación, dosificación y toxicidad, tanto a corto como a largo plazo, con objeto de proteger la salud pública y todo ello tanto si se trata de colorantes naturales como de síntesis.

### **Toxicidad**

El problema de la toxicidad de los colorantes [1-16] está relacionado con la forma y cantidad que puede ser absorbida por la persona sin que esta corra ningún tipo de riesgo para su salud, por lo que el grado de seguridad dependerá de dos factores: la frecuencia y la cantidad ingerida. Es evidente que la toxicidad de un colorante no es la misma cuando se utiliza en una loción facial que cuando se ingiere en un alimento o preparado farmacéutico. Por otra parte es un hecho demostrado que los colorantes solubles de alto peso molecular utilizados en las industrias alimentaria y farmacéutica, son menos absorbidos que los de menor peso molecular, razón por la cual, en la actualidad, se están desarrollando los denominados colorantes poliméricos que han demostrado no ser absorbidos por el tracto intestinal, además de presentar una propiedades semejantes a las de los colorantes sintéticos tradicionales. En consecuencia el estudio de la toxicidad de un colorante debe contemplar los siguientes factores: naturaleza del colorante (colorantes tradicionales o colorantes poliméricos), uso al que va destinado (aplicación externa o ingestión), frecuencia de ingestión o aplicación sobre la piel y, finalmente, cantidad máxima que puede ingerirse o aplicarse sin riesgo.

Además de todos estos factores, en el caso de colorantes alimentarios, otro factor de riesgo, que debe ser objeto de estudio al introducir un nuevo colorante para la industria alimentaria, es su posible reaccionabilidad con otros colorantes, aditivos, o materias primas presentes tanto en alimentos como en fármacos ya que existen ejemplos de reacciones de este tipo que se conocen desde hace tiempo. Una de las más conocidas es la que producen la



tartracina y el ácido acetilsalicílico. Así mismo se conocen determinadas situaciones de riesgo en las que la presencia de un colorante puede producir un agravamiento de la enfermedad, como es el caso de las afecciones asmáticas. El grave deterioro del estado asmático de un niño puede ser causado por un colorante.

Los ensayos toxicológicos realizados permiten conocer los riesgos que suponen el uso de los colorantes y es por ello que los países han dictado y dictan constantemente, normas para su uso. Ahora bien, los pruebas realizados por los distintos organismos gubernamentales son de diversa índole y ello supone que las conclusiones y normas dictadas no son las mismas en todos los países, por ejemplo, en Norteamérica es obligatorio etiquetar todos los productos que contengan colorantes, especificando el tipo de colorante añadido, cosa que no es obligatoria en otros países. Sin embargo existe unanimidad en lo que se denomina la Dosis Día Aceptable (DDA) o Ingesta Diaria Admisible (IDA) que, según un comité de expertos de la FAO-OMS, se define como la dosis diaria de un producto químico que, ingerido durante toda la vida y en función de los datos actualmente conocidos, parece estar desprovisto de riesgo apreciable para la salud. Esta DDA se expresa en miligramos de producto por kilogramo de peso corporal de la persona y día (mg/kg/día). El valor de esta dosis varía apreciablemente de un colorante a otro, de forma que colorantes como la tartrazina presentan una DDA de 7'5 mg/kg/día, mientras que el amarillo de quinoleína o el amaranto solo pueden ser ingeridos en dosis de 0'5 mg/kg/día.

Por otra parte, hemos de decir que la Comunidad Europea no solo controla la clase de colorante y su DDA sino que también ha dictado normas sobre las impurezas que pueden acompañar al colorante de síntesis. Los colorantes autorizados en alimentación y farmacología, son sustancias hidrosolubles que, por lo general, son derivados sulfonados del correspondiente colorante no sulfonado e insoluble en agua, razón por la cual, además de otras impurezas tanto de carácter inorgánico como orgánico (aminas aromáticas sulfonadas o no sulfonadas) los colorantes utilizados en la industria alimentaria pueden llevar pequeñas cantidades del correspondiente colorante no sulfonado que, al no ser hidrosoluble, solo puede acompañar al componente principal en dosis mínimas dada su mayor toxicidad.

### **Identificación de los colorantes**

La identificación de un colorante, en numerosas ocasiones, no es tarea fácil ya que falta una nomenclatura que unifique criterios. Nos encontramos así que para su identificación se pueden utilizar las siguientes nomenclaturas:

- \* Denominación genérica
- \* Denominación química
- \* Denominación de Colour Index
  - \* Código del Colour Index 1924 (1ª edición)
  - \* Código del Colour Index 1956 (2ª edición)
- \* Código Schultz
- \* Número de Thomasset
- \* Número de la Comunidad Europea
- \* Otras (del país, comercial de fabricantes)

Habitualmente las mas utilizadas son las de la FDA, el código del Colour Index 1956 y el número de la Comunidad Europea que se indica mediante el prefijo E- seguido de un número comprendido entre el 100 y el 180.

### **Análisis de colorantes**

La razón fundamental que justifica la necesidad del análisis de colorantes, tanto para su identificación como para su determinación en alimentos, es asegurar que el producto alimentario cumple las normas técnico-sanitarias que garantizan la salud de los consumidores. Esta garantía implica el control riguroso de los siguientes aspectos:

- 1º.- Que los colorantes utilizados estén permitidos, lo que, desde el punto de vista analítico, supone la identificación de uno o más colorantes en el producto alimentario en cuestión.
- 2º.- Que los colorantes utilizados tengan el grado de pureza requerido. Numerosos estudios toxicológicos han puesto de manifiesto que ciertos colorantes, que son prácticamente inocuos en estado puro, pueden ser perjudiciales para la salud cuando son preparados a nivel industrial, debido a la falta de pureza de las materias

primas utilizadas en su fabricación. Por ejemplo, cuando en la fabricación industrial de un colorante se utiliza ácido sulfúrico de calidad industrial, los restos de plomo, arsénico o cualquier otro metal pesado que contiene, pueden suponer un grave peligro para la salud. El control de estas posibles impurezas o contaminantes exige la identificación y determinación, a nivel de trazas, no solo de los citados metales sino también de otra serie de productos tales como aminas y alcoholes aromáticos, compuestos nitrados y, en general, compuestos orgánicos tóxicos.

En este aspecto es de destacar la presencia de los denominados colorantes subsidiarios que son sustancias colorantes que se producen durante el proceso de fabricación del colorante principal pero que presentan una estructura química diferente a la del colorante deseado. En este apartado nos vamos a referir con especial interés a los colorantes no sulfonados que suelen acompañar en cantidades ínfimas a sus homólogos sulfonados. En resumen, este segundo aspecto se refiere al control de calidad de los colorantes utilizados como materia prima en la elaboración de los alimentos.

3º.- Un tercer aspecto a considerar es la necesidad de controlar la calidad, no del colorante de partida en la elaboración del alimento sino la calidad del propio alimento lo que, desde el punto de vista analítico, implica la identificación y determinación de impurezas o contaminantes resultantes de la descomposición de los colorantes bien sea durante el proceso de elaboración del alimento o bien durante su distribución o almacenamiento. Aunque generalmente los colorantes de síntesis son de gran estabilidad, durante su almacenamiento y distribución pueden estar sometidos a condiciones de humedad, calor, pH, etc. que no sean las adecuadas y, como consecuencia de ello, pueden sufrir una parcial o total descomposición originando productos tóxicos.

4º.- Cantidad o dosis permitida. Como se ha indicado anteriormente los colorantes permitidos, incluso en grado de pureza absoluta, sólo pueden ser utilizados en determinadas cantidades para la elaboración de los productos alimentarios o farmacéuticos y es por ello que, el control sanitario de estos productos elaborados, exige la determinación de cantidades de uno o más colorantes en matrices tan diversas como son los productos alimentarios que los contienen.

En consecuencia podemos decir que el control de calidad de los alimentos, en cuanto a colorantes se refiere, exige la puesta a punto de métodos de análisis químico que permitan identificar y determinar sustancias colorantes permitidas y no permitidas, así como impurezas y contaminantes de los mismos, tanto en alimentos elaborados como en el producto colorante usado para su elaboración.

Como se ha indicado más arriba, uno de los productos no deseados que suelen acompañar a un colorante de síntesis, principalmente en el caso de los colorantes azoicos sulfonados, es su correspondiente colorante no sulfonado. La legislación comunitaria europea establece un contenido máximo de colorante no sulfurando por encima del cual el colorante industrial no debe ser utilizado en la elaboración de alimentos o fármacos. De este hecho derivan dos problemas analíticos:

Primero: disponer de métodos de identificación y determinación de colorantes no sulfonados, en presencia de grandes cantidades de su homólogo sulfonado, para controlar la calidad del colorante que va a ser utilizado como materia prima en la elaboración del alimento.

Segundo disponer de métodos de análisis químico que permitan la determinación de estos colorantes -sulfonados y no sulfonados- en los alimentos una vez que estos han sido elaborados.

Estos análisis de control entrañan dos dificultades, añadidas a las dificultades propias de todo análisis químico: el tratamiento al que hay que someter la muestra de alimento para separar los colorantes y, en segundo lugar, disponer de métodos de análisis que permitan identificar y determinar sustancias cuya estructura química es muy semejante, como es el caso de tener que analizar las dos formas -sulfurada y no sulfurada- de un mismo colorante. Por otra parte aunque se tratase de colorantes diferentes no hemos de olvidar que las diferencias estructurales entre ellos, sobre todo en el caso de los colorantes azoicos, a veces sólo estriban en la posición ocupada por alguno o algunos de los sustituyentes de los núcleos aromáticos que forman la molécula, lo que se traduce en una gran semejanza entre las propiedades físicas y químicas de los analitos.

Como acabamos de indicar uno de los pasos más delicados en el análisis de alimentos, no tanto en el de materias primas colorantes utilizadas en su elaboración, es la toma de muestra. Los procedimientos establecidos para ello son muy variados y, como es sabido, dependen del tipo de muestra que se desee analizar. Si el material es completamente homogéneo cualquier porción puede ser una muestra representativa del mismo, pero es obvio que, tratándose de alimentos, este caso no es el único que se nos puede presentar, sobre todo si se trata de alimentos sólidos en los que, a veces, el colorante solo se utiliza en la superficie o en una determinada parte del material que se desea analizar. En tales casos, tras una rigurosa molienda y mezcla del material se deberán recoger porciones del mismo de acuerdo con las normas establecidas en un plan de muestreo adecuado a tal fin.

El segundo aspecto crítico en el análisis de colorantes especialmente cuando, como es nuestro caso, se trata de colorantes no sulfonados que acompañan en cantidades ínfimas a sus correspondientes homólogos sulfonados, es el proceso de medida ya que las propiedades físicas y químicas de estos analitos son muy semejantes entre sí, a la vez que son parecidas a las de otros colorantes con los que frecuentemente se mezclan al elaborar el alimento. Esta semejanza de propiedades obliga a que el análisis de estas mezclas de colorantes se tenga que llevar a cabo mediante técnicas muy selectivas que tengan una gran capacidad de separación o utilizando métodos de calibración apropiados cuando la técnica analítica empleada no es tan selectiva. En cualquiera de los casos siempre habrá que tener presente el posible efecto matriz del material en estudio.

Los métodos de análisis químico de colorantes basados en estas técnicas, en cada caso deberán adaptarse a las propiedades y constitución del problema analítico en particular y deberán permitir la identificación del colorante y/o su determinación. Por lo general los métodos de identificación pueden ser tanto métodos tradicionales, que en ocasiones no tienen nada en común con los métodos de análisis químico, usados en la industria textil, como métodos químicos clásicos o métodos instrumentales, mientras que los métodos cuantitativos son casi exclusivamente métodos instrumentales. Con objeto de hacer un breve resumen de los más utilizados vamos a establecer los siguientes grupos:

**Métodos tradicionales.** Entre estos métodos rápidos tradicionales, que sólo presentan carácter cualitativo, podemos citar los siguientes:

- Apariencia del colorante con iluminación directa observando su coloración con luz visible y con luz ultravioleta de 300 nm de longitud de onda, para detectar así la posible fluorescencia que puedan presentar. Algunos de los colorantes más utilizados en alimentación presentan color y fluorescencia específicas que permiten su identificación.
- Coloración en distintos medios acuosos de diferente pH. Basándonos en la observación del color a diferente pH se pueden identificar colorantes con la ayuda de tablas en las que se indican las coloraciones que adquiere cada uno de ellos a valores de pH de 2'5, 7'0 y 10'0.
- Coloración en ácidos y bases concentrados. Al colocar una pequeña porción de colorante en un ácido o una base concentrados, las coloraciones que adquieren son típicas de la naturaleza del colorante lo que puede ayudar a su identificación.
- Afinidad por diferentes sustratos. Es esta una prueba muy sencilla que permite una identificación bastante segura de los colorantes permitidos en alimentación. Consiste en utilizar trozos de tejido de diferente naturaleza (algodón, seda, nylon...) que son introducidos en una disolución ácida del colorante y se mantiene a ebullición durante 2 horas. Pasado este tiempo se secan los trozos de tejidos y se planchan y observando la tinción que presentan podemos establecer de qué colorante se trata.

**Métodos clásicos de análisis químico.** Estos métodos han sido utilizados durante mucho tiempo para la identificación de tipos de colorantes, pero en la actualidad son poco utilizados debido a que son lentos y tediosos y se basan en la utilización de reacciones químicas y ensayos específicos que proporcionan información sobre la posible clase a la que pertenece el colorante, pero sin permitir su identificación. Una referencia de estos métodos, más por su carácter histórico que por su aplicabilidad actual, es la obra de *Andrew L. W.* **Análisis de alimentos** publicada en 1947 por la editorial Hispano-americana, en la que se referencian numerosos procedimientos químicos para la identificación y determinación de colorantes naturales y artificiales en alimentos.

**Métodos instrumentales.** Las técnicas instrumentales más utilizadas que sirven de base para el desarrollo de métodos para la identificación y determinación de colorantes son: las diversas técnicas cromatográficas, principalmente cromatografía en capa fina y cromatografía

líquida de alta resolución, las técnicas espectroscópicas, fundamentalmente espectrofotometría ultravioleta-visible e infrarroja, las técnicas electroquímicas, con especial referencia a la polarografía, así como la espectrometría de masas y de resonancia magnética nuclear. Estas dos últimas principalmente con el propósito de determinar estructuras de compuestos desconocidos.

Hacer en este punto una exposición detallada de la bibliografía existente sobre el tema es casi imposible. Para darnos una idea aproximada de la importancia que el tema ha suscitado baste decir que sólo la Revista *Analytical Chemistry*, durante el periodo de tiempo entre 1967 y 1989, ha publicado cada dos años una revisión bibliográfica de los trabajos de investigación publicados, dedicados exclusivamente al análisis de alimentos, en la que los colorantes alimentarios ocupan un lugar destacado. En estas revisiones se dan más de 600 citas de trabajos referentes a la identificación y/o determinación de colorantes en alimentos, así como la referencia de más de 10 libros publicados en este periodo y que se refieren al tema. Por consiguiente, dado el elevado número de métodos existentes en la bibliografía y ante la imposibilidad de hacer referencia ni tan siquiera a los más importantes, hemos optado por aludir sólo a aquellos que están relacionado con alguno o algunos de los colorantes estudiados en esta Memoria. Para ello hemos clasificado esta breve revisión bibliográfica en los grupos que anteriormente hemos reseñado al principio de este apartado.

**Métodos cromatográficos.** De las distintas técnicas cromatográficas de las que actualmente disponemos, la cromatografía sobre papel y principalmente, la cromatografía en capa fina son sin duda dos de las técnicas que mejor se adaptan al establecimiento de métodos de identificación de colorantes. Las ventajas que presentan estas dos técnicas sobre otras técnicas, como pueden ser la espectrometría de masas de iones secundarios de tiempo de vuelo [17] o la espectrometría de resonancia Raman [18,19] que recientemente se ha aplicado con el mismo fin, son: equipamiento simple y económico, rapidez y facilidad de manipulación y necesidad de pequeñas porciones de disolución de los colorantes a identificar. Todo ello unido a su efectividad y sensibilidad, hace que los métodos basados en estas técnicas sean de gran utilidad para la identificación no sólo de los colorantes en estudio sino también de posibles contaminantes e impurezas que estos puedan llevar. Ahora bien, aunque la principal aplicación de estos métodos cromatográficos es la identificación directa de los colorantes [21-24] o para la identificación de colorantes en alimentos tras efectuar una extracción previa [25-27], también es cierto que existen métodos que utilizan la estas técnicas como etapa separativa previa a la determinación de colorantes espectrofotométricamente [28] o mediante espectrofotometría fotoacústica [29].

El fundamento de estas técnicas es la distinta capacidad de migración de los diferentes analitos a través del papel o de la capa de material apropiado, cuando se utiliza un disolvente adecuado y es precisamente la adecuada selección de la fase móvil la que nos va a permitir que la separación sea óptima incluso cuando la capacidad migratoria de los analitos sea ínfima.

Existen diferentes fases móviles cuya composición está en función del tipo de colorante a separar [30], e incluso en función de la matriz en la que se encuentren los analitos [31,32], teniendo todas ellas en común el ser mezclas de distintos disolventes, tanto polares como apolares, en diferentes proporciones. Así, las fases móviles más utilizadas en cromatografía en papel suelen ser mezclas de agua y disolventes orgánicos miscibles, que posean pares electrónicos libres (cetonas, dimetilformamida, piridina o dioxanos) para que se facilite la formación de puentes de hidrógeno. La separación generalmente está basada en un proceso de reparto, pero también pueden usarse papeles de cambio iónico que permiten la separación de colorantes hidrosolubles [30, 33] modificándose por tanto el mecanismo de separación.

En el caso de los métodos basados en la cromatografía en capa fina además de seleccionar la fase móvil de acuerdo con los analitos a separar y con la naturaleza de la matriz en la que se encuentran, podemos disponer de distintos substratos que permiten separaciones difíciles de conseguir sin su ayuda. Recientemente se han publicado estudios en los que se consiguen separar colorantes en función del substrato [31]. Capas de sílica G impregnadas con acetato de cadmio, mezclas de sulfato de cobre y molibdato amónico o con mezclas de sulfato de cinc con cloruro de cadmio, se ha comprobado que son substratos muy útiles para la separación de dos colorantes difícil de separar como son el verde S y el azul brillante FCF, utilizando como fase móvil una disolución acuosa de fenol. En el caso concreto de colorantes sulfónicos la cromatografía de pares iónicos utilizando sílice como substrato y bromuro de cetiltrimetilamonio con una mezcla de metanol-acetona ha demostrado ser una forma útil para su separación.

Sin embargo, a pesar de las indudables ventajas que estas dos técnicas presentan para la identificación de colorantes también es cierto que presentan algunos inconvenientes. En efecto, la capacidad de separación, en la práctica, depende de una serie de factores, algunos de los cuales escapan a nuestro control, cuya influencia es tal que los valores de  $R_f$  llegan a ser poco fiables en determinadas ocasiones. Entre los factores no controlables cabe citar el tiempo transcurrido desde la preparación de la fase móvil, la calidad del papel, el tipo de sustancias que acompañan al analito, la saturación de disolventes en la atmósfera que rodea al papel, la



temperatura ambiente, la concentración del analito o el pH de la disolución. Por otra parte, es un hecho conocido que, en el caso de la cromatografía sobre papel el valor de  $R_f$  decrece a medida que aumenta cualquiera de los siguientes factores: la complejidad de la estructura del colorante, la longitud de la cadena de los sistemas conjugados, el número de grupos azo-, ceto-, carbónicos o sulfónicos y la masa molecular, mientras que decrece con la simetría molecular por efecto del momento dipolar. Todo ello nos permite decir que al efectuar una identificación mediante cualquier método basado en estas técnicas hay que tener presente, entre otras, las siguientes cuestiones:

- 1°.- Distintos valores de  $R_f$  indican la existencia de diferentes especies pero una misma coloración acompañada de un mismo valor de  $R_f$  no indica necesariamente que se trate de un solo compuesto.
- 2°.- Cuando estamos analizando un solo colorante, la aparición de más de una mancha es un hecho indicativo de la falta de pureza del mismo, pero si solo aparece una mancha no podemos asegurar que el producto sea totalmente puro.

Por todas estas razones en la utilización de métodos cromatográficos basados en estas técnicas siempre han de usarse valores relativos de  $R_f$  frente a patrones apropiados.

Recientemente se han publicado algunos estudios acerca de separación de colorantes mediante electroforesis sobre papel que se basa en las diferencias de movilidad de los iones cuando sobre ellos actúa un campo eléctrico lo que hace que la velocidad de migración de los analitos se produzca en orden inverso a como lo hace en los métodos basados en las técnicas anteriores. De este modo la electroforesis en capa fina se ha utilizado para la identificación y separación de colorantes en bebidas alcohólicas [34], sin embargo dada su mayor dificultad de manejo y más alto precio es una técnica que no se utiliza con frecuencia.

Otra de las técnicas cromatográficas que podemos utilizar como fundamento de métodos de análisis de colorantes es la cromatografía líquida de alta resolución cuyas ventajas sobre las cromatografías en capa fina y sobre papel las podemos resumir en los dos puntos siguientes: Primero, reproducibilidad del gradiente de elución, hecho este de gran importancia en el campo de los colorantes dadas sus diferentes polaridades que comprenden desde colorantes totalmente apolares, hasta colorantes altamente polares como son los derivados trisulfónicos de los

azocolorantes. Segundo, posibilidad de acoplar técnicas de detección tales como espectrofotometría UV-Vis convencional [35-50] espectrofotometría UV-Vis con diodos en fila [51-59], espectrofluorimetría [60] o resonancia magnética nuclear [61] esta última utilizada para la detección de los diferentes constituyentes del amarillo de quinoleína.

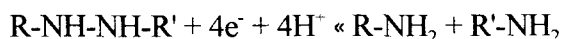
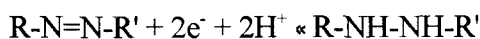
Una variación de este tipo de cromatografía, la cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa, utilizando columna C-18 y una mezcla de acetonitrilo-ácido fosfórico como fase móvil permite la separación de los derivados sulfonados de los azocolorantes. En este tipo de cromatografía la influencia del pH es fundamental sobre el factor  $k$  de manera que a bajos valores de pH se observan grandes diferencias en los tiempos de retención, pero la mayor ventaja de la fase inversa es la relación que se puede establecer entre estructura química del colorante y retención del mismo, los derivados fenílicos eluyen antes que los naftílicos y los derivados tri- di- y monosulfónicos eluyen en este orden. Cuando se trata de derivados muy sulfonados, tres o más grupos sulfónicos en la molécula, los tiempos de retención son tan cortos que hay que recurrir a la cromatografía de cambio iónico o de pares iónicos en fase inversa para la resolución. Así los colorantes Amaranto, Amarillo limón y amarillo-anaranjado se han determinado mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa en diversas matrices alimentarias [62] y el colorante Tartracina se ha determinado en arroz mediante formación de pares iónicos con tri-n-octilamina y cromatografía líquida de alta resolución [63].

Finalmente, dentro de las técnicas cromatográficas, nos queda la cromatografía de gases. Son muy limitados los métodos propuestos para analizar colorantes basados en esta técnica y la razón que avala este hecho es que la volatilidad de estos compuestos es muy pequeña y se originan degradaciones térmicas que causan problemas adicionales en el análisis. En el caso de los derivados sulfonados de los azocolorantes, para ser analizados mediante cromatografía de gases tendrían que ser sometidos previamente a una esterificación para aumentar su volatilidad lo cual entorpece la rapidez y economía del proceso de análisis. Por todo ello la cromatografía de gases se usa más para determinar impurezas presentes en los colorantes que para los propios colorantes [64,65].

**Métodos eletroquímicos.** Dentro del grupo de técnicas que nos permiten desarrollar métodos para la identificación y determinación de colorantes nos encontramos en segundo lugar con las técnicas electroquímicas entre las que hay que destacar la polarografía en sus diferentes modalidades. Los métodos polarográficos nos permiten identificar y determinar diversos

colorantes así como los productos de degradación que se originan durante los procesos de oxido-reducción que pueden sufrir los colorantes en los alimentos como consecuencia de la fotodegradación o de la acción de otros aditivos.

Los diferentes azocolorantes estudiados polarográficamente, sufren un proceso de ruptura del grupo azoico originando, en último termino las aminas correspondientes lo cual presenta cierto paralelismo con los procesos que tienen lugar durante el metabolismo de estos compuestos en los seres vivos. El proceso no es simple y su mayor o menor complicación depende de las condiciones experimentales y de los sustituyentes que contenga la molécula del colorante. Obviando las etapas intermedias, el mecanismo seguido lo podemos resumir como sigue:



en donde R y R' son grupos aromáticos monocíclicos o policíclicos, con o sin sustituyentes diferentes de los grupos sulfónicos.

Entre los métodos electroquímicos más utilizados para el análisis de colorantes principalmente azoicos destacaremos en primer lugar los basados en la polarografía de pulso diferencial. Mediante esta técnica se han identificado y analizado colorantes alimentarios tales como Rojo 2G y su producto de degradación Rojo 10B, Amarillo de quinoleina, Amarillo-anaranjado, Tartracina, Ponceau 4R, Amaranto, Carmoisina, Verde S, Azul patente, Azul brillante, Índigo carmín, Negro PN o Marrón chocolate HT entre otros. Para su determinación se han propuesto electrodo de gotas de mercurio, o electrodos sólidos como son los electrodos de pasta de carbón o de carbón vitrificado y se han utilizado sales del trifenilfosfonio y trifenilarsonio para desplazar los picos de los potenciales de onda con objeto de separarlos en el caso de determinaciones simultáneas de varios colorantes. El problema presentado en la resolución de las mezclas: Tartracina-Amarillo atardecer FCF, Tartracina-Verde S, Amaranto-Verde S y Marrón Chocolate HT-Tartracina-Verde S en diversas bebidas consistente en los malos resultados obtenidos a consecuencia de la semejanza en los potenciales de reducción inicialmente se resolvió mediante el empleo de métodos de separación previos pero posteriormente se ha solucionado usando cloruro de tetrafenilfosfonio en el electrolito soporte con lo que se consigue eliminar los máximos polarográficos que origina la tartracina [66]. De esta

forma se pueden analizar con resultados aceptables las citadas mezclas de colorantes en bebidas refrescantes [67].

Igualmente se ha estudiado de forma sistemática la influencia de las sales cloruro de tetrafenilfosfonio, yoduro de tributilmetilfosfonio, bromuro de trifenilbutilfosfonio, cloruro de tributilbencilfosfonio, cloruro de trifenilmetalilfosfonio, el bromuro de trifenilmetilfosfonio, el yoduro de trifeniletilfosfonio, el cloruro de tetrabutilfosfonio, el cloruro de tetrafenilarsonio y de la gelatina sobre los potenciales de pico de gran número de los colorantes usados en alimentación y en medicamentos proponiendo métodos para la identificación de los colorantes en matrices de diverso tipo [68,69]. Para evitar la adsorción de colorantes en el electrodo de gota de mercurio se han utilizado electrodos de pasta de carbón para la determinación voltamétrica de colorantes, habiéndose descrito que es posible la determinación para la mayoría de ellos en el rango 2-100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  [68,71]. Basándose en ambos tipos de electrodos (de gota de mercurio y de pasta de carbón) se han construido detectores electroquímicos para técnicas de inyección en flujo que presentan bajos límites de detección ( $<0,1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) [68,69].

*Métodos espectroscópicos.* Incluimos dentro de este amplio grupo de métodos de análisis los basados en las siguientes técnicas: espectrofotometría ultravioleta-visible, espectrometría de masas, espectrometría infrarroja, resonancia magnética nuclear y espectrometría Raman y difracción de rayos X. De todos ellos sin duda los más empleados para la identificación y, sobre todo, determinación de colorantes son los métodos basados en la espectrofotometría ultravioleta-visible. Las ventajas que estos métodos aportan son: su amplia aplicabilidad, facilidad de obtención de datos, sensibilidad adecuada y bajo costo. Su principal inconveniente es su falta de selectividad, lo cual hace que sean muy útiles para la determinación de un solo componente o de mezclas de ellos cuyos espectros no estén muy solapados. En caso contrario tendremos que emplear métodos de calibración apropiados para el tratamiento de la señal analítica o bien, proceder al acoplamiento de la espectrofotometría ultravioleta-visible con otras técnicas de tipo separativo.

Para la resolución de mezclas de colorantes, utilizando la espectrofotometría ultravioleta-visible, se han propuesto los siguientes grupos de métodos:

- Métodos con separación cromatográfica previa, en los cuales, tras la separación cromatográfica adecuada, bien en capa fina bien en columna, la cuantificación de los analitos se hace mediante espectrofotometría UV-Visible [72].
- Métodos basados en el tratamiento de la señal analítica, entre los cuales cabe destacar los que utilizan las derivadas espectrales de diversos órdenes [73-76] o los basados en la espectrofotometría de doble longitud de onda [77-82].
- Métodos basados en el tratamiento quimiométrico de los datos obtenidos por espectrofotometría UV-Visible [83,84].

En consecuencia podemos decir que salvando el inconveniente de la falta de selectividad, la espectrofotometría UV-Visible es sin duda la técnica analítica de mayor utilidad para la determinación de colorantes en diferentes tipos de matrices.

**Espectroscopia de masas.** Aunque la espectroscopia de masas de ionización por impacto de electrones difícilmente puede utilizarse para el análisis de colorantes, dado que la mayoría de ellos no son volátiles sin que se produzca descomposición térmica, sin embargo utilizando técnicas tales como: espectrometría de masas de ion negativo [85], espectrometría de masas de ionización secundaria (SIMS) [86,87], bombardeo con átomos rápidos (FAB) [88-90] o espectrometría de desorción de campo (FD) [91] el impedimento al que hemos aludido desaparece y podemos analizar colorantes catiónicos y sulfonados.

**Espectrometría infrarroja y Raman.** Los espectros de absorción infrarroja y Raman suelen ser en teoría los mejores medios de identificación de colorantes a través de sus grupos funcionales, sin embargo, en la práctica, la utilización de estas zonas del espectro puede presentar algunas dificultades. En el caso del espectro infrarrojo dado que puede obtenerse a partir de disolución o suspensión del material en un disolvente adecuado o bien usando la técnica de la pastilla de bromuro potásico, el estado físico y la estructura cristalina de la muestra puede afectar al espectro obtenido, razón por la cual es necesario el uso de patrones o muestras conocidas cuyos espectros se hayan obtenido de la misma forma que se ha empleado para obtener el de la sustancia problema.

Un avance reciente en la utilización de esta técnica ha sido la incorporación de programas informáticas que permiten la obtención de espectros infrarrojos por transformada de Fourier lo que, junto con la utilización de librerías, permite alcanzar una gran aplicabilidad en la identificación y caracterización estructural de los colorantes alimentarios [92-95] incluso cuando se trata de analizar mezclas de colorantes en las cuales uno de ellos se encuentra en proporción muy superior a la de los demás hecho este frecuente cuando se desea obtener una coloración concreta del producto elaborado. No obstante, cuando se trata de analizar colorantes desconocidos en matrices complejas, es necesario el uso de la cromatografía en capa fina como paso previo a su identificación.

La espectroscopia de resonancia magnética nuclear es una poderosa herramienta para establecer la estructura de un compuesto, y con la misma finalidad se usa en el análisis de colorantes [96-105]. No obstante, y debido a la complejidad en la estructura molecular de muchos colorantes, presenta problemas en su uso, que van siendo superados actualmente con equipos de resonancia magnética nuclear con altos campos magnéticos y la disponibilidad de programas capaces de obtener el espectro por técnicas de transformada de Fourier.

Otra técnica mediante la cual se puede elucidar la estructura de un compuesto, siempre que se disponga de muestra cristalina del mismo, es la difracción de rayos X, y con tal fin se ha utilizado en el análisis de colorantes [106-111]. Sus principales ventajas son el uso de pequeñas cantidades de muestra y el hecho de ser una técnica no destructiva.

### **Espectroscopia en fase sólida**

Durante los últimos años, nuestro grupo de trabajo ha desarrollado una técnica analítica denominada Espectrometría en Fase Sólida (EFS) [112-119], basada en los trabajos de *K. Yoshimura* que en 1976 publicó un nuevo método espectrofotométrico para la microdeterminación de metales en aguas, basado en la técnica que él mismo denominó *Colorimetría de cambio iónico* [120].

La EFS, cuya metodología se expondrá con detalle en el siguiente capítulo de esta Memoria, consiste en retener el analito, coloreado o fluorescente, sobre un soporte sólido, una resina de cambio iónico o un adsorbente, midiendo a continuación la absorbancia o la fluorescencia del sistema formado por el analito y el soporte sólido en el que se ha fijado. Para

ello se agita un volumen de la disolución que contiene el analito junto con una determinada cantidad de soporte sólido, se separa la disolución mediante filtración, se empaqueta en una cubeta de un milímetro de paso de luz y se mide la señal analítica.

Si tenemos en cuenta que el volumen de muestra que contiene el analito puede ser muy variable, unos mililitros y varios litros, y que la cantidad de resina es menor de un gramo, usualmente entre 0'05 y 0'150 llegaremos a la conclusión de que con la fijación del analito sobre el soporte tiene lugar un proceso de preconcentración del mismo, razón por la cual la señal analítica se verá incrementada considerablemente y, consecuentemente, la EFS será una técnica adecuada para el desarrollo de métodos que permitan de la determinación de analitos a nivel de trazas.

Pero no es esta la única ventaja que podemos destacar de la EFS. Uno de los principales inconvenientes de la espectrofotometría convencional es su falta de selectividad lo cual, como se ha dicho anteriormente, nos obliga a efectuar separaciones previas o, en el mejor de los casos, a utilizar los espectros derivados como señal analítica, o a usar metodologías como la doble longitud de onda, para resolver mezclas de analitos cuyos espectros estén solapados. Aún así, en ocasiones, la resolución de la mezcla es imposible si no efectuamos una separación previa de sus componentes a analizar. Uno de estos casos es el que se nos plantea cuando queremos resolver una mezcla formada por un colorante azoico y su correspondiente derivado sulfónico. Los espectros de estos compuestos son idénticos, o al menos muy semejantes, de manera que la determinación simultánea de ambos aplicando métodos espectrofotométricos convencionales es prácticamente inviable si no se efectúa una separación previa de ambas especies, el colorante sulfónico y su homólogo no sulfonado.

En este otro aspecto, la EFS presenta una segunda ventaja que podemos añadir a la anteriormente comentada, la selectividad. Esta selectividad se origina al poder utilizar soportes sólidos de diferentes tipos para fijar sobre ellas los distintos analitos. En efecto, utilizando una resina anionica de cambio iónico podemos separar selectivamente los analitos que posean grupos aniónicos en su molécula, como son los colorantes sulfonados a los que hemos hecho referencia, mientras que sus homólogos no sulfonados no se fijaran en este tipo de soporte. Por el contrario, si utilizamos un adsorbente, es lógico pensar que sobre ella se fijarán los colorantes no sulfonados quedando libres los sulfonados.

El problema analítico que se suscita en el análisis de estos colorantes, bien para controlar su calidad cuando se utilizan como materia prima para la manufacturación de alimentos, o bien cuando tenemos que determinarlos en un alimento o bebida ya fabricado, es que la cantidad de colorante subsidiario, entendiendo como tal el no sulfonado que se encuentra presente como impureza del sulfonado, está en proporciones ínfimas respecto a su homólogo sulfonado. Si a este problema le añadimos el que dimana de la igualdad de sus respectivos espectros, fácilmente podemos concluir que mediante espectrofotometría convencional no podemos resolver dichas mezclas a menos que preconcentremos y separemos previamente dichas mezclas. Como queda dicho más arriba, preconcentración y separación son precisamente las cualidades que la EFS presenta como ventajas a destacar respecto a la espectrofotometría convencional.

Admitiendo, a priori, la idoneidad de esta técnica para la resolución del problema planteado queda por ver cuales son los parámetros teóricos que, directa o indirectamente influyen sobre la sensibilidad y selectividad de la técnica propuesta. Independientemente de la influencia de variables experimentales como son: pH de la disolución de analito, tiempo de agitación de la mezcla analito-resina, longitud de onda, absorbancia neta del sistema,... que se determinaran experimentalmente, existen otros parámetros que afectan a la sensibilidad de la medida y que son inherentes al propio proceso de fijación del analito sobre el soporte. En efecto, una de las ventajas de la EFS es que podemos aumentar la sensibilidad del método aumentando el volumen de disolución de analito, de una concentración dada, que se equilibra con una cantidad dada de sólido. Ahora bien, esta posibilidad está limitada además de por razones puramente prácticas -no podemos agitar un volumen excesivo- por una serie de factores teóricos que vamos a estudiar a continuación y entre los que se encuentra la limitación de la resina para fijar sobre sí misma, una cantidad de analito superior a la que permite el coeficiente de distribución.

Supongamos una masa  $m$  (gramos) de resina que equilibramos con un volumen  $V$  (mL) de disolución de analito cuya concentración inicial sea  $C_0$  (moles/litro). El número de mmoles de analito inicialmente en el volumen  $V$  será entonces  $C_0V$  del que, después del proceso de fijación  $M_R$  mmoles estarán en el sólido y  $M_D$  mmoles estarán en la disolución resultante del proceso de equilibración. Por tanto podemos escribir:

$$C_0V = M_R + M_D \quad (\text{Ec. 1})$$



expresión que podemos escribir como sigue:

$$C_0 V = M_R (1 + M_D/M_R) \quad (\text{Ec. 2})$$

Ahora bien, llamando D al coeficiente de distribución del analito entre el sólido y la disolución, será: D = mmoles analito fijados por cada gramo de soporte/ mmoles de analito en disolución resultante por cada mL. de ella, o sea,

$$D = (M_R/m)/(M_D/V) \quad (\text{Ec. 3})$$

Sustituyendo esta expresión en la Ec. 2 y despejando  $M_R$  nos queda la expresión:

$$M_R = (C_0 V) / [1 + (V/mD)] \quad (\text{Ec. 4})$$

Si llamamos v al volumen de resina por unidad de masa, el producto mv será el volumen de soporte sólido equilibrado con la disolución de analito, de donde la concentración de analito fijado en el sólido será  $C_R = M_R/mv$  y sustituyendo el valor de  $M_R$  dado en la Ec. 4 nos queda finalmente:

$$C_R = C_0 V / [mv (1 + V/mD)] \quad (\text{Ec. 5})$$

Aplicando la ley de Beer para esta concentración de analito, la absorbancia neta que este produce será:

$$A = \epsilon l C_R \quad (\text{Ec. 6})$$

donde  $\epsilon$  es la absorptividad molar de la especie retenida en la resina y l es el paso de luz medio a través de la cubeta utilizada. Si en esta expresión sustituimos el valor de  $C_R$  dado por la Ec. 5, nos queda finalmente la siguiente expresión:

$$A = \epsilon l C_0 V / [m v (1 + V/mD)] \quad (\text{Ec. 7})$$

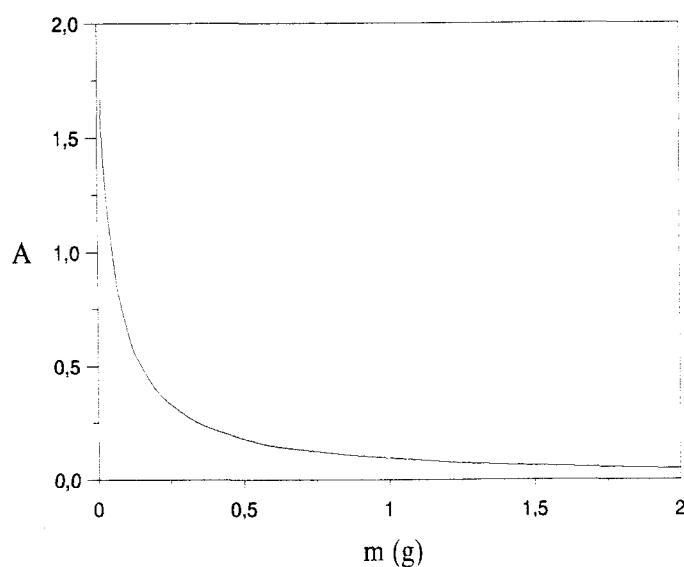
que será la expresión que relaciona la absorbancia producida por el analito fijado sobre la resina en función de diferentes parámetros cuya influencia vamos a estudiar.

En primer lugar la absorbancia del analito fijado sobre el soporte sólido y, por tanto la sensibilidad del método, para un espesor de cubeta determinado (1 mm), depende del coeficiente de absorptividad molar del analito fijado en el soporte ( $\epsilon$ ), como era de esperar, pero además, para una concentración inicial de analito dada, también depende del volumen de muestra equilibrado con el soporte sólido, del coeficiente de distribución  $D$ , de la masa de soporte sólido utilizado en la equilibración y del parámetro  $v$  que tendrá un valor constante para un soporte determinado. Por otra parte el valor del coeficiente  $D$ , dados un soporte y un analito determinados, también lo podemos suponer constante, por lo que la absorbancia neta del analito fijado sobre la resina es función de la masa ( $m$ ) de esta que hayamos utilizado y del volumen de muestra ( $V$ ) empleado en la equilibración.

Suponiendo un volumen de muestra  $V$  fijado de antemano y la constancia de los demás parámetros excepto la masa de soporte, la absorbancia será función de dicha masa  $m$  según la expresión:

$$A = k / (mv + k') \quad (\text{Ec. 8})$$

en donde  $k = \epsilon l C_0 V$  y  $k' = vV/D$  y cuya representación gráfica podemos ver en la figura I, que nos indica que la señal analítica disminuye de forma exponencial al aumentar la masa de soporte utilizada, suponiendo constantes todos los demás parámetros. Como veremos más adelante al estudiar experimentalmente la influencia de la masa de soporte sobre la absorbancia, los resultados experimentales concuerdan con esta predicción teórica. Según esto, la masa óptima de soporte con la que se obtendría la señal analítica más alta, es cero ya que en este caso  $A = k / k'$  es el máximo valor que puede alcanzar. Obviamente, en la práctica este valor no tiene sentido físico ya que supone la eliminación del soporte sólido. La conclusión a la que llegamos es que la masa de soporte debe ser la mínima posible, pero esta cantidad mínima debe ser tal que permita el llenado de la cubeta para poder efectuar la medida a la vez que facilite su manejo. En consecuencia llegaremos a una situación de compromiso que nos permita elegir la mínima cantidad de resina posible pero que, a la vez, sea suficiente para llenar la cubeta hasta un cierto límite permitiendo así su medida y manipulación.



**Figura I.-** Influencia de la masa de soporte sobre la señal analítica.

Por otra parte, si tomamos como variable independiente el volumen de muestra  $V$  equilibrado con una cantidad prefijada de sólido  $m$  y suponemos que los demás parámetros de la Ec. 7 se mantienen constantes, podemos llegar a la expresión:

$$A = k''V / (k''' + vV/D) \quad (\text{Ec. 9})$$

donde  $k'' = \epsilon l C_0$  y  $k''' = mv$ , expresión esta que vamos a estudiar más detenidamente. La función es creciente y tiende a un límite superior que vendrá dado por:

$$\lim_{V \rightarrow \infty} A = \epsilon l C_0 D / v \quad (\text{Ec. 10})$$

y su representación gráfica es la que podemos ver en la figura II para diferentes valores de  $D$ .

La consecuencia analítica que podemos obtener de este sencillo cálculo es la siguiente: al aumentar el volumen de muestra equilibrado con una cantidad de soporte dada, aumenta progresivamente la absorbancia medida, con lo cual la sensibilidad del método establecido también aumenta, ahora bien, este aumento no puede ser indefinido por dos razones, una de tipo teórico derivada de la ecuación que acabamos de estudiar y otra de tipo práctico. En el primer

caso podemos decir que por muy alto que sea el valor del volumen de la muestra, la absorbancia estará limitada por el valor dado en la Ec. 10, en la que podemos observar que, para un analito determinado y una resina apropiada -con lo cual  $\epsilon$ ,  $l$ ,  $D$  y  $v$  están prefijados de antemano- el límite de  $A$  está impuesto por la concentración inicial de analito.

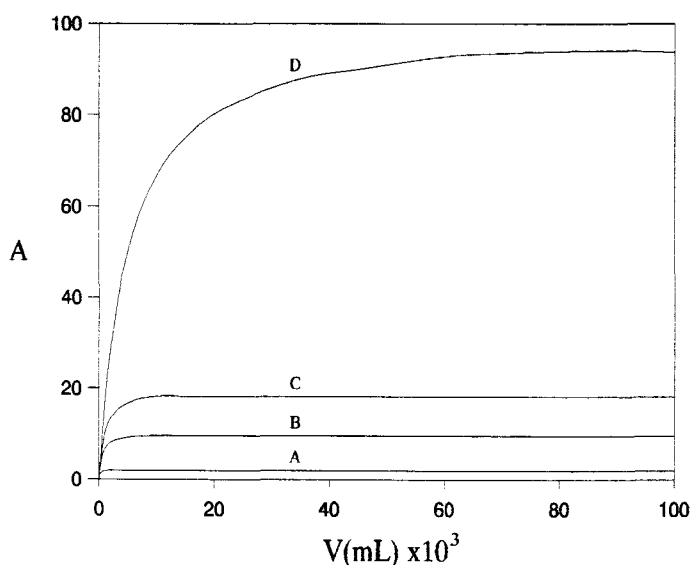
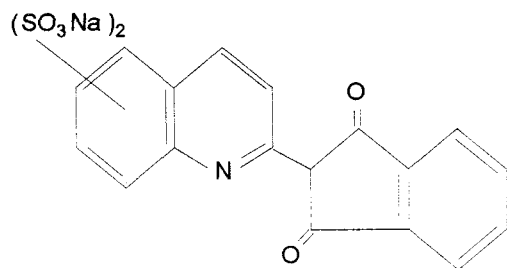


Figura II.- Influencia del volumen.

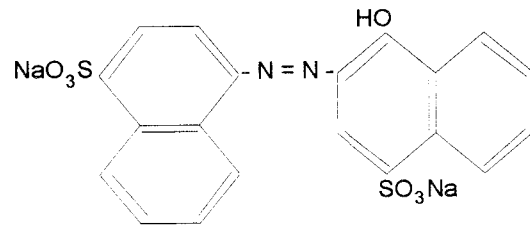
A:1000; B: 5000; C:10000

D:50000 ml.

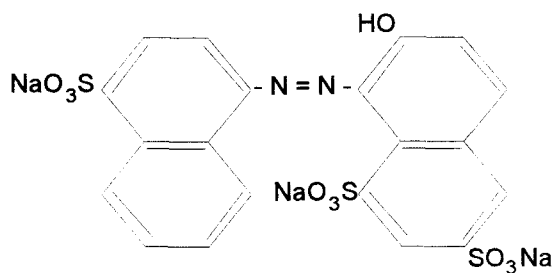
Con todos estos antecedentes y presupuestos y procurando que en cada momento nuestro trabajo fuese encaminado a la resolución de problemas analíticos reales se seleccionaron cinco colorantes de entre los más frecuentes en alimentación, bebidas, golosinas e incluso fármacos, tanto cuando se encuentran solos en el producto manufacturado como cuando están mezclados entre sí. Tras una inspección de numerosos productos alimentarios de venta en establecimientos comerciales se seleccionaron los siguientes: Amarillo de Quinoleina (AQ), Amarillo Anaranjado (AA), Tartracina (TT), Carmoisina (CM) y Escarlata 4R, cuyas fórmulas vemos en la figura III que se recoge a continuación. Solo hemos incluido los productos sulfonados por entender que los homólogos no sulfonados quedan tácitamente implícitos.



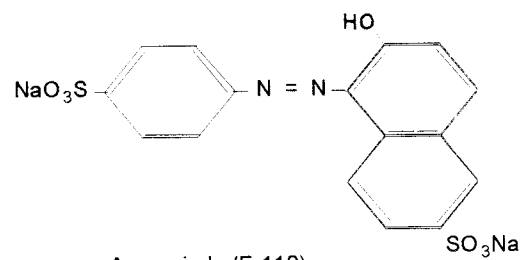
Amarillo de quinoleina (E-104)



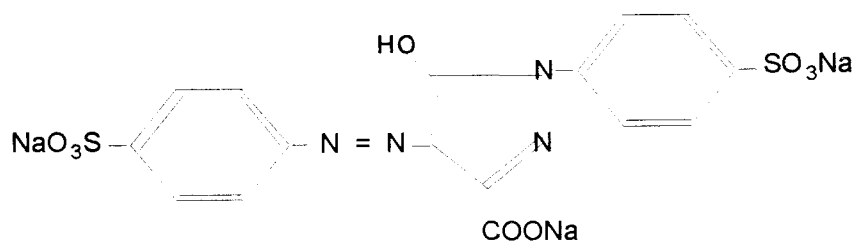
Carmoisina (E-122)



Ponceau (E-124)

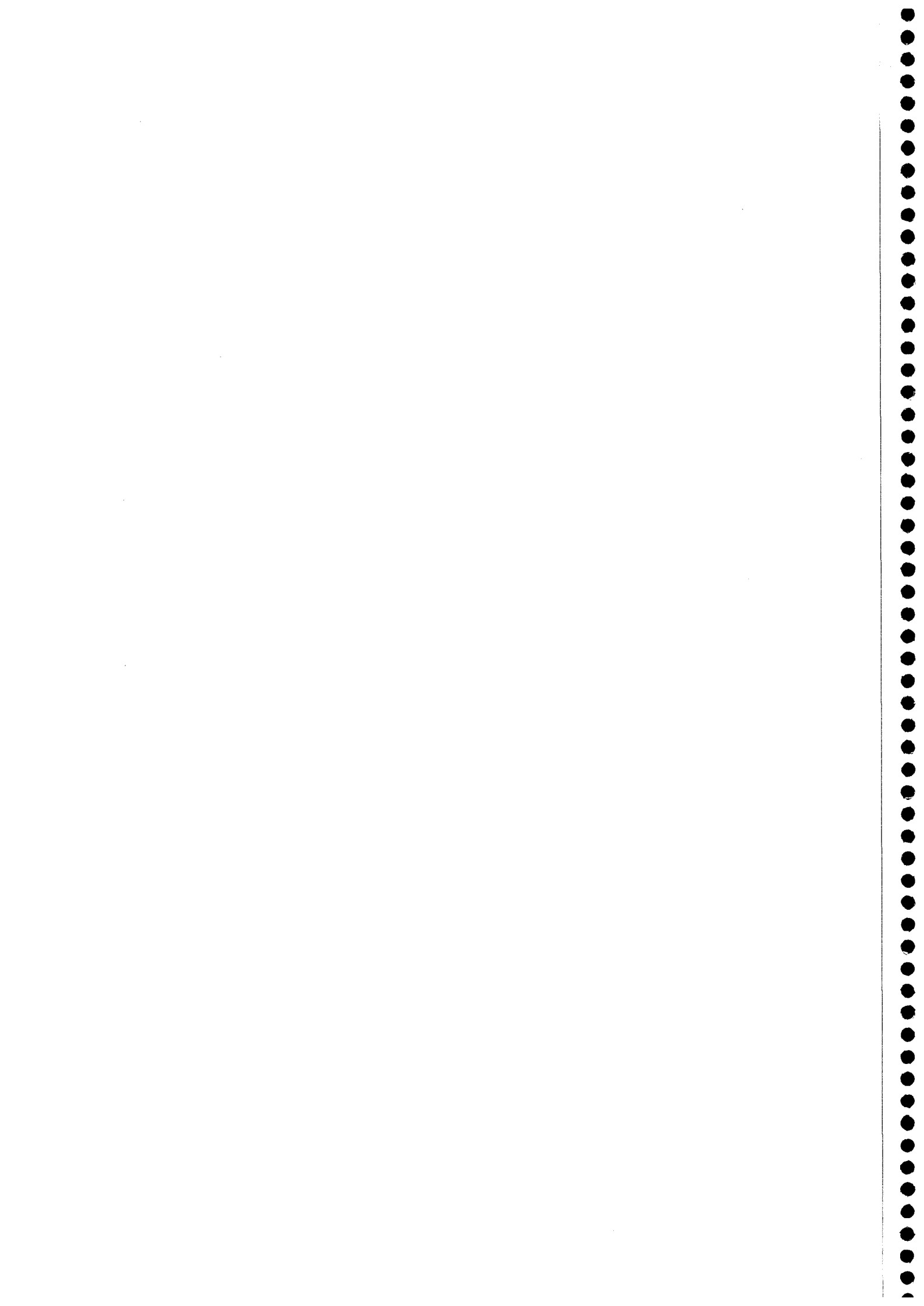


Anaranjado (E-110)

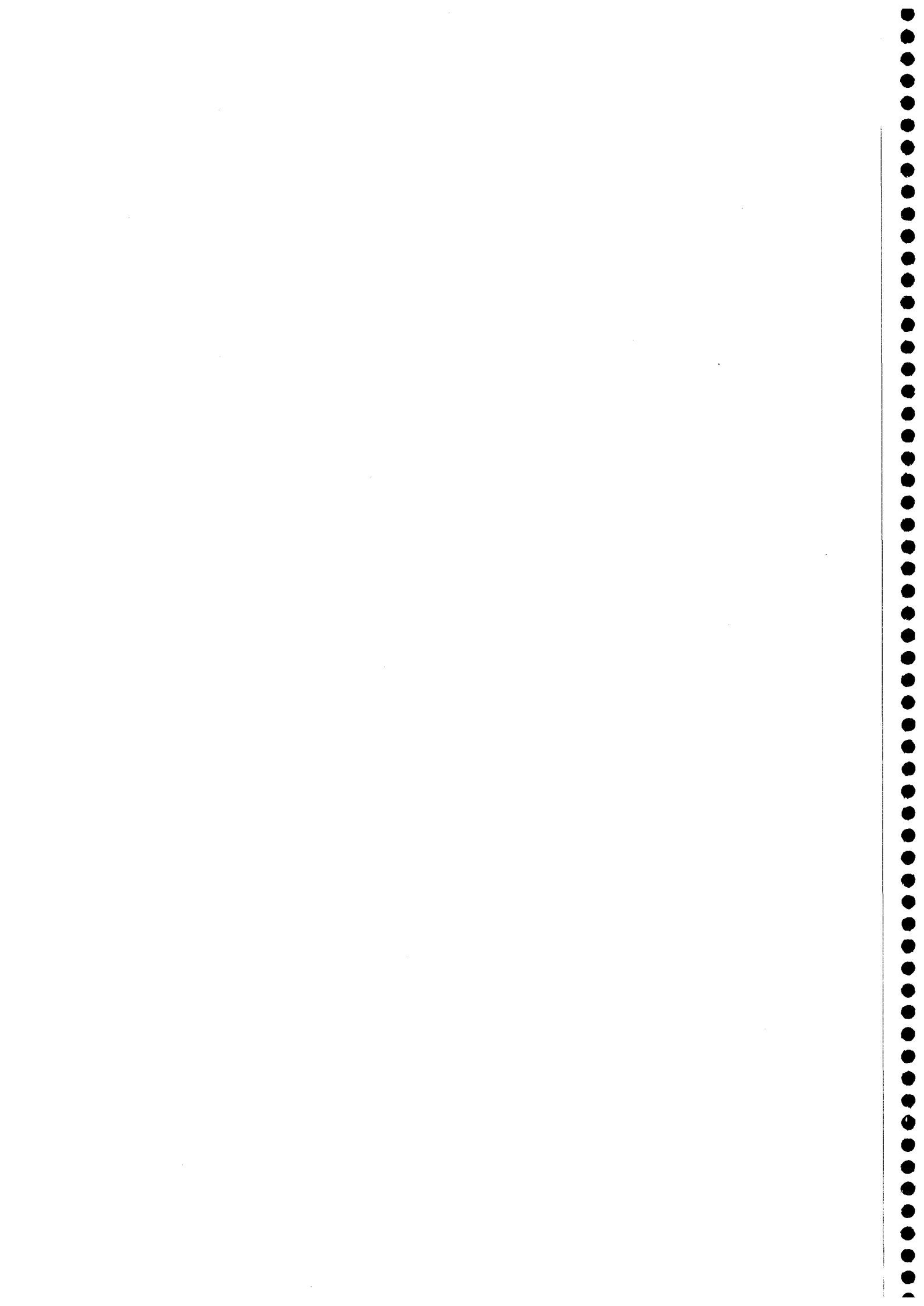


Tartracina (E-102)

Figura III.- Estructura de los colorantes seleccionados.



**CAPÍTULO I:  
METODOLOGÍA DE TRABAJO**





En este capítulo se exponen todas las metodologías de trabajo que se han utilizado durante el desarrollo de esta Memoria para alcanzar los objetivos anteriormente propuestos. Así mismo se ha incluido la preparación de las disoluciones, instrumentación, programas informáticos y las síntesis tanto del gel de sílice C-18, como de los analitos 1-naftilazo-1-naftol y 1-naftilazo-2-naftol utilizados para la realización del trabajo experimental.

Como técnica para el aislamiento y preparación del analito o mezclas de analitos y posterior medida de los mismos se ha empleado la espectrofotometría en fase sólida y para el tratamiento de las señales analíticas, con objeto de proponer métodos de análisis, hemos utilizado tanto la calibración univariante como la multivariante. En las páginas que siguen vamos a desarrollar en qué consiste y de qué forma hemos aplicado estos métodos de trabajo.

## **1. TÉCNICAS ANALÍTICAS.**

### **1.1.- Espectrofotometría en fase sólida (EFS).**

La espectrofotometría en fase sólida (EFS), cuya definición y estado actual hemos visto en la introducción de esta Memoria, pretende incorporar el analito o mezclas de analitos o bien un derivado de los mismos, a un soporte sólido donde se efectuaran las medidas necesarias para establecer sus concentraciones. El procedimiento que nosotros

hemos aplicado consiste en añadir una cierta cantidad de un soporte sólido (cambiadores de iones, adsorbentes etc) a un determinado volumen de disolución que contiene el analito junto con los reactivos necesarios. El conjunto se introduce en una botella de vidrio, de capacidad adecuada, y se equilibra mediante un agitador rotatorio durante el tiempo necesario para que la especie de interés se fije sobre el soporte sólido. A continuación, se filtra la disolución a través de un filtro de vidrio sinterizado modificado por nosotros y con ayuda de un gotero de vidrio, se recogen las partículas de la fase sólida con el analito fijado sobre ellas y se empaqueta en una cubeta óptica de 1 mm de paso de luz. Para que el empaquetamiento mejore y sea uniforme, la cubeta se somete a una centrifugación a 2000 rpm situándola en una pieza de madera con una ranura, de tamaño adecuado forrada de gamuza para que las paredes de la cubeta no se deterioren. Posteriormente se introduce ésta junto con un espaciador en el compartimento de cubetas del espectrofotómetro, de 1 cm de espesor y se registra el espectro de absorción, midiendo a la longitud de onda idónea. En todos los casos la medida se hace frente a un blanco que consiste que contiene todo menos al analito y al que se le aplica el mismo procedimiento anteriormente descrito.

Cuando el soporte sólido es gel de sílice C-18, es necesario eliminar completamente el resto de la disolución que acompaña al soporte sólido tras la filtración ya que, de no ser así, el empaquetamiento en la cubeta es imposible y las medidas de absorbancia no son reproducibles. Para ello, una vez filtrada la disolución, mediante una bomba de vacío se succiona el aire del kitasatos y la corriente de aire que pasa a través de la muestra es suficiente para que esta quede totalmente seca al cabo de unos minutos, gracias al carácter hidrófobo de la resina. Una vez seca, la recogida del gel se realiza con ayuda de una micro espátula y se transfiere a una cubeta de 1 mm de paso de luz, dónde se empaqueta y centrifuga de la forma anteriormente descrita. La medida de la señal y la preparación del blanco al que se efectúa dicha medida se hacen de la forma descrita arriba. Los pasos seguidos se representan en la figura I.1.

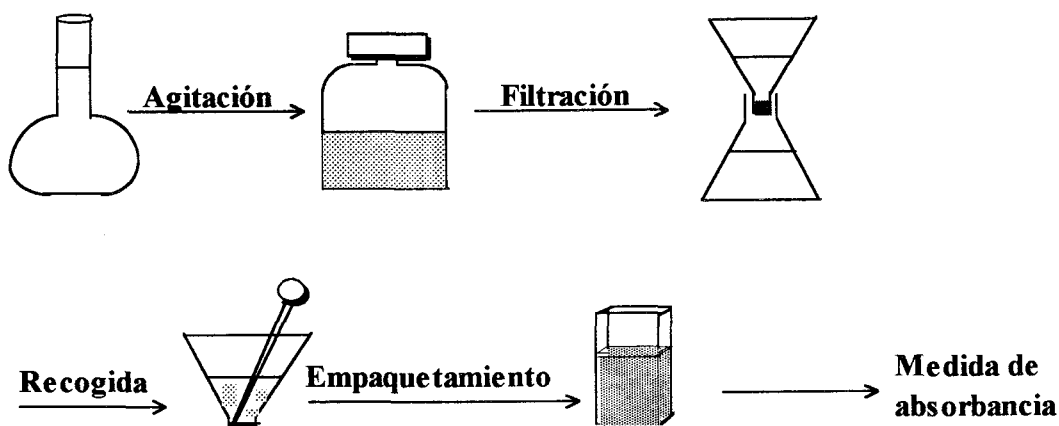


Figura I.1.- Esquema de la metodología empleada en EFS.

## 1.2. Medidas en fase resina.

Cuando la radiación electromagnética interacciona con el soporte sólido que contiene el analito se produce, una disminución de la potencia del haz incidente, debido principalmente a fenómenos de absorción y dispersión [121]. La absorción puede deberse a la presencia de especies absorbentes en la matriz y al propio soporte sólido, mientras que la dispersión es debida al propio soporte sólido que esta constituido por pequeñas partículas sólidas, de forma aproximadamente esférica, que actuan como puntos dispersantes de la radiación electromagnética. Aunque deberíamos emplear el término de atenuación para referirnos a la disminución de la potencia que sufre el haz incidente utilizaremos absorbancia para una mayor sencillez en la exposición.

De acuerdo con lo anterior, si llamamos  $A_{\lambda}$  a la absorbancia que presenta la fase sólida, con la especie fijada sobre ella, a una longitud de onda dada, dicha absorbancia será la suma de varias contribuciones por lo que podemos escribir la siguiente expresión:

$$A_{\lambda} = A_A + A_{sol} + A_S$$

donde :  $A_A$  es la absorbancia neta debida al analito o analitos.

$A_{sol}$  es la absorbancia correspondiente al analito presente en la disolución intersticial que queda entre los granos de soporte sólido. En el caso de la C-18 no hay disolución intersticial.

$A_s$  es la absorbancia de fondo debida al soporte sólido.

La absorbancia del analito que queda en la disolución intersticial,  $A_{sol}$ , se puede despreciar por dos razones:

1ª.- Los coeficientes de distribución de los componentes de la muestra (fase sólida/disolución) son muy altos, lo que suele ocurrir si se ha elegido correctamente el soporte sólido

2ª.- El volumen de la disolución intersticial es muy pequeño.

Por lo tanto, en nuestro caso, el valor de  $A_\lambda$  viene dado por la suma de dos factores  $A_A$  y  $A_s$  ambos afectados por el grado de empaquetamiento de los granos de sólido en la cubeta, por ello el valor de la absorbancia correspondiente a la especie sorbida en la resina, no puede ser obtenido por medida de la absorbancia a la longitud de onda del máximo de absorción, frente a un blanco de resina preparado en iguales condiciones pero exento de analito, sino que habrá que calcularlo teniendo también en cuenta el valor de  $A_s$ .

Para conocer el valor de la absorbancia neta debida al analito (o analitos) podemos razonar como sigue: sean (I) y (II) (figura I.2) los espectros de absorción de la muestra (fase sólida + analito) y de su blanco correspondiente respectivamente. Llamando  $A_{\lambda_1}$  y  $A_{\lambda_1b}$  a las absorbancias de la muestra y del blanco a la longitud de onda del máximo de absorción del analito ( $\lambda_1$ ) y  $A_{\lambda_2}$  y  $A_{\lambda_2b}$  a las absorbancias de muestra y blanco respectivamente, medidas a una longitud de onda  $\lambda_2$  donde solo absorbe el sólido, suponiendo que las condiciones de empaquetamiento de muestra y blanco son idénticas, podemos decir que la absorbancia neta del analito ( $A_A$ ) será:

$$\Delta A - \Delta A_b = |A_A + (A_s - A'_s)| - |(A_{b,s} - A'_{b,s})| = A_A$$

donde las absorbancias denominadas como  $A'$  son las correspondientes a la longitud de onda  $\lambda_2$  donde no absorbe el analito. En la figura I.2, se muestra los términos anteriormente usados.

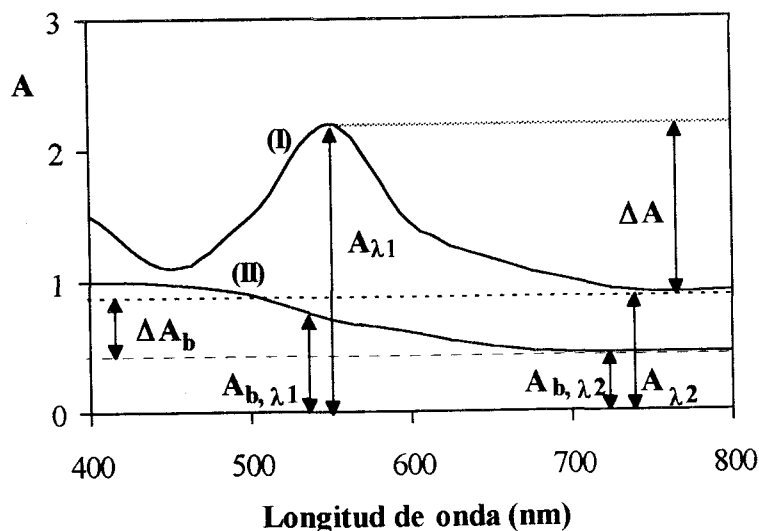


Figura I.2.- Contribuciones a la absorbancia de un sistema fijado sobre un soporte sólido.

### 1.3. Condiciones instrumentales para la medida de absorbancia en fase sólida.

Los espectros de absorción se han registrado en todos los casos entre 400 y 800 nm. La velocidad de barrido se seleccionó registrando un mismo espectro a las distintas velocidades que permite el espectrofotómetro, comprobándose que no existe diferencia entre los espectros obtenidos, se escogió 480 nm/min como velocidad de barrido para posteriores experiencias. El intervalo de puntos experimentales con el que se registra cada espectro es de 0.5 nm.

Cada muestra se mide frente a su blanco correspondiente, preparado al mismo tiempo que la muestra y con idéntico procedimiento. Los espectros obtenidos directamente al medir los analitos, presentan un pequeño ruido que se puede eliminar usando el programa informático PECSS que controla la toma de datos del espectrofotómetro. Este programa permite suavizar los espectros por el método de Savitzky-Golay [122], utilizando para ello distintos factores de suavizado (entre 0 y 7) según el número de puntos experimentales (entre 0 y 49) que se tomen para obtener el promedio.

En el caso de los colorantes solubles en agua se seleccionó un factor de 3 que corresponde a 13 puntos experimentales, este es el factor mínimo con el que se elimina el

ruido del espectro. Con suavizados mayores los resultados no mejoran y por el contrario se pierde información. En el caso de los colorantes no solubles en agua, debido a las características del soporte (gel de sílice C-18), que introduce un mayor ruido de fondo, el factor seleccionado fué 5 que corresponde a 25 puntos experimentales, comprobándose que este es el mínimo valor con el que se elimina el ruido del espectro. Si el factor es inferior a 5 no se elimina totalmente el ruido y si es superior no produce ninguna mejora y se pierde información.

#### **1.4.- Espectrofotometría derivada en fase sólida.**

La espectrofotometría UV-Vis, en su modalidad de derivadas [123-125], se aplicó en los casos donde se emplea la calibración univariante para resolver mezclas de colorantes, que no se pueden resolver mediante espectrofotometría convencional.

Para la aplicación de dicha técnica se preparan dos disoluciones de una concentración determinada de cada analito y una tercera disolución que contiene la suma de las concentraciones de las dos anteriores. A continuación se obtienen los espectros derivados de ordenes sucesivos y se escoge el de menor orden al que le podemos aplicar la técnica del “zero-crossing” [126- 128]. En espectrometría de derivadas hemos de tener presente que existen variables instrumentales que pueden influir en la señal analítica . Estas variables son:

*Velocidad de barrido:* en nuestro caso las señales analíticas obtenidas a diferentes velocidades de barrido son muy parecidas entre sí, por lo que se opta por realizar los barridos con una velocidad de 480 nm/min, para que las medidas sean rápidas sin pérdida apreciable de sensibilidad.

*Factor de filtrado:* en esta técnica a medida que aumenta el orden de la derivada empeora progresivamente la relación entre la señal y el ruido. Para evitar este deterioro se obtuvieron los espectros derivados suavizados con distintos factores que utilizaban entre 5 y 49 puntos experimentales, comprobándose que el proceso era más efectivo a medida que el factor de suavizado era mayor. No obstante, con objeto de no perder mucha información, se adopta una situación de compromiso entre una eliminación considerable del ruido y una pérdida significativa de sensibilidad. Por ello, en el caso de los colorantes solubles en agua, el factor de filtrado seleccionado es de 4 que corresponde a 15 puntos experimentales y para los

colorantes no solubles en agua el factor de filtrado es 5 que corresponde a 25 puntos experimentales. La necesidad de filtrar los espectros derivados de los colorantes no solubles en agua tomando un mayor número de puntos experimentales, no esta motivada por los colorantes sino por el soporte sólido (C-18) que es el que principalmente genera el ruido de fondo.

*Variación de la longitud de onda* [129]: para obtener los espectros derivados es necesario optimizar el valor de  $\Delta \lambda$ . Para optimizar el valor de esta variable se obtienen los espectros derivados y después de suavizarlos con sus respectivos factores de filtrado, se obtienen los espectros derivados para distintos valores de  $\Delta \lambda$ . Operando de esta forma se comprueba que a medida que el valor de  $\Delta \lambda$  aumenta, el espectro obtenido se hace más nítido, pero las señales obtenidas son de menor intensidad. Por ello, se ha seleccionado el valor de  $\Delta \lambda = 1$  nm que es el valor mínimo que puede tomar esta variable con objeto de no perder sensibilidad.

## 2.- METODOLOGÍA DE TRABAJO.

Debido a la presencia de los grupos sulfónicos en los colorantes solubles en agua, es lógico pensar que estos se fijan selectivamente en un soporte sólido de tipo aniónico (Sephadex DEAE A-25, QAE A-25, etc), en el que no se fijarán los correspondientes compuestos no solubles por carecer de dichos grupos polares. Por el contrario este último tipo de colorantes deberán de fijarse, al carecer de grupos sulfónicos, en un soporte sólido de tipo adsorbente, gel de sílice C-18, donde no se fijaran los colorantes solubles en agua. Estos hechos nos permiten cuantificar la cantidad que tenemos de cada una de las sustancias, siguiendo los procedimientos operatorios que exponemos a continuación:

### **Procedimiento para el caso de los colorantes solubles en agua:**

En matraces de 100 ml se introducen los volúmenes necesarios de las disoluciones patrones de colorantes o muestras problema, junto con la cantidad necesaria de disolución reguladora de pH y se enrasa con agua de ósmosis inversa. El conjunto se transfiere a un frasco de vidrio de 1 litro de capacidad, se añade la cantidad apropiada de soporte sólido (Sephadex DEAE A-25) y se lleva a un agitador de botellas, donde se agita un tiempo determinado. Se filtra a través de un embudo de vidrio sinterizado y posteriormente, con la ayuda de una micro pipeta se recoge el gel para introducirlo en una cubeta de 1 mm de

paso de luz. Se centrifuga la cubeta el tiempo necesario, para asegurarnos de que el empaquetamiento es máximo, y se procede a la medida de la señal analítica (Absorbancia).

#### **Procedimiento para el caso de los colorantes no solubles en agua:**

En matraces de 100 ml se introducen los volúmenes necesarios de las disoluciones patrones de colorantes o muestras problema, se añaden las cantidades necesarias de disolución reguladora del pH y de etanol (esta última en proporción adecuada para que la solubilidad del compuesto sea total) y se enrasa con agua de ósmosis inversa hasta un volumen de 100 ml. Las disoluciones se transfieren a frascos de vidrio de 1 L de capacidad, se añade la cantidad necesaria de gel de sílice C-18, se agita el conjunto durante el tiempo de equilibración necesario, se filtra la disolución y se seca la resina por succión mediante una bomba de vacío. Se recoge el sólido con ayuda de una microespátula y se introduce en una cubeta de 1 mm de espesor. Se centrifuga la cubeta el tiempo apropiado para asegurarnos de que el empaquetamiento sea máximo y se procede a la medida de la señal analítica (Absorbancia).

### **3.-METODOLOGÍA PARA EL TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS ANALÍTICOS.**

Los métodos instrumentales de análisis son relativos, por lo que, para conocer la cantidad de analito presente en una muestra, es necesario realizar la comparación de la señal analítica producida por la muestra con las producidas por un conjunto de patrones de composición conocida, proceso que se denomina calibración. La calibración, es por tanto una etapa fundamental en el proceso analítico ya que es una de las fuentes de error sistemático más importante. Este proceso consta de dos etapas:

**1.- Obtención de la función de calibrado.-** Consiste en aplicarle a un conjunto de patrones el método operatorio para encontrar la relación entre la variable dependiente, que es la absorbancia y la variable independiente, que es la concentración de analito, y elegir el modelo matemático que establece dicha relación. Esta puede ser una relación bien conocida, como por ejemplo la aplicación de la ley de Lambert-Beer en espectrofotometría de absorción, la ecuación de Ilkovic en polarografía o la ecuación de Nerst en potenciometría, o bien, puede ser una relación obtenida experimentalmente.



**2.- Predicción de resultados.-** Esta segunda etapa, una vez conocida la relación entre la señal analítica y la concentración de analito, se procede a obtener el valor de la concentración de analito en la muestra, utilizando el modelo establecido previamente.

Los modelos matemáticos que se han utilizado en la presente Memoria para establecer el calibrado analítico son: Modelo de regresión univariante y Modelo de regresión multivariante. Ambos son modelos lineales, pues la relación entre la variable independiente (concentración) y la variable dependiente (señal analítica) es lineal. Al trabajar en espectrofotometría, la ley que justifica esta relación experimental es la ley de Lambert-Beer. La principal diferencia entre ellos se encuentra en el número de variables que se utilizan a la hora de caracterizar el comportamiento del sistema analítico en estudio.

### 3.1.- Modelo de regresión univariante.

Los modelos de regresión univariante, son los más usados para calibración en Química Analítica. En este modelo existe una relación lineal entre la concentración y la señal analítica de la forma:

$$Y = a + b \cdot X$$

donde **Y** es la variable dependiente, **X** la variable independiente y **a** y **b** los parámetros desconocidos a estimar de forma experimental, para obtener un modelo funcionalmente correcto.

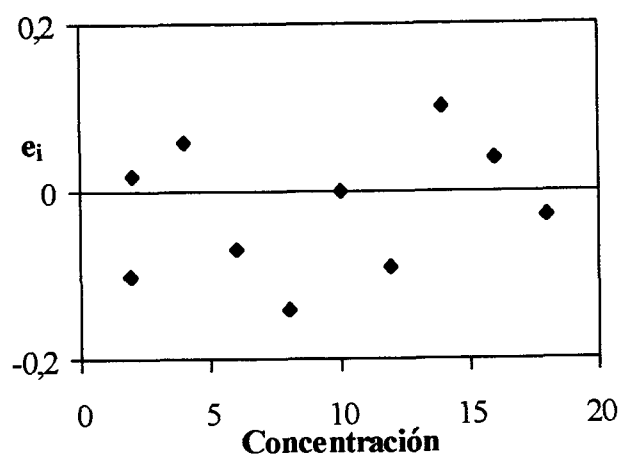
Las hipótesis básicas que garantizan la validez de los resultados analíticos son:

1.- Que la relación entre las variables, concentración y señal sea lineal en el rango de aplicabilidad.

2.- Que la variable concentración no sea aleatoria, es decir que este medida sin error o su error aleatorio sea despreciable frente a la respuesta. En la práctica este error se minimiza con el empleo de sustancias patrón. Si se cumple esta segunda condición, diremos que entre ambas variables se puede establecer una regresión.

3.- Que los errores en la respuesta presenta una distribución normal, son independientes entre sí, están distribuidos por igual y su media es cero, lo que implica que

para cada concentración de analito la dispersión de las medidas de la señal analítica debe de ser la misma e independiente de dicha concentración. De esta forma, se establece una única desviación estándar,  $s_{R,C}$ , como representativa de la dispersión de la señal analítica para todo el rango dinámico lineal de concentraciones de analito, condición esta a la que se denomina **homoscedasticidad**. La figura I.3 nos representa una distribución ideal del valor de los residuales (que son la diferencia entre los valores predichos y los experimentales) frente a la concentración.



**Figura I.3.-** Distribución de los residuales frente a la concentración (condición de homoscedasticidad).

Suponiendo un modelo lineal y que los datos experimentales los podemos ajustar mediante una regresión, el siguiente paso consiste en estimar los valores de los parámetros  $a$  y  $b$ .

### 3.1.1.- Estimación de los parámetros del modelo con el criterio de mínimos cuadrados.

Para la estimación de los parámetros  $a$  y  $b$ , que nos permite obtener la función de calibrado que mejor se ajuste a los valores experimentales, podemos adoptar varios criterios [130]: ó minimización de la varianza (método de mínimos cuadrados), ó minimización de la suma de las desviaciones absolutas, ó minimización de las desviaciones máximas y ó método de grupos (la suma de las desviaciones es igual a cero). Nosotros adoptaremos el criterio conocido como “mínimos cuadrados” que supone que la recta que mejor se ajusta a los

puntos experimentales es aquella que se obtiene haciendo que la suma de los cuadrados de los residuales sea igual a cero. En este caso los valores estimados de la pendiente, **b**, y la ordenada en el origen, **a**, son:

$$a = \bar{R} - b\bar{c}$$

$$b = \frac{\sum (R_i - \bar{R})(c_i - \bar{c})}{\sum (c_i - \bar{c})^2}$$

donde  $R_i$  es la señal instrumental correspondiente a la concentración  $c_i$  del analito patrón,  $\bar{R}$  y  $\bar{c}$  son los valores medios del conjunto de señales y concentraciones empleadas en el calibrado. La desviación estándar de la regresión esta expresada por la ecuación:

$$s_{R,C} = \frac{\sum (R_i - \bar{R}_{i,c})^2}{n-2}$$

donde  $\bar{R}_{i,c}$  es el valor de la señal correspondiente a la concentración  $c_i$  calculado sobre la recta de regresión y  $n$  el número total de parejas de puntos utilizados en la regresión.

### 3.1.2.- Validación del modelo lineal establecido.

Según R. Boqué y F. X. Rius [131], el proceso de validación consiste en verificar experimentalmente que el modelo matemático constituye una simplificación correcta de la serie de puntos experimentales que se poseen, es decir, que el modelo es válido en su establecimiento y válido para predecir futuros valores de concentración desconocidos. El proceso de validación consta de los siguientes pasos: 1.- Comprobación del cumplimiento de las hipótesis matemáticas establecidas. 2.- Comprobación de la adecuación del modelo lineal a los puntos experimentales.

### 3.1.3.- Comprobación del cumplimiento de las hipótesis matemáticas establecidas.

La verificación de las hipótesis matemáticas establecidas: aleatoriedad, independencia, normalidad y homoscedasticidad, se lleva a cabo aplicando los test de

Durbin-Watson, Kolmogoroff o D'Agostino y Barlett respectivamente. Sin embargo la realización de dichos test es tediosa y, desde el punto de vista práctico, se suele asumir el cumplimiento de las hipótesis matemáticas sin aplicar estos test. Solo se comprueba la condición de homocedasticidad siguiendo las sugerencias de Boqué y Rius [131] mediante un **análisis gráfico de los residuales**, procedimiento este orientativo aunque no muy riguroso. Consiste en representar graficamente los residuales frente a la variable independiente y aceptará el cumplimiento si se obtiene: igualdad entre el número de residuales positivos y negativos, distribución aleatoria y valores numéricos similares de los residuales (ver figura I.3). Sobre esta gráfica se podría asimismo evaluar, aunque con las debidas precauciones, la presencia de valores anómalos.

### 3.1.4.- Comprobación del grado de acoplamiento del modelo a los puntos experimentales.

Dado que el coeficiente de correlación,  $r$ , no constituye un test estadístico fiable, no se puede considerar como parámetro estimador de la linealidad [132]. Por ello, para evaluar el grado de acoplamiento del modelo lineal establecido respecto a los puntos experimentales, se usa un test de fallo de ajuste [131].

#### - Test de evaluación del fallo de ajuste.

Para la realización de este test se requieren réplicas para cada valor de la concentración. Se calcula el valor del estadístico  $F_{cal}$ , como el cociente entre las varianzas debidas al fallo de ajuste ( $MS_{LOF}$ ) y al error puro ( $MS_{PE}$ ):

$$F_{cal} = \frac{MS_{LOF}}{MS_{PE}}$$

y el valor calculado se compara con los valores de  $F$  tabulados, para un determinado nivel de significación  $\alpha$ , con  $k-2$  y  $n-k$  grados de libertad, donde  $k$  es el número de patrones de calibración diferentes y  $n$  el número total de observaciones. Actuando de esta forma se nos pueden presentar los siguientes casos:

- Si  $F_{cal} < F_{(\alpha, k-2, n-k)}$  se concluye que la hipótesis nula ( $H_0$ ) es correcta, luego el modelo es lineal.
- Si  $F_{cal} > F_{(\alpha, k-2, n-k)}$  se concluye que la hipótesis alternativa ( $H_1$ ) es correcta, luego el modelo no es lineal.

La concentración más alta de la función de calibrado para la cual no hay fallo de ajuste será el límite superior del rango dinámico lineal establecido para el modelo.

### 3.1.5.- Comparación de las pendientes de dos rectas de calibrado.

Una situación que frecuentemente se presenta al comprobar si existe efecto matriz o al comparar varias funciones de calibrado entre sí, es la de comparar las pendientes de dos rectas de calibrado para comprobar si son iguales entre sí o son distintas. En nuestro caso para comparar la pendiente de la recta de calibrado obtenida usando patrones, con la obtenida por medio de la técnica de la adición de patrón, aplicaremos la metodología estadística que exponemos a continuación.

El primer paso consiste en la realización del test de la **F de Snedecor** para comparar las varianzas de los residuales de ambos calibrados. Si no hay diferencia, estadísticamente significativa, entre la varianza estimada de los residuales de ambas rectas se calcula la varianza promedio. Esta se emplea para el cálculo de la  $t$  experimental que se compara con el valor de  $t$  tabulado con  $n_1 - 2$  y  $n_2 - 2$  grados de libertad, con un grado de significación del 1 %.

Si existe una diferencia estadísticamente significativa entre las varianzas estimadas de las regresiones de ambas rectas, el test se lleva a cabo calculando el valor de  $t$  mediante la siguiente expresión:

$$t_{cal} = \frac{|b_1 - b_2|}{\sqrt{s_{b1}^2 + s_{b2}^2}}$$

donde  $b_1$ ,  $b_2$ , son las pendientes de las respectivas rectas de calibrado y  $s_{b1}$ ,  $s_{b2}$ , son sus respectivas varianzas. Este valor se compara con el valor teórico:

$$t_{cal} = \frac{t_1 s_{b1}^2 + t_2 s_{b2}^2}{s_{b1}^2 + s_{b2}^2}$$

donde  $t_1$  y  $t_2$  son los valores teóricos, para un nivel de significación del 1 % y  $n_1 + n_2 - 4$  grados de libertad obtenidos a partir de las tablas.

En la presente Memoria la comparación de pendientes se ha realizado con el programa informático "QUIMIO" [131].

### 3.1.6.- Parámetros de fiabilidad del modelo.

Una vez establecida la función de calibrado y el modelo lineal se procede a estimar sus parámetros de fiabilidad que en la presente Memoria son los siguientes:

#### 3.1.6.1.- Límites de detección y cuantificación.

Según la IUPAC [133] el límite de detección (LD) es la concentración más pequeña que puede ser detectada, con una certeza razonable, mediante un procedimiento dado. Se calcula mediante la expresión:

$$LD = \frac{3 s_{bl}}{b}$$

donde  $s_{bl}$  es la desviación estándar de la señal analítica correspondiente al blanco, que se obtiene aplicando 10 veces el proceso analítico al blanco y  $b$  es la pendiente de la recta de calibrado.

El límite de cuantificación (LQ), es la menor concentración de analito que puede ser determinada con una precisión apreciable, y viene dado por la siguiente expresión:

$$LQ = \frac{10 s_{bl}}{b}$$

### 3.1.6.2- Rango dinámico lineal.

Viene dado por los dos límites entre los cuales la respuesta es lineal respecto de la concentración:

$$\text{R.D.L.} = 0,1 \left( \text{Lim}_{\text{sup}} / \text{Lim}_{\text{inf}} \right)$$

donde  $\text{Lim}_{\text{inf}}$  es el límite de detección y  $\text{Lim}_{\text{sup}}$  es el límite superior del intervalo calculado al aplicar con el test de fallo de ajuste que vimos anteriormente.

### 3.1.6.2.- Linealidad

Como parámetro estimador de la linealidad se ha utilizado [134]:

$$\text{Lin} (\%) = [1 - \text{DER} (b)] \cdot 100$$

donde  $\text{DER} (b)$ , es la desviación estándar relativa de la pendiente, expresada en tanto por uno, definida por el cociente entre la desviación estándar de la pendiente  $s_b$  y el valor de la propia pendiente. Con esta expresión se obtiene información de la mayor o menor dispersión de los datos alrededor de la línea de calibrado, linealidad “on-line”. Esta linealidad se cuantifica una vez que se ha comprobado la ausencia de curvatura en la línea de calibrado con el test de fallo de ajuste, linealidad “in-line”.

### 3.1.6.4.- Precisión.

Mide el componente aleatorio de la respuesta por lo que para su evaluación se requiere la repetición de un análisis. Se evalúa a partir de los siguientes términos:

**Reproducibilidad o precisión interlaboratorio:** que es la concordancia entre los resultados del análisis de una misma muestra realizados por diferentes laboratorios.

**Repetibilidad o precisión intralaboratorio:** que es la concordancia entre los resultados del análisis de una misma muestra, realizados por un mismo operador, aplicando el mismo método y en el mismo laboratorio.

En la presente Memoria la precisión se evaluó de dos formas:

**a) Repetibilidad del método propuesto aplicado a una muestra patrón y al blanco:** se preparan 10 muestras patrón idénticas, de concentración correspondiente a un punto central de la recta de calibrado y 10 blancos y se calcula la D.E.R. de ambas series de la siguiente forma:

$$\text{D.E.R. (\%)} = (s_{n-1} / A) \cdot 100$$

donde  $s_{n-1}$ , es la desviación estándar de las absorbancias encontradas y A es la absorbancia media de las 10 medidas de los patrones en un caso y de blancos en el otro.

**b) Repetibilidad del método a partir de los datos del calibrado:** se evalúa la precisión a partir de la desviación estándar relativa de la concentración D.E.R.(c):

$$\text{D.E.R ( c ) \%} = (s_c / c) \cdot 100$$

donde  $s_c$  es la desviación estándar de las concentraciones del calibrado, que viene dada por la siguiente expresión:

$$s_c = \frac{s_{R,c}}{b} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(R - \bar{R})^2}{b^2 \sum (c_i - \bar{c})^2}}$$

donde m, es el número de réplicas de la señal instrumental, n es el número de pares de valores utilizados para calcular la ecuación de regresión,  $\bar{R}$  y  $\bar{c}$ , son respectivamente las medias aritméticas de los valores de la señal y la concentración obtenidas en el cálculo de la ecuación de regresión y  $s_{R,c}$  es la desviación estándar de la regresión de la señal R sobre la concentración c, que viene dado por:

$$s_{R,c} = \sqrt{\frac{\sum (R_i - \hat{R})^2}{n-2}}$$



### 3.1.6.5.- Sensibilidad

Mide la capacidad del método para discernir entre dos valores de concentración muy próximos entre sí. Según la IUPAC [133], se define la **sensibilidad** como la relación entre la señal instrumental medida y la concentración de analito y depende de las condiciones instrumentales utilizadas. Dicha sensibilidad es igual a la pendiente de la recta de calibrado.

$$\text{Sensibilidad del calibrado} = b$$

Otra forma de definir la sensibilidad [134], es la **sensibilidad analítica** que determina la diferencia mínima que debe existir entre dos valores de concentración de analito para que el método proporcione una variación de la respuesta superior al error aleatorio, por lo que no sólo depende de la pendiente sino también del componente aleatorio. Se define como sigue:

$$\text{Sensibilidad analítica} = s_{R,C} / b$$

### 3.1.6.6.- Exactitud.

La exactitud indica la capacidad del método analítico para dar resultados lo más próximos posible al valor verdadero. Para evaluar la exactitud se debe conocer el valor considerado como verdadero ya que el valor verdadero, en el sentido estricto de la palabra, es imposible de conocer. El valor considerado como verdadero se puede obtener por los siguientes caminos: 1° empleo de un material de referencia 2° comparación con una metodología estándar 3° ejercicios interlaboratorios 4° bien comparar con otro método en el mismo laboratorio. En la presente Memoria la evaluación de la exactitud, no puede realizarse ni por el camino 1° y 3° por no poseer materiales de referencia en un caso y por lo complicado del otro, se va a seguir el 2° camino en los casos donde se disponga de dicha metodología y el 4° donde no se disponga de ellas.

### 3.2.- Modelos de regresión multivariantes.

La cantidad de información que podemos obtener de la señal en función de una única variable controlada, señales univariantes, es limitada, esto ha sugerido la introducción de nuevos métodos instrumentales que presentan los distintos datos en función de dos o

más variables controladas, señales multivariantes. Estos métodos [135-154] tienen la ventaja de proceder a la determinación de los constituyentes de una muestra de forma simultánea, es decir, se obtiene información cuantitativa muy selectiva a partir de datos poco selectivos, de tal forma que se acortan los tiempos de análisis.

Se han propuesto distintos métodos de calibración multivariante, que se diferencian en los cálculos realizados en la etapa de calibración y en los requisitos del modelo. Los métodos de calibración multivariante más utilizados actualmente son:

- Análisis multicomponente clásico (CLS).
- Regresión inversa por mínimos cuadrados (ILS).
- Regresión por componentes principales (PCR).
- Regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS).

En todos ellos se realizan una serie de medidas sobre un conjunto de patrones, para formar lo que se conoce como matriz de calibración. Los patrones empleados (en concentraciones y composición perfectamente conocidos) deben de cubrir el rango de concentraciones esperadas para las muestras que se vayan a analizar como problema y se medirán bajo las mismas condiciones que las muestras problema. De cada patrón se registra el espectro de absorción completo y una vez establecida la matriz de calibración, ésta se empleará para la predicción de la concentración en muestras problema. En cualquier caso partimos de dos conjuntos de datos:

- El conjunto de respuestas instrumentales (absorbancias  $A$ ) correspondientes a  $p$  diferentes canales de medida (longitudes de onda) de los  $N$  patrones sobre los que se confecciona la matriz de calibración. Con este conjunto se forman la matriz  $A$  ( $N \times p$ ).
- El conjunto de datos formados por las concentraciones conocidas de los  $R$  analitos en la  $N$  disoluciones patrón con este conjunto se obteniendo la matriz  $C$  ( $N \times R$ ).

La matriz de datos  $A$  se puede descomponer en el producto de otras dos matrices  $A = C \cdot S$ , donde  $C$  es la matriz de concentración de los componentes individuales y  $S$  es la matriz de los espectros puros de los componentes de las muestras patrón.

En todos los métodos de calibración multivariante se busca la relación existente entre las dos matrices **C** y **S**, para poder utilizarla en la predicción de las concentraciones de analito en las disoluciones problema, de las que se ha obtenido su respuesta analítica o espectro. Por lo tanto, en este tipo de calibración también se establecen las etapas de calibración y predicción.

### 3.2.1.- Regresión por mínimos cuadrados parciales, PLS.

Este método fué introducido por H. Wold en 1975 [155], teniendo una gran aceptación en el campo del análisis químico. Se ha comprobado [156, 157] que los métodos multivariantes que usan datos espectrofotométricos están limitados: por problemas en la línea base, desviaciones en la ley de Lambert-Beer (curvas de calibrado no lineal), interacciones entre los componentes y fuertes solapamientos espectrales, comparando los distintos métodos multivariantes entre sí, se llega a la conclusión de que los métodos basados en PLS son los más adecuados para resolver estos problemas.

El método PLS, se caracteriza por calcular los denominados factores o componentes principales a partir de las matrices **A** y **C**. Estos componentes principales son combinaciones lineales de las variables originales del sistema en estudio, que son diferentes entre sí y tienen distinto porcentaje de varianza de manera, por lo que, con cada factor, se obtiene una varianza inferior a la obtenida con el anterior.

El problema fundamental en PLS es conocer el número de factores que deben incluirse en el modelo. Este número debe ser inferior al de variables originales, que en nuestro caso coincide con el número de longitudes de onda, ya que se utiliza para modelar el sistema en estudio, excluyendo del modelo los factores que contienen información irrelevante, como puede ser la información debida al ruido o a errores experimentales.

Si se elige un número pequeño de factores para modelar los datos, esto dará lugar a una predicción pobre del modelo, por otra parte, si calculamos más factores de los debidos estos se van agrupando, según el grado de importancia que presenten en el modelo, y puede ocurrir que lleguen incluso a modelar el propio error del aparato, con lo cual el error de predicción comienza a aumentar rápidamente. es claro, por tanto, que la del número óptimo de factores es un paso crítico en este tipo de calibración.

### 3.2.2.- Selección del número óptimo de factores.

El camino seguido para seleccionar el número óptimo de factores es calcular la suma de los cuadrados de los errores residuales pronosticados, valor al que llamamos PRESS y lo obtendremos mediante la expresión:

$$PRESS = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m (\hat{c}_i - c_i)^2$$

donde,  $n$  es el número total de muestras empleadas en la etapa de calibración,  $m$  es el número total de analitos,  $\hat{c}_i$  es la concentración calculada para el compuesto  $i$  por el modelo y  $c_i$  es la concentración real.

Para obtener el valor de PRESS, el procedimiento es como sigue: dejando fuera una de las muestras empleadas en la calibración, las restantes se usan para llevar a cabo el proceso de descomposición espectral por un factor y se calcula la matriz de calibración por regresión. Esta matriz de calibración se utiliza para calcular la concentración de la muestra dejada fuera. El proceso se repite para cada muestra patrón y de esta forma se va calculando el valor de PRESS que nos proporciona información sobre la idoneidad de la matriz de calibración para predecir la concentración de los analitos en función del número de factores considerado. Cuantos más factores sean tenidos en cuenta menor será el error en la predicción de los resultados. Ahora bien, aunque para disminuir el error hay que aumentar el número de factores, este aumento no puede ser ilimitado ya que a partir de un valor en adelante el modelo incorpora factores de ruido que dan lugar a un sobreajuste en donde se considera al ruido como un componente a ajustar. Para evitar el sobreajuste se debe tomar el número de factores que den lugar al PRESS mínimo, sin embargo aún en este valor se puede producir sobreajuste.

La solución a este problema fué sugerida por Haaland y Thomas [158] y consiste en comparar los valores de PRESS, obtenidos para cada factor, con el valor de PRESS mínimo encontrado. Para para estimar la significación de PRESS mayor que el mínimo tenemos la F estadística que se calcula como la relación entre el valor más pequeño del PRESS (el mínimo) con todos los valores del PRESS. F es una función del número total de muestras usadas en la serie de calibración. Esto es algo arbitrario, por esta razón Haaland empíricamente ha determinado que el número verdadero de de factores debería de ser el primer valor del PRESS donde la relación de probabilidad F es menor que 0'75, lo que nos

dice que el número óptimo de factores que debería de ser usado para construir la calibración.

Dentro de los métodos PLS hay dos planteamientos distintos en cuanto a los algoritmos que hay que aplicar para calcular el valor del PRESS. Cada uno de estos dos algoritmos da lugar a una modalidad diferente de PLS a los que se denomina PLS-1 y PLS-2. El método PLS-1 asigna un factor para cada uno de los componentes de la muestra y por tanto calcula un valor de PRESS para cada uno de esos componentes, mientras que en PLS-2, el método calcula un solo valor para todos los componentes y calcula el PRESS una sola vez. En la presente memoria se han empleado ambas variantes con objeto de comparar resultados y elegir el método más apropiado.

La interpretación de la información contenida en cada uno de los factores o componentes principales seleccionados en el modelo, es un campo actualmente en investigación y se realiza mediante análisis de componentes principales. Para ello se seleccionan aquellos factores que explican un gran porcentaje de la varianza sin saber realmente que información contienen, aunque esto no determina que esta varianza esté asociada a una información importante, incluso se podría deber al ruido de fondo. Recientemente se han propuesto métodos alternativos para la selección más apropiada de los componentes principales o factores como pueden ser los métodos basados en los algoritmos genéticos [159].

### 3.2.3.- Calidad en el ajuste del modelo.

Existen diferentes parámetros estadísticos para evaluar el grado de ajuste entre los valores calculados y los predichos por el modelo, en la presente Memoria se han empleado los siguientes:

- **Coefficiente de correlación o de detección:** es un estimador del ajuste de los datos a la regresión lineal y viene dado por la siguiente expresión:

$$r^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (\hat{x}_i - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

donde  $x_i$ , es la concentración teórica de analito en la muestra,  $\hat{x}_i$  es la concentración predicha por el modelo,  $\bar{x}$ , es el valor medio de las concentraciones teóricas y  $n$  es el número de muestras patrón empleadas.

- **Desviación estándar media residual (DEMR)** : este parámetro mide el error medio cometido en el análisis y viene dado por la siguiente expresión:

$$DEMR = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (\hat{x}_i - x_i)^2}$$

donde  $\hat{x}_i$ ,  $x_i$  y  $\bar{x}$  tienen el mismo significado que en la expresión anterior.

- **Error relativo de predicción (ERP)**: este parámetro mide la capacidad de predicción de cada método para cada componente y viene dado por la siguiente expresión:

$$ERP(\%) = \frac{100}{\bar{x}} \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (\hat{x}_i - x_i)^2}$$

### 3.2.4.- Detección de muestras sospechosas.

La detección y eliminación de muestras erróneas constituye una etapa importante en el análisis químico por multicalibración. Hay varias formas de hacerlo basadas todas ellas en métodos matemáticos complejos tales como análisis de cluster y análisis de residuos.

**a) Análisis de clúster:** la representación de las muestras de la matriz de calibración, en el caso de que todas sean similares en composición y valor, se agrupan alrededor de un valor medio denominado "clúster". La forma de evaluar si la muestra es desechable o no es midiendo la distancia estadística entre la muestra considerada sospechosa y el clúster, esta distancia se llama Distancia de Mahalanobis.

**b) Análisis de residuos:** después de ajustar el espectro siempre queda una información residual y el valor de este residuo es un indicador de la parte de información que no ha sido modelada. Si el residuo que se obtiene es excepcionalmente elevado, comparado con el resto de los residuos obtenidos para las distintas muestras, resultará

sospechoso y debemos comprobar si hay que rechazarlo. En la presente Memoria esta es la vía que se ha utilizado.

#### 4.- VALIDACIÓN DEL PROCESO ANALÍTICO.

Validar un método de análisis consiste en verificar y documentar su validez, mediante su adecuación a unos determinados parámetros de calidad que pueden ser de tipo estadístico (exactitud y precisión) y de tipo económico (rapidez del análisis, costo, mantenimiento, etc). Por lo general unos y otros son antagónicos por lo que en la práctica se llegará a una situación de compromiso entre ellos [160]. Para evaluar estos parámetros de calidad se deben contrastar nuestros resultados con los ofrecidos por diversos procedimientos de mayor o menor validez: materiales de referencia, ejercicios interlaboratorios, métodos de referencia, aplicación de los protocolos estadísticos de diverso tipo (adición de patrón en ausencia o presencia de efecto matriz) y preparaciones internas (sustancias de ensayo de concentración conocida).

En nuestro caso, al no disponer de un material de referencia certificado, recurrimos a la determinación de la exactitud comparando los resultados con los obtenidos mediante un método de referencia y en los casos donde no se dispone de él, se utilizaron los llamados protocolos alternativos de validación, como es el método de adición de patrón.

##### 4.1.- Comparación de las medias de dos conjuntos de resultados.

En el caso de utilizar un método de referencia, tendremos que comparar los resultados obtenidos por nuestro método con los obtenidos por el método de referencia con lo cual la verificación de la exactitud se lleva a cabo comparando estadísticamente las medias aritméticas de estos dos conjuntos de datos.

El primer paso consiste en comparar las varianzas de los dos conjuntos de datos mediante el test de la F de Fisher:

$$F_{\text{cal}} = s_M^2 / s_m^2$$

donde  $s_M^2$  y  $s_m^2$  son las varianzas de ambos conjuntos de datos colocando siempre en el numerador varianza del mayor conjunto de datos y en el denominador el del menor. Dicho

valor calculado se compara con el valor de  $F_{tab}$ , para un nivel de significación  $\alpha$ , con  $n_{Ref}-1$  y  $n_r-1$  grados de libertad correspondientes al método de referencia y al método a contrastar respectivamente. Se nos pueden presentar dos casos:

- Que  $F_{cal} > F_{tab}$ , se concluye en este caso que hay una diferencia significativa entre las varianzas de los dos conjuntos de datos, en cuyo caso se comparan las medias de los dos conjuntos de datos aplicando el test de la t de Student.

$$t_{cal} = \frac{|c_{Ref} - c_r|}{\sqrt{\left(\frac{S_{Ref}^2}{n_{Ref}}\right) + \left(\frac{S_r^2}{n_r}\right)}}$$

El valor de  $t_{cal}$  se compara con el de  $t_{tab}$  con un grado de confianza  $\alpha = 0.05$  y unos grados de libertad aproximados que se calculan mediante el test de Welch:

$$g.l. = \frac{(s_r^2/n_r + s_{Ref}^2/n_{Ref})^2}{\frac{(s_r^2/n_r)^2}{n_r} - 1 + \frac{(s_{Ref}^2/n_{Ref})^2}{n_{Ref}} - 1}$$

donde r, es indicativo del método a contrastar y Ref del método de referencia.

- Que  $F_{cal} < F_{tab}$ , en este caso no hay una diferencia significativa entre las varianzas de los dos conjuntos de datos. El paso siguiente sería el cálculo de la varianza promedio  $s_p^2$  de las varianzas correspondientes a ambos conjuntos de datos:

$$s_p^2 = \frac{(n_{ref}-1)s_{ref}^2 + (n_r-1)s_r^2}{(n_{Ref}+n_r-2)}$$

a continuación se calcula el valor de  $t_{cal}$  con la ecuación:

$$t_{cal} = \frac{|c_{Ref} - c_r|}{s_p^2(1/n_{Ref} + 1/n_r)}$$



este valor se compara con un  $t_{tab}$  para un determinado grado de confianza  $\alpha = 0.05$  y  $(n_{Ref} + n_r - 2)$  grados de libertad.

En ambas situaciones puede ocurrir: que  $t_{cal} < t_{tab}$ , se acepta que no existen diferencias significativas entre las medias de ambos conjuntos de datos, por lo tanto el método aplicado es exacto, o bien que  $t_{cal} > t_{tab}$ , ambas medias son significativamente distintas por lo que el método no es exacto.

#### **4.2.- Protocolos estadísticos de validación para comprobar la exactitud. Método de adición de patrón.**

El método de adición de patrón se emplea frecuentemente Química Analítica 1° para la determinación de analitos en muestras en las que el efecto de la matriz lleva a resultados inexactos si se utiliza el calibrado con patrones, 2ª para detectar la presencia de analitos en una concentración inferior al límite de cuantificación del método pero superior a la sensibilidad analítica y 3° para comprobar la exactitud de los resultados obtenidos cuando no se dispone de un método de referencia ya establecido. Hay varias modalidades del método de adición de patrón [161]: variación continua de patrón a un volumen constante, variación continua de patrón y muestra en un volumen total constante, adición simple de un volumen variable de patrón y volumen total variable con variación continua de patrón. La primera modalidad, que es la más seguida, consiste en adicionar en todos los matraces volúmenes iguales de la disolución obtenida generalmente después de tratar la muestra y añadirle a todas menos a una cantidades crecientes y perfectamente conocidas del analito. Si representamos las señales así obtenidas frente a las concentraciones adicionadas y si no hay presencia de interferencias se obtiene una recta con la misma pendiente que la del calibrado (figuraII.4). La extrapolación de esta recta con la parte negativa del eje de las concentraciones corresponde a la concentración de analito en la muestra problema.

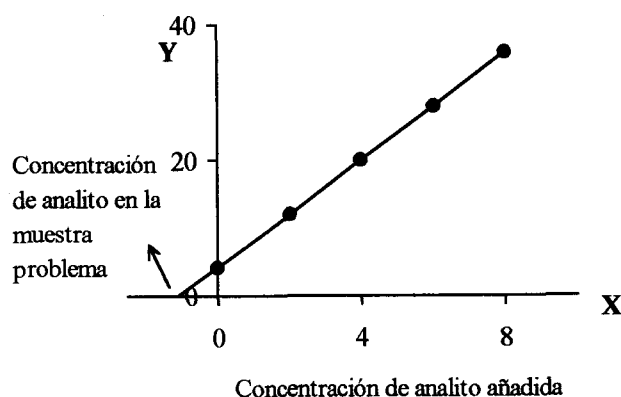


Figura I.4.- Método de adición de patrón.

Cuadros y col. [162], han propuesto un protocolo estadístico para llevar a cabo la validación de un método analítico por aplicación del método de adición de patrón. Dicho protocolo, esta basado en los datos obtenidos a partir de tres experiencias de calibrado: un calibrado con patrones (CP), un calibrado con adición de patrón (CA), y otro con porciones de muestra o calibrado de Youden (CY). En el CY se representa la señal obtenida frente al cociente volumen añadido/volumen final, lo que nos permite establecer la señal del blanco propio de la muestra (blanco de Youden) y corregir errores sistemáticos constantes. Para cada calibrado se calcula la ordenada en el origen, la pendiente y la desviación estándar de la regresión. La exactitud del resultado analítico, se comprueba mediante la comparación de los contenidos de analito obtenidos a partir de estos tres calibrados.

## 5. EXPERIMENTAL.

### 5.1.- Disoluciones y soportes empleados.

#### 5.1.1. Disoluciones empleadas.

☐ **Agua de ósmosis inversa** obtenida por el equipo de ósmosis inversa Milli-RO 12 plus Millipore junto con un equipo de depurado Milli-Q plus 185.

☐ **Disoluciones de colorantes solubles en agua:** todas las disoluciones fueron preparadas por pesada exacta del colorante y disolución con agua de ósmosis inversa. Las

disoluciones se conservaron en botellas de cristal ambar para evitar la fotodegradación del analito. En la tabla I.1 se especifica cada uno de los colorantes usados en esta Memoria, el grado de pureza indicado por el fabricante, junto con el Color Index. De cada colorante se prepara una disolución patrón de 10 mg/l, la cantidad pesada de cada uno de ellos es función de la pureza correspondiente. Las disoluciones de trabajo se prepararon a partir de disoluciones madre de 10 mg/l por simple dilución con agua de ósmosis inversa.

**Tabla I.1-** Disoluciones patrón.

Colorante	Pureza (%)	Color Index	Fabricante
Amarillo Anaranjado (E-110)	85	15985	Sancolor S.A.
Amarillo Anaranjado (E-110)	86	15985	Utter
Amarillo de Quinoleina (E-104)	70	47005	Aldrich
Escarlata 4R (E-124)	82	16255	Sancolor S.A.
Carmoisina (E-122)	85	14720	Sancolor S.A.
Tartracina (E-102)	85	19140	Sancolor S.A.

□ **Disoluciones de colorantes no solubles en agua:** todas las disoluciones fueron preparadas por pesada exacta y disolución en etanol absoluto. Las disoluciones se conservaron en botellas de cristal de color ambar para evitar la fodegradación del analito. En la tabla I.2. se especifica cada uno de los colorantes, su grado de pureza indicado por el fabricante. Las disoluciones patrón preparadas de cada uno de los colorantes tienen una concentración de 50 mg/l, nuevamente la cantidad pesada de cada uno de ellos está en función de la pureza correspondiente. Las disoluciones de trabajo se prepararon a partir de estas disoluciones patrón de 50 mg/l por simple dilución con agua de ósmosis inversa.

Tabla I.2.- Colorantes patrón poco solubles en agua.

Colorante	Pureza (%)	Fabricante
Sudan I	97	Aldrich
Amarillo de Quinoleina insoluble	95	Aldrich
1-naftilazo-1-naftol	Sintetizado por nosotros	
1-naftilazo-2-naftol.	Sintetizado por nosotros	

**Disolución reguladora de pH ácido acético/acetato sódico 1M de pH 5**, preparada a partir de 200 ml de ácido acético 1M y la cantidad necesaria de hidróxido sódico 1M hasta alcanzar pH 5.

**Metanol**, para cromatografía líquida. Panreac.

**Hidróxido sódico (97 %)**. Panreac.

**Ácido acético (96 %)**. Merck.

**Etanol absoluto**. Panreac.

**Dihidrógeno fosfato potásico (99.5 %)**. Merck.

**Tetrabutilamonio hidrógeno sulfato**. Merck.

**Ácido clorídrico 35 %**. Panreac.

### 5.1.2.- Soportes empleados.

Los soportes empleados en esta Memoria son de dos tipos: cambiadores iónicos y adsorbentes.

#### ✧ Geles de cambio iónico.

- Sephadex DEAE A-25 (Sigma) en ciclo cloruro.
- Sephadex QAE A-25 (Sigma) en ciclo cloruro.
- Sephadex SP C-25 (Sigma) en ciclo sodio.
- Sephadex CM C-25 (Sigma) en ciclo sodio.

⊗ Adsorbentes.

- Sephadex (Sigma) G-15.

- Sephadex (Sigma) G-25.

- Gel de sílice C-18. Obtenida e identificada por nosotros, tal como se describe posteriormente. Todas las resinas se emplean sin tratamiento previo al objeto de evitar la posible contaminación de las mismas.

I.1.2.1. Características de los soportes empleados.

- Soportes tipo Sephadex.

El Sephadex es un gel formado por cadenas de polidextrano entrecruzadas por epíclorhidrina, cuya estructura se muestra en la figura I.5.

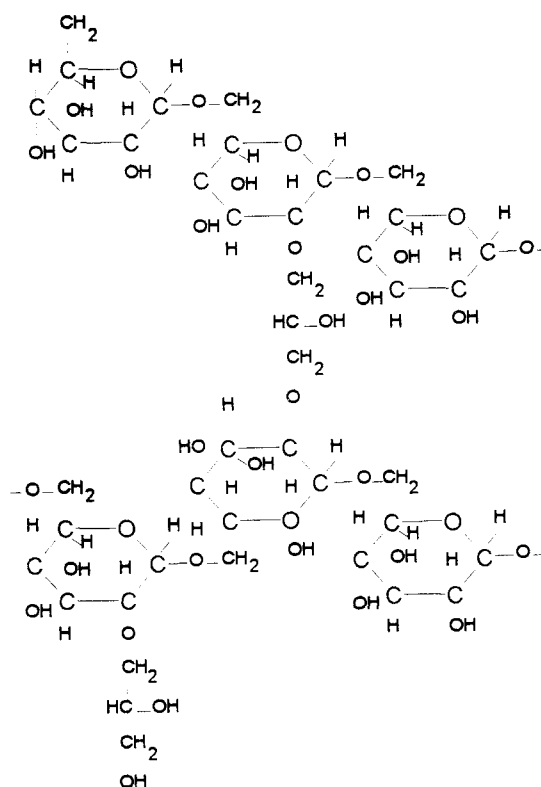


Figura I.5.- Estructura parcial del gel Sephadex.

El gran número de grupos hidroxilo que posee le confiere carácter hidrofílico, por lo que se hincha con facilidad en agua y en disoluciones de electrolitos.

Para su identificación se emplean las iniciales del correspondiente grupo funcional responsable del carácter cambiador (DEAE, QAE, CM, SP), seguido de la letra A o C para indicar si se trata de un gel cambiador de aniones o de cationes respectivamente, y de un número que indica su porosidad (15, 25, 50).

Los diferentes geles Sephadex tipo G, que son aquellos que no presentan en su estructura grupos cambiadores de iones, difieren en el grado de entrecruzamiento de las cadenas de polidextrano, por lo que también varía su grado de hinchamiento y tamaño de poro. En ellos hay que tener en cuenta que al aumentar la porosidad disminuye el grado de entrecruzamiento por lo que serán capaces de retener sustancias de mayor peso molecular que los demás geles de su mismo tipo.

Por otra parte, un cambiador de iones es un polímero que porta grupos iónicos fijos, capaz de intercambiar contraiones ligados a él por cantidades equivalentes de otros iones de la disolución. Estructuralmente consiste en una matriz insoluble que tiene unidos, por enlace covalente, grupos cargados que están asociados a contraiones móviles. Estos contraiones se pueden intercambiar de forma reversible, por otros iones de la misma carga, sin alterar la matriz orgánica o inorgánica. La naturaleza de esta matriz determina sus propiedades físicas, como pueden ser: resistencia mecánica, densidad, características ópticas, etc. En el caso de los cambiadores iónicos Sephadex, los grupos iónicos están unidos a las unidades de glucosa mediante enlaces éter que son muy estables. Los soportes no cambiadores de iones ensayados son: Sephadex G-15, Sephadex G-25 y gel de sílice C-18.

## **5.2.- Instrumentación y material de laboratorio.**

### **5.2.1.- Instrumentación empleada.**

- Espectrofotómetro UV-VIS**, Perkin-Elmer modelo Lambda 2, conectado a un ordenador IBM SX-486, equipado con el software PECSS, que permite archivar y manipular los espectros.
- Agitador de botellas rotatorio** Agitaser modelo 2000, de velocidad variable.

- pH-metro** digital Crison modelo 501 provisto de un electrodo Ingold combinado de vidrio y calomelanos saturado.
- Balanza analítica** Mettler AE 163.
- Bomba eléctrica de vacío** Büchi, modelo B-169 de Laboratoriums-Technik AG.
- Centrífuga** BHG modelo Fixette II.
- Microondas** Ufesa modelo complete 220.
- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución** Hewlett-Packard serie 1050, equipado con: Detector espectrofotométrico de longitud de onda variable, Inyector manual Rheodyne 7125 con un bucle de 20  $\mu$ l, Integrador Hewlett-Packard modelo 3396-A,- Microjeringa Hamilton para HPLC, modelo 1810 RNE, con 100  $\mu$ l de capacidad,- Columna Sugelabor C-18, 5  $\mu$ m de tamaño de partícula, dimensiones 100 mm por 2.1 mm, relleno Hypersil ODS.
- Estufa** Heraeus.
- Baño de arena** Selecta.
- Rotavapor** Heidolph VV1. 40-200 rpm.

### 5.2.2.- Material de laboratorio.

Todo el material utilizado en la presente Memoria ha sido de vidrio, ya que se ha comprobado que si se almacenan las disoluciones en botellas de PVC u otros polímeros, se produce una considerable adsorción de los colorantes sobre las paredes de los mismos.

- Matraces aforados** Afora, clase A, de diferentes capacidades.
- Pipetas aforadas y graduadas** Afora, clase A, de diferentes capacidades.
- Embudos filtrantes de diferentes tamaños** provistos de placa de vidrio sinterizada de 3 mm diseñados por nosotros.
- Goteros de vidrio**, provistos de tetinas, para empaquetar las muestras en la cubeta de medida.
- Cubetas de ultravioleta-visible** Starna de 1 mm de paso de luz.
- Botellas de vidrio ambar** de 1 litro de capacidad para conservar las disoluciones patrón de los distintos colorantes.
- Botellas de vidrio incoloras** Schott de diferentes capacidades para la agitación de las muestras.
- Filtros de acetato de celulosa** Millipore Hawp 04700 tipo HA de 0.45  $\mu$ m de tamaño de poro.

- Filtros de membrana** Whatman de nylon de 47mm de diámetro y de 0.45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro.
- Cartuchos SEP-PAK C-18**, Waters Millipore.
- Placas cromatográficas** Whatman de 250  $\mu\text{m}$  de espesor de gel de sílice sobre una base de aluminio.

### 5.3.- Ordenadores y programas informáticos.

- Ordenador 486 DX4** equipado con el programa GRAMS/386 versión 2.02 (1993) de Galactic Industries Corporation.
- Ordenador IE 486** equipado con el programa PECSS versión 4.2 (1992) de Perkin-Elmer.
- Statgraphics**, ver. 6.0. STSC, Inc., Statistical Graphics Corporation, USA (1993). Licencia Universidad de Granada.
- Quimio**, ver. 1.0, Ed. Rafael Cela, Autores: M. Blanco, R. Boqué, R. Cela, J. Coello, S. MasPOCH, M<sup>a</sup> C. Ortiz, J. Riba, F. X. Rius, A. Ruíz, L. A. Sarabia, X. Tomás. Secretario de Publicaciones, Universidad de Santiago de Compostela, España (1993).
- Grams/386**, ver. 2.02, de Galactic Industries Corporation (1993).
- PECSS**, ver. 4.2, de Perkin-Elmer.
- Harvard Graphics**, ver. 3.0, de Software Publishing Corporation (1991).
- Excel**, ver. 5.0 de Microsoft office.

### 5.4.- Metodología de tratamiento de las muestras.

Para comprobar la validez de los métodos desarrollado en la presente Memoria y establecer su aplicabilidad, en un primer lugar se determinaron los diferentes productos comerciales, usados en España como colorantes en la manufactura de alimentos, citados en el apartado anterior. Posteriormente también se usa para a la determinación de los colorantes presentes en productos alimenticios, procurando seleccionar productos lo más variados posibles, para demostrar así la viabilidad de la metodología de análisis propuesta. El tratamiento de la muestra está siempre determinado por la naturaleza de la matriz de la sustancia en estudio. Las disoluciones de las muestras en todos los casos fueron filtradas a través de un filtro de acetato de celulosa, Millipore Hawp 04700 tipo HA de 0.45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro, para eliminar las posibles sustancias que puedan interferir en el análisis del



colorante y la turbidez pasando las disoluciones a un matraz de vidrio que ha sido previamente limpiado cuidadosamente.

#### 5.4.1.- Refrescos.

Son de naturaleza líquida por lo que para su análisis se toma un volumen determinado de muestra, una vez filtrado, y se le aplica la metodología establecida. En el caso de las bebidas carbónicas es necesario una previa desgasificación, sometiendo al refresco a vacío el tiempo necesario para la eliminación del gas.

**Tabla I.3. Muestras analizadas**

Muestra	Marca	Fabricante
Refresco sabor plátano	Charly's	Internacional de Comercio y Destilerías J. Borrajo S.A. (España)
Refresco sabor limón	World	Lobeca S.A. (España)
Refresco sabor limón	Hipercor	Casera Industrial S.A. (España)
Refresco sabor limón	Gatorade	Stokely Van Cap. Inc. (USA)
Licor sabor melón	Amarischia	Amarischia S.P.A. (Italia)
Refresco de naranja	Casera	Casera Industrial S.A. (España)
Refresco de plátano	Frutaysol	Industrias Espadafor (España)
Refresco de naranja	Hipercor	Casera Industrial S.A. (España)
Grosella	Dama de Baza	Industrias Espadafor (España)

#### 5.4.2.- Golosinas líquidas y sorbetes.

**Tabla I.4. Sorbete y golosina líquida analizada.**

Muestra	Marca	Fabricante
Sorbete sabor naranja	Camy	Sociedad Nestlé, A.E.P.A. (España)
Golosina líquida	Chupol	Hijos de Alberto Soto S.A. (España)

El sorbete de naranja se dejó a temperatura ambiente el tiempo necesario para que pase a estado líquido. Al aplicarle el método y añadir la disolución reguladora aparece un precipitado blanco, probablemente debido a la goma xantana que contiene, que se elimina volviendo a filtrar la disolución. A la golosina líquida se le aplica el método una vez filtrada.

#### 5.4.3.- Colorantes alimentarios.

Los dos colorantes alimentarios seleccionados (tabla I.5) son: el colorante vahiné, que es un líquido empleado en repostería para dar color, se analiza tomando volúmenes de muestra una vez filtrada y el colorante alimentario Ducros que es un producto sólido en forma de polvo, empleado en la cocina para dar color a las comidas sustituyendo al tradicional azafrán, se analiza preparando una disolución del mismo 0.0499 gramos del producto que se introducen en un matraz aforado de 100 ml y se enrasa con agua de ósmosis inversa. La disolución se guardó en una botella de color ámbar de 1 litro de capacidad.

Tabla I.5. Colorantes alimentarios.

Muestra	Marca	Fabricante
Colorante alimentario	Vahiné	Ducros S.A (España)
Colorante alimentario	Ducros	Ducros S.A (España)

#### 5.4.4.- Caramelos, gominolas y gelatinas

Las disoluciones para el análisis del colorante en los caramelos, se obtienen disolviendo varias piezas de la muestra previamente pesadas, en la mínima cantidad de agua de ósmosis inversa necesaria con objeto de obtener una señal de absorbancia apreciable una vez que se aplique el método operatorio establecido. En las gelatinas la disolución se prepara pesando 3 gramos del producto que se introducen en un vaso de precipitado donde se añaden 90 ml de agua de ósmosis inversa, agitando y calentando moderadamente la disolución el tiempo necesario para su total disolución. En el caso de las gominolas y de las espumas la disolución se preparó introduciendo varias piezas previamente pesadas, dentro de un vaso de precipitado junto a un volumen medido de agua de ósmosis inversa. El vaso

se introduce en el microondas a una temperatura de 70 °C durante 2 minutos. Los caramelos, gominolas y gelatinas seleccionados se recogen en la tabla I.6.

Tabla I.6. Caramelos y gominolas.

Muestra	Marca	Fabricante
Caramelo sabor fresa-mentolada	Pectol	Leaf Iberia S.A(España)
Caramelo sabor fresa-mentolada	Halls	Adams (España)
Caramelo sabor miel	Agüera	Productos Agüera S.L. (España)
Gominolas	Mauri	Mauri S.A (España)
Espumas dulces	Party Pack. Animallow	Lidl. (CEE)
Gelatina sabor piña	Royal	Nabisco Iberia S.A (España)
Gelatina sabor tutti frutti	Royal	Nabisco Iberia S.A (España)

#### 5.4.5.- Mermelada y lápiz pastelero.

Tabla I.7. Muestras analizadas.

Muestra	Marca	Fabricante
Mermelada sabor fresa	Halcón	Halcón foods S.A (España)
Lápiz Pastelero	Ducros	DUCROS S.A (España)

La disolución para el análisis del colorante en la mermelada se prepara pesando una determinada cantidad de producto que se introduce en un vaso de precipitado al que se le agrega un volumen conocido de agua de ósmosis inversa. La disolución se agita y calienta moderadamente el tiempo necesario para la total dosolución del producto y posteriormente se filtra.

El lápiz pastelero es un producto empleado en repostería para adornar los postres. La disolución de este compuesto se hizo pesando una determinada cantidad del producto que se introduce en un vaso de precipitado donde se añade un determinado volumen de agua de ósmosis inversa, se agita el tiempo necesario para conseguir la total disolución del producto y posteriormente se filtra y se aplica el método operatorio establecido.

## **6. SÍNTESIS DEL GEL DE SÍLICE C-18 Y DE LOS ANALITOS 1-NAFTILAZO-1-NAFTOL Y 2-NAFTILAZO-2-NAFTOL.**

### **6.1- Síntesis y caracterización del gel de sílice derivado con octadeciltriclorosilano (C-18).**

Dada la metodología de trabajo que se va a llevar a cabo, se hace necesario el empleo del gel de sílice C-18 con un tamaño de partícula relativamente grande para poder recoger la resina seca y empaquetarla en la cubeta de medida. Sin embargo los adsorbentes existentes en el mercado, tienen un tamaño medio de 50  $\mu\text{m}$ . Por otra parte al trabajar en medio acuoso no experimentan hinchamiento alguno lo que hace imposible su manipulación en seco, es decir la recogida del gel con espátula y su empaquetamiento en la cubeta de 1 mm de paso de luz. A todo esto hay que unir el elevado precio del adsorbente C-18 comercial del orden de 70000 pesetas/100 g [163]. Por estas razones hemos optado por sintetizar nuestro propio soporte.

### **6.2.- Reactivos empleados en la síntesis.**

- **Sílica gel 60**, 30-70 mallas ASTM, con un tamaño medio de partícula entre 0.2 y 0.5 mm. Merck.
- **Octadeciltriclorosilano**. Sigma.
- **Hexametildisilazano**. Sigma.
- **Tetrahidrofurano**. Sigma.
- **Tetracloruro de carbono**. Panreac.
- **Metanol**. Panreac.

### **6.3.- Síntesis del gel.**

Se ensayaron dos procedimientos de síntesis diferentes:

### 6.3.1.- Método de LITTLE [164, 165]

Este proceso que es más simple que el siguiente, consta de las siguientes operaciones:

Se adicionan 5 g de sílice a 0.5 g de octadeciltricloro silano que han sido previamente disueltos en 50 ml de tolueno. La mezcla se deja reaccionar a temperatura ambiente durante 24 horas, después de las cuales se filtra la sílice, se lava con tolueno y se seca.

Si se compara este método con el siguiente se encuentra, por análisis elemental, que la cantidad de carbono fijada a la superficie de la sílice en este último caso es menor, 6.0 % frente a 18.6 % sólo en la reacción de silanización, ya que estos autores no realizan la metilación posterior, esta diferencia puede ser debida a que en este caso las condiciones experimentales son más suaves. Por lo tanto se descarta su utilización.

### 6.3.2.- Método de SANDER Y WISE [166].

Hemos seleccionado este método de síntesis, entre todos los existentes en bibliografía [166-184, 164, 165], debido a que las etapas de síntesis propuestas por estos autores para la obtención de C-18 monomérica que son silanización de la sílice con octadeciltriclorosilano y posterior metilación, coinciden con las etapas de síntesis indicadas por la casa Sigma [163] cuya resina será tomada como base para comparar el producto resultante de nuestra síntesis

Estos autores proponen la síntesis de tres tipos de fases enlazadas: monoméricas, poliméricas y un tipo intermedio denominado por ellos oligoméricas.

Las fases poliméricas se preparan por silanización con octadeciltriclorosilano en presencia de agua, de forma que modificando la proporción de agua se controla el grado de polimerización.

Las fases oligoméricas se sintetizan mediante un esquema de reacción secuencial, donde cada etapa consiste en una síntesis monomérica y al final de la misma tenemos que los átomos de cloro del agente silanzante que no han reaccionado, son hidrolizados para

dar lugar a nuevos grupos silanol. Por consiguiente, se puede considerar un proceso de polimerización controlado ya que la posibilidad de entrecruzamiento es menor en este caso, al efectuarse la reacción sobre la superficie de la sílice en lugar de en disolución acuosa, como ocurre en la síntesis polimérica.

Nuestro objetivo fue sintetizar fases monoméricas, ya que la síntesis de fases oligoméricas ha sido realizada en estudios preliminares comprobándose que el rendimiento de esta segunda reacción de silanización es escaso (no se modifica la superficie activa del gel) por lo que no se aumenta la fijación de los analitos. La síntesis de fases poliméricas no se ensayó por la complejidad que presenta el control del grado de polimerización y la posterior identificación de las diferentes fases. Por estas razones se utilizó, para todo el trabajo monómeros de C-18.

#### **- Etapas de la síntesis monomérica:**

##### **1. Acondicionamiento de la sílice.**

Aproximadamente 100 g de sílice fueron tratados con  $\text{HNO}_3$  (1:1) durante 24 horas para activar la superficie del gel, observándose un desprendimiento de  $\text{CO}_2$ . Esta presencia de carbonato se verifica posteriormente mediante un análisis elemental, pues mientras que la sílice no tratada presenta un 3,2 % de carbono, la que fue tratada con  $\text{HNO}_3$  no lo presentaba.

Antes de llevar a cabo la reacción de silanización, la muestra de sílice, previamente lavada con abundante agua desionizada, se secó a  $150\text{ }^\circ\text{C}$  durante 2 horas para eliminar el agua adsorbida físicamente sobre su superficie y evitando el riesgo de polimerización.

##### **2. Silanización.**

A 93.0 g de la sílice anterior, se le adicionan en caliente 250 ml de tetracloruro de carbono y 50 ml de octadeciltriclorosilano. La mezcla se mantiene a reflujo durante 4 horas utilizando el montaje de la figura II.6.

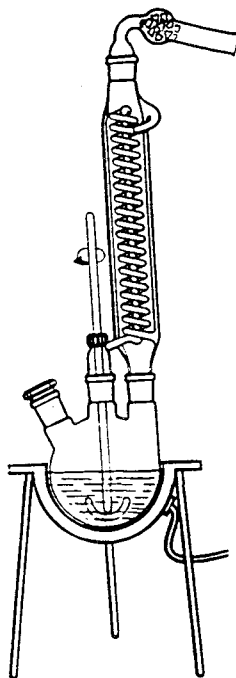
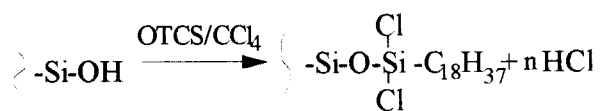


Figura I.6.- Montaje empleado en la síntesis de la sílice C-18.

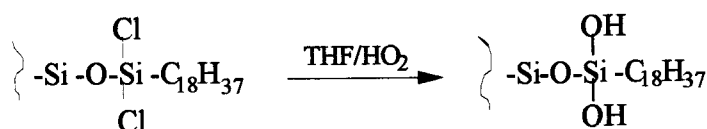
A continuación, la sílice enlazada se filtró e inmediatamente fue lavada con la siguiente secuencia de disolventes: tetracloruro de carbono, tetrahidrofurano, metanol, 50 % metanol-agua, metanol y finalmente tetrahidrofurano. Con esta secuencia nos aseguramos la eliminación de residuos tanto polares como apolares. La reacción que ocurre en esta etapa de silanización es:



### 3. Hidrólisis.

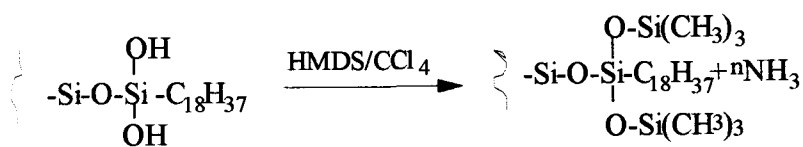
A continuación la sílice se introdujo de nuevo en el matraz de reacción junto con 250 ml de una mezcla de tetrahidrofurano-agua (1:1) y se mantuvo a reflujo durante 1 hora en el montaje indicado en la figura I.6.

Terminada la operación de reflujo, la sílice fue filtrada, lavada con tetrahidrofurano y secada a 150 °C durante 1 hora. En esta etapa se hidrolizan los cloros residuales unidos a silicio, intercambiándose por los grupos OH. De esta forma se acondiciona el gel tanto para una nueva etapa de silanización (formación de fase oligomérica), como para una metilación de los hidroxilos libres (obtención de fase monomérica enlazada). La reacción que tiene lugar es:



#### 4. Metilación.

Una vez que la sílice está completamente seca, se vuelve a poner a reflujo durante 2 horas con 250 ml de una mezcla hexametildisilazano-tetracloruro de carbono (1:1), con lo que obtenemos lo siguiente:



Con esto se da por finalizado el proceso de síntesis del gel y se procede a su lavado siguiendo la misma secuencia de disolventes indicada anteriormente.

#### 6.4.- Identificación y caracterización.

Para identificar el soporte monomérico obtenido se han llevado a cabo aquellas pruebas de identificación realizadas en trabajos anteriores [185].



### 6.4.1.- Análisis elemental.

Durante el proceso de síntesis se han tomado muestras de cada una de las etapas de la misma para la realización del análisis elemental de C, H y N. Los resultados obtenidos, correspondientes a la media de tres análisis efectuados a tres porciones diferentes de la misma muestra, se recogen en la tabla II.8.

Tabla I.8.-Análisis elemental del gel.

Muestra	%C	%H	%N
SiO <sub>2</sub>	3,2	0,9	0,1
SiO <sub>2</sub> tratada con HNO <sub>3</sub> (1:1)	-	0,5	-
SiO <sub>2</sub> silanizada e hidrolizada	18,69	3,49	0,1
SiO <sub>2</sub> silanizada, hidrolizada y metilada	19,11	3,65	0,1

La ausencia de C en el blanco hace innecesaria la corrección de los datos. Es difícil comparar los resultados obtenidos con los expuestos en bibliografía [166, 168, 169] y con los datos dados por las casas comerciales ya que el tamaño de partícula es muy diferente, por lo tanto también lo será el área.

En el caso del adsorbente comercial sílice C-18 suministrado por Sigma [163] y sintetizado según el mismo método utilizado por nosotros, el contenido de carbono es del 21%, pero hemos de tener en cuenta que su tamaño de partícula es de 40-63  $\mu$  frente a las 200-500  $\mu$  de la sílice utilizada para la síntesis, con lo cuál el área específica es mucho menor en nuestro caso.

### 6.4.2.- Espectro infrarrojo.

La espectrometría infrarroja ha sido una técnica ampliamente utilizada para la caracterización de ligandos inmobilizados sobre la superficie de sílice [170-180].

Se realizó el espectro IR de la sílice C-18 sintetizada por nosotros y se comparó con el espectro IR de la distribuida por la casa comercial Sigma, observándose los siguientes resultados, correspondientes a las bandas comunes en ambas, recogidos en la tabla I.9.

Tabla I.9.- Asignación de las bandas del espectro de IR.

$\delta$ (cm <sup>-1</sup> )	Asignación
1096 y 469	tensión asimétrica debida a la absorción del enlace silano.
3666, 3466, 800	tensión simétrica del grupo S <sub>i</sub> -OH
2960	tensión simétrica de CH <sub>3</sub>
2927	tensión simétrica de CH <sub>2</sub>
1469	flexión del enlace C-H
848	tensión de S <sub>i</sub> -C
757	vibración del esqueleto de -S <sub>i</sub> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>

Se realizó también el espectro IR de los reactivos usados en la síntesis de C-18, pudiéndose observar la coincidencia en la posición de estas bandas con los espectros correspondientes a octadeciltriclorosilano y hexametildisilazano. Por todo esto puede afirmarse que los espectros de IR de ambas resinas son prácticamente superponibles y que por lo tanto se trata del mismo compuesto.

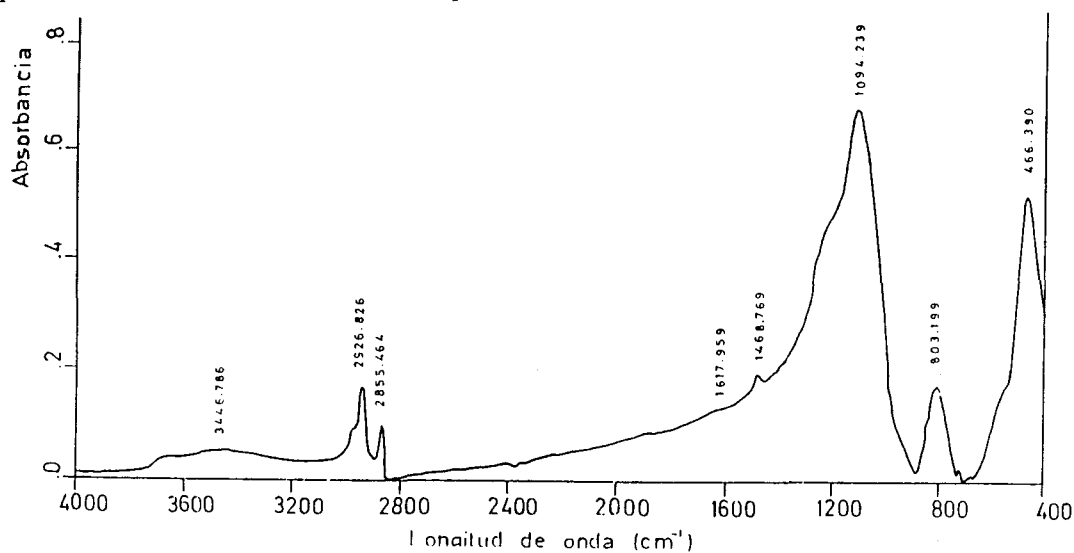


Figura I.9.- Espectro infrarrojo de la sílice C-18 distribuida por la marca comercial Sigma.

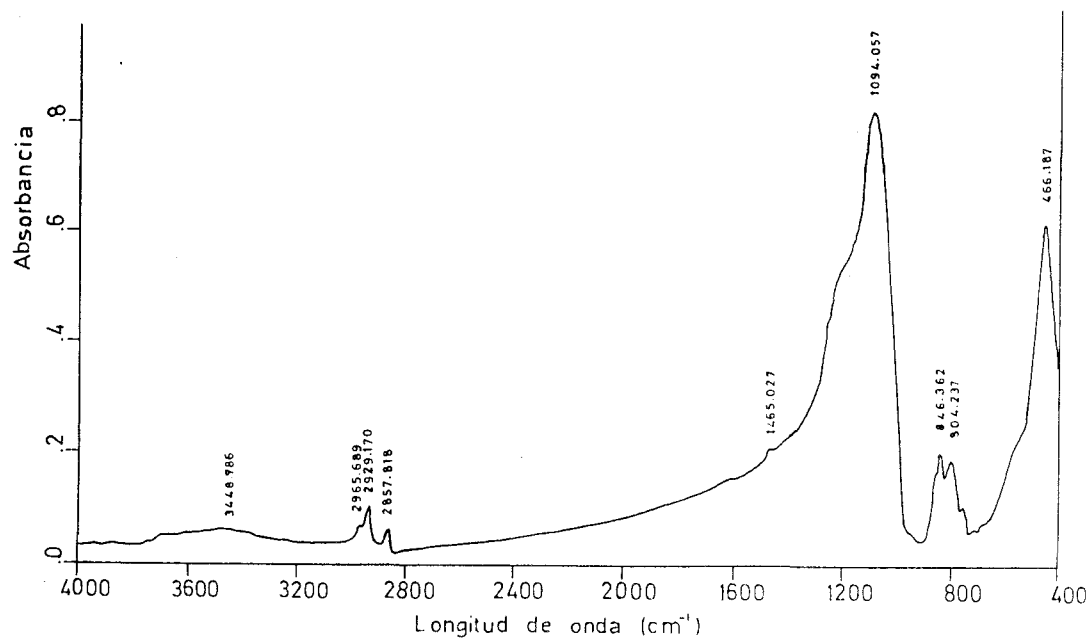


Figura I.8.- Espectro de infrarrojo de la sílice C-18 sintetizada en el laboratorio.

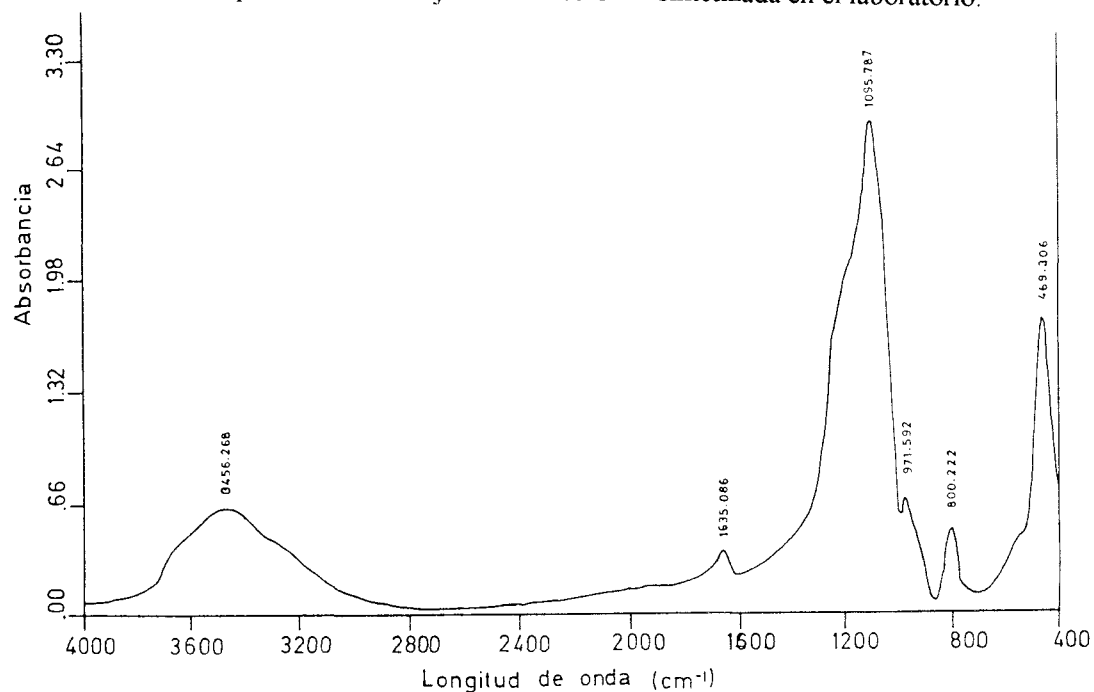


Figura I.7.- Espectro infrarrojo de la sílice empleada como soporte para la derivación.

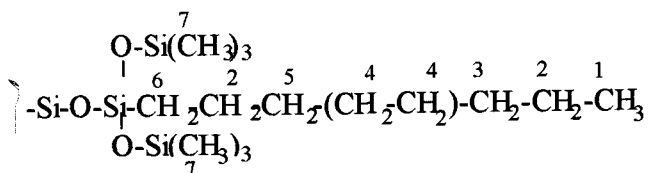
### 6.4.3.- Espectros de RMN- $^{13}\text{C}$ .

En bibliografía se utiliza la técnica de Resonancia Magnética Nuclear de  $^{13}\text{C}$  en fase sólida para elucidar la estructura de geles de sílice derivados químicamente [180-182]. Los resultados del espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  se recogen en la tabla I.10.

Tabla I.10.- Asignación de los desplazamientos químicos del espectro de RMN- $^{13}\text{C}$ .

Carbono	Desplazamiento químico (ppm)	Carbono	Desplazamiento químico (ppm)
1	13,06	5	33,19
2	22,50	6	solapado con C-1
3	32,00	7	1,22
4	29,84		

En el caso de las señales de relajación correspondientes a los carbonos identificados en la molécula como 1 y 6, se da un solapamiento de la señal correspondiente al carbono 6 por compresión esférica de los metilos adyacentes unidos al silicio vecinal. La numeración asignada a cada carbono es la siguiente:



Como los resultados de la identificación son satisfactorios, podemos afirmar que la composición del gel sintetizado parece correcta.

### 6.5.- Síntesis del 1-naftilazo-1-naftol y del 1-naftilazo-2-naftol.

Ya que uno de los propósitos de la presente Memoria es la determinación de los subproductos no solubles en agua, producidos en la manufactura de los colorantes más empleados en alimentación, se hizo en primer lugar una búsqueda de estos productos, para poder realizar dicho estudio, encontrándonos con que algunos de ellos se venden por conocidas casas comerciales (tal es el caso del Amarillo de Quinoleina insoluble y del Sudan I, que son los colorantes no solubles en agua del Amarillo de Quinoleina y del Amarillo anaranjado respectivamente). Mientras que otros no se encontraban disponibles en el mercado razón por la cual fué necesario proceder a su síntesis. La síntesis y estudio de colorantes solubles en agua está ampliamente recogida en bibliografía [186-188]. En todos estos trabajos la síntesis descrita de estos compuestos es similar, por lo que basándonos en esto proponemos la síntesis de nuestros compuestos, con la única variante de que nosotros no introducimos los grupos sulfónicos ya que estos son la única diferencia estructural con los compuestos que deseamos obtener. Posteriormente a la realización de esta síntesis apareció publicado [189] un método similar al nuestro para la síntesis de colorantes no solubles en agua. La síntesis se basa en una reacción de diazotación de la naftilamina seguida de una copulación con el 1-naftol o 2-naftol para obtener 1-naftilazo-1-naftol o 1-naftilazo-2-naftol respectivamente. El esquema de las reacciones mayoritarias es:

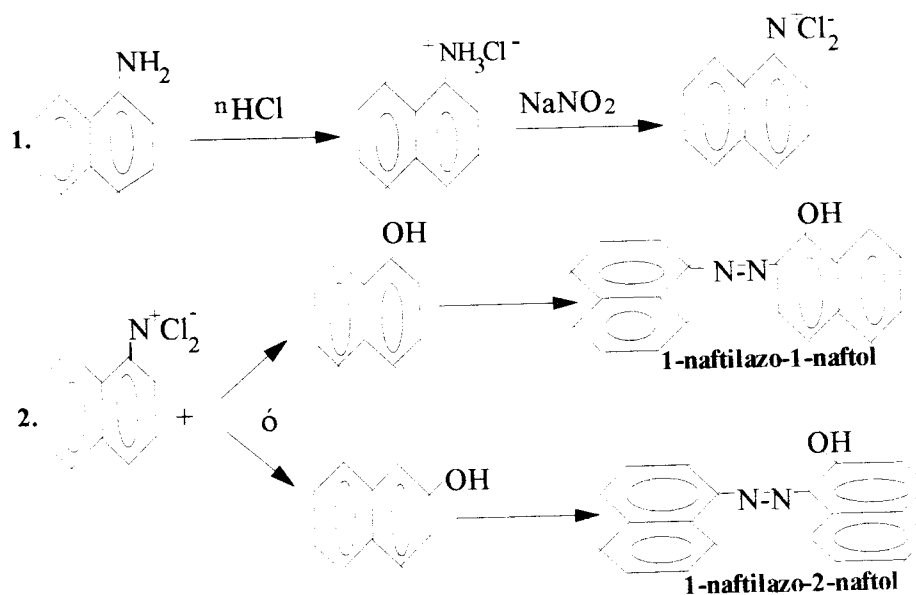


Figura I.7. Esquema de las reacciones que ocurren en la síntesis de ambos analitos.

### 6.5.1.- Reactivos empleados en la síntesis.

- Naftilamina. Aldrich.
- Nitrito sódico. Panreac
- 2-naftol. Aldrich
- 1-naftol. Aldrich

### 6.5.2.- Síntesis de los analitos.

El proceso de síntesis es el siguiente: se disuelven 7.72 g de naftilamina en 16 ml de HCl y 16 ml de agua de ósmosis inversa en un matraz de 250 ml de capacidad. Esta disolución se mantiene en un baño de hielo y se adiciona lentamente sobre ella una disolución formada por 4 g de nitrito sódico disueltos en 20 ml de agua de ósmosis inversa, produciéndose una reacción de diazotación.

Por otra parte se prepara una disolución conteniendo 7.77 g de 1-naftol (para formar el 1-naftilazo-1-naftol) ó 2-naftol (para formar el 1-naftilazo-2-naftol) en 90 ml de NaOH al 10 % en un matraz de 250 ml de capacidad. La disolución se enfría a 5 °C mediante la inmersión en un baño de hielo asistida por la adición directa de 25 g de hielo picado. Se agita vigorosamente, se adiciona la disolución de la sal de diazonio fría muy lentamente, desarrollándose inmediatamente el color rojo debido a la aparición de los cristales rojos del compuesto. Cuando se ha adicionado toda la sal se agita la disolución de vez en cuando durante 30 minutos. Se filtra la disolución a través de un Büchner, con ligero vacío y los cristales se lavan con agua, después se secan presionándolos con un papel de filtro y para asegurarnos de que el producto esté lo más puro posible se recrystaliza en etanol.

Una vez que tenemos los productos purificados se emplea la cromatografía en capa fina para comprobar si el producto obtenido es único. Para ello se utiliza una placa cromatográfica de gel de sílice sobre soporte de aluminio de 250 µm de espesor y 10x20 cm de dimensiones. Se toman 50 ppm del producto 1-naftilazo-2naftol se disuelve en etanol y con ayuda de una micropipeta se toman 10 µl de la misma depositándolos a 2 cm del extremo inferior de la placa. Esta placa se introduce en la cámara de separación cromatográfica donde se encuentra la fase móvil, que es una mezcla de tetracloruro de carbono-benceno 50/50 (v/v), se utiliza esta fase móvil ya que es la que se emplea para realizar la cromatografía a clorantes que tienen una estructura similar a la nuestra<sup>5</sup>, durante

50 minutos, transcurrido este tiempo se deja secar la placa cromatográfica durante 15 minutos a temperatura ambiente (25 °C). Una única mancha de color rosa que aparece a 6.5 cm de la base, indica la presencia del producto deseado.

Con el producto 1-naftilazo-1-naftol se procede de igual forma pero al revelar la placa se observan dos manchas: una de color amarillo pardo y otra rosa, apareciendo la primera a 1.7 cm y la segunda a 6.7 cm de la base.

Para el aislamiento y separación de nuestro producto se utilizó tetracloruro de carbono que disuelve nuestro compuesto quedando el otro sólido. Se dividió la cantidad de producto obtenido en cuatro fracciones de 2 gramos cada una y se le adicionaron 20 ml de tetracloruro de carbono a cada fracción, agitándolas durante 20 min. El producto soluble de color rojo se introduce en un matraz esférico que se acopla al rotavapor donde se evapora el tetracloruro de carbono quedándonos un residuo sólido de color rojo; este se recoge con ayuda de una espátula y se guarda en un frasco color ambar. La parte insoluble que nos queda de la extracción también se guarda en otro frasco de color ambar. A ambos productos sólidos se le hace de nuevo la misma prueba cromatográfica anteriormente descrita, observándose que en la primera fracción se obtiene una única mancha de color rojo a los 6.7 cm de la base correspondiente al producto deseado. En la otra fracción se observa una mancha de color amarillo pardo a 1.7 cm de la base y otra mucho menos intensa de color rojo a 6.7 cm de la base.

La cantidad obtenida del 1-naftilazo-2-naftol es de 6.24 gramos y del 1-naftilazo-1-naftol es de 0.8 gramos, de acuerdo con la reacción de síntesis obtenemos que el reactivo limitante es el compuesto formado al reaccionar la anilina con el HCl y el  $\text{NaNO}_2$ , con este reactivo obtenemos los gramos teóricos de cada compuesto con lo cual se obtiene un rendimiento para la reacción de síntesis del primer compuesto del 51.67 % y del 6.62 % para el caso del segundo.

### 6.5.3.- Identificación y caracterización.

Para identificar los analitos obtenidos se utilizan las técnicas habituales: Análisis Elemental, Espectros Infrarojos, Espectrometría de Masas de alta y baja resolución y Resonancia Magnética Nuclear.

### 6.5.3.1.- Análisis elemental.

Se toma una porción de este compuesto una vez obtenido y se realiza el análisis elemental de C, H y N (tabla I.11) para comprobar si están estos elementos en la proporción que corresponde a la fórmula molecular  $C_{20}H_{14}N_2O$ , esta proporción se debe de dar en ambos compuestos ya que son isómeros.

Tabla I.11. Análisis elemental.

Elemento	Porcentaje (%) teórico	Porcentaje (%)	
		1-naftilazo-1-naftol	1-naftilazo-2-naftol
Carbono	80,53	80,16	80,56
Nitrógeno	9,39	9,77	9,20
Hidrógeno	4,69	4,89	4,79
Oxígeno	5,39	5,51	5,45

La cantidad de oxígeno se obtiene por diferencia de la suma de las cantidades de los otros tres componentes hasta el 100%. Al efectuar los cálculos pertinentes la posible ecuación que se obtiene en el caso del 1-naftilazo-1-naftol es  $C_{19}H_{14}N_2O$  y para el 1-naftilazo-2-naftol es  $C_{20}H_{14}N_2O$ . En el primer caso no se obtiene la fórmula exacta del compuesto, en cambio en el segundo si, a pesar de esto este análisis no es concluyente por lo que para estar seguros de la estructura de estos compuestos tendremos que esperar a ver el resultado de las demás pruebas realizadas.

### 6.5.3.2.- Espectros Infrarrojos.

En las figuras I.10 y I.11 se muestran los espectros de infrarrojos correspondientes a 1-naftilazo-1-naftol y a 1-naftilazo-2-naftol respectivamente, de la observación de los mismos cabe destacar:

- En ambos compuestos se presenta una banda a 3430 y 3421  $cm^{-1}$  respectivamente, es una banda característica bastante ancha que indica de la presencia de un grupo OH asociado en la molécula.



- Varias bandas de escasa intensidad entre los 3080 y 3030  $\text{cm}^{-1}$  indican la presencia de enlaces C-H aromáticos saturados.
- Doblete a 1603 y 1575  $\text{cm}^{-1}$  indicativo de los enlaces C-C aromáticos.
- Entre 900 y 650  $\text{cm}^{-1}$  varias bandas de intensidad variable indican la presencia de enlaces C-H aromáticos.
- A 1600  $\text{cm}^{-1}$  aparece una banda que indica la presencia del grupo C=N aromático.
- Entre los 1400-1500  $\text{cm}^{-1}$  aparece la banda que indica la presencia del grupo azo, N=N.

### 6.5.3.3.- Espectros de masas.

En primer lugar se realizaron los espectros de masas de alta resolución para ambos analitos para la masa de nuestros compuestos que es de 298 g/mol, obteniéndose los siguientes resultados:

**Tabla I.12.-** Resultados del EM de alta resolución para 1-naftilazo-1-naftol.

Variables				Elementos (%)			
PPM	mDa	Masa calc.	DBE	C	H	N	O
0,0	0,0	298,110613	15,0	20	14	2	1
1,7	0,5	298,111121	2,5	6	16	7	7
-2,8	-0,8	298,109778	3,0	4	14	10	6
-4,5	-1,3	298,109271	3,0	4	14	10	6
		298,112464	15,5	18	12	5	0
6,2	1,9	298,117933	2,0	8	18	4	8
		298,103801	2,0	8	18	4	8
-9,0	-2,7	298,113807	10,5	17	16	1	4
10,7	3,2	298,116591	7,0	9	14	8	4
		298,105144	7,0	9	14	8	4
10,7	-4,0	298,115253	1,5	10	20	1	9
-13,5	4,5	298,105248	11,0	15	14	4	3

A la vista de la tabla se puede observar claramente que con el peso molecular requerido se encuentra que la combinación más probable es  $C_{20}H_{14}N_2O$ , que es la que se presenta en este compuesto ya que obtenemos 0 ppm, y el rango admisible es hasta 10 ppm, lo que quiere decir que hay una probabilidad del 100% de que se encuentre la sustancia buscada por nosotros.

**Tabla I.13.- Resultados del EM de alta resolución para 1-naftilazo-2-naftol.**

Variables				Elementos (%)			
PPM	mDa	Masa calc.	DBE	C	H	N	O
0,1	0,0	298,110613	15,0	20	14	2	1
1,8	0,5	298,111121	2,5	6	16	7	7
		298,109778					
-2,7	-0,8	298,109271	3,0	4	14	10	6
-4,4	-1,3	298,112464	15,5	18	12	5	0
		298,107933					
6,3	1,9	298,113801	2,0	8	18	4	8
-8,9	-2,7	298,113807	10,5	17	16	1	4
10,8	3,2	298,106591	7,0	9	14	8	4
		298,115144					
10,8	-4,0	298,105253	1,5	10	20	1	9
-13,4	4,6	298,105248	11,0	15	14	4	3

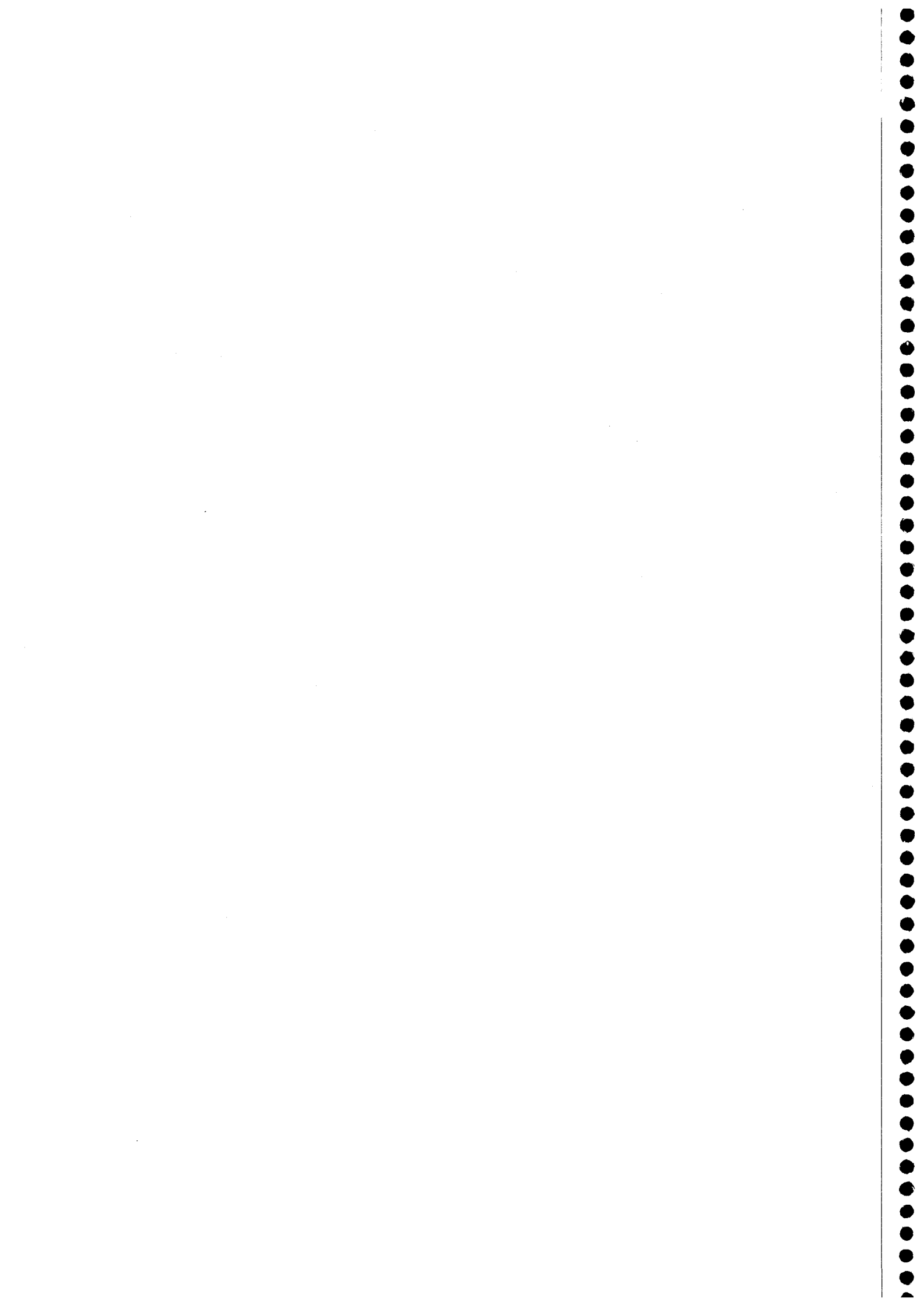
Si comparamos estos datos con los anteriores se puede ver la gran similitud que existe entre los resultados, lo que indica que las sustancias son muy parecidas y son isómeros de posición. Aquí la estructura buscada aparece como la más probable 0,1 ppm, esto indica que la probabilidad sería del 99,99%.

También se realizó el espectro de masas de baja resolución para ambos compuestos el resultado se muestra en las figuras I.12 y I.13. En ellas se observa el enorme parecido de las sustancias ya que la mayoría de los fragmentos se encuentran repetidos en ambos espectros. Los fragmentos más importantes que aparecen en ambos espectros y su interpretación se recoge en la tabla I.14.

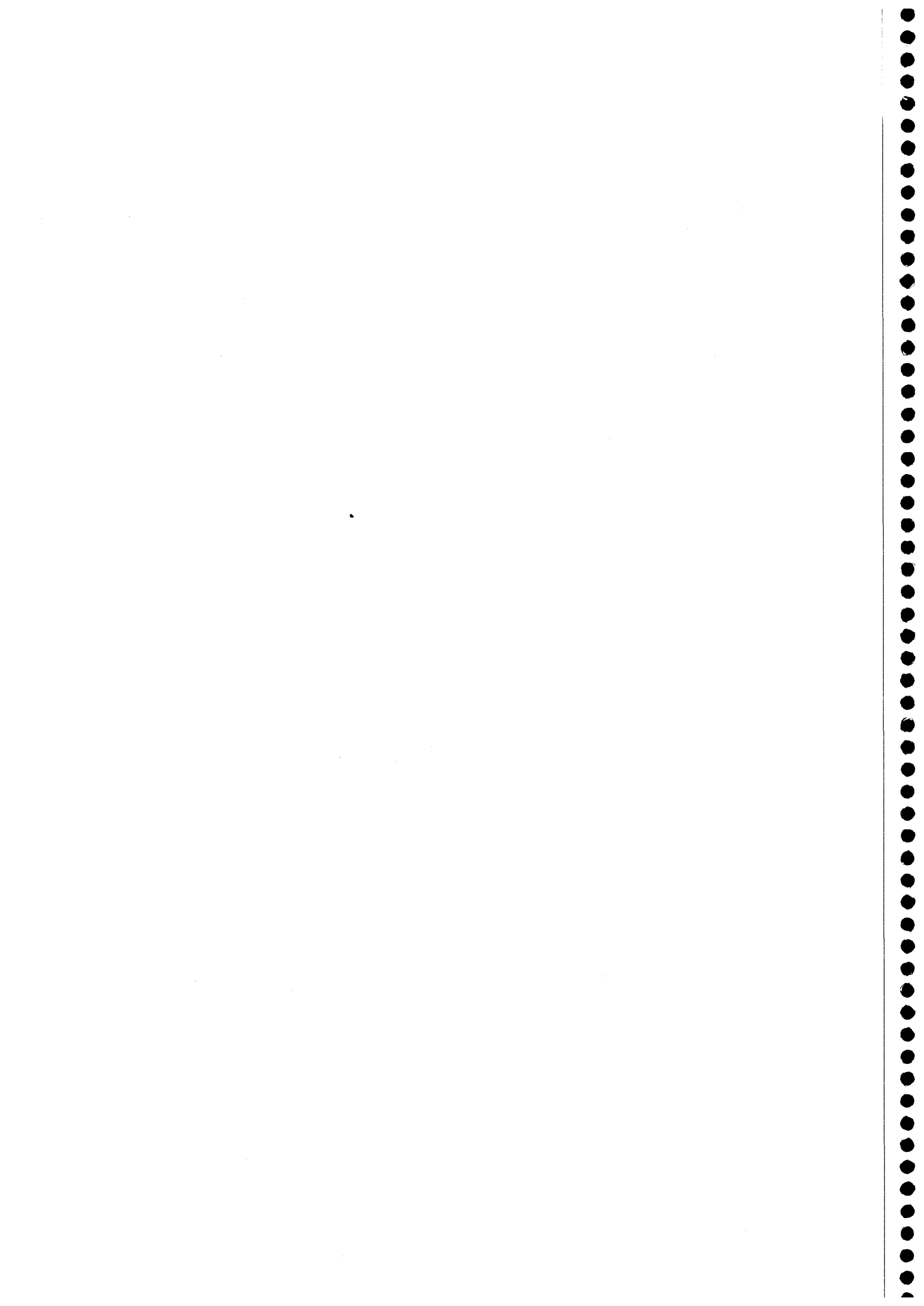
Tabla I.14.- Espectro de masas de baja resolución.

Masa	% BPI		Asignación
	1-naftilazo-1naftol	1-naftilazo-2-naftol	
298	51,26	50,74	Ión molecular
270	4,67	4,53	Pérdida del grupo azo
171	4,52	9,25	correspondiente a la pérdida del grupo naftaleno.
144	7,46	12,62	Correspondiente al 1-naftol o 2-naftol
143	62,18	73,53	Correspondiente a $C_{10}H_7O$
127	90,76	92,16	Correspondiente al grupo naftaleno

#### 6.5.3.4.- Espectos de resonancia magnética nuclear.



**CAPÍTULO II:  
DETERMINACIÓN DE SIMULTÁNEA DE  
AMARILLO ANARANJADO Y SUDAN I MEDIANTE  
ESPECTROFOTOMETRÍA EN FASE SÓLIDA**



En este capítulo se desarrolla y propone un nuevo método espectrofotométrico para la determinación simultánea de un colorante sintético, la sal disódica del ácido 6-hidroxi-5-[(4-sulfonil)azo]-2-naftaleno sulfónico (C.I. 15958), también llamado Amarillo Anaranjado (AA) y su producto no sulfonado el 1-fenilazo-2-naftol (C.I. 12055) al que comúnmente se le conoce como Sudan I (SD). El primer compuesto es ampliamente utilizado como aditivo en alimentos, productos farmacéuticos y cosméticos, mientras que el segundo compuesto se emplea en la industria textil como colorante soluble en disolventes orgánicos o grasos, este se forma en el proceso de manufacturación del primero y ya que tanto en la legislación española como en la europea se establece que los productos comerciales de los colorantes solo pueden contener cantidades muy pequeñas, por lo que es preciso su determinación para establecer la pureza del colorante. A partir de ahora se designará a ambos por los acrónimos AA y SD respectivamente.

El método que se ha desarrollado se fundamenta en la fijación de ambos analitos en dos soportes sólidos diferentes, basándose en la diferencia de carga que exhiben, con lo que se consigue separar y determinar ambos analitos por una misma técnica de análisis. Se logra un aumento de la sensibilidad frente al método espectrofotométrico convencional al preconcentrar los analitos sobre la fase sólida y medir directamente sobre ella, así como un aumento de la selectividad ya que las sustancias interferentes también tendrían que fijarse en los soportes sólidos utilizados para que contribuyeran a la señal junto con el analito, lo

que disminuye la probabilidad de interferencias.

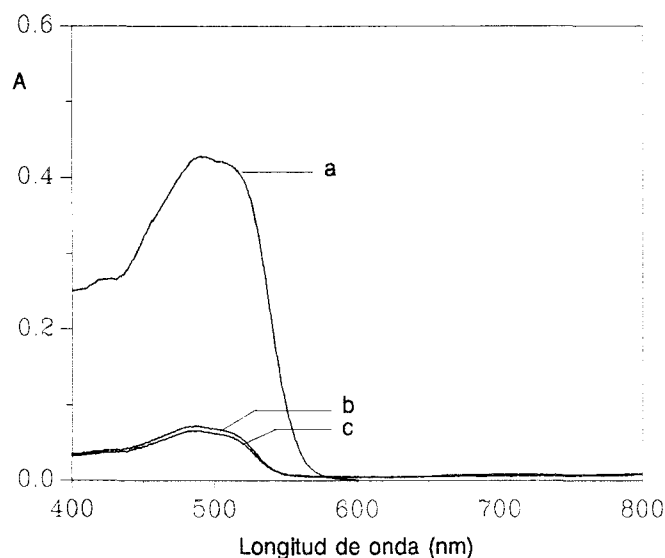
### **Optimización de las variables experimentales.**

#### **1.- Elección del soporte sólido.**

La primera cuestión que se plantea en espectrofotometría en fase sólida es la elección del soporte sólido más adecuado para fijar a cada uno de los analitos. Si consideramos la estructura de estas moléculas, en el caso de AA se trata de un sulfonato, por lo que se podría fijar tanto en cambiadores de iones como en adsorbentes polares; en cambio el SD no contiene grupos iónicos en su molécula, por tanto no se retendrá por intercambio iónico y si por adsorción sobre un soporte adecuado que podría ser tanto hidrofílico como hidrofóbico pues tiene ambos tipos de grupos en la molécula. Cualitativamente se comprobó la buena retención de AA en geles aniónicos y de SD en adsorbentes hidrofóbicos.

Para conocer mejor el proceso de fijación se registraron los espectros en fase sólida de ambos colorantes, al equilibrar 100 ml de disolución de 100  $\mu\text{g/l}$  de AA y de otros 100 ml de SD de 500  $\mu\text{g/l}$ , con cada uno de los siguientes cambiadores: G-15, G-25, DEAE A-25, QAE A-25, CM C-25, SP C-25, C-18. Los resultados obtenidos se recogen en la figura II.1.





**FiguraII.1.-** Espectros de absorción de:

- (a) SD (500 µg/l) en gel de sílice C-18
- (b) AA sobre Sephadex DEAE A-25
- (c) AA sobre Sephadex QAE A-25.

El SD únicamente se fijó sobre gel de sílice C-18, figura III.1 a, dado que su molécula carece de grupos cambiadores y los grupos polares que tiene, azo y fenol, no le confieren suficiente polaridad para retenerse sobre soportes hidrofílicos. En los demás demás soportes ensayados no produjo ninguna retención por lo que al carecer de información no se han incluido en la figura. Las figuras III.1 b y c son los resultados de la fijación de AA sobre Sephadex DEAE A-25 y Sephadex QAE A-25 respectivamente. La retención sobre estos soportes se debe a que posee grupos sulfónicos en su estructura, lo que hace que se retenga sobre cambiadores aniónicos. Dado que se presenta una retención ligeramente superior sobre Sephadex DEAE A-25 y que este soporte es más selectivo que el anterior, por contener grupos amino que deben protonarse para actuar como cambiadores de iones y no amonio cuaternario, este es el soporte sólido que se elige para experiencias posteriores. Al igual que en el caso anterior los demás soportes ensayadas con este analito no dan resultado por lo que tampoco se han incluido en la figura.

## **2.- Optimización de las variables químicas que afectan a la fijación de AA y SD.**

Una vez elegido el soporte sólido más adecuado para la retención de cada uno de los colorantes, es necesario establecer la influencia de las variables experimentales sobre la retención de los analitos en estudio. Para ello estudiaremos la influencia de los siguientes factores:

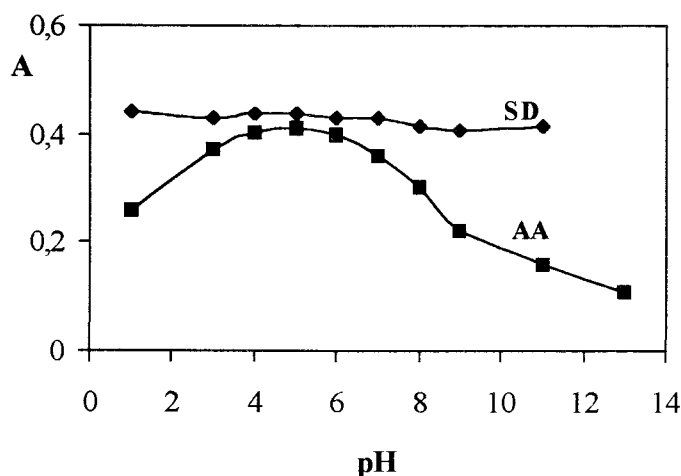
- 1.- Factores que influyen sobre el proceso de fijación: pH, naturaleza de la disolución reguladora, fuerza iónica del medio y cantidad de gel.
- 2.- Factores que influyen sobre la cinética del proceso de fijación: tiempo de equilibración del gel, velocidad de agitación y porcentaje de etanol, esta última variable se ha incluido aquí, aunque también influye sobre el proceso de equilibrio.
- 3.- Factores que influyen sobre la señal analítica: volumen de la disolución a equilibrar y tiempo de centrifugación de la cubeta que contiene al analito ya fijado.

### **2.1.- Factores que influyen sobre el proceso de fijación.**

#### **2.1.1- Influencia del pH.**

El pH de la disolución regula el equilibrio ácido-base y determina una mayor o menor retención del analito sobre el soporte empleado, si el analito presenta grupos que se vean afectados por la variación en la concentración de protones del medio.

Para establecer la dependencia con el pH para ambos compuestos se preparan dos series de disoluciones, una de 500  $\mu\text{g/l}$  para AA y otra serie de 200  $\mu\text{g/l}$  para SD en matraces de 100 ml. Para cada disolución se ajusta un valor de pH diferente, desde 1 hasta 13, mediante la adición de disoluciones de HCl o NaOH de la concentración adecuada para obtener el valor del pH requerido en cada ocasión, siguiendo a continuación la metodología establecida en el capítulo II, hasta obtener los datos cuya representación se muestra en la figura III.3:



**Figura II.2.-** Influencia del pH sobre los procesos de retención de AA y SD.

En ambos casos se puede observar que el pH óptimo se encuentra alrededor de 5, aunque las variaciones de la señal en función del pH son mucho menores para el SD debido a que el proceso de retención se realiza por adsorción. La retención de AA por intercambio iónico aumenta al incrementarse el valor del pH pues el  $pK_a$  del grupo sulfónico debe encontrarse entre 1 y 2 como es habitual. Por ello en medios muy ácidos la retención es menor por encontrarse la molécula en forma no iónica. En medio básico la retención comienza a disminuir por la creciente competencia con los iones hidroxilo por los grupos iónicos fijos. De los resultados de estas experiencias podemos concluir que el pH óptimo es 5,0, para lo que habrá que seleccionar una disolución reguladora.

### 2.1.2.- Elección de la disolución reguladora del pH y de su cantidad óptima.

Para la elección de la disolución reguladora se prueban dos disoluciones reguladoras que pueden actuar en la zona de pH 5, una disolución de ácido acético/acetato sódico 1 M y otra de monocloroacético/monocloroacetato sódico 1 M. Se sigue el proceso operatorio requerido para cada analito, observando que la absorbancia para ambos analitos es igual con ambas disoluciones reguladoras, pero que la cantidad requerida de ésta en el segundo caso

es mayor. Por ello se optó por usar como disolución reguladora la disolución de ácido acético/acetato sódico 1 M. Para la determinación de la cantidad necesaria de ésta, se preparan disoluciones de 500 µg/l de AA y de 200 µg/l de SD poniendo en cada una de ellas cantidades crecientes desde 1 ml hasta 20 ml de disolución reguladora comprobando, para ambos analitos y en todos los casos la constancia del pH antes y después de aplicar el proceso operatorio.

Los datos obtenidos en ambos casos (tabla III.1), señala que 5 ml son suficientes para los dos, por lo que dicho volumen se elige para posteriores experiencias.

Tabla II.1.- Influencia de la cantidad de disolución reguladora.

V (ml)	pH	A	
		AA	SD
1	5'13	0'4339	0'2321
2	5'11	0'4338	0'2485
5	5'09	0'4493	0'2472
10	5'07	0'4491	0'2435
20	5'06	0'4494	0'2456

### 2.1.3.- Influencia de la fuerza iónica.

El estudio de la influencia de la fuerza iónica del medio sobre la fijación de ambos analitos se realizó preparando 5 disoluciones de 500 µg/l de AA y 5 disoluciones de 200 µg/l de SD todas ellas con 5 ml de disolución de ácido acético/acetato sódico (pH = 5), a cada una de las disoluciones se le añaden volúmenes crecientes de disolución 0.1 M de NaCl hasta que se obtenga una concentración de la sal en la disolución final de cada serie de 1 M enrasando en todos los casos a un volumen final de 100 ml. Siguiendo el procedimiento operatorio establecido en el capítulo II se obtienen los resultados que podemos ver en la figura III.4.

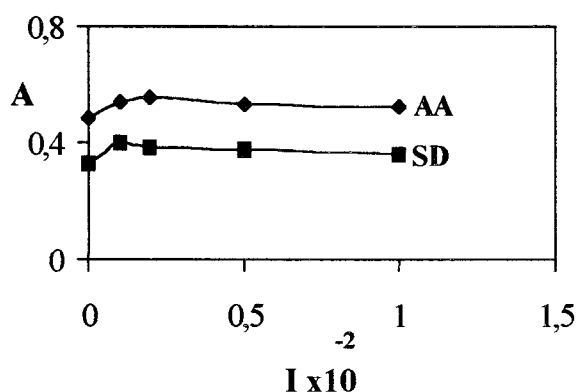


Figura II. 3.- Influencia de la fuerza iónica .

En ambos casos se pone de manifiesto que la señal es prácticamente independiente de la fuerza iónica existente en el medio, ya que para AA la diferencia entre el valor máximo y el mínimo de la absorbancia es de 0,04 unidades y para SD es de 0,07 unidades, razón por la que no se consideró necesario ajustar esta variable.

#### 2.1.4.- Influencia de la cantidad de gel.

Para establecerla se prepararon 6 disoluciones con un volumen final de 100 ml de 500  $\mu\text{g/l}$  de AA y otras tantas de 200  $\mu\text{g/l}$  de SD, todas ellas con 5 ml de disolución de ácido acético/acetato sódico. En el caso del AA se añadieron cantidades crecientes entre 20 y 140 mg de Sephadex A-25 y en el caso del SD entre 120 y 250 mg de gel de sílice C-18. Posteriormente se aplicó el proceso operatorio establecido, obteniendo los resultados recogidos en la tabla II.2.

Tabla II.2 Influencia de la cantidad de gel.

AA		SD	
mg(DEAE)	A	mg (C-18)	A
20	0'9820	120	0,6522
40	0'5895	140	0,3414
50	0'4936	150	0,2800
70	0'3799	170	0,1714
90	0'3131	200	0,1221
140	0'2204	250	0,1074

La representación de los datos anteriores (figura III.5) pone de manifiesto una dependencia exponencial entre la masa de gel empleada y la absorbancia obtenida de acuerdo con lo señalado en la Introducción.

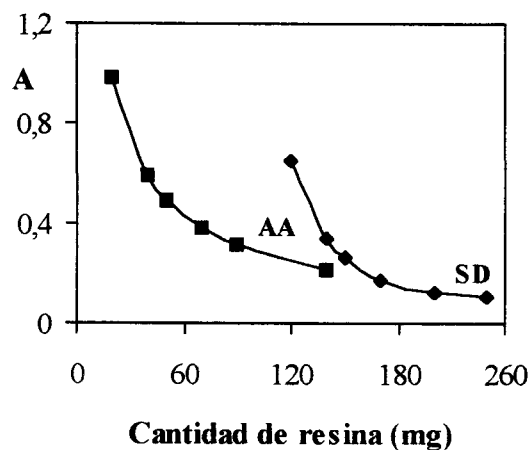


Figura II.4.- Influencia de la cantidad de resina.

En ambos casos, si se realiza una transformación logarítmica de los valores

experimentales obtenidos y se ajustan por mínimos cuadrados, se obtienen las siguientes ecuaciones:

$$\text{Para AA} \quad \log A = 1.029 - 0.789 \log m_g$$

$$\text{Para SD} \quad \log A = 6.410 - 3.190 \log m_g$$

donde  $m_g$  es la masa del gel correspondiente expresada en miligramos.

A partir de estas ecuaciones se puede establecer para cada analito la ecuación de la hipérbola correspondiente a la curva de la figura II.4. para AA:  $A \cdot m_g^{0.785} = -1.029$  . Para SD  $A \cdot m_g^{3.190} = -6.410$  .

La cantidad de gel a utilizar en los métodos analíticos depende de tres factores:

- 1.- Masa del soporte sólido ya que para una misma concentración de analito, al aumentar la cantidad de soporte sólido se produce una disminución de la absorbancia obtenida.
- 2.- Facilidad de manejo ya que la cantidad de soporte sólido debe de ser la suficiente para permitir una cómoda manipulación.
- 3.- Llenado de la cubeta ya que la altura que debe de alcanzar el soporte sólido dentro de la cubeta tiene que ser la suficiente para que al introducirla en el compartimento de cubetas del espectrofotómetro sea atravesado por el haz de radiación.

Según todo esto, en principio se debería de tomar la cantidad de gel que proporciona un valor máximo de absorbancia, 20 mg en un caso y 120 mg en otro, pero estas cantidades tan pequeñas tienen problemas de manipulación al empaquetarlas en la cubeta de medida. Por ello se llega a una situación de compromiso entre sensibilidad y facilidad en la manipulación, eligiéndose 50 mg de Sephadex A-25 para AA y 150 mg de gel de sílice C-18 para el caso de SD, que son las mínimas cantidades de soporte sólido que se pueden manipular con facilidad sin que se produzca una pérdida de sensibilidad

excesivamente grande y se alcanza la altura en la cubete necesaria para que el haz de radiación atraviese la resina.

## **2.2.- Factores que influyen sobre la cinética del proceso de fijación.**

### **2.2.1.- Influencia del tiempo de equilibración del gel.**

El tiempo de equilibración del soporte sólido con la disolución que contiene los analitos, es una variable que nos da una idea de la cinética del proceso de fijación de los mismos.

Para establecer su influencia se preparan 100 ml de disolución de 500  $\mu\text{g/l}$  de AA y 200  $\mu\text{g/l}$  de SD respectivamente, conteniendo ambas disoluciones 5 ml de disolución reguladora. Estas disoluciones se transfieren a botellas de vidrio de 1 litro donde se añaden las cantidades necesarias de los respectivos soportes sólidos. Las disoluciones se agitan mecánicamente durante periodos de tiempo variables comprendidos entre 5 y 60 minutos a 60 rpm y posteriormente se sigue el procedimiento operatorio establecido anteriormente. Los resultados obtenidos se recogen en la figura II.5.



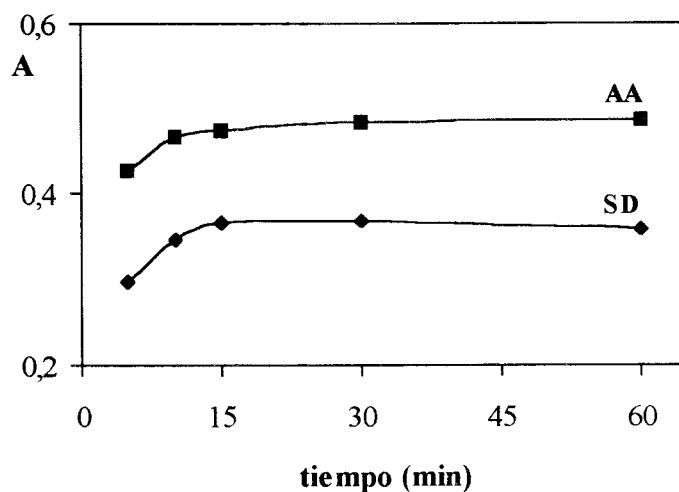


Figura II.5.- Influencia del tiempo de equilibración.

Como se puede observar hay un aumento en la absorbancia en el caso del AA al aumentar el tiempo de agitación de 5 a 10 minutos a partir del cual permanece constante. En el SD hay un aumento de la absorbancia con el tiempo de agitación hasta 15 minutos a partir del cual se mantiene constante. Cabe destacar la rápida equilibración debido a que no hay reacciones químicas previas. Este hecho ha sido puesto de manifiesto en otras ocasiones, tal es el caso de la retención de sulfamidas sobre Sephadex SP C-25<sup>II.4</sup>.

De todo esto concluimos que para la determinación de AA se selecciona un tiempo de equilibración de 10 minutos y para la determinación de SD de 15 minutos.

### 2.2.2.- Influencia de la velocidad de agitación.

Para determinar la velocidad de agitación óptima para ambos analitos se opera de igual forma que en el apartado anterior; manteniendo constante el tiempo de equilibración, que será como se ha establecido en el apartado anterior de 10 minutos para AA y de 15 minutos para SD y variando la velocidad de agitación entre 20 y 100 rpm. Los resultados obtenidos se recogen en la siguiente figura II.6.

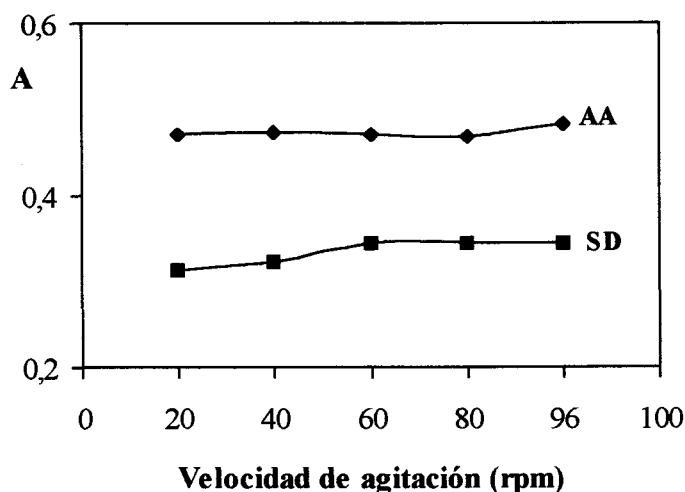


Figura II.6.- Influencia de la velocidad de agitación.

Aunque para AA no influye y para SD hay una escasa influencia, ya que a partir de una velocidad de agitación de 60 rpm la absorbancia es máxima y constante, seleccionamos este valor para experiencias posteriores. Este valor de la velocidad de agitación permite aumentar la cinética del proceso de fijación de los colorantes sobre los respectivos soportes sólidos, alcanzándose el equilibrio en un tiempo inferior que el necesario si se agitase a menor velocidad.

### 2.2.3.- Influencia del contenido de etanol.

Puesto que el método que estamos estudiando pretende determinar AA que es soluble en agua y SD que no es soluble en agua y si soluble en etanol, será necesario será necesario trabajar con un determinado porcentaje de etanol, que permita la solubilización del SD. De hecho la disolución madre de este analito se encuentra preparado en este disolvente .

Lo dicho justifica estudiar su influencia sobre la retención de ambos analitos, respectivamente se preparan disoluciones de 500  $\mu\text{g/l}$  de AA y de 200  $\mu\text{g/l}$  de SD conteniendo 5 ml de disolución reguladora y cantidades de etanol entre 1 y 20 ml,

enrasando a un volumen final de 100 ml con agua desionizada. Posteriormente se sigue el proceso operativo descrito en el capítulo II. Los resultados obtenidos se recogen en la figura II.7:

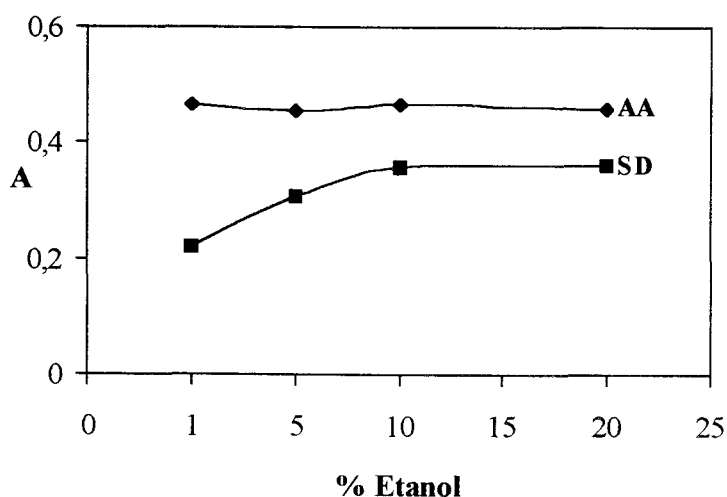


Figura II.7.- Influencia del % de etanol.

Como puede observarse en el caso de AA el volumen de etanol añadido no afecta a la fijación de éste por cambio iónico, al menos hasta un 20 %.

Para SD en cantidades inferiores al 10% de etanol hay una menor retención sobre el soporte sólido y a partir de esta cantidad se obtiene una señal constante, por lo tanto este será el valor empleado para estudios posteriores. La razón de esta variación se debe a que a partir de un 10% de etanol en la disolución el colorante se encuentra totalmente disuelto por lo que aumenta la retención sobre el soporte sólido.

No se probaron cantidades superiores al 20% de etanol porque a partir de este valor se produce una deshidratación del gel dando lugar a un apelmazamiento del mismo que dificulta su empaquetamiento en la cubeta.

### **2.3.- Factores que influyen en la medida de la señal analítica.**

#### **2.3.1.- Influencia del volumen de disolución empleado.**

Un hecho característico de la espectrofotometría en fase sólida, comentado en la Introducción, es que a medida que aumenta el volumen de muestra empleado disminuye el límite de detección y aumenta la sensibilidad de los métodos, dentro de un límite. La consecuencia inmediata es que se puede determinar la concentración de analito a bajas concentraciones sin más que aumentar el volumen de muestra que lo contenga. Esto permite poner a punto métodos, según las necesidades del problema, dentro de unos límites razonables.

Para establecer la dependencia del volumen de muestra se preparan disoluciones de 500  $\mu\text{g/l}$  de AA y de 200  $\mu\text{g/l}$  de SD, todas ellas con 5 ml de disolución reguladora, en el caso del SD además de esto también con un 10 % de etanol y enrasadas con volúmenes variables de agua desionizada que van desde los 100 ml hasta los 2000 ml. A estas disoluciones transferidas a botellas de vidrio de 1 ó 2 litros, según el volumen final de la disolución, se añaden 50 mg de Sephadex A-25 o 150 mg de gel de sílice C-18 respectivamente y se agitan durante 15 minutos.

En la figura II.8 se pone de manifiesto, como es de esperar, que en ambos casos hay un aumento de la absorbancia al aumentar el volumen final de muestra, hasta alcanzar un valor constante a partir del cual el valor de la absorbancia permanece constante. Para este caso ese valor es de 500 ml. Utilizando volúmenes superiores no se produce aumento de la señal como es de esperar a la vista de lo discutido en la Introducción.

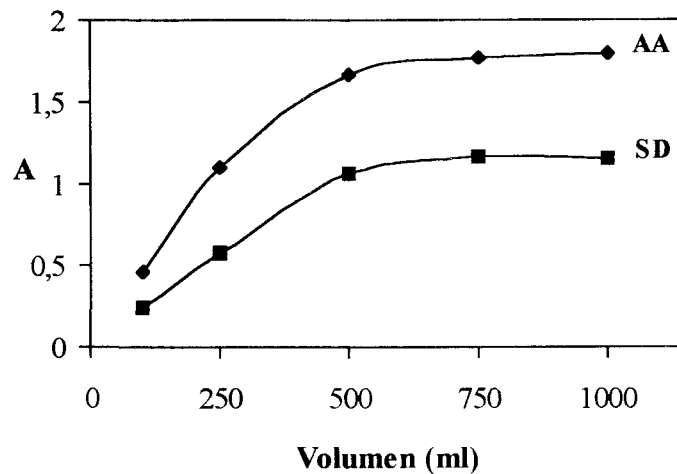


Figura II.8.-Influencia del volumen.

Se seleccionó como volumen de trabajo 100 ml debido a que con este volumen se reduce el tiempo de agitación y por tanto el método se hace más rápido. Por otra parte, la sensibilidad que se obtiene es buena, y el rango dinámico lineal es el apropiado para las concentraciones de los colorantes en las muestras reales a las que se va a aplicar.

### 2.3.- Influencia del tiempo de secado en la determinación de SD.

Debido a las características hidrófobas del gel de sílice C-18, es necesario secarlo antes de empaquetarlo en la cubeta de medida y proceder a su lectura. Para elegir el tiempo de secado óptimo se prepararon disoluciones de 200  $\mu\text{g/l}$  de SD siguiendo todo el proceso operatorio establecido hasta llegar a la fijación del analito sobre el gel de sílice y filtración posterior. Una vez llegado a este punto se somete a distintos tiempos de secado siguiendo la metodología establecida en el capítulo II (figura II.9).

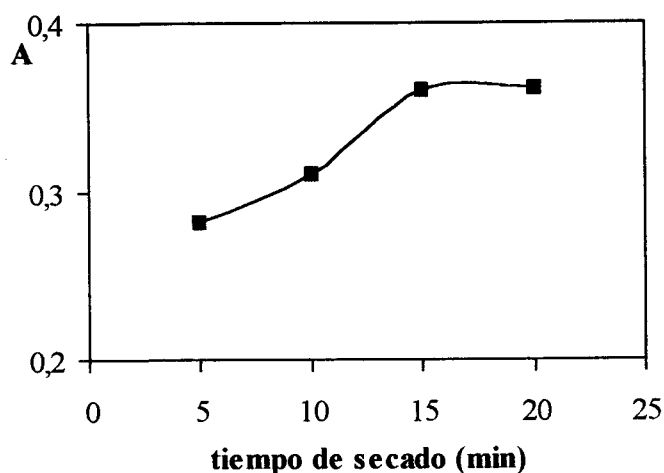


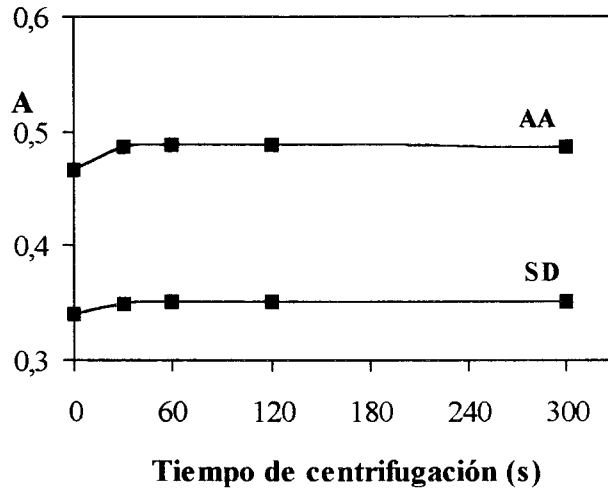
Figura II.9.- Influencia del tiempo de secado.

Para un valor inferior a 5 minutos en el tiempo de secado es imposible empaquetar el gel en la cubeta ya que no está suficientemente seco y al introducirla en la cubeta queda apelmazado. De 5 a 10 minutos se observa un incremento de la señal, debido a que el empaquetamiento va siendo cada vez más homogéneo, hasta que se llega a una constancia en la señal analítica a partir de 15 minutos, tiempo que se empleará en experiencias posteriores.

### 2.3.2.- Influencia del tiempo de centrifugación.

Un hecho comprobado anteriormente por nuestro grupo de investigación<sup>II.4</sup> es que el empaquetamiento del gel en la cubeta es una fuente de variabilidad de la señal analítica medida. Este componente de error se puede minimizar asegurándonos de que el empaquetamiento es lo más compacto posible. Para establecer esta dependencia, se introduce la cubeta de medida conteniendo al soporte sólido ya empaquetado en un compartimento, especialmente preparado para ello, en el interior de una centrifuga. La experiencia que se plantea consiste en preparar una disolución de 500  $\mu\text{g/l}$  de AA y otra de 200  $\mu\text{g/l}$  de SD siguiendo el procedimiento operatorio ya establecido, realizándose la medida de ambos soportes con el analito sin centrifugar y centrifugando durante distintos

tiempos.



**Figura II.10.-** Influencia del tiempo de centrifugación.

La figura II.10 indica que es adecuado centrifugar el soporte sólido con el analito en la cubeta para mejorar el empaquetamiento y aumentar la señal. Se seleccionan 30 segundos como tiempo suficiente para conseguir una señal estable.

**3.- Resumen de la optimización de variables para AA y para SD.**

En la tabla II.3 se resumen todos los valores óptimos encontrados para ambos analitos que a partir de ahora se utilizaran las experiencia sucesivas. Posteriormente se describe el método operatorio seguido en la determinación de cada analito.

Tabla II.3.- Resumen de las variables experimentales.

Variable	AA	SD
Absorbancia	$A = A_{487} - A_{800}$	$A = A_{487} - A_{800}$
pH	5	5
Disolución reguladora	AcH/AcNa 1M 5%	AcH/AcNa 1 M 5 %
Cantidad de gel	50 mg DEAE	150 mg C-18
Tiempo de agitación	10 min	15 min
Velocidad de agitación	60 rpm	60 rpm
Contenido de etanol	-----	10 %
Volumen de agitación	100 ml	100 ml
Tiempo de centrifugación	30 seg	30 seg
Tiempo de secado	-----	15 min

Para la determinación de AA se toma un determinado volumen de la disolución patrón de ésta para obtener la concentración final deseada y se introduce en un matraz aforado de 100 ml, se añaden 5 ml de la disolución reguladora ácido acético/acetato sódico 1 M y se enrasa hasta el volumen final con agua de ósmosis inversa, el contenido del matraz se transfiere a una botella de vidrio de 1 litro de capacidad, paralelamente se prepara un blanco que contiene solamente los 5 ml de la misma disolución reguladora y el resto de agua de ósmosis inversa hasta el volumen final de 100 ml, esta disolución se transfiere también a otra botella de las mismas características de la que contiene la disolución de la muestra, a ambas se le añaden 50 mg de Sephadex DEAE-A25 y se introducen en un agitador rotatorio de botellas durante 10 minutos, transcurridos los cuales se filtran las disoluciones



y se recoge la resina con ayuda de una micropipeta empaquetándose en una cubeta, esta se introduce en la centrífuga durante 30 segundos y por último ambas se introducen en el compartimento de cubetas del espectrofotómetro para realizar el registro del espectro.

Para la determinación de SD se toma un determinado volumen de la disolución patrón de ésta para obtener la concentración final deseada y se introduce en un matraz aforado de 100 ml, se añaden 5 ml de la disolución reguladora ácido acético/acetato sódico 1 M y 10 ml de etanol ,enrasando hasta el volumen final con agua de ósmosis inversa, el contenido del matraz se transfiere a una botella de vidrio de 1 litro de capacidad, paralelamente se prepara un blanco que contiene solamente los 5 ml de la misma disolución reguladora, los 10 ml de etanol y el resto de agua de ósmosis inversa hasta el volumen final de 100 ml, esta disolución se transfiere también a otra botella de las mismas características de la que contiene la disolución de la muestra, a ambas se le añaden 150 mg de gel de sílice C-18 y se introducen en un agitador rotatorio de botellas durante 15 minutos, transcurridos los cuales se filtran la disoluciones, la resina retenida en el filtro se seca mediante una bomba de vacío durante 15 minutos, transcurridos los cuales se recoge la resina con ayuda de una microespatula empaquetandola en la cubeta, esta se centrifuga durante 30 segundos y por último ambas se introducen en el compartimento de cubetas del espectrofotómetro para realizar el registro del espectro.

#### **4.- PARÁMETROS ANALÍTICOS.**

A continuación se recogen los datos encontrados para la calibración y parámetros de fiabilidad para cada uno de los colorantes estudiados.

##### **4.1.- Cumplimiento de la ley de Lambert-Beer y parámetros de fiabilidad para Amarillo anaranjado.**

Se preparan una serie de disoluciones en matraces de 100 ml, todas ellas por triplicado, conteniendo concentraciones de analito comprendidas entre 50 y 800  $\mu\text{g/l}$  y 5 ml de disolución reguladora, siguiendo la metodología establecida. Para ello se transfieren a botellas de vidrio, añadiendo 50 mg de Sephadex DEAE A-25, tras lo cual se agita el conjunto durante 10 minutos y se recoge el gel que es empaquetado en la cubeta y

centrifugado durante 30 segundos. Los valores de absorbancia medidos se recogen en la tabla II.4.

Tabla II.4.-Cumplimiento de la ley de Lamber-Beer para el AA.

[AA] ( $\mu\text{g/l}$ )	A		
	1ª Serie	2ª Serie	3ª Serie
50	0'0682	0'0470	0'0594
100	0'1030	0'0989	0'1073
200	0'1993	0'1926	0'1859
300	0'2822	0'2817	0'2793
500	0'4614	0'4620	0'4599
800	0'6164	0'6165	0'6166

La representación gráfica de los datos muestra un curvatura para valores superiores a 500  $\mu\text{g/l}$ , lo que parece indicar que el soporte sólido comienza a estar saturado.

Aplicando el test de fallo de ajuste para el intervalo de concentración comprendido entre 50 y 800  $\mu\text{g/l}$  se encuentra curvatura ya que se obtiene un valor de P inferior al 5%. Por otra parte el análisis gráfico de los residuales (figura II.11) señala la existencia de heteroscedasticidad pues existe relación entre el valor del residual y la concentración. Todo esto señala que el modelono es válido.

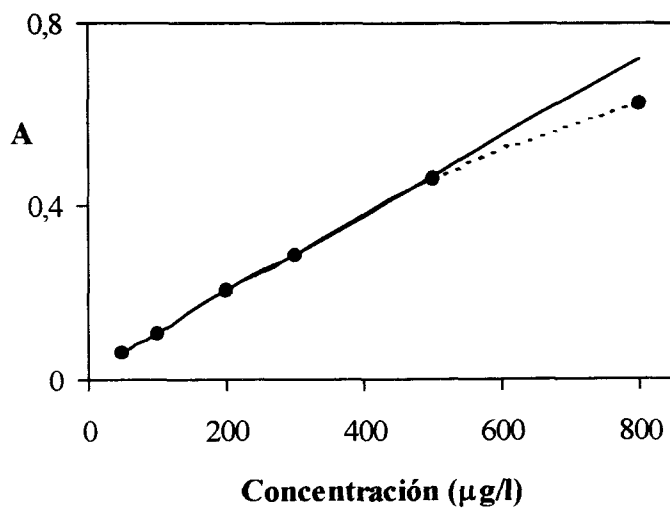


Figura II.11.- Cumplimiento de la ley de Lambert-Beer .

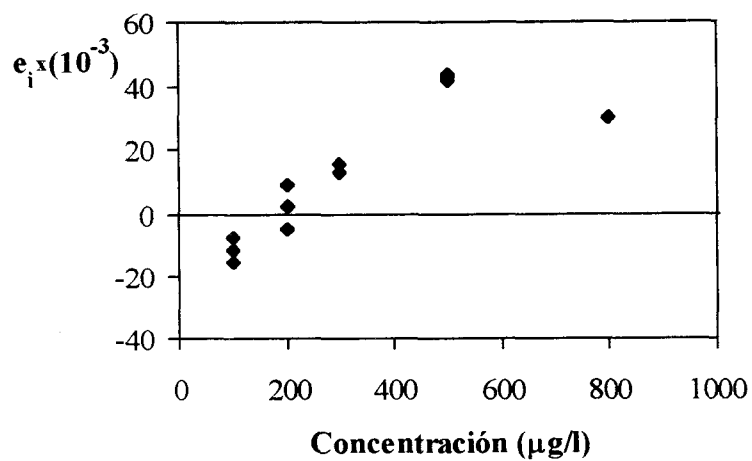
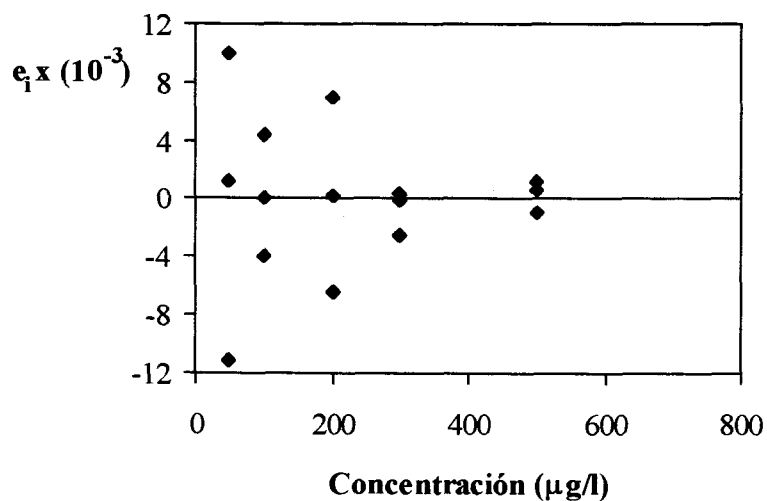


Figura II.12.- Representación gráfica de los residuales frente a la concentración de AA.

Tras eliminar los datos correspondientes a la concentración de 800 µg/l, y repetir

los cálculos se encontró un valor de P de 99'88% lo que pone de manifiesto que hay un buen ajuste lineal entre los datos.

Si ahora realizamos la representación gráfica de los residuales frente a la concentración de AA se obtiene una distribución aleatoria de los residuos, como era de esperar, indicativo de la existencia de homoscedasticidad (figura II.12).



**Figura III.12.-** Representación gráfica de los residuales frente a la concentración de AA.

Los resultados de aplicar el Anova en el intervalo lineal comprendido entre 50 y 500 µg/l pone de manifiesto el buen ajuste lineal del modelo y la ausencia de curvatura.

**Tabla II.5.- Resultados del ANOVA realizado en el rango de concentraciones comprendido entre 50 y 500  $\mu\text{g/l}$  de AA.**

Fuente	SM <sup>1</sup>	g.l	MC <sup>2</sup>	F <sub>exp</sub>	P (%)
Modelo	3,07x10 <sup>-1</sup>	1	3,07x10 <sup>-1</sup>	1,10x10 <sup>4</sup>	0,00
Residuales	3,61x10 <sup>-4</sup>	13	2,80x10 <sup>-5</sup>		
Fallo de ajuste	2,30x10 <sup>-6</sup>	3	8,00x10 <sup>-7</sup>	2,18x10 <sup>-2</sup>	99,53
Error puro	3,59x10 <sup>-4</sup>	10	3,19x10 <sup>-5</sup>		

(1) Suma de cuadrados ; (2) Media de cuadrados.

Una vez que se comprueba la homoscedasticidad y admitir que se cumplen las hipótesis matemáticas del modelo de mínimos cuadrados (normalidad, aleatoridad e independencia) se calcula la siguiente función de calibrado:

$$A = 0,013 + 8,95 \cdot 10^{-4} \cdot [AA]$$

En la tabla (II.6) se indican los parámetros estadísticos correspondientes a esta ecuación de calibrado:

**Tabla II.6.-Parámetros estadísticos.**

Parámetros	Valor
$s_{R,C}$	5,27x10 <sup>-3</sup>
$r^2$ (%)	99,88
$s_b$	8,51 x 10 <sup>-6</sup>
$s_a$	2,38x10 <sup>-3</sup>

**Linealidad**

$$\text{Lin (\%)} = [1 - \text{D.E.R. (b)}] \cdot 100 = 99'05 \%$$

**Sensibilidad**

a) La sensibilidad de calibrado:  $S_{\text{cal.}} = b = 8'95 \times 10^{-4} (\mu\text{g/l})^{-1}$ .

b) La sensibilidad analítica:  $S_{\text{anal.}} = (s_{R,C}/b) = 5'89 \mu\text{g/l}$ .

**Límite de detección y límite de cuantificación.**

El cálculo de los límites de detección y de cuantificación se realizaron siguiendo las normas de la IUPAC, para ello se prepararon 10 disoluciones del blanco que contienen la disolución reguladora, el gel y agua, siguiendo el procedimiento operatorio propuesto y se midieron sus absorbancias frente a una referencia constituida por el gel y agua, en la tabla II.7 se recogen los resultados obtenidos.

Tabla II.7.-Repetibilidad del blanco.

Disolución nº	A (blanco)	Disolución nº	A (blanco)
1	0'0019	6	0'0018
2	0'0018	7	0'0036
3	0'0006	8	0'0012
4	0'0009	9	0'0015
5	0'0034	10	0'0009

El valor medio de la señal de los blancos es de 0,0017 y la desviación estándar  $1,02 \times 10^{-3}$ , de donde se deducen los siguientes límites:

$$\text{LD} \dots\dots\dots 3'4 \mu\text{g/l.}$$

LQ ..... 11'4 µg/l.

### Rango dinámico lineal

El intervalo de aplicación del método esta comprendido entre el límite inferior, que es el límite de cuantificación, 11,4 µg/l y el límite superior, que viene determinado por el valor superior de concentración que esta dentro del intervalo lineal aceptado por el test de fallo de ajuste, 500 µg/l en nuestro caso.

$$\text{R.D.L.} = 0.1 (\text{Lim}_{\text{sup}}/\text{Lim}_{\text{inf}}) = 4,38 \mu\text{g/l.}$$

### Precisión

La precisión se evaluó mediante las dos formas establecidas en el capítulo II, obteniéndose los siguientes resultados:

#### a) Repetibilidad del método propuesto aplicado a una muestra dada.

Se preparan 10 disoluciones correspondientes a una concentración incluida dentro del rango dinámico lineal anteriormente determinada, 100 µg/l. Siguiendo la metodología de trabajo establecida se obtienen los resultados recogidos en la tabla II.9, de donde se estima la repetibilidad del método:

Tabla II.9.- Repetibilidad del método.

Disolución nº	A (muestra)	Disolución nº	A (muestra)
1	0'1105	6	0'1120
2	0'1184	7	0'1129
3	0'1131	8	0'1183
4	0'1103	9	0'1175
5	0'1122	10	0'1132

Cuyos parámetros estadísticos son 0'1138 de valor medio de absorbancia y 0'0031 de desviación estándar, lo que supone una desviación estándar relativa de 2'7%.

**b) Repetibilidad del método a partir de los datos del calibrado.**

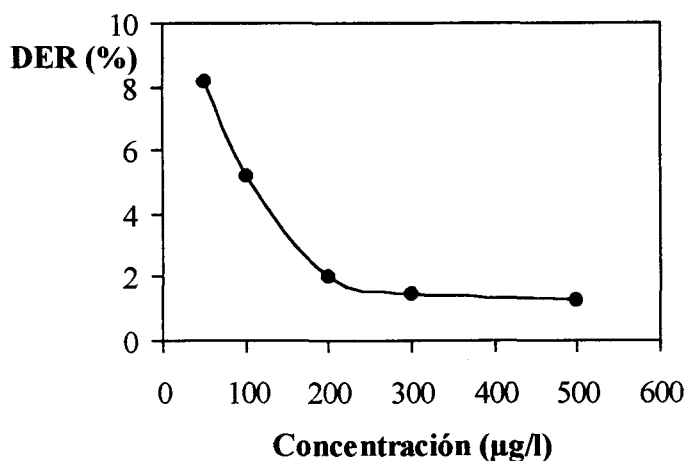
En la tabla II.10 se muestran los valores calculados a partir de la función de calibrado previamente en el apartado 4.1 del presente capítulo.

**Tabla II.10.- Parámetros estadísticos.**

[AA] ( $\mu\text{g/l}$ )	$s_c$	D.E.R (%)
50	4'09	8'2
100	5'19	5'2
200	4'12	2'1
300	4'57	1'5
500	6'42	1'3

En la figura II.13 observa, como era de esperar, que a medida que la concentración de AA analizada aumenta, la desviación estándar relativa se hace cada vez menor, ya que se dividimos un valor constante de desviación estándar entre un valor de concentración cada vez mayor.





**Figura II.14.-** Repetibilidad en función de la concentración de AA.

Existe una pequeña diferencia en la repetibilidad de 100 µg/l al aplicar esto a una muestra dada (2'7%) o al obtenerla a partir de los datos del calibrado (5'2%) . La causa de esta diferencia podría encontrarse en el número de réplicas utilizadas que en el primer caso es de diez y en el segundo caso es de tres.

#### **4.2.- Cumplimiento de la ley de Lambert-Beer y parámetros de fiabilidad para el Sudan I.**

Como en el caso anterior para establecer la relación entre la concentración y la señal analítica se preparan una serie de disoluciones, todas ellas por triplicado, conteniendo concentraciones de analito comprendidas entre 20 y 200 µg/l, todas ellas conteniendo 5ml de disolución reguladora y enrasadas hasta un volumen de 100 ml con agua de ósmosis inversa. Aplicando el procedimiento establecido se obtienen los datos recogidos en la tabla II.10.

Tabla II.10.-Cumplimiento de la ley de Lambert-Beer para el SD.

[SD] ( $\mu\text{g/l}$ )	A		
	1ª Serie	2ª Serie	3ª Serie
20	0'1007	0'1008	0'1021
50	0'1313	0'1310	0'1298
100	0'1823	0'1824	0'1821
150	0'2333	0'2345	0'2331
200	0'2842	0'2835	0'2856

No se toman valores de concentración superiores a 200  $\mu\text{g/l}$  a pesar de que este valor es aún relativamente bajo para establecer el límite superior del intervalo dinámico lineal, debido a que las concentraciones superiores ensayadas presentan una pendiente diferente a la que presenta este tramo inferior, lo que se puede deber a fenómenos de adsorción sobre la superficie del gel. La representación gráfica de estos datos se recoge en la figura III.16, donde se puede observar una relación lineal entre ambas variables.

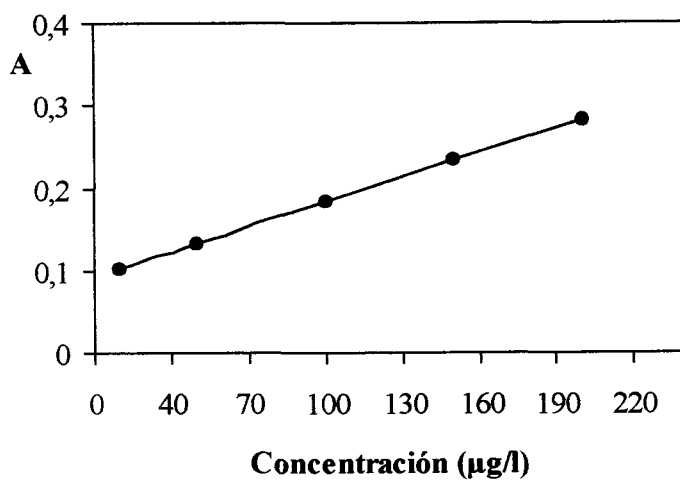


Figura II.15.- Cumplimiento de la ley de Lambert-Beer para el SD.

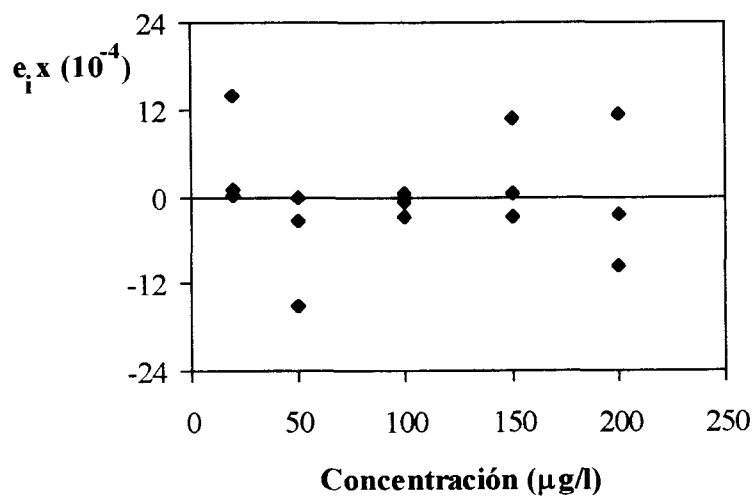


Figura II.16.- Representación de los residuales frente a la concentración de SD.

Para verificar la linealidad se realiza el ANOVA en el rango de concentración entre 20 y 200  $\mu\text{g/l}$ , mediante el test de fallo de ajuste, comprobamos que no hay curvatura ( $P = 36,68\%$ ) y en consecuencia hay un buen ajuste lineal .

La representación de residuales (figura II.16) pone de manifiesto una distribución aleatoria de los mismos que implica que se cumple la condición de homoscedasticidad.

**Tabla II.13.- ANOVA en el rango de concentraciones 20 a 200  $\mu\text{g/l}$  de SD.**

Fuente	SM <sup>1</sup>	g.l	MC <sup>2</sup>	F <sub>exp</sub>	P (%)
Modelo	$7,00 \times 10^{-2}$	1	$7,00 \times 10^{-2}$	$10,74 \times 10^4$	0,00
Residuales	$8,00 \times 10^{-6}$	13	$1,00 \times 10^{-6}$		
Fallo de ajuste	$2,11 \times 10^{-6}$	3	$7,00 \times 10^{-7}$	1,17	36,68
Error puro	$6,00 \times 10^{-6}$	10	$6,00 \times 10^{-7}$		

(1) Suma de cuadrados; (2) Media de cuadrados.

Una vez comprobada la homoscedasticidad y asumiendo el cumplimiento del resto de las hipótesis matemáticas del modelo de mínimos cuadrados (normalidad, aleatoriedad e independencia) se establece la función de calibrado:  $A = 8,00 \times 10^{-2} + 1,02 \cdot 10^{-3} \cdot [\text{SD}]$

**Tabla II.14.-Parámetros estadísticos.**

Parámetros	Valor
$s_{R,C}$	$7'88 \times 10^{-4}$
$r^2$ (%)	99'99
$s_b$	$3'11 \times 10^{-6}$
$s_a$	$3'82 \times 10^{-4}$

**Linealidad**

$$\text{Lin (\%)} = [1 - \text{D.E.R. (b)}] \cdot 100 = 99'69 \%$$

**Sensibilidad**

a) La sensibilidad de calibrado:  $S_{\text{cal.}} = b = 1'02 \times 10^{-3} \mu\text{g/l}$ .

b) La sensibilidad analítica:  $S_{\text{anal.}} = (s_{R,C}/b) = 0'77 \mu\text{g/l}$ .

**Límite de detección y límite de cuantificación**

Siguiendo el procedimiento operatorio propuesto sobre las disoluciones del blanco, se obtienen los resultados recogidos en la tabla II.15, de la que se calcula un valor medio de 0,029 y una desviación estándar de  $1,46 \times 10^{-3}$ .

Tabla II.15.-Repetibilidad del blanco

Disolución nº	A (blanco)	Disolución nº	A (blanco)
1	0'0298	6	0'0310
2	0'0286	7	0'0287
3	0'0314	8	0'0298
4	0'0296	9	0'0294
5	0'0280	10	0'0264

Los límites de detección y de cuantificación son de  $4,3 \mu\text{g/l}$  y de  $14,2 \mu\text{g/l}$  respectivamente.

**Rango dinámico lineal**

El intervalo de aplicación del método esta comprendido entre el límite inferior, que

es el límite de cuantificación, 14,2  $\mu\text{g/l}$  y el límite superior, determinado por el valor superior de concentración que esta dentro del intervalo lineal especificado por el test de fallo de ajuste cuyo valor es 200  $\mu\text{g/l}$ .

$$\text{R.D.L.} = 0.1 (\text{Lim}_{\text{sup}}/\text{Lim}_{\text{inf}}) = 1,40 \mu\text{g/l.}$$

### Precisión

#### a) Repetibilidad del método propuesto aplicado a una muestra dada.

Los valores de absorbancia originados por el análisis de 10 disoluciones de 100  $\mu\text{g/l}$  se recogen en la tabla III.16. Estos datos junto con los valores del blanco incluidos en la tabla III.15 nos permiten el cálculo de la repetibilidad expresada como desviación estándar relativa que resulta ser de 1,2.%.

Tabla II.16.- Repetibilidad de la muestra.

Disolución nº	A (muestra)	Disolución nº	A(muestra)
1	0,1836	6	0,1834
2	0,1858	7	0,1791
3	0,1855	8	0,1810
4	0,1832	9	0,1827
5	0,1822	10	0,1800

Tabla II.17.- Parámetros estadísticos.

Parámetros	Valor
$A_{\text{media}}$	0,1826
$S_{n-1}$	$2,17 \times 10^{-3}$
D.E.R (%)	1,18

**b) Repetibilidad del método a partir de los datos del calibrado.**

En la tabla II.18 se recogen los resultados obtenidos para cada uno de los valores de concentración ensayados.

Tabla II.18.- Parámetros estadísticos.

[SY] ( $\mu\text{g/l}$ )	$s_c$	DER (%)
20	0,55	2,8
50	0,51	1,0
100	0,49	0,5
150	0,51	0,3
200	0,56	0,3

En la presente tabla se puede observar que la desviación estándar relativa disminuye a medida que la concentración de SD analizada aumenta (figura III.18).

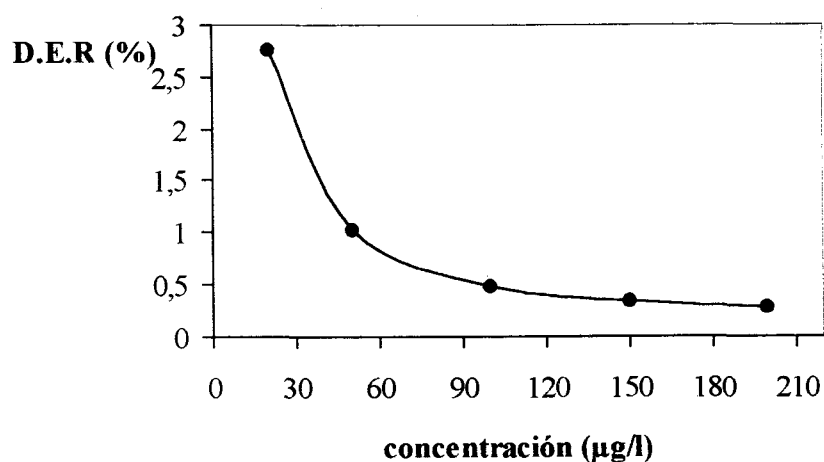


Figura II.17.- Repetibilidad en función de la concentración de SD.

Hay que destacar que existe nuevamente diferencia entre los valores de la repetibilidad para 100 µg/l obtenidos a partir de la repetibilidad de la muestra (1,2%) y los obtenidos a partir del calibrado (0,49%). Diferencia que puede tener su explicación en el hecho de que el número de réplicas utilizadas en el primer caso es de diez y en el segundo de tres aunque, a diferencia con lo obtenido para AA, aquí los resultados son mejores al realizar tres réplicas, en ambos casos se aplicaron criterios de rechazo, no existiendo ningún dato anómalo por ello la única explicación posible se debe a la aleatoriedad ya que la diferencia no es demasiado grande (inferior al 1%) pudiendo encontrarse dentro del margen de error del método.

#### 5.- Resumen de los parámetros de fiabilidad de ambos métodos.

En la tabla III.17 se muestran a modo de resumen los parámetros analíticos del método propuestos para ambos analitos.

Tabla III.17.- Resumen de los parámetros analíticos.

Parámetros	AA	SD
R.D.L.	4'30	1'34
Linealidad (%)	99'05	99'69
Sensibilidad calibrado (µg/l) <sup>-1</sup>	8'95x10 <sup>-4</sup>	1'02x10 <sup>-3</sup>
Sensibilidad analítica (µg/l)	5'89	0'77
LD (µg/l)	3'40	4'30
LQ (µg/l)	11'40	14'20
D.E.R. (%)	2'71	1'18



### 6.- Verificación de la independencia de las señales analíticas.

Dado que el método se va a aplicar a muestras donde se encuentran ambos analitos, se hace necesario demostrar que la presencia de uno no influye en los resultados del otro. Por ello se hizo una experiencia en la que se efectuaron distintos calibrados para cada analito en presencia de una cantidad constante del otro, todo ello operando de acuerdo con el método propuesto. El calibrado se realiza entre 50 y 500  $\mu\text{g/l}$  para AA y entre 20 y 200  $\mu\text{g/l}$  para SD. En la tabla II.18 se indican los resultados obtenidos.

**Tabla II.18.** - Datos de las funciones de calibración de AA y SD en ausencia y presencia de SD y AA respectivamente.

Analito	Interferente	Concentración ( $\mu\text{g/l}$ )	Pendiente	Ordenada	P(%)
AA	SD	0'0	$8,96 \times 10^{-4}$	$1,34 \times 10^{-2}$	88,74
		10'0	$8,95 \times 10^{-4}$	$2,01 \times 10^{-2}$	96,30
		50'0	$8,90 \times 10^{-4}$	$-1,04 \times 10^{-2}$	59,02
		150'0	$8,88 \times 10^{-4}$	$3,14 \times 10^{-2}$	68,04
SD	AA	0'0	$1,02 \times 10^{-3}$	$8,0 \times 10^{-2}$	78,25
		50,0	$1,02 \times 10^{-3}$	$6,5 \times 10^{-2}$	91,38
		500,0	$1,01 \times 10^{-3}$	$-0,1 \times 10^{-2}$	89,28
		1000,0	$1,02 \times 10^{-3}$	$-0,3 \times 10^{-2}$	78,48

Las pendientes de cada serie de las funciones de calibrado establecidas se compararon con la obtenida únicamente con patrones, según la metodología establecida en el capítulo II. Como conclusión se puede señalar que la presencia de SD en concentraciones comprendidas entre 10 y 150  $\mu\text{g/l}$  no afectan a la función de calibrado de AA, igualmente la presencia de concentraciones de AA comprendidas entre 50 y 1000  $\mu\text{g/l}$  no afectan a la función de calibrado de SD.

Se comprueba que no hay diferencia significativa entre las pendientes de las

correspondientes funciones de calibrado comparadas, ya que en todos los casos se obtiene un valor de P muy superior al 5 %, como se refleja en la tabla III.18.

## 6.- Aplicaciones Analíticas.

Para comprobar la utilidad del método propuesto, se aplicó a la determinación de ambos colorantes en dos muestras de Amarillo anaranjado usado con fines alimentarios y procedentes de dos casas comerciales diferentes: Laboratorios Utter (muestra 1) y Sancolor S.A. (muestra 2).

Debido a que no existe, que nosotros sepamos, ningún método propuesto para determinar ambos colorantes a la vez que se pueda emplear como método de referencia, se validó el método aquí propuesto utilizando el procedimiento de adición de patrón para cada una de las aplicaciones propuestas y se verificó la exactitud usando una metodología propuesta en este Departamento<sup>II.18</sup> y ya comentada en el capítulo II.

### 6.1.- Validación del método propuesto.

Los calibrados con adición de patrón se establecen preparando dos series de disoluciones, una para cada marca comercial del producto, con un volumen final de 100 ml introduciendo en todas ellas 50  $\mu\text{g/l}$  de AA. Hay que señalar que las disoluciones madres de ambas muestras se preparan teniendo en cuenta la pureza del producto proporcionada por los respectivos fabricantes, que es de un 86 % y de un 85 % para la muestra proporcionada por los Laboratorios Utter y Sancolor S.A. respectivamente. Este dato será el que se tendrá en cuenta para compararlo con los valores que se obtengan al determinar la cantidad de SD que tienen estas muestras.

Posteriormente se siguió el método operatorio establecido y los resultados obtenidos se recogen en la tabla III.19 y los parámetros establecidos en la tabla III.20.

Tabla II.19.- Calibrados con adición de patrón.

[AA] $\mu\text{g/l}$ adicionado	A	
	Muestra 1	Muestra 2
0	0,0602	0,0584
50	0,1010	0,1004
100	0,1417	0,1429
150	0,1901	0,1908

Tabla II.20.- Parámetros estadísticos de los calibrados con adición de patrón.

Parámetros	Muestra 1	Muestra 2
a	0,0580	0,0573
b	$8,67 \times 10^{-4}$	$8,88 \times 10^{-4}$
$r^2$	0,9999	0,9977
P (modelo)	0,0000	0,0011

El calibrado con adición de patrón, para determinar la cantidad de SD en las muestras de Amarillo Anaranjado, se realiza preparando dos series de disoluciones, una para cada marca comercial del producto, con un volumen final de 100 ml y en todas se introducen 100  $\mu\text{g/l}$  de AA, así el punto cero de la adición de patrón dará la señal correspondiente a la cantidad de SD contenida en los 100  $\mu\text{g/l}$  de AA y por lo tanto el resultado obtenido vendrá dado en tanto por ciento de AA, posteriormente se siguió el método operatorio establecido. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla III.21.

Tabla II.21.- Calibrados con adición de patrón.

[SD] $\mu\text{g/l}$ adicionado	A	
	Muestra 1	Muestra 2
0	0,0129	0,0199
20	0,0325	0,0402
50	0,0611	0,0710
100	0,1131	0,1229

Los parámetros estadísticos calculados a partir de estos datos se recogen en la tabla II.22.

Tabla II.22.- Parámetros estadísticos de los calibrados con adición de patrón.

Parámetros	Muestra 1	Muestra 2
a	0,0160	0,019
b	$1,07 \times 10^{-3}$	$1,03 \times 10^{-3}$
$r^2$	0,9999	0,9996
P (modelo)	0,0000	0,0002

### 6.1.1.- Validación del método. Aplicación al análisis del contenido de Amarillo Anaranjado en la muestra de los Laboratorios UTTER.

Las experiencias realizadas son las siguientes:

*a.1.- Calibrado con patrones.* Se ha establecido ya en el anterior apartado 3.1. Para emplear la metodología de adición de patrón nos será necesaria la ordenada en el origen (a),

la pendiente (b) y la desviación estándar de la regresión del calibrado ( $s_{R,c}$ ).

a.2.- *Calibrado con adición de patrón.* Para establecerlo se preparan cuatro disoluciones conteniendo todas ellas 50 µg/l de muestra y añadiendo cantidades crecientes de disolución patrón de AA. Los parámetros que se necesitan son nuevamente la ordenada en el origen (a), la pendiente (b) y la desviación estándar de la regresión ( $s_{R,c}$ ).

a.3.- *Calibrado de Youden.* Se toman volúmenes crecientes de la disolución de 10 mg/l de la muestra en concreto, 3, 5, 7 y 10 ml, y se llevan a un volumen final de 100 ml con agua de ósmosis inversa, al igual que en los casos anteriores para utilizar la metodología de adición de patrón se utiliza la ordenada en el origen (a), la pendiente (b) y la desviación estándar de la regresión ( $s_{R,c}$ ) obtenidas a partir de este calibrado. En la figura III.19 y III.20 se muestran de forma gráfica los resultados de los tres calibrados.

**Tabla II.24.-** Resultados estadísticos obtenidos en la determinación de AA de los Laboratorios UTTER.

Parámetros	CP	CA	CY
n	15	4	4
a	0,013	0,0573	-0,010
b	$8,95 \times 10^{-4}$	$8,88 \times 10^{-4}$	4,8925
$s_{R,c}$	$5,27 \times 10^{-3}$	$2,22 \times 10^{-3}$	$41,93 \times 10^{-4}$
$s_p$	$4,97 \times 10^{-3}$		
t (b)	0,34 (P = 73,86 %)		
$b_p$	$8,94 \times 10^{-4}$		
a'	0,0136	0,0552	-----
BY	-----	-----	-0,0236
$c_{x,S}$	50,56	-----	-----
$c_{x,A}$	-----	54,13	-----
t (c)	0,807 (P = 26,84 %)		

De la aplicación de la metodología de adición de patrón, cuyos resultados se

resumen en la tabla III.24, se puede concluir que en la comparación de varianzas no se encuentran diferencias significativas entre ambas ( $P = 16.15 \%$ ), por lo que se acepta la hipótesis nula ( $H_0$ ), las varianzas son iguales. Por otra parte al comparar las pendientes tampoco se obtienen diferencias significativas entre ambas, pues  $P = 73,86\%$ , por lo que se acepta la hipótesis nula ( $H_0$ ), que las pendientes son iguales.

En este caso  $a_y$  no está incluido en el intervalo calculado calculado para la  $t$ , por lo tanto existe un componente de error sistemático. No obstante como el valor del blanco de Youden es muy pequeño, este error también será pequeño y lo eliminamos restándole a la señal el blanco de Youden en lugar del blanco analítico.

Al comparar el contenido de analito en la disolución calculado a partir del calibrado con patrones ( $c_{x,S}$ ) y el contenido de analito en la disolución, calculado a partir del calibrado con adición de patrón ( $c_{x,A}$ ), se observa  $P > 5\%$ , por lo que se concluye que el método es exacto para la determinación de AA en la muestra de los laboratorios Utter con un nivel de significación mayor del 5%.

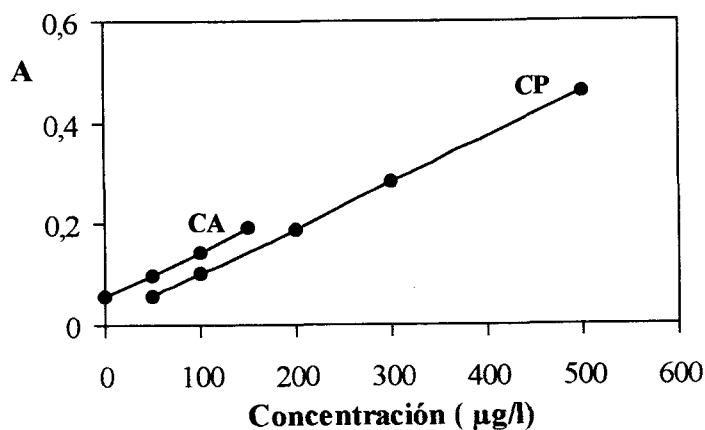
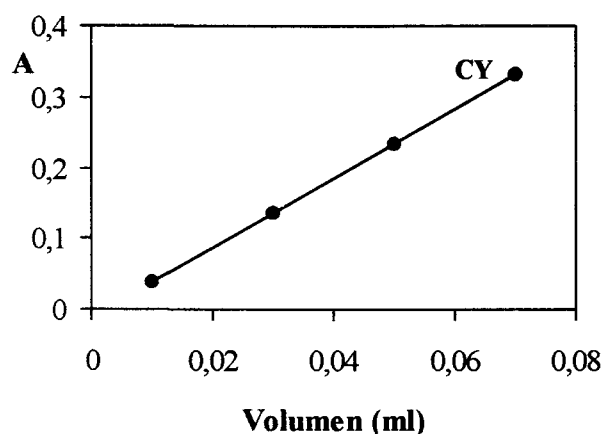


Figura II.18.- Calibrado con patrones (CP) y calibrado con adición de patrón (CA) para la determinación de AA en la muestra 1.



**Figura II.19.-** Calibrado de Youden (CY) para la determinación de AA en la muestra 1.

Como conclusión consideramos que el método queda validado para la determinación de AA en el colorante alimentario Amarillo Anaranjado de los Laboratorios Utter.

#### **Análisis de la muestra.**

Una vez validado el método para analizar este tipo de muestras fue aplicado el método operatorio establecido y la señal obtenida se aplica directamente el calibrado con patrones para calcular la concentración de analito. Se realiza el análisis por triplicado para el colorante alimentario de los Laboratorios Utter (tabla II.25). Donde se obtiene una desviación estándar relativa de 0,33 %. Con ellos se obtiene un valor de concentración media para la muestra de 50,96  $\mu\text{g/l}$ , ya que se adicionó una cantidad de 50  $\mu\text{g/l}$  del analito y la pureza suministrada por el fabricante es del 86%, estableciendo una relación con entre el valor obtenido por nuestro método y el añadido de acuerdo con los datos suministrados por el fabricante, obtenemos una pureza del 87.6%. Comparando estadísticamente ambos porcentajes, para un nivel de confianza del 95,5%, obtenemos  $P = 6,4$ , por lo que podemos concluir que no hay diferencias significativas entre el dato de pureza suministrado por el fabricante y el encontrado por nosotros.

**Tabla II.25.-** Contenido de AA en el colorante alimentario de los Lab. Utter.

Serie n°	A	c(µg/l)
1	0,0556	51,00
2	0,0554	50,78
3	0,0557	51,10

**6.1.2.- Validación del método. Aplicación a la determinación del contenido de Amarillo Anaranjado de SANCOLOR S.A.**

**Tabla II.25.-** Resultados estadísticos obtenidos en la validación del método para AA de Sancolor S.A.

Parámetros	CP	CA	CY
n	15	4	4
a	0,013	0,0580	$9,97 \times 10^{-3}$
b	$8,95 \times 10^{-4}$	$8,67 \times 10^{-4}$	9,0097
$s_{R,c}$	$5,27 \times 10^{-3}$	$3,30 \times 10^{-3}$	$5,27 \times 10^{-3}$
$s_p$	$5,05 \times 10^{-3}$		
t (b)	0,61 (P = 55,10 %)		
$b_p$	$8,94 \times 10^{-4}$		
$a^2$	0,0136	0,0562	-----
BY	-----	-----	$-3,63 \times 10^{-3}$
$c_{x,S}$	52,82	-----	-----
$c_{x,A}$	-----	48,34	-----
t (c)	1,20 (P = 24,76 %)		

La aplicación de la metodología a esta muestra se realiza de igual forma que en el caso anterior, los resultados obtenidos se reflejan en las figuras III.21 y III.22 y los datos estadísticos se recogen en la tabla III.26.



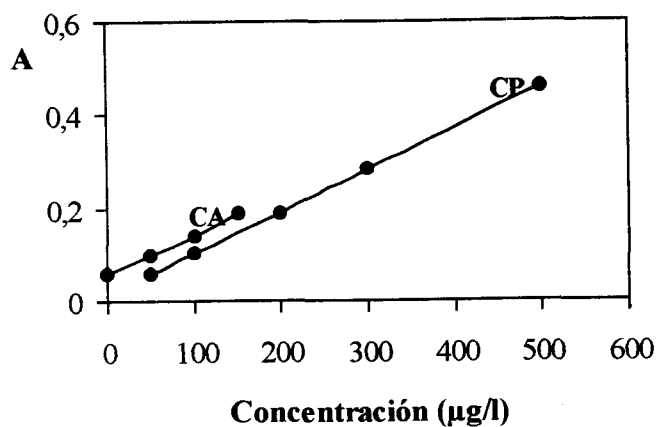


Figura II. 20.- Calibrado con patrones (CP) y calibrado con adición de patrón (CA) para la determinación de AA de Sancolor S.A.

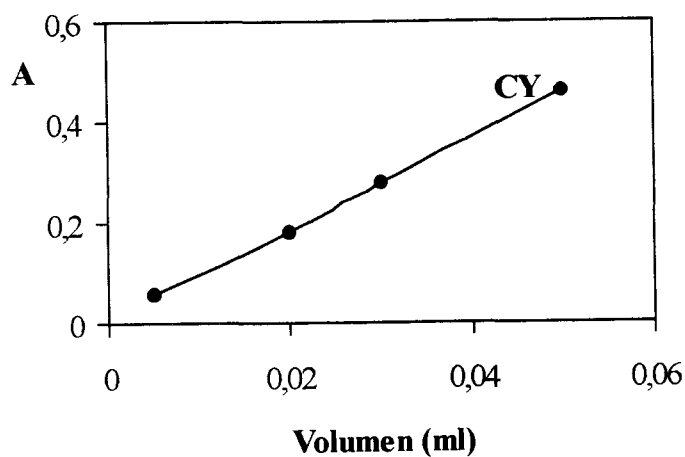


Figura II.21.- Calibrado de Youden (CY) para la determinación de AA de Sancolor S.A.

De los resultados se concluye que al comparar las varianzas no se obtienen diferencias significativas entre ambas ( $P = 31,66 \%$ ), por lo que se considera que las varianzas son iguales.

Igualmente al comparar las pendientes no se obtienen diferencias significativas entre ambas, al obtener  $P = 55,10\%$ , por lo que nuevamente concluimos que las pendientes son iguales.

En este caso  $a_Y$  está incluido en el intervalo calculado para la  $a'_S$  por lo tanto no existe componente de error sistemático. Al comparar el contenido de analito en la disolución, calculado a partir del calibrado con patrones ( $c_{x,S}$ ) y el contenido de analito en la disolución calculado a partir del calibrado con adición de patrón ( $c_{x,A}$ ), se observa que no hay diferencias significativas entre ambas ( $P = 24,76\%$ ), por lo que el método es exacto para la determinación de AA en la muestra de Sancolor S.A. con un nivel de confianza del 95,5%. En este caso se puede considerar que el método queda validado para la determinación de AA en el colorante alimentario de Amarillo Anaranjado de Sancolor S.A.

#### Análisis de la muestra.

Aplicamos el método para el análisis de esta muestra usando el calibrado con patrones para calcular la concentración de analito. Se realizan tres análisis del colorante alimentario de Sancolor S.A (tabla II.27).

Tabla II.27.- Contenido de AA en el colorante alimentario Sancolor S.A.

Serie n°	A	C( $\mu\text{g/l}$ )
1	0,0572	49,44
2	0,0578	50,11
3	0,0573	49,52

La desviación estándar relativa de los datos es de 0,73%. Con estos datos se obtiene

un valor de concentración media para la muestra de 49,69  $\mu\text{g/l}$ , ya que se adicionó una cantidad de 50  $\mu\text{g/l}$  del analito y la pureza suministrada por el fabricante de esta muestra es del 85%, de la relación entre lo encontrado por nuestro método y la cantidad adicionada establecemos que la pureza de la muestra es del 84,47%, comparando ambos resultados estadísticamente, obtenemos  $P = 27,67\%$ , por lo que se puede concluir diciendo entre la pureza de la muestra establecida por nuestro método y la dada por el fabricante no existen diferencias significativas para el nivel de confianza establecido.

### **6.1.3. Validación del método. Aplicación a la determinación del contenido en SD en el colorante Amarillo Anaranjado de los Laboratorios UTTER.**

Como en anteriores ocasiones se necesitan tres calibrados diferentes, calibrado con patrones, calibrado con adición de patrón y calibrado de Youden.

Para establecer el calibrado con adición de patrón se añaden en cada matraz 1 ml de la disolución madre de AA de los laboratorios Utter de 10 mg/l de concentración y en cada uno de ellos se añade una cantidad diferente y creciente de SD enrasando con agua de ósmosis inversa hasta un volumen de 100 ml (esto equivale a poner en todos los matraces una concentración de 100  $\mu\text{g/l}$  de AA), así el contenido de SD que encontraremos estará referido a 100  $\mu\text{g/l}$  de AA, por lo que vendrá directamente expresado en tanto por ciento.

El calibrado de Youden se establece tomando volúmenes crecientes de la disolución madre de AA de los Laboratorios Utter 3, 5, 7 y 10 ml y aplicando el proceso operatorio establecido para la determinación de SD. Los parámetros estadísticos que se necesitan para los tres calibrados son ordenada en el origen (a), pendiente (b), y desviación estándar de la regresión ( $s_{R,c}$ ).

**Tabla II.28.-** Resultados estadísticos obtenidos en la determinación de SD en la muestra de Amarillo Anaranjado de los Laboratorios UTTER.

Parámetros	CP	CA	CY
n	15	4	4
a	0,080	0,0102	0,0949
b	$1,02 \times 10^{-3}$	$1,00 \times 10^{-3}$	1,202
$s_{R,c}$	$7,87 \times 10^{-4}$	$1,50 \times 10^{-3}$	$5,35 \times 10^{-4}$
$s_p$	$9,14 \times 10^{-4}$		
t (b)	1,58 (P = 13,50 %)		
$b_p$	$1,019 \times 10^{-3}$		
a'	0,0804	0,0999	-----
BY	-----	-----	0,0145
$c_{x,S}$	4,8	-----	-----
$c_{x,A}$	-----	4,9	-----
t (c)	0,189 (P = 85,24 %)		

Trás aplicar la metodología se comprueba que las varianzas de ambos calibrados no se diferencian significativamente (P = 5,6 %), por lo que se concluye que las varianzas son iguales. Lo mismo ocurre con la pendiente, al compararlas tampoco se obtienen diferencias significativas entre ambas, (P > 1%) y concluimos que las pendientes son iguales.

En esta ocasión  $a_Y$  no está incluido en el intervalo calculado para la nueva  $a'_S$  por lo tanto existe componente de error sistemático, que eliminaremos restando este blanco a la señal obtenida.

Al comparar el contenido de analito en la disolución problema calculado a partir del calibrado con patrones ( $c_{x,S}$ ) y el contenido a partir del calibrado con adición de patrón ( $c_{x,A}$ ), se concluye que el método es exacto para la determinación de AA en la muestra de Amarillo Anaranjado con un nivel de confianza del 95,5%.

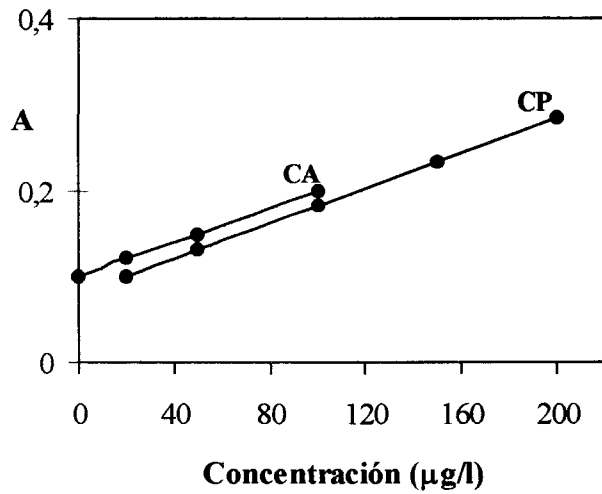


Figura II.22.- Calibrado con patrones (CP) y calibrado con adición de patrón (CA) para la determinación de SD de la muestra de AA de los Laboratorios Utter.

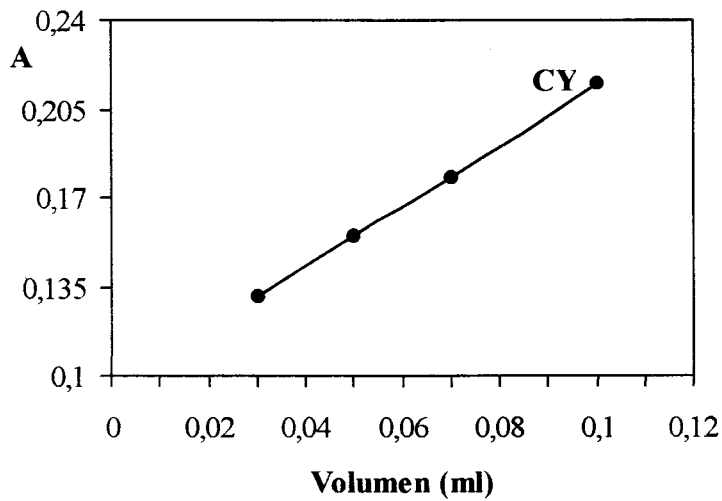


Figura II. 23.- Calibrado de Youden (CY) para la determinación de la cantidad de SD en la muestra de AA de los laboratorios Utter.

Por todo esto se considera que el método queda validado para la determinación de SD en la muestra de Amarillo Anaranjado de los laboratorios Utter.

#### **Análisis de la muestra.**

Una vez validado el método, se determina el contenido de analito realizando tres determinaciones directas. El contenido de analito será el valor medio de estas tres determinaciones. Los resultados se reflejan en la tabla II.29.

**Tabla II.29.-** Contenido de SD en el colorante alimentario de los Laboratorios Utter.

Serie nº	A	C(µg/l)
1	0,0999	4,90
2	0,0998	4,81
3	0,0998	4,81

Con estos datos se obtiene que la impureza se encuentra en un 4,84%, resultado que esta de acuerdo con el contenido de impurezas suministrado por el fabricante y calculado con nuestro método 15 % (la pureza es del 85%). La desviación estándar relativa de los datos es de 1,07 %.

#### **6.1.4. Validación del método. Aplicación a la determinación del contenido en SD en el colorante alimentario Amarillo Anaranjado de SANCOLOR S.A.**

Operando de manera similar a la anterior se obtienen los resultados que se resumen en la tabla II.29.

Tabla II.29.- Resultados estadísticos obtenidos en la determinación de SD en la muestra de AA de Sancolor S.A.

Parámetros	CP	CA	CY
n	15	4	4
a	0,080	0,0997	0,0936
b	$1,02 \times 10^{-3}$	$1,03 \times 10^{-3}$	1,107
$s_{R,c}$	$7,87 \times 10^{-4}$	$2,50 \times 10^{-4}$	$7,36 \times 10^{-4}$
$s_p$	$7,38 \times 10^{-4}$		
t (b)	0,978 (P = 34,36 %)		
$b_p$	$1,03 \times 10^{-4}$		
$a'$	0,0792	0,0997	-----
BY	-----	-----	0,0144
$c_{x,S}$	6,11	-----	-----
$c_{x,A}$	-----	5,92	-----
t (c)	0,42 (P = 67,36 %)		

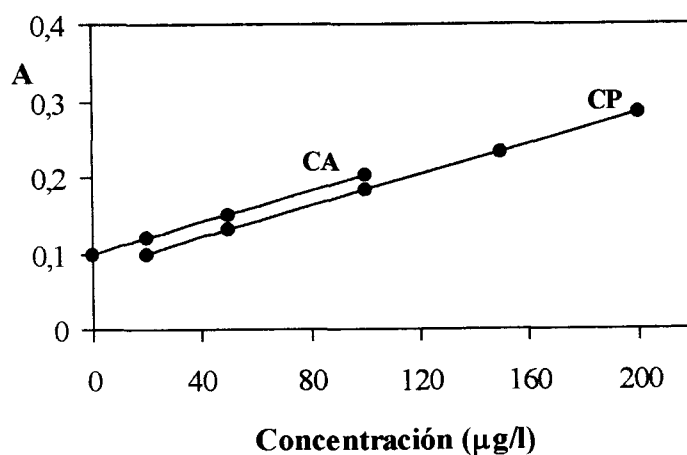
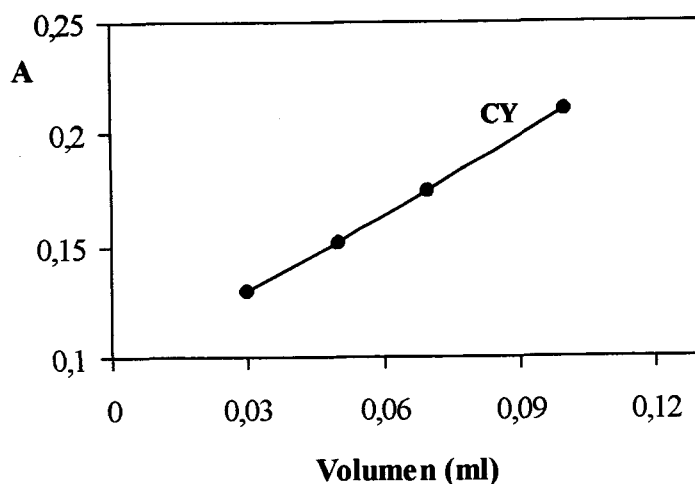


Figura II.24.- CP y CA para la determinación de SD en la muestra de AA de Sancolor S.A.



**Figura II.23.-** Calibrado de Youden (CY) para la determinación de SD en la muestra de AA de Sancolor S.A.

En esta ocasión al comparar las varianzas no se obtienen diferencias significativas entre ambas ( $P = 9'54 \%$ ). Al comparar las pendientes tampoco se obtienen diferencias significativas y se consideran iguales.

Como  $a_Y$  no está incluido en el intervalo calculado para el nuevo valor de la ordenada en el origen del calibrado con patrones en este caso, se considera que hay componente de error sistemático, aunque muy pequeño, que se elimina restando su valor al valor de la señal obtenida. Al comparar el contenido de analito en la disolución calculado a partir del calibrado con patrones ( $c_{x,S}$ ) y el contenido de analito en la disolución calculado a partir del calibrado con adición de patrón ( $c_{x,A}$ ), se concluye que el método es exacto para la determinación de SD en la muestra de colorante alimentario Amarillo Anaranjado de Sancolor S.A, con un grado de confianza del 95'5 % y el método queda validado.

#### **Análisis de la muestra.**

A continuación se le aplicó a ésta el método operatorio establecido y la señal que se obtiene se lleva directamente a la recta de calibrado con patrones para calcular la



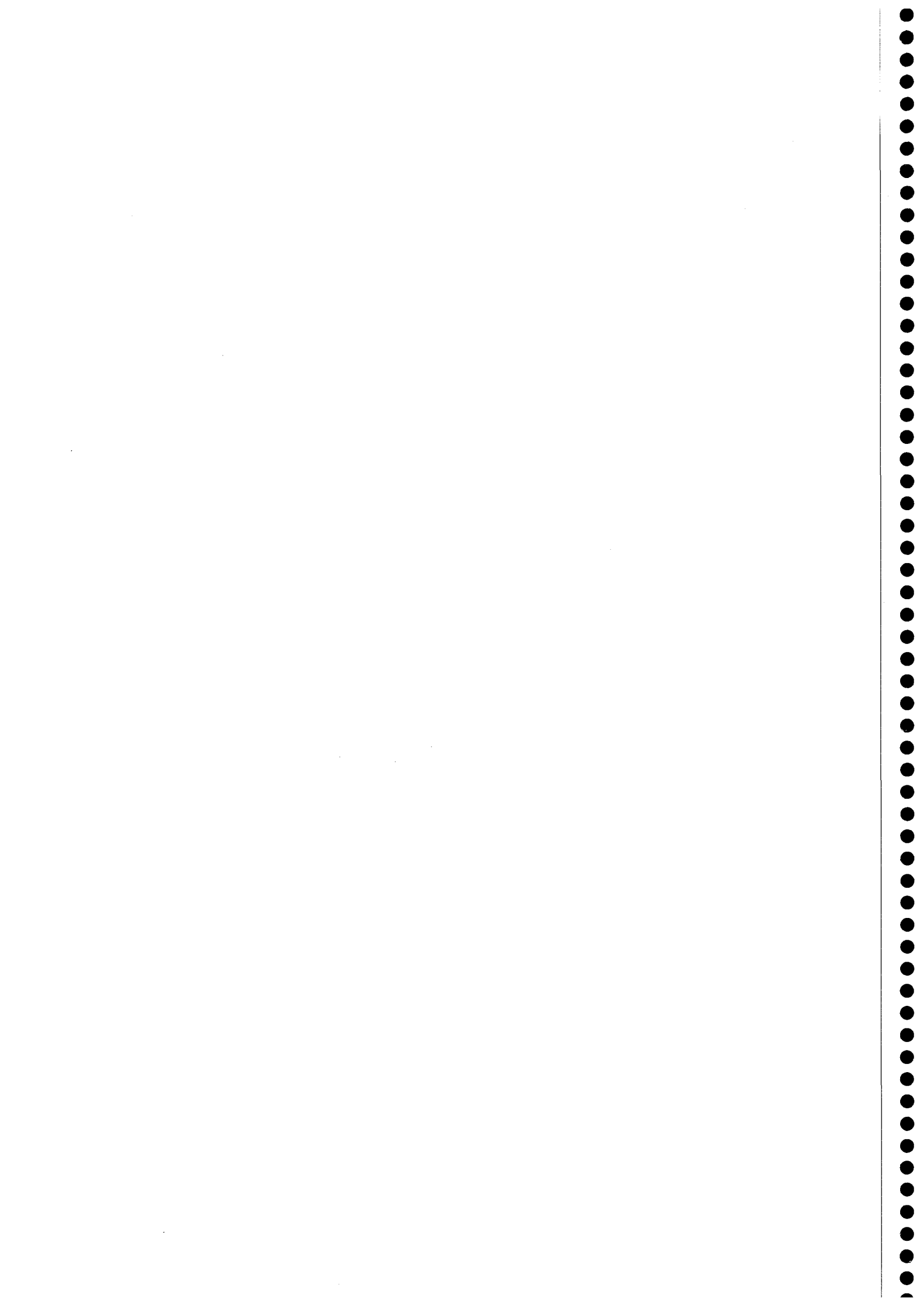
concentración de analito. Se realizan tres análisis del colorante alimentario de Sancolor S.A (tabla II.29).

**Tabla II.29.-** Contenido de SD en el colorante alimentario AA de Sancolor S.A.

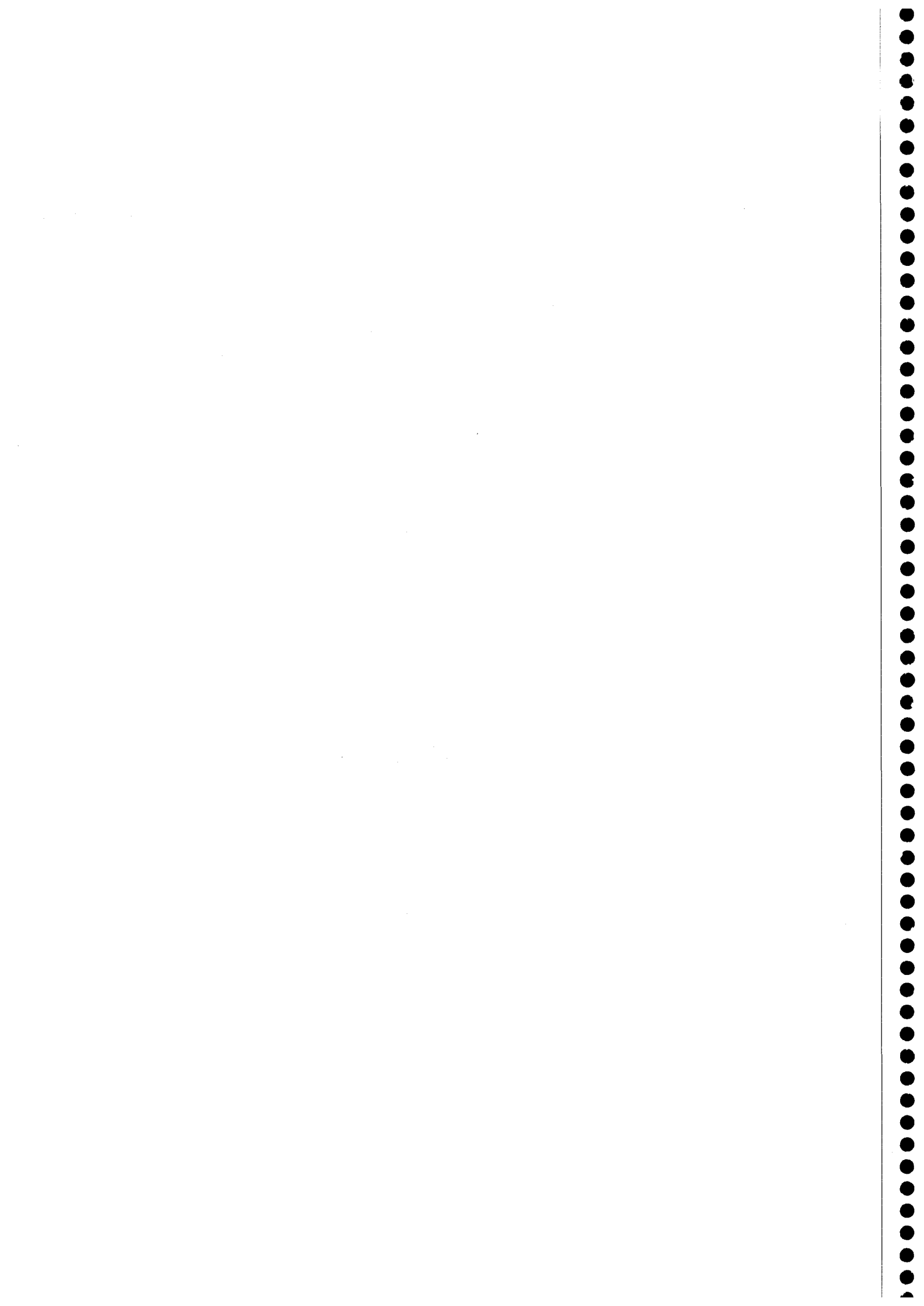
Serie nº	A	C(µg/l)
1	0'0991	5'30
2	0'0991	5'30
3	0'0099	5'24

Con estos datos se obtiene un valor de 5'24 % de SD en la muestra de Amarillo Anaranjado de Sancolor S.A., este resultado que esta de acuerdo con la pureza suministrada por el fabricante , 85%, que indica la presencia de un 15% de impurezas en la muestra. La desviación estándar relativa de los datos es de 0,'6 %.

Como síntesis de todo lo expuesto, se propone un nuevo método para la determinación de AA y SD en muestras comerciales de colorantes empleados en productos alimentarios.



**CAPÍTULO III:  
DETERMINACIÓN DE CARMOISINA Y SU PRODUCTO NO  
SULFONADO EN ALIMENTOS MEDIANTE  
ESPECTROFOTOMETRÍA EN FASE SÓLIDA**



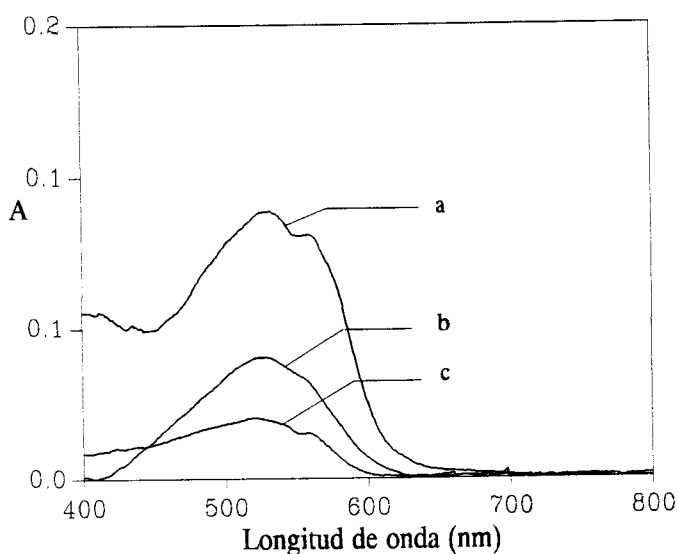
En este capítulo se desarrolla y propone un nuevo método espectrofotométrico para la determinación conjunta de un colorante sintético, la sal disódica del ácido (sulfo-4-naftilazo-1')-2-naftol-1-sulfónico-4 (C.I. 14720), también llamado Carmoisina (CM) y su producto no sulfonado el 1-naftilazo-1-naftol (NN), que fué sintetizado por nosotros según el procedimiento expuesto en el capítulo I. El primer compuesto es ampliamente utilizado como aditivo en alimentos, productos farmacéuticos y cosméticos, además de ser utilizado en la industria textil y en artes gráficas, mientras que el segundo compuesto se forma en el proceso de manufacturación del primero. Los productos comerciales destinados a alimentación no pueden contener de este segundo compuesto más de un 2%, según lo establecido en la legislación española y europea, lo que hace necesario el establecimiento de métodos de análisis que permitan la determinación de ambos compuestos, aunque uno de ellos (el colorante no sulfonado) se encuentre en proporciones muy pequeñas respecto a su homólogo sulfonado. Para resolver esta situación proponemos el empleo de la espectrofotometría en fase sólida como técnica analítica apropiada, ya que además de posibilitar la separación de ambos compuestos, ejerce una preconcentración que aumenta la sensibilidad de las medidas. A partir de ahora se designará a ambos por los acrónimos CM y NN respectivamente.

## OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES EXPERIMENTALES.

### 1.- Elección del soporte sólido.

Al considerar la estructura de estas moléculas, se observa que en el caso de CM se trata de un sulfonato, por lo que se podría fijar tanto en cambiadores de iones como en adsorbentes, en cambio NN no contiene grupos iónicos en su molécula, y por tanto, no se deben retener por intercambio iónico y sí por adsorción sobre un soporte adecuado. Cualitativamente se comprobó la buena retención de CM en geles aniónicos y de NN en adsorbentes hidrofóbicos.

Para conocer mejor el proceso de fijación se registraron los espectros en fase sólida de ambos colorantes, resultantes de equilibrar 100 ml de disolución de 200  $\mu\text{g/l}$  de CM y de otros 100 ml de NN de 500  $\mu\text{g/l}$ , con cada uno de los siguientes cambiadores: Sephadex G-15, G-25, DEAE A-25, QAE A-25, CM C-25, SP C-25 y gel de sílice C-18. Los resultados obtenidos se recogen en la figura III.1. En ella se observa que NN únicamente se fijó sobre gel de sílice C-18, dado que su molécula carece de grupos cambiadores y los grupos polares que tiene, azo e hidroxilo, no le confieren suficiente polaridad como para retenerse sobre soportes hidrofílicos. En los demás soportes ensayados no se observó ninguna retención por lo que, al no proporcionar ningún tipo de información, no se han incluido en la citada figura. En la figura III.1 las curvas nos muestran el espectro del colorante CM fijado sobre Sephadex DEAE A-25 (b) y Sephadex QAE A-25 (c). La retención sobre estos soportes podemos atribuirlos a la presencia de grupos sulfónicos en su molécula, que permiten su retención sobre cambiadores aniónicos. Como podemos apreciar presenta una retención mayor sobre Sephadex QAE A-25, pero también presenta una retención apreciable sobre Sephadex DEAE A-25 y dado que este es un soporte más selectivo que el anterior, es el que se selecciona para experiencias posteriores. Al igual que en el caso anterior los demás soportes ensayados con este analito no dan resultado por lo que tampoco se han incluido en la figura citada.



**Figura III.1.-** Espectros de absorción de:  
(a) NN (500  $\mu\text{g/l}$ ) en gel de sílice C-18.  
(b) CM (200  $\mu\text{g/l}$ ) en Sephadex QAE A-25  
(c) CM (200  $\mu\text{g/l}$ ) en Sephadex DEAE A-25.

## 2.- Optimización de las variables químicas que afectan a la fijación de CM y NN.

### 2.1.- Factores que influyen sobre el proceso de fijación.

#### 2.1.1.- Influencia del pH.

En el caso del colorante sulfonado (CM) una de las variables que mayor influencia puede ejercer en su proceso de retención sobre la resina, es el pH del medio ya que la concentración de protones afecta al equilibrio ácido-base de los grupos sulfónicos y en consecuencia, a su capacidad para fijarse en el soporte sólido.

Para establecer la dependencia con el pH para ambos compuestos se preparan dos series de disoluciones, una de 500  $\mu\text{g/l}$  para CM y otra serie de 200  $\mu\text{g/l}$  para NN, en matraces de 100 ml. Para cada disolución se ajusta un valor de pH diferente, desde 1 hasta 13, mediante la adición de disoluciones de HCl o NaOH de concentraciones . A

continuación siguiendo la metodología establecida en el Capítulo I, se obtuvieron los resultados cuya representación se muestra en la figura III.2:

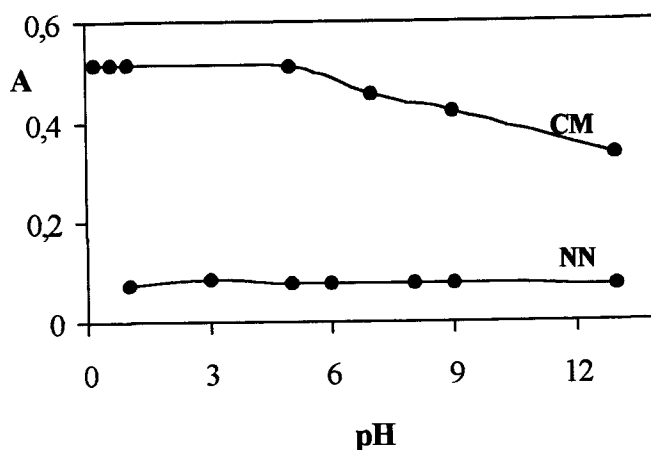


Figura III.2.- Influencia del pH sobre el proceso de retención .

En la citada figura podemos observar que la retención de NN sobre la resina es independiente del valor de pH, cosa lógica si tenemos en cuenta que se trata de un proceso de adsorción. Por el contrario la retención del colorante CM, que sigue un mecanismo de cambio iónico, si está influenciada por el pH del medio. En efecto, en medio ácido los grupos sulfónicos a pesar de estar protonados se retienen con fuerza disminuyendo la retención al incrementarse el valor del pH debido a la competencia que surge con los iones hidroxilo por los grupos iónicos fijos libres. Por todo esto se selecciona para CM un pH 1 y para NN un pH 5, para lo que habrá que utilizar disoluciones reguladoras de pH.

Por su parte y para asegurarnos que las disoluciones de NN alcanzan un pH de 5 se prueban distintas cantidades de dos disoluciones reguladoras válidas para esa zona de pH, ácido acético/acetato sódico 1 M y ácido monocloroacético/monocloroacetato sódico 1 M.

Siguiendo el proceso operatorio requerido para cada analito, se observa que para CM la disolución de HCl mantiene el valor requerido de pH, y que para NN ambas disoluciones amortiguadoras ensayadas ofrecen idénticos resultados, pero que la cantidad



requerida en el segundo caso es mayor. Por ello se optó por usar la disolución de ácido acético/acetato sódico 1 M.

Para la determinación de la cantidad mínima de disolución reguladora necesaria para ajustar el pH en cada caso, se preparan disoluciones de 500  $\mu\text{g/l}$  de CM y de 100  $\mu\text{g/l}$  de NN poniendo en cada una de ellas cantidades crecientes de disolución de HCl para CM y de ácido acético/acetato sódico para NN desde, 1 ml hasta 20 ml comprobando, para ambos analitos y en todos los casos, la constancia del pH antes y después de aplicar el proceso operatorio. Los datos obtenidos en ambos casos (tabla III.1), señalan que 5 ml son suficientes en ambos casos, por lo que dicho volumen se elige como óptimo para posteriores experiencias.

Tabla III.1.- Influencia de la cantidad de disolución reguladora.

V (ml)	pH		A	
	CM	NN	CM	NN
1	1'67	4'96	0'5639	0'0621
2	1'38	4'98	0'5698	0'0645
5	1'00	5'00	0'5786	0'0718
10	1'00	5'00	0'5783	0'0735
20	0'89	5'00	0'5784	0'0726

### 2.1.2.- Influencia de la fuerza iónica.

El estudio de dicha influencia sobre la fijación de ambos analitos se realizó preparando 5 disoluciones de 500  $\mu\text{g/l}$  de CM y otras 5 disoluciones de 100  $\mu\text{g/l}$  de NN, añadiendo a cada una de ellas 5 ml de disolución de HCl 1 M ( $\text{pH} = 1$ ) para las primeras y 5 ml de ácido acético/acetato sódico ( $\text{pH} = 5'0$ ) para las segundas. Se añaden a ambas series volúmenes crecientes de disolución 0,1 M de NaCl, enrasando en todos los casos a un volumen final de 100 ml. Siguiendo el procedimiento operatorio establecido en el capítulo I se obtienen los resultados que podemos ver en la figura III.3.

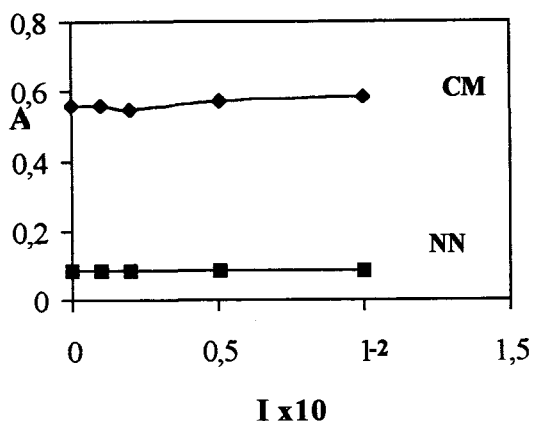


Figura III.3.- Influencia de la fuerza iónica .

Para NN la señal es totalmente independiente del valor de la fuerza iónica del medio. Para CM la absorbancia aumenta ligeramente (0'02 unidades al aumentar la fuerza iónica del medio desde  $0'2 \times 10^{-2}$  hasta  $0'5 \times 10^{-2}$  M, por lo que no se consideró necesario ajustarla en ninguno de los casos.

### 2.1.3.- Influencia de la cantidad de gel.

Se prepararon 6 disoluciones con un volumen final de 100 ml de disolución 500  $\mu\text{g/l}$  de CM y otras tantas de 100  $\mu\text{g/l}$  de NN, todas ellas con sus correspondientes disoluciones amortiguadoras. En el caso de CM se añadieron cantidades crecientes de Sephadex A-25 desde 40 hasta 120 mg y en el caso de NN gel de sílice C-18 desde 100 hasta 300 mg. Posteriormente se aplicó el proceso operatorio establecido, obteniendo los resultados recogidos en la tabla III.2 y representados en la figura III.4, que ponen de manifiesto una dependencia exponencial entre la masa de gel empleada y la absorbancia obtenida que está de acuerdo con las predicciones teóricas señaladas en la Introducción.

Tabla III.2 Influencia de la cantidad de gel.

CM		NN	
mg(DEAE)	A	mg (C-18)	A
40	0'7172	100	0'1950
50	0'4667	120	0'1339
70	0'3420	130	0'1040
90	0'2878	150	0'0831
100	0'2722	250	0'0712
120	0'2700	300	0'0705

Si se realiza una transformación logarítmica de los valores experimentales obtenidos en ambos casos y se ajustan por mínimos cuadrados, como hemos realizado en anteriores ocasiones, se obtienen las siguientes ecuaciones:

Para CM  $\log A = 1'192 - 0'873 \log m_g$

Para NN  $\log A = 0'803 - 0'813 \log m_g$

donde  $m_g$  es la masa del gel correspondiente, expresada en miligramos.

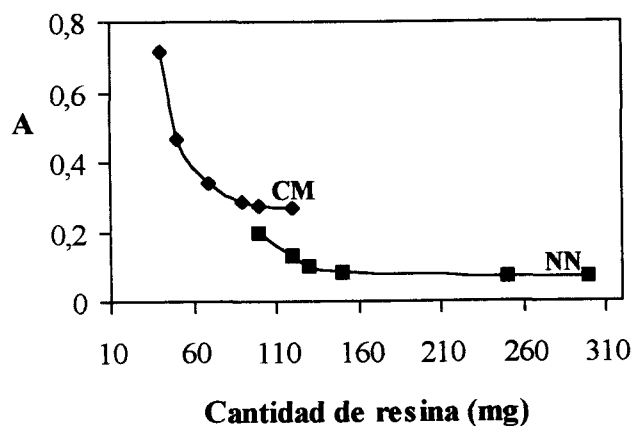


Figura III.4.- Influencia de la cantidad de resina.

A partir de estas ecuaciones se puede establecer para cada analito la ecuación de la hipérbola correspondiente a la curva de la figura III.4. Para CM  $A \cdot m_n^{0.813} = -1/192$  y para NN  $1 \cdot m_n^{0.803} = -0/811$ .

Con ellas se puede estimar el valor de absorbancia para cualquier cantidad de gel comprendida entre 40 y 120 mg para CM y entre 100 y 300 mg para NN en las mismas condiciones operatorias.

Según lo establecido en el capítulos anteriores, se debe de tomar la cantidad de gel que proporcione un valor máximo de absorbancia, 40 mg en un caso y 100 mg en otro, pero estas cantidades tan pequeñas presentan problemas de manipulación durante el proceso de recogida y empaquetado de los sólidos en la cubeta de medida. Por ello, se llega a una situación de compromiso entre sensibilidad y facilidad en la manipulación, eligiéndose 50 mg de Sephadex A-25 para CM y 150 mg de gel de sílice C-18 para el caso de NN, que son las mínimas cantidades de soporte sólido que se pueden usar con facilidad sin que se produzca una pérdida de sensibilidad excesivamente grande. Hay que destacar que la cantidad de resina seleccionada para NN esta dentro de la zona que da el valor de absorbancia más baja de la gráfica, luego la sensibilidad que obtenemos con esta cantidad de resina es la mínima dentro de todas las posibles cantidades de resina es de las menores dentro de las cantidades de resina que se pueden utilizar.

## 2.2.- Factores que influyen sobre la cinética del proceso de fijación.

### 2.2.1.- Influencia del tiempo de equilibración del gel.

Se preparan dos series de disoluciones, una de 500  $\mu\text{g/l}$  de CM en un volumen final de 100 ml de agua de ósmosis inversa y otra de 100  $\mu\text{g/l}$  de NN, se ajustan los valores de pH en la forma anteriormente indicada y se transfieren a botellas de vidrio de 1 litro donde se añaden las cantidades necesarias de los respectivos soportes sólidos. Disoluciones idénticas se agitan mecánicamente durante periodos de tiempo variables comprendidos entre 5 y 60 minutos a 60 rpm y se sigue el procedimiento operatorio establecido anteriormente. Los resultados obtenidos se recogen en la figura III.5, donde se puede observar que hay un importante aumento en la absorbancia en el caso del CM al aumentar el tiempo de agitación

de 5 a 10 minutos a partir del cual permanece constante. En el NN hay un ligero aumento inicial de absorbancia hasta que a partir de 15 minutos se mantiene constante. Al igual que con los analitos estudiados en capítulos anteriores cabe destacar la rápida equilibración debido a que no hay reacciones químicas previas. Se elige un tiempo de equilibración de 10 minutos para el caso de CM y de 15 minutos para el caso de NN.

Como en casos anteriores la velocidad de agitación resultó ser una variable que no afecta al proceso de fijación de los analitos siempre que su valor sea razonablemente alto. En este caso se elige 60 rpm para ambos analitos.

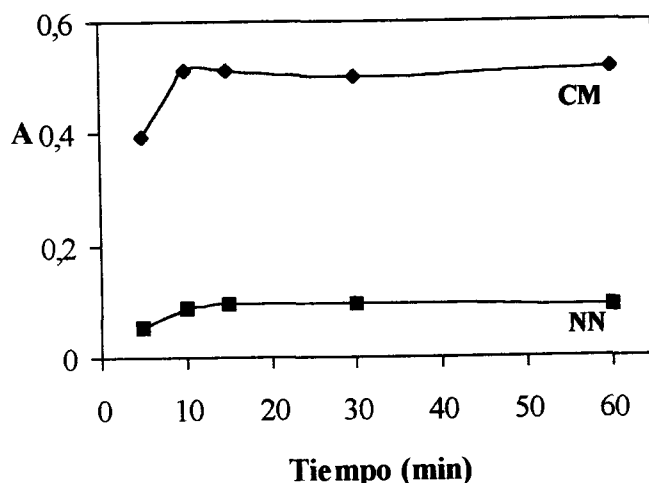


Figura III.5.- Influencia del tiempo de equilibración.

### 2.2.3.- Influencia del contenido en etanol.

Puesto que el estudio que estamos realizando pretende determinar CM que es soluble en agua y NN que es insoluble en agua pero soluble en etanol, será necesario trabajar con un determinado porcentaje de etanol, que permita la solubilización del NN. De hecho la disolución madre de este analito se encuentra preparada en este disolvente. Este hecho justifica el estudio de la influencia del contenido de etanol sobre la retención de ambos analitos, para lo cual se preparan disoluciones de 500  $\mu\text{g/l}$  de CM y de 100  $\mu\text{g/l}$  de NN y tras ajustar el valor de pH seleccionado para cada analito se añaden cantidades de

etanol entre 1 y 20 ml, enrasando a un volumen final de 100 ml con agua de ósmosis inversa. Posteriormente se sigue el proceso operatorio descrito en el capítulo I. Los resultados obtenidos se recogen en la figura III.6, donde puede observarse que en el caso de CM el volumen de etanol añadido no afecta a la fijación de éste por cambio iónico, al menos hasta un 20 % (etanol/agua v/v). Para NN, en cantidades inferiores al 10% de etanol, hay una menor retención sobre el soporte sólido y a partir de esta proporción se obtiene una señal constante que es la que se selecciona. El etanol nos asegura que el NN se encuentra completamente disuelto, esto como se ve en la figura III.7 se consigue a partir de un 10% de etanol como lo indica el valor máximo de absorbancia. No se han representado cantidades superiores al 20% de etanol porque a partir de este valor se produce una deshidratación del gel dando lugar a un apelmazamiento del mismo que dificulta su empaquetamiento en la cubeta.

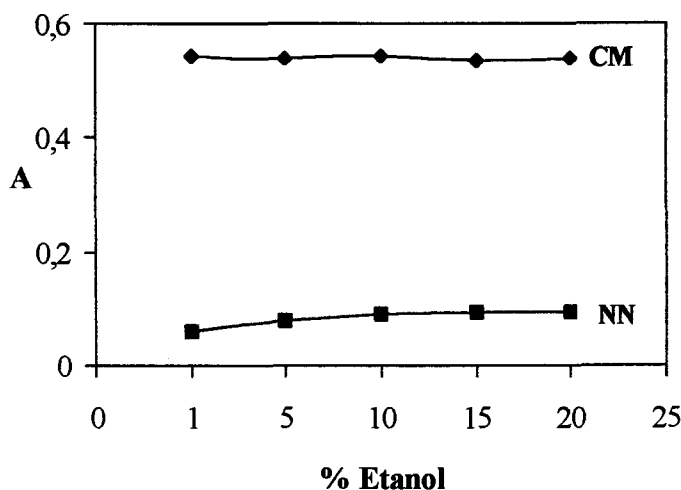


Figura III.6.- Influencia del % de etanol en los procesos de fijación de los analitos.

Las muestras reales en las que vamos a determinar los colorantes de nuestro interés no llevan etanol por lo que NN deberá de encontrarse disuelto o disperso en agua a pesar de ser muy poco soluble. Las cantidades encontradas de este producto, NN son muy pequeñas, no obstante la presencia de surfactantes en alguno de los productos analizados pueden contribuir a su disolución quizás en estado coloidal. Para realizar la determinación

del contenido de NN en alguno de ellos, añadimos nosotros un 10% de etanol para asegurar la disolución del producto que se puede encontrar disperso.

### 2.3.- Factores que influyen en la medida de la señal analítica.

#### 2.3.1.- Influencia del volumen de disolución empleado.

Para establecer la dependencia de la absorbancia respecto del volumen de muestra inicialmente tomado para el análisis, se preparan disoluciones de 500  $\mu\text{g/l}$  de CM y de 100  $\mu\text{g/l}$  de NN, todas ellas con 5 ml de disolución reguladora, con un 10 % de etanol (en el caso del NN), y enrasadas con volúmenes variables de agua de ósmosis inversa que van desde 100 ml hasta 2000 ml. A estas disoluciones, transferidas a botellas de vidrio de 1 ó 2 litros, según el volumen final de la disolución, se añaden 50 mg de Sephadex DEAE A-25 o 150 mg de gel de sílice C-18 respectivamente y se agitan durante 15 minutos.

En la figura III.7 se pone de manifiesto, como es de esperar, que en ambos casos hay un aumento de la absorbancia al aumentar el volumen final de muestra, hasta alcanzar un valor constante a partir del cual el valor de la absorbancia permanece constante. Para CM ese valor es de 1000 ml.

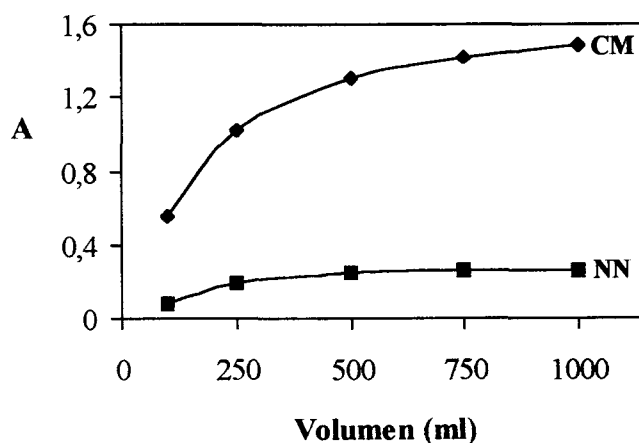


Figura III.7.-Influencia del volumen de muestra.

En principio se seleccionó como volumen de trabajo 100 ml debido a que se reduce el tiempo de agitación y por tanto el método se hace más rápido. Sin embargo para el caso de NN los valores de absorbancia obtenidos son muy bajos, lo que se puede deber a que la cantidad de resina seleccionada es demasiado grande y origina una señal de absorbancia baja. Por ello, para este analito vamos a establecer dos funciones de calibrado, una para un volumen de 100 y otra de 500 ml, al objeto de poder comparar las sensibilidades de ambos y seleccionar el volumen de trabajo que mejor convenga.

### 2.3.- Influencia del tiempo de secado en la determinación de NN.

Debido a las características hidrófobas del gel de sílice C-18, es necesario secarla antes de empaquetarla en la cubeta de medida y proceder a su lectura. Para elegir el tiempo de secado óptimo se prepararon disoluciones de 100  $\mu\text{g/l}$  de NN siguiendo el proceso operatorio establecido hasta llegar a la fijación del analito sobre el gel de sílice y filtración posterior. Una vez llegado a este punto, distintas muestras se someten a diferentes tiempos de secado comprendidos entre 1 y 20 minutos siguiendo la metodología establecida. Los resultados los encontramos representados en la figura III.8.

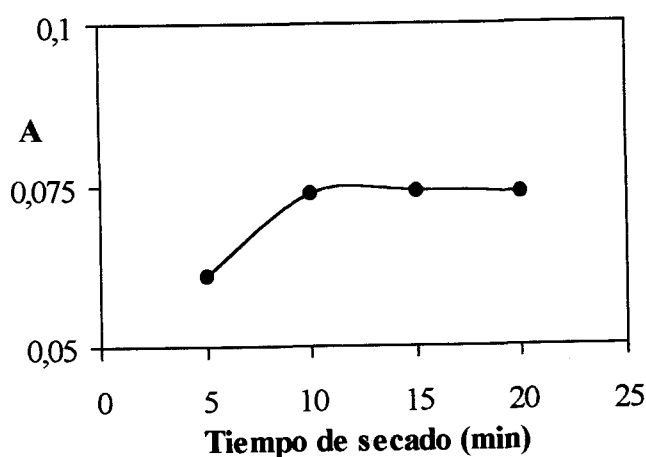


Figura III.8.- Influencia del tiempo de secado en las muestras de NN.

Para un valor del tiempo de secado inferior a 5 minutos, no es posible empaquetar el gel pues no está suficientemente seco y al introducirlo en la cubeta queda apelmazado. De 5 a 10 minutos se observa un incremento de la señal, debido a que el empaquetamiento



va siendo cada vez más homogéneo, hasta que se llega a una constancia en la señal analítica a partir de 15 minutos, tiempo que se empleará, a partir de ahora, para secar el sólido después de fijar el analito.

### 2.3.2.- Influencia del tiempo de centrifugación.

Para establecer esta dependencia se introduce la cubeta de medida, conteniendo al soporte sólido ya empaquetado, en un compartimento especialmente preparado para ello y el conjunto se lleva a una centrífuga de sobremesa. La experiencia que se plantea consiste en preparar una disolución de 500  $\mu\text{g/l}$  de CM y otra de 100  $\mu\text{g/l}$  de NN siguiendo el procedimiento operatorio ya establecido, realizándose la medida de ambos soportes con el analito sin centrifugar y centrifugando durante tiempos diferentes.

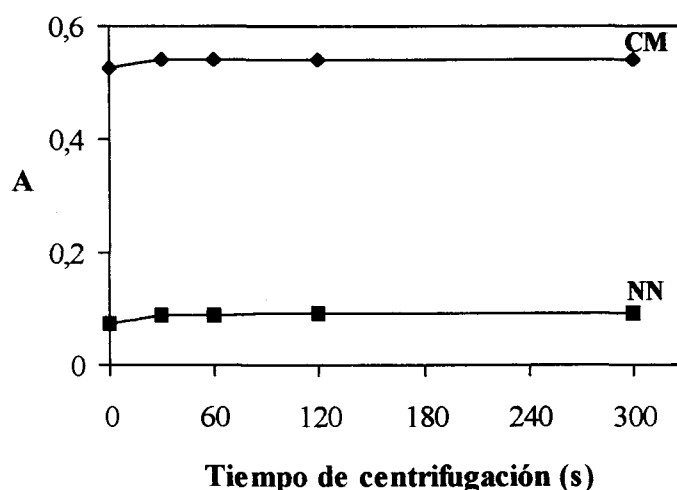


Figura III.9.- Influencia del tiempo de centrifugación.

La figura III.9 indica que es adecuado centrifugar la cubeta con el soporte sólido y con el analito para conseguir que la señal sea independiente del empaquetamiento. Se seleccionan 30 segundos como tiempo suficiente para conseguir una señal estable.

### 3.- PARÁMETROS ANALÍTICOS.

Optimizadas las variables instrumentales y experimentales que afectan al proceso, procedemos a comprobar el cumplimiento de la ley de Lambert-Beer.

#### 3.1.- Cumplimiento de la ley de Lambert-Beer y parámetros de fiabilidad para Carmoisina.

Se preparan una serie de disoluciones en matraces de 100 ml, cada una por triplicado, conteniendo concentraciones de analito comprendidas entre 50 y 650  $\mu\text{g/l}$  y siguiendo la metodología establecida se obtienen los valores de absorbancia que se recogen en la tabla III.3.

Tabla III.3.- Establecimiento de la ley de Lambert-Beer para CM.

[CM] ( $\mu\text{g/l}$ )	A		
	1ª Serie	2ª Serie	3ª Serie
50	0'0485	0'0502	0'0493
100	0'1071	0'1068	0'1032
250	0'2825	0'2832	0'2828
500	0'5751	0'5732	0'5728
650	0'7505	0'7521	0'7493

Aplicando el test de fallo de ajuste para el rango de concentraciones entre 50 y 650  $\mu\text{g/l}$  se encuentra que hay un buen ajuste lineal pues  $P = 16'64\%$ . La representación gráfica de los residuales frente a la concentración de CM muestra una distribución aleatoria de los mismos, como era de esperar, indicativo de la existencia de homoscedasticidad (figura III.11).

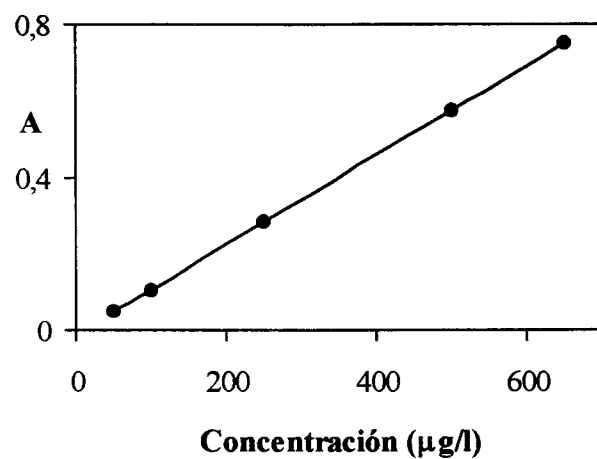


Figura III.10.- Cumplimiento de la ley de Lambert-Beer para el caso de CM.

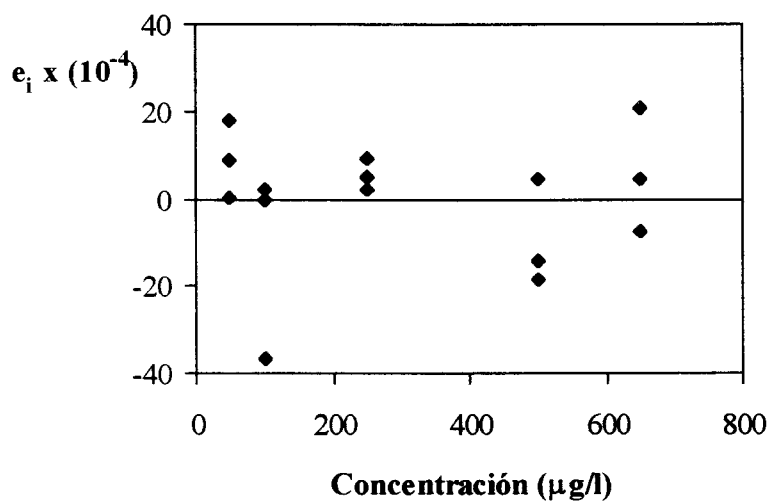


Figura III.11.- Representación gráfica de los residuales frente a la concentración de CM.

**Tabla III.4.-** Resultados del ANOVA realizado en el rango de concentraciones 50 a 650 µg/l de CM.

Fuente	SM <sup>1</sup>	g.l	MC <sup>2</sup>	F <sub>exp</sub>	P (%)
Modelo	110x10 <sup>-1</sup>	1	110x10 <sup>-1</sup>	4'85x10 <sup>5</sup>	0.00
Residuales	2'90x10 <sup>-5</sup>	13	2'00x10 <sup>-6</sup>		
Fallo de ajuste	1'13x10 <sup>-5</sup>	3	3'80x10 <sup>-6</sup>	208x10 <sup>-1</sup>	16'64
Error puro	1'81x10 <sup>-5</sup>	10	1'80x10 <sup>-6</sup>		

(1) Suma de cuadrados ; (2) Media de cuadrados.

Una vez que se comprueba la homoscedasticidad y admitiendo que se cumplen las hipótesis del modelo matemático (normalidad, aleatoriedad e independencia) se establece la siguiente función de calibrado:

$$A = -0,010 + 1,169 \cdot 10^{-3} \cdot [CM]$$

En la tabla (III.5) se indican los parámetros estadísticos correspondientes a esta ecuación de calibrado:

**Tabla III.5.-**Parámetros estadísticos.

Parámetros	Valor
S <sub>R,C</sub>	1'5x10 <sup>-3</sup>
r <sup>2</sup> (%)	99'99
s <sub>b</sub>	1'68 x 10 <sup>-6</sup>
s <sub>a</sub>	6'49x10 <sup>-4</sup>

### Linealidad

$$\text{Lin (\%)} = [1 - \text{D.E.R. (b)}] \cdot 100 = 99'85 \%$$

**Sensibilidad**

a) La sensibilidad de calibrado:  $S_{\text{cal.}} = b = 1'169 \times 10^{-3} (\mu\text{g/l})^{-1}$ .

b) La sensibilidad analítica:  $S_{\text{anal.}} = (s_{R,C}/b) = 1'28 \mu\text{g/l}$ .

**Límite de detección y límite de cuantificación.**

El cálculo de los límites de detección y cuantificación se realizaron siguiendo las normas de la IUPAC. Para ello se prepararon 10 disoluciones del blanco, siguiendo el procedimiento operatorio propuesto y se midieron sus absorbancias frente a una referencia constituida por gel y agua. En la tabla III.6 se recogen los resultados obtenidos.

**Tabla III.6.-Repetibilidad del blanco.**

Disolución nº	A (blanco)	Disolución nº	A (blanco)
1	0'0016	6	-0'0009
2	-0'0005	7	0'0010
3	-0'0009	8	0'0012
4	-0'0008	9	-0'0020
5	0'0018	10	-0'0013

El valor medio de la señal de los blancos es de  $-8'0 \times 10^{-5}$  y la desviación estándar  $1'34 \times 10^{-3}$ , de donde se deducen los siguientes resultados:

LD ..... 3'4  $\mu\text{g/l}$ .

LQ ..... 11'5  $\mu\text{g/l}$ .

**Rango dinámico lineal**

El intervalo de aplicación del método esta comprendido entre el límite inferior, que es el límite de cuantificación 11'5  $\mu\text{g/l}$  y el límite superior, que viene determinado por el

valor superior de concentración que está dentro del intervalo lineal aceptado por el test de fallo de ajuste, 650 µg/l en nuestro caso.

$$\text{R.D.L.} = 0.1 (\text{Lim}_{\text{sup}}/\text{Lim}_{\text{inf}}) = 5'77 \mu\text{g/l.}$$

### Precisión

Se evaluó mediante las dos formas establecidas en el capítulo I, obteniéndose los siguientes resultados:

#### a) Repetibilidad del método propuesto aplicado a una muestra dada.

Se preparan 10 disoluciones correspondientes a una concentración intermedia del rango dinámico lineal anteriormente determinado, 250 µg/l. Siguiendo la metodología de trabajo establecida se obtienen los resultados recogidos en la tabla III.7, de donde se estima la repetibilidad del método. De la citada tabla se deduce que el valor medio de absorbancia es de 0'2816 siendo la desviación estándar  $3'73 \times 10^{-3}$ , lo que supone una desviación estándar relativa de 1'3%.

Tabla III.7.- Repetibilidad del método.

Disolución nº	A (muestra)	Disolución nº	A (muestra)
1	0'2832	6	0'2871
2	0'2816	7	0'2861
3	0'2795	8	0'2831
4	0'2738	9	0'2800
5	0'2801	10	0'2815

#### b) Repetibilidad del método a partir de los datos del calibrado.

En la tabla IV.10 se muestran los valores calculados a partir de la función de calibrado previamente establecida en el apartado 3.1.

Tabla III.8.- Parámetros estadísticos.

[CM] ( $\mu\text{g/l}$ )	$s_c$	D.E.R (%)
50	0'86	1'7
100	0'84	0'8
250	0'83	0'3
500	0'92	0'2
650	1'00	0'2

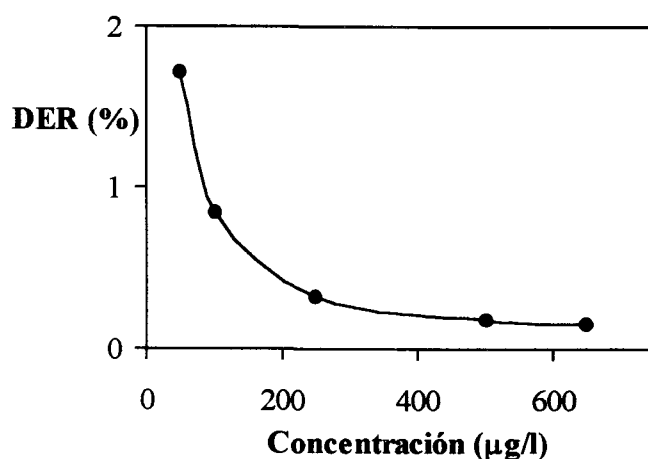


Figura III.12.- Repetibilidad en función de la concentración de CM.

En la figura III.12 se observa, como era de esperar, que a medida que aumenta la concentración de CM analizada, la desviación estándar relativa se hace cada vez menor, ya que dividimos un valor constante de desviación estándar entre un valor de concentración cada vez mayor. La diferencia observada en la repetibilidad para 250  $\mu\text{g/l}$  al aplicar el procedimiento a una muestra dada (1'3%) y al obtenerla a partir de los datos del calibrado (0'3%) puede ser debida a que el número de réplicas medidas en el primer caso es de diez, y en el segundo caso es de tres.

### 3.2- Establecimiento de la ley de Lambert-Beer y parámetros de fiabilidad para el 1-naftilazo-1-naftol.

Como ya se comentó en la Introducción de esta Memoria, una de las ventajas de la espectrofotometría en fase sólida es la posibilidad de aumentar la sensibilidad y reducir el límite de detección del método, aumentando el volumen de disolución empleado, siempre dentro de unos márgenes determinados. En el caso de este analito, debido a las razones anteriormente comentadas, se propone el método para 100 y 500 ml, comparando posteriormente la sensibilidad de ambos métodos.

#### 3.2.1.- Método para 100 ml.

En las condiciones operatorias anteriormente establecidas para este analito, se establece la relación absorbancia-concentración, preparando una serie de disoluciones, todas ellas por triplicado, cuyas concentraciones de analito están comprendidas entre 30 y 100  $\mu\text{g/l}$ , siguiendo el procedimiento operatorio establecido. Los datos se recogen en la tabla III.9.

Tabla III.9.- Cumplimiento de la ley de Lambert-Beer para un volumen de 100 ml del NN.

[NN] ( $\mu\text{g/l}$ )	A		
	1ª Serie	2ª Serie	3ª Serie
30	0'0136	0'0114	0'0193
50	0'0325	0'0313	0'0356
60	0'0412	0'0431	0'0428
80	0'0628	0'0712	0'0639
100	0'0760	0'0798	0'0750

No se toman valores de concentración superiores a 100  $\mu\text{g/l}$ , a pesar de que este valor es aún relativamente bajo para ser la concentración superior, debido a que las



concentraciones superiores ensayadas presentan una pendiente diferente a la que presenta este tramo inferior, esto se puede deber a fenómenos de absorción sobre la superficie del gel.

La representación gráfica de estos datos se recoge en la figura III.13, donde se puede observar una relación lineal entre ambas variables. Para verificar la linealidad se aplica el ANOVA en el rango de concentración de 30 a 100  $\mu\text{g/l}$ , mediante el test de fallo de ajuste, comprobando que no hay curvatura ( $P = 7,99\%$ ) y en consecuencia hay un buen ajuste lineal. La representación de los residuales (figura III.14) pone de manifiesto una distribución aleatoria de los mismos que implica que se cumple la condición de homoscedasticidad.

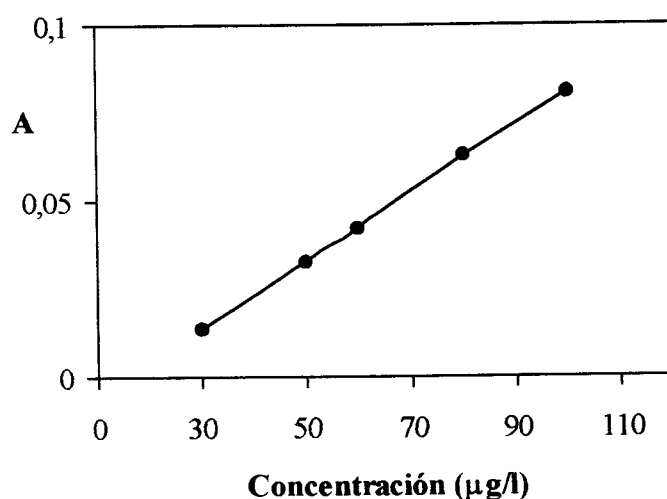


Figura III.13.- Cumplimiento de la ley de Lambert-Beer para un volumen final de 100 ml de NN.

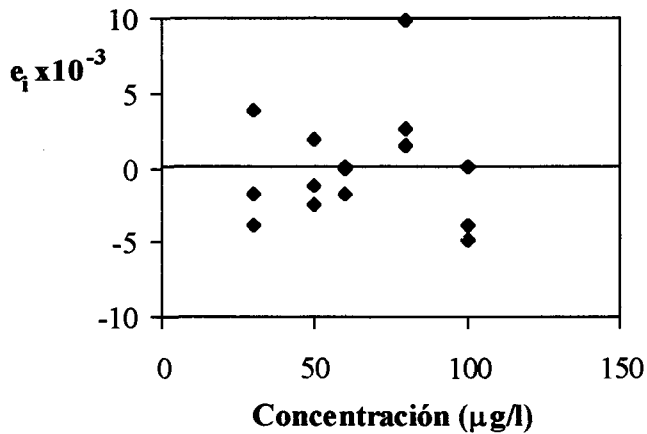


Figura III.14.- Representación de los residuales frente a la concentración de NN.

Tabla III.10.- Resultados del ANOVA en el rango de concentraciones 30 a 100 µg/l.

Fuente	SM <sup>1</sup>	g.l	MC <sup>2</sup>	F <sub>exp</sub>	P (%)
Modelo	7'43x10 <sup>-3</sup>	1	7'43x10 <sup>-3</sup>	5'06x10 <sup>2</sup>	0'00
Residuales	1'91x10 <sup>-4</sup>	13	1'50x10 <sup>-5</sup>		
Fallo de ajuste	9'08x10 <sup>-5</sup>	3	3'03x10 <sup>-5</sup>	3'03	7'99
Error puro	9'98x10 <sup>-5</sup>	10	1'00x10 <sup>-5</sup>		

(1) Suma de cuadrados; (2) Media de cuadrados.

Una vez comprobada la homoscedasticidad y asumiendo el cumplimiento del resto de las hipótesis matemáticas del modelo matemático (normalidad, aleatoriedad e independencia) se establece la función de calibrado:  $A = -0'01 + 9'21 \cdot 10^{-4} \cdot [NN]$ , cuyos parámetros estadísticos se muestran en la tabla III.11.

Tabla III.11.-Parámetros estadísticos.

Parámetros	Valor
$s_{R,C}$	$3'83 \times 10^{-3}$
$r^2$ (%)	98'74
$s_b$	$4'09 \times 10^{-5}$
$s_a$	$2'79 \times 10^{-3}$

**Linealidad**

$$\text{Lin (\%)} = [1 - \text{D.E.R. (b)}] \cdot 100 = 95'56 \%$$

**Sensibilidad**

a) La sensibilidad de calibrado:  $S_{\text{cal.}} = b = 9'21 \times 10^{-4} (\mu\text{g/l})^{-1}$ .

b) La sensibilidad analítica:  $S_{\text{anal.}} = (s_{R,C}/b) = 4'16 \mu\text{g/l}$ .

**Límite de detección y límite de cuantificación**

Siguiendo el procedimiento operatorio propuesto para las disoluciones del blanco, se obtienen los resultados recogidos en la tabla III.12, de la que se calcula un valor medio de  $5'0 \times 10^{-3}$  y una desviación estándar de  $2'43 \times 10^{-3}$ .

Tabla III.12.-Repetibilidad del blanco

Disolución nº	A (blanco)	Disolución nº	A (blanco)
1	0'0020	6	0'0050
2	0'0071	7	0'0095
3	0'0041	8	0'0030
4	0'0081	9	0'0032
5	0'0040	10	0'0040

Los límites de detección y de cuantificación son 7'9  $\mu\text{g/l}$  y 26'4  $\mu\text{g/l}$  respectivamente.

### Rango dinámico lineal

El intervalo de aplicación del método está comprendido entre el límite inferior, que es el límite de cuantificación, 26'4  $\mu\text{g/l}$  y el límite superior, determinado por el valor superior de concentración que está dentro del intervalo lineal especificado por el test de fallo de ajuste y que es 100  $\mu\text{g/l}$ .

$$\text{R.D.L.} = 0.1 (\text{Lim}_{\text{sup}}/\text{Lim}_{\text{inf}}) = 0'38 \mu\text{g/l}.$$

El intervalo lineal estaba comprendido entre 27  $\mu\text{g/l}$  y 100  $\mu\text{g/l}$ .

### 3.2.2.- Método para 500 ml.

Para establecer el método para un volumen de equilibración de 500 ml, es necesario volver a optimizar el tiempo de equilibración. Para ello se preparan disoluciones conteniendo cada una de ellas 100  $\mu\text{g/l}$  de NN, 25 ml de disolución de HCl 1 M, 10% etanol y aplicamos el método operatorio establecido, obteniendo los resultados que se reflejan la figura III.15.

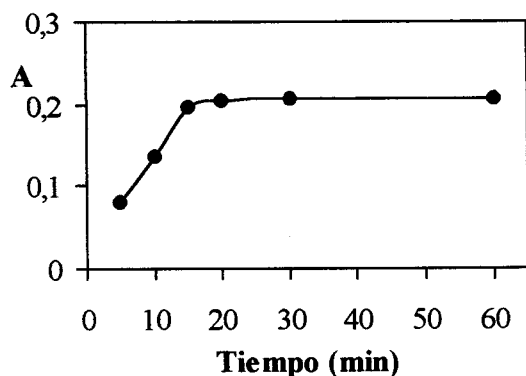


Figura III.15.- Tiempo de equilibración para 500 ml.

Un tiempo de 20 minutos se considera suficiente para obtener una señal máxima y estable.

### Cumplimiento de la ley de Lambert-Beer para 500 ml.

Para establecer la relación absorbancia-concentración se preparan una serie de disoluciones, todas ellas por triplicado, conteniendo concentraciones de analito comprendidas entre 10 y 100  $\mu\text{g/l}$ , a las que se agrega 25 ml de disolución de HCl 1 M y un 10% de etanol y se enrasa hasta un volumen de 500 ml con agua desionizada. Aplicando el procedimiento establecido se obtienen los datos recogidos en la tabla III.13.

No se consideran concentraciones superiores a 100  $\mu\text{g/l}$ , a pesar de que este valor es aún relativamente bajo para ser la concentración superior, debido a que las concentraciones superiores ensayadas presentan una pendiente diferente a la que presenta este tramo inferior, como hemos comentado en páginas anteriores. La representación gráfica de estos datos se recoge en la figura III.16, donde se puede observar una relación lineal entre ambas variables.

Tabla III.13.- Cumplimiento de la ley de Lambert-Beer para un volumen de 500 ml del NN.

[NN] ( $\mu\text{g/l}$ )	A		
	1ª Serie	2ª Serie	3ª Serie
10	0'0536	0'0450	0'0538
30	0'0855	0'0913	0'0876
50	0'1211	0'1228	0'1125
80	0'1733	0'1861	0'1772
100	0'2315	0'2104	0'2150

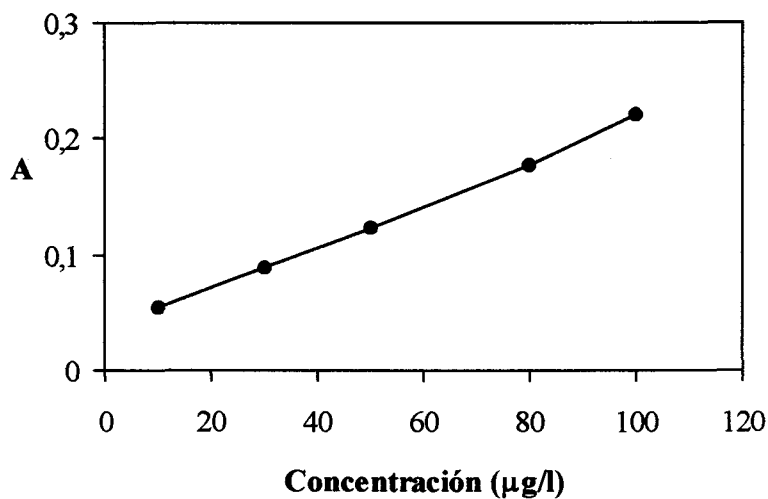


Figura III.16.- Cumplimiento de la ley de Lambert-Beer para un volumen final de 500 ml de NN.

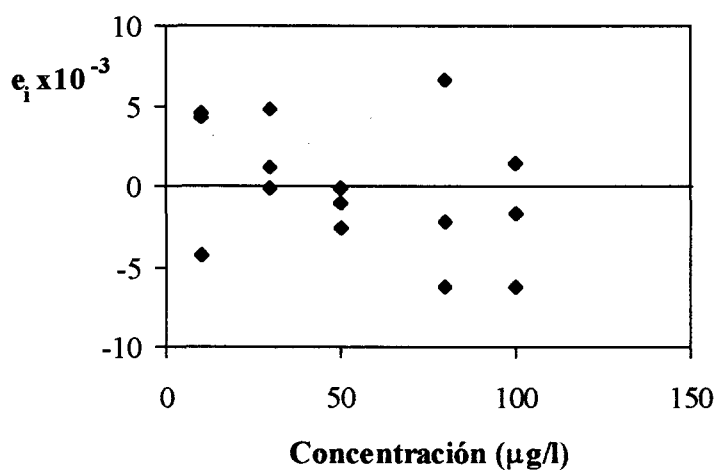


Figura III.17.- Representación de los residuales frente a la concentración de NN.

Para verificar la linealidad se realiza un ANOVA en el rango de concentración de 10 a 100  $\mu\text{g/l}$ , mediante el test de fallo de ajuste, comprobando que no hay curvatura ( $P = 54,77\%$ ) y en consecuencia hay un buen ajuste lineal. La representación de

los residuales (figura III.17) pone de manifiesto una distribución aleatoria de los mismos que implica que se cumple la condición de homoscedasticidad.

Tabla III.14.- Resultados del ANOVA en el rango de concentraciones 10 a 100 µg/l.

Fuente	SM <sup>1</sup>	g.l	MC <sup>2</sup>	F <sub>exp</sub>	P (%)
Modelo	5'52x10 <sup>-2</sup>	1	5'52x10 <sup>-2</sup>	1'27x10 <sup>3</sup>	0'00
Residuales	5'61x10 <sup>-4</sup>	13	4'30x10 <sup>-5</sup>		
Fallo de ajuste	1'03x10 <sup>-4</sup>	3	3'43x10 <sup>-5</sup>	0'75	54'77
Error puro	4'58x10 <sup>-4</sup>	10	4'58x10 <sup>-5</sup>		

(1) Suma de cuadrados; (2) Media de cuadrados.

Una vez comprobada la homoscedasticidad y asumiendo el cumplimiento del resto de las hipótesis matemáticas del modelo de mínimos cuadrados (normalidad, aleatoriedad e independencia) se establece la función de calibrado:  $A = 0'03 + 1'86 \cdot 10^{-3} \cdot [NN]$ , cuyos parámetros estadísticos se muestran en la tabla III.19.

Tabla III.15.-Parámetros estadísticos

Parámetros	Valor
s <sub>R,C</sub>	6'57x10 <sup>-3</sup>
r <sup>2</sup> (%)	98'99
s <sub>b</sub>	5'20x10 <sup>-5</sup>
s <sub>a</sub>	3'28x10 <sup>-3</sup>

**Linealidad**

$$\text{Lin (\%)} = [1 - \text{D.E.R. (b)}] \cdot 100 = 97'20 \%$$

### Sensibilidad

a) La sensibilidad de calibrado:  $S_{cal} = b = 1'86 \times 10^{-3} (\mu\text{g/l})^{-1}$ .

b) La sensibilidad analítica:  $S_{anal} = (s_{R,C}/b) = 3'56 \mu\text{g/l}$ .

### Límite de detección y límite de cuantificación

Siguiendo el procedimiento operatorio propuesto para las disoluciones del blanco, se obtienen los resultados recogidos en la tabla III.20, de la que se calcula un valor medio de  $3'6 \times 10^{-3}$  y una desviación estándar de  $5'60 \times 10^{-4}$ . Los límites de detección y de cuantificación son  $0'9 \mu\text{g/l}$  y  $3'01 \mu\text{g/l}$  respectivamente.

Tabla III.16.-Repetibilidad del blanco

Disolución nº	A (blanco)	Disolución nº	A (blanco)
1	0'0031	6	0'0048
2	0'0038	7	0'0034
3	0'0034	8	0'0039
4	0'0038	9	0'0038
5	0'0037	10	0'0037

### Rango dinámico lineal

El intervalo de aplicación del método esta comprendido entre el límite inferior, que es el límite de cuantificación,  $3'01 \mu\text{g/l}$  y el límite superior, determinado por el valor superior de concentración que está dentro del intervalo lineal especificado por el test de fallo de ajuste y que es  $100 \mu\text{g/l}$ .

$$\text{R.D.L.} = 0.1 (\text{Lim}_{sup}/\text{Lim}_{inf}) = 3'32 \mu\text{g/l}.$$

El intervalo de aplicación lineal está comprendido entre  $3$  y  $100 \mu\text{g/l}$ .



Si estudiamos comparativamente los resultados que se acaban de exponer, queda claro que se produce un aumento de la sensibilidad cuando se incrementa el volumen de la muestra para una misma cantidad de gel. En la tabla III.17 se reúnen comparativamente todos los resultados. Estos resultados ponen de manifiesto que al aumentar el volumen aumenta la sensibilidad por lo que para la aplicación del método a muestras reales tomaremos un volumen de 500 ml para ese analito, ya que la sensibilidad del método tomando 100 ml no es suficiente en estos casos. A partir de ahora seguiremos exponiendo el resto de los parámetros analíticos para el método seleccionado, 500 ml.

**Tabla III.17.- Comparación de la sensibilidad para NN en los dos volúmenes.**

Parámetro	100 ml	500 ml
$A = a + b$ [NN]	$A = -0'01 + 9'21 \times 10^{-4}$ [NN]	$A = 0'03 + 1'86 \times 10^{-3}$ [NN]
Intervalo lineal ( $\mu\text{g/l}$ )	27-100	3-100
LD ( $\mu\text{g/l}$ )	7'9	0'9
LQ ( $\mu\text{g/l}$ )	26'4	3'01
$S_{\text{analítica}}$ ( $\mu\text{g/l}$ )	4'15	3'53
$S_{\text{calibrado}}$ ( $\mu\text{g/l}$ ) <sup>-1</sup>	$9'21 \times 10^{-4}$	$1'86 \times 10^{-3}$

### Precisión

Como en casos anteriores la precisión se evaluó mediante las dos formas establecidas en el capítulo I, obteniéndose los siguientes resultados:

#### a) Repetibilidad del método propuesto aplicado a una muestra dada.

Se preparan 10 disoluciones correspondientes a una concentración de 50  $\mu\text{g/l}$  que es un valor intermedio del rango dinámico lineal anteriormente establecido, siguiendo la metodología de trabajo establecida se obtienen los resultados recogidos en la tabla III.18, de donde se estima la reproducibilidad del método. Los parámetros estadísticos obtenidos son 0'1136 de valor medio de absorbancia y la desviación estándar tiene un valor de  $9'93 \times 10^{-3}$ , lo que supone una desviación estándar relativa de 8'75%.

Tabla III.18- Repetibilidad del método.

Disolución n°	A (muestra)	Disolución n°	A (muestra)
1	0'1024	6	0'1126
2	0'1131	7	0'1131
3	0'1245	8	0'1014
4	0'1228	9	0'0990
5	0'1234	10	0'1236

**b) Repetibilidad del método a partir de los datos del calibrado.**

En la tabla III.19 se muestran los valores calculados a partir de la función de calibrado previamente establecida en el apartado 3.2. En ella se observa, que a medida que la concentración de CM analizada aumenta, la desviación estándar relativa se hace cada vez menor, ya que se está dividiendo cada vez entre un valor mayor de concentración.

Tabla III.19.- Parámetros estadísticos.

[NN] ( $\mu\text{g/l}$ )	$s_c$	D.E.R (%)
10	2'54	25'4
30	2'32	7'7
50	2'24	4'5
80	2'34	2'9
100	2'29	2'6

Existe una diferencia en la repetibilidad obtenida a partir de réplicas de 50  $\mu\text{g/l}$  (8'7%) y la obtenida a partir de los datos del calibrado (4'5%). La causa de esta diferencia podría deberse como en casos anteriores, al distinto número de réplicas realizadas en ambos casos.

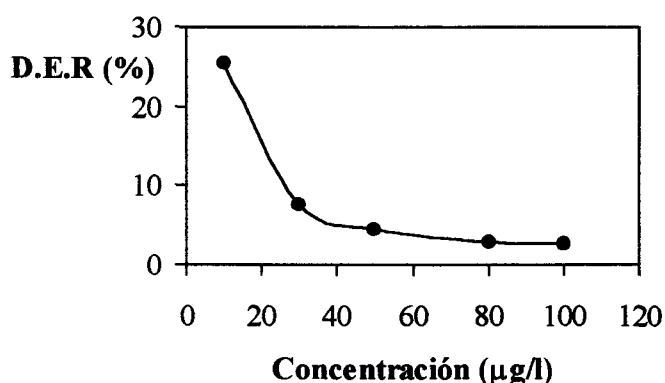


Figura III.18.- Repetibilidad en función de la concentración de CM.

**4.- Resumen de los parámetros de fiabilidad de ambos métodos.**

Tabla III.20.- Resumen de los parámetros analíticos.

Parámetros	CM (100 ml)	NN (500 ml)
R.D.L.(µg/l)	5'77	3'32
Linealidad (%)	99'85	97'20
Sensibilidad calibrado (µg/l) <sup>-1</sup>	1'169x10 <sup>-3</sup>	1'86x10 <sup>-3</sup>
Sensibilidad analítica (µg/l)	1'28	3'53
LD (µg/l)	3'44	0'90
LQ (µg/l)	11'46	3'01

**5.- Verificación de la independencia de las señales analíticas.**

Dado que el método se va a aplicar a muestras donde se encuentran ambos analitos, se hace necesario demostrar que la presencia de uno no influye en los resultados del otro. Por ello se hizo una experiencia en la que se efectuaron distintos calibrados para cada

analito en presencia de una cantidad constante del otro, todo ello operando de acuerdo con el método propuesto. El calibrado se realiza entre 50 y 650  $\mu\text{g/l}$  para CM y entre 10 y 100  $\mu\text{g/l}$  para NN.

Las pendientes de cada serie de las funciones de calibrado establecidas se compararon con la obtenida únicamente con patrones, según la metodología recogida en el capítulo II. Como conclusión se puede señalar que la presencia de NN en concentraciones comprendidas entre 0 y 100  $\mu\text{g/l}$  no afectan a la función de calibrado de CM. Igualmente la presencia de concentraciones de CM comprendidas entre 0 y 500  $\mu\text{g/l}$  tampoco afectan a la función de calibrado de NN.

**Tabla III.21.-** Funciones de calibración de CM y NN en ausencia y presencia de NN y CM respectivamente.

Analito	Interferente	concentración ( $\mu\text{g/l}$ )	Pendiente	Ordenada	P (%)
CM	NN	0'0	$1'15 \times 10^{-3}$	$-4'66 \times 10^{-3}$	16'22
		30'0	$1'15 \times 10^{-3}$	$-1'18 \times 10^{-2}$	66'33
		50'0	$1'14 \times 10^{-3}$	$-9'53 \times 10^{-3}$	45'96
		100'0	$1'10 \times 10^{-3}$	$6'00 \times 10^{-3}$	27'05
NN	CM	0'0	$1'86 \times 10^{-3}$	$1'0 \times 10^{-2}$	99'92
		50'0	$1'86 \times 10^{-3}$	$3'4 \times 10^{-2}$	95'61
		200'0	$1'47 \times 10^{-3}$	$3'6 \times 10^{-2}$	13'20
		500'0	$1'79 \times 10^{-3}$	$7'8 \times 10^{-2}$	51'36

Se comprueba que no hay diferencia significativa entre las pendientes de las correspondientes funciones de calibrado comparadas, ya que en todos los casos al aplicar el test correspondiente descrito en el capítulo I, se obtiene un valor de P superior al 1 %.

## 6.- Aplicaciones Analíticas.

Para comprobar la utilidad del método propuesto, se aplicó a la determinación de ambos colorantes en las muestras: colorante Carmoisina de Sancolor S.A., colorante alimentario Vahiné, caramelo sabor fresa mentolada Pectol y gominola de color rojo Mauri.

El procedimiento seguido para determinar la cantidad de los colorantes en las muestras es el de adición de patrón y se validó la exactitud del método usando la metodología propuesta por este Departamento<sup>II.18</sup>.

### 6.1.- Validación del método y aplicación al análisis de muestras reales.

En primer lugar vamos a determinar el contenido de CM en todas las muestras, para ello se establece un calibrado con adición de patrón (CA) añadiendo en todos los matraces 100µg/l del colorante carmoisina de Sancolor S.A.. En el caso de la muestra del colorante alimentario Vahiné, como la concentración es muy elevada se prepara una disolución intermedia diluyendo 10<sup>3</sup> veces la inicial y de ella tomamos 0'1 ml para establecer el calibrado con adición de patrón. Para el caramelo de fresa Pectol se toma una porción de la muestra de 3'685gramos y se disuelve en 5 ml de agua de ósmosis inversa, esta disolución se emplea para establecer el calibrado con adición de patrón , añadiendo en todos los matraces 1 ml de esta disolución y cantidades crecientes de CM. Por último para establecer el calibrado con adición de patrón para la gominola Mauri se toma una cantidad de muestra cuyo peso es de 5'554 gramos y se disuelve en un volumen de 10 ml de agua de ósmosis inverso, utilizando un horno de microondas para que el proceso sea más rápido, de esta disolución se toman 0,1 ml. Posteriormente en todos los casos se aplica el método operatorio establecido.

Para el establecimiento del calibrado de Youden (CY) en las distintas muestras analizadas se toman los siguientes volúmenes: entre 0'5 y 5 ml para el colorante Carmoisina de Sancolor S.A., entre 0'1 y 1 ml para el colorante alimentario Vahiné, para la determinación del calibrado de Youden en en el caramelo de fresa mentolada Pectol se prepara una nueva disolución tomando 3 piezas del producto de 3'616, 3'655 y 3'631 gramos y cada una se disuelve en 5 ml de agua de ósmosis inverso, para tomar entre 1 y 7 ml, para la gominola Mauri se toman de la misma disolución preparada para establecer el

calibrado con adición de patrón entre 0'1 y 1 ml. En todos los casos se enrasa hasta un volumen final de 100 ml con agua de ósmosis inversa y se aplica el proceso operatorio establecido.

**Tabla III.22.-** Resultados obtenidos en el CA y CY para Carmoisina de Sancolor S.A y para el colorante alimentario Vahiné.

Carmoisina de Sancolor S.A				Colorante alimentario Vahiné			
CA		CY		CA		CY	
[CM] (µg/l)	A	V (ml)	A	[CM] (µg/l)	A	V (ml)	A
0	0'1062	0'005	0'0524	0	0'0992	0'001	0'0987
50	0'1704	0'010	0'1012	50	0'1560	0'002	0'2004
100	0'2278	0'020	0'2448	100	0'2100	0'005	0'4969
200	0'3437	0'050	0'5692	300	0'4441	0'010	0'9861

**Tabla III.23.-** Resultados obtenidos en el CA y CY para el caramelo con sabor a fresa mentolada Pectol y para la gominola Mauri.

Caramelo Pectol				Gominola Mauri			
CA		CY		CA		CY	
[CM] (µg/l)	A	V (ml)	A	[CM] (µg/l)	A	V (ml)	A
0	0'0842	0'01	0'0844	0	0'0693	0'001	0'0687
50	0'1425	0'03	0'2642	50	0'1314	0'005	0'2870
200	0'3148	0'05	0'4552	200	0'3000	0'008	0'4463
400	0'5486	0'07	0'6348	400	0'5337	0'010	0'5462

Tabla III.24.- Resultados estadísticos obtenidos en la determinación de CM de Sancolor S.A.

Parámetros	CP	CA	CY
n	15	4	4
a	-0'01	0'1129	-3'38x10 <sup>-3</sup>
b	1'169x10 <sup>-3</sup>	1'15x10 <sup>-3</sup>	11'54
s <sub>R,c</sub>	1'50x10 <sup>-3</sup>	3'94x10 <sup>-3</sup>	1'48x10 <sup>-2</sup>
s <sub>p</sub> t (b)	1'40x10 <sup>-3</sup>		
b <sub>p</sub>	1'7 (P = 9'72 %)		
a'	-0'0096	0'1115	-----
BY	-----	-----	-0'0129
c <sub>x,S</sub>	99'8	-----	-----
c <sub>x,A</sub>	-----	98'4	-----
t (c)	2'02 (P = 6'04 %)		

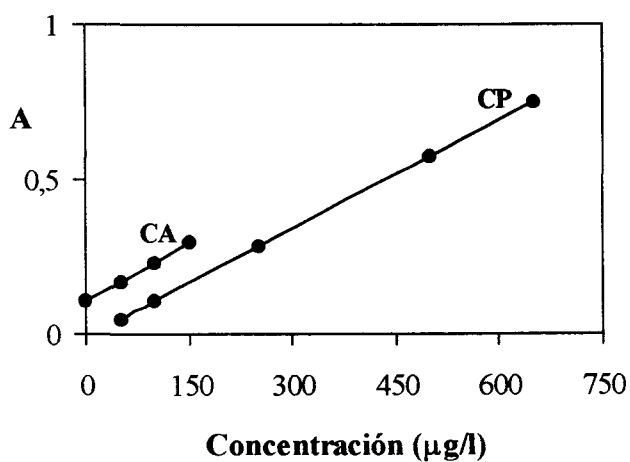


Figura III.19 .- CP y CA para la determinación de CM en la muestra de Sancolor S.A.

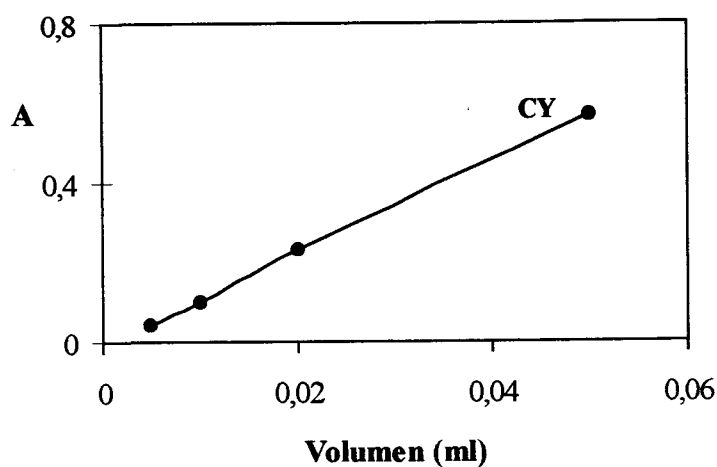


Figura III.20.- Calibrado de Youden (CY) para la determinación de CM en la muestra de Sancolor S.A.

Tabla III.25.- Resultados estadísticos obtenidos en la validación del método para CM en el colorante alimentario Vahiné

Parámetros	CP	CA	CY
n	15	4	4
a	-0'01	0'097	2'36
b	1'169x10 <sup>-3</sup>	1'15x10 <sup>-3</sup>	98'48
s <sub>R,c</sub>	1'50x10 <sup>-3</sup>	2'44x10 <sup>-3</sup>	2'39x10 <sup>-3</sup>
s <sub>p</sub>	1'74x10 <sup>-3</sup>		
t (b)	1'27 (P = 22'26 %)		
b <sub>p</sub>	1'16x10 <sup>-3</sup>		
a'	-0'0072	0'0968	-----
BY	-----	-----	2'3672
c <sub>x,s</sub>	83'3	-----	-----
c <sub>x,A</sub>	-----	81'6	-----
t (c)	0'17 (P = 86'70 %)		



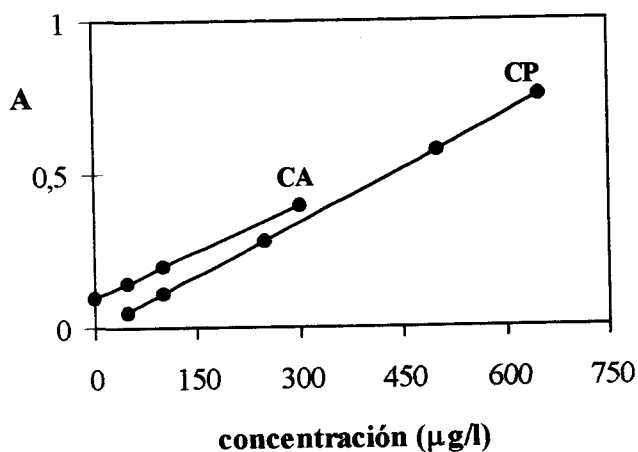


Figura III. 21- Calibrado con patrones (CP) y calibrado con adición de patrón (CA) para la determinación de CM en el colorante Vahiné.

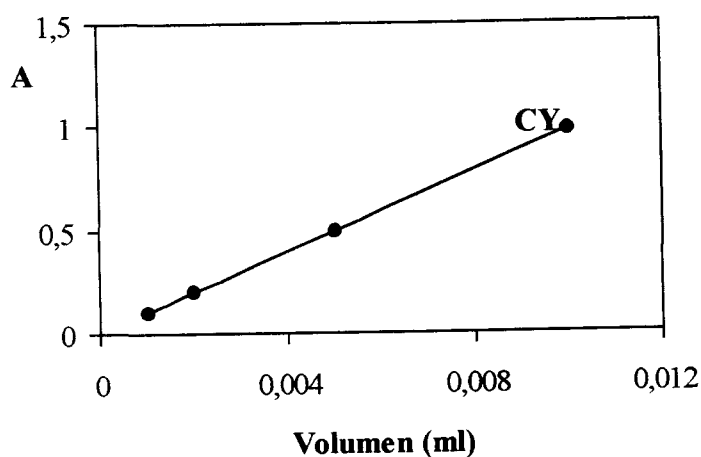


Figura III.22.- Calibrado de Youden (CY) para la determinación de CM en el colorante alimentario Vahiné.

Tabla III.26.- Resultados estadísticos obtenidos en la determinación de CM en el Caramelo Pectol.

Parámetros	CP	CA	CY
n	15	4	4
a	-0'01	0'084	-8'79x10 <sup>-3</sup>
b	1'169x10 <sup>-3</sup>	1'16x10 <sup>-3</sup>	9'211
s <sub>R,c</sub>	1'50x10 <sup>-3</sup>	1'02x10 <sup>-3</sup>	3'57x10 <sup>-3</sup>
s <sub>p</sub>	1'44x10 <sup>-3</sup>		
t (b)	1'84 (P = 8'56 %)		
b <sub>p</sub>	1'17x10 <sup>-3</sup>		
a <sup>2</sup>	-0'0103	0'0824	-----
BY	-----	-----	0'0015
c <sub>x,S</sub>	79'40	-----	-----
c <sub>x,A</sub>	-----	77'93	-----
t (c)	2'10 (P = 5'24 %)		

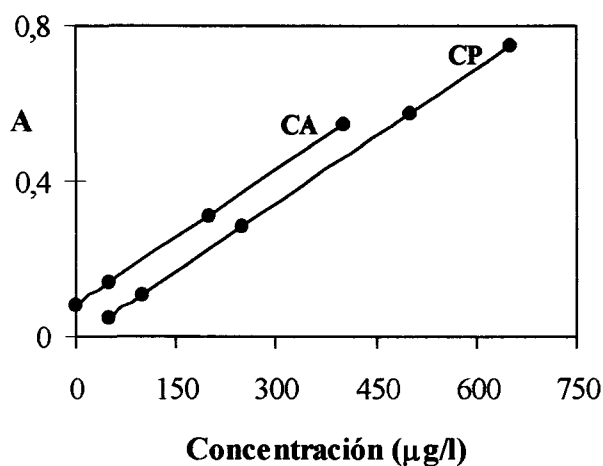


Figura III.23.- CP y CA para la determinación de CM en el caramelo Pectol.

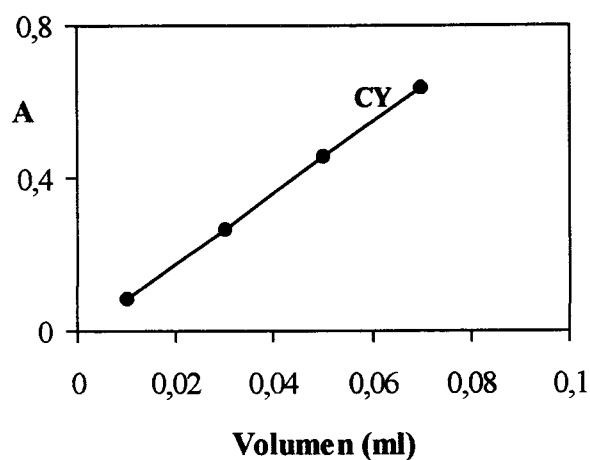


Figura III. 24.- Calibrado de Youden (CY) para la determinación de la cantidad de CM en el caramelo Pectol.

Tabla IV.27.- Resultados estadísticos obtenidos en la determinación de CM en la gominola Mauri.

Parámetros	CP	CA	CY
n	15	4	4
a	-0'01	0'072	0'043
b	1'169x10 <sup>-3</sup>	1'155x10 <sup>-3</sup>	48'85
sR,c	1'50x10 <sup>-3</sup>	2'67x10 <sup>-3</sup>	0'1010
s <sub>p</sub>	1'7x10 <sup>-3</sup>		
t (b)	1'79 (P = 9'33 %)		
b <sub>p</sub>	1'167x10 <sup>-3</sup>		
a'	-0'0093	0'0689	-----
BY	-----	-----	0'0523
c <sub>x,s</sub>	22'53	-----	-----
c <sub>x,A</sub>	-----	22'19	-----
t (c)	0'41 (P = 68'72 %)		

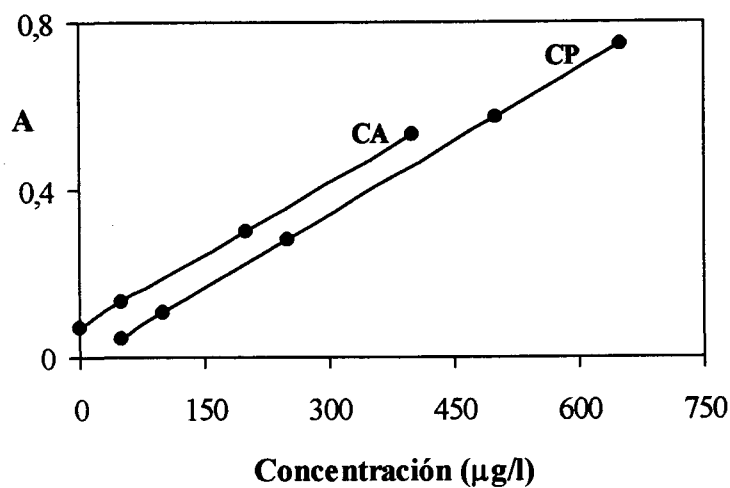


Figura III.24.- CP y CA para la determinación de CM en la gominola Mauri.

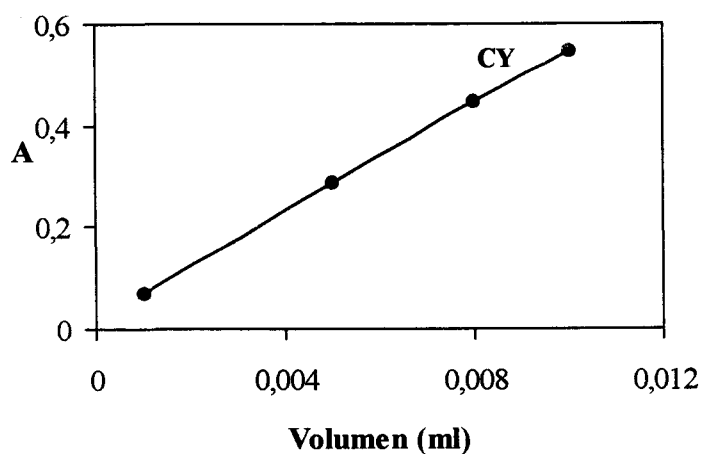


Figura III.25.- Calibrado de Youden (CY) para la determinación de la cantidad de CM en la mora Mauri.

Trás aplicar la metodología se comprueba que las varianzas de ambos calibrados no se diferencian significativamente para ninguna de las muestras estudiadas, como lo pone de manifiesto el valor de P que en todos los casos es superior al 5% ( 6'60%, 30'80%, 35'93

% y 26'58% respectivamente), por lo que se concluye que las varianzas son iguales. Lo mismo ocurre con la pendiente, ya que al compararlas tampoco se obtienen diferencias significativas entre ellas en todos los casos, ( $P > 1\%$ ), concluimos que no hay diferencias significativas entre las pendientes del calibrado con patrones y las del calibrado con adición de patrón para ninguna de las muestras.

En la determinación de CM en el colorante Carmoisina de Sancolor S.A, en el caramelo de fresa mentolada Pectol y en la gominola Mauri, el valor de la ordenada en el origen del calibrado de Youden,  $a_y$ , no está incluido en el intervalo calculado para el nuevo valor de la ordenada en el origen del calibrado con patrones, por lo tanto en estos casos existe componente de error sistemático, que eliminaremos restando el blanco de Youden a la señal obtenida. En el colorante alimentario Vahiné el valor de  $a_y$  si está incluida en el intervalo, por lo que podemos suponer que no hay componente de error sistemático. En todas las muestras al comparar el contenido de CM en la disolución problema calculado a partir del calibrado con patrones ( $c_{x,s}$ ) y el contenido a partir del calibrado con adición de patrón ( $c_{x,A}$ ), se encuentra que no hay diferencias significativas entre ambos, por lo que se concluye que el método es exacto para la determinación de CM en las muestras estudiadas.

#### Análisis de las muestras.

Una vez validado el método, se procede a la determinación directa del contenido de CM en las muestras aplicando a cada una de ellas el método operatorio establecido. Del análisis de cada muestra se realizan tres réplicas, obteniéndose los resultados que podemos ver en las tablas III.28 y 29.

**Tabla III.28.-** Contenido de CM en el colorante alimentario de Sancolor S.A y en el colorante alimentario Vahiné.

Serie n°	Carmoisina Sancolor S.A		Colorante alimentario Vahiné	
	A	c(µg/l)	A	c(µg/l)
1	0'1161	98'88	0'0999	84'08
2	0'1179	103'84	0'1100	92'79
3	0'1178	100'33	0'0997	83'91

**Tabla III.29.-** Contenido de CM en el caramelo con sabor a fresa mentolada Pectol y en la gominola Mauri.

Serie n°	Caramelo Pectol		Gominola Mauri	
	A	c(µg/l)	A	c(µg/l)
1	0'0840	79'31	0'0632	17'31
2	0'0820	77'80	0'0641	18'08
3	0'0870	81'87	0'0639	17'90

La desviación estándar relativa es: 2'52% para Carmoisina de Sancolor S.A, 5'84% para el colorante alimentario Vahiné, 2'69% para el caramelo Pectol y de 2'28% para la gominola Mauri.

En el colorante Carmoisina de Sancolor S.A, el valor medio de concentración para la muestra es de 101'1 µg/l. Como la cantidad de muestra que se adicionó de la muestra fué de 100 µg/l y la pureza indicada por el fabricante es del 85%, podemos establecer que la pureza del producto según nuestro método es del 85'8%. Al comparar estadísticamente este valor con el suministrado por el fabricante, para un nivel de confianza del 95'5%, podemos concluir que no hay diferencias significativas entre el dato de pureza suministrado por el fabricante y el encontrado por nosotros ( $P = 57'56\%$ ). El contenido de CM para las restantes muestras fué: 10'80 µg/g en el caramelo de fresa Pectol; 31,98 µg/g en la gominola Mauri y 8'7 g/l en el colorante alimentario Vahiné, valor este muy alto debido a que dicho producto comercial está compuesto de CM y agua, se vende en envases de 6 ml y cada uno de ellos puede servir para 20 aplicaciones.

### 6.2.- Validación del método. Determinación de 1-naftil-azo-1-naftol y aplicación a muestras reales.

Para aplicar la metodología establecida, igual que en el caso anterior, es necesario establecer un calibrado con adición de patrón. Para ello se añade en todos los matraces una cantidad fija de 200 µg/l de la muestra de Carmoisina de Sancolor S.A., 1 ml de la disolución descrita en el apartado anterior del colorante alimentario Vahiné, 4 ml de la disolución anteriormente descrita para el caramelo de fresa mentolada Pectol y 7 ml de

distintas disoluciones de la gominola Mauri, preparadas tomando varias piezas del producto de 5'554, 5'610 y 5'461 gramos disueltas en 10 ml de agua de ósmosis inversa cada una de ellas.

Los calibrados de Youden se establecen añadiendo volúmenes de muestra entre 1 y 5 ml en el caso del colorante Carmoisina de Sancolor S.A., entre 1 y 10 ml para el colorante alimentario Vahiné, entre 2 y 10 ml para el caramelo de fresa mentolada Pectol y entre 0'1 y 1 ml para la gominola Mauri. En todos los casos se enrasa con agua de ósmosis inversa hasta un volumen final de 500 ml y posteriormente se aplica el método operatorio establecido para la determinación de NN. Los resultados se recogen en las tablas III.30 y 31.

**Tabla III.30.-** Resultados obtenidos en el CA y CY para NN en la muestra de carmoisina de Sancolor S.A y en la del colorante alimentario Vahiné.

Carmoisina de Sancolor S.A				Colorante alimentario Vahiné			
CA		CY		CA		CY	
[NN] ( $\mu\text{g/l}$ )	A	V (ml)	A	[NN] ( $\mu\text{g/l}$ )	A	V (ml)	A
0	0'0212	0'002	0'0208	0	0'1713	0'002	0'1700
30	0'0900	0'004	0'0387	30	0'2232	0'005	0'2075
50	0'1225	0'006	0'0631	50	0'2731	0'010	0'3504
80	0'1731	0'010	0'0967	80	0'3116	0'020	0'4959

**Tabla III.31.-** Resultados obtenidos en el CA y CY para NN en la muestra del caramelo de fresa mentolada Pectol y en la gominola Mauri.

Caramelo Pectol				Gominola Mauri			
CA		CY		CA		CY	
[NN] ( $\mu\text{g/l}$ )	A	V (ml)	A	[NN] ( $\mu\text{g/l}$ )	A	V (ml)	A
0	0'0351	0'004	0'0441	0	0'0503	0'014	0'0397
30	0'0870	0'010	0'0786	30	0'1058	0'018	0'0416
50	0'1044	0'014	0'1015	50	0'1400	0'020	0'0425
80	0'1416	0'020	0'1361	80	0'1998	0'030	0'0451

**Tabla III.32.-** Resultados estadísticos obtenidos en la determinación de NN de Sancolor S.A.

Parámetros	CP	CA	CY
n	15	4	4
a	0'03	0'0263	$2'05 \times 10^{-3}$
b	$1'86 \times 10^{-3}$	$1'88 \times 10^{-3}$	9'59
$s_{R,c}$	$6'57 \times 10^{-3}$	$6'96 \times 10^{-3}$	$2'91 \times 10^{-3}$
$s_p$	$6'62 \times 10^{-3}$		
t (b)	0'16 (P = 87'50 %)		
$b_p$	$1'88 \times 10^{-3}$		
a'	0'0296	0'0312	-----
BY	-----	-----	-0'0275
$c_{x,S}$	10'2	-----	-----
$c_{x,A}$	-----	15'0	-----
t (c)	1'39 (P = 18'20 %)		



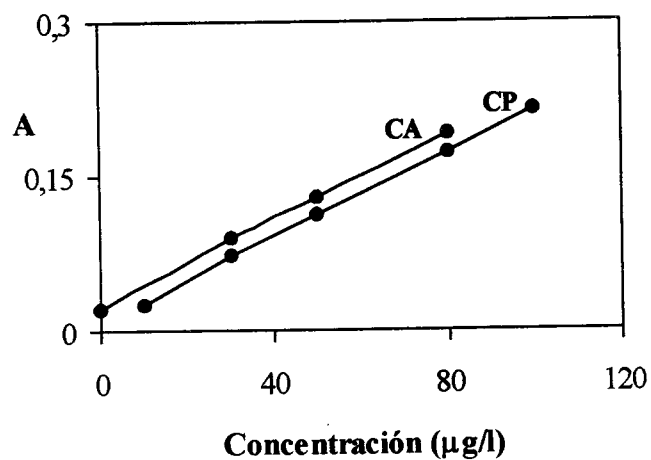


Figura III.26.- Calibrado con patrones (CP) y calibrado con adición de patrón (CA) para la determinación de NN en la muestra de Sancolor S.A.

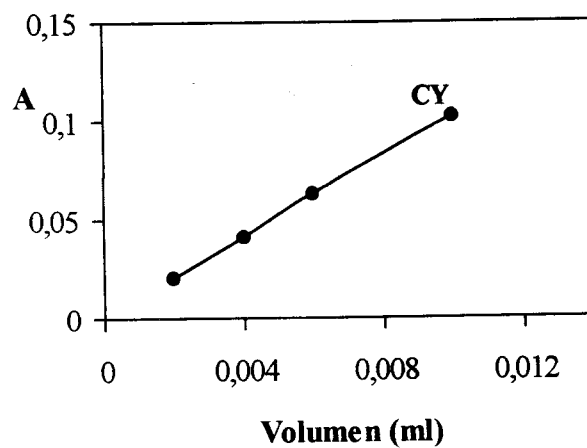
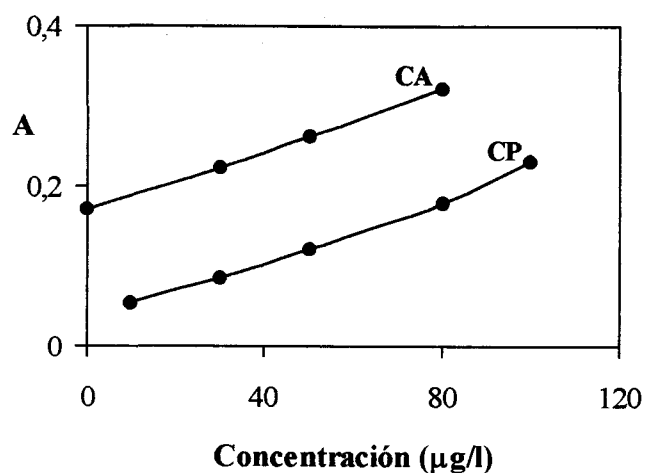


Figura III.27.- Calibrado de Youden (CY) para la determinación de NN en la muestra de Sancolor S.A.

**Tabla III.33.-** Resultados estadísticos obtenidos en la validación del método para NN en el colorante alimentario Vahiné.

Parámetros	CP	CA	CY
n	15	4	4
a	0'03	0'1729	0'1336
b	$1'86 \times 10^{-3}$	$1'79 \times 10^{-3}$	18'63
$s_{R,c}$	$6'57 \times 10^{-3}$	$8'61 \times 10^{-3}$	$2'65 \times 10^{-2}$
$s_p$	$6'87 \times 10^{-3}$		
t (b)	0'54 (P = 59'78 %)		
$b_p$	$1'86 \times 10^{-3}$		
$a'$	0'0302	0'1700	-----
BY	-----	-----	0'1034
$c_{x,S}$	20'16	-----	-----
$c_{x,A}$	-----	19'46	-----
t (c)	0'26 (P = 79'81 %)		



**Figura III. 28.-** Calibrado con patrones (CP) y calibrado con adición de patrón (CA) para la determinación de NN en el colorante Vahiné.

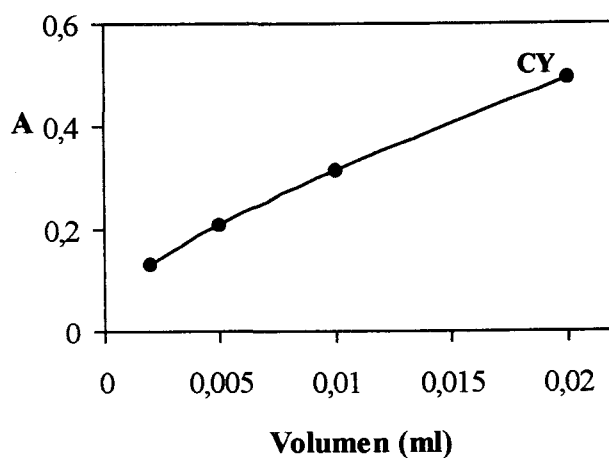


Figura III.29.- Calibrado de Youden (CY) para la determinación de NN del colorante Vahiné.

Tabla III.34.- Resultados estadísticos obtenidos en la validación del método para NN en el caramelo Pectol.

Parámetros	CP	CA	CY
n	15	4	4
a	0'03	0'0338	0'021
b	$1'86 \times 10^{-3}$	$1'77 \times 10^{-3}$	5'75
$s_{R,c}$	$6'57 \times 10^{-3}$	$2'07 \times 10^{-3}$	$6'00 \times 10^{-5}$
$s_p$	$6'16 \times 10^{-3}$		
t (b)	0'59 (P = 56'39 %)		
$b_p$	$1'86 \times 10^{-3}$		
a'	0'0301	0'0347	-----
BY	-----	-----	-0'0091
$c_{x,S}$	2'40	-----	-----
$c_{x,A}$	-----	2'12	-----
t (c)	0'114 (P = 24'01 %)		

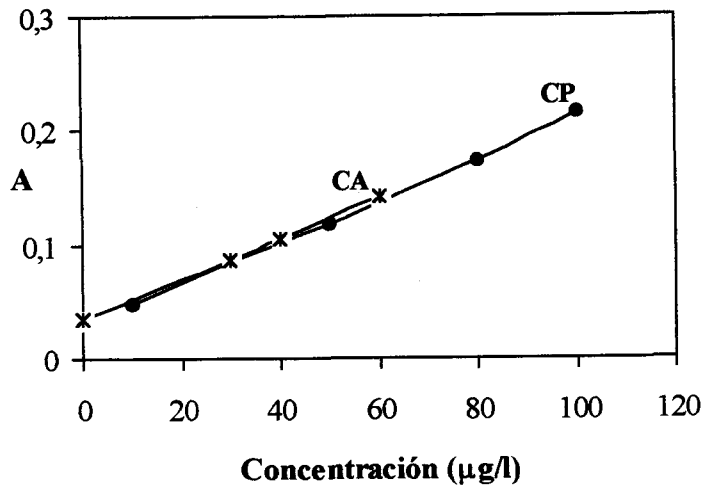


Figura III.30.- Calibrado con patrones (CP) y calibrado con adición de patrón (CA) para la determinación de NN en el caramelo Pectol.

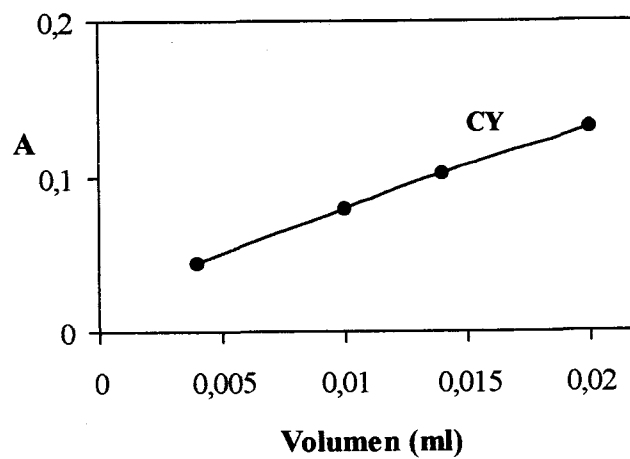


Figura III.31.- Calibrado de Youden (CY) para la determinación de NN del caramelo Pectol.

**Tabla III34.-** Resultados estadísticos obtenidos en la validación del método para NN en la gominola Mauri.

Parámetros	CP	CA	CY
n	15	4	4
a	0'03	0'049	0'035
b	1'86x10 <sup>-3</sup>	1'86x10 <sup>-3</sup>	0'324
s <sub>R,c</sub>	6'57x10 <sup>-3</sup>	2'16x10 <sup>-3</sup>	4'70x10 <sup>-4</sup>
s <sub>p</sub>	6'16x10 <sup>-3</sup>		
t (b)	0'00 (P = 100 %)		
b <sub>p</sub>	1'86x10 <sup>-3</sup>		
a'	0'0306	0'0488	-----
BY	-----	-----	-0'2934
c <sub>x,S</sub>	10'59	-----	-----
c <sub>x,A</sub>	-----	9'78	-----
t (c)	0'42 (P = 68'00 %)		

Cuando se comparan estadísticamente las varianzas del calibrado realizado con patrones con las del calibrado realizado con adición de patrón, no se encuentran diferencias significativas entre ambas para ninguna de las muestras, como se pone de manifiesto en los valores de P que en todos los casos son superiores al 5%, 56'68, 42'87, 99'77 y 10'16%, en cada caso, por lo que se acepta la hipótesis nula (H<sub>0</sub>). Por otra parte, al comparar las pendientes tampoco se obtienen diferencias significativas entre ambas como esta reflejado en las distintas tablas para cada analito. En el colorante carmoisina de Sancolor S.A es el único caso donde a<sub>y</sub> no esta incluido en el intervalo calculado para la nueva ordenada en el origen del calibrado con patrones, por lo que podemos suponer que existe un componente de error sistemático. En todos los demás casos no existe componente de error sistemático, restándose el blanco analítico a la señal de la muestra. Al comparar el contenido de analito en la disolución calculado a partir del calibrado con patrones (c<sub>x,S</sub>) y el contenido de analito en la disolución calculado a partir del calibrado con adición de patrón (c<sub>x,A</sub>), resulta un valor de P > 5%, por lo que se concluye que el método es exacto para la determinación de NN en las muestras estudiadas.

**Análisis de las muestras.**

Una vez validado el método, se determina el contenido de analito realizando tres determinaciones directas. El contenido de analito resultante será el valor medio de estas determinaciones.

**Tabla III.35.-** Contenido de NN en el colorante alimentario de Sancolor S.A.

Serie n°	Carmoisina de Sancolor S.A		Colorante alimentario Vahiné	
	A	C (µg/l)	A	C (µg/l)
1	0'0224	10'85	0'1713	20'16
2	0'0239	11'65	0'1721	20'58
3	0'0251	12'28	0'1742	21'71

**Tabla III.36.-** Contenido de NN en el caramelo Pectol y en la gominola Mauri.

Serie n°	Caramelo Pectol		Gominola Mauri	
	A	C (µg/l)	A	C (µg/l)
1	0'0352	2'46	0'0483	9'51
2	0'0354	2'56	0'0480	9'35
3	0'0353	2'52	0'0482	10'00

La desviación estándar relativa de los datos en las respectivas muestras es del 6'18% para Carmoisina de Sancolor S.A, 3'85% para el colorante alimentario Vahiné, 2'33% para el caramelo Pectol y 2'06 % para la gominola Mauri. Para el colorante de Sancolor S.A se obtiene un valor de concentración media para la muestra de 11'59 µg/l, ya que se adicionó una cantidad de 200 µg/l del analito. Si referimos esta cantidad al contenido en 100 µg/l de muestra, por tanto expresando el resultado en tanto por ciento, tenemos una cantidad de impureza del 5'79%. Para el colorante alimentario Vahiné se obtiene un valor de concentración media final una vez tenido en cuenta los factores de dilución para la muestra de 1'04g/l. Para determinar el contenido de NN en el caramelo de fresa mentolada Pectol

se toman 4 ml de disoluciones de 5 ml conteniendo cada una una pieza de caramelo de 3'655, 3'591 y 3'631 gramos cada una, el resultado da un contenido medio de NN en la muestra de 0'43  $\mu\text{g/g}$ . En la gominola Mauri se obtiene un valor de concentración media final una vez tenido en cuenta los factores de dilución para la muestra de 1'21  $\mu\text{g/g}$ .

A modo de resumen se recogen en la tabla III.36 los contenidos de ambos analitos encontrados en las muestras analizadas.

Tabla III.36.- Resumen de los contenidos de ambos colorantes encontrados en las muestras analizadas.

Muestra	Concentración ( $s_{n-1}$ )	
	Carmoisina	1-naftilazo-1-naftol
Carmoisina de Sancolor S.A <sup>1</sup>	101'10 (2'55)	5'79 (0'71)
Colorante alimentario Vahiné <sup>2</sup>	8'70 (0'51)	1'07 (0'04)
Caramelo Pectol <sup>3</sup>	10'80 (0'29)	0'43 (0'01)
Gominola Mauri <sup>3</sup>	31'98 (0'73)	1'21 (0'03)

<sup>1</sup>expresado en  $\mu\text{g/l}$ ; <sup>2</sup>expresado en  $\text{g/l}$ ; <sup>3</sup>expresado en  $\mu\text{g/g}$ .





**CAPÍTULO IV:  
DETERMINACIÓN DE ESCARLATA 4R Y SU PRODUCTO NO  
SULFONADO EN ALIMENTOS MEDIANTE  
ESPECTROFOTOMETRÍA EN FASE SÓLIDA**



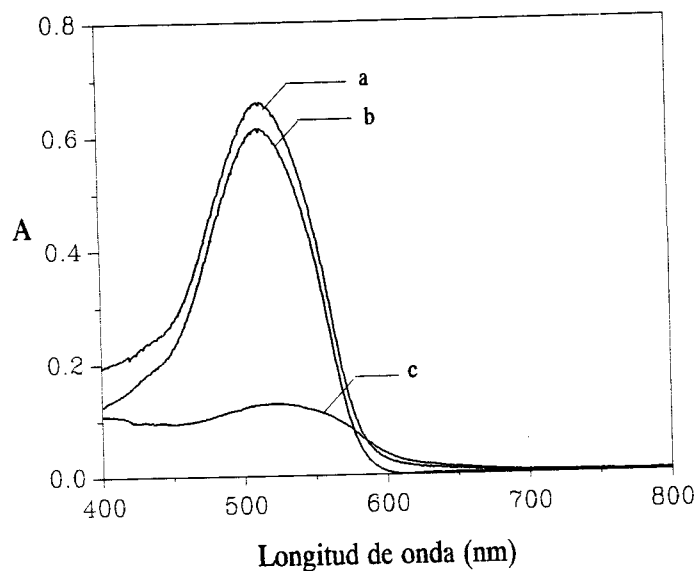
En este capítulo se desarrolla y propone un nuevo método espectrofotométrico para la determinación simultánea de un colorante sintético, la sal trisódica del ácido (sulfo-4,7-naftilazo-1'-1)hidroxi-2 naftaleno disulfónico-6,8 (C.I. 16255), también llamado Escarlata 4R (ER), compuesto ampliamente utilizado como aditivo en alimentos, productos farmacéuticos y cosméticos, y su producto no sulfonado el 1-naftilazo-2-naftol (NN) que fué sintetizado por nosotros según lo establecido en el Capítulo I. Según la legislación vigente, este último compuesto no puede superar el 2% del total del colorante sulfónico que se utiliza como materia prima para la fabricación de alimentos, razón por la cual es necesario disponer de métodos de análisis que permitan su determinación incluso en presencia de grandes cantidades de su homólogo. A partir de ahora se designará a ambos por los acrónimos ER y NN respectivamente.

### **OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES EXPERIMENTALES.**

#### **1.- Elección del soporte sólido.**

Como ER y su producto no sulfonado son isómeros de posición de los dos analitos estudiados en el capítulo III, todas las consideraciones allí expuestas para la elección del soporte sólido son válidas aquí. Los resultados de equilibrar 100 ml de disolución de ER y NN de 500  $\mu\text{g/l}$  con cada uno de los cambiadores ensayados en el capítulo III se recogen

en la figura IV.1.



**Figura IV.1.-** Espectros de absorción de:

- (a) ER (500  $\mu\text{g/l}$ ) en Sephadex DEAE A-25.
- (b) ER (500  $\mu\text{g/l}$ ) en Sephadex QAE A-25.
- (c) NN (500  $\mu\text{g/l}$ ) en gel de sílice C-18.

El NN colorante únicamente se fijó sobre gel de sílice C-18, figura IV.1 c, dado que su molécula carece de grupos cambiadores y los grupos polares que tiene, azo y naftol, no le confieren suficiente polaridad como para retenerse sobre soportes hidrofílicos. Sobre los demás soportes ensayados no mostraron ninguna retención por lo que, al carecer de información, sus espectros no se han incluido. Las figuras IV.1 a y b son los resultados de la fijación de ER sobre Sephadex DEAE A-25 y Sephadex QAE A-25 respectivamente. La retención sobre estos soportes se debe a que posee grupos sulfónicos en su estructura, lo que hace que se retenga sobre cambiadores aniónicos. Dado que se presenta una retención ligeramente superior sobre Sephadex DEAE A-25 y que este soporte es más selectivo que el anterior, por contener grupos amino y no amonio cuaternario, este es el soporte sólido que se elige para experiencias posteriores. Al igual que en el caso anterior los demás soportes ensayados con este analito no dan resultado por lo que tampoco se han incluido en la figura.

## 2.- Optimización de las variables químicas que afectan a la fijación de ER y NN.

### 2.1.- Factores que influyen sobre el proceso de fijación.

#### 2.1.1.- Influencia del pH.

Para establecer esta influencia para ambos compuestos, se preparan dos series de disoluciones, una de 500  $\mu\text{g/l}$  de ER y otra serie de 100  $\mu\text{g/l}$  de NN en matraces de 100 ml. Para cada disolución se ajusta un valor de pH diferente, desde 1 hasta 13, mediante la adición de disoluciones de HCl o NaOH de distintas concentraciones, siguiendo a continuación la metodología establecida en el capítulo I, hasta obtener los datos cuya representación se muestra en la figura IV.2.

Al ser estos colorantes isómeros de los estudiados en el Capítulo III, la influencia del pH es la misma, por lo que se selecciona para ER un pH 1 y para NN un pH 5, para lo que habrá que utilizar disoluciones reguladoras de pH.

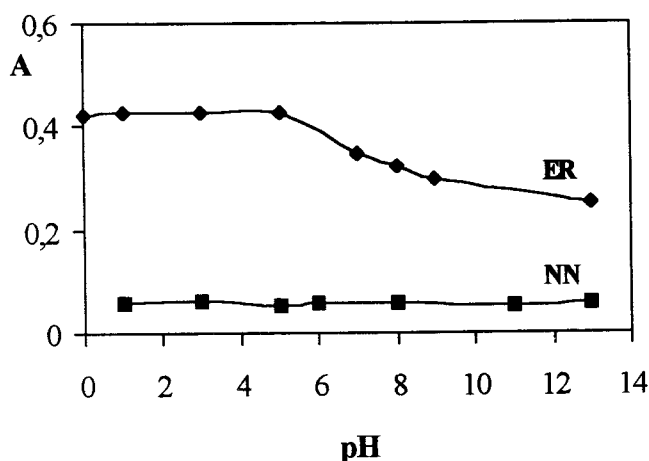


Figura IV.3.- Influencia del pH sobre los procesos de retención de ER y NN .

Para asegurarnos que todas las disoluciones de ER tienen pH 1 se utiliza una disolución de HCl 1 M, ya que no hay disoluciones reguladoras que actúen a pH tan ácidos. Esta disolución mantiene el pH.

Para asegurarnos de que las disoluciones de NN alcanzan el pH 5 se prueban dos disoluciones que pueden actuar en esa zona de pH, una disolución de ácido acético/acetato sódico 1 M y otra de monocloroacético/monocloroacetato sódico 1 M. Se sigue el proceso operatorio requerido para cada analito, observando que para ER la disolución de HCl preparada mantenía el valor requerido de pH, y para NN la absorbancia es igual con ambas disoluciones reguladoras ensayadas, pero que la cantidad requerida de ésta en el segundo caso es mayor, por ello se optó por usar la disolución de ácido acético/acetato sódico 1 M.

Para la determinación de la cantidad necesaria de disolución reguladora, se preparan disoluciones de 500 µg/l de ER y de 100 µg/l de NN poniendo en cada una de ellas cantidades crecientes desde 1 ml hasta 20 ml de la disolución de HCl 1M para ER y de la disolución reguladora de acético/acetato sódico para NN comprobando, para ambos analitos y en todos los casos, la constancia del pH antes y después de aplicar el proceso operatorio.

**Tabla IV.1.-** Influencia de la cantidad de disolución reguladora.

V (ml)	pH		A	
	ER	NN	ER	NN
1	1'67	4'96	0'4439	0'0521
2	1'38	4'98	0'4498	0'0645
5	1'00	5'00	0'4517	0'0717
10	1'00	5'00	0'4553	0'0725
20	0'89	5'00	0'4534	0'0731

Los datos obtenidos en los dos casos (tabla IV.1), señalan que 5 ml son suficientes, por lo que dicho volumen se elige para posteriores experiencias.

### 2.1.3.- Influencia de la fuerza iónica.

Se prepararon 5 disoluciones de 500 µg/l de ER y 5 disoluciones de 100 µg/l de NN, añadiendo a cada una de las disoluciones 5 ml de disolución de HCl 1 M (pH = 1) para

las primeras y 5 ml de ácido acético/acetato sódico (pH = 5.0) para las segundas. Se le añaden a ambas series, volúmenes crecientes de disolución 0.1 M de NaCl hasta que en las disoluciones de los colorantes se alcanza una concentración de sal 1 M, enrasando en todos los casos a un volumen final de 100 ml. Siguiendo el procedimiento operatorio establecido en el capítulo I se obtienen los resultados que podemos ver en la figura IV.5.

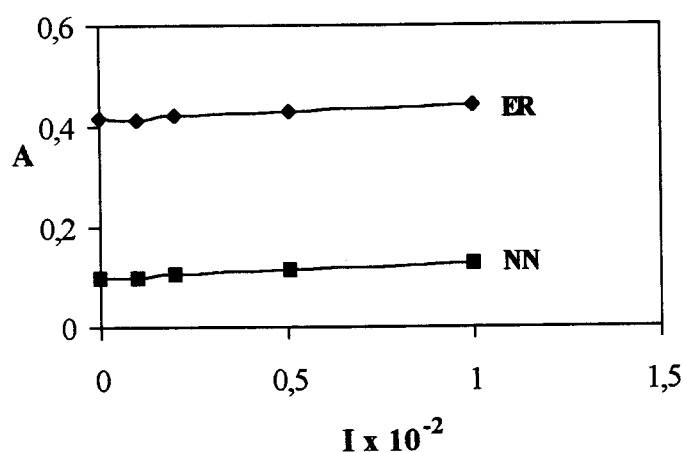


Figura IV.5.- Influencia de la fuerza iónica .

Para NN y ER la señal es prácticamente independiente de la fuerza iónica del medio, ya que para ambos analitos la diferencia entre el valor máximo y el valor mínimo de absorbancia es de 0'03 unidades, razón por la cual no se consideró necesario ajustar esta variable.

#### 2.1.4.- Influencia de la cantidad de gel.

Para establecerla se prepararon 6 disoluciones con un volumen final de 100 ml de 500  $\mu\text{g/l}$  de ER y otras tantas de 100  $\mu\text{g/l}$  de NN, todas ellas con sus correspondientes disoluciones amortiguadoras. En el caso de ER se añadieron cantidades crecientes de Sephadex A-25 entre 40 y 120 mg y en el caso de NN cantidades crecientes de gel de sílice C-18 entre 100 y 300 mg. Posteriormente se aplicó el proceso operatorio establecido, obteniendo los resultados recogidos en la tabla IV.2. La representación de estos datos (figura IV.3) pone de manifiesto una dependencia exponencial entre la masa de gel

empleada y la absorbancia, obtenida de acuerdo con lo señalado en la introducción de la presente Memoria.

Tabla IV.2 Influencia de la cantidad de gel.

ER		NN	
mg(DEAE)	A	mg (C-18)	A
40	0'5237	100	0'3210
50	0'3571	120	0'2330
70	0'2989	140	0'1877
90	0'1911	150	0'0831
100	0'1716	250	0'0712
120	0,1700	300	0'0705

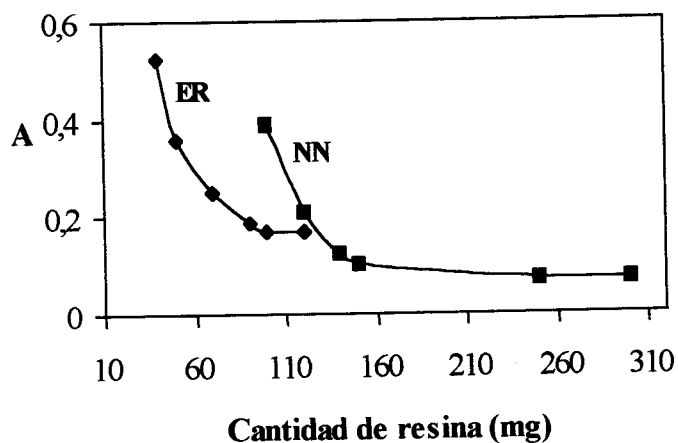


Figura IV.3.- Influencia de la cantidad de resina.

En ambos casos si se realiza una transformación logarítmica de los valores experimentales obtenidos y se ajustan por mínimos cuadrados (como hemos realizado en anteriores ocasiones) se obtienen las siguientes ecuaciones:



$$\text{Para ER} \quad \log A = 1,345 - 1,047 \log m_g$$

$$\text{Para NN} \quad \log A = 2,198 - 1,389 \log m_g$$

donde  $m_g$  es la masa del gel empleado, expresada en miligramos.

A partir de estas ecuaciones se puede establecer para cada analito la ecuación de la hipérbola correspondiente a la curva de la figura IV.3. Para ER  $A \cdot m_g^{1,047} = -1,345$ , para AA  $A \cdot m_g^{1,389} = -2,198$ .

Ambas ecuaciones nos sirven para conocer la señal que obtendremos para cualquier masa de soporte dentro del margen de las cantidades ensayadas para cada colorante. Según esto, se debería de tomar la cantidad de gel que proporciona un valor máximo de absorbancia, 40 mg en un caso y 100 mg en otro, pero estas cantidades tan pequeñas presentan problemas de manipulación al empaquetarlas en la cubeta de medida. Por ello se llega a una situación de compromiso entre sensibilidad y facilidad en la manipulación, eligiéndose 50 mg de Sephadex DEAE A-25 para ER y 150 mg de gel de sílice C-18 para el caso de NN, que son de las menores cantidades de soporte sólido que se pueden usar con facilidad, sin que se produzca una pérdida de sensibilidad excesivamente grande. Hay que destacar que la cantidad de resina seleccionada para NN esta dentro de la zona de estabilidad de la gráfica, luego la sensibilidad que obtenemos con esta cantidad de soporte sólido, al igual que ocurre con su isómero estudiado en el capítulo previo, es la mínima dentro de las cantidades posibles que se pueden utilizar.

## 2.2.- Factores que influyen sobre la cinética del proceso de fijación.

### 2.2.1.- Influencia del tiempo de equilibración del gel.

Para establecer su influencia se preparan dos series de disoluciones, una conteniendo 100  $\mu\text{g/l}$  de NN y otra 500  $\mu\text{g/l}$  de ER enrasados a 100 y 500 ml respectivamente con agua de ósmosis inversa, conteniendo ambas las disoluciones que mantienen el respectivo pH seleccionado. Estas disoluciones se transfieren a botellas de vidrio de 1 litro donde se añaden las cantidades necesarias de los respectivos soportes sólidos. A cada una de las disoluciones anteriores se les somete a una agitación mecánica durante un periodo de

tiempo determinado, y distinto de las demás de su serie, comprendido entre 5 y 60 minutos a 60 rpm y posteriormente se sigue el procedimiento operatorio establecido anteriormente. Los resultados obtenidos se recogen en la figura V.4. Como se puede observar hay un importante aumento en la absorbancia en el caso de ER al aumentar el tiempo de agitación de 5 a 10 minutos a partir del cual permanece constante.

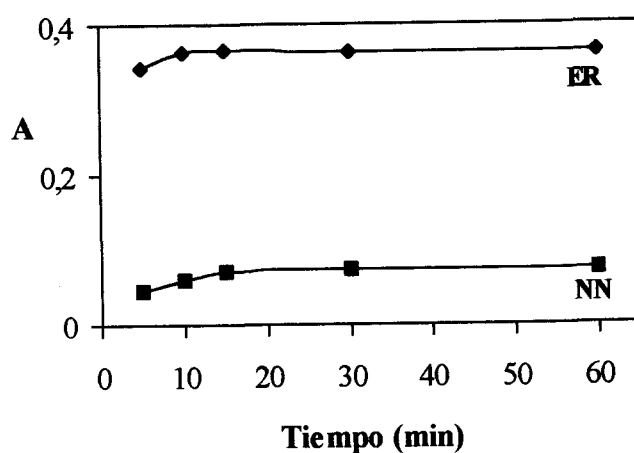


Figura IV. 4.- Influencia del tiempo de equilibración.

En el NN hay un ligero aumento de la absorbancia con el tiempo de agitación hasta 15 minutos a partir del cual se mantiene constante. Al igual que con los analitos estudiados en capítulos anteriores cabe destacar la rápida equilibración debido a que no hay reacciones químicas previas. Se selecciona un tiempo de 10 minutos para la determinación de ER y de 15 minutos para la determinación de NN.

### 2.2.3.- Influencia del contenido en etanol.

Ya que se pretende determinar ER que es soluble en agua y NN que es insoluble en agua y soluble en etanol, será necesario trabajar con un determinado porcentaje de etanol, que permite la solubilización del NN. De hecho la disolución madre de este analito se encuentra preparada en este disolvente. Por ello es necesario estudiar su influencia sobre la retención de ambos analitos, para lo cual se preparan disoluciones de 500  $\mu\text{g/l}$  de ER y de 100  $\mu\text{g/l}$  de NN y tras ajustar el valor de pH seleccionado para cada analito se añaden cantidades de etanol entre 1 y 20 ml, enrasando a un volumen final de 100 ml con agua

desionizada. Posteriormente se sigue el proceso operatorio descrito en el Capítulo I. Los resultados obtenidos se recogen en la figura IV.6:

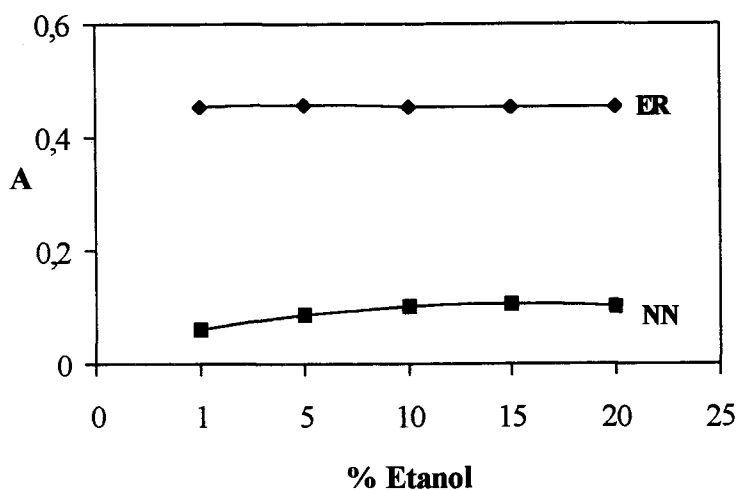


Figura IV.6.- Influencia del % de etanol en los procesos de fijación de los analitos .

Como puede observarse en el caso de ER el porcentaje de etanol añadido no afecta a la fijación de éste por cambio iónico, al menos hasta un 20 %. Para NN, en cantidades inferiores al 10% de etanol hay una menor retención sobre el soporte sólido y a partir de esta cantidad se obtiene una señal constante, por lo tanto este será el valor empleado para estudios posteriores. La razón de esta variación se debe a que con este porcentaje de etanol (10%) la solubilidad del compuesto es total por lo que la retención del colorante sobre el gel esta favorecida.

Como en anteriores ocasiones al realizar esta experiencia, no se representan cantidades superiores al 20% de etanol porque a partir de este valor se produce una deshidratación del gel dando lugar a un apelmazamiento del mismo que dificulta su empaquetamiento en la cubeta.

Las muestras reales presentan las mismas propiedades que las estudiadas en el capítulo anterior, por lo que todo lo dicho allí es válido en este capítulo.

### 2.3.- Factores que influyen en la medida de la señal analítica.

#### 2.3.1.- Influencia del volumen de disolución empleado.

Se preparan disoluciones de 500  $\mu\text{g/l}$  de ER y de 100  $\mu\text{g/l}$  de NN, todas ellas con 5% de disolución empleada para mantener el pH, con un 10 % de etanol (en el caso del NN), y enrasadas cada una a un volumen diferente con agua de ósmosis inversa que va desde los 100 ml hasta 1000 ml. A estas disoluciones transferidas a botellas de vidrio de 1 ó 2 litros, según el volumen final de la disolución, se le añaden 50 mg de Sephadex DEAE A-25 o 150 mg de gel de sílice C-18 según el caso, y se agitan durante 10 o 15 minutos respectivamente.

En ambos casos hay un aumento de la absorbancia al aumentar el volumen final de muestra, hasta alcanzar un valor a partir del cual el valor de la absorbancia permanece constante de acuerdo con las predicciones teóricas que establecimos en la Introducción de esta Memoria. Para ER se selecciona un volumen de trabajo de 100 ml debido a que con este volumen se reduce el tiempo de agitación y por tanto el método se hace más rápido. Sin embargo para el caso de NN, como el comportamiento es similar al producto no sulfonado estudiado en el capítulo III, se emplea como volumen de trabajo 500 ml.

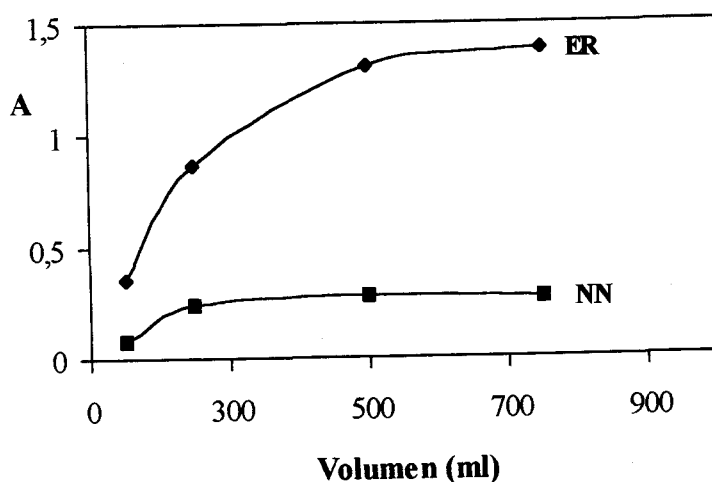


Figura IV.7.-Influencia del volumen.

### 2.3.- Influencia del tiempo de secado en la determinación de NN.

Debido a las características hidrófobas del gel de sílice C-18, es necesario secarlo antes de empaquetarlo en la cubeta de medida y proceder a su lectura. Para elegir el tiempo de secado óptimo se prepararon disoluciones de 100  $\mu\text{g/l}$  de NN siguiendo todo el proceso operatorio establecido hasta llegar a la fijación del analito sobre el gel de sílice y filtración posterior. Una vez llegado a este punto las distintas muestras se someten a diferentes tiempos de secado comprendidos entre 1 y 20 minutos siguiendo a continuación la metodología establecida. Los resultados los encontramos representados en la figura IV.8.

Para un valor inferior a 5 minutos en el tiempo de secado es imposible empaquetar el gel ya que no está suficientemente seco y al introducirlo en la cubeta queda apelmazado. De 5 a 10 minutos se observa un incremento de la señal, debido a que el empaquetamiento va siendo cada vez más homogéneo, hasta que se llega a una constancia en la señal analítica a partir de 15 minutos, tiempo que se empleará en experiencias posteriores para secar el gel.

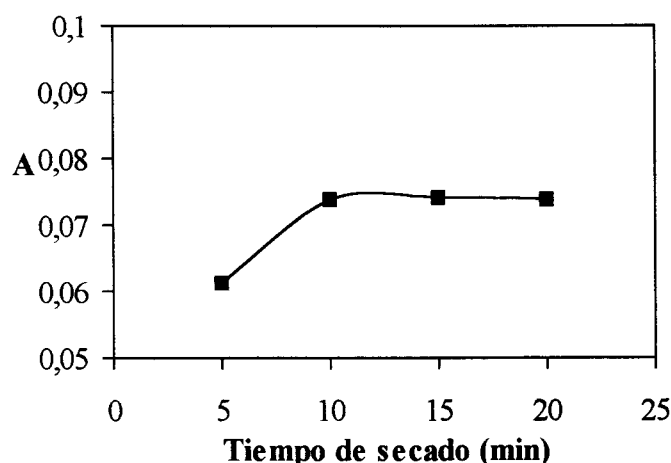


Figura IV.9.- Influencia del tiempo de secado en las muestras de NN.

#### 2.3.2.- Influencia del tiempo de centrifugación.

Se preparan una disolución de 500  $\mu\text{g/l}$  de ER y otra de 100  $\mu\text{g/l}$  de NN y siguiendo el procedimiento operatorio ya establecido, se realizan medidas de Absorbancia de ambos

sistemas sin centrifugar y centrifugando durante distintos tiempos. La figura IV.10 indica que es adecuado centrifugar la cubeta con el soporte sólido con el analito para mejorar el empaquetamiento y aumentar la señal. Se seleccionan 30 segundos como tiempo suficiente para conseguir una señal estable en ambos casos.

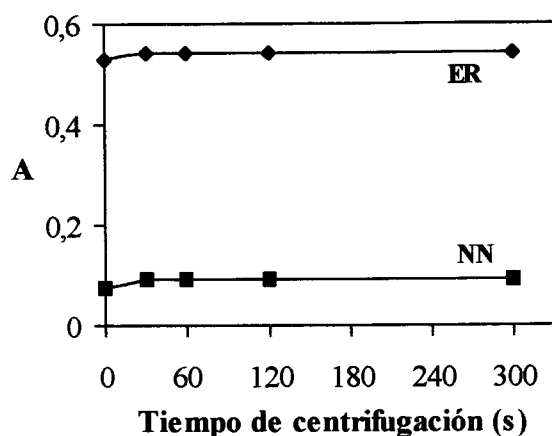


Figura IV.10.- Influencia del tiempo de centrifugación

### 3.- Resumen de las optimización de variables para ER y para NN.

Tabla IV.3.- Resumen de las variables experimentales.

Variable	ER	NN
Absorbancia	$A = A_{513} - A_{800}$	$A = A_{517} - A_{800}$
pH	1'0	5'0
Disolución reguladora	HCl 1M	AcH/AcNa 1M
Cantidad de gel	50 mg DEAE A-25	150 mg C-18
Tiempo de agitación	10 minutos	15 minutos
Volumen de agitación	100 ml	500 ml

En la anterior tabla se resumen los valores de las diferentes variables experimentales

optimizadas para cada analito, que serán las que empleen a partir de ahora para la realización de las experiencias sucesivas. Las variables que tienen el mismo valor para ambos analitos no se han incluido en la tabla y son: la velocidad de agitación de 60 rpm, y el tiempo de centrifugación de 30 segundos. Hay variables que solo afectan al NN, por lo que tampoco se han incluido en la tabla son: contenido de etanol que es del 10% y tiempo de secado del soporte sólido que es de 15 minutos.

#### 4.- PARÁMETROS ANALÍTICOS.

A continuación se recogen los datos encontrados para la calibración y los parámetros de fiabilidad para cada uno de los colorantes estudiados.

##### 4.1.- Cumplimiento de la ley de Lambert-Beer y parámetros de fiabilidad para Escarlata 4R.

Se preparan una serie de disoluciones en matraces de 100 ml, cada uno por triplicado, conteniendo concentraciones de analito comprendidas entre 50 y 650  $\mu\text{g/l}$  y seguimos la metodología establecida hasta obtener los valores de absorbancia que figuran en la tabla IV.4 de cuya representación gráfica obtenemos la figura IV.12.

Tabla IV.4.-Cumplimiento de la ley de Lamber-Beer para el ER.

[ER] ( $\mu\text{g/l}$ )	A		
	1ª Serie	2ª Serie	3ª Serie
50	0'0460	0'0406	0'0468
100	0'0899	0'0826	0'0903
250	0'2276	0'2281	0'2249
500	0'4528	0'4516	0'4587
650	0'5936	0'5981	0'5910

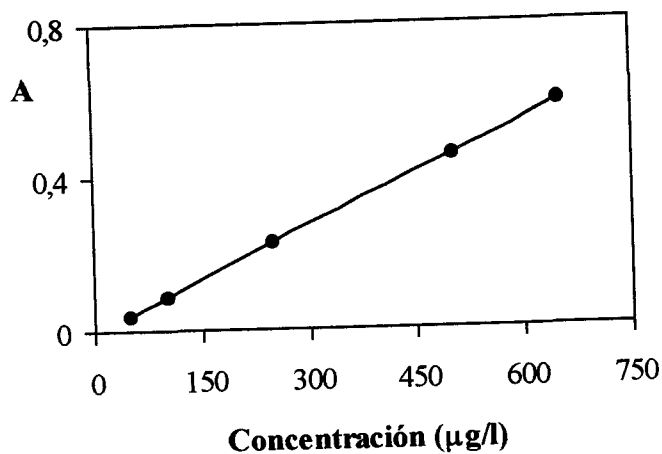


Figura IV.12.- Cumplimiento de la ley de Lambert-Beer para el caso de ER.

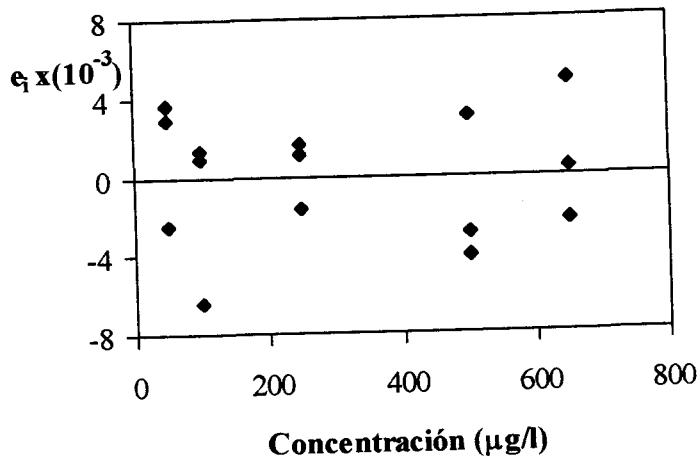


Figura IV.13.- Representación gráfica de los residuales frente a la concentración de ER.

Realizando un test de fallo de ajuste para el rango de concentración comprendido entre 50 y 650 µg/l se encuentra que no hay curvatura ya que se obtiene un valor de P superior al 5% ( $P = 66,19\%$ ). Por otra parte el análisis gráfico de los residuales (figura IV.13) señala la existencia de homoscedasticidad. Todo esto señala que el modelo de ajuste seleccionado es válido.



Tabla IV.15.- Resultados del ANOVA realizado en el rango de concentraciones 50 a 650 µg/l de CM.

Fuente	SM <sup>1</sup>	g.l	MC <sup>2</sup>	F <sub>exp</sub>	P (%)
Modelo	6'73x10 <sup>-1</sup>	1	6'73x10 <sup>-1</sup>	6'21x10 <sup>4</sup>	0'00
Residuales	1'41x10 <sup>-4</sup>	13	1'10x10 <sup>-5</sup>		
Fallo de ajuste	1'98x10 <sup>-5</sup>	3	6'60x10 <sup>-6</sup>	5'459x10 <sup>-1</sup>	66'19
Error puro	1'21x10 <sup>-4</sup>	10	1'21x10 <sup>-5</sup>		

(1) Suma de cuadrados ; (2) Media de cuadrados.

Una vez que se comprueba la homoscedasticidad, y admitiendo que se cumplen las hipótesis matemáticas del modelo de ajuste por mínimos cuadrados (normalidad, aleatoridad e independenciam) se calcula la siguiente función de calibrado:

$$A = -2'71x10^{-3} + 9'168x10^{-4} \cdot [ER].$$

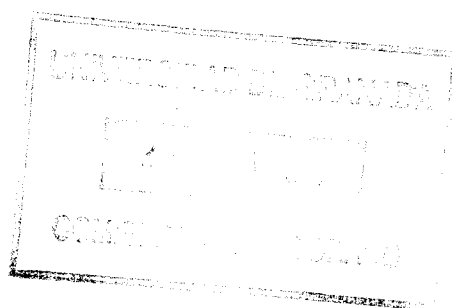
En la tabla (IV.6) se indican los parámetros estadísticos correspondientes a esta ecuación de calibrado:

Tabla IV.6.-Parámetros estadísticos.

Parámetros	Valor
s <sub>R,C</sub>	3'29x10 <sup>-3</sup>
r <sup>2</sup> (%)	99'98
s <sub>b</sub>	3'67 x 10 <sup>-6</sup>
s <sub>a</sub>	1'42x10 <sup>-3</sup>

**Linealidad**

$$Lin (%) = [1 - D.E.R. (b)] \cdot 100 = 99'60 \%$$



**Sensibilidad**

a) La sensibilidad de calibrado:  $S_{cal.} = b = 9'16 \times 10^{-4} (\mu\text{g/l})^{-1}$ .

b) La sensibilidad analítica:  $S_{anal.} = (s_{R,C}/b) = 3'59 \mu\text{g/l}$ .

**Límite de detección y límite de cuantificación.**

El cálculo de los límites de detección y de cuantificación se realizaron siguiendo las normas de la IUPAC; para ello se prepararon 10 disoluciones del blanco, siguiendo el procedimiento operatorio propuesto y se midieron sus absorbancias frente a una referencia constituida por el gel y agua. En la tabla IV.7 se recogen los resultados obtenidos.

Tabla IV.7.-Repetibilidad del blanco.

Disolución nº	A (blanco)	Disolución nº	A (blanco)
1	0'0019	6	0'0015
2	0'0018	7	0'0009
3	0'0016	8	0'0012
4	0'0006	9	0'0038
5	0'0007	10	0'0008

El valor medio de la señal de los blancos es de  $1'48 \times 10^{-3}$  y la desviación estándar  $9'39 \times 10^{-4}$ , de donde se deducen los siguientes resultados:

LD ..... 3'07  $\mu\text{g/l}$ .

LQ ..... 10'25  $\mu\text{g/l}$ .

**Rango dinámico lineal**

El intervalo de aplicación del método esta comprendido entre el límite inferior, que es el límite de cuantificación, 10'25  $\mu\text{g/l}$  y el límite superior, que viene determinado por el

valor superior de concentración que esta dentro del intervalo lineal aceptado por el test de fallo de ajuste, 650  $\mu\text{g/l}$  en nuestro caso, por tanto el intervalo lineal esta comprendido entre 11 y 650  $\mu\text{g/l}$  y el R.D.L. = 0.1 ( $\text{Lim}_{\text{sup}}/\text{Lim}_{\text{inf}}$ ) = 6'34.

### Precisión

En la presente Memoria la precisión se evaluó mediante las dos formas establecidas en el capítulo I, obteniéndose los siguientes resultados:

#### a) Repetibilidad del método propuesto aplicado a una muestra dada.

Se preparan 10 disoluciones correspondientes a una concentración intermedia del rango dinámico lineal anteriormente determinado, 300  $\mu\text{g/l}$ . Siguiendo la metodología de trabajo establecida se obtienen los resultados recogidos en la tabla IV.9, de donde se estima la reproducibilidad del método. Los parámetros estadísticos que se deducen de esta tabla son: valor medio de absorbancia 0'2118 y desviación estándar  $7'28 \times 10^{-3}$ , lo que supone una desviación estándar relativa de 3'4%.

Tabla IV.9.- Repetibilidad del método.

Disolución nº	A (muestra)	Disolución nº	A (muestra)
1	0'2173	6	0'2124
2	0'2071	7	0'2062
3	0'2087	8	0'2230
4	0'2100	9	0'2225
5	0'2106	10	0'2000

#### b) Repetibilidad del método a partir de los datos del calibrado.

En la tabla IV.10 se muestran los valores calculados a partir de la función de calibrado previamente establecida en el apartado 4.1.

Tabla IV.10.- Parámetros estadísticos.

[CM] ( $\mu\text{g/l}$ )	$s_c$	D.E.R (%)
50	2'47	4'9
100	2'41	2'4
250	2'28	0'9
500	2'41	0'5
650	2'68	0'4

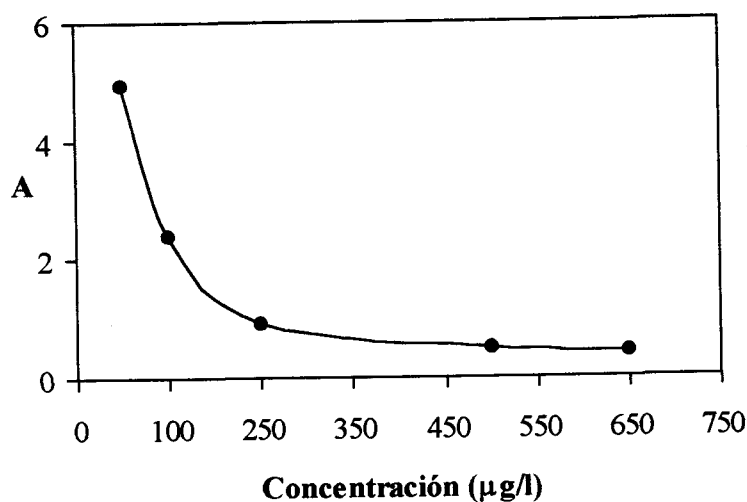


Figura IV.15.- Repetibilidad en función de la concentración de ER.

En la figura IV.15 se observa, como era de esperar, que a medida que la concentración de ER analizada aumenta, la desviación estándar relativa se hace cada vez menor, ya que dividimos un valor constante de desviación estándar entre un valor cada vez mayor de concentración.

#### 4.2- Cumplimiento de la ley de Lambert-Beer y parámetros de fiabilidad para el 1-naftilazo-2-naftol.

En el caso de este analito, debido a las razones anteriormente comentadas, se

propone el método para 100 y 500 ml, comparando posteriormente la sensibilidad de ambos métodos, haciendo así uso de la ya citada ventaja de la espectrofotometría en fase sólida consistente en la posibilidad de aumentar la sensibilidad y de reducir el límite de detección del método, aumentando el volumen de disolución empleado, siempre dentro de unos márgenes determinados.

#### 4.2.1.- Método para 100 ml.

En las condiciones operatorias anteriormente establecidas para este analito, se preparan una serie de disoluciones, todas ellas por triplicado, conteniendo concentraciones de analito comprendidas entre 30 y 100  $\mu\text{g/l}$ , y se obtienen los datos experimentales recogidos que figuran en la tabla IV.10.

Tabla IV.10.- Cumplimiento de la ley de Lambert-Beer para un volumen de 100 ml del NN.

[NN] ( $\mu\text{g/l}$ )	A		
	1ª Serie	2ª Serie	3ª Serie
30	0'0450	0'0423	0'0387
50	0'0516	0'0502	0'0514
60	0'0572	0'0565	0'0559
80	0'0643	0'0627	0'0634
100	0'0757	0'0762	0'0747

No se toman valores de concentración superiores a 100  $\mu\text{g/l}$ , a pesar de que este valor es aún relativamente bajo para ser el límite superior debido a que las concentraciones superiores ensayadas presentan una pendiente diferente a la que presenta este tramo inferior, esto se puede deber a fenómenos de absorción sobre la superficie del gel. La representación gráfica de estos datos se recoge en la figura IV.12, donde se puede observar una relación lineal entre ambas variables.

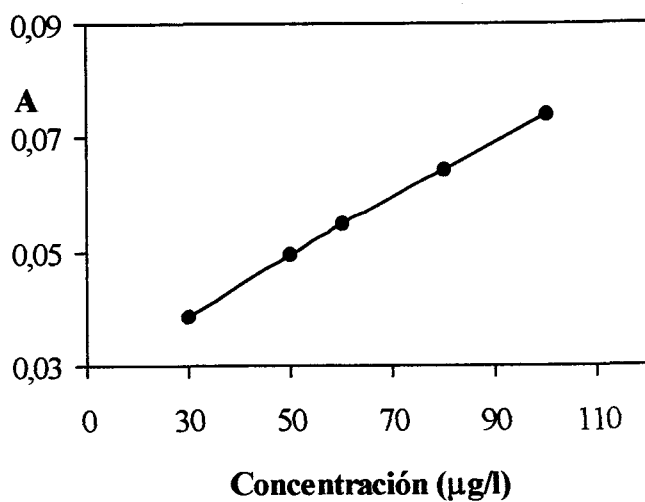


Figura III.12.- Cumplimiento de la ley de Lambert-Beer para un volumen final de 100 ml de NN.

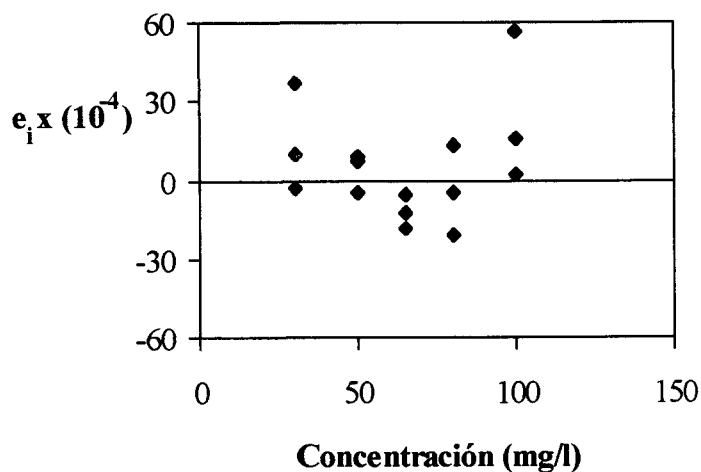


Figura IV.16.- Representación de los residuales frente a la concentración de NN.

La representación de los residuales (figura IV.16) pone de manifiesto una distribución aleatoria de los mismos que indica el cumplimiento de la condición de

homoscedasticidad. Al realizar un análisis de la varianza , se aplica el test de fallo de ajuste en el rango de concentración de 30 a 100 µg/l, comprobando que no hay curvatura (P = 13'97%) y en consecuencia el ajuste lineal es aceptable.

Tabla IV.13.- Resultados del ANOVA en el rango de concentraciones 30 a 100 µg/l.

Fuente	SM <sup>1</sup>	g.l	MC <sup>2</sup>	F <sub>exp</sub>	P (%)
Modelo	1'91x10 <sup>-3</sup>	1	1'91x10 <sup>-3</sup>	604'94	0'00
Residuales	0'41x10 <sup>-4</sup>	13	0'03x10 <sup>-4</sup>		
Fallo de ajuste	1'68x10 <sup>-5</sup>	3	0'56x10 <sup>-5</sup>	2'29	13'97
Error puro	2'43x10 <sup>-5</sup>	10	0'24x10 <sup>-5</sup>		

(1) Suma de cuadrados; (2) Media de cuadrados.

La función de calibrado establecida es:  $A = 0'027 + 4'68x10^{-4} \cdot [NN]$ , cuyos parámetros estadísticos se muestran en la tabla IV. 14.

Tabla IV.14.-Parámetros estadísticos.

Parámetros	Valor
$s_{R,C}$	1'78x10 <sup>-3</sup>
$r^2$ (%)	97'90
$s_b$	1'90x10 <sup>-5</sup>
$s_a$	1'32x10 <sup>-3</sup>

**Linealidad**

$$\text{Lin} (\%) = [1 - \text{D.E.R. (b)}] \cdot 100 = 95'94 \%$$

### Sensibilidad

a) Sensibilidad de calibrado:  $S_{cal.} = b = 4'68 \times 10^{-4} (\mu\text{g/l})^{-1}$ .

b) Sensibilidad analítica:  $S_{anal.} = (s_{R,C}/b) = 3'80 \mu\text{g/l}$ .

### Límite de detección y límite de cuantificación

Siguiendo el procedimiento operatorio propuesto para las disoluciones del blanco, se obtienen los resultados recogidos en la tabla IV.15, de la que se calcula un valor medio para la absorbancia de  $2'52 \times 10^{-3}$  y una desviación estándar de  $1'44 \times 10^{-3}$ .

Tabla IV.15.-Repetibilidad del blanco

Disolución n°	A (blanco)	Disolución n°	A (blanco)
1	0'0034	6	0'0019
2	0'0023	7	0'0020
3	0'0010	8	0'0017
4	0'0019	9	0'0028
5	0'0020	10	0'0062

Los límites de detección y de cuantificación son  $9'25 \mu\text{g/l}$  y  $30'83 \mu\text{g/l}$  respectivamente.

### Rango dinámico lineal

El intervalo de aplicación del método esta comprendido entre el límite inferior, que es el límite de cuantificación,  $30'83 \mu\text{g/l}$  y el límite superior, determinado por el valor superior de concentración que está dentro del intervalo lineal especificado por el test de fallo de ajuste y que es  $100 \mu\text{g/l}$ .  $R.D.L. = 0.1 (\text{Lim}_{sup}/\text{Lim}_{inf}) = 0'32$ .



#### 4.2.2.- Método para 500 ml.

Para establecer el método para un volumen de 500 ml, es necesario volver a optimizar el tiempo de equilibración. Para ello se preparan disoluciones conteniendo cada una de ellas 100  $\mu\text{g/l}$  de NN, 25 ml de disolución de ClH 1 M, 10% etanol y aplicamos el método operatorio establecido, obteniendo los resultados que se reflejan la figura IV-17.

Al observar estos resultados se puede ver que un tiempo de 20 minutos se puede considerar suficiente para obtener la máxima señal estable.

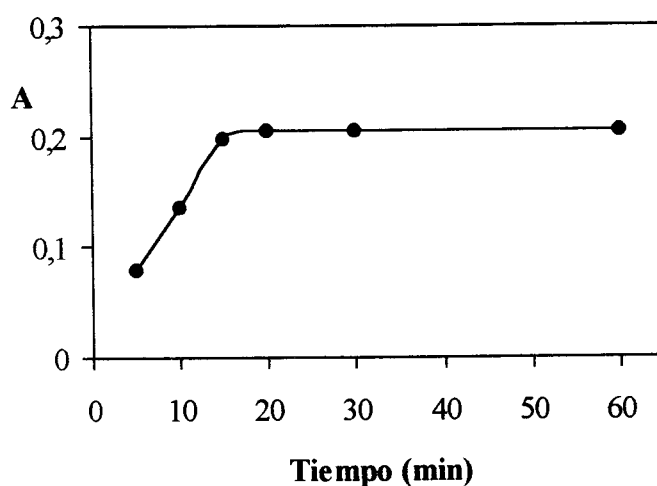


Figura IV.17.- Tiempo de equilibración para 500 ml.

#### Cumplimiento de la ley de Lambert-Beer para 500 ml.

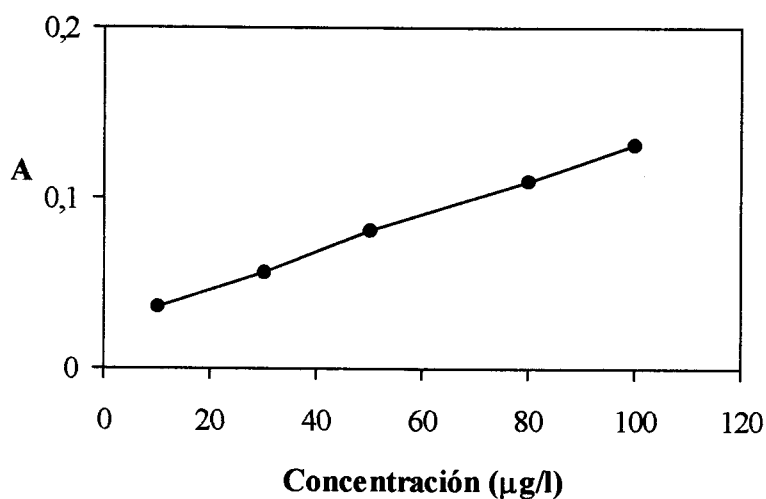
Para establecer la relación entre la absorbancia y la concentración se preparan una serie de disoluciones, todas ellas por triplicado, conteniendo concentraciones de analito comprendidas entre 10 y 100  $\mu\text{g/l}$ , a las que se agrega 25 ml de disolución de HCl 1 M y un 10% de etanol, enrasando hasta un volumen de 500 ml con agua desionizada. Aplicando el procedimiento establecido se obtienen los datos recogidos en la tabla IV.16.

No se consideran valores de concentración superiores a 100  $\mu\text{g/l}$ , debido a que para

concentraciones superiores la pendiente difiere de la que presenta el tramo inferior, esto se puede deber a fenómenos de absorción sobre la superficie del gel.

**Tabla IV.16.-** Cumplimiento de la ley de Lambert-Beer para un volumen de 500 ml del NN.

[NN] ( $\mu\text{g/l}$ )	A		
	1ª Serie	2ª Serie	3ª Serie
10	0'0366	0'0399	0'0372
30	0'0563	0'0542	0'0598
50	0'0811	0'0796	0'0741
80	0'1099	0'1103	0'1138
100	0'1307	0'1319	0'1295



**Figura IV.18.-** Cumplimiento de la ley de Lambert-Beer para un volumen final de 500 ml de NN.

El ANOVA (tabla IV.18), donde se recoge el test de fallo de ajuste, no significativo ( $P = 60,96\%$ ) y en consecuencia hay un buen ajuste lineal en el rango de concentración de

10 a 100 µg/l. La representación de los residuales (figura IV.19) pone de manifiesto una distribución aleatoria de los mismos que implica que se cumple la condición de homoscedasticidad.

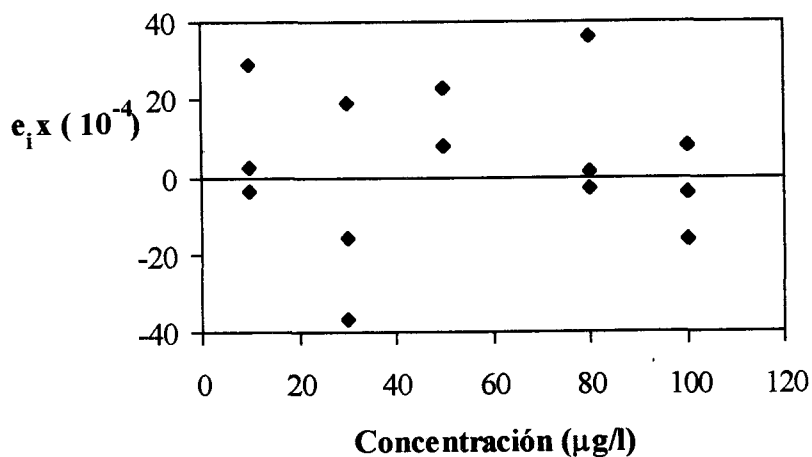


Figura IV.19.- Representación de los residuales frente a la concentración de NN.

Tabla IV.18.- Resultados del ANOVA en el rango de concentraciones 10 a 100 µg/l de NN.

Fuente	SM <sup>1</sup>	g.l	MC <sup>2</sup>	F <sub>exp</sub>	P (%)
Modelo	1'75x10 <sup>-2</sup>	1	1'75x10 <sup>-2</sup>	3'10x10 <sup>3</sup>	0'00
Residuales	0'73x10 <sup>-4</sup>	13	0'06x10 <sup>-4</sup>		
Fallo de ajuste	1'17x10 <sup>-5</sup>	3	0'39x10 <sup>-5</sup>	0'63	60'96
Error puro	6'14x10 <sup>-5</sup>	10	0'61x10 <sup>-5</sup>		

(1) Suma de cuadrados; (2) Media de cuadrados.

Posteriormente se establece la función de calibrado:  $A = 0'026 + 1'04 \cdot 10^{-3} \cdot [NN]$ , cuyos parámetros estadísticos se muestran en la tabla IV.19.

Tabla IV.9.-Parámetros estadísticos.

Parámetros	Valor
$s_{R,C}$	$2'37 \times 10^{-3}$
$r^2$ (%)	99'58
$s_b$	$1'87 \times 10^{-5}$
$s_a$	$1'18 \times 10^{-3}$

**Linealidad**

$$\text{Lin (\%)} = [1 - \text{D.E.R. (b)}] \cdot 100 = 98'20 \%$$

**Sensibilidad**

a) Sensibilidad de calibrado:  $S_{\text{cal}} = b = 1'04 \times 10^{-3} (\mu\text{g/l})^{-1}$ .

b) Sensibilidad analítica:  $S_{\text{anal}} = (s_{R,C}/b) = 2'28 \mu\text{g/l}$ .

**Límite de detección y límite de cuantificación**

Tabla IV.20.-Repetibilidad del blanco

Disolución n°	A (blanco)	Disolución n°	A (blanco)
1	0'0037	6	0'0039
2	0'0036	7	0'0031
3	0'0034	8	0'0036
4	0'0037	9	0'0032
5	0'0032	10	0'0030

El valor medio de la señal es de  $3'44 \times 10^{-3}$  y la desviación estándar de  $3'02 \times 10^{-4}$  y los

límites de detección y cuantificación son 0'87  $\mu\text{g/l}$  y 2'91  $\mu\text{g/l}$  respectivamente.

### Rango dinámico lineal

El intervalo de aplicación del método esta comprendido entre el límite inferior, que es el límite de cuantificación, 2'91  $\mu\text{g/l}$  y el límite superior, determinado por el valor superior de concentración que está dentro del intervalo lineal especificado por el test de fallo de ajuste y que es 100  $\mu\text{g/l}$ . R.D.L. = 0'1 ( $\text{Lim}_{\text{sup}}/\text{Lim}_{\text{inf}}$ ) = 3'43.

En la tabla IV.21 se reúnen comparativamente todos los resultados. En ella queda claro que al aumentar el volumen aumenta la sensibilidad por lo que para la aplicación del método a las muestras reales, para este analito, se empleará el volumen de 500 ml, ya que la sensibilidad del método de 100 ml no es adecuada para las muestras. A partir de ahora seguiremos exponiendo el resto de los parámetros analíticos para el método que utiliza 500 ml.

**Tabla IV.21.- Comparación de la sensibilidad para NN en los dos volúmenes.**

Parámetro	100 ml	500 ml
$A = a + b [\text{NN}]$	$A = 0'027 + 4'68 \times 10^{-4} [\text{NN}]$	$A = 0'026 + 1'04 \times 10^{-3} [\text{NN}]$
Intervalo lineal ( $\mu\text{g/l}$ )	30-100	3-100
LD ( $\mu\text{g/l}$ )	9'25	0'89
LQ ( $\mu\text{g/l}$ )	30'83	2'91
$S_{\text{analítica}} (\mu\text{g/l})^{-1}$	3'80	2'28
$S_{\text{calibrado}} (\mu\text{g/l})$	$4'68 \times 10^{-4}$	$1'04 \times 10^{-3}$

### Precisión

#### a) Repetibilidad del método propuesto aplicado a una muestra dada.

Se preparan 10 disoluciones correspondientes a una concentración intermedia del rango dinámico lineal anteriormente determinado, 50  $\mu\text{g/l}$ .

Tabla IV.21- Repetibilidad del método.

Disolución nº	A (muestra)	Disolución nº	A (muestra)
1	0'0884	6	0'0824
2	0'0748	7	0'0886
3	0'0752	8	0'0894
4	0'0718	9	0'0738
5	0'0724	10	0'0750

El valor medio que se obtiene de la señal de absorbancia es 0'0792 y la desviación estándar es de  $7'23 \times 10^{-3}$ , lo que supone una desviación estándar relativa de 9'13%.

**b) Repetibilidad del método a partir de los datos del calibrado.**

En la tabla IV.22 se muestran los valores calculados a partir de la función de calibrado previamente establecido en el apartado 4.2.

Tabla IV.22.- Parámetros estadísticos.

[NN] ( $\mu\text{g/l}$ )	$s_c$	D.E.R (%)
10	1'64	16'4
30	1'51	5'0
50	1'44	2'9
80	1'52	1'9
100	1'66	1'6

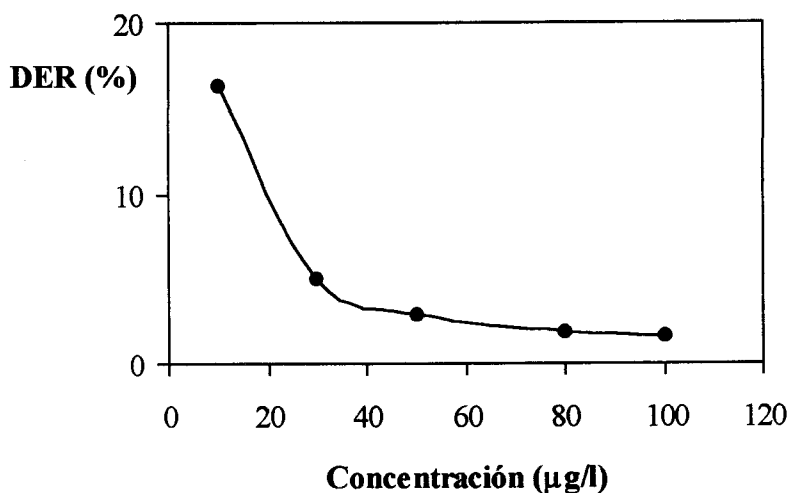


Figura IV.20.- Repetibilidad en función de la concentración de NN.

Existe una diferencia en la repetibilidad obtenida al realizar diez réplicas de 50 µg/l (9,13%) y la obtenida a partir de los datos del calibrado (2,9%). La causa de esta diferencia podría encontrarse en el distinto número de réplicas utilizando en ambos casos.

#### 5.- Verificación de la independencia de las señales analíticas.

Dado que el método se va a aplicar a muestras donde se encuentran ambos analitos, se hace necesario demostrar que la presencia de uno no influye en los resultados obtenidos para el otro. Por ello se hizo una experiencia en la que se efectuaron distintos calibrados para cada analito, en presencia de una cantidad constante del otro, todo ello operando de acuerdo con el método propuesto. El calibrado se realiza entre 50 y 650 µg/l para ER y entre 10 y 100 µg/l para NN. En la tabla IV.24 hemos incluido los resultados experimentales obtenidos.

Tabla IV.24.- Funciones de calibración de ER y NN en ausencia y presencia de NN y ER respectivamente.

Analito	Interferente	Concentración ( $\mu\text{g/l}$ )	Pendiente	Ordenada	P (%)
ER	NN	0'0	$9'15 \times 10^{-4}$	$1'04 \times 10^{-3}$	73'19
		30'0	$8'98 \times 10^{-4}$	$5'10 \times 10^{-3}$	14'00
		50'0	$9'13 \times 10^{-4}$	$-5'97 \times 10^{-3}$	93'02
		100'0	$9'14 \times 10^{-4}$	$-9'65 \times 10^{-4}$	84'49
NN	ER	0'0	$1'04 \times 10^{-3}$	$1'00 \times 10^{-2}$	76'08
		50'0	$1'09 \times 10^{-3}$	$-4'13 \times 10^{-4}$	21'96
		200'0	$1'19 \times 10^{-3}$	$3'6 \times 10^{-3}$	22'22
		400'0	$1'08 \times 10^{-3}$	$6'1 \times 10^{-2}$	8'89

Las pendientes de cada serie de funciones de calibrado se compararon con la obtenida únicamente con patrones, según la metodología recogida en el capítulo I. Como conclusión se puede señalar que la presencia de NN en concentraciones comprendidas entre 30 y 100  $\mu\text{g/l}$  no afecta a la función de calibrado de ER. Igualmente la presencia de concentraciones de ER comprendidas entre 50 y 400  $\mu\text{g/l}$  tampoco afectan a la función de calibrado de NN. Se comprueba que no hay diferencia significativa entre las pendientes de las correspondientes funciones de calibrado comparadas, ya que en todos los casos se obtiene un valor de P superior al 1 %.

#### 6.- Aplicaciones Analíticas.

Para comprobar la utilidad del método propuesto, se aplicó a la determinación de ambos colorantes en las siguientes muestras: colorante Escarlata 4R de Sancolor S.A., colorante Escarlata 4R de los Laboratorior Utter, grosella "Dama de Baza", lápiz pastelero "Vahiné", Espumas dulces "Party pack. Animallow", caramelo sabor fresa mentolada "Halls" y mermelada sabor fresa "Halcón". Se aplica la misma metodología de validación que en los capítulos previos.



### 6.1.- Validación del método. Aplicación al análisis del contenido de Escarlata 4R en las muestras estudiadas.

Para el análisis de ER se establece el calibrado con adición de patrón para cada una de las muestras anteriormente citadas, añadiendo en todos los matraces una cantidad fija de 100 µg/l de la muestra de Escarlata 4R de Sancolor S.A, 100 µg/l de Escarlata 4R de los laboratorios Utter, 0'2 ml de la grosella, 0'5 ml de una disolución preparada pesando 1'066 gramos disueltos en 10 ml de agua de ósmosis inversa del lápiz pastelero, 1 ml de una disolución formada cuando se disuelve 4'362 gramos en 10 ml de agua de ósmosis inversa de la espuma dulce, 1 ml de la disolución formada al disolver una pieza del caramelo de fresa mentolada Halls de 3'670 gramos en 10 ml de agua de ósmosis inversa y 1 ml de la disolución formada al disolver 6'175 gramos de la mermelada de fresa Halcón en 20 ml de agua de ósmosis inversa. Los distintos calibrados de Youden se establece añadiendo volúmenes de muestra entre 0'5 y 5 ml en el caso de la muestra de Escarlata 4R de sancolor S.A, entre 0'5 y 5 ml para Escarlata 4R de los Laboratorios Utter, entre 0'2 y 0'5 para la grosella, entre 0'3 y 1 ml de la disolución del lápiz pastelero, entre 1 y 7 ml de la disolución de espuma dulce, entre 1 y 7 ml de la disolución del caramelo Halls y entre 0'5 y 3 ml de la disolución de mermelada. En todos los casos se enrrasa con agua desionizada hasta un volumen final de 100 ml y se aplica el método operatorio establecido para tal fin.

Tabla IV.25.- Resultados obtenidos para CA y CY para escarlata 4R de Sancolor S.A y escarlata 4R de los laboratorios Utter.

Escarlata 4R de Sancolor S.A				Escarlata 4R de los Laboratorios Utter			
CA		CY		CA		CY	
[ER] (µg/l)	A	V (ml)	A	[ER] (µg/l)	A	V (ml)	A
0	0'0942	0'005	0'0465	0	0'0914	0'005	0'0381
50	0'1393	0'010	0'0917	50	0'1372	0'010	0'0832
100	0'2742	0'020	0'2670	300	0'3698	0'030	0'2533
200	0'4553	0'050	0'4499	500	0'5447	0'050	0'4193

**Tabla IV.26.-** Resultados obtenidos para CA y CY para la grosella Dama de Baza y la lápiz pastelero Vahiné.

Grosella Dama de Baza				Lápiz pastelero Vahiné			
CA		CY		CA		CY	
[ER] ( $\mu\text{g/l}$ )	A	V (ml)	A	[ER] ( $\mu\text{g/l}$ )	A	V (ml)	A
0	0'3911	0'002	0'3910	0	0'1775	0'003	0'1015
50	0'4376	0'001	0'1925	50	0'2286	0'005	0'1778
100	0'4870	0'005	0'9872	100	0'2652	0'007	0'2208
300	0'6725	0'010	1'9238	400	0'5432	0'010	0'3208

**Tabla IV.27.-** Resultados obtenidos para CA y CY para el caramelo sabor fresa mentolada Halls y para la espuma dulce Party Pack. Animallovs.

Caramelo de fresa mentolada Halls				Espuma dulce Party Pack. Animallovs			
CA		CY		CA		CY	
[ER] ( $\mu\text{g/l}$ )	A	V (ml)	A	[ER] ( $\mu\text{g/l}$ )	A	V (ml)	A
0	0'0576	0'010	0'0580	0	0'0866	0'010	0'0870
50	0'1034	0'020	0'1126	50	0'1349	0'020	0'1416
100	0'1481	0'050	0'2926	100	0'1766	0'050	0'3602
300	0'3360	0'070	0'3813	300	0'3598	0'070	0'4964

Tabla IV.28.- Resultados obtenidos para CA y CY para la mermelada de fresa Halcón.

Mermelada de fresa Halcón			
CA		CY	
[ER] (µg/l)	A	V (ml)	A
0	0'1410	0'005	0'0740
50	0'1802	0'010	0'1481
200	0'3282	0'020	0'2904
400	0'5062	0'030	0'4036

Tabla IV.29.- Resultados estadísticos obtenidos en la determinación de CM de Sancolor S.A.

Parámetros	CP	CA	CY
n	15	4	4
a	$-2'71 \times 10^{-3}$	0'093	$1'38 \times 10^{-3}$
b	$9'168 \times 10^{-4}$	$9'099 \times 10^{-4}$	8'94
$s_{R,c}$	$3'29 \times 10^{-3}$	$1'19 \times 10^{-3}$	$2'23 \times 10^{-3}$
$s_p$ t (b)	$3'09 \times 10^{-3}$		
$b_p$	0'665 (P = 51'61 %)		
a'	-0'0146	0'0926	-----
BY	-----	-----	0'0159
$c_{x,S}$	101'3	-----	-----
$c_{x,A}$	-----	99'6	-----
t (c)	0'92 (P = 37'12 %)		

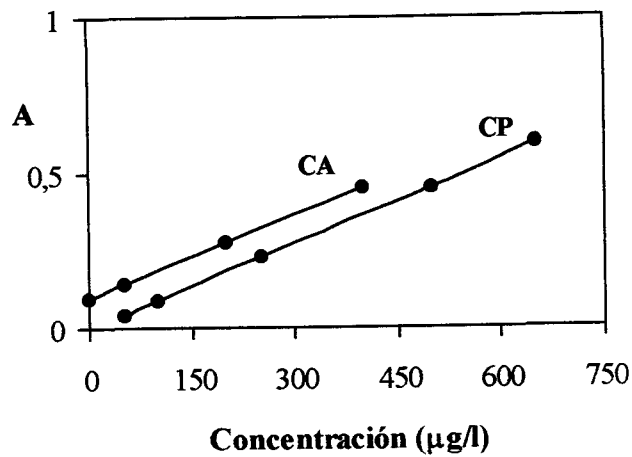


Figura IV.21 .- CP y CA para la determinación de ER en la muestra de Sancolor S.A.

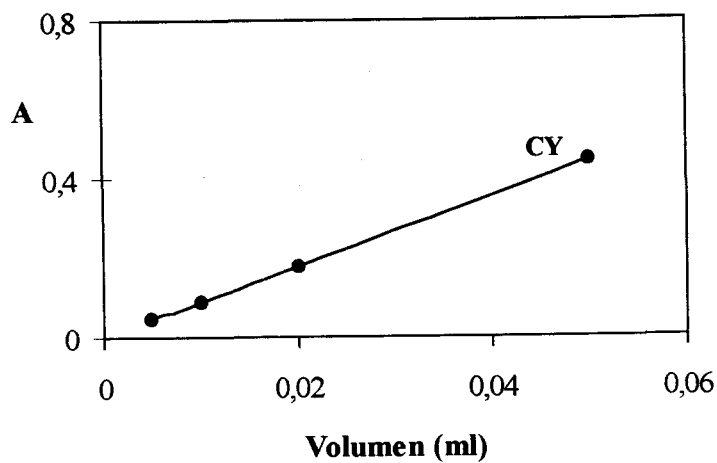


Figura IV.22.- Calibrado de Youden (CY) para la determinación de ER en la muestra de Sancolor S.A.

Tabla IV.26.- Resultados estadísticos obtenidos en la determinación de ER de los laboratorios Utter.

Parámetros	CP	CA	CY
n	15	4	4
a	$-2'71 \times 10^{-3}$	0'0924	$-2'4 \times 10^{-3}$
b	$9'168 \times 10^{-4}$	$9'095 \times 10^{-4}$	8'45
$s_{R,c}$	$3'29 \times 10^{-3}$	$3'74 \times 10^{-3}$	$2'18 \times 10^{-3}$
$s_p$	$3'35 \times 10^{-3}$		
t (b)	0'712 (P = 48'74 %)		
$b_p$	$9'15 \times 10^{-4}$		
$a'$	-0'0140	0'0913	-----
BY	-----	-----	0'0116
$c_{x,S}$	102'5	-----	-----
$c_{x,A}$	-----	102'4	-----
t (c)	0'053 (P = 95'84 %)		

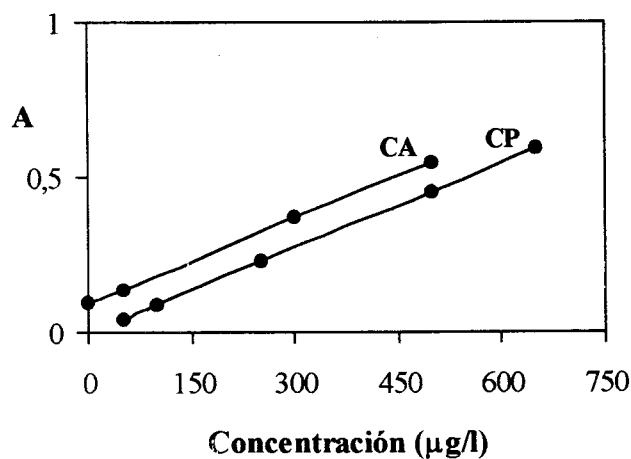


Figura IV.21 .- Calibrado con patrones (CP) y calibrado con adición de patrón (CA) para la determinación de ER en la muestra de los Lab. Utter.

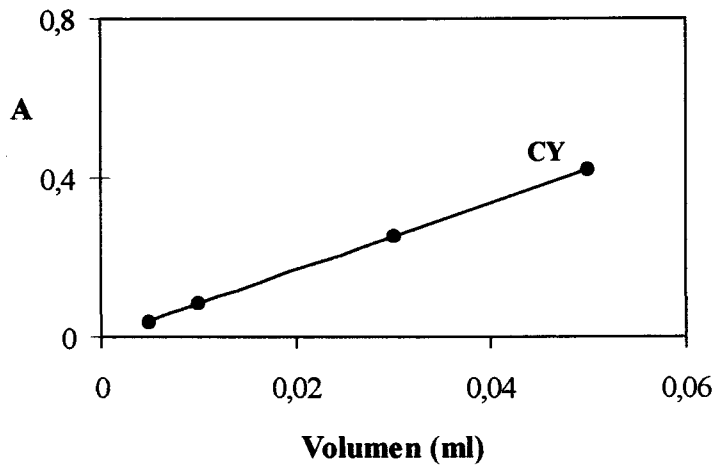


Figura IV.22.- Calibrado de Youden (CY) para la determinación de ER en la muestra de los Labor. Utter.

Tabla IV.29.- Resultados estadísticos obtenidos en la validación del método para ER en la grosella.

Parámetros	CP	CA	CY
n	15	4	4
a	$-2'71 \times 10^{-3}$	0'3912	$7'15 \times 10^{-3}$
b	$9'16 \times 10^{-4}$	$9'38 \times 10^{-4}$	192'78
$s_{R,c}$	$3'29 \times 10^{-3}$	$7'89 \times 10^{-4}$	0'0135
$s_p$	$3'07 \times 10^{-3}$		
t(b)	1'58 (P = 13'49 %)		
$b_p$	$9'18 \times 10^{-4}$		
$a^2$	-0'0150	0'3935	-----
BY	-----	-----	0'0221
$c_{x,s}$	418'24	-----	-----
$c_{x,A}$	-----	420'86	-----
t ©	1'26 (P = 22'57 %)		

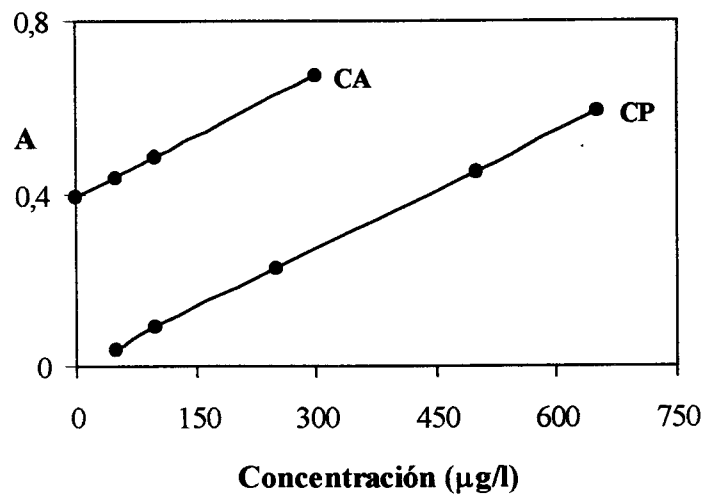


Figura IV. 25.- Calibrado con patrones (CP) y calibrado con adición de patrón (CA) para la determinación de ER en la grosella.

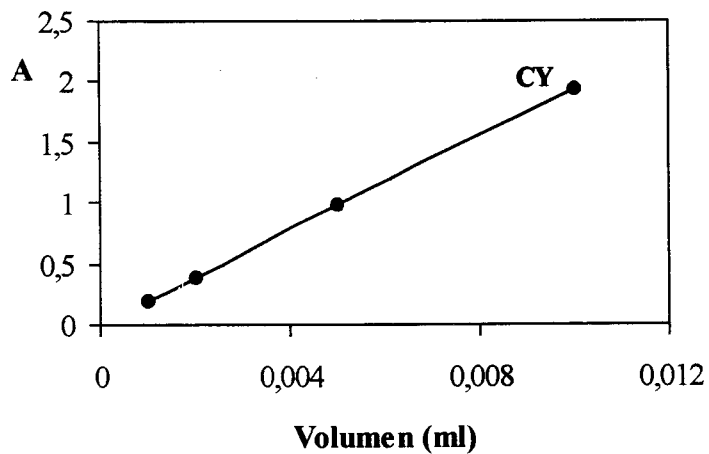


Figura IV.26.- Calibrado de Youden (CY) para la determinación de ER en la grosella.

Tabla IV.32.- Resultados estadísticos obtenidos en la determinación de ER en el Lapiz pastelero.

Parámetros	CP	CA	CY
n	15	4	4
a	$-2'71 \times 10^{-3}$	0'1783	0'0140
b	$9'16 \times 10^{-4}$	$9'11 \times 10^{-4}$	30'54
$s_{R,c}$	$3'29 \times 10^{-3}$	$4'53 \times 10^{-3}$	$9'80 \times 10^{-3}$
$s_p$	$3'48 \times 10^{-3}$		
t (b)	0'42 (P = 68'04 %)		
$b_p$	$9'16 \times 10^{-4}$		
a'	-0'0140	0'1776	-----
BY	-----	-----	0'0280
$c_{x,S}$	178,49	-----	-----
$c_{x,A}$	-----	178'60	-----
t (c)	0'05 (P = 95'99 %)		

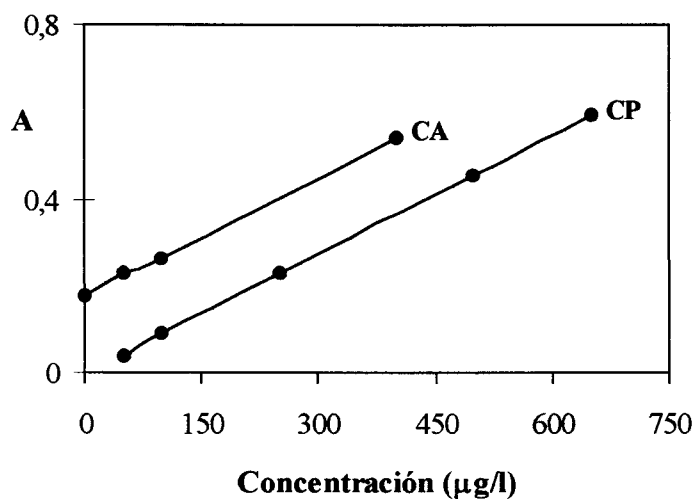


Figura IV.29.- Calibrado con patrones (CP) y calibrado con adición de patrón (CA) para la determinación de ER en el lápiz pastelero.



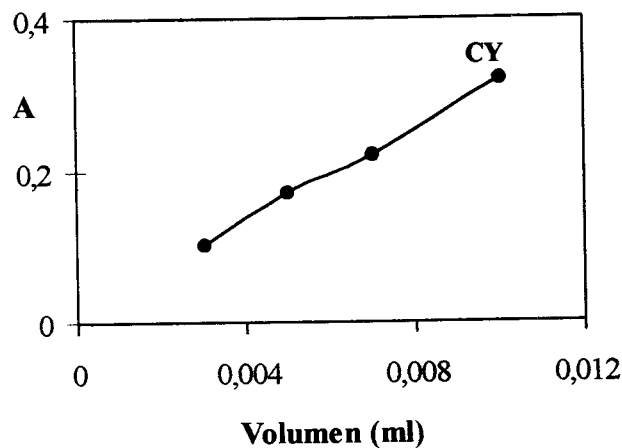


Figura IV. 30.- Calibrado de Youden (CY) para la determinación de la cantidad de ER en el lápiz pastelero.

Tabla IV.35.- Resultados estadísticos obtenidos en la determinación de ER en el Caramelo Halls.

Parámetros	CP	CA	CY
n	15	4	4
a	$-2'71 \times 10^{-3}$	0'057	$5'34 \times 10^{-3}$
b	$9'16 \times 10^{-4}$	$9'29 \times 10^{-4}$	5'49
$s_{R,c}$	$3'29 \times 10^{-3}$	$1'31 \times 10^{-3}$	0'011
$s_p$	$3'09 \times 10^{-3}$		
t (b)	0'92 (P = 37'21 %)		
$b_p$	$9'17 \times 10^{-4}$		
a'	-0'0150	0'0581	-----
BY	-----	-----	0'0203
$c_{x,S}$	56'95	-----	-----
$c_{x,A}$	-----	57'49	-----
t (c)	0'278 (P = 78'48 %)		

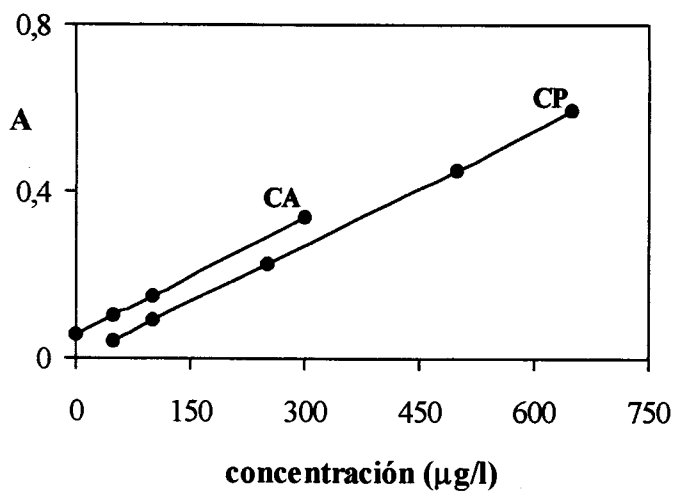


Figura IV.33.- Calibrado con patrones (CP) y calibrado con adición de patrón (CA) para la determinación de ER en el caramelo Halls.

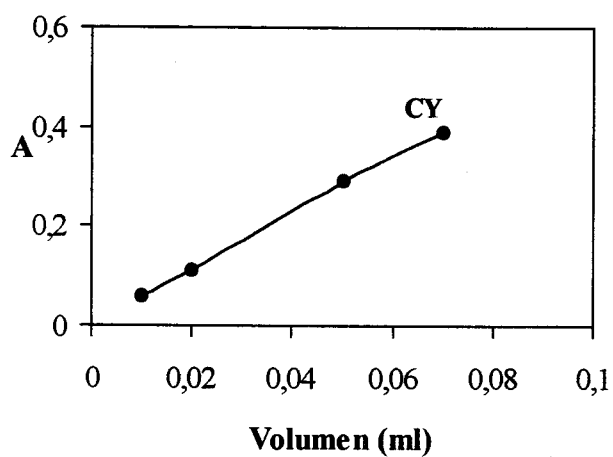


Figura IV. 34.- Calibrado de Youden (CY) para la determinación de la cantidad de ER en el caramelo Halls.

Tabla IV.35.- Resultados estadísticos obtenidos en la determinación de ER en la Espuma dulce.

Parámetros	CP	CA	CY
n	15	4	4
a	$-2'71 \times 10^{-3}$	0'0873	0'0114
b	$9'16 \times 10^{-4}$	$9'08 \times 10^{-4}$	6'93
$s_{R,c}$	$3'29 \times 10^{-3}$	$1'94 \times 10^{-3}$	$7'6 \times 10^{-3}$
$s_p$	$3'14 \times 10^{-3}$		
t (b)	0'56 (P = 58'37 %)		
$b_p$	$9'16 \times 10^{-4}$		
$a'$	-0'0140	0'0836	-----
BY	-----	-----	0'0254
$c_{x,S}$	2'53	-----	-----
$c_{x,A}$	-----	2'20	-----
t (c)	0'17 (P = 86'71 %)		

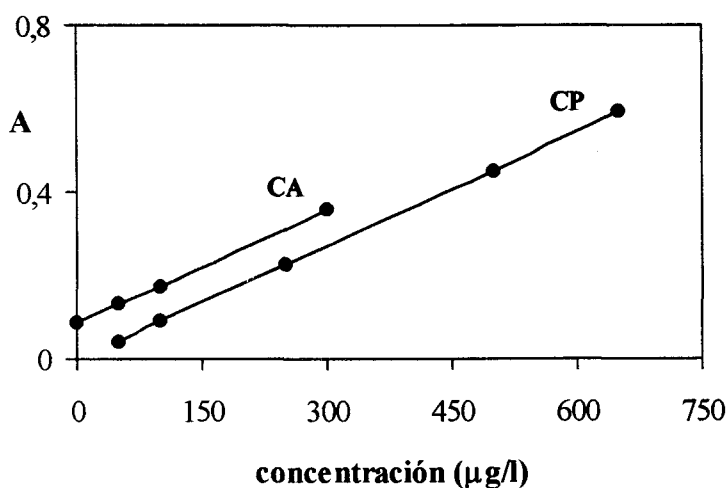


Figura IV.33.- Calibrado con patrones (CP) y calibrado con adición de patrón (CA) para la determinación de ER en la Espuma dulce.

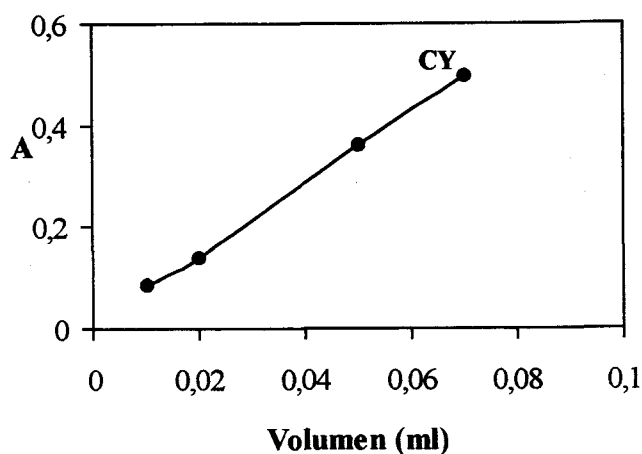


Figura IV. 34.- Calibrado de Youden (CY) para la determinación de la cantidad de ER en la Espuma dulce.

Tabla IV.35.- Resultados estadísticos obtenidos en la determinación de ER en la mermelada.

Parámetros	CP	CA	CY
n	15	4	4
a	$-2'71 \times 10^{-3}$	0'139	0'014
b	$9'16 \times 10^{-4}$	$9'22 \times 10^{-4}$	13'23
$s_{R,c}$	$3'29 \times 10^{-3}$	$5'17 \times 10^{-3}$	0'010
$s_p$	$3'60 \times 10^{-3}$		
t (b)	0'48 (P = 63'81 %)		
$b_p$	$9'17 \times 10^{-4}$		
$a'$	-0'0149	0'1399	-----
BY	-----	-----	0'0289
$c_{x,S}$	138'6	-----	-----
$c_{x,A}$	-----	137'4	-----
t (c)	0'54 (P = 59'66 %)		

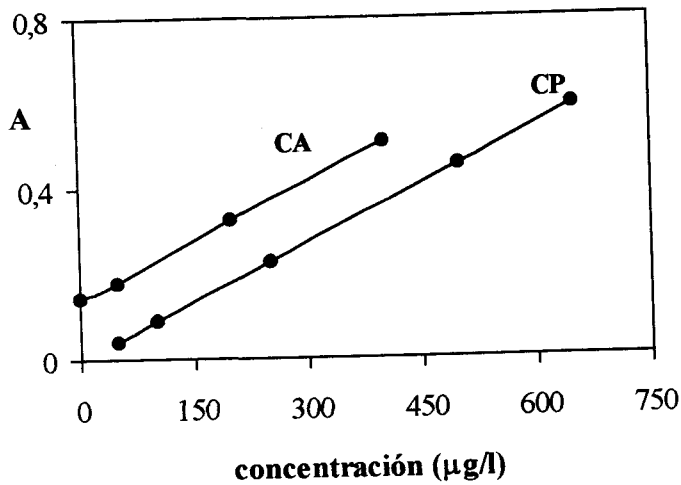


Figura IV.33.- Calibrado con patrones (CP) y calibrado con adición de patrón (CA) para la determinación de ER en la mermelada.

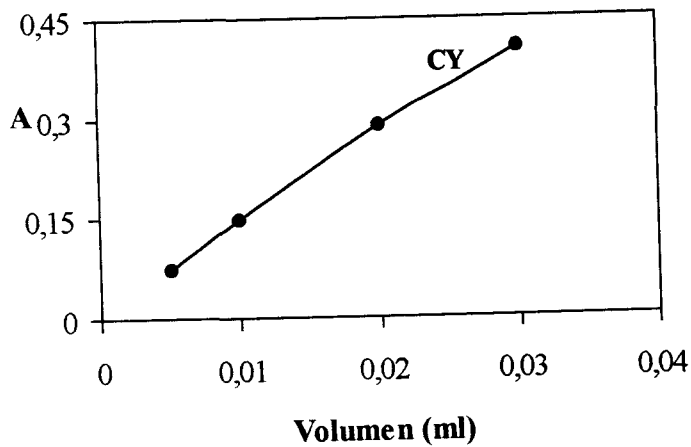


Figura IV. 34.- Calibrado de Youden (CY) para la determinación de la cantidad de ER en la mermelada.

Trás aplicar la metodología se comprueba que las varianzas de los calibrados con

patrones y de los calibrados con adición de patrón no se diferencian significativamente como se pone de manifiesto al obtener P en todos los casos superior al 5% ( $P = 12'15, 51'92, 5'56, 39'87, 14'51, 28'78$  y  $32'48$  %), por lo que se concluye que las varianzas son iguales. Lo mismo ocurre con la pendiente, ya que al compararlas tampoco se obtienen diferencias significativas entre ambas, ( $P > 1\%$ ).

En todas las muestra se encuentra un error sistemático constante, ya que  $a_y$  no esta incluido en el intervalo calculado para el nuevo valor de la ordenada en el origen del calibrado con patrones por lo que se elimina restando el blanco de Youden a la señal obtenida. Al comparar el contenido de analito en la disolución problema calculado a partir del calibrado con patrones ( $c_{x,S}$ ) y el contenido a partir del calibrado con adición de patrón ( $c_{x,A}$ ), se concluye que el método es exacto para la determinación de ER en las muestra estudiadas. Por todo esto se considera que el método queda validado para la determinación de ER en las distintas muestras.

#### Análisis de la muestra.

Una vez validado el método para analizar este tipo de muestras fue aplicado el método operatorio establecido y a la señal obtenida se aplica directamente el calibrado con patrones para calcular la concentración de analito. Cada determinación se realiza por triplicado.

Tabla IV.23.- Contenido de ER en la escarlata de Sancolor S.A, en la Escarlata de los Laboraorios Utter y de la grosella Dama de Baza.

Serien <sup>o</sup>	Escarl. Sancolor S.A		Escarl. Laborat. Utter		Grosella Dama de Baza	
	A	C( $\mu\text{g/l}$ )	A	C( $\mu\text{g/l}$ )	A	C( $\mu\text{g/l}$ )
1	0'0933	100'34	0'0900	100'90	0'3978	425'58
2	0'0942	101'3	0'0907	101'60	0'3980	425'76
3	0'0928	99'80	0'0089	99'40	0'4091	437'90

**Tabla IV.23.-** Contenido de ER en las muestras de lápiz pastelero, caramelo de fresa mentolada Halls Espumas dulces y Mermelada de fresa Halcón.

Serien°	Lápiz pastelero		Caramelo Halls		Espumas dulces		Mermelada	
	A	C(µg/l)	A	C(µg/l)	A	C(µg/l)	A	C(µg/l)
1	0'1775	178'49	0'0578	57'17	0'0825	76'96	0'1412	138'82
2	0'1775	178'49	0'0580	57'38	0'0770	72'05	0'1404	137'95
3	0'1774	178'38	0'0576	56'95	0'0860	82'53	0'1326	129'44

La desviación estándar relativa de estos datos es de: 0'76% para Escarlata 4R de Sancolor S.A; 1'12% para Escarlata 4R de los Laboratorios Utter; 1'65% para la grosella Dama de Baza; 0'09% para el lápiz pastelero; 0'42% para el caramelo Halls; 6'78% para la espuma dulce y 3'83% para la mermelada Halcón.

La concentración media que se obtiene para las muestras de Escarlata 4R de Sancolor S.A y de los Laboratorios Utter es de 100'48 µg/l y de 100'60 µg/l respectivamente, ya que se adicionó una cantidad de 100 µg/l de analito en ambas y la pureza suministrada por el fabricante es la misma (82%), estableciendo una relación entre el valor obtenido por nuestro método y el añadido de acuerdo con los datos suministrados por el fabricante, obtenemos una pureza del 82'40% y del 82'52% en cada caso, que al compararlas estadísticamente con el valor suministrados por el fabricante, para un nivel de confianza del 95'5%, obtenemos  $P = 34'95\%$  y  $43'20\%$ , por lo que podemos concluir que no hay diferencias significativas, en ambas muestras, entre el dato de pureza suministrado por el fabricante y el encontrado por nosotros.

Teniendo en cuenta los distintos factores de dilución y en su caso el peso de la muestra, el contenido de ER es de 214'87 mg/l en la grosella Dama de Baza, 334'60 µg/g en el lápiz pastelero Vahiné, 15'57 µg/g en el caramelo de fresa mentolada Halls, 17'69 µg/g en la espuma dulce y 43'85 µg/g en la mermelada de fresa Halcón.

### 6.2.- Validación del método. Aplicación al análisis del contenido de 1-naftilazo-2-naftol en las muestras estudiadas anteriormente.

Para el análisis de 1-naftilazo-2-naftol (NN) se establece el calibrado con adición de patrón, a las muestras anteriormente estudiadas, añadiendo en todos los matraces una cantidad fija de 100 µg/l de la muestra de Escarlata 4R de Sancolor S.A, 100 µg/l de Escarlata 4R de los laboratorios Utter, 2 ml de la grosella, 5 ml de una disolución preparada pesando 1'066 gramos disueltos en 10 ml de agua de ósmosis inversa del lápiz pastelero, 5 ml de una disolución formada cuando se disuelve cuatro piezas del producto de 17'572 gramos en 10 ml de agua de ósmosis inversa de la espuma dulce, 7 ml de la disolución formada al disolver una cantidad del caramelo Halls de 3'670 gramos en 10 ml de agua de ósmosis inversa y 7 ml de la disolución formada al disolver 12'350 gramos de mermelada de fresa Hácón en 40 ml de agua de ósmosis inversa. Los distintos calibrados de Youden se establece añadiendo volúmenes de muestra entre 1 y 7 ml en el caso de la muestra de Escarlata 4R de sancolor S.A, entre 3 y 10 ml para Escarlata 4R de los Laboratorios Utter, entre 1 y 5 para la grosella, entre 5 y 15 ml de la disolución del lápiz pastelero, entre 5 y 15 ml de la disolución de espuma dulce, entre 5 y 15 ml de la disolución del caramelo Halls y entre 7 y 15 ml de la disolución de mermelada. En todos los casos se enrrasa con agua desionizada hasta un volumen final de 500 ml y se aplica el método operatorio establecido para tal fin.

Tabla IV.25.- Resultados obtenidos para CA y CY para escarlata 4R de Sancolor S.A y escarlata 4R de los laboratorios Utter.

Escarlata 4R de Sancolor S.A				Escarlata 4RdelosLaboratoriosUtter			
CA		CY		CA		CY	
[NN] (µg/l)	A	V (ml)	A	[NN] (µg/l)	A	V (ml)	A
0	0'0039	0'002	0'0038	0	0'0035	0'006	0'0099
30	0'0340	0'006	0'0088	30	0'0320	0'010	0'0250
50	0'0539	0'010	0'0142	50	0'0528	0'014	0'0387
100	0'1138	0'020	0'0571	100	0'1114	0'020	0'0610



Tabla IV.26.- Resultados obtenidos para CA y CY para la grosella Dama de Baza y la lápiz pastelero Vahiné.

Grosella Dama de Baza				Lápiz pastelero Vahiné			
CA		CY		CA		CY	
[NN] (µg/l)	A	V (ml)	A	[NN] (µg/l)	A	V (ml)	A
0	0'0675	0'002	0'0643	0	0'0279	0'010	0'0248
30	0'0912	0'004	0'1286	30	0'0598	0'014	0'0353
50	0'1121	0'006	0'1929	50	0'0721	0'020	0'0504
80	0'1492	0'010	0'3015	100	0'1331	0'030	0'0758

Tabla IV.27.- Resultados obtenidos para CA y CY para el caramelo sabor fresa mentolada Halls y para la espuma dulce Party Pack. Animallovs.

Caramelo de fresa mentolada Halls				Espuma dulce Party Pack. Animallovs			
CA		CY		CA		CY	
[NN] (µg/l)	A	V (ml)	A	[NN] (µg/l)	A	V (ml)	A
0	0'0320	0'010	0'0325	0	0'0590	0'010	0'0609
30	0'0652	0'014	0'0335	30	0'0900	0'014	0'0853
50	0'0840	0'020	0'0400	50	0'1221	0'020	0'1217
80	0'1123	0'030	0'0500	80	0'1623	0'030	0'1826

Tabla IV.28.- Resultados obtenidos para CA y CY para la mermelada de fresa Halcón.

Mermelada de fresa Halcón			
CA		CY	
[NN] ( $\mu\text{g/l}$ )	A	V (ml)	A
0	0'0290	0'014	0'0343
30	0'0602	0'016	0'0351
50	0'0813	0'020	0'0413
100	0'1424	0'030	0'0485

Tabla IV.27.- Resultados estadísticos obtenidos en la determinación de NN de Sancolor S.A.

Parámetros	CP	CA	CY
n	15	4	4
a	0'026	$1'79 \times 10^{-3}$	$-8'07 \times 10^{-3}$
b	$1'04 \times 10^{-3}$	$1'10 \times 10^{-3}$	3'057
$s_{R,c}$	$2'37 \times 10^{-3}$	$2'95 \times 10^{-3}$	$7'75 \times 10^{-3}$
$s_p$	$2'45 \times 10^{-3}$		
t (b)	1'54 (P = 14'32 %)		
$b_p$	$1'06 \times 10^{-3}$		
$a'$	0'0257	0'0037	-----
BY	-----	-----	-0'0337
$c_{x,S}$	5'16	-----	-----
$c_{x,A}$	-----	4'98	-----
t (c)	0'13 (P = 89'82 %)		

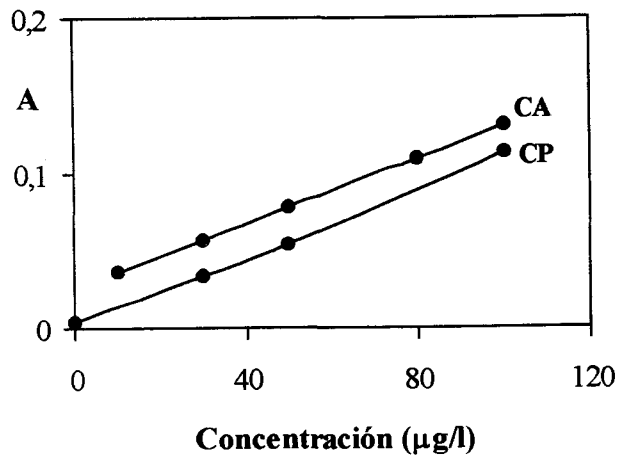


Figura IV.24 .- Calibrado con patrones (CP) y calibrado con adición de patrón (CA) para la determinación de NN en la muestra de Sancolor S.A.

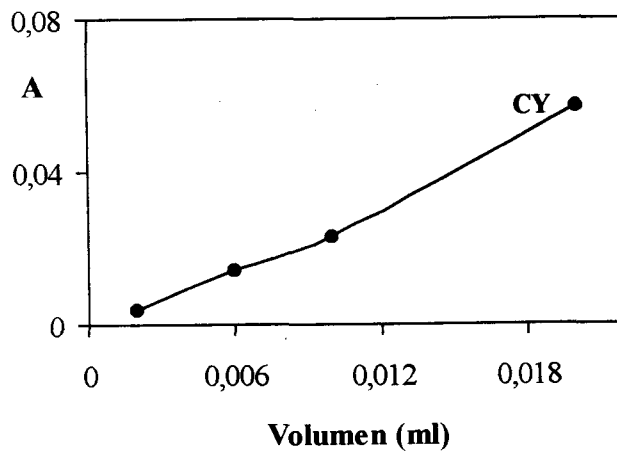


Figura IV.25.- Calibrado de Youden (CY) para la determinación de NN en la muestra de Sancolor S.A.

Tabla IV.27.- Resultados estadísticos obtenidos en la determinación de NN de los Laboratorio Utter.

Parámetros	CP	CA	CY
n	15	4	4
a	0'026	$1'07 \times 10^{-3}$	-0'011
b	$1'04 \times 10^{-3}$	$1'08 \times 10^{-3}$	3'63
$s_{R,c}$	$2'37 \times 10^{-3}$	$3'01 \times 10^{-3}$	$4'33 \times 10^{-4}$
$s_p$	$2'46 \times 10^{-3}$		
t (b)	1'025 (P = 32'16 %)		
$b_p$	$1'05 \times 10^{-3}$		
a'	0'0263	0'0027	-----
BY	-----	-----	-0'0373
$c_{x,S}$	2'38	-----	-----
$c_{x,A}$	-----	1'59	-----
t (c)	0'56 (P = 58'32 %)		

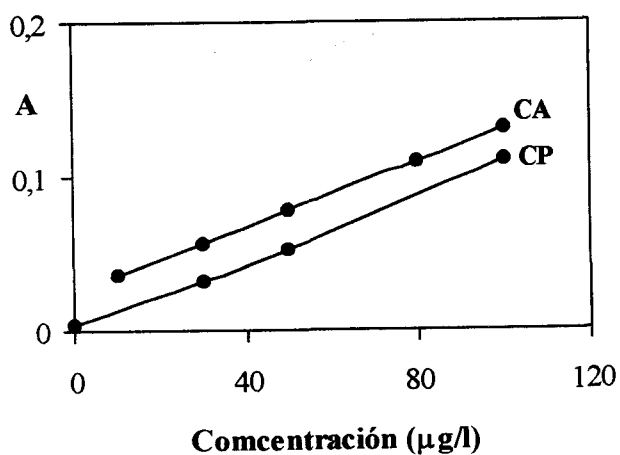


Figura IV.24 .- Calibrado con patrones (CP) y calibrado con adición de patrón (CA) para la determinación de NN en la muestra de los Lab. Utter.

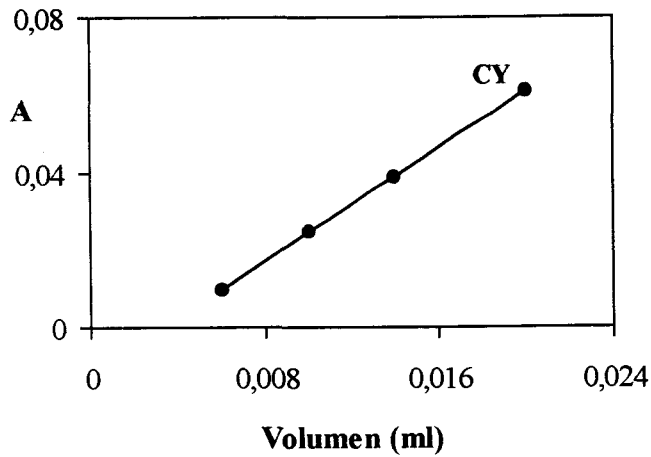


Figura IV.25.- Calibrado de Youden (CY) para la determinación de NN en la muestra de los Lab. Utter.

Tabla IV.31.- Resultados estadísticos obtenidos en la validación del método para NN en la grosella.

Parámetros	CP	CA	CY
n	15	4	4
a	0'026	0'064	9'14x10 <sup>-3</sup>
b	1'04x10 <sup>-3</sup>	1'02x10 <sup>-3</sup>	29'57
s <sub>R,c</sub>	2'37x10 <sup>-3</sup>	4'74x10 <sup>-3</sup>	5'85x10 <sup>-3</sup>
s <sub>p</sub>	5'61x10 <sup>-6</sup>		
t (b)	0'37 (P = 71'07%)		
b <sub>p</sub>	1'04x10 <sup>-3</sup>		
a'	0'0268	0'0634	-----
BY	-----	-----	-0'0176
c <sub>x,S</sub>	56'11	-----	-----
c <sub>x,A</sub>	-----	52'17	-----
t (c)	1'94 (P = 7'02%)		

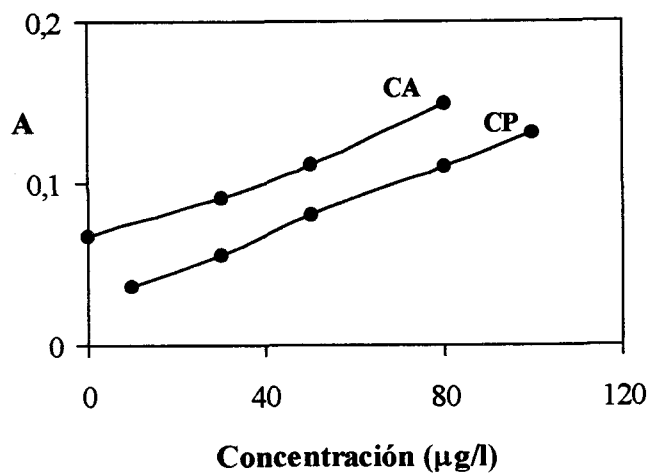


Figura IV. 27.- Calibrado con patrones (CP) y calibrado con adición de patrón (CA) para la determinación de NN en la grosella.

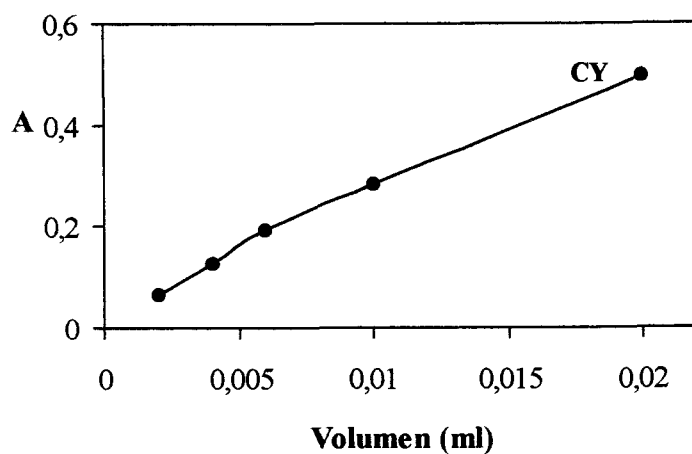


Figura IV.28.- Calibrado de Youden (CY) para la determinación de NN en la grosella.

Tabla IV.34.- Resultados estadísticos obtenidos en la validación del método para NN en el lápiz pastelero.

Parámetros	CP	CA	CY
n	15	4	4
a	0'026	0'026	-5'04x10 <sup>-4</sup>
b	1'04x10 <sup>-3</sup>	1'04x10 <sup>-3</sup>	2'544
s <sub>R,c</sub>	2'37x10 <sup>-3</sup>	5'19x10 <sup>-3</sup>	1'63x10 <sup>-4</sup>
s <sub>p</sub>	3'15x10 <sup>-3</sup>		
t (b)	0'00 (P = 100 %)		
b <sub>p</sub>	1'04x10 <sup>-3</sup>		
a'	0'0268	0'0064	-----
BY	-----	-----	-0'0273
c <sub>x,S</sub>	2'99	-----	-----
c <sub>x,A</sub>	-----	1'57	-----
t (c)	0'79 (P = 44'12 %)		

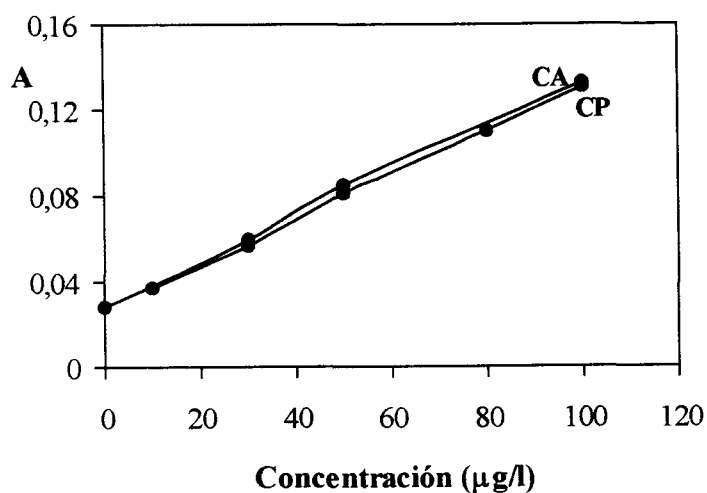


Figura IV. 31.- Calibrado con patrones (CP) y calibrado con adición de patrón (CA) para la determinación de NN en el lápiz pastelero.

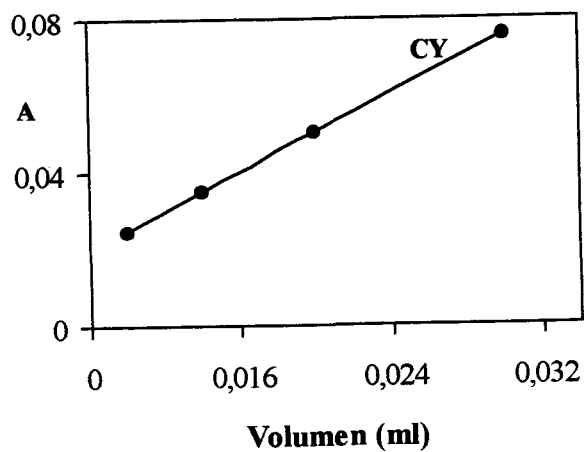


Figura IV.32.- Calibrado de Youden (CY) para la determinación de NN del lápiz pastelero.

Tabla IV.35.- Resultados estadísticos obtenidos en la determinación de NN en el Caramelo Halls.

Parámetros	CP	CA	CY
n	15	4	4
a	0'026	0'029	0,022
b	1'04x10 <sup>-3</sup>	1'03x10 <sup>-3</sup>	0,91
s <sub>R,c</sub>	2'37x10 <sup>-3</sup>	4'60x10 <sup>-3</sup>	1,39x10 <sup>-3</sup>
s <sub>p</sub>	2,77x10 <sup>-3</sup>		
t (b)	0,21 (P = 83,65 %)		
b <sub>p</sub>	1,04x10 <sup>-3</sup>		
a'	0'0268	0'0581	-----
BY	-----	-----	-4'80x10 <sup>-3</sup>
c <sub>x,S</sub>	4'80	-----	-----
c <sub>x,A</sub>	-----	2'11	-----
t (c)	1'789 (P = 9'25 %)		



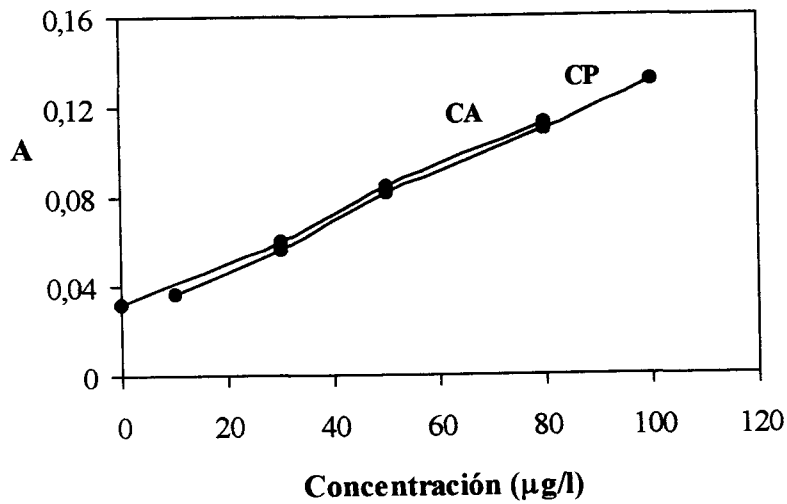


Figura IV. 35.- Calibrado con patrones (CP) y calibrado con adición de patrón (CA) para la determinación de NN en el caramelo Halls.

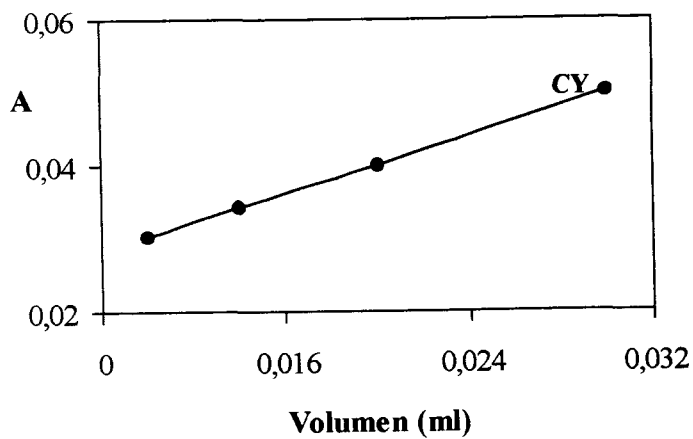


Figura IV.32.- Calibrado de Youden (CY) para la determinación de NN en el caramelo Halls.

Tabla IV.35.- Resultados estadísticos obtenidos en la determinación de NN en la Espuma dulce.

Parámetros	CP	CA	CY
n	15	4	4
a	0'026	0'0584	$8'06 \times 10^{-5}$
b	$1'04 \times 10^{-3}$	$1'01 \times 10^{-3}$	6'08
$s_{R,c}$	$2'37 \times 10^{-3}$	$2'78 \times 10^{-3}$	$5'27 \times 10^{-5}$
$s_p$	$2'43 \times 10^{-3}$		
t (b)	0'65 (P = 52'55 %)		
$b_p$	$1'03 \times 10^{-3}$		
a'	0'0273	0'0577	-----
BY	-----	-----	-0'0272
$c_{x,S}$	57'20	-----	-----
$c_{x,A}$	-----	55'94	-----
t (c)	0'94 (P = 36'12 %)		

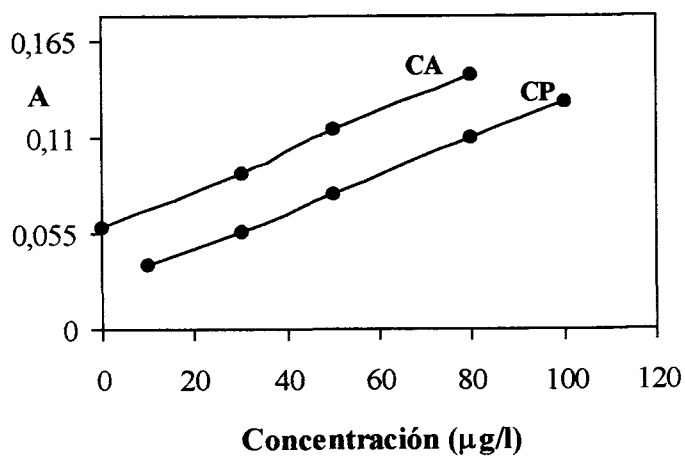


Figura IV. - CP y CA para la determinación de NN en la Espuma dulce

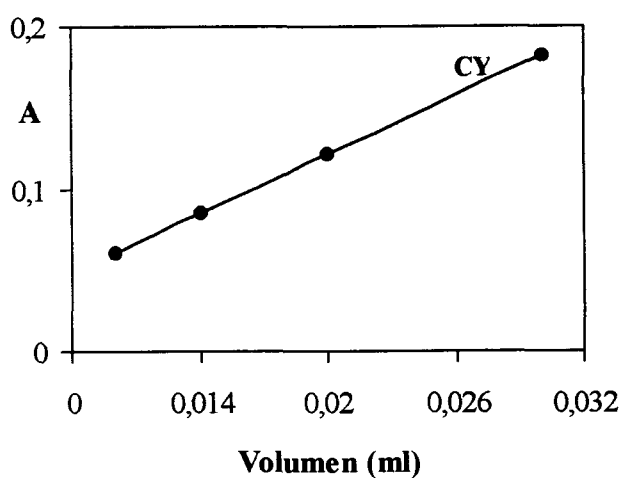


Figura IV.- Calibrado de Youden para la determinación de NN en la Espuma dulce.

Tabla IV.35.- Resultados estadísticos obtenidos en la determinación de NN en la Mermelada de fresa Halcón.

Parámetros	CP	CA	CY
n	15	4	4
a	0'026	0'027	0'0217
b	$1'04 \times 10^{-3}$	$1'04 \times 10^{-3}$	0'905
$s_{R,c}$	$2'37 \times 10^{-3}$	$1'53 \times 10^{-3}$	$1'33 \times 10^{-3}$
$s_p$	$2'27 \times 10^{-3}$		
t (b)	0'00 (P = 100%)		
$b_p$	$1'04 \times 10^{-3}$		
a'	0'0268	0'0279	-----
BY	-----	-----	$-5'10 \times 10^{-3}$
$c_{x,S}$	2'11	-----	-----
$c_{x,A}$	-----	2'50	-----
t (c)	0'29 (P = 77'55%)		

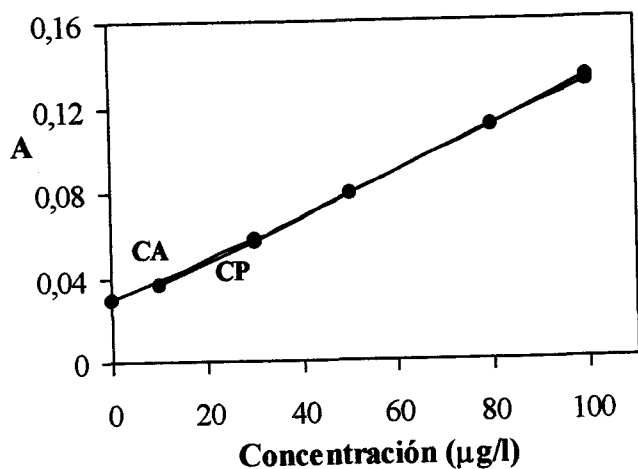


Figura IV. 35.- Calibrado con patrones (CP) y calibrado con adición de patrón (CA) para la determinación de NN en la mermelada.

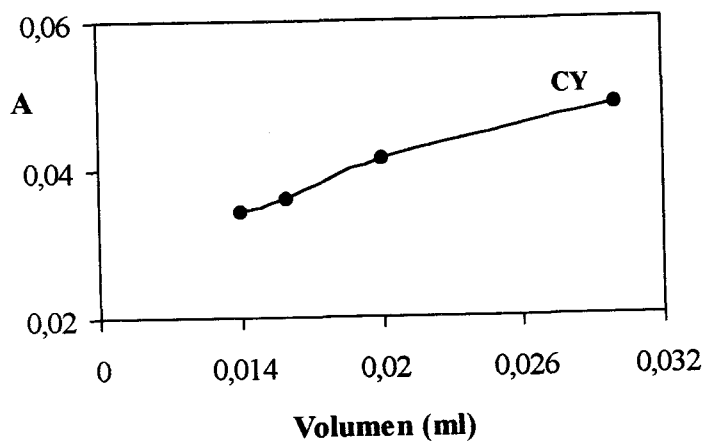


Figura IV.32.- Calibrado de Youden (CY) para la determinación de NN de la mermelada.

Cuando se aplica la metodología establecida, no se encuentran diferencias significativas entre las varianzas del calibrado con patrones y del calibrado con adición, como se pone de manifiesto en el hecho de que es todos los casos el valor de P es superior al 5% ( $P = 53'24, 44'74, 21'75, 18'57, 22'94, 49'93$  y  $33'33\%$  respectivamente para cada muestra). Al comparar las pendientes tampoco se obtienen diferencias significativas entre

ambas, como se comprueba al observar las tablas IV, para cada una de las muestras.

La ordenada en el origen del calibrada de Youden no esta incluida en el intervalo de la nueva ordenada en el origen del calibrado con patrones, por lo tanto existe un componente de error sistemático y lo eliminamos restándole a nuestra señal no el blanco analítico, sino el blanco de Youden.

Al comparar el contenido de analito en la disolución calculado a partir del calibrado con patrones ( $c_{x,S}$ ) y el contenido de analito en la disolución calculado a partir del calibrado con adición de patrón ( $c_{x,A}$ ), se observa  $P > 5\%$ , por lo que se concluye que el método es exacto para la determinación de NN en las muestras ensayadas. Con esto el método queda validado para la determinación de NN en las estas muestras.

#### Análisis de las muestras.

Igual que en el caso anterior, una vez validado el método para analizar este tipo de muestras fue aplicado el método operatorio establecido y a la señal obtenida se aplica directamente el calibrado con patrones para calcular la concentración de analito. Se realiza el análisis por triplicado.

**Tabla IV.23.-** Contenido de NN en la escarlata de Sancolor S.A, en la Escarlata de los Laboratorios Utter y de la grosella Dama de Baza.

Serien°	Escarl. Sancolor S.A		Escarl. Laborat. Utter		Grosella Dama de Baza	
	A	C( $\mu\text{g/l}$ )	A	C( $\mu\text{g/l}$ )	A	C( $\mu\text{g/l}$ )
1	0'0035	4'79	0'0030	1'90	0'0657	54'38
2	0'0039	5'16	0'0032	2'09	0'0631	51'88
3	0'0037	4'96	0'0029	1'81	0'0669	55'54

**Tabla IV.23.-** Contenido de NN en las muestras de lápiz pastelero, caramelo de fresa mentolada Halls Espumas dulces y Mermelada de fresa Halcón.

Serien°	Lápiz pastelero		Caramelo Halls		Espumas dulces		Mermelada	
	A	C(µg/l)	A	C(µg/l)	A	C(µg/l)	A	C(µg/l)
1	0'0078	2'89	0'0300	2'88	0'0542	52'54	0'0293	2'40
2	0'0080	3'08	0'0292	2'11	0'0513	49'72	0'0294	2'50
3	0'0076	2'70	0'0295	2'40	0'0536	51'96	0'0288	1'92

La desviación estándar relativa es de: 3'73% para Escarlata de Sancolor S.A, 7'52% para Escarlata de los Laboratorios Utter, 3'46% para la grosella Dama de Baza, 6'64% para el lápiz pastelero, 16'02% para el caramelo Halls, 2'88% para la Espuma dulce y 13'4% para la Mermelada Halcón.

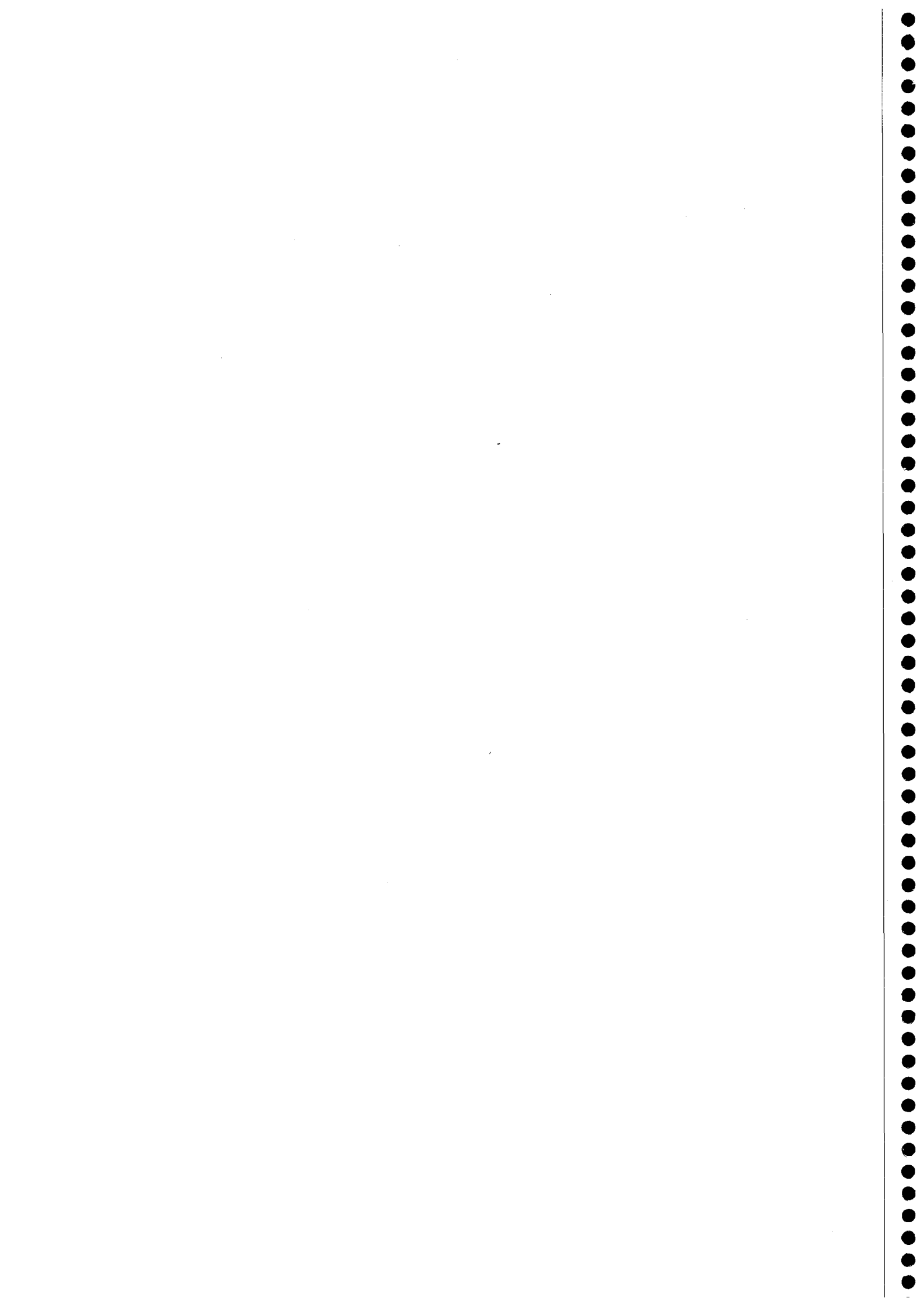
La concentración media que se obtiene de NN para las muestras de Escarlata 4R de Sancolor S.A y de los Laboratorios Utter es de 4'97 µg/l y de 1'93 µg/l respectivamente, teniendo en cuenta los distintos factores de dilución y en su caso el peso de la muestra, el contenido de ER es de 26'97 mg/l en la grosella Dama de Baza, esta cantidad es alta pero hay que tener en cuenta que la concentración de ER en la muestra es mucho más alta aún, por lo que en relación a esto sería una cantidad normal, 2'71 µg/g en el lápiz pastelero Vahiné, 0'47 µg/g en el caramelo de fresa mentolada Halls, 2'8 µg/g en la espuma dulce y 0'56 µg/g en la mermelada de fresa Halcón.

En la tabla IV.24 se resume el contenido de ambos colorantes encontrado en las muestras analizadas.

Tabla IV.24.- Resumen del contenido de los colorantes en las muestras.

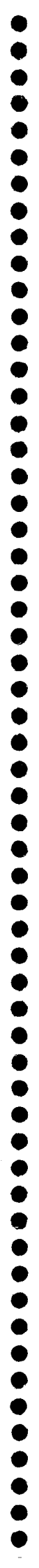
Muestra	C (s <sub>n-1</sub> )	
	Escarlata 4R	1-naftilazo-2-naftol
Escarlata 4R Sancolor S.A <sup>a</sup>	100'48 (0'76)	4'97 (0'18)
Escarlata 4R de los Laboratorios Utter <sup>a</sup>	100'60 (0'27)	1'94 (0'15)
Grosella Dama de Baza <sup>b</sup>	214'87 (3'54)	26'97 (0'93)
Lápiz pastelero Vahiné <sup>c</sup>	334'60 (0'30)	2'71 (0'18)
Espumas dulces <sup>c</sup>	17'69 (1'20)	2'92 (0'08)
Caramelo Halls <sup>c</sup>	15'58 (0'06)	0'48 (0'07)
Mermelada de fresa Halcón <sup>c</sup>	43'85 (1'68)	0'53 (0'07)

<sup>a</sup> expresado en µg/l; <sup>b</sup> expresado en mg/l; <sup>c</sup> expresado en µg/g.



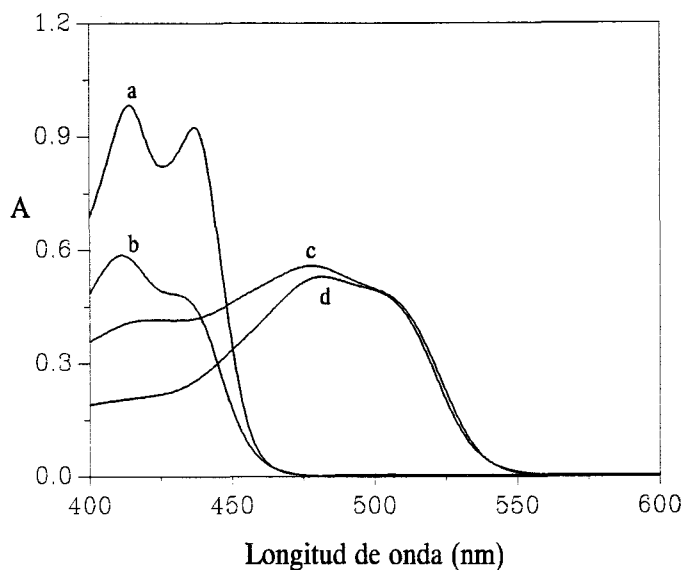


**CAPÍTULO V:  
DETERMINACIÓN CONJUNTA DE MEZCLAS DE COLORANTES EN  
ALIMENTOS MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRÍA DERIVADA EN  
FASE SÓLIDA**



En los capítulos anteriores se han propuesto métodos espectrofotométricos para la determinación conjunta de un colorante sulfonado y de su correspondiente colorante no sulfonado. En el presente capítulo se aborda la determinación conjunta de dos colorantes sulfonados, Amarillo Anaranjado (AA) y Amarillo de Quinoleina (AQ) junto con sus correspondientes productos no sulfonados Sudan I (SD) y Amarillo de Quinoleina insoluble (AQI), ya que esta mezcla binaria es muy empleada en productos alimenticios dando a los productos que la llevan una variedad de colores que va desde el amarillo claro hasta el naranja intenso. Debido al alto grado de solapamiento espectral que presentan estos componentes (figura V.1). La determinación simultánea no es posible por métodos convencionales, por lo que se decide utilizar como señal analítica la derivada de la absorbancia en lugar de esta misma. Las medidas que se realizan en fase sólida y se aplica la técnica del “zero-crossing”.

La mezcla de AA y SD ha sido estudiada en el capítulo II, por lo que partimos de las variables experimentales allí establecidas con objeto de resolver la nueva mezcla y posteriormente trataremos de determinar estos colorantes en productos alimenticios.



**Figura V.1.-** Espectros de absorción realizados en disolución y con una concentración de 10 mg/l de:  
(a) AQI; (b) AQ; (c) SD; (d) AA

### 1.- Elección del soporte sólido.

En el capítulo II, quedó establecido que debido a las características de los compuestos, AA, que es el producto sulfonado se fija en una resina de cambio iónico, Sephadex DEAE A-25 y el producto no sulfonado SD se fija sobre un gel adsorbente de sílice C-18. Al realizar la misma experiencia con AQ y AQI se obtienen comportamientos similares de manera que, AQI, se fija sobre gel de sílice C-18 y AQ sobre Sephadex DEAE A-25.

### 2.- Optimización de las variables experimentales.

#### 2.1.- Influencia del pH.

En primer lugar se estudia la influencia del pH para AQ y AQI con objeto de establecer un valor de pH óptimo para los cuatro componentes. Para ello se preparan una serie de disoluciones de 500  $\mu\text{g/l}$  de AQ y otra serie de 100  $\mu\text{g/l}$  de AQI enrasadas a un

volumen final de 100 ml de agua de ósmosis inversa. Cada disolución se ajusta a un valor de pH diferente, desde 1 hasta 13, mediante la adición de disoluciones de HCl o NaOH de las concentraciones adecuadas para obtener el valor de pH requerido. Siguiendo la metodología recogida en el capítulo II, se obtienen los resultados que se reflejan en la figura V.2.

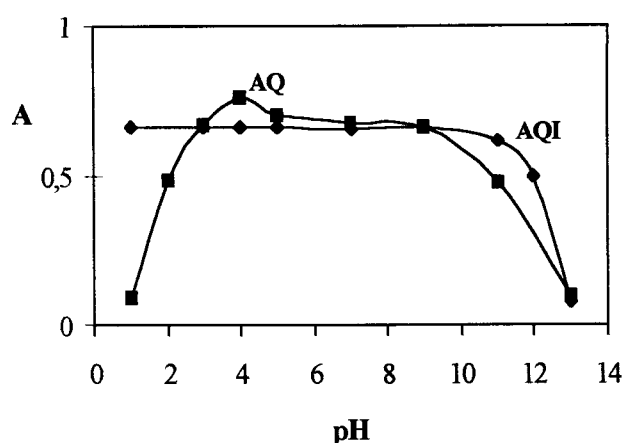


Figura V.2.- Influencia del pH para AQ y AQI.

Como se observa en la figura V.2, AQI presenta una absorbancia prácticamente independiente del pH del medio hasta llegar a valores muy básicos, donde se produce un descenso en la señal de absorbancia ya que a estos valores de pH la resina se degrada perdiendo su capacidad de retención. Como la señal que se obtiene para AQI es independiente del pH del medio seleccionamos como pH de trabajo el que se utilizó en el estudio del SD,  $\text{pH} = 5,0$ .

En el caso de AQ, en medios muy ácidos, el grupo sulfónico se protona, disminuyendo así el proceso de retención en el gel y en medios muy básicos los iones hidroxilo compiten con el analito en el proceso de fijación por lo que también se produce una disminución de dicho proceso; a valores del pH intermedios se produce la máxima retención por lo que seleccionamos un  $\text{pH} = 5$  para experiencias posteriores, ya que este es el pH que se utilizó en la determinación de AA. Así tenemos a ambos colorantes fijados en

los mismos soportes y en las mismas condiciones de pH. El resto de las variables seleccionadas para la determinación conjunta fueron las mismas que en el caso de la determinación de AA y SD (tabla V.2).

Con el fin de ajustar el método a los contenidos habituales de los colorantes en las muestras reales, se realiza el estudio de la influencia del volumen de muestra para AQ y AQI, por otra parte, también se estudia la influencia del contenido de etanol, ya que esta variable es muy importante para establecer la fijación cuantitativa de los colorantes no sulfonados.

### 2.2.2.- Influencia del contenido de etanol para AQ y AQI.

Para establecer la influencia del contenido de etanol se preparan disoluciones de 500  $\mu\text{g/l}$  de AQ y de 100  $\mu\text{g/l}$  de AQI conteniendo todas ellas 5 ml de la disolución reguladora de ácido acético/ acetato sódico 1 M y cantidades variables comprendidas entre 0 y 20% de etanol. Tras enrasar a un volumen final de 100 ml con agua de ósmosis inversa y aplicar el método operatorio establecido, obteniéndose los resultados que se recogen en la figura V.4. En ella se observa que para AQSS a partir del 5% de etanol la señal que se obtiene es máxima y estable, ya que a partir de este porcentaje de etanol se consigue que la solubilidad del compuesto sea máxima. La señal que se obtiene para AQ no depende de la cantidad de etanol presente en el medio. Por ello se selecciona un 10 % de etanol para las experiencias posteriores, que es la misma cantidad que se utilizó para resolver la mezcla AA-SD.

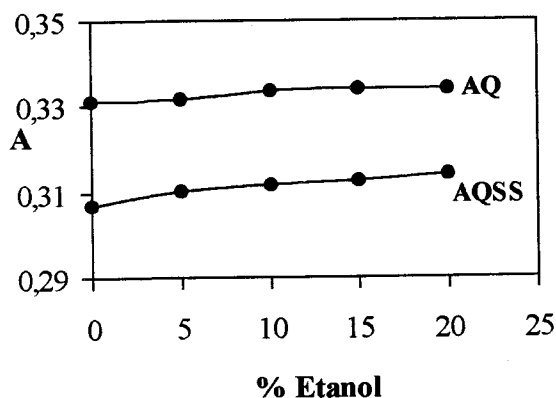


Figura V.4.- Influencia de la cantidad de etanol.

### 2.2.3.- Influencia del volumen de agitación para AQ y AQI.

Una de las características más importantes de la espectrofotometría en fase sólida, como ya se ha establecido en la Introducción de la presente Memoria, es que la sensibilidad y el límite de detección son función del volumen de muestra empleados, por lo que se pueden poner a punto métodos adecuados a las necesidades del problema con sólo variar el volumen, esto siempre dentro de unos límites, ya que hay un volumen a partir del cual no se produce un aumento de la señal.

Para establecer dicha dependencia se preparan disoluciones de 500  $\mu\text{g/l}$  de AQ y 100  $\mu\text{g/l}$  de AQI todas ellas conteniendo un 5 % de la disolución reguladora de ácido acético/acetato sódico 1M y un 10 % de etanol, en el caso de la disolución de AQI, enrasando a distintos volúmenes finales (100, 250, 500, 750 y 1000 ml). Estas disoluciones se transfieren a botellas de vidrio de 1 ó 2 litros de capacidad, donde se añaden 50 mg de Sephadex DEAE A-25 o 150 mg de gel de sílice C-18 según el caso. El tiempo de equilibración es de 10 minutos para AQ y de 15 minutos para AQI. Paralelamente se preparan los respectivos blancos, constituidos por todos los reactivos excepto el colorante. Posteriormente se aplica el procedimiento operatorio establecido, obteniendo los resultados que se recogen en la tabla V.1. representando gráficamente estos valores obtenemos las curvas que se encuentran en la figura V.3.

Tabla V.1.- Influencia del volumen de muestra.

Volumen (ml)	A	
	AQ	AQI
100	0'3182	0'3678
250	0'6253	0'3995
500	0'8788	0'7193
750	0'9537	0'7221
1000	0'9563	0'7234

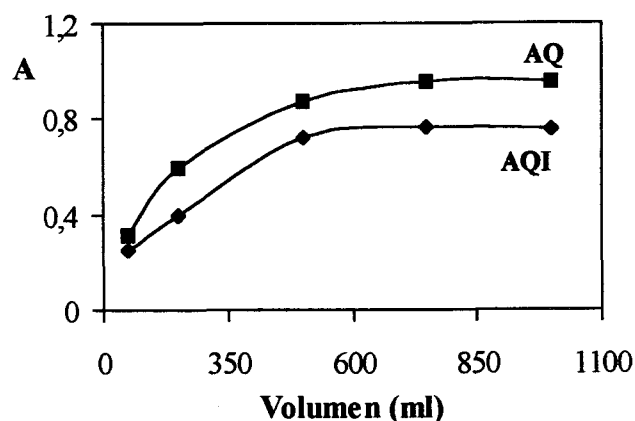


Figura V.3.- Influencia del volumen.

Se selecciona un volumen de trabajo de 100 ml, ya que este volumen permite un manejo de las muestras más fácil, en principio, y la sensibilidad que ofrece parece adecuada a las necesidades del problema.

#### 2.2.4.- Resumen de las variables optimizadas para AA, AQ y SD, AQI.

Para los cuatro analitos se utiliza un pH de trabajo de 5,0, conseguido mediante la adición de 5 ml de la disolución reguladora de ácido acético/acetato sódico 1M y un volumen final de 100 ml. La velocidad de agitación es de 60 rpm, el tiempo de centrifugación en ambos casos es de 30 segundos. En todos los casos no es necesario ajustar la fuerza iónica del medio.

Tabla V.2.- Resumen de la optimización de variables.

Variable	AA	AQ	SD	AQI
Absorbancia	$A = A_{487} - A_{800}$	$A = A_{487} - A_{800}$	$A = A_{487} - A_{800}$	$A = A_{487} - A_{800}$
Cantidad de gel	50 mg DEAE	50 mg DEAE	150 mg C-18	150 mg C-18
Tiempo de agitación	10 min.	10 min.	15 min.	15 min.
Contenido de etanol	-----	-----	10%	10%



### 3.- Determinación conjunta de AA, AQ y de SD, AQI por espectrofotometría derivada en fase sólida.

Para el estudio de la mezcla binaria formada por AA y AQ se prepararon 3 disoluciones conteniendo 250  $\mu\text{g/l}$  de AA la primera, 250  $\mu\text{g/l}$  de AQ la segunda y la tercera formada por una mezcla equimolecular de 250  $\mu\text{g/l}$  de AA y AQ. A cada una de estas disoluciones se le añaden 5 ml de la disolución reguladora de ácido acético/acetato sódico 1 M, enrasando hasta un volumen final de 100 ml con agua de ósmosis inversa. Posteriormente se añaden 50 mg de Sephadex DEAE A-25 y se agita el conjunto durante 10 minutos aplicándose el procedimiento operatorio anteriormente establecido. La figura V.5 representa los espectros de absorción obtenidos. Para el estudio de la resolución de la mezcla binaria formada por SD y AQI se prepararon otras 3 disoluciones conteniendo 50  $\mu\text{g/l}$  de SD la primera, 50  $\mu\text{g/l}$  de AQI la segunda y la tercera formada por la mezcla de las otras dos. A cada una de estas disoluciones se le añaden 5 ml de la disolución reguladora de ácido acético/acetato sódico y 10 ml de etanol, enrasando hasta un volumen final de 100 ml con agua de ósmosis inversa. Posteriormente se añaden 150 mg de gel de sílice C-18 y se agita el conjunto durante 15 minutos. Los espectros obtenidos los podemos ver en la figura V.6.

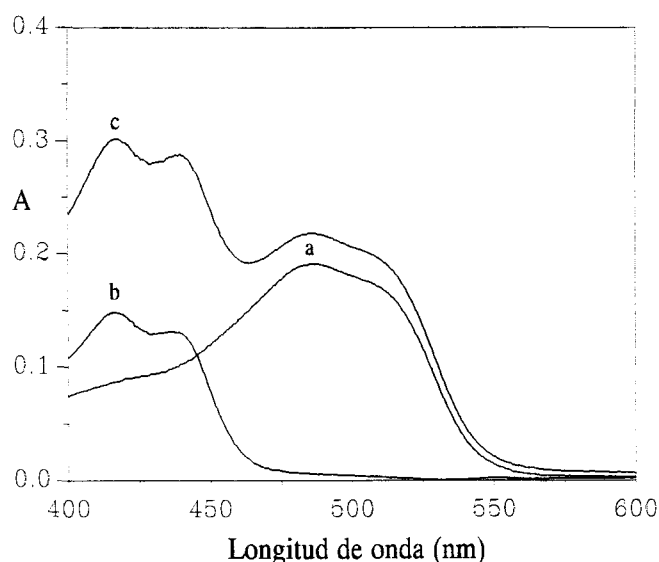
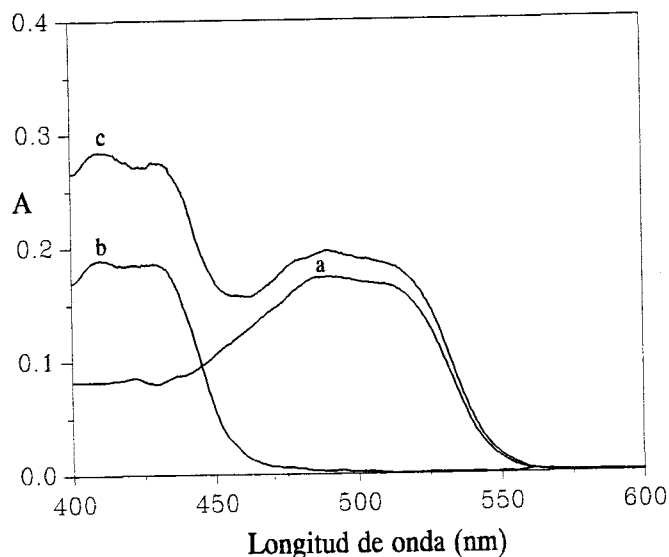


Figura V.5.- Espectros de absorción en Sephadex DEAE A-25:

(a) 250  $\mu\text{g/l}$  de AA; (b) 250  $\mu\text{g/l}$  de AQ; (c) mezcla de ambos.



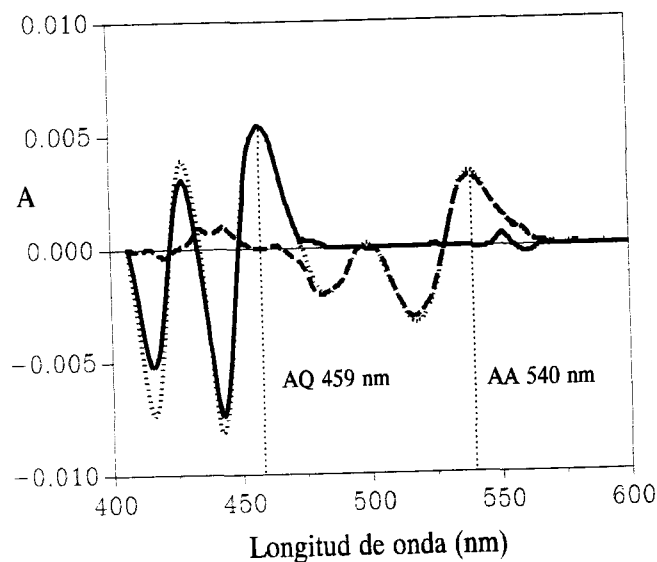
**Figura V.6.-** Espectros de absorción en gel de sílice C-18:  
(a) 50 µg/l de SD; (b) 50 µg/l de AQI; (c) mezcla de ambos.

En las figuras anteriores se pone de manifiesto que tanto la mezcla de los colorantes sulfonados como la de los no sulfonados presentan un alto grado de solapamiento, lo que hace imposible su determinación por medidas directas. Este hecho nos indujo a pensar en la utilización de los espectros derivados para resolver el problema.

### 3.1.- Obtención de los espectros derivados de ambas mezclas binarias.

Como ya se ha dicho, para resolver ambas mezclas de colorantes por espectrofotometría derivada en fase sólida vamos a aplicar la técnica del "zero-crossing" a los espectros derivados. Para ello partimos de los espectros de absorción de las figuras V.5 y V.6 de los que se obtienen los espectros derivados de primer a cuarto orden. Al obtener dichos espectros derivados se observa que, para el caso de la mezcla de AA-AQ, la mejor resolución se obtuvo con la segunda derivada (figura V.7), que permite determinar simultáneamente ambos analitos, a longitudes de onda de 459 nm para AQ, ya que la señal del espectro derivado de segundo orden de la mezcla coincide con la señal de AQ a esa longitud de onda, siendo la señal de AA a esa misma longitud de onda cero. AA se

determinó a 540 nm, ya que la señal de su espectro derivado coincide con la de la mezcla, siendo la señal del otro componente cero.



**Figura V.7.-** Espectros derivados de segundo orden.  
 ..... Mezcla ; ---- AA; — AQ.

Al obtener dichos espectros derivados para el caso de la mezcla de SD y AQSS se observa que la mejor resolución se obtiene con la primera derivada (figura V.8), ya que a una longitud de onda de 431nm se puede determinar AQSS y a 531 nm es posible determinar SD.

Por lo tanto se selecciona la derivada de segundo orden para determinar los colorantes sulfonados y la derivada de primer orden para determinar los colorantes no sulfonados.

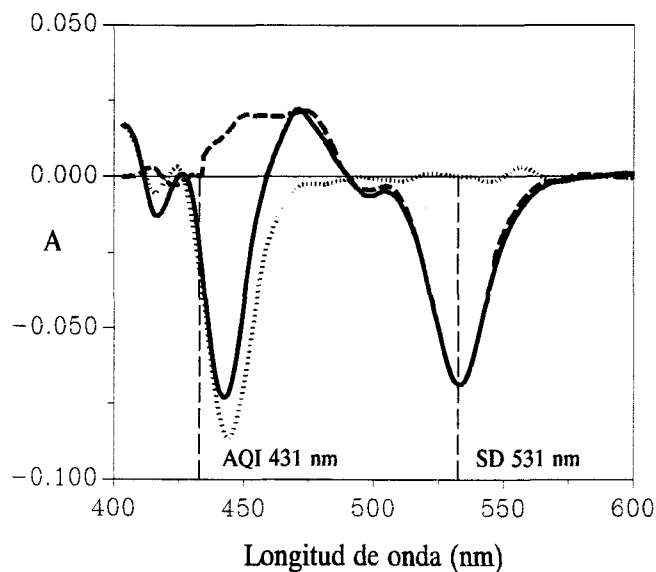


Figura V.8.- Espectros derivados de primer orden  
---- SD; ..... AQSS; — Mezcla.

### 3.2.- Selección de las condiciones instrumentales óptimas.

Las variables instrumentales que afectan a la obtención de espectros derivados son: la velocidad de barrido, el factor de filtrado y el incremento de longitudes de onda usado para obtener dichos espectros derivados. Por lo tanto vamos a estudiar la influencia que estos parámetros instrumentales ejercen sobre los espectros derivados de los analitos.

#### 3.2.1.- Influencia de la velocidad de barrido.

Para comprobar la influencia de esta variable se registró el espectro de la segunda derivada (ya que con este orden de derivación se resuelve la mezcla) de la mezcla formada por 250  $\mu\text{g/l}$  de AA y 250  $\mu\text{g/l}$  de AQ fijados sobre Sephadex DEAE A-25 y el de la primera derivada para una mezcla formada por 50  $\mu\text{g/l}$  de SD y 50  $\mu\text{g/l}$  de AQI fijados sobre gel de sílice C-18, a las diferentes velocidades de barrido que permite el espectrofotómetro utilizado que son entre 75 y 2880 nm/min.

El resultado experimental es que esta variable no influye en el intervalo comprendido entre 120 y 480 nm/min. Valor a partir del cual se produce un descenso apreciable en la lectura de la señal analítica a medida que aumenta la velocidad de barrido.

### 3.2.2.- Influencia del factor de filtrado.

La influencia de esta variable ha quedado establecida en el capítulo I. Para optimizar el valor del factor de filtrado en estas mezclas binarias, se preparan cuatro disoluciones conteniendo 250  $\mu\text{g/l}$  de AA, 250  $\mu\text{g/l}$  de AQ, 50  $\mu\text{g/l}$  de SD y 50  $\mu\text{g/l}$  de AQI respectivamente a los que se les aplica el método operatorio establecido. Una vez obtenidos los respectivos espectros, se filtran mediante el programa PECSS que permite utilizar ventanas de filtrado que contienen entre 5 y 49 puntos espectrales, se suavizan los espectros de absorción para distintos valores de puntos experimentales y se obtienen sus espectros derivados de primer orden para SD y AQI y de segundo orden para AA y AQ con un  $\Delta\lambda = 5$  y 3 nm respectivamente. Los datos experimentales demuestran que un suavizado con 19 puntos experimentales es suficiente para eliminar el ruido sin perder información del espectro para AA y AQ, mientras que para SD y AQI se necesitó un suavizado con 49 puntos experimentales para poder eliminar el ruido producido por el soporte sólido de sílice C-18.

### 3.2.3.- Influencia del incremento de la longitud de onda.

Para optimizar el valor de la variable  $\Delta\lambda$  utilizada en la obtención de los espectros derivados, preparamos una disolución que contiene una mezcla de 250  $\mu\text{g/l}$  de AA y 250  $\mu\text{g/l}$  de AQ y otra de 50  $\mu\text{g/l}$  de SD y 50  $\mu\text{g/l}$  de AQI. Una vez aplicados el procedimiento operatorio establecido, los espectros que se obtienen se suavizan utilizando 19 y 49 puntos experimentales respectivamente. A continuación se obtienen la primera y segunda derivadas variando sistemáticamente el valor de  $\Delta\lambda$ . Los resultados experimentales ponen de manifiesto que la variación de  $\Delta\lambda$  no modifica apreciablemente la señal del espectro derivado, hasta llegar a un determinado valor de este donde la amplitud del espectro derivado disminuye, esto se produce a partir de  $\Delta\lambda = 5$  y de  $\Delta\lambda = 3$  para la mezcla de AA-AQ y SD-AQI respectivamente. Por tanto estos son los valores que se seleccionan. Los espectros derivados para ambas mezclas en las condiciones instrumentales óptimas e

indicando las longitudes de onda donde se determina cada analito son las que hemos indicado en las figuras V.7 y V.8 .

#### 4.- PARÁMETROS ANALÍTICOS.

##### 4.1.- Cumplimiento ley de Lambert-Beer y parámetros de fiabilidad para AA, AQ, SD y AQI.

El cumplimiento de la ley de Lambert-Beer y los parámetros de fiabilidad para AA, AQ, SD y AQI, se establece para sus espectros de absorción como para los derivados. Para AA y SD, empleando los espectros de absorción, fueron establecidos en el capítulo II y aquí utilizaremos dichos resultados. Para el estudio de los demas casos se preparan disoluciones de las concentraciones indicadas en la tabla V.3 y V.4, a las que se les aplica el procedimiento operatorio establecido.

Tabla V.3.- Establecimiento de la ley de Lambert-Beer para AA en los espectros de 2ª derivada y SD en los de 1ª derivada.

[AA] (µg/l)	<sup>2</sup> D <sub>540 nm</sub>			[SD] (µg/l)	<sup>1</sup> D <sub>531 nm</sub>		
	1ª Serie	2ª Serie	3ª Serie		1ª Serie	2ª Serie	3ª Serie
50	0'0008	0'0008	0'0009	30	0'0357	0'0352	0'0316
80	0'0013	0'0013	0'0014	50	0'0437	0'0412	0'0415
150	0'0024	0'0023	0'0024	60	0'0477	0'0475	0'0478
250	0'0034	0'0032	0'0031	80	0'0557	0'0554	0'0552
500	0'0078	0'0076	0'0075	100	0'0635	0'0632	0'0638

**Tabla V.4.-** Establecimiento de la ley de Lambert-Beer para AQ en sus espectros de absorción y en su espectro derivado de 2° orden.

[AQ] (µg/l)	A		<sup>2</sup> D <sub>459 nm</sub>	
	1ª Serie	2ª Serie	1ª Serie	2ª Serie
50	0'0309	0'0258	0'0010	0'0008
100	0'0545	0'0509	0'0018	0'0018
250	0'1465	0'1537	0'0045	0'0046
500	0'3198	0'3501	0'0090	0'0099
650	0'4163	0'4613	0'0120	0'0122
800	0'5338	0'5545	0'0136	0'0138

**Tabla V.5.-** Establecimiento de la ley de Lambert-Beer para AQI en sus espectros de absorción y en sus espectros derivados de 1° orden.

[AQI] (µg/l)	A			<sup>1</sup> D <sub>431 nm</sub>		
	1ª Serie	2ª Serie	3ª Serie	1ª Serie	2ª Serie	3ª Serie
20	0'0556	0'0661	0'0654	0'0032	0'0030	0'0032
30	0'1051	0'0902	0'1102	0'0038	0'0036	0'0035
50	0'1730	0'1811	0'1744	0'0052	0'0054	0'0052
80	0'2624	0'2324	0'3456	0'0074	0'0077	0'0073
100	0'3274	0'3283	0'3280	0'0089	0'0088	0'0089

Se aplica el test de fallo de ajuste en los rangos de concentraciones estudiados en cada uno de los casos, encontrándose que no hay curvatura ya que se obtienen valores de P superiorer al 5% en todos los casos, (40'92, 26'82, 25'31, 39'82, 80'17 y 25'11%). Por otra parte, el análisis gráfico de los correspondientes residuales nos indica que hay homoscedasticidad y admitiendo que se cumplen las hipótesis matemáticas del modelo, establecemos las siguientes funciones de calibrado:

$${}^2D_{540 \text{ nm}} = 1'27 \times 10^{-4} + 1'50 \times 10^{-5} \cdot [\text{AA}]$$

$${}^2D_{459 \text{ nm}} = 1'71 \times 10^{-4} + 1'74 \times 10^{-5} \cdot [\text{AQ}]$$

$$A = -0'02 + 7'26 \times 10^{-4} \cdot [\text{AQ}]$$

$${}^1D_{531 \text{ nm}} = 0'02 + 4'31 \times 10^{-4} \cdot [\text{SD}]$$

$$A = 3'50 \times 10^{-3} + 3'33 \times 10^{-3} \cdot [\text{AQI}]$$

$${}^1D_{431 \text{ nm}} = 1'57 \times 10^{-3} + 7'31 \times 10^{-5} \cdot [\text{AQI}]$$

Los principales parámetros estadísticos de las correspondientes rectas de calibrado, una vez aplicada la regresión por mínimos cuadrados, se recogen en la tabla V.6.

Tabla V.6.- Parámetros estadísticos.

Parámetros	${}^2D_{540 \text{ nm}}$ (AA)	A (AQ)	${}^2D_{459 \text{ nm}}$ (AQ)	${}^1D_{531 \text{ nm}}$ (SD)	A (AQI)	${}^1D_{431 \text{ nm}}$ (AQI)
$s_{R,c}$	$1'07 \times 10^{-4}$	$1'82 \times 10^{-2}$	$4'55 \times 10^{-4}$	$1'16 \times 10^{-3}$	$2'45 \times 10^{-3}$	$1'48 \times 10^{-4}$
$r^2$ (%)	99'83	99'33	99'28	98'93	95'06	99'61
$s_b$	$1'72 \times 10^{-7}$	$1'89 \times 10^{-5}$	$4'70 \times 10^{-7}$	$1'24 \times 10^{-5}$	$2'10 \times 10^{-4}$	$1'27 \times 10^{-6}$
$s_a$	$4'36 \times 10^{-5}$	$9'09 \times 10^{-3}$	$2'26 \times 10^{-4}$	$8'53 \times 10^{-4}$	$1'34 \times 10^{-2}$	$8'09 \times 10^{-5}$

### Parámetros de fiabilidad

A continuación se exponen todos los parámetros de fiabilidad calculados de la forma recogida en el Capítulo I de la presente Memoria.

### Linealidad

- a.- Para la 2ª derivada de AA: 98'95%.
- b.- Para el espectro de absorción de AQ: 97'39%.
- c.- Para la 2ª derivada de AQ: 97'30%.
- d.- Para la 1ª derivada de SD: 97'11%.
- e.- Para el espectro de absorción de AQI: 93'66%.
- f.- Para la 1ª derivada de AQI: 98'26%.



## Sensibilidad

Tabla V.7.- Sensibilidad del método.

Sensibilidad	${}^2D_{540 \text{ nm}}$ (AA)	A (AQ)	${}^2D_{459 \text{ nm}}$ (AQ)	${}^1D_{531 \text{ nm}}$ (SD)	A (AQI)	${}^1D_{431 \text{ nm}}$ (AQI)
del calibrado ( $\mu\text{g/l}$ ) <sup>-1</sup>	$1'50 \times 10^{-5}$	$7'26 \times 10^{-4}$	$1'74 \times 10^{-5}$	$4'31 \times 10^{-4}$	$3'33 \times 10^{-3}$	$7'31 \times 10^{-5}$
analítica ( $\mu\text{g/l}$ )	7'13	20'11	26'15	2'70	0'73	2'02

## Límites de detección y límites de cuantificación.

Los límites de detección y de cuantificación se calculan, igual que en los casos anteriores, siguiendo las normas de la IUPAC. Para ello es necesario conocer las desviaciones estándar de los blancos que son:  $5'27 \times 10^{-5}$  para la segunda derivada de AA,  $1'39 \times 10^{-3}$  para AQ,  $5'16 \times 10^{-5}$  para la segunda derivada de AQ,  $1'02 \times 10^{-3}$  para la primera derivada de SD,  $6'27 \times 10^{-4}$  para AQI y  $1'49 \times 10^{-4}$  para la primera derivada de AQI. Con estos valores se obtienen los resultados que figuran en la tabla V.8.

Tabla V.8.- Límites de detección y límites de cuantificación.

Límites ( $\mu\text{g/l}$ )	${}^2D_{540 \text{ nm}}$ (AA)	A (AQ)	${}^2D_{459 \text{ nm}}$ (AQ)	${}^1D_{531 \text{ nm}}$ (SD)	A (AQI)	${}^1D_{431 \text{ nm}}$ (AQI)
LD	10'54	5'99	8'90	7'08	0'56	6'13
LQ	35'13	19'97	29'67	23'61	1'88	20'44

**Rango dinámico lineal.**

El rango dinámico lineal, teniendo en cuenta los límites superiores e inferiores para cada caso, se recogen en la tabla V.9, donde también se incluye el intervalo lineal de aplicación del método.

Tabla V.9.- Rango dinámico lineal (R.D.L.) e Intervalo lineal (I.L.).

Parámetro	<sup>2</sup> D <sub>540 nm</sub> (AA)	A (AQ)	<sup>2</sup> D <sub>459 nm</sub> (AQ)	<sup>1</sup> D <sub>531 nm</sub> (SD)	A (AQI)	<sup>1</sup> D <sub>431 nm</sub> (AQI)
R.D.L.	1'42	4'00	2'69	0'42	5'31	0'48
I.L. (µg/l)	35-500	20-800	30-800	24-100	2-100	20-100

**Precisión****a) Repetibilidad del método propuesto aplicado a una muestra dada.**

Se realizó un estudio de las señales obtenidas en cada uno de los casos, para lo que se establecieron series de 10 disoluciones idénticas conteniendo respectivamente 150 µg/l de AA, 250 µg/l de AQ, 50 µg/l de SD y 50 µg/l de AQI a las que se les aplica el método operatorio establecido.

Tabla V.10.- Repetibilidad del método aplicado a una muestra dada.

Parámetro	<sup>2</sup> D <sub>540 nm</sub> (AA)	A (AQ)	<sup>2</sup> D <sub>459 nm</sub> (AQ)	<sup>1</sup> D <sub>531 nm</sub> (SD)	A (AQI)	<sup>1</sup> D <sub>431 nm</sub> (AQI)
Señal <sub>media</sub>	2'26x 10 <sup>-3</sup>	0'1460	4'46x 10 <sup>-3</sup>	0'0418	0'1737	5'27x 10 <sup>-3</sup>
s <sub>n-1</sub> <sup>1</sup>	1'07x 10 <sup>-4</sup>	3'75x 10 <sup>-3</sup>	1'35x 10 <sup>-5</sup>	8'66x 10 <sup>-4</sup>	4'57x 10 <sup>-3</sup>	1'33x 10 <sup>-4</sup>
DER (%)	4'7	2'6	3'0	2'0	2'6	2'5

1- Desviación estándar.

**b) Repetibilidad del método partir de los datos del calibrado.**

Los valores estan calculados a partir de las respectivas funciones de calibrado que han sido previamente establecidas.

**Tabla V.11.-** Desviación estándar relativa de los valores de concentración utilizados al establecer el calibrado para la segunda derivada de AA y la primera de SD.

[AA] (µg/l)	$s_c$	D.E.R (%)	[SD] (µg/l)	$s_c$	D.E.R (%)
50	4'82	9'6	30	1'98	6'6
80	4'70	5'8	50	1'74	3'5
150	4'54	3'0	60	1'69	2'8
200	4'51	2'2	80	1'76	2'2
500	5'69	1'1	100	1'97	1'9

**Tabla V.12.-** Desviación estándar relativa de los valores de concentración utilizados al establecer el calibrado para AQ y su 2ª derivada.

[AQ] (µg/l)	$s_c$	D.E.R (%)	derivada	
			$s_c$	D.E.R (%)
50	16'82	33'6	22'12	44'2
100	16'54	16'5	21'55	21'5
250	15'69	6'3	20'31	8'1
500	15'53	3'1	20'33	4'0
650	16'28	2'5	21'26	3'3
800	17'57	2'2	22'52	2'8

**Tabla V.13.-** Desviación estándar relativa de los valores de concentración utilizados al establecer el calibrado para AQI y su 1ª derivada.

[AQI] ( $\mu\text{g/l}$ )	$s_c$	D.E.R (%)	derivada	
			$s_c$	D.E.R (%)
20	5'12	25'6	1'41	7'0
30	4'83	16'1	1'36	4'5
50	4'55	9'1	1'28	2'5
80	4'85	6'0	1'34	1'7
100	5'23	5'2	1'48	1'5

Si se comparan los valores de desviación estándar relativa para los concentraciones ensayadas en la repetibilidad del método, con los respectivos valores obtenidos a partir de los datos del calibrado se observa que existen algunas diferencias que se pueden deber al distinto número de réplicas realizadas en cada caso.

#### 5.- Verificación de la independencia de las señales analíticas.

Se establecieron rectas de calibrado de cada colorante en presencia de concentraciones altas, medias y bajas del intervalo lineal de los demás y se compararon estadísticamente las pendientes de estas rectas con la obtenida con los patrones del colorante estudiado en ese momento. Como el procedimiento empleado en la separación se basa en el tipo de resina que se añade, en función de lo que se fije en esta, la comparación se realizará con la recta de calibrado de los espectros de absorción sin derivar, o con los derivados.

Tabla V.14.- Funciones de calibración de los analitos en presencia de cantidades bajas de los demás.

Colorante	Interferente	Concentración (µg/l)	Pendiente b	Ordenada a	P (%)
AA	SD	30	$8'73 \times 10^{-4}$	$3'29 \times 10^{-3}$	9'65
	AQ <sup>a</sup>	50	$1'43 \times 10^{-5}$	$-1'65 \times 10^{-4}$	44'58
	AQI	50	$8'99 \times 10^{-4}$	$4'25 \times 10^{-3}$	74'81
SD	AA	50	$1'21 \times 10^{-3}$	$9'40 \times 10^{-2}$	59'17
	AQ <sup>b</sup>	50	$4'42 \times 10^{-4}$	$1'57 \times 10^{-2}$	88'27
	AQI	30	$3'81 \times 10^{-4}$	$2'32 \times 10^{-2}$	14'98
AQ	AA <sup>a</sup>	50	$1'77 \times 10^{-5}$	$1'51 \times 10^{-4}$	28'16
	SD	30	$6'96 \times 10^{-4}$	$-4'86 \times 10^{-3}$	99'61
	AQI	30	$6'70 \times 10^{-4}$	$-2'99 \times 10^{-3}$	52'36
AQI	AA	50	$3'36 \times 10^{-3}$	$3'72 \times 10^{-2}$	99'84
	SD <sup>b</sup>	30	$7'53 \times 10^{-5}$	$8'00 \times 10^{-4}$	94'66
	AQ	30	$3'19 \times 10^{-3}$	$4'82 \times 10^{-2}$	67'26

<sup>a</sup> resuelta en la segunda derivada; <sup>b</sup> resuelta en la primera derivada

Tabla V.15.- Funciones de calibración de los analitos en presencia de cantidades medias de los demás.

Colorante	Interferente	Concentración (µg/l)	Pendiente b	Ordenada a	P (%)
AA	SD	50	$8'72 \times 10^{-4}$	$8'24 \times 10^{-3}$	30'81
	AQ <sup>a</sup>	300	$1'52 \times 10^{-5}$	$-4'48 \times 10^{-5}$	86'49
	AQI	50	$8'68 \times 10^{-4}$	$3'24 \times 10^{-3}$	45'09
SD	AA	300	$1'50 \times 10^{-3}$	$6'71 \times 10^{-2}$	60'86
	AQ	300	$6'80 \times 10^{-4}$	$1'79 \times 10^{-3}$	22'10
	AQI <sup>b</sup>	50	$3'54 \times 10^{-4}$	$6'12 \times 10^{-2}$	53'81
AQ	AA <sup>a</sup>	300	$1'71 \times 10^{-5}$	$4'34 \times 10^{-4}$	70'62
	SD	50	$6'57 \times 10^{-4}$	$-9'57 \times 10^{-3}$	21'02
	AQI	50	$6'42 \times 10^{-4}$	$-1'72 \times 10^{-2}$	70'84
AQI	AA	300	$9'16 \times 10^{-4}$	$2'30 \times 10^{-1}$	7'60
	SD <sup>b</sup>	50	$7'34 \times 10^{-5}$	$9'38 \times 10^{-5}$	95'92
	AQ	300	$3'10 \times 10^{-3}$	$1'53 \times 10^{-1}$	23'65

<sup>a</sup>resuelta en la segunda derivada ; <sup>b</sup>resuelta en la primera derivada

Tabla V.16.- Funciones de calibración de los analitos en presencia de cantidades altas de los demás.

Colorante	Interferente	Concentración (µg/l)	Pendiente b	Ordenada a	P (%)
AA	SD	100	$8'73 \times 10^{-4}$	$3'29 \times 10^{-3}$	9'65
	AQ <sup>a</sup>	500	$1'52 \times 10^{-5}$	$-3'12 \times 10^{-4}$	93'56
	AQI	100	$8'99 \times 10^{-4}$	$4'25 \times 10^{-3}$	74'81
SD	AA	500	$1'21 \times 10^{-3}$	$9'40 \times 10^{-2}$	59'17
	AQ <sup>b</sup>	500	$4'61 \times 10^{-4}$	$1'56 \times 10^{-2}$	80'83
	AQI	100	$3'81 \times 10^{-4}$	$2'32 \times 10^{-2}$	14'98
AQ	AA <sup>a</sup>	500	$1'47 \times 10^{-5}$	$7'76 \times 10^{-4}$	5'28
	SD	100	$6'93 \times 10^{-4}$	$1'56 \times 10^{-3}$	94'30
	AQI	100	$7'24 \times 10^{-4}$	$9'30 \times 10^{-4}$	69'30
AQI	AA	500	$3'36 \times 10^{-3}$	$3'72 \times 10^{-2}$	99'84
	SD <sup>b</sup>	100	$7'53 \times 10^{-5}$	$8'10 \times 10^{-4}$	94'66
	AQ	500	$3'18 \times 10^{-3}$	$2'55 \times 10^{-1}$	70'36

<sup>a</sup> resuelta en la segunda derivada; <sup>b</sup> resuelta en la primera derivada

Observando las tablas V.14, 15 y 16 se pone de manifiesto, al aplicar el correspondiente test de comparación de pendientes recogido en el Capítulo I, la independencia de las señales de cada analito en presencia de cualquiera de los demás en cantidades comprendidas dentro de los intervalos lineales de sus rectas de calibrado, ya que en todos los casos se obtienen valores de  $P > 1\%$ .

## 6.- Aplicaciones.

Con objeto de comprobar la utilidad del método, se aplicó para la determinación de estos colorantes en los productos alimentarios recogidos en la tabla V.37, en la que también se indican los colorantes que llevan, según indican sus fabricantes. El método se validó siguiendo la misma metodología que en los capítulos anteriores.

**Tabla V.17.-** Composición de las muestras analizadas según indicación de los fabricantes.

Muestra	Marca	Colorante
Licor de melón	Amarischia	AA
Sorbete de naranja	Camy	AA
Refresco de plátano	Charly's	AA y AQ
Refresco de limón	World	AA y AQ

#### **6.1.- Validación del método. Aplicación al análisis del contenido de AA y SD en el licor con sabor a melón.**

Como en esta muestra solo hay un componente AA y posiblemente su homólogo no sulfonado, para su determinación no es necesario recurrir a la espectrofotometría derivada, por lo tanto, utilizaremos rectas de calibrado obtenidas a partir de sus espectros de absorción.

El volumen de muestra tomado para realizar los calibrados con adición de patrón es de 1 y de 5 ml para AA y SD respectivamente, los blancos de Youden se realizan tomando volúmenes de muestra entre 0'5 y 2 ml para AA y entre 1 y 7 ml para SD; en ambos casos se aplica el proceso operatorio establecido. Los resultados obtenidos al realizar ambos calibrados y los obtenidos al aplicarles el tratamiento estadístico para la determinación de ambos analitos se recogen en las tablas V.18 y V.19.



Tabla V.18.- Resultados obtenidos al realizar CA y CY para la determinación de AA y SD en el licor de melón.

AA				SD			
CA		CY		CA		CY	
[AA] (µg/l)	A	Vol (ml)	A	[SD] (µg/l)	A	Vol (ml)	A
0	0'2278	0'005	0'1437	0	0'0931	0'01	0'0132
50	0'2644	0'010	0'2448	50	0'1431	0'03	0'0502
100	0'3091	0'015	0'4334	80	0'1764	0'05	0'1000
200	0'3996	0'020	0'5312	100	0'1910	0'07	0'1406

Tabla V.19.- Resultados estadísticos obtenidos en la determinación de AA y SD en el licor de melón.

Parámetros	AA			SD		
	CP	CA	CY	CP	CA	CY
n	15	4	4	15	4	4
a	0'013	0'2243	5'00x10 <sup>-4</sup>	8'00x10 <sup>-2</sup>	0'092	-0'010
b	8'95x10 <sup>-4</sup>	8'67x10 <sup>-4</sup>	27'0	1'02x10 <sup>-3</sup>	1'04x10 <sup>-3</sup>	2'16
s <sub>R,c</sub>	5'27x10 <sup>-3</sup>	3'87x10 <sup>-3</sup>	2'80x10 <sup>-2</sup>	7'88x10 <sup>-4</sup>	1'25x10 <sup>-3</sup>	3'70x10 <sup>-3</sup>
s <sub>p</sub>	5'10x10 <sup>-3</sup>			8'64x10 <sup>-4</sup>		
t (b)	0'78 (P = 44'75%)			0'016 (P = 98'74%)		
b <sub>p</sub>	8'93x10 <sup>-4</sup>			1'02x10 <sup>-3</sup>		
a'	0'0138	0'2220	-----	0'0803	0'0922	-----
BY	-----	-----	-0'0133	-----	-----	0'0903
c <sub>x,P</sub>	254'53	-----	-----	101'47	-----	-----
c <sub>x,A</sub>	-----	248'04	-----	-----	100'59	-----
t (c)	1'94 (P = 7'02%)			1'79 (P = 9'20%)		

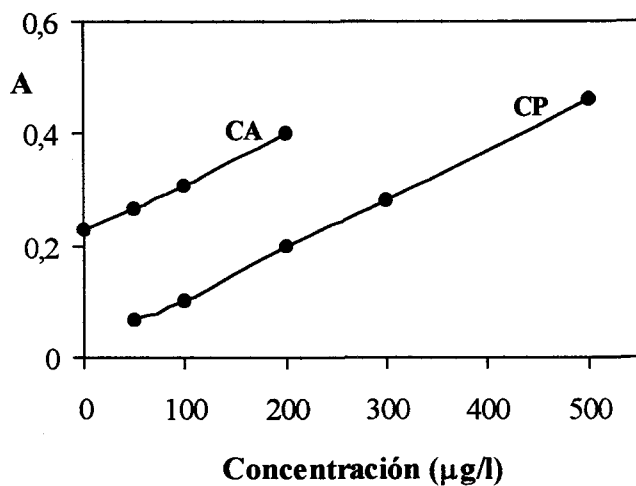


Figura V.9.- Calibrado con patrones (CP) y calibrado con adición de patrón (CA) para la determinación de AA en el licor.

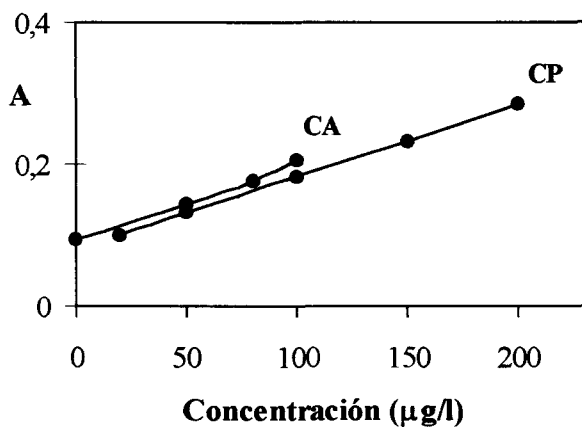


Figura V.10.- Calibrado con patrones (CP) y calibrado con adición de patrón (CA) para la determinación de SD en el licor.

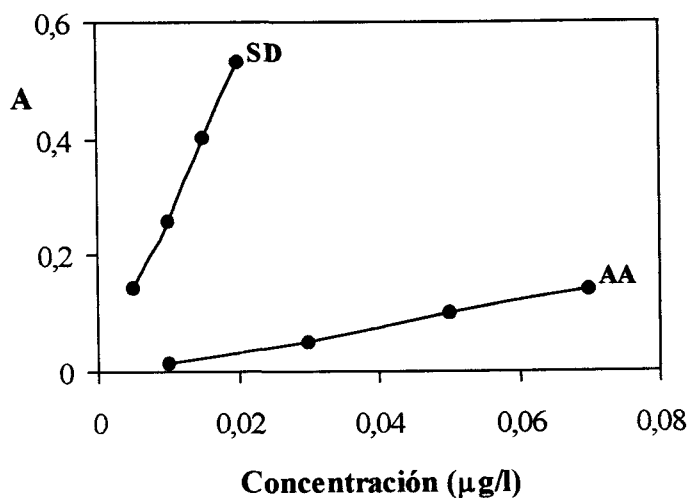


Figura V.11.- Representación gráfica de los blancos de Youden para la determinación de SD y AA en el licor.

Al comparar estadísticamente las concentraciones obtenidas a partir del calibrado con patrones y del calibrado con adición de patrón para ambas analitos, no se encuentran diferencias significativas por lo que el método queda validado para la determinación de AA y SD en el licor de melón.

**Análisis de las muestras**

Una vez comprobada la validez del método para AA y SD, se realizan tres determinaciones de la muestra según el proceso habitual.

Tabla V.20.- Contenido de AA y SD en el licor de melón.

Serie n°	AA		SD	
	A	C (µg/l)	A	C (µg/l)
1	0'2275	254'19	0'0919	100'29
2	0'1971	220'16	0'0931	101'47
3	0'2268	253'41	0'0917	100'09

Teniendo en cuenta que el volumen analizado en el caso de AA es de 1 ml y de 5 ml en el caso de SD y que el volumen final de las disoluciones analizadas es de 100 ml tenemos un contenido medio de AA en el licor de 24'26 mg/l y de SD 2,01 mg/l, las desviaciones estándar de los resultados 8'01% y 0'73% respectivamente.

### 6.2.- Validación del método. Aplicación al análisis del contenido de AA y SD en el sorbete de naranja Camy.

En la muestra solo se presenta el colorante Amarillo Anaranjado, por lo que para su determinación y la del correspondiente compuesto no sulfonado Sudan I se utilizan los espectros de absorción sin derivar, igual que en el caso anterior.

Los calibrados con adición de patrón se establecen en ambos casos adicionando 1 ml de muestra. Los volúmenes tomados para la realización de los blancos de Youden estan comprendidos entre 0'2 y 1 ml para determinar AA y entre 0'5 y 2 para determinar SD. Los resultados se recogen en la tabla V.21.

Tabla V.22.- Resultados obtenidos al realizar CA y CY para la determinación de ambos analitos en el sorbete de naranja Camy.

AA				SD			
CA		CY		CA		CY	
[AA] (µg/l)	A	Vol (ml)	A	[SD] (µg/l)	A	Vol (ml)	A
0	0'6240	0'002	0'1275	0	0'0677	0'005	0'0389
50	0'6640	0'005	0'3120	50	0'1179	0'010	0'0647
100	0'7022	0'007	0'3813	100	0'1674	0'015	0'0977
200	0'7921	0'010	0'6391	200	0'2679	0'020	0'1259

Una vez que se aplica el protocolo estadístico de la validación (tabla V.41), se obtiene igualdad de varianzas ( $P = 32'79\%$  y  $P = 12'08\%$  respectivamente) y de pendientes y el blanco de youden no esta incluido en ningún caso en el intervalo correspondiente a la nueva ordenada en el origen, por lo que para determinar el contenido de analito se restará

el blanco de Youden, en lugar del blanco analítico, a la señal de la muestra. Al comparar los resultados de analito obtenidos por ambos calibrados no se obtienen diferencias significativas, por lo que el método aplicado es exacto para la determinación de dichas muestras.

Tabla V.23.- Resultados estadísticos obtenidos en la determinación de AA y SD en el sorbete de naranja Camy.

Parámetros	AA			SD		
	CP	CA	CY	CP	CA	CY
n	15	4	4	15	4	4
a	0'013	0'622	-8'38x10 <sup>-3</sup>	8'00x10 <sup>-2</sup>	0'067	8'30x10 <sup>-3</sup>
b	8'95x10 <sup>-4</sup>	8'40x10 <sup>-4</sup>	62'22	1'02x10 <sup>-3</sup>	1'00x10 <sup>-3</sup>	5'88
s <sub>R,c</sub>	5'27x10 <sup>-3</sup>	3'37x10 <sup>-3</sup>	0'038	7'88x10 <sup>-4</sup>	2'84x10 <sup>-4</sup>	2'07x10 <sup>-3</sup>
s <sub>p</sub>	5'06x10 <sup>-3</sup>			7'40x10 <sup>-4</sup>		
t (b)	1'56 (P = 13'96%)			0'34 (P = 73'86%)		
b <sub>p</sub>	8'92x10 <sup>-4</sup>			1'01x10 <sup>-3</sup>		
a'	0'0140	0'6177	-----	0'0813	0'0668	-----
BY	-----	-----	-0'022	-----	-----	-0'073
c <sub>x,P</sub>	708'95	-----	-----	58'80	-----	-----
c <sub>x,A</sub>	-----	701'88	-----	-----	57'92	-----
t (c)	1'23 (P = 11'82%)			2'09 (P = 5'29%)		

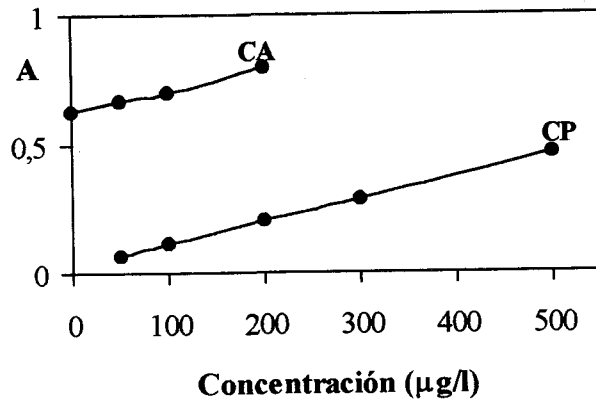


Figura V.12.- Calibrado con patrones (CP) y calibrado con adición de patrón (CA) para la determinación de AA en el sorbete.

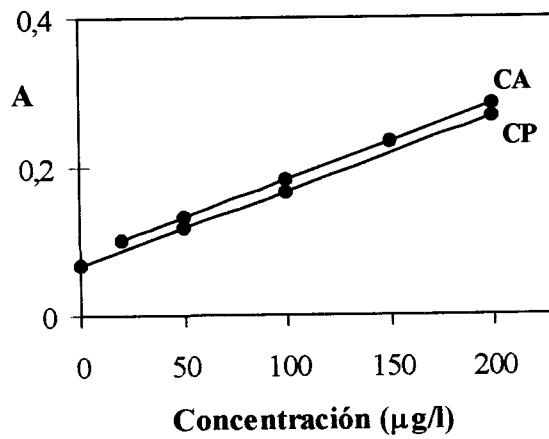


Figura V. 13.- Calibrado con patrones (CP) y Calibrado con adición de patrón (CA) para la determinación de SD en el sorbete.

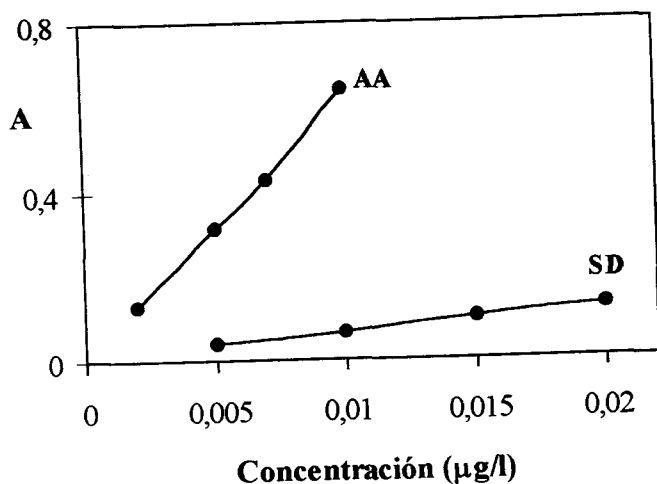


Figura V.14.- Representación gráfica de los blancos de Youden para la determinación de SD y AA en el sorbete.

El método queda validado para la determinación de AA yAQ en la muestra de sorbete de naranja.

**Análisis de las muestras**

Tabla V.24.- Contenido de AA y SD en el sorbete de naranja Camy.

Serie nº	AA		SD	
	A	C (µg/l)	A	C (µg/l)
1	0'5998	683'34	0'0664	57'52
2	0'6012	684'92	0'0618	57'92
3	0'6211	707'20	0'0613	52'47

Teniendo en cuenta que el volumen de muestra que se toma en ambos casos es de 1 ml y que el volumen final de las disoluciones analizadas es de 100 ml, tenemos un

contenido medio de AA en el sorbete de 69'18 mg/l y de SD 5'60 mg/l, las desviaciones estándar de los resultados son 1'92% y 5'42% respectivamente.

### 6.3.- Validación del método. Aplicación al análisis del contenido de AA, SD, AQ y AQI en el refresco de plátano Charly's.

En este compuesto están presentes los cuatro analitos en estudio, lo que hace necesario el empleo de la espectrofotometría derivada para la determinación de los mismos. Para establecer los calibrados con adición de patrón para AA y AQ se toman 5 ml y 2 ml de muestra respectivamente, 5 ml de disolución reguladora y cantidades crecientes de los respectivos patrones, enrasando hasta un volumen final de 100 ml con agua de ósmosis inversa. Posteriormente se adicionan 50 mg de Sephadex DEAE A-25 y se aplica el método operatorio establecido.

Los calibrados de Youden se establecen tomando volúmenes de muestra crecientes entre 2 y 15 ml. Cuando se obtienen los espectros de absorción, se suavizan tomando 19 puntos experimentales y se obtiene la segunda derivada con un  $\Delta \lambda = 5$ .

Tabla V.25.- Resultados obtenidos al realizar CA y CY para la determinación de AA y AQ en el refresco de plátano.

AA				AQ			
CA		CY		CA		CY	
[AA] ( $\mu\text{g/l}$ )	A	Vol (ml)	A	[AQ] ( $\mu\text{g/l}$ )	A	Vol (ml)	A
0	0'0022	0'02	0'0009	0	0'0062	0'02	0'0061
50	0'0032	0'05	0'0022	100	0'0081	0'05	0'0152
100	0'0037	0'10	0'0046	200	0'0097	0'10	0'0300
200	0'0052	0'15	0'0058	300	0'0110	0'15	0'0448



**Tabla V.26.- Resultados estadísticos obtenidos en la determinación de AA y AQ en el refresco de plátano.**

Parámetros	AA			AQ		
	CP	CA	CY	CP	CA	CY
n	15	4	4	12	4	4
a	1'27x10 <sup>-4</sup>	2'30x10 <sup>-3</sup>	2'89x10 <sup>-4</sup>	1'71x10 <sup>-4</sup>	6'35x10 <sup>-3</sup>	2'37x10 <sup>-4</sup>
b	1'50x10 <sup>-5</sup>	1'45x10 <sup>-5</sup>	0'038	1'74x10 <sup>-5</sup>	1'60x10 <sup>-5</sup>	0'2973
s <sub>R,c</sub>	1'07x10 <sup>-4</sup>	1'46x10 <sup>-4</sup>	3'91x10 <sup>-4</sup>	4'45x10 <sup>-4</sup>	2'12x10 <sup>-4</sup>	9'62x10 <sup>-5</sup>
s <sub>p</sub>	1'34x10 <sup>-4</sup>			4'24x10 <sup>-4</sup>		
t (b)	0'63 (P = 53'82%)			0'71 (P = 48'86%)		
b <sub>p</sub>	1'50x10 <sup>-5</sup>			0'74x10 <sup>-5</sup>		
a'	1'50x10 <sup>-5</sup>	2'26x10 <sup>-3</sup>	-----	2'02x10 <sup>-4</sup>	6'14x10 <sup>-4</sup>	-----
BY	-----	-----	-1'21x10 <sup>-3</sup>	-----	-----	3'50x10 <sup>-5</sup>
c <sub>x,P</sub>	127'4	-----	-----	344'71	-----	-----
c <sub>x,A</sub>	-----	131'4	-----	-----	341'14	-----
t (c)	0'94 (P = 36'12%)			0'26 (P = 79'82%)		

Una vez que se aplica el protocolo estadístico de la validación (tabla V.26), se obtiene igualdad de varianzas (P = 19'48% y P = 19'17% respectivamente), y de pendientes . En el caso de la determinación de AQ , el blanco de youden esta incluido en el intervalo correspondiente a la nueva ordenada en el origen, para AA no esta incluido. Al comparar los resultados de analito obtenidos por ambos calibrados no se obtienen diferencias significativas, por lo que el método aplicado es exacto para la determinación de dichas muestras.

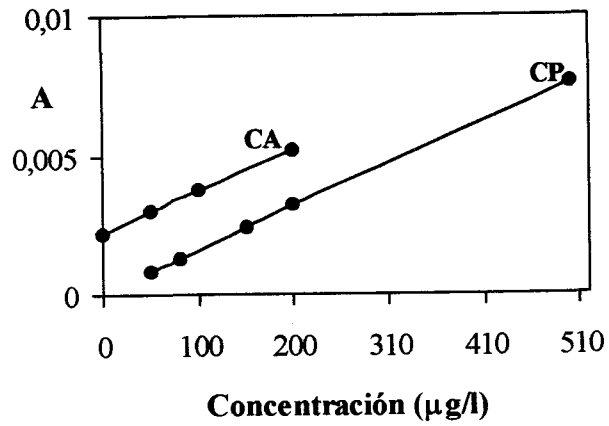


Figura V.15.- Calibrado con patrones (CP) y calibrado con adición de patrón (CA) para la determinación de AA en el refresco de plátano.

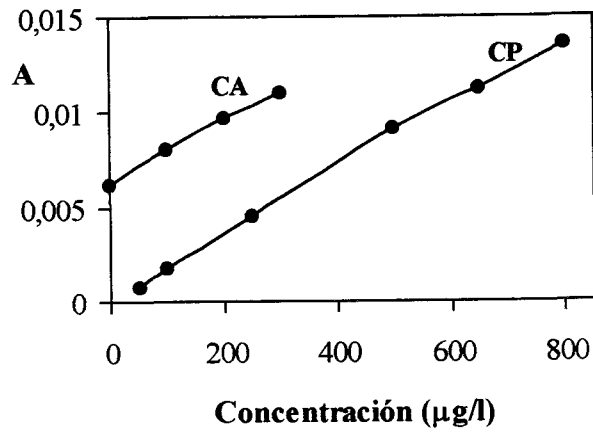


Figura V. 16.- CP y CA para la determinación de AQ en el refresco de plátano.

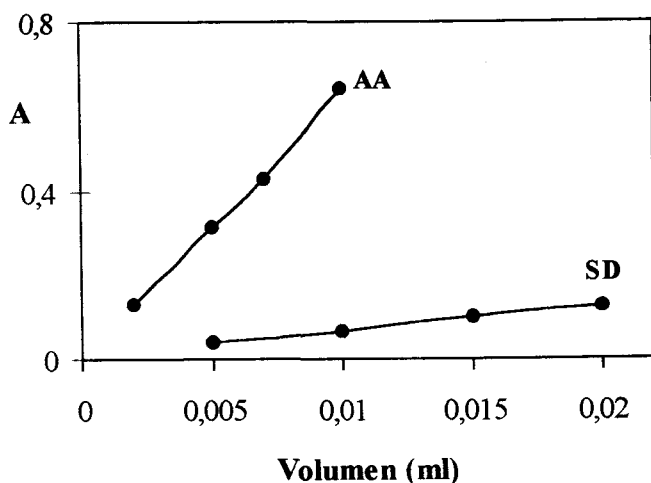


Figura V.17.- Calibrados de Youden para la determinación de AA y AQ en el refresco de plátano.

El método queda validado para la determinación de AA y AQ en el refresco de plátano.

**Análisis de las muestras**

Tabla V.27.- Contenido de AA y AQ en el refresco de plátano.

Serie nº	AA		AQ	
	A	C (µg/l)	A	C (µg/l)
1	0'0025	147'40	0'0062	344'71
2	0'0023	134'06	0'0061	336'91
3	0'0024	140'73	0'0063	350'34

Teniendo en cuenta que el volumen de muestra analizado en el caso de AA es de 5ml y de 2 ml en el de AQ, encontramos un contenido medio de AA en el refresco de

plátano de 2'79 mg/l y de AQ 1'72 mg/l, las desviaciones estándar de los resultados son 5'02% y 1'96% respectivamente.

Para determinar el contenido de SD y AQI se realizan los correspondientes calibrados con adición de patrón tomando 10 ml de muestra en ambos casos. Los volúmenes de la misma tomados para establecer los calibrados de Youden están comprendidos entre 10 y 30 ml.

**Tabla V.28.-** Resultados obtenidos al realizar CA y CY para la determinación de SD y AQI en el refresco de plátano.

SD				AQI			
CA		CY		CA		CY	
[SD] (µg/l)	A	Vol (ml)	A	[AQI] (µg/l)	A	Vol (ml)	A
0	0'0250	0'10	0'0250	0	0'0016	0'10	0'0017
30	0'0380	0'15	0'0280	30	0'0039	0'20	0'0029
50	0'0478	0'20	0'0400	50	0'0055	0'40	0'0038
80	0'0602	0'30	0'0610	80	0'0077	0'60	0'0047

Una vez que se aplica el protocolo estadístico de la validación (tabla V.29), se obtiene igualdad de varianzas ( $P = 18'54\%$  y  $P = 11'00\%$  respectivamente), y de pendientes, en el caso de la determinación de SD el la ordenada en el origen del blanco de Youden no está incluido en el intervalo de la nueva ordenada en el origen del calibrado con patrones, por lo que para determinar el contenido de analito se restará el valor de la ordenada en el origen del blanco de Youden, en la determinación de AQI si está incluida, con lo cual se resta el blanco analítico. Al comparar los resultados de analito obtenidos por ambos calibrados no se obtienen diferencias significativas, por lo que el método aplicado podemos admitir que es exacto para la determinación de dichas muestras.

Tabla V.29.- Resultados estadísticos obtenidos en la determinación de SD y AQI en el refresco de plátano.

Parámetros	SD			AQI		
	CP	CA	CY	CP	CA	CY
n	15	4	4	15	4	4
a	0'020	0'025	3'28x10 <sup>-3</sup>	1'57x10 <sup>-3</sup>	1'61x10 <sup>-3</sup>	1'44x10 <sup>-3</sup>
b	4'31x10 <sup>-4</sup>	4'43x10 <sup>-4</sup>	0'189	7'31x10 <sup>-5</sup>	7'64x10 <sup>-5</sup>	5'64x10 <sup>-3</sup>
s <sub>R,c</sub>	1'16x10 <sup>-3</sup>	5'29x10 <sup>-4</sup>	3'33x10 <sup>-3</sup>	1'48x10 <sup>-4</sup>	5'07x10 <sup>-5</sup>	3'38x10 <sup>-4</sup>
s <sub>p</sub>	1'09x10 <sup>-3</sup>			1'39x10 <sup>-4</sup>		
t (b)	0'54 (P = 59'71%)			1'23 (P = 23'76%)		
b <sub>p</sub>	4'35x10 <sup>-4</sup>			7'38x10 <sup>-5</sup>		
a'	0'0208	0'0253	-----	1'54x10 <sup>-3</sup>	1'72x10 <sup>-3</sup>	-----
BY	-----	-----	-0'0175	-----	-----	-1'00x10 <sup>-4</sup>
c <sub>x,P</sub>	9'65	-----	-----	2'17	-----	-----
c <sub>x,A</sub>	-----	10'34	-----	-----	3'52	-----
t (c)	0'48 (P = 63'77%)			1'25 (P = 22'92%)		

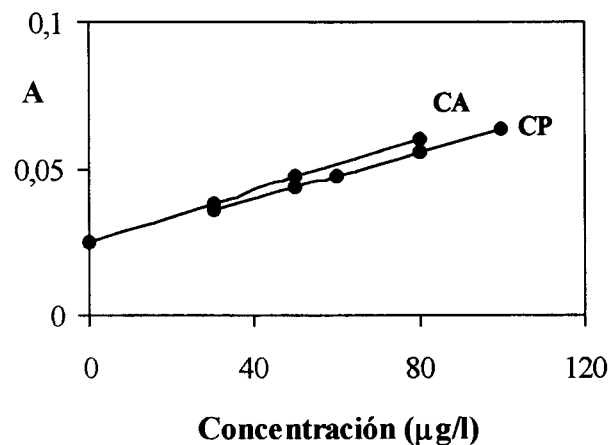


Figura V.

18.- Calibrado con patrones (CP) y calibrado con adición de patrón (CA) para la determinación de SD en el refresco de plátano.

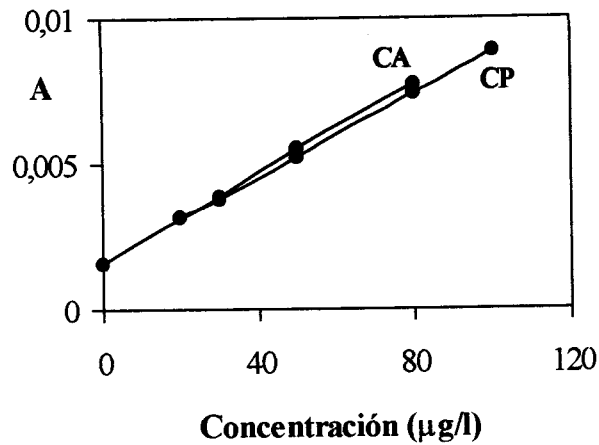


Figura V.19.- Calibrado con patrones (CP) y calibrado con adición de patrón (CA) para la determinación de AQSS en el refresco de plátano.

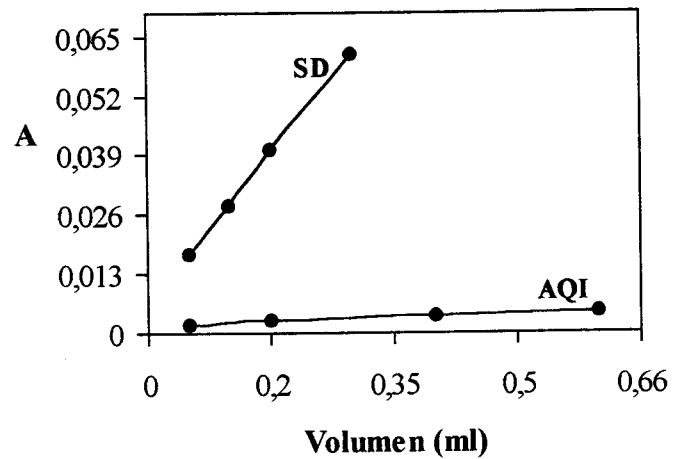


Figura V. 20.- Calibrado de Youden para la determinación de SD y AQI en el refresco de plátano.

### Análisis de las muestras

El contenido de SD y AQI en la muestra se determina realizando tres determinaciones.

Tabla V.30.- Contenido de SD y AQI en el refresco de plátano.

Serie nº	SD		AQI	
	A	C (µg/l)	A	C (µg/l)
1	0'0250	9'65	0'0016	2'17
2	0'0230	5'05	0'0017	3'52
3	0'0250	9'65	0'0016	2'17

El volumen de muestra analizado para los analitos es de 10 ml y el volumen final del análisis es de 100 ml, lo que determina un contenido medio de SD en la muestra de 0'066 mg/l y de 0'026 mg/l para AQI.

#### 6.4.- Validación del método. Aplicación al análisis del contenido de AA, SD, AQ y AQI en el refresco con sabor a limón World.

Al tratar de establecer la cantidad de AA en la muestra, se observa que el método de 100 ml no detecta la presencia de este componente, que por el contrario sabemos que esta presente ya que así lo indica el fabricante. Por esta razón se hizo uso de la propiedad que ya ha sido comentada con anterioridad, que tienen estos métodos, proponiendo el método para la determinación de AA por espectrofotometría derivada en fase sólida en un volumen final de 500 ml.

Para ello en primer lugar se realiza la experiencia para determinar el tiempo de equilibración de la muestra tomando 500µg/l de AA, 5% de disolución reguladora enrasando hasta un volumen final de 500 ml con agua de ósmosis inversa, adicionando 50 mg de Sephadex DEAE A-25 y sometiendo las distintas muestras así preparadas a distintos tiempos de agitación, obteniéndose que a partir de los 15 minutos la señal se hace máxima y estable, por lo que se selecciona un tiempo de equilibración de 15 minutos.

**Método de 500 ml para la determinación de AA en la segunda derivada.**

Para establecer el cumplimiento de la ley de Lambert-Beer se prepararon distintas disoluciones conteniendo cantidades variables de analito a las que se les aplica el método operatorio establecido.

**Tabla V.31** .- Cumplimiento de la ley de Lambert-Beer para el método de 500 ml

[AA] ( $\mu\text{g/l}$ )	${}^2D_{540}$ (500 ml)		
	Serie nº1	Serie nº2	Serie nº3
20	0'0002	0'0004	0'0002
50	0'0022	0'0014	0'0015
100	0'0038	0'0039	0'0039
300	0'0134	0'0136	0'0136
500	0'0220	0'0225	0'0230

Al realizar el Anova en el rango de concentraciones estudiado se obtiene que no hay curvatura ( $P = 48'34\%$ ), se comprueba la homoscedasticidad, el resto de hipótesis matemáticas del modelo se admiten como válidas estableciendo la siguiente ecuación:

$${}^2D_{540} = -6'54 \times 10^{-4} + 4'65 \times 10^{-5} [\text{AA}]$$

**Parámetros de fiabilidad del método de 500 ml.**

Al realizar ANOVA se obtienen los parámetros estadísticos, donde los más significativos se recogen en la tabla V.32.



Tabla V.32.- Parámetros estadísticos.

Parámetros	Valor
$S_{R,c}$	$3'02 \times 10^{-4}$
$r^2$ (%)	99'89
$s_b$	$4'30 \times 10^{-7}$
$s_a$	$1'14 \times 10^{-4}$

Tabla V.33.- Parámetros de fiabilidad del método de 500 ml.

Parámetros	Valor
Linealidad (%)	99'07
$S_{\text{Calibrado}} (\mu\text{g/l})^{-1}$	$4'65 \times 10^{-5}$
$S_{\text{analítica}} (\mu\text{g/l})$	6'49
LD ( $\mu\text{g/l}$ )	3'66
LQ ( $\mu\text{g/l}$ )	12'19
R.D.L.	4'16
I.L. ( $\mu\text{g/l}$ )	12-500

Para determinar los límites de detección y cuantificación, se ha establecido la repetibilidad del blanco, preparando 10 disoluciones conteniendo 25 ml de la disolución reguladora y 50 mg de Sephadex DEAE A-25, medidas frente a una referencia constituida por el soporte sólido y agua, aplicando el procedimiento operatorio establecido, una vez obtenidos los espectros de absorción se filtran a través de 19 puntos experimentales y se obtiene la segunda derivada con un  $\Delta \lambda = 5$  nm. La absorbancia media de los blancos es de  $-1'00 \times 10^{-5}$  y la desviación estándar de  $5'67 \times 10^{-5}$ .

Una vez que se ha establecido el método de 500 ml para la determinación de AA, pasamos a exponer los resultados de los correspondientes calibrados con adición de patrón realizados con 15 y 300 ml de muestra respectivamente. los calibrados de Youden se establecen tomando volúmenes variables de muestra entre 10 y 375 ml (tabla V.46).

Cuando se realiza el tratamiento estadístico de los datos obtenidos (tabla V.47), se encuentra que hay igualdad de varianzas en ambos casos, ( $P = 7'6\%$  y  $P = 37'00\%$  respectivamente) y de pendientes y en el caso de AA el blanco de Youden no está incluido en el intervalo calculado para la nueva ordenada en el origen del calibrado con patrones, en el caso de AQ si está incluido.

Tabla V.34.- Resultados obtenidos al realizar CA y CY para la determinación de AA y AQ en el refresco de limón.

AA (500 ml)				AQ (100 ml)			
CA		CY		CA		CY	
[AA] ( $\mu\text{g/l}$ )	A	Vol (ml)	A	[AQ] ( $\mu\text{g/l}$ )	A	Vol (ml)	A
0	0'0053	0'40	0'0031	0	0'0060	0'10	0'0037
100	0'0096	0'50	0'0042	50	0'0063	0'15	0'0053
150	0'0119	0'60	0'0053	200	0'0100	0'20	0'0070
200	0'0143	0'75	0'0064	500	0'0150	0'25	0'0087

Tabla V.35.- Resultados estadísticos obtenidos en la determinación de AA y AQ en el refresco de limón.

Parámetros	AA (500 ml)			AQ (100 ml)		
	CP	CA	CY	CP	CA	CY
n	15	4	4	12	4	4
a	$-6'54 \times 10^{-4}$	$5,23 \times 10^{-3}$	$-3'57 \times 10^{-4}$	$1'71 \times 10^{-4}$	$5'84 \times 10^{-3}$	$3'30 \times 10^{-4}$
b	$4'65 \times 10^{-5}$	$4,48 \times 10^{-5}$	$8'17 \times 10^{-3}$	$1'74 \times 10^{-5}$	$1'85 \times 10^{-5}$	$3'34 \times 10^{-2}$
$s_{R,c}$	$3'02 \times 10^{-4}$	$1,25 \times 10^{-4}$	$3'22 \times 10^{-4}$	$4'45 \times 10^{-4}$	$4'79 \times 10^{-4}$	$3'87 \times 10^{-5}$
$s_p$	$2'84 \times 10^{-4}$			$4'59 \times 10^{-4}$		
t (b)	0'86 (P = 40'33%)			0'86 (P = 40'66 %)		
$b_p$	$4'64 \times 10^{-5}$			$1'76 \times 10^{-5}$		
$a'$	$-6'32 \times 10^{-4}$	$4'98 \times 10^{-3}$	-----	$1'24 \times 10^{-4}$	$6'02 \times 10^{-3}$	-----
BY	-----	-----	$2'75 \times 10^{-4}$	-----	-----	$2'06 \times 10^{-4}$
$c_{x,P}$	121'97	-----	-----	333'87	-----	-----
$c_{x,A}$	-----	115'02	-----	-----	335'29	-----
t (c)	1'99 (P = 6'39%)			0'09 (P = 92'97%)		

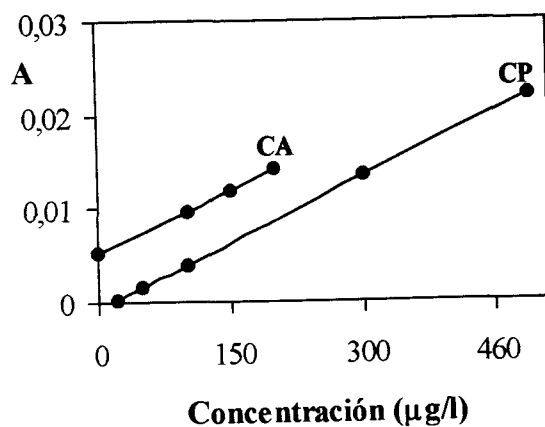


Figura V.21.- Calibrado con patrones (CP) y calibrado con adición de patrón (CA) para la determinación de AA en el refresco de limón.

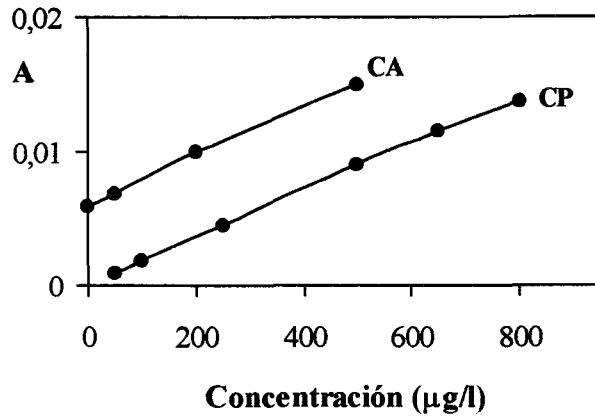


Figura V.22.- Calibrado con patrones (CP) y calibrado con adición de patrón (CA) para la determinación de AQ en el refresco de limón.

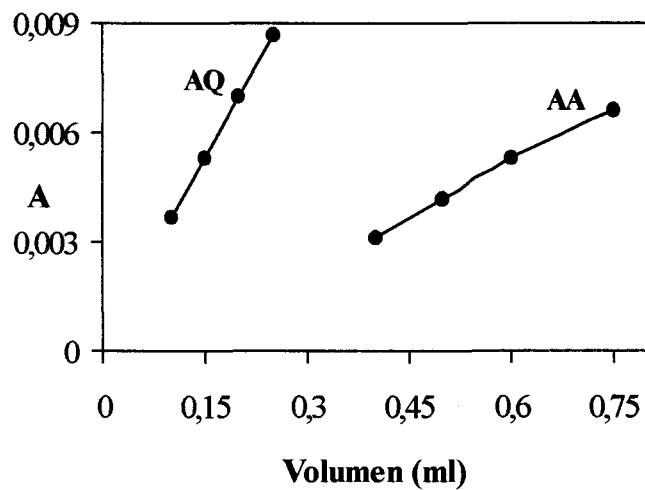


Figura V.23.- Representación del calibrado de Youden para ambos analitos en el refresco de limón.

## Análisis de las muestras

Tabla V.36.- Contenido de AA y AQ en el refresco de limón.

Serie n°	AA		AQ	
	A	C (µg/l)	A	C (µg/l)
1	0'0056	113'97	0'0060	333'87
2	0'0055	126'23	0'0064	356'60
3	0'0053	121'92	0'0065	362'28

El volumen de muestra analizado en el caso de AA es de 300 ml llevado a un volumen de 500 ml, por lo que el contenido medio en la muestra es de 0'209 mg/l. En el caso de AQ es de 15 ml llevados a un volumen final de 100 ml, por lo que su contenido medio en la muestra es de 2'34 mg/l, la desviación estándar relativa del resultado es de 4'28%.

Al tratar de determinar el contenido de SD y AQI, resultó que la cantidad de Sudan I no la detectaba el método, por lo que la determinación de AQI se realizó con los correspondientes espectros sin derivar. El calibrado con adición de patrón se realiza tomando 15 ml de muestra. Los volúmenes de la misma tomados para establecer el calibrado de Youden estan comprendidos entre 5 y 20 ml.

Tabla V.37.- CA y CY para AQI en el refresco de limón.

AQI			
CA		CY	
[AQI] (µg/l)	A	Vol (ml)	A
0	0'0669	0'05	0'0477
20	0'1267	0'10	0'0521
40	0'1995	0'15	0'0672
60	0'530	0'20	0'0803

Tabla V.38.- Resultados estadísticos obtenidos en la determinación de AQI en el refresco de limón.

Parámetros	AQSS		
	CP	CA	CY
n	15	4	4
a	0'015	0'066	0'033
b	$3'33 \times 10^{-3}$	$3'15 \times 10^{-3}$	0'225
$s_{R,c}$	0'024	$5'57 \times 10^{-3}$	$3'67 \times 10^{-3}$
$s_p$	0'022		
t (b)	0'34 (P = 73'86%)		
$b_p$	$3'28 \times 10^{-3}$		
a'	0'022	0'075	-----
BY	-----	-----	0'011
$c_{x,P}$	16'7	-----	-----
$c_{x,A}$	-----	16'3	-----
t (c)	0'10 (P = 92'16%)		

Una vez que se aplica el protocolo estadístico de la validación (tabla V.51), se obtiene igualdad de varianzas  $P = 5'27\%$  y también hay igualdad de pendientes. La ordenada en el origen del blanco de Youden no está incluido en el intervalo de la nueva ordenada en el origen del calibrado con patrones, por lo que para determinar el contenido de analito se restará el valor de la ordenada en el origen del blanco de Youden. Al comparar los resultados de analito obtenidos por ambos calibrados no se obtienen diferencias significativas, por lo que el método aplicado es exacto para la determinación de AQI en la muestra.

## Análisis de la muestra

Tabla V.39.- Contenido de AQI en el refresco de limón.

Serie n°	AQI	
	A	C ( $\mu\text{g/l}$ )
1	0'0721	15'24
2	0'0715	15'06
3	0'0750	16'12

El volumen de muestra analizada es de 15 ml y que el volumen final de trabajo es de 100 ml, se tiene una concentración media de AQI en la muestra de 0'1 mg/l, la desviación estandar de la determinación es de 0'003 y la desviación estándar relativa es de 3'69%.

En la siguiente tabla se resumen los contenidos de los colorantes encontrados en las muestras analizadas:

Tabla V.40.- Resumen del contenido de los colorantes en las muestras.

Muestra	C ( $s_{n-1}$ ) (mg/l)			
	AA	AQ	SD	AQI
Licor de melón	24'26 (1'94)	nc	2'01 (0'01)	nc
Sorbete de naranja	69'18 (1'35)	nc	5'60 (0'30)	nc
Refresco de plátano	2'50 (0'03)	1'72 (0'34)	0'06 (0'26)	0'026 (0'007)
Refresco de limón	0'209 (0'05)	2'34 (0'10)	nd	0'100 (0'003)

nc: no contiene; nd: no se detecta.





**CAPÍTULO VI:  
DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE LOS COLORANTES AMARILLO  
ANARANJADO Y AMARILLO DE QUINOLEINA MEDIANTE  
REGRESIÓN POR MÍNIMOS CUADRADOS PARCIALES**



El objetivo de este capítulo es probar la aplicabilidad de los métodos de calibración multivariante para la determinación mediante espectrofotometría en fase sólida de colorantes en diferentes tipos de matrices. Para ello se aborda la resolución de la mezcla binaria de Amarillo Anaranjado (AA) y Amarillo de Quinoleina (AQ) que ha sido resuelta en el capítulo anterior mediante espectrofotometría derivada en fase sólida aplicando la técnica del zero-crossing. Ahora se combinarán para la resolución de esta mezcla la regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS) a través de las formas algorítmicas PLS-1 y PLS-2, junto con la espectrofotometría en fase sólida, que presenta las ventajas ya conocidas.

Las variables experimentales ya han sido optimizadas en los capítulos anteriores para ambos analitos, así como la comprobación de la existencia de una relación lineal entre la señal analítica que emplearemos en el calibrado multivariante, absorbancia y concentración de analitos. Por consiguiente procederemos a aplicar directamente la metodología para establecer la calibración.

### 1.- Optimización de la matriz de calibración.

El primer paso para aplicar el método de calibración multivariante PLS es el establecimiento de la matriz de calibración. Para ello se diseña una matriz de calibración que estará constituida tanto por disoluciones de mezclas binarias como por disoluciones unitarias de ambos colorantes, en concentraciones seleccionadas de forma aleatoria y comprendidas dentro de los intervalos de linealidad establecidos para cada uno de los colorantes, que en este caso se encuentra entre 50 y 500  $\mu\text{g/l}$ .

Se prepara un conjunto de 16 disoluciones que contienen uno o los dos colorantes en distintas proporciones. Este número de muestras es lo suficientemente amplio para que al aplicar los criterios de rechazo y eliminar las posibles muestras erróneas, podamos disponer de un número adecuado de ellas que permita obtener la matriz de calibración óptima al aplicar los métodos de calibración multivariantes. A cada una de estas muestras se le aplica el método operatorio establecido en el Capítulo I, con lo que se obtienen los correspondientes espectros de absorción.

Una vez obtenidos los espectros de absorción de cada una de las muestras que componen la matriz de calibración, cada uno de ellos se somete a distintas manipulaciones previas antes de aplicarle el método de PLS, con el fin de obtener los mejores resultados posibles. Los tratamientos a los que se somete al conjunto de espectros son:

- 1.- El primer conjunto de datos está formado por los espectros que no se someten a ningún tratamiento previo, son los que se obtienen directamente al introducir las muestras en el espectrofotómetro y registrar los espectros con un intervalo de longitud de onda de 5 nm.
- 2.- El segundo conjunto de datos está formado por los espectros anteriores después de ser sometidos a una operación de suavizado del ruido instrumental, utilizando para ello el método de Savitzky-Golay, con un intervalo de 15 puntos experimentales.
- 3.- El tercer conjunto de datos lo constituyen los espectros derivados de primer orden, obtenidos a partir de los originales con un incremento de longitud de onda

de 5 nm

4.- El cuarto conjunto de datos espectrales es el formado por los espectros originales, manipulados mediante el programa informático Datta Leader de forma que todos con el programa informático Datta Leader se hace que todos los espectros originales comiencen en un valor cero de absorbancia, con lo cual tenemos que todos los espectros que forman la matriz de calibración parten del mismo punto.

A estos cuatro conjuntos de datos espectrales correspondientes a la misma matriz de calibración, se le aplica ambos algoritmos PLS-1 y PLS-2. Para efectuar los cálculos en todos los casos se selecciona la zona del espectro visible comprendida entre 400 y 600 nm, ya que es ahí donde se encuentra la mayor información espectral correspondiente a los analitos, mientras que en la zona comprendida entre 600 y 800 nm la señal que se obtiene es la misma que corresponde al blanco. En estas condiciones el número total de puntos experimentales que tenemos en los espectros sin derivar y sin suavizar es de 401 puntos. Al efectuar los cálculos con los cuatro conjuntos de datos se comprueba que se obtienen los mejores resultados con los espectros originales de los que una vez aplicados los criterios de rechazo establecidos en el Capítulo I, se seleccionan 15 muestras para obtener la matriz de calibración (tabla IV.1) que se utilizará posteriormente en la etapa de predicción.

Tabla IV.1.- Composición de la matriz de calibración.

Muestra	[AA] ( $\mu\text{g/l}$ )	[AQ] ( $\mu\text{g/l}$ )	Muestra	[AA] ( $\mu\text{g/l}$ )	[AQ] ( $\mu\text{g/l}$ )
1	50	0	9	150	150
2	200	0	10	250	200
3	400	0	11	200	300
4	0	50	12	300	100
5	0	200	13	100	400
6	0	400	14	200	150
7	150	50	15	50	200
8	80	250	-----	-----	-----

Los resultados que se obtienen mediante PLS-1 y PLS-2 son igualmente satisfactorios. Sin embargo seleccionamos la forma algorítmica de PLS-2 porque al calcular el valor de PRESS para todos los componentes a la vez, tiene un campo de aplicación más restringido, dando solamente resultados satisfactorios cuando el número de componentes es bajo, como es el caso de la mezcla binaria planteado por nosotros.

Como podemos ver en la tabla VI.2, el número máximo de factores a tener en cuenta para optimizar la matriz de calibración, aplicando el criterio de Haaland y Thomas (mitad de número de muestras patrón más uno) es de ocho, por lo tanto, teniendo en cuenta que vamos a utilizar el algoritmo PLS-2 que utiliza un solo valor de PRESS para todos los componentes y que dicho valor es el que corresponde al primer valor de probabilidad que se encuentra por debajo de 0,75, nos encontramos que el número máximo de factores es tres, al que le corresponde un valor de PRESS de 390,83 y un cociente F unidad. Este cociente F se obtiene dividiendo cada valor de PRESS por el mínimo de los valores de PRESS de todos los encontrados.

Tabla VI.2.- Factores y valores de PRESS.

Número de Factores	PRESS	Cociente F	Probabilidad (tanto por uno)
0	448773,34	1148,30	1,00
1	383319,81	980,79	1,00
2	11681,00	29,88	0,99
<b>3</b>	<b>390,83</b>	<b>1,00</b>	<b>0,50</b>
4	500,39	0,00	0,00
5	487,37	0,00	0,00
6	564,72	0,00	0,00
7	593,76	0,00	0,00
8	576,84	0,00	0,00

En la tabla VI.3, se recogen los parámetros estadísticos relacionados con la calidad

del ajuste del modelo para cada colorante obtenidos de la forma ya comentada en el Capítulo I.

**Tabla VI.3.-** Parámetros estadísticos.

Colorante	R <sup>2</sup>	RMSD	REP
AA	0,99919	3,2551	2,1300
AQ	0,99909	3,9318	2,5728

Los resultados obtenidos en la predicción de ambos analitos son satisfactorios, ya que la correlación entre las concentraciones verdaderas y las predichas por la matriz, expresadas como R<sup>2</sup>, son en ambos casos superiores a 0,999.

## **2.- Determinación de ambos colorantes en mezclas sintéticas aplicando el método PLS-2.**

La matriz de calibración anteriormente seleccionada se emplea a continuación para determinar ambos colorantes en mezclas sintéticas. El objetivo de esta experiencia es determinar la capacidad de la matriz de calibración para resolver no solo, mezclas binarias, sino también sistemas que solamente contengan uno de los analitos de forma que, posteriormente podamos aplicar el método a la resolución de muestras de productos alimenticios con garantías de éxito. Para ello se preparan mezclas de ambos analitos binarias y unitarias y se les aplica el proceso operatorio establecido introduciendo los espectros obtenidos en la matriz de calibración. En las tablas VI.4, VI.5 y VI.6 se recogen los resultados obtenidos, donde se establece el tanto por ciento de recuperación para cada una de las muestras.

Tabla VI.4.- Mezclas sintéticas unitarias de AA y AQ.

Mezcla	AA		Mezcla	AQ	
	C( $\mu\text{g/l}$ ) puesta	% R		C( $\mu\text{g/l}$ ) puesta	% R
1	50	89,2	1	0	-0,5
2	150	97,7	2	0	0,3
3	300	98,6	3	0	1,4
4	0	-2,2	4	50	98,5
5	0	1,2	5	150	99,4
6	0	6,9	6	400	97,8

Tabla VI.5.- Mezclas sintéticas binarias de AA y AQ.

Mezcla	AA		AQ	
	C ( $\mu\text{g/l}$ ) puesta	%R	C ( $\mu\text{g/l}$ ) puesta	%R
1	150	97,9	80	99,5
2	200	98,0	200	98,7
3	50	104,5	50	97,8
4	400	95,4	100	100,2
5	150	102,4	200	100,0
6	80	110,0	300	98,9
7	300	100,0	100	99,2
8	200	99,1	300	99,1
9	200	101,8	250	97,9
10	100	102,8	150	100,0



En la tabla VI.4 se pone de manifiesto la capacidad de predicción de la matriz de calibrado incluso para determinar el contenido de analito en muestras que presenten un solo colorante.

En las mezclas sintéticas binarias, el porcentaje de recuperación para AA esta entre 89,2 y 110,0% y para AQ entre 97,8 y 100,2%, por lo que los resultados pueden considerarse satisfactorios, quedando clara la capacidad de la matriz seleccionada para resolver este tipo de mezclas.

### 3.- Aplicación del método PLS-2 a la resolución de la mezcla AA yAQ en productos alimenticios comerciales.

Para la aplicación práctica del método, se seleccionaron 8 muestras comerciales de productos alimenticios , 6 refrescos, un licor y un sorbete, que contenían la mezcla de ambos compuestos, o bien, uno solo de ellos. El contenido, clase y marca de las muestras es la siguiente:

**Tabla VI.6.-** Composición de las muestras analizadas suministradas por los fabricantes.

Nº	Muestra	Marca	Composición
1	Refresco de plátano	Charly's.	AA y AQ
2	Refresco de limón	Revoltosa	AA y AQ
3	Refresco de limón	Tang	AA y AQ
4	Refresco de limón	World	AA y AQ
5	Refresco de limón	Gatorade	AQ
6	Refresco de limón	Hipercor	AQ
7	Licor de melón	Amarischia	AA
8	Sorbete de naranja	Camy	AA

Para la determinación del contenido de colorantes en las muestras, se toman 3 volúmenes diferentes de cada una de ellas y se les aplica el método operatorio establecido

realizándose 5 réplicas para cada volumen. Los espectros obtenidos con las muestras se introducen en la matriz de calibración seleccionada y esta nos da el contenido de los analitos en las distintas muestras (tabla VI.7).

Tabla VI.7.- Aplicaciones a muestras reales.

Muestra	Volumen (ml)	C <sup>1</sup> (s <sub>n-1</sub> ) (mg/l)	
		AA	AQ
1	1	3,17 (0,06)	15,44 (0,26)
	2	2,77 (0,09)	16,24 (0,30)
	2.5	3,23 (1,84)	15,92 (0,82)
2	5	0,23 (0,02)	1,42 (0,05)
	10	0,31 (0,15)	1,60 (0,05)
	20	0,34 (0,02)	1,67 (0,05)
3*	10	50,64 (7,72)	2191,32 (41,49)
	20	91,65 (8,55)	2223,45 (68,50)
	25	102,33 (5,02)	2231,53 (25,60)
4*	10	250,03 (4,25)	1868,98 (45,25)
	15	303,90 (3,78)	1979,32 (57,70)
	20	283,25 (3,27)	1947,95 (50,62)
5	2	nc	4,12 (0,24)
	5		5,70 (0,12)
	7		5,94 (0,16)
6	5		1,67 (0,07)
	10	nc	1,84 (0,06)
	15		1,90 (0,38)
7	0.5	24,97( 0,72)	
	1	25,02 (0,68)	nc
	1.5	26,09 (0,35)	
8	0.1	65,74 (1,09)	
	0.3	68,00 (1,53)	nc
	0.4	67,24 (1,52)	

<sup>1</sup>Valor medio de 5 réplicas; \* expresado en µg/l.

El resultado final del contenido de los colorantes en las muestras estudiadas se da comola media de las cinco determinaciones realizadas para tres volúmenes de muestra diferentes, recogidos en la tabla anterior.

**Tabla VI.9.-** Contenido final de los colorantes en las muestras estudiadas.

Muestra	C(s <sub>n-1</sub> ) (mg/l)	
	AA	AQ
1	3,05 (0,25)	15,87 (0,40)
2	0,29 (0,06)	1,56 (0,13)
3*	81,54 (27,29)	2215,43 (21,27)
4*	279,06 (27,18)	1932,08 (56,86)
5	no contiene	5,25 (0,99)
6	no contiene	1,80 (0,12)
7	25,36 (0,64)	no contiene
8	66,99 (1,15)	no contiene

\* expresada en µg/l.

### 3.1 Validación del método mediante Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR).

Para comprobar la validez de los resultados obtenidos con nuestro método se comparan estos con los obtenidos por medio de CLAR, según el método establecido por J.F. Lawrence<sup>1</sup>. El método cromatográfico se basa en la formación de un par iónico entre los colorantes y una disolución del reactivo tetrabutilamonio fosfato (TBAP), 0,005M. La formación de este compuesto hace que los colorantes se retengan en la columna de C-18, cuando son inyectados en el cromatógrafo, pudiéndose eluir selectivamente más tarde cuando se hace pasar, a través de la columna de C-18, la fase móvil formada por una mezcla metanol/agua. La columna de C-18 es de 5µm y de 100 x 2,1 mm, la fase móvil, que también lleva el reactivo, está formada por una mezcla de metanol/agua (45: 55), el flujo

es de 0,4 ml/min, el volumen de inyección es de 25,0  $\mu$ l y la longitud de onda de medida es de 410 nm.

### 3.1.1.- Calibración para CLAR.

En las condiciones anteriormente descritas se preparan cinco patrones de ambos analitos que contienen 1, 2, 3, 4 y 5 mg/l cada uno y (0,005 M) TBAP. Cada patrón se inyecta dos veces, apareciendo el cromatograma de AA a los 2,470 minutos y el de AQ a los 8,327 minutos. La medida del área de cada uno de ellos aparece en la tabla VI.9.

Tabla VI.9.- Calibrado para AA y AQ.

Concentración (mg/l)	Área (u.a) AA		Área (u.a) AQ	
	Serie n°1	Serie n°2	Serie n°1	Serie n°2
1	450295	408725	351718	308198
2	763776	585139	105758	703974
3	903876	778628	1044462	1246216
4	956680	1036693	1483621	1556513
5	1165440	1036693	1825886	1661107

Al representar la concentración frente al área del pico cromatográfico se obtiene una línea recta cuya ecuación, ajustada por el método de mínimos cuadrados, es:

$$\text{Para AA: } [\text{AA}] = -1'85 + 6'00 \times 10^{-6} \cdot \text{Área}$$

$$\text{Para AQ: } [\text{AQ}] = -0'24 + 2'88 \times 10^{-6} \cdot \text{Área}$$

donde la concentración viene expresada en mg/l.

Al aplicar el cálculo estadístico ANOVA en el rango de concentraciones de 1 a 5 mg/l, se encuentra que no hay curvatura ni para AA (P = 64,98%) ni para AQ (P = 47,49%).

### 3.1.2.- Determinación del contenido en AA y AQ de las muestras reales mediante CLAR.

- **Tratamiento previo de las muestras.-** Puesto que todas las muestras son líquidas (incluido el sorbete de naranja que se dejó fundir) se filtraron y se tomaron los siguientes volúmenes de cada una de ellas: 0,8 ml de la muestra del licor de melón, 0,2 ml del sorbete de naranja, 7 ml del refresco de limón gatorade, 10 ml de refresco de plátano y 20 ml de las muestras de los refrescos de limón Revoltosa, Tang, World y Hipercor. Se les añade a cada una la cantidad necesaria de TBAP para que tengan una concentración final de 0,005 M del reactivo y se introducen en jeringas de 5 ml acopladas a cartuchos de 300 mg de C-18 que previamente ha sido acondicionado pasando a su través de 5 ml de metanol. El líquido cae por gravedad, con lo que se consigue que el contacto entre la disolución y la resina sea la máxima posible, quedando los colorantes que contienen las muestras, retenidos en el interior del cartucho mientras que el resto de la matriz, que no tiene color, se recoge en un matraz de 10 ml de capacidad que se encuentra situado en el otro extremo del cartucho. A continuación este matraz se retira colocando en su lugar otro matraz de 10 ml perfectamente limpio, para recoger en él el colorante que es eluido haciendo pasar a través del cartucho 10 o 20 ml de metanol, según los casos, dejando al igual que antes que este disolvente caiga por gravedad favoreciendo así el contacto con los granos del gel. El colorante de la muestra disuelto en metanol, se introduce en un vaso de 25 ml que se pone en un baño de arena que se encuentra a la temperatura de ebullición del disolvente, se tiene el tiempo suficiente para que se elimine el disolvente, evitando que la muestra se quemé. A continuación se añade agua para recoger el colorante y la disolución obtenida se introduce en el cromatógrafo. De cada muestra se realizan 5 réplicas, obteniendo los siguientes resultados (tabla VI.9).

Tabla V.9.- Resultados obtenidos al aplicar el método CLAR a las muestras estudiadas.

Muestra	C (s <sub>n-1</sub> ) (mg/l)		Muestra	C (s <sub>n-1</sub> ) (mg/l)	
	AA	AQ		AA	AQ
1	2,844 (0,005)	1,42 (0,14)	5	nc	5,18 (0,53)
2	0,27 (0,05)	1,52 (0,20)	6	nc	1,74 (0,10)
3	0,52 (0,02)	2,28 (1,15)	7	23,86 (1,09)	nc
4	0,31(0,01)	2,30 (0,12)	8	67,03 (1,09)	nc

Cada valor de la tabla se ha obtenido como resultado de 5 réplicas.

### 3.1.3.- Comparación de los resultados obtenidos mediante EFS y CLAR para las muestras reales.

Una vez obtenidos los resultados mediante nuestro método (tabla VI.8) y mediante el de referencia CLAR (tabla VI.9) procedimos a la comparación de ambos resultados para cada una de las dos métodos elegidos. La comparación se hizo aplicando el método estadístico descrito en el Capítulo I de la presente Memoria, según el cual en primer lugar se comparan las varianzas de los resultados del contenido del colorante obtenido por ambos métodos, si no hay diferencias significativas entre ambas, o sea  $P > 5\%$ , se calcula una varianza promedio, si hay diferencias se calculan los grados de libertad teóricos mediante la aplicación del test de Welch. En ambas situaciones cuando se aplica el test t de student, para comparar los contenidos medios de colorante encontrados por ambos métodos, no se presentan diferencias significativas entre ellas, ya que  $P > 5\%$  para todas las muestras, por lo que queda comprobado que se puede aplicar satisfactoriamente la calibración multivariante para resolver mezclas de estos colorantes en diferentes matrices.

Los resultados de la comparación estadística del contenido de los colorantes en las muestras, junto con los parámetros estadísticos necesarios para tal fin, se recogen en las siguientes tablas.

Tabla VI.10.- Comparación del contenido de AA y de AQ en el refresco de plátano.

Parámetros	AA		AQ	
	CLAR	EFS	CLAR	EFS
n	5	3	5	3
$\bar{c}$ (mg/l)	2,836	3,056	1,42	1,59
$s_{n-1}$	0,0055	0,248	0,14	0,40
t	1,53 (P = 17,68%)		0,38 (P = 71,70%)	

Tabla VI.10.- Comparación del contenido de AA y de AQ en el refresco de limón Revoltosa.

Parámetros	AA		AQ	
	CLAR	EFS	CLAR	EFS
n	5	3	5	3
$\bar{c}$ (mg/l)	0,27	0,29	1,52	1,56
$s_{n-1}$	0,05	0,06	0,20	0,13
t	0,06 (P = 95,41%)		0,10 (P = 92,36%)	

**Tabla VI.12.-** Comparación del contenido de AA  
y de AQ en el refresco de limón Tang.

Parámetros	AA		AQ	
	CLAR	EFS	CLAR	EFS
n	5	3	5	3
$\bar{c}$ (mg/l)	0,52	0,81	2,28	2,21
$s_{n-1}$	0,02	0,03	1,15	0,21
t	0,84 (P = 43,31%)		0,13 (P = 90,08 %)	

**Tabla VI.13.-** Comparación del contenido de AA  
y de AQ en el refresco de limón world.

Parámetros	AA		AQ	
	CLAR	EFS	CLAR	EFS
n	5	3	5	3
$\bar{c}$ (mg/l)	0,31	0,28	2,30	1,93
$s_{n-1}$	0,01	0,03	0,12	0,05
t	0,08 (P = 93,88%)		0,97 (P = 36,95%)	



Tabla VI.14.- Comparación del contenido de AQen el refresco de limón Gatorade y en de Hipercor.

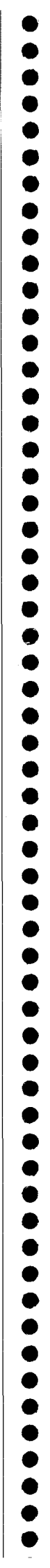
Parámetros	Refresco de limón Gatorade		Refresco de limón Hipercor	
	CLAR	EFS	CLAR	EFS
n	5	3	5	3
$\bar{c}$ (mg/l)	5,18	5,25	1,74	1,80
$s_{n-1}$	0,53	0,99	0,10	0,12
t	0,11 (P = 91,60 %)		0,16 (P = 87,81%)	

Tabla VI.15.- Comparación del contenido de AA en el licor de melón y en el sorbete de naranja Camy.

Parámetros	Licor de melón		Sorbete de naranja Camy	
	CLAR	EFS	CLAR	EFS
n	5	3	5	3
$\bar{c}$ (mg/l)	23,86	25,36	67,03	66,99
$s_{n-1}$	1,09	0,64	1,40	1,15
t	1,97 (P = 9,60 %)		0,04 (P = 96,94%)	



**CAPÍTULO VII:  
DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE LOS COLORANTES  
TARTRACINA, ESCARLATA 4R Y AMARILLO ANARANJADO  
MEDIANTE REGRESIÓN POR MÍNIMOS CUADRADOS PARCIALES**



En este capítulo se propone la resolución de la mezcla ternaria formada por los colorantes Tartracina (TT), Escarlata 4R (ER) y Amarillo Anaranjado (AA) ampliamente utilizados en alimentación. Los espectros de estos tres colorantes se encuentran muy solapados (Figura VII.1), por lo que la resolución de esta mezcla mediante espectrofotometría derivada aplicando la técnica del zero-crossing implicaría el empleo de un orden de derivación muy elevado con la consiguiente disminución en la sensibilidad. Por ello proponemos el empleo de métodos de calibración multivariante junto con la espectrofotometría en fase sólida para la resolución de este problema. La ventaja que supone el empleo de los métodos de multicalibración es que nos permitirán la resolución tanto de la mezcla ternaria como de las tres posibles binarias, así como también la determinación individual de cada colorante sin tener que recurrir a diferentes procedimientos. El método de multicalibración que aquí se emplea es el de regresión por mínimos cuadrados parciales, PLS, en su forma algorítmica PLS-1.

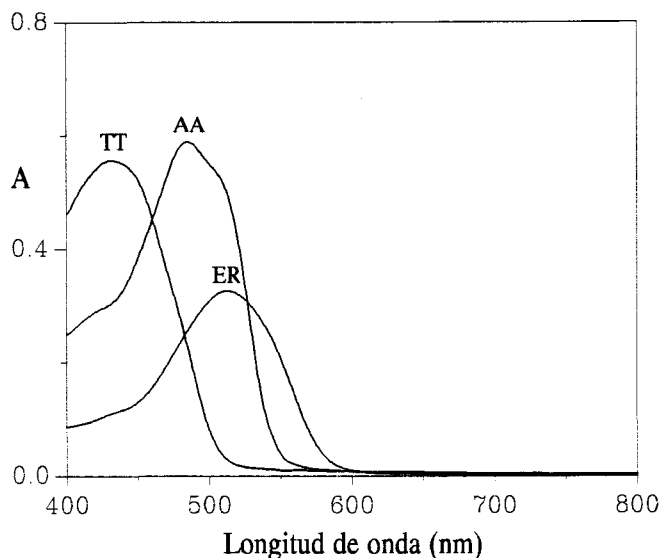


Figura VII.1.- Espectros de absorción de TT, ER y AA.

## 1.- Estudio de las variables experimentales.

Antes de abordar la resolución de la mezcla de los tres colorantes seleccionados, se procede al estudio de las variables experimentales que afectan a la fijación de los tres compuestos sobre Sephadex DEAE A-25. Para AA y ER, las variables experimentales ya han sido optimizadas en los Capítulos II y IV respectivamente, por lo que no vamos a repetir su estudio en este capítulo. Ahora bien, los resultados allí obtenidos condicionan el valor de las variables para TT y por ello, para este colorante solo se estudiará la influencia del pH.

### 1.1.- Influencia del pH.

Para conocer la influencia del pH del medio sobre la fijación de la tartracina, ya que el pH condiciona la existencia de la forma aniónica del analito que se retiene sobre la resina, se preparan disoluciones de 500  $\mu\text{g/l}$  en matraces de 100 ml. Cada disolución se ajusta hasta un valor de pH final diferente adicionando para ello la cantidad de HCl o NaOH (1M) necesaria para conseguir el valor de pH requerido (figura VII.2). A la vista de la figura, para establecer el valor de pH óptimo para la resolución de la mezcla, hay que llegar a una situación de compromiso entre las condiciones de pH más favorable para los tres colorantes.

Teniendo en cuenta este criterio se optó por seleccionar un valor de pH de 2, ya que a este valor la señal de absorbancia que se obtiene es máxima para TT y ER.

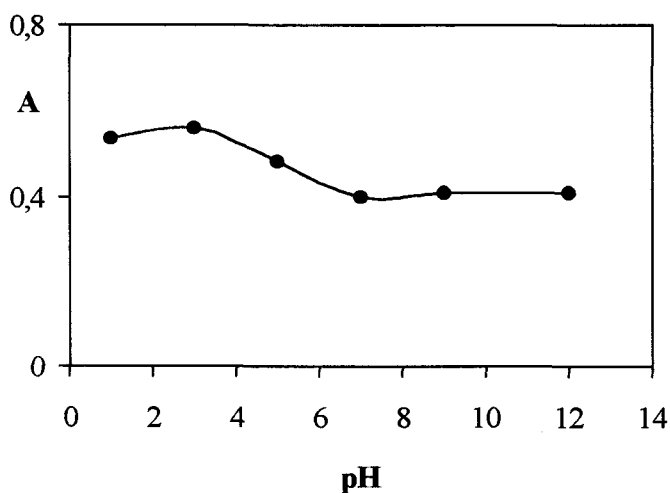


Figura VII.2.- Influencia del pH para TT.

Para ajustar este valor de pH se utiliza una disolución de HCl 0,5 M, comprobándose que 2,2 ml de esta disolución son suficientes para mantener constante el valor del pH.

## 2.- Funciones de calibrado para TT, AA y ER.

Se preparan series de disoluciones por triplicado, conteniendo cada una de ellas entre 50 y 800  $\mu\text{g/l}$  de cada analito. Se le añaden 2,2 ml de la disolución de HCl 0,5 M enrasando hasta un volumen final de 100 ml con agua de ósmosis inversa. A cada disolución se le añaden 50 mg de Sephadex DEAE A-25, agitándose durante 10 minutos y aplicando el método operatorio establecido en capítulos precedentes. Los resultados que se obtienen son los siguientes:

Tabla VII.1.- Cumplimiento de la ley de Lambert-Beer para los analitos.

Conc. ( $\mu\text{g/l}$ )	TT			ER			AA		
	Serie n°1	Serie n°2	Serie n°3	Serie n°1	Serie n°2	Serie n°3	Serie n°1	Serie n°2	Serie n°3
50	0,0593	0,0572	0,0616	0,0136	0,0103	0,0141	0,0676	0,0729	0,0160
100	0,1114	0,1103	0,1043	0,0312	0,0385	0,0376	0,1255	0,1252	0,1278
250	0,2919	0,2837	0,2845	0,1406	0,1399	0,1358	0,2892	0,2891	0,2880
500	0,5292	0,5252	0,5518	0,3567	0,3255	0,3756	0,6053	0,5832	0,5848
650	0,7025	0,6881	0,7413	0,4382	0,4687	0,4401	0,7303	0,7307	0,7598

No se ha incluido en la tabla anterior los valores de absorbancia para la concentración de 800  $\mu\text{g/l}$  porque en todos los casos, al aplicar el test de fallo de ajuste en el rango de concentraciones comprendido entre 50 y 800  $\mu\text{g/l}$  se observaba una curvatura en la región de mayor concentración que desaparece al rechazar el valor de 800  $\mu\text{g/l}$ . Al aplicar de nuevo el test de fallo de ajuste entre 50 y 650  $\mu\text{g/l}$  se encuentra que no hay curvatura en ningún caso, siendo los valores de P encontrados los siguientes: TT (P = 32,92%), ER (P = 11,86%) y AA (P = 6,6%).

### 3.- Optimización de la matriz de calibración.

El primer paso para aplicar el método de calibración multivariante PLS es el establecimiento de la matriz de calibración. Para ello se diseña una matriz de calibración que estará constituida por mezclas ternarias, binarias y de un solo componente de los tres colorantes, en concentraciones seleccionadas de forma aleatoria y comprendidas dentro de los intervalos de linealidad establecidos para cada uno de los colorantes, en este caso entre 50 y 650  $\mu\text{g/l}$ . Con tal motivo, se preparan un conjunto de 24 disoluciones que contienen mezclas de los colorantes en distintas proporciones. Este número es lo suficientemente amplio como para que al aplicar los criterios de rechazo y eliminar las posibles muestras erróneas, podamos disponer de un número adecuado de ellas que permita obtener la matriz de calibración óptima al aplicar los métodos de calibración multivariante. A cada una de estas mezclas se le aplica el método operatorio establecido en el Capítulo I, con lo que se



obtienen los correspondientes espectros de absorción. Los espectros se registran con un intervalo de 0.2 nm para disponer de un gran número de puntos experimentales.

Tabla VII.2.- Composición de la matriz de calibración.

Muestra	[TT] ( $\mu\text{g/l}$ )	[ER] ( $\mu\text{g/l}$ )	[AA] ( $\mu\text{g/l}$ )
1	50	0	0
2	250	0	0
3	600	0	0
4	0	0	50
5	0	50	0
6	0	250	0
7	0	600	0
8	100	250	200
9	200	100	300
10	100	400	100
11	200	100	50
12	250	200	150
13	300	100	100
14	80	250	150
15	200	200	200
16	250	150	100
17	150	200	150
18	200	100	80
19	250	150	80
20	100	300	150
21	80	100	50

En todos los casos se selecciona la zona del espectro visible comprendida entre 400 y 800 nm, aunque la zona comprendida entre 600 y 800 nm no aporta ninguna información ya que la señal producida por los patrones es igual a la producida por los blancos respectivos. El número de puntos experimentales que tenemos en los espectros, una vez suavizados usando 15 puntos experimentales mediante el método de Savitzky-Golay, es de 1987 puntos. Posteriormente se comprobó que se obtienen los mejores resultados con los espectros suavizados, a los que se les aplican los criterios de rechazo establecidos en el Capítulo I y de cuyo resultado se seleccionan 21 muestras para obtener la matriz de calibración (tabla VII.2). Matriz que se utiliza posteriormente en la etapa de predicción. Se aplican ambos algoritmos PLS-1 y PLS-2, obteniéndose mejores resultados al aplicar PLS-1, por lo que se utilizó este algoritmo posteriormente.

Para obtener el PRESS, según lo establecido en el Capítulo I, el número máximo de factores a tener en cuenta para la optimización de la matriz de calibración es de 11 (la mitad del número de muestras patrón más uno), al tratarse de PLS-1, siempre se mantiene la condición de que en cada ajuste, se deje una sola muestra fuera para obtener así la mayor exactitud en los resultados.

En el proceso de optimización de la matriz de calibración se obtiene un valor de PRESS para cada colorante y para cada factor hasta un máximo de 11 que es el número seleccionado (tablas VII.3, VII.4 y VII.5). En éstas también se recoge el valor del cociente  $F$ , que se obtiene dividiendo cada valor del PRESS por el mínimo valor encontrado de este y el nivel de probabilidad que le corresponde. Como sabemos, se selecciona como número óptimo de factores el primero de ellos al que le corresponde un nivel de probabilidad inferior a 0'75 (criterio de Haaland y Thomas), por ello, en estas las tablas, solo se han incluido aquellos factores que dan una probabilidad distinta de cero, ya que los demás no aportan ninguna información.

Tabla VII.3.- Factores y valores de PRESS para TT.

Número de Factores	PRESS	Cociente F	Probabilidad (tanto por uno)
0	390200	479'78	1'00
1	123589'4	151'96	1'00
2	18888	23'224	1'00
3	3999'5	4'9177	0'99
4	<b>856'88</b>	<b>1'0536</b>	<b>0'54</b>
5	813'29	1	0'50

Tabla VII.4.- Factores y valores de PRESS para ER.

Número de Factores	PRESS	Cociente F	Probabilidad (tanto por uno)
0	431666'66	569'95	1'00
1	186410'87	246'13	1'00
2	136384'31	180'07	1'00
3	33042	43'627	1'00
4	1224	1'616	0'85
5	<b>1023'6</b>	<b>1'3515</b>	<b>0'74</b>

Como vemos en la tabla VII.3, el primer valor de probabilidad inferior a 0'75 es de 0'54 y el número de factores correspondientes a dicho valor de probabilidad es de 4, por lo que será este el valor seleccionado para el colorante TT. Aplicando los mismos criterios para los colorantes ER (tabla VII.4) y AA (tabla VII.5) se obtienen valores de 5 y 4, respectivamente.

Tabla VII.5.- Factores y valores de PRESS para AA.

Número de Factores	PRESS	Cociente F	Probabilidad (tanto por uno)
0	136580'95	276'76	1'00
1	104216'87	211'18	1'00
2	134606'34	272'76	1'00
3	37160	75'299	1'00
4	641'42	1'2927	0'71
5	585'69	1'1868	0'64
6	629'18	1'2749	0'70
7	647'67	1'3124	0'72
8	508'77	1'0309	0'52
9	499'93	1'0130	0'51
10	493'50	1'00	0'50

En consecuencia, la matriz de calibración seleccionada esta formada por 21 mezclas y el número de factores óptimo para la aplicación del método de calibración es de 4 para TT y AA y 5 para ER. En la tabla VII.6 se recogen los parámetros estadísticos relacionados con la calidad del ajuste del modelo para cada colorante, obtenidos de la forma comentada en el Capítulo I.

Tabla VII.6.- Parámetros estadísticos.

Colorante	R <sup>2</sup>	RMSD	REP
TT	0'99784	6'3878	0'0380
ER	0'99536	6'9816	0'0416
AA	0'99771	5'5267	0'0611

Los resultados obtenidos en la predicción de los tres analitos son satisfactorios, ya que la correlación entre las concentraciones verdaderas y las predichas por la matriz expresadas como  $R^2$  son en todos los casos superiores a 0,99.

#### **4.- Determinación de los colorantes en mezclas sintéticas aplicando el método PLS-1.**

La matriz de calibración anteriormente seleccionada se empleó para la determinación de los colorantes en mezclas sintéticas. El objetivo de esta experiencia es determinar la capacidad de la matriz de calibración para resolver no sólo mezclas ternarias y binarias sino también problemas que solamente contengan uno de los analitos para posteriormente, resolver en muestras de productos alimenticios que contengan un solo colorante. Aplicando el procedimiento operatorio ya descrito se prepararon mezclas ternarias y binarias así como de un solo componente y tras obtener sus respectivos espectros se les aplicó a la matriz de calibrado obteniéndose los resultados que se recogen en las tablas VII.7, 8 y 9, en las que figuran los porcentajes de recuperación obtenidos.

En las mezclas sintéticas ternarias, los porcentajes de recuperación encontrados se encuentran entre el 103'2 y el 92'7% para TT, entre el 110'3 y el 91'0% para ER y entre el 102'1 y el 91'6%, lo que indica la buena capacidad de predicción que presenta la matriz de calibración seleccionada para la determinación de los tres colorantes.

Tabla VII.7.- Mezclas sintéticas ternarias de TT, ER y AA.

Muestra	Colorante ( $\mu\text{g/l}$ )					
	TT		ER		AA	
	Puesta	%R	Puesta	%R	Puesta	%R
1	100	99'9	100	93'3	100	101'4
2	300	97'1	150	98'7	200	99'9
3	250	97'2	250	98'4	150	95'9
4	80	95'2	150	91'0	50	91'8
5	200	97'1	100	103'5	150	100'0
6	150	103'2	300	110'3	150	102'1
7	100	94'3	80	98'8	80	96'9
8	80	99'9	200	108'5	100	92'1
9	150	92'7	250	105'9	80	84'6
10	100	95'8	350	88'7	200	91'6
11	300	95'8	200	98'4	100	89'3
12	80	95'2	200	91'4	100	92'8
13	200	100'4	150	103'4	200	99'2
14	200	95'4	150	91'8	80	93'1
15	100	100'9	250	99'5	200	99'3

En las mezclas sintéticas ternarias, los porcentajes de recuperación se encuentran entre el 103'2 y el 92'7% para TT, entre el 110'3 y el 88'7% para ER y entre el 102'1 y el 91'6%, lo que indica la buena capacidad de predicción que presenta la matriz de calibración seleccionada para la determinación de los tres colorantes.

Tabla VII.8.- Mezclas sintéticas binarias de TT, ER y AA.

Muestra	Colorante ( $\mu\text{g/l}$ )					
	TT		ER		AA	
	Puesta	%R	Puesta	%R	Puesta	%R
1	80	94'0	150	97'3	-----	(1'2)
2	150	92'8	100	98'5	-----	(-1'7)
3	500	95'2	200	99'5	-----	(-0'1)
4	100	100'0	-----	(0'6)	200	98'1
5	150	99'6	-----	(1'2)	250	95'9
6	300	98'8	-----	(0'5)	80	96'4
7	-----	(-1'2)	80	97'7	100	97'8
8	-----	(0,1)	500	99'2	150	94'5
9	-----	(2,2)	150	93'3	250	101'3

los valores entre paréntesis deberían de ser ceros.

Los buenos resultados encontrados en la recuperación en las tres mezclas binarias posibles de los colorantes indican el buen comportamiento de la matriz de calibración seleccionada para la resolución de éstas.

En las mezclas sintéticas donde solamente está presente un colorante (tabla VII.9), los porcentajes de recuperación encontrados se encuentran entre el 91'8 y el 96'2% para TT, entre el 92'6 y el 100'8% para ER y entre el 95'1 y el 100'5% para AA, lo que indica la buena capacidad de predicción de la matriz de calibración seleccionada para la determinación individual de cada colorante.

Tabla VII.9.- Mezclas sintéticas unitarias de TT, ER y AA.

Muestra	Colorante ( $\mu\text{g/l}$ )					
	TT		ER		AA	
	Puesta	%R	Puesta	%R	Puesta	%R
1	80	93'0	-----	(-7'3)	-----	(1'6)
2	150	91'8	-----	(-8'8)	-----	(-3'7)
3	500	96'2	-----	(-9'5)	-----	(2'1)
4	-----	(1'2)	80	82'6	-----	(-3'0)
5	-----	(-2'5)	150	90'9	-----	(-5'7)
6	-----	(-3'9)	500	100'8	-----	(-6'3)
7	-----	(6'4)	-----	(7'5)	80	95'8
8	-----	(7'7)	-----	(9'2)	150	95'1
9	-----	(0'3)	-----	(0'3)	500	100'5

los valores entre paréntesis deberían de ser ceros.

### 5.- Aplicación del método PLS-1 a la resolución de la mezcla TT, ER y AA en productos alimentarios comerciales.

Una vez comprobada la validez del método multivariante para la resolución de mezclas sintéticas de los tres colorantes TT, ER y AA, se procede a la aplicación a muestras reales seleccionando para ello 10 productos alimenticios comerciales, donde se encontraban presentes bien los tres colorantes, bien mezclas binarias de ellos, o bien un solo colorante. Los distintos productos seleccionados, así como su composición y marca se recogen en la tabla VII.10.



**Tabla VII.10.-** Composición de las muestras analizadas dadas por los fabricantes.

Nº	Muestra	Marca	Composición
1	Refresco de naranja	Hipercor	TT, ER y AA
2	Gelatina de piña	Royal	TT, ER y AA
3	Refresco de naranja	Casera	TT, ER y AA
4	Caramelo de miel	Agüera S.L	AA y ER
5	Colorante alimentario	Ducros	TT y AA
6	Gelatina de tutti frutti	Royal	AA y ER
7	Grosella	Dama de Baza	ER
8	Golosina líquida de limón	Chupol	TT
9	Refresco de plátano	Frutaysol	TT
10	Licor de melón	Amarischia	AA

Para la determinación del contenido de los colorantes en las muestras comerciales se toman 3 volúmenes diferentes de la muestra, con el fin de comprobar que el resultado del análisis no depende del volumen de muestra tomado. A cada uno de los tres volúmenes se les aplica el método operatorio establecido y de cada uno se realizan 5 réplicas. Los espectros obtenidos se introducen en la matriz de calibración seleccionada obteniéndose así el contenido de analitos en las distintas muestras.

Las muestras anteriormente citadas las vamos a agrupar en función del número de colorantes presentes, refiriéndonos a cada una de ellas con el número de identificación que se le ha asignado en la tabla VII.10.

Tabla VII.11.- Contenido de las muestras que presentan los tres colorantes.

Muestra	Volumen (ml)	C (s <sub>n-1</sub> )		
		TT	ER	AA
1 <sup>a</sup>	1	10479'0 (335'1)	651,7 (298,2)	3601'8 (217'3)
	2	10807'3 (421'7)	290,3 (150,9)	3609'0 (203'8)
	5	10727'9 (467'4)	408,3 (82,7)	3833'4 (119'6)
2 <sup>b</sup>	3	11'7 (2'1)	7,5 (2,6)	8'5 (3'9)
	5	8'8 (0'9)	3,4 (2,1)	8'8 (1'6)
	10	7'9 (1'0)	1,2 (0,9)	10'1 (0'9)
3 <sup>a</sup>	1	15860'6 (480'1)	nd	3064'2 (227'8)
	2	15891'3 (806'6)		3159'2 (90'6)
	5	15299'8 (387'3)		3365'3 (116'5)

<sup>a</sup>: Expresado en µg/l; <sup>b</sup>: Expresado en µg/g.

En la expresión de los resultados se han tenido en cuenta los factores de dilución empleados en el análisis de cada muestra. La gelatina de piña (muestra sólida) para su análisis se tomaron tres gramos del producto y se disolvieron en 90 ml de agua de ósmosis inversa agitando y calentando moderadamente para favorecer el proceso.

Como resultado final del contenido de los colorantes en las muestras tomaremos la media obteniéndose los siguientes resultados (expresados en concentración (s<sub>n-1</sub>)):

**Muestra 1.-** TT: 10671'0 (171'0)      ER: 450'1 (184'2)      AA: 3681'4 (131'7) µg/l  
**Muestra 2.-** TT: 9'4 (2,0)              ER: 4'0 (3'2)              AA: 9'1 (0'8) µg/g.  
**Muestra 3.-** TT: 15683'9 (333,0)      ER: no se detecta      AA: 3196'2 (154'0) µg/l.

El contenido de ER en la muestra de refresco de naranja de la Casera, no es detectable por nuestro método, a pesar de que el fabricante del producto indica que está presente en la composición.

Tabla VII.12.- Contenido de los analitos referidos a la masa de la muestra.

Muestra	Volumen (ml)	C (s <sub>n-1</sub> ) (µg/g)		
		TT	ER	AA
4	1	nc	9'8 (2'8)	191'9 (11'8)
	2		10'8 (0'9)	189'3 (7'5)
	3		11'6 (0'2)	185'0 (2'7)
5	3	41007'6 (2033'4)	nc	1132'3 (1107'2)
	5	42618'1 (2037'0)		1043'0 (278'2)
	10	43087'0 (1897'0)		1421'0 (234'0)
6	1	nc	40'0 (10'0)	712'3 (15'6)
	2		41'9 (5'8)	669'0 (37'0)
	5		48'8 (2'5)	608'4 (12'4)

nc.- no contiene.

Al igual que en el caso anterior se analizan tres volúmenes distintos de cada muestra, realizando de cada volumen cinco réplicas a los que se les aplica el método operatorio establecido. En los tres casos se trata de muestras sólidas, por lo que para referir el resultado del contenido de los colorantes al peso de muestra se ha tenido en cuenta que la disolución del caramelo de miel se prepara disolviendo una cantidad de 6'795 gramos en un volumen de 50 ml de agua de ósmosis inversa, la disolución del colorante alimentario se prepara disolviendo 0'04996 gramos en 100 ml de agua de ósmosis inversa y la disolución de la gelatina se prepara disolviendo 3 gramos del producto en 90 ml de agua de ósmosis inversa.

El contenido final de cada una de las muestras se obtiene como promedio de las tres determinaciones anteriores, siendo los siguientes:

**Muestra 4.- ER:**10'8 (0'9)

**AA:**188'7 (3'5) µg/g.

**Muestra 5.- TT:**42237'6 (1090'7)

**AA:**1198'7 (197'6) µg/g.

**Muestra 6.- ER:**43'6 (4'7)

**AA:**663'2 (52'2) µg/g.

Tabla VII.13.- Contenido de las muestras que contienen un solo componente.

Muestra	Volumen (ml)	C (s <sub>n-1</sub> ) (mg/l)		
		TT	ER	AA
7	3	nc	23'9 (6580'8)	nc
	5		23'5 (6251'3)	
	10		26'6 (4484'8)	
8	4	14'0 (0'5)	nc	nc
	5	13'9 (0'8)		
	6	14'0 (0'5)		
9	1	4'34 (0'23)	nc	nc
	2	4'47 (0'22)		
	5	4'12 (0'07)		
10	0.1	nc	nc	22'6 (5'3)
	0.2			22'8 (4'9)
	0.5			25'3(3'4)

El contenido final del colorante en estas muestras se da como media del contenido encontrado al realizar las cinco réplicas de los tres volúmenes ensayados, siendo el siguiente:

**Muestra 7:** ER: 24'7 (16'4) mg/l.

**Muestra 8:** TT: 13'96 (0'07) mg/l.

**Muestra 9:** TT: 4'3 (0'2) mg/l.

**Muestra 10:** AA: 23'6 (1'5) mg/l.

### 5.1 Validación del método mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR).

Se utiliza la técnica CLAR como método de contraste para el análisis de los colorantes en los productos alimenticios estudiados, cuyo fundamento está resumido en el Capítulo VI. Al tratarse aquí de una mezcla de tres colorantes la variante con respecto a la

resolución de la mezcla binaria anterior es que la longitud de onda a la que se realiza la detección es de 490 nm, con la que se determinan los tres componentes. La fase móvil sigue siendo una mezcla metanol/agua (55:45), conteniendo TBAP 0.0005M y con un flujo de 0.4 ml/min.

El tiempo de retención de los analitos es 1,998 para TT, 4,975 para ER y de 2,785 minutos para AA. Los resultados del cumplimiento de la ley de Lambert-Beer para los tres colorantes se recoge en la tabla VII.14.

Tabla VII.14.- Establecimiento de la relación lineal entre la concentración y el área.

Conc. (mg/l)	Área (u.a) TT		Área (u.a) ER		Área(u.a) AA	
	Serie nº1	Serie nº2	Serie nº1	Serie nº2	Serie nº1	Serie nº2
1	3'04x10 <sup>5</sup>	2'92x10 <sup>5</sup>	3'18x10 <sup>5</sup>	2'16x10 <sup>5</sup>	3'97x10 <sup>5</sup>	3'64x10 <sup>5</sup>
2	3'64x10 <sup>5</sup>	3'63x10 <sup>5</sup>	4'03x10 <sup>5</sup>	4'03x10 <sup>5</sup>	7'09x10 <sup>5</sup>	7'10x10 <sup>5</sup>
3	4'20x10 <sup>5</sup>	4'27x10 <sup>5</sup>	6'65x10 <sup>5</sup>	6'41x10 <sup>5</sup>	1'08x10 <sup>6</sup>	1'09x10 <sup>6</sup>
4	4'84x10 <sup>5</sup>	5'44x10 <sup>5</sup>	8'20x10 <sup>5</sup>	8'93x10 <sup>5</sup>	1'48x10 <sup>6</sup>	1'49x10 <sup>6</sup>
5	6'30x10 <sup>5</sup>	6'47x10 <sup>5</sup>	1'22x10 <sup>6</sup>	1'12x10 <sup>6</sup>	1'84x10 <sup>6</sup>	1'88x10 <sup>6</sup>

En los tres casos al aplicar ANOVA en el rango de concentraciones ensayado, se observa que no hay curvatura en ningun caso TT (P = 14'72%), ER (P = 23'47%) y AA (P = 12'51%).

Al representar concentración frente a área se obtiene rectas cuyas ecuaciones, ajustadas por el método de mínimos cuadrados, son:

$$\text{Para TT: } [TT] = -2'38 + 1'20 \times 10^{-5} \cdot \text{Área}$$

$$\text{Para ER: } [ER] = 0'034 + 4'42 \times 10^{-6} \cdot \text{Área}$$

$$\text{Para AA: } [AA] = 0'042 + 2'68 \times 10^{-6} \cdot \text{Área}$$

donde las concentraciones estan extresada en mg/l.

Al aplicar el método CLAR a las muestras se determina la cantidad de los colorantes presentes en ellas. Para ello se toma un volumen determinado de la muestra que se somete al proceso de preconcentración detallado en el Capítulo VI. Los volúmenes de muestra analizados son 5, 10, 15, 2, 2, 2, 1, 5, 4 y 1'5 ml respectivamente de las muestras de la n°1 al 10 y se aplica el procedimiento anteriormente descrito, el colorante concentrado se eluye en 2 ml de agua de ósmosis inversa y esta disolución es la que se emplea en el análisis, del que se realizan cinco réplicas. Los contenidos medios encontrados siguiendo esta metodología se recogen en la tabla VII.15.

**Tabla VII.15.-** Contenido de los colorantes obtenido al aplicar CLAR.

Muestra	C (s <sub>n-1</sub> ) (mg/l)		
	TT	ER	AA
1	10'24 (0'58)	0'578 (8'36x10 <sup>-3</sup> )	3'74 (0'08)
2*	9'3x10 <sup>-3</sup> (8'4x10 <sup>-3</sup> )	9'14x10 <sup>-4</sup> (6'65x10 <sup>-3</sup> )	9'14x10 <sup>-4</sup> (2'10x10 <sup>-3</sup> )
3	14'36 (3'20)	0'14 (0'01)	3'50 (0'05)
4*	no contiene	no se detecta	0'183 (0'019)
5*	42'73 (2'79)	no contiene	0'85 (0'44)
6*	no contiene	0'0479 (3'70x10 <sup>-3</sup> )	0'703 (0'012)
7	no contiene	243'17 (26'51)	no contiene
8	13'27 (0'15)	no contiene	no contiene
9	3'81 (0'13)	no contiene	no contiene
10	no contiene	no contiene	23'20 (1'36)

\* expresados en mg/g.

## 5.2. Comparación estadística de las concentraciones de los colorantes obtenidos por ambos métodos.

Las cantidades de los colorantes en las muestras determinados por nuestro método se comparan estadísticamente con los resultados obtenidos por el método CLAR, método de referencia, con el fin de validar nuestros resultados. Para ello se aplica la metodología

estadística recogida en el Capítulo I. Los resultados comparados son los contenido medios de cada muestra y se recogen en las tablas siguientes:

**Tabla VII.16.- Comparación entre CLAR y EFS del contenido de los colorantes en el refresco de naranja Hipercor.**

Parámetros	TT		ER		AA	
	CLAR	EFS	CLAR	EFS	CLAR	EFS
n	5	3	5	3	5	3
$\bar{c}$ (mg/l)	10,24	10,67	0,578	0,450	3,742	3,681
$s_{n-1}$	0,58	0,17	0,008	0,184	0,085	0,131
t	1,28 (P = 24,78%)		1,20 (P = 27,53%)		0,16 (P= 87,81%)	

**Tabla VII.17.- Comparación entre CLAR y EFS del contenido de los colorantes en la Gelatina de piña Royal.**

Parámetros	TT		ER		AA	
	CLAR	EFS	CLAR	EFS	CLAR	EFS
n	5	3	5	3	5	3
$\bar{c}$ (mg/g)	$9,3 \times 10^{-3}$	$9,4 \times 10^{-3}$	$9,1 \times 10^{-4}$	$4,0 \times 10^{-3}$	3,74	3,68
$s_{n-1}$	$8,4 \times 10^{-4}$	$2,0 \times 10^{-3}$	$6,7 \times 10^{-3}$	$3,2 \times 10^{-3}$	0,08	0,13
t	0,20 (P = 84,80%)		$9,4 \times 10^{-3}$ (P =99,28%)		0,16 (P = 87,81%)	

Tabla VII.18.- Comparación entre CLAR y EFS del contenido de los colorantes en el refresco de naranja Casera.

Parámetros	TT		ER		AA	
	CLAR	EFS	CLAR	EFS	CLAR	EFS
n	5	3	5	3	5	3
$\bar{c}$ (mg/l)	14,36	15,68	0,14	nd	3,50	3,20
$s_{n-1}$	3,20	0,33	0,02	-----	0,05	0,15
t	0,91 (P = 39,79%)		-----		0,81 (P = 44,88%)	

Tabla VII.19.- Comparación del contenido de los colorantes por ambos métodos en el caramelo de miel.

Parámetros	AA		ER	
	CLAR	EFS	CLAR	EFS
n	5	3	5	3
$\bar{c}$ (mg/g)	0,183	0,189	nd	1,47
$s_{n-1}$	0,019	$3,5 \times 10^{-3}$	-----	-----
t	0,22 (P = 83,32%)		-----	

El colorante ER, no lo detecta nuestro método en la muestra del refresco de naranja la Casera y por el contrario si se puede determinar por el método CLAR. Otro hecho importante es que este mismo colorante en la muestra del caramelo de miel, no se detecta por el método CLAR, y sí por nuestro método, justo al contrario que en la otra muestra. La explicación de estos hechos podría estar en la pequeña proporción en la que se encuentra este compuesto en la muestras y esto junto con la presencia de algún tipo de sustancias que



pueden encontrarse en la matriz, azúcar, etc, que en un caso afecten a la determinación mediante un método y no al otro o diceversa.

**Tabla VII.20.-** Comparación del contenido de los colorantes por ambos métodos en el colorante alimentario.

Parámetros	TT		AA	
	CLAR	EFS	CLAR	EFS
n	5	3	5	3
$\bar{c}$ (mg/g)	42,73	42,23	0,85	0,20
$s_{n-1}$	2,79	1,09	0,44	0,20
t	0,34 (P = 74,54%)		0,70 (P = 51,01%)	

**Tabla VII.21.-** Comparación del contenido de los colorantes Por ambos métodos en la gelatina de tutti frutti.

Parámetros	ER		AA	
	CLAR	EFS	CLAR	EFS
n	5	3	5	3
$\bar{c}$ (mg/l)	0,0479	0,0436	0,70	0,66
$s_{n-1}$	$3,7 \times 10^{-3}$	$4,7 \times 10^{-3}$	0,01	0,05
t	0,013 (P = 99,00%)		1,36 (P = 22,27%)	

**Tabla VII.22.-** Comparación del contenido del colorante por ambos métodos que contiene la grosella y la golosina líquida.

Parámetros	Grosella Dama de Baza (ER)		Golosina líquida Chupol (TT)	
	CLAR	EFS	CLAR	EFS
n	5	3	5	3
$\bar{c}$ (mg/l)	234,17	246,85	13,27	13,96
$s_{n-1}$	26,51	16,43	0,15	0,07
t	1,16 (P = 29,01%)		1,7 (P = 14,00%)	

**Tabla VII.23.-** Comparación del contenido del colorante por ambos métodos que contiene el refresco de plátano y el licor de melón.

Parámetros	Refresco de plátano Frutaysol (TT)		Licor de melón Amarischia (AA)	
	CLAR	EFS	CLAR	EFS
n	5	3	5	3
$\bar{c}$ (mg/l)	3,8	4,3	23,20	23,57
$s_{n-1}$	0,13	0,17	1,36	1,48
t	1,23 (P = 26,47%)		0,38 (P = 71,70%)	

Por consiguiente, se puede concluir que al comparar estadísticamente los contenidos de los colorantes encontrados por nuestro método (EFS) y por el método de referencia (CLAR), no hay diferencias significativas entre ambas como lo indican los altos valores de P encontrados al aplicar el test de comparación de los resultados correspondiente, por lo que nuestro método queda validado para las muestras estudiadas.

A lo largo del desarrollo de la presente Memoria, algunas muestras han sido estudiadas por los diferentes métodos propuestos, con objeto de comprobar la concordancia de los resultados obtenidos, vamos a comparar estos resultados con los del método de referencia.

Las muestras son: todas las muestras estudiadas en el Capítulo V, resueltas mediante espectrofotometría en fase sólida, se han estudiado junto con otras más en el Capítulo VI mediante PLS y los resultados se contrastaron mediante CLAR (como estos los resultados por estos dos métodos ya se han comparado, aquí solo se hará la comparación con los obtenidos mediante CLAR), la grosella Dama de Baza que se estudió en el Capítulo IV mediante EFS y en el presente capítulo se le han aplicado las técnicas de multicalibración comparando los resultados con el método de referencia CLAR. Otra muestra que se estudió en el Capítulo IV es la espuma dulce que contiene ER, esta no se ha incluido en este Capítulo por la imposibilidad de determinar su contenido mediante CLAR, debido a que en su composición lleva alguna sustancia que cuando penetra en el cartucho de C-18 hace imposible la elución completa del colorante, sin embargo si se consigue determinar aplicando EFS junto con PLS, en las mismas condiciones que el resto de las muestras estudiadas en el presente Capítulo. Los resultados se reflejan en la tabla VII.24.

Tablas VII.24.- Comparación de métodos.

Parámetros	Licor demelón Amarischia (AA)		Sorbete de naranja Camy (AA)	
	CLAR	EFS	CLAR	EFS
n	5	3	5	3
$\bar{c}$ (mg/l)	23'86	24'26	67'03	69'18
$s_{n-1}$	1'09	1'94	1'40	1'35
t	0'32 (P = 75'98%)		2'17 (P = 7'20%)	

Parámetros	Refresco de plátano Charly's			
	AA		AQ	
	CLAR	EDFS	CLAR	EDFS
n	5	3	5	3
$\bar{c}$ (mg/l)	2'79	4,3	1'72	1'59
$s_{n-1}$	0'14	0,17	0'34	0'40
t	0'57 (P = 58'94%)		0'11 (P = 91'60%)	

Parámetros	Refresco de limón World			
	AA		AQ	
	CLAR	EFS	CLAR	EFS
n	5	3	5	3
$\bar{c}$ (mg/l)	0'31	0'209	2'30	2'34
$s_{n-1}$	0'01	0'05	0'14	0'10
t	3'4 (P = 7'67%)		0'45 (P = 66'85%)	

Parámetros	grosella Dama de Baza (ER)		Espuma dulce Party.Pack (ER)*	
	CLAR	EFS	EFS-PLS	EFS
n	5	3	3	3
$\bar{c}$ (mg/l)	234'17	214'87	14'2	17'69
$s_{n-1}$	26'51	1'65	3'1	1'2
t	1'62 (P = 18'05%)		1'63 (P = 17'84%)	

\* Expresada en  $\mu\text{g/g}$ .

Según los resultados obtenidos se puede afirmar que no existen diferencias significativas entre los concentraciones de los colorantes encontrados mediante la aplicación de los métodos propuestos para estas muestras.





**BIBLIOGRAFÍA**





## BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Khanna S.K., Das M., *J. Scientific and Industrial Research*, 50, 965 (1991).
- 2.- Jaskot R.H., Costa D.L., *Fundamental and Applied Toxicology*, 22, 103 (1994).
- 3.- Nakagawa M., Kawai K., Kawai K., *Contact Dermatitis*, 34, 6 (1996).
- 4.- Stringer B.K., Blarkemeger J.T., *Bulletin of Enviromental contamination and toxicology*, 51, 557 (1993).
- 5.- Zahnt ., Braunbeck T., *Toxicology in vitro*, 9, 729, (1995).
- 6.- Sdigui N., Monsigny M., Bertrand O., *J. of Biomedical and Biophysical methodos*, 29, 269 (1994).
- 7.- Fuglsang G., Madsen C., Halken S., Jorgensen M., Ostergaard P.A., Osterballe O., *Allergy*, 49, 31 (1994).
- 8.- Digiano F.A., Clarking C., Maenker M.J., Francisco D.E., Larocca C., *Water Science and Technology*, 25, 55 (1992).
- 9.- Lipman A.L., *ACS Symposium Series*, 616, 34 (1995).
- 10.- Morgan D.L., Dunnick J.K., Goehlt T., Jokinen M.P., Matthews H.B., *Environmental Healht Perspectives*, 102, 63 (1994).
- 11.- Brown M.D., Devito S.C., *Critical Reviews in Environmental Science andTechnology*, 23, 249 (1993).
- 12.- Sweeneneg E.A., Chipman J.K., Forsythe S.J., *Environmental Health Perspectives*, 102, 119 (1994).
- 13.- Arcadi J.A., Narangan S., Techy G., Saronfeen R.M.G., Jones C.W., *J. of Surgical Oncology*, 59, 86 (1995).
- 14.- Ramchandani S., Das M., Khanna S.K., *Food and Chemical Toxicology*, 32, 159 (1994).
- 15.- Valentovic M.A., lo H.H., brown P.I., rankin G.O., *Toxicology Lettres*, 78, 207 (1995).
- 16.- Zijno A., Marcon F., Leopardi P., Salvatore G., Carere A., Crebelli R., *Food and chemical Toxicology*, 32, 159 (1994).
- 17.- Pachuta S.J., Staral J.S., *Anal. Chem.*, 66, 276 (1994).
- 18.- Brow C.W., Lynch P.F., *J. Food Sci.*, 41, 1231 (1976).
- 19.- Higuchi S., Tanaka J., Tanaka S., *Bunko Kenkyu*, 27, 353 (1978).
- 20.- Malkus Z., *Cesk. Hyg.*, 22, 259 (1977). *Anal. Abstr.*, 35, 3F-12 (1978).
- 21.- Cuzzoni M.T., Gazzani G., Clerico M.L., *Fármaco* 31, 368 (1976). *Anal. Abastr.*, 31, 6F-18 (1976).
- 22.- Harold T. M., Kert I., *J. of Chemical Ed.*, 57, 321 (1980).
- 23.- Shinobu N., Hisashi K., *Analytical Sciences*, 6, 473 (1990).
- 24.- Yanuka Y., Shalon Y., Weissenberg E., Nir-Grosfald I., *Analyst.*, 88, 873 (1963).
- 25.- Laub E., Lichtenthal H., Link M., *Lenesmittelchem. Gerichtl. Chem.*, 32, 137 (1978). C.A. 91, 138955a (1979).
- 26.- Wisker E., König R., Feldheim W., *Z. Lebensm-Unters Forsh*, 170, 267 (1980).
- 27.- Vesna R., Trajce S., *Analytical letter*, 28,1305 (1995).

- 28.- Pallotti G., Bencivenga B., Giabbai M., Palmioli A., Rosatelli I., *Boll. Chim. Unione Ital. Lab. Prov.*, 3, 217 (1977). C.A. 88, 61165w (1978).
- 29.- Ashworth D.M., Castledon S.L., Kirkbrigh G.F., Spillane D.E.M., *J. Photoacoust.*, 1, 151 (1982). C.A. 97, 90520 z (1982).
- 30.- *Encyclopedic of Analytical Science*, Academic Press, 4, 3980 (1995).
- 31.- Gupka V.K., *Handbook of Thin Layer Chromatography Synthetic Dyes*, Sherman J., Fried B., New York, 939-969 (1991).
- 32.- Gordana M., Gordana V., *J. Serb. Chem. Soc.*, 54,155 (1989).
- 33.- Kwon H.H., Kim I.B., Kim J.H., *Kungnip Pogon Yon'guwopon*, 15, 437 (1979).
- 34.- Tewari S.N., Sharma I.C., Sharma V.K., *Chromatographia*, 9, 405 (1976). *Anal. Abastr.* 32, 2F-35 (1977).
- 35.- Sing M., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 60, 173 (1977).
- 36.- Hurst W.J., McKim J.M., Martin R.A., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 64, 1411 (1981).
- 37.- Boiley N.P., Buton N.G., Crosby N.T., Johnson A.E., Roper P., Somers L., *Analyst*, 105, 589 (1980).
- 38.- Young M.L., *J. Assoc. off Anal. Chem.*, 67, 1022 (1984).
- 39.- Young M.L., *J. Assoc. off Anal. Chem.*, 71, 458 (1988).
- 40.- Salagoity-Auguste M.H., Bertrand A., Sudraud P., *Sciences des aliments*, 3, 127, (1983).
- 41.- Aqbidi S.L., *J. Chromatography*, 225, 101, (1983).
- 42.- Prandi C., *18 th Fatipecc-Congress*, 3, 521, (1987).
- 43.- Gluckman, Slais K., Brinkman, Roland W.F., *Anal. Chem.*, 59, 79, (1987).
- 44.- Forni E., Ghozzi, Polesello A., *Chromatographic*, 26, 120, (1988).
- 45.- Chayter J.P., *Agric. Food Chem.Consum, Proc. Eur. Conf. Food Chem.*, 5<sup>a</sup> edición, 1, 87, (1989).
- 46.- Ren Y., Hang S., *Chromatogram*, 10, 11, (1989).
- 47.- Naga S., Koike H., *Anal. Sci.*, 6, 473, (1990).
- 48.- Greenway G.M., Kometa N., Macrae R., *Food Chem.*, 43, 137, (1992).
- 49.- Fischer Ch-H., *J. Chromatography*, 674,271, (1994).
- 50.- Griffin R. M. E., Speers S.J., Elliot L., Told N., Soyomo W., Kee T.G., *J. Chromatography*, 13, 319, (1990).
- 51.- White P.C., Harbin A.M., *Analyst*, 114, 877 (1989).
- 52.- Hong V., Wrolstad R.E., *J. Agric. Food Chem.*, 38, 698 (1990).
- 53.- Hong V., Wrolstad R.E., *J. Agric. Food Chem.*, 38, 708 (1990).
- 54.- Hong V., Wrolstad R.E., *J. Agric. Food Chem.*, 39, 457 (1991).
- 55.- Velioglu Y.S., Mazza G., *J. Agric. Food Chem.*, 39, 463 (1991).
- 56.- Fischer Ch-H., Bischof M., Rabe J. G., *J. Liquid Chromatography*, 13, 319, (1990).
- 57.- Logan B.K., *Anal. Chim. Acta*, 288, 111, (1994).
- 58.- Andrisano V., Gotti R., Dipietra A.M., Cavrini V., *Chromatographia*, 39, 138, (1994).
- 59.- Speers S.J., Litte B.H., Roy M., *J. Chromatography*, 674, 263, (1994).
- 60.- Castle M., Neuteboom A., *J. Chromatogr.*, 696, 93 (1995).
- 61.- Shibai Y., Huixin H., Yanhua C., Qui H., *Shipin Kexue*, 67, 48 (1985). C.A. 104(7), 49896b (1985).
- 62.- Puttemans M.L., Dryon L., Massart D.L., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 66, 1039 (1983).
- 63.- Straub R.F., Voyksner R.D., Keever J.T., *Anal. Chem.*, 65, 2131 (1993).
- 64.- Verweig A.M.A., Lipman P.J.L., *J. Chromatogr.* 653,359 (1993).

- 65.- Fogg A.G. Yoo K.S., *Analyst*, 104, 723 (1979).
- 66.- Fogg A.G., Yoo K.S., *Analyst*, 104, 1087 (1979).
- 67.- Fogg A.G., Bahnot D., *Analyst*, 112, 1319 (1987).
- 68.- Barros A.A., *Analyst*, 112, 1359 (1987).
- 69.- Fogg A.G., Bhanot D., *Analyst*, 106, 883 (1981).
- 70.- Fogg A.G., Bhanot D., *Analyst*, 105, 868 (1980).
- 71.- Fogg A.G., Summan A.M., *Analyst*, 109, 1029 (1984).
- 72.- Patel R.B., Patel M.R., Patel A.A., Shah A.K., Patel A.G., *Analyst*, 111, 577 (1986).
- 73.- Berzas J.J., Rodríguez J., Villaseñor M.J., *Talanta*, 40, 1391 (1993).
- 74.- Berzas J.J., Rodríguez J., Villaseñor M.J., *Analisis*, 22, 5 (1994).
- 75.- Berzas J.J., Cabanillas C.G., Salcedo A.M., *Talanta*, 42, 2043 (1995).
- 76.- Berzas J.J., Rodríguez J., Villaseñor M.J., *Analytical letter*, 27, 1009, (1994).
- 77.- Honkawa T., *Anal. Lett.*, 9, 839 (1976).
- 78.- Honkawa T., *Anal. Lett.*, 8, 901 (1975).
- 79.- Zeng H., Wang A., Min X., Fan C., *Shipin Yu Fajiao Gongye*, 4, 20 (1983). C.A. 101, 71131h (1984).
- 80.- Kamikura M., Endo F., Sasaki H., *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 13, 55 (1972).
- 81.- Sasaki H., *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 19, 1 (1978).
- 82.- Sasaki H., Tansei H., Niwa M., Asakura M., Shirai K., *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 19, 12 (1978).
- 83.- Zeng W., Wang P., Zhang H. Tang S., *Anal. Chim. Acta.*, 284, 445 (1993).
- 84.- López de Alba P.L., wróbel-Kaczmarczyk K., López martínez L., Amador hernandez J., *Anal. Chim. Acta.*, 330, 19 (1996).
- 85.- Oehme M., *Mass Spectrometry of Large Molecules*, Ed. Fachetti (1985).
- 86.- Scheiters S.M., Verma S., Zooka R.G., *Anal. Chem.*, 55, 2260 (1983).
- 87.- Pachuta J.S., Staral S.J., *Anal. Chem.*, 6, 276 (1994).
- 88.- Monaghan J., Barber M., Bordoly R.S., Sedgwizk R.D., *Organic Mass Spectr.*, 17, 569 (1982).
- 89.- Van Breemen R.B., Canjura F.L., Schwartz S.J., *Agric. Food Chem.*, 39, 1452 (1991).
- 90.- Borgerding A.J., Hites R.A., *Envirom. And Technolog.*, 28, 1278 (1994).
- 91.- McEven C.N., Layton S.F., Taylor S.K., *Anal. Chem.*, 49, 7 (1977).
- 92.- Bouffard S.P., Sommer A.J., Katon J.E., Godber S., *Appl. Spectrosc.* 48, 1387 (1994).
- 93.- Kokot S., Gilbert C., *Analyst*, 119, 671 (1994).
- 94.- Bouffard S.P., Katon J.E., Sommer A.J., Danielson N.D., *Anal. Chem.*, 66, 1937 (1994).
- 95.- Metsov S., Dudev T., Koleva V., *Molecular Structure*, 350, 241 (1995).
- 96.- Suzuki M., Tsutsui M., Ohmori H., *Carbohydrate Research*, 261, 223 (1994).
- 97.- Lycka A., Pelnar J., *Dyes and Pigments*, 25, 79 (1994).
- 98.- Li Q., Peng B.X., *Dyes and Pigments*, 27, 153 (1995).
- 99.- Okada Y., Sakada M., Takahashi I., Morita Z., *Dyes and Pigments*, 24, 1 (1994).
- 100.- Zhu Z.H., Zhu W.P., *Dyes and Pigments*, 24, 281 (1994).
- 101.- Stolarski R., Fiksinstei K.J., *Dyes and Pigments*, 24, 295 (1994).
- 102.- Takayi K., Mizumo A., Iwamoto H., Mishida, Hashikama T., Hazamo, Nozoe T., *Dyes and Pigments*, 27, 227 (1995).
- 103.- Lebeau B., Sánchez Z., Prasselet S., Zyss J., Froc G., Dumont M., *New J. of Chem.*, 20, 13 (1996).
- 104.- Metsov S., Dudeu T., Koleva V., *J. of molecular estructure*, 350, 241 (1995).

- 105.- Murihy S., Yang X.Q., Shuster J.B., *J. of Organic Chemistry*, 60, 2411 (1995).
- 106.- Malone J.F., Andrews S.J., Bullock J.F., Docherty R., *Dyes and Pigments*, 30, 183 (1996).
- 107.- Chia W.L., Chen C.L., Shen H.J., *Materials Research Bulletin*, 30, 1421 (1995).
- 108.- Das S., Basu R., Minch M., Nandy P., *Dyes and Pigments*, 29, 191 (1995).
- 109.- Whitaker A., *J. of The Soc. of Dyers and Colorists*, 102, 66 (1995).
- 110.- Ajtai K., Buryahardt T.P., *Biochemistry*, 34, 1594 (1995).
- 111.- Fagan I.G., Hammord R.B., Roberts K.J., Boaherty R., Chorlton K.A., Jones W., Potts G.A., *Chemistry of Materials*, 7, 2322 (1995).
- 112.- Capitán-Vallvey L.F., Valencia M.C., de Orbe I., *Microchem. J.*, 40, 166 (1989).
- 113.- Capitán-Vallvey L.F., de Orbe I., Valencia M.C., Berzas J., *Talanta*, 41, 1327 (1994).
- 114.- Capitán F., Navalón A., Vilchez J.L., Capitán-Vallvey L.F., *Talanta*, 37, 193 (1990).
- 115.- Capitán F., Manzano E., Navalón A., Vilchez J.L., Capitán-Vallvey L.F., *Talanta*, 39, 21 (1992).
- 116.- Capitán F., Sánchez-Palencia G., Navalón A., Capitán-Vallvey L.F., Vilchez J.L., *Anal. Chim. Acta*, 259, 345 (1992).
- 117.- Capitán F., Alonso E., Avidad R., Capitán-Vallvey L.F., Vilchez J.L., *Anal. Chem.*, 65, 1336, (1993).
- 118.- Capitán-Vallvey L.F., del Olmo M., Avidad R., Navalón A., de Orbe I., Vilchez J.L., *Anal. Chim. Acta*, 302, 193, (1995).
- 119.- Vilchez J.L., del Olmo M., Avidad R., Capitán-Vallvey L.F., *Analyst*, 119, 1211, (1994).
- 120.- Yoshimura K., Waki W., Oshasi S., *Talanta*, 23, 449, (1976).
- 121.- de Orbe Payá, *Tesis Doctoral*, 54 (1991).
- 122.- Savitzky A, Golay, *Anal. Chem.*, 36, 1627 (1964).
- 123.- Capitán-Vallvey L.F., de Orbe I., Valencia M.C., Berzas J., *Química Analítica*, 12, 141 (1993).
- 124.- Capitán-Vallvey L.F., de Orbe I., Valencia M.C., *Anal. Chim. Acta*, 282, 75 (1993).
- 125.- Capitán-Vallvey L.F., de Orbe I., Valencia M.C., Berzas J., *Mikrochim Acta*, 111, 223 (1993).
- 126.- Morelli B., *Analyst*, 113, 1077 (1988).
- 127.- O'Haver T.C., *Clin. Chem.*, 25, 1548 (1979).
- 128.- O'Haver T.C., Green G.L., *Anal. Chem.*, 48, 312 (1976).
- 129.- O'Haver T.C., Begley T., *Anal. Chem.*, 53, 1876 (1981).
- 130.- Blanco M., Cerdá V., *Quimiometría*, Serie Química Analítica. Publicaciones Univ. Autónoma de Barcelona (1988).
- 131.- Boqué R., Rius F.X., *Avances en Quimiometría práctica, Capítulo 4, Universidad de Santiago de Compostela*, Servicio Public. e Intercambio Científico (1994).
- 132.- Analytical Methods Committee, *Analyst*, 119 (1994).
- 133.- IUPAC. Analytical Chemistry Division, *Spectrochim Acta B*, 33, 242 (1978).
- 134.- Cuadros Rodríguez L., García Campaña A., Jiménez Linares C., Román Ceba M., *Anal. Lett.*, 26, 1243 (1993).
- 135.- Haaland D.M., Easterling R. G., *Applied Spectroscopy*, 36, 665 (1982).
- 136.- Haaland D.M., Easterling R.G., Vopicka D.A., *Applied Spectroscopy*, 39, 73 (1985).
- 137.- Blanco M., Coello J., Iturriaga H., MasPOCH S., Bertrán E., *Analyst*, 119, 1779 (1994).
- 138.- Lindberg W., Persson J.A., *Anal. Chem.*, 55, 643 (1983).
- 139.- Li-shi Y., Levine S.P., *Anal. Chem.*, 61, 667 (1989).

- 140.- Gemperline P.G., Worsfold P.J., Norman P., Crane M., *Analyst*, 118, 617 (1993).
- 141.- Díaz T.G., Azedo M.I., Salinas F., *Fresenius J. Anal. Chem.*, 350, 692 (1994).
- 142.- Whitman D.A., Sasholtz M.B., Christian G.D., Ruzicka J., Kowalski B.R., *Anal. Chem.*, 63, 775 (1991).
- 143.- Blanco M., Coello J., Iturriaga H., Maspoch S., Riba J., *Anal. Chem.*, 66, 2905 (1994).
- 144.- Quencer B.M., Crouch S.R., *Analyst*, 118, 695 (1993).
- 145.- MacLaurin P., Worsfold P.J., Norman P., Crane M., *Analyst*, 118, 617 (1993).
- 146.- Quencer B.M., Crouch S.R., *Anal. Chem.*, 66, 458 (1994).
- 147.- Arrabal M.J., González P.V., Gámez C.C., Misiego A.S., *Analyst*, 119, 1537 (1994).
- 148.- Hsieh Y.S., Crouch S.R., *Anal. Chim. Acta*, 296, 333 (1994).
- 149.- Galera M.M., Martínez J.L., Frenich A.C., Parrilla, *Analyst*, 119, 1189 (1994).
- 150.- García J.M., Jiménez A.I., Arias J.J., Khalaf K.D., Morales A., Guardia M., *Analyst*, 120, 313 (1995).
- 151.- Navarro F., Pérez L.V., León M.E., Polo-Díez L.M., *Anal. Chim. Acta*, 313, 93 (1995).
- 152.- Saurina J., Hernández S., *Analyst*, 120, 305 (1995).
- 153.- Estela J.M., Cladera A., Cerdá V., *Anal. Chim. Acta*, 308, 238 (1995).
- 154.- Garthwaite P.H., *J. of the American Statistical Association*, 89, 122 (1994).
155. Wold H., *Research Paper in Statistics*, David F., Ed. Wiley, New York, London (1966).
- 156.- Otto M., Wolford W., *Anal. Chem.*, 57, 63, (1985).
- 157.- Bautista R.D., Jimenez F., Jimenez A.I., Arias J.J., *Talanta*, 40, 1687 (1993).
- 158.- Haaland D.M., Thomas D.V., *Anal. Chem.*, 60, 1193 (1988).
- 159.- Leardi R., Onno E., Noord D., *Anal. Chem.*, 67, 4295 (1995).
- 160.- Valcarcel M., Rios, *Anal. Chem.*, 65, 781 A (1993).
- 161.- Bader M., *J. Chem. Educ.*, 57, 703 (1980).
- 162.- Cuadros Rodríguez L., García Campaña A., Alés Barrero F., Jiménez Linares C., Román Ceba M., *J. of AOAC*, 78, 795 (1995).
- 163.- *Reactivos bioquímicos y orgánicos para investigación y el diagnóstico*, Sigma-Química (1993).
- 164.- Little C.J., Dale A.D., Whattley J.A., Evans M.B., *J. of Chromatography*, 171, 431 (1979).
- 165.- Little C.J., Dale A.D., Whattley J.A., Evans M.B., *J. of Chromatography*, 171, 435 (1979).
- 166.- Sander L.C., Wise S.A., *Anal. Chem.*, 56, 504 (1984).
- 167.- Ogan K., Katz E., *J. of Chromatography*, 118, 115 (1980).
- 168.- Wise S.A., May W.E., *Anal. Chem.*, 55, 1479 (1983).
- 169.- Hansson L., Trojer L., *J. of Chromatography*, 207, 1 (1981).
- 170.- Rao C.N.R., *Chemical Applications of Infrared Spectroscopy*, Academic Press (1963).
- 171.- Wright N., Hunter M.J., *J. Am. Chem. Soc.*, 71, 2753 (1949).
- 172.- Lord R.C., Robinson D.W., Schumb W.C., *J. Am. Chem. Soc.*, 78, 1327 (1956).
- 173.- Ferraro J.R., *Low-Frequency Vibrations of Inorganic and Coordination Compounds*, Plenum Press (1971).
- 174.- Kakudo M., Kasai P., Watase T., *J. Chem. Phys.*, 21, 165 (1953).
- 175.- Sander L.C., Callis J.B., Field L.R., *Anal. Chem.*, 55, 1068 (1983).
- 176.- Wright N., Hunter M.J., *J. Am. Chem. Soc.*, 71, 2753 (1949).
- 177.- Ebsworth E.A.V., Onyszchuk M., Sheppard, *J. Chem. Soc.*, 1453 (1958).

- 178.- Hemetsberger H., Maasfeld W., Ricken H., *Chromatographia*, 9, 303 (1976).
- 179.- Maroncelli M., Qi S.P., Strauss H.L., Snyder R.G., *J. Am. Chem. Soc.*, 104, 6237 (1982).
- 180.- Leyden D.E., Kendall D.S., Burggraf L.W., Pern F.J., Debello M., *Anal. Chem. Soc.*, 54, 101 (1982).
- 181.- Sindorf D.W., Maciel G.E., *J. Am. Chem. Soc.*, 105, 3767 (1983).
- 182.- Sindorf D.W., Maciel G.E., *J. Am. Chem. Soc.*, 105, 1848 (1983).
- 183.- Sander L.C., Wise S.A., *Anal. Chem.*, 59, 2309 (1987).
- 184.- Hammers W.E., Janssen R.H.A.M., Baars A.G., de Ligny C.L., *J. of Chromatography*, 167, 273 (1978).
- 185.- del Olmo Iruela M., *Tesis Doctoral*, (1994).
- 186.- Baldinus J.G., Critchfield F.E., Muraca R.F., Ruch J.E., *Treatise on Analytical Chemistry*, Parte II, Editor. Kolthoff, Awiley-Interscience Publication (1976).
- 187.- Furniss B.S., Hannaford A.J., Rogers V., Smith P.W.G., Tatchell A.R., *Textbook of practical organic chemistry*, Vogel's (1979).
- 188.-
- 189.- Stick R.V., Mocerino M., Franz D.A., *J. of Chemical Education*, 73, 540 (1996).
- 190.- Lawrence J.F., Lancaster F.E., Conacher H.B.S., *J. of Chromatography*, 210, 168 (1981).

**CONCLUSIONES**

Como consecuencia del trabajo experimental realizado se han propuesto y validado diversos procedimientos para la determinación de colorantes solubles y sus impurezas insolubles tanto solos como en mezclas de productos alimentarios de diverso tipo: refrescos, aditivos colorantes para cocina y repostería, licores, sorbetes, golosinas y mermeladas.

En concreto se han resuelto las mezclas de Amarillo Anaranjado y Sudan I, Carmoisina y 1-naftilazo-1-naftol y Escarlata 4R y 1-naftilazo-2naftol utilizando la espectrofotometría en fase sólida basándonos en la fijación selectiva en diferentes soportes sólidos. Estos procedimientos han sido aplicados a la determinación de los anteriores compuestos en colorantes comerciales y en alimentos y validados quimiométricamente.

Se ha resuelto la mezcla binaria de los colorantes solubles Amarillo anaranjado y Amarillo de Quinoleína y sus insolubles Sudan I y Amarillo de Quinoleína insoluble mediante espectrofotometría en fase sólida, comprobando que ofrece buenos resultados en su aplicación a bebidas refrescantes y preparados alimentarios.

Se ha resuelto mediante la aplicación de métodos de calibración multivariantes, en concreto la regresión por mínimos cuadrados parciales dos tipos de mezclas diferentes: Amarillo Anaranjado y Amarillo de Quinoleína, por un lado y Tartracina, escarlata 4R y Amarillo Anaranjado por otro, previa fijación de estos colorantes en el del Sephadex DEAE A-25.

Se han aplicado los procedimientos aquí propuestos a la determinación de estas mezclas en alimentos y se han validado los resultados mediante cromatografía líquida de alta resolución.