

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

**"DESARROLLO DE UNA TECNICA ESPECIFICA PARA
LA DETERMINACION DE ALGUNOS EDULCORANTES, SABORIZANTES
Y PRESERVANTES EN BEBIDAS CARBONATADAS,
POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESION"**

INFORME DE TESIS

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

Presentado por

THELMA HAYDEE LOPEZ AGUILAR

Para optar al Título de
QUIMICA FARMACEUTICA

Guatemala, febrero de 1996

D.L
06
T(715)

**JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE
CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA**

DECANO	Lic. Jorge Rodolfo Pérez Folgar
SECRETARIO	Licda. Eleonora Gaitán Izaguirre
VOCAL I	Lic. Miguel Angel Herrera Gálvez
VOCAL II	Lic. Gerardo Leonell Arroyo Catalán
VOCAL III	Lic. Miguel Orlando Garza
VOCAL IV	Br. Ana María Rodas Cardona
VOCAL V	Br. Hayro Oswaldo García García

ACTO QUE DEDICO

A DIOS

Ser supremo a quien debo mi vida, la luz que guía mi caminar

A MIS PADRES

Luis Felipe López Valdizón
Thelma Edith Aguilar de López

Por su inmenso amor, apoyo, ejemplo, confianza y dedicación
y a quienes debo lo que soy y el triunfo que hoy alcanzo

A MIS HERMANOS

Luis Felipe y Gloria Judith
Sandra Edith y Antonio
Héctor Raúl y Lilian Ivonne
Sergio Estuardo y Sofía

Por su amor, apoyo y ejemplo durante mi vida

A NELSON

Por su amor, paciencia y apoyo brindados durante estos años

A MIS SOBRINOS

Gloria Isabel y Luis Francisco
Irene Ale Sandra y Luis Antonio
Karla María y Maria José

A MIS ABUELITOS

Marcos Egberto López Barrientos (Q.P.D.)
María Olivia Valdizón de López (Q.P.D.)
Gregorio Aguilar Rodríguez (Q.P.D.)
Maria Luisa Rodríguez de Aguilar

A MIS COMPANEROS Y AMIGOS

Especialmente a Karla, Claudia, Héctor, Astrid, Juan Manuel,
Menchi, José, Elisa y Wendy; así como a Mandy, Pili, Beatriz,
Lidia y Hilda, Claudia, por la amistad y el apoyo compartidos
en estos años.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor, Lic. Roberto Benavides,
sin cuya valiosa guía, dedicación y conocimiento
no hubiera sido posible realizar este trabajo.

Al Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá, I.N.C.A.P., al Laboratorio Especializado de
Bioquímica especialmente a la Licda. Mónica Guamuch y
a la Licda. Carolina Martínez y
al Laboratorio de Composición de Alimentos,
de dicha institución, por su ayuda constante.

A la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Y a todas aquellas personas que de una u otra forma colaboraron a la realización de esta
investigación.

INDICE

	PAGINA
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCION	3
3. ANTECEDENTES	5
4. JUSTIFICACIONES.....	12
5. OBJETIVOS	13
6. HIPOTESIS.....	14
7. MATERIALES Y METODOS	15
8. RESULTADOS.....	23
9. DISCUSION DE RESULTADOS.....	50
10. CONCLUSIONES	53
11. RECOMENDACIONES.....	54
12. REFERENCIAS.....	55
13. ANEXOS	57

1. RESUMEN

La presente investigación se realizó con el objetivo de establecer una técnica de análisis instrumental para la cuantificación de algunos edulcorantes, saborizantes y preservantes en bebidas carbonatadas; específicamente se trabajaron ácido ascórbico, ácido benzoico, ácido cítrico, cafeína y sacarina sódica.

Se escogió un método por cromatografía líquida de alta presión, con detector ultravioleta para la determinación cuantitativa de los compuestos mencionados; por lo que el primer paso constituyó la determinación de la mejor longitud de onda, para esto se utilizaron los espectros ultravioleta de los compuestos y se efectuaron ensayos a diferentes longitudes de onda (215, 220 y 254 nm). Se llegó a la conclusión que la mejor longitud de onda para detectar mezclas de dos o más de los compuestos fue 254 nm, ya que a esta longitud de onda se obtuvo la mejor línea base y resolución de los picos correspondientes a todos los compuestos mencionados, así como la mejor absorbancia en la que se logró su identificación. El siguiente paso fue determinar la composición de la fase móvil que se debía utilizar; las cuales fueron dos; esto se debió a que para algunos compuestos se lograba una mejor separación entre sí con una fase móvil que con otra.

Esta técnica se validó de la forma siguiente: para los patrones de cada compuesto se hicieron gráficas de concentración contra área, las cuales fueron lineales; se estableció la precisión a través de la desviación estándar relativa, obteniéndose para cada uno, un valor abajo del 5% y también se determinó la exactitud, expresada por medio del porcentaje de recuperación, cuyo resultado para cada compuesto fue mayor de 85%, para esto se comparó la concentración obtenida a través de patrones externos contra los valores obtenidos con el método de "adición de estándar".

Después de validar el método se procedió al análisis de las muestras. Se trabajaron muestras de tres embotelladoras de bebidas carbonatadas. Se analizaron tres muestras de cada una; la identificación y cuantificación se realizó a través de los tiempos de retención de cada compuesto que estaba presente en cada muestra.

2. INTRODUCCION

Uno de los mercados más grandes a nivel mundial es el de las bebidas carbonatadas, Guatemala no escapa de esto, ya que éstas son consumidas por un amplio sector de la población, no importando su edad. En el país son conocidas comúnmente con el nombre de "aguas gaseosas".

En la legislación guatemalteca sobre alimentos existe la Norma COGUANOR NGO 34 154 en la que las bebidas carbonatadas se definen como: "una bebida no alcohólica, que contiene dióxido de carbono (anhídrido carbónico) disuelto". Se clasifican en dos tipos:

1. Con sabor: como uva, naranja, mandarina, etc.
2. Sin sabor: llamada comúnmente agua mineral.

Dentro de su composición poseen agua (en mayor porcentaje), colorantes, edulcorantes, saborizantes, preservantes y dióxido de carbono.

Todo producto que ingresa al país debe cumplir con las especificaciones de las normas guatemaltecas obligatorias, donde se indican las cantidades y la calidad de cada componente para obtener su número de registro y por consiguiente, la autorización para su comercialización, pues de esta manera se asegura la salud al consumidor.

En Guatemala existen varias empresas que se dedican a la elaboración de bebidas carbonatadas. El control de calidad de estas bebidas en Guatemala se lleva a cabo en las embotelladores en una forma parcial, y en su totalidad únicamente se realiza en el extranjero. Es conveniente que existan técnicas específicas y validadas que permitan

evaluar cuantitativamente la composición de las bebidas carbonatadas, para garantizar a la población un producto de calidad.

El objetivo de esta investigación fue establecer una técnica, sencilla y rápida que permita determinar con exactitud el contenido de algunos edulcorantes, saborizantes y preservantes utilizados en la elaboración de bebidas carbonatadas por medio de cromatografía líquida de alta presión. Esta técnica fue validada para utilizarla en el control y la verificación de calidad de las bebidas carbonatadas.

3. ANTECEDENTES

El alto consumo de bebidas carbonatadas o "aguas gaseosas" en el mundo ha creado la necesidad de buscar métodos analíticos sencillos, que permitan detectar sus diferentes componentes, entre los cuales se encuentran los saborizantes, edulcorantes y preservantes, con la mayor exactitud y precisión para efectuar el control y la verificación de la calidad.

La Norma COGUANOR NGO 34 154 es de cumplimiento obligatorio en Guatemala y en ella se encuentran las especificaciones y los límites permitidos para los compuestos utilizados en la elaboración de bebidas carbonatadas, así como la definición para estas. (Ver Anexos I).

La norma aludida establece que los análisis de control de calidad incluyen las siguientes pruebas:

1. Análisis microbiológicos

- Recuento total en placa
- Recuento de coliformes
- Recuento de mohos y levaduras (1)

2. Análisis químicos

- Determinación de los sólidos solubles
- Determinación del contenido de alcohol
- Determinación de la acidez
- Determinación del contenido de cobre
- Determinación del contenido de plomo
- Determinación del contenido de arsénico

- Determinación cualitativa y cuantitativa del ácido benzóico y benzoatos alcalinos
- Determinación cualitativa y cuantitativa del ácido sórbico y sorbatos alcalinos
- Determinación de zinc
- Determinación de mercurio (1)

3. **Determinación del dióxido de carbono (anhídrido carbónico)**

(1)

Las bebidas carbonatadas por lo tanto pueden contener entre sus ingredientes los siguientes:

a. **Edulcorantes**

Dentro de estos se tiene una amplia gama, los cuales se utilizan solos o en combinación (por sinergismo) dentro de este tipo de alimento:

- Sacarosa
- Ciclamato
- Sacarina
- Aspartame

La función de los edulcorantes es contribuir con el sabor dulce, proporcionar calorías, cuerpo y una textura que se aprecia en la boca. (2)

b. **Saborizantes**

Los saborizantes principales que se usan en la elaboración de bebidas carbonatadas vienen en forma de extractos alcohólicos o esencias, soluciones acuosas, emulsiones, soluciones de saborizantes en glicerol, propilenglicol y jugos de fruta concentrados. (3)

En bebidas carbonatadas se permite el uso de sabores naturales o artificiales en cantidad suficiente para lograr el efecto deseado en el producto. (1)

Estos componentes se clasifican como:

- **Saborizantes naturales**

Entre estos están: los aceites esenciales; los cuales a su vez, se componen de: terpenos, sesquiterpenos, compuestos oxigenados como ésteres, alcoholes, éteres, aldehídos, cetonas, lactonas, fenoles, éteres fenólicos, sustancias no volátiles; oleoresinas. y verdaderos concentrados de frutas. (3)

- **Saborizantes fortificantes**

Se utilizan para acentuar los sabores de algunos concentrados de frutas. (3)

- **Saborizantes artificiales**

Entre estos se encuentran: vainilla, cinamaldehído, biacetil y metilbeta-metiltiolpropionato. (3)

c. Ácidos

Los principales ácidos utilizados son: ácido fosfórico, cítrico, tartárico y málico. Se utilizan para dar a las bebidas carbonatadas el sabor ácido, característico de las frutas, principalmente se utiliza el ácido cítrico; mientras que el fosfórico es el que se emplea en cola y otras bebidas que no tienen sabor a frutas. (2)

Además de mejorar el sabor, el ácido ejerce acción preservante en las bebidas, aunque éste no sea suficiente para esta última acción, por lo que se pueda adicionar preservantes. (2)

d. Colorantes

En Guatemala, además de los naturales existen 6 colorantes artificiales permitidos:

- Azul brillante FCF (FD&C Azul No. 1)
- Indigotina (FD&C Azul No. 2)
- Tartrazina (FD&C Amarillo No. 5)
- Amarillo crepúsculo FCF (FD&C Amarillo No. 6)
- Eritrosina (FD&C Rojo No. 3)

- Amaranto (FD&C Rojo No. 2) (1)

Los más utilizados son los sintéticos, y el colorante natural obtenido de azúcar quemado o caramelo. (2?)

e. Preservantes

En bebidas carbonatadas únicamente se podrá usar el ácido benzoico y/o el ácido sórbico o sus sales de sodio o potasio en una dosis máxima de 1000 mg/kg.

(1)

f. Agua

El agua, que representa aproximadamente el 92% de la bebida, es el principal ingrediente. Es esencial que tenga el máxima grado de pureza química. (2)

g. Dióxido de carbono

Este es el responsable del sabor especial y de la efervescencia. Se obtiene de carbonatos, cal, quema de combustibles orgánicos y procesos de fermentación industriales. (2)

Existen métodos oficiales de análisis para algunos compuestos descritos en el AOAC (Official Methods or Analysis of the Association of Official Analytical Chemists). Para el ácido cítrico y ácido málico el método se lleva a cabo por medio de una titulación ácido-base. (4) Para el análisis de benzoato, cafeína y sacarina se utiliza un método por cromatografía líquida de alta presión. (Ver Anexos II)

(4)

Los investigadores desarrollan desde hace varios años trabajos acerca del análisis de este tipo de bebidas:

Tyler, Theodore A., et al. en 1984 investigó una técnica de determinación de sacarina sódica, cafeína, aspartame y benzoato de sodio por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) en bebidas de cola. Los ensayos fueron realizados en duplicado, en distintos tipos de bebidas de cola. Este método no utilizó estándares internos, por lo que la cuantificación fue dependiente de que el volumen de inyección fuera reproducible. (5)

Wel, H. van der, et al. en 1988 reportan que en Ottawa, Canadá, El Departamento de Seguridad Química de la División de Investigación de Alimentos, desarrolló un método para la determinación de siete edulcorantes artificiales en alimentos dietéticos: aspartame, acesulfame-K, sacarina, ciclamato, alitame, sucralosa y dulcín. (6) A excepción del ciclamato y sucralosa, todos pueden ser detectados por absorción UV a 200 nm. El ciclamato fue determinado simultáneamente con un aparato de separación post-columna de par-iónico conectado en series con el sistema de Cromatografía Líquida. El método fue evaluado con éxito en bebidas gaseosas, pudines y cubiertas de postres. Dicho método se consideró efectivo para el análisis de los siete edulcorantes mencionados. (7)

Sjoberg, Dr. Anna-Maija reporta que se han publicado varios métodos para el ensayo de sacarina por cromatografía líquida de alta presión mediante la inyección de una solución acuosa para el caso de bebidas carbonatadas. También la determinación simultánea por HPLC de sacarina y aspartame da grandes ventajas, pues se separan otros aditivos como lo son los preservante y colorantes. Menciona que el ciclamato no ha sido determinado por HPLC debido a que no absorbe en el rango UV. (8) Esta misma persona condujo un estudio complementario colaborativo acerca de la determinación de sacarina en aguas gaseosas y postres por cromatografía líquida. Se utilizaron duplicados ciegos y un blanco para cada tipo de material a cada nivel de concentración. Reportó la reproducibilidad relativa de las desviaciones estándar para cada tipo de muestras y los resultados fueron comparados con un estudio anterior realizado por laboratorios Nórdicos y con resultados generales obtenidos por AOAC. (9)

Puttemans, Marc L., et al. en Bélgica en 1984 realizaron un método en el que extrajeron simultáneamente ácido benzoico, ácido sórbico y sacarina de 46 muestras

comerciales de bebidas carbonatadas con tri-n-octilamina 0.01M a pH 5.5 y extraídos nuevamente a una fase acuosa con perclorato de sodio 0.1 M. Esta última solución fue inyectada directamente a un sistema de cromatografía líquida de fase inversa que permite la separación de todas los compuestos investigados. (10)

Maeda, Yumie, et al. sugieren un método sencillo para la determinación de ácido ascórbico en dulces y en bebidas carbonatadas por cromatografía líquida y que puede ser aplicado para análisis diario. Ellos proponen que se trate con una alícuota de 10 mL de la muestra y se lleve a 100 mL con una solución de ácido metafosfórico al 2% para que se inyecte directamente al cromatógrafo, equipado con una columna Inradasil ODS de 150 mm x 4.6 mm, y a un longitud de onda de 254 nm con una fase móvil de ácido fosfórico al 1% a pH 2.2. Mencionan que obtuvieron muy buenos resultados y que éstos demostraron en un 70% de las muestras exceso de cantidad de ácido ascórbico con base al Requerimiento Mínimo Diario Recomendado (DRDA). E indican que este método permite una determinación de ácido ascórbico simple, rápida y exacta en dulces seleccionados como también en bebidas carbonatadas; además es apropiado para un análisis rutinario. (11)

Tsuda, Taizo, et. al. en Japón en 1985 realizaron un método para determinar simultáneamente ácidos carboxílicos usados como preservantes y como acidulantes en bebidas carbonatadas por cromatografía de gas. Se analizaron aparte los patrones y las muestras comerciales de las bebidas carbonatadas, identificando los ácidos carboxílicos en las muestras por comparación de los tiempos de retención en cromatografía de gas. (12)

4. JUSTIFICACIONES

La mayoría de industrias que comercializan bebidas carbonatadas son transnacionales, y muchas veces es en el extranjero donde se efectúa el control de calidad de los componentes que poseen dichas bebidas, lo que constituye una desventaja, pues se traduce en un incremento del costo del producto.

En Guatemala las Normas Oficiales COGUANOR establecen como métodos de análisis para la determinación de algunas sustancias conservadoras (ácido benzoico, benzoatos alcalinos, ácido sórbico y sorbatos alcalinos) métodos volumétricos y espectrofotométricos. (13, 14)

De esto se originó la necesidad de buscar en Guatemala técnicas modernas, reproducibles, sencillas y validadas para efectuar el control de calidad y la posterior verificación de calidad ó cumplimiento con normas.

La técnica validada podrá ser adoptada como "Procedimientos Estándar de Operación" por los laboratorios de control de calidad de la industria o de instituciones como el Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP) o el Laboratorio Unificado de Control de Alimentos y Medicamentos, (LUCAM).

La cromatografía líquida de alta presión, en el presente es una de los métodos apropiados para este tipo de análisis, esta metodología es común en los laboratorios de control de calidad de alimentos. Por ello esta investigación pretendió establecer una técnica de análisis específica y válida, para realizar el análisis mencionado.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVOS GENERALES

- 5.1.1 Establecer una técnica de análisis instrumental moderna y adecuada para la cuantificación de edulcorantes, saborizantes y preservantes en bebidas carbonatadas.

5.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 5.2.1 Determinar una técnica de análisis moderna, reproducible, sencilla y rápida por cromatografía líquida de alta presión para cuantificar los edulcorantes, saborizantes y preservantes presentes en las bebidas carbonatadas.
- 5.2.2 Validar una técnica de análisis para el control y la verificación de calidad de bebidas carbonatadas en Guatemala.

6. HIPOTESIS

Los componentes responsables del sabor y adecuada conservación en bebidas carbonatadas pueden determinarse por Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) mediante una técnica específica.

7. MATERIALES Y METODOS

7.1 Universo de trabajo

3 muestras de bebidas carbonatadas por compañía embotelladora, seleccionadas por conveniencia.

7.2 Medios

7.2.1 Recursos humanos

- Autora: Thelma Haydée López Aguilar.
- Asesor: Lic. Roberto Benavides.

7.2.2 Recursos físicos

- Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá (INCAP).
- Biblioteca del Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá (INCAP).
- Biblioteca del Instituto Centroamericano de Investigación y Tecnología Industrial (ICAITI).
- Biblioteca de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

7.2.3 Recursos materiales

7.2.3.1 Materiales y Equipo

- Cristalería
- Balanza analítica
- Agitador magnético
- Bomba de vacío
- Filtros de membrana de 45 μ (MILLIPORE)

- Filtros de nylon de 0.45 μm (MILLIPORE)
- Jeringa de vidrio de 25 μl (HAMILTON)
- Columna CH-5 N cap, 25 cm x 4 mm (VARIAN) C18 de fase reversa
- Cromatógrafo Líquido Varian Vista 5500
- Integrador Hewlett Pacard 3390A
- Espectrofotómetro UV Visible Varian DMS 100S
- Impresora Epson Spectrum LX-80

7.2.3.2 Reactivos

- Agua destilada grado HPLC
- Metanol grado HPLC
- Solución saturada de fosfato de amonio
- Solución de ácido acético al 5% (v/v)
- Solución de ácido acético al 20% (v/v) llevado a pH 3.00 con solución saturada de fosfato de amonio

Patrones de:

- Acido ascórbico
- Acido benzoico
- Acido cítrico
- Acido fosfórico
- Acido fumárico
- Acido málico
- Cafeína
- Sacarina sódica

7.2.4 Procedimiento

7.2.4.1 Preparación de la muestra

Medir 100 mL de bebida carbonatada y colocarlos en un earlenmeyer de 250 mL; liberar el gas por medio de una bomba al vacío, agitando con un magneto por aproximadamente 60 minutos, observar que se libere la mayor parte del gas.

7.2.4.2 Preparación de los patrones

Pesar exactamente la cantidad de sustancia para tener las siguientes concentraciones de cada patrón:

- Acido ascórbico: 0.25, 0.50, 1.00, 2.00, 3.00 y 5.00 mg/mL.
- Acido benzoico: 0.01, 0.05, 0.10, 0.25, 0.50, 1.00, 2.00, 3.00 y 5.00 mg/mL.
- Acido cítrico: 0.10, 0.25, 0.50, 1.00, 2.00, 3.00 y 5.00 mg/mL.
- Cafeína: 0.05, 0.10, 0.25, 0.50, 1.00, 2.00, 3.00 y 5.00 mg/mL.
- Sacarina sódica: 0.005, 0.05, 0.10, 0.25, 0.50, 1.00, 2.00, 3.00 y 5.00 mg/mL.

El diluyente utilizado fue una solución de agua grado HPLC - metanol grado HPLC en una proporción de 50:50. Luego filtrar cada solución patrón con un filtro de nylon de 0.45 μm (MILLIPORE).

7.2.4.3 Preparación de las fases móviles

7.2.4.3.1 Fase móvil No. 1

Preparar una solución de ácido acético al 5% (v/v) con agua grado HPLC; también una solución saturada de

fosfato de amonio con agua grado HPLC. Ya preparadas se mezclan en las siguientes proporciones: Acido acético al 5% - Solución saturada de fosfato de amonio - Metanol (60:20:20). Para liberar el gas se coloca en un kitazato conectado a una bomba de vacío, se deja con agitación constante por aproximadamente 60 minutos y luego se filtra al vacío a través de membrana de 45 μ .

7.2.4.3.2 Fase móvil No. 2

Preparar una solución de ácido acético al 20% (v/v) con agua grado HPLC, llevar a pH de 3.00 con solución saturada de fosfato de amonio. Para liberar el gas se coloca en un kitazato conectado a una bomba al vacío, se deja con agitación constante por aproximadamente 60 minutos. Luego filtrar al vacío a través de una membrana de 45 μ . Utilizarla al 96% y metanol HPLC a 4%.

7.2.4.4 Análisis espectrofotométrico

A cada patrón, con una concentración de 1 mg/mL, realizar un barrido en el espectrofotómetro, a una longitud de onda mínima de 200 nm y 300 nm máxima.

7.2.4.5 Análisis cromatográfico

7.2.4.5.1 Condiciones cromatográficas

- Columna: CH-5 N cap, 25 cm x 4 mm (VARIAN) C18 de fase inversa.
- Fases móviles

* Fase móvil No. 1:

Acido acético al 5% - Solución saturada de fosfato de amonio - Metanol en una proporción de 60:20:20
100%

* Fase móvil No. 2:

Acido acético al 20% con pH 3.00	96%
Metanol	4%

- Flujo:

Fase móvil No. 1: 0.80 mL/min

Fase móvil No. 2: 1.00 mL/min

- Detector:

* Longitud de onda: 254 nm

* Sensibilidad: 0.005 AUFS

- Integrador:

* Zero: 5

* Atenuación: 1

* Velocidad de la carta: 0.25 cm/min

* Area rechazada: 1000

7.2.4.5.2 Inyección de curvas estándar

Inyectar 10 μ L de cada solución patrón en duplicado en el cromatógrafo líquido y plotear las áreas de los picos vrs. la concentración de cada solución en mg/mL.

7.2.4.5.3 Inyección de la muestra

Inyectar directamente 10 μ L de la muestra, preparada como se indicó anteriormente, en triplicado con el total de muestras a ensayar. Identificar todos los picos correspondientes a edulcorantes, saborizantes y preservantes por su tiempo de retención mediante el uso del detector ultravioleta.

7.2.4.6 Determinación de la concentración de cada compuesto

Utilizar el área de cada pico identificado en el cromatograma de la muestra y compararlo con la curva de concentración contra área que se obtiene para cada patrón. Se trabaja con patrones externos, ya que la inyección de la muestra es en forma directa y porque se utiliza un loop de 10 μ L inyectándose la misma cantidad siempre. Comparar los resultados obtenidos con el método descrito para benzoato, cafeína y sacarina con los obtenidos por el método oficial de la AOAC. (Ver Anexos II).

7.2.5 Diseño de investigación

7.2.5.1 Validación de la técnica

7.2.5.1.1 Exactitud

Para establecer la exactitud se compara los resultados obtenidos con el Método de Estándares Externos (Curva de calibración: Concentración contra Área) con los obtenidos por el Método de Adición de Estándar. Este método consiste en adicionar a la muestra, que contiene una cantidad de principio activo

desconocida, cantidades conocidas del mismo compuesto; y de esta manera determinar la cantidad original del mismo en la muestra. Para la comparación de los resultados por los dos métodos se obtuvo el porcentaje de recuperación a través de la siguiente ecuación:

$$\%R = (\text{Concentración obtenida}/\text{Concentración agregada}) * 100$$

En donde:

- Concentración obtenida: es aquella que se encuentra mediante la ecuación de la recta de la gráfica Concentración contra
- Concentración agregada es la Concentración basal (- a/b) * Concentración agregada de patrón por el método de adición de estándares.

7.2.5.1.2 Precisión

Para determinar la precisión inyectar cada patrón 6 veces consecutivas a la misma concentración (de 1 mg/mL para el ácido benzoico, ácido cítrico y cafeína; y de 0.5 mg/mL para el ácido ascórbico) y se determina el coeficiente de variación, a través de la desviación estándar, utilizando la siguiente ecuación:

$$SR(\%) = 100/x * \sqrt{\text{SUMATORIA } (xi - x)^2 / N - 1}$$

7.2.5.2 Etapa de Muestreo

Se realizó por conveniencia, seleccionándose tres muestras (botellas) de bebidas carbonatadas por compañía embotelladora

para un número igual de determinaciones para comprobar su aplicabilidad en este tipo de muestras.

7.2.5.3 Análisis de resultados

Se compararon las gráficas obtenidas para cada patrón con el respectivo componente identificado en cada una de las bebidas carbonatadas, a través del tiempo de retención. Para encontrar la concentración de los componentes que interesen dentro de la muestra se utilizó la ecuación de la recta de las gráficas Concentración contra Area, respectivamente para cada caso.

8. RESULTADOS

Se graficó el espectro ultravioleta entre los 200 nm y los 300 nm de longitud de onda de los patrones de los siguientes ácidos:

- Acido ascórbico
- Acido benzoico
- Acido cítrico
- Acido fosfórico
- Acido fumárico
- Acido málico
- Cafeína
- Sacarina sódica

(Ver Anexo III). Con los espectros de cada patrón (a una concentración de 1 mg/mL) se observó que el ácido fosfórico y el ácido málico no serían detectados por el cromatógrafo ya que éstos no absorben a 254 nm y que sí podían medirse a una longitud de onda de 210 ó 215 nm, pero en el detector ultravioleta se incrementó tanto el ruido de fondo a estas longitudes de onda cerca de los 200 nm, que no fue posible detectar los compuestos.

Para los anteriores, a excepción del ácido fosfórico y ácido málico, fue posible detectarlos a una longitud de onda de 254 nm; por lo que únicamente se trabajó con esta.

Para la elección de la fase móvil se efectuaron inyecciones de los patrones mediante "gradiente de elución":

Tiempo (min)	Metanol	Buffer de fosfato de amonio (pH 4.5)
0.00	30%	70%
5.00	30%	70%
5.00	60%	40%
2.00	60%	40%
0.00	30%	70%

Luego de varias pruebas se determinó que no se mejoraba la separación de los patrones con el uso del gradiente y que la mejor separación se obtuvo con dos fases móviles, éstas son:

Fase móvil No. 1:

Acido acético al 5% - Solución saturada de fosfato de amonio - Metanol en una proporción de 60:20:20 100%

Fase móvil No. 2:

- Acido acético al 20% llevado a pH = 3.00
con solución saturada de fosfato de amonio 96%
- Metanol 4%

Se trabajaron los siguientes patrones en ambas fases móviles: ácido ascórbico, ácido benzoico, ácido cítrico, ácido fosfórico, ácido fumárico, ácido málico, cafeína y sacarina sódica; se obtuvieron los siguientes resultados:

TABLA DE RESULTADOS No. 1

STD \ TIEMPO RETENCION	FASE MOVIL 1	FASE MOVIL 2
Acido ascórbico	3.00-4.00 min	2.80 min
Acido benzoico	16.00-18.00 min	12.00 min
Acido cítrico	4.00 min	2.80 min
Acido fosfórico	No detectado	No detectado
Acido fumárico	4.00-4.50 min	-----
Acido málico	No detectado	No detectado
Cafeína	-----	13.00-14.00 min
Sacarina	6.00-7.00 min	-----

Escogiéndose para realizar las gráficas de concentración contra área las fases móviles resaltadas respectivamente para cada patrón.

Una vez establecidas todas las condiciones de trabajo (Ver Materiales y Métodos, No. 7.2.4.) se procedió a validar la técnica:

1. Gráfica Concentración contra Area

Para esto se escogió para cada estándar las fases móviles resaltadas en la tabla de resultados No. 1, obteniéndose una regresión buena para cada uno de los patrones analizados, ver las tablas de resultados Nos. 2-6 y gráficas Nos. 1-5, presentadas a continuación.

TABLA DE RESULTADOS No. 2

CONCENTRACION VRS. AREA

ACIDO ASCORBICO

CONCENTRACION (MG/ML)	AREA	PROMEDIO AREA
0.25	2,620,200 2,827,500	2,723,850
0.50	8,473,100 8,550,100	8,511,600
1.00	19,449,000 19,865,000	19,657,000
2.00	68,912,000 74,837,000	71,874,500
3.00	126,660,000 134,600,000	130,630,000
5.00	261,860,000 265,750,000	263,805,000

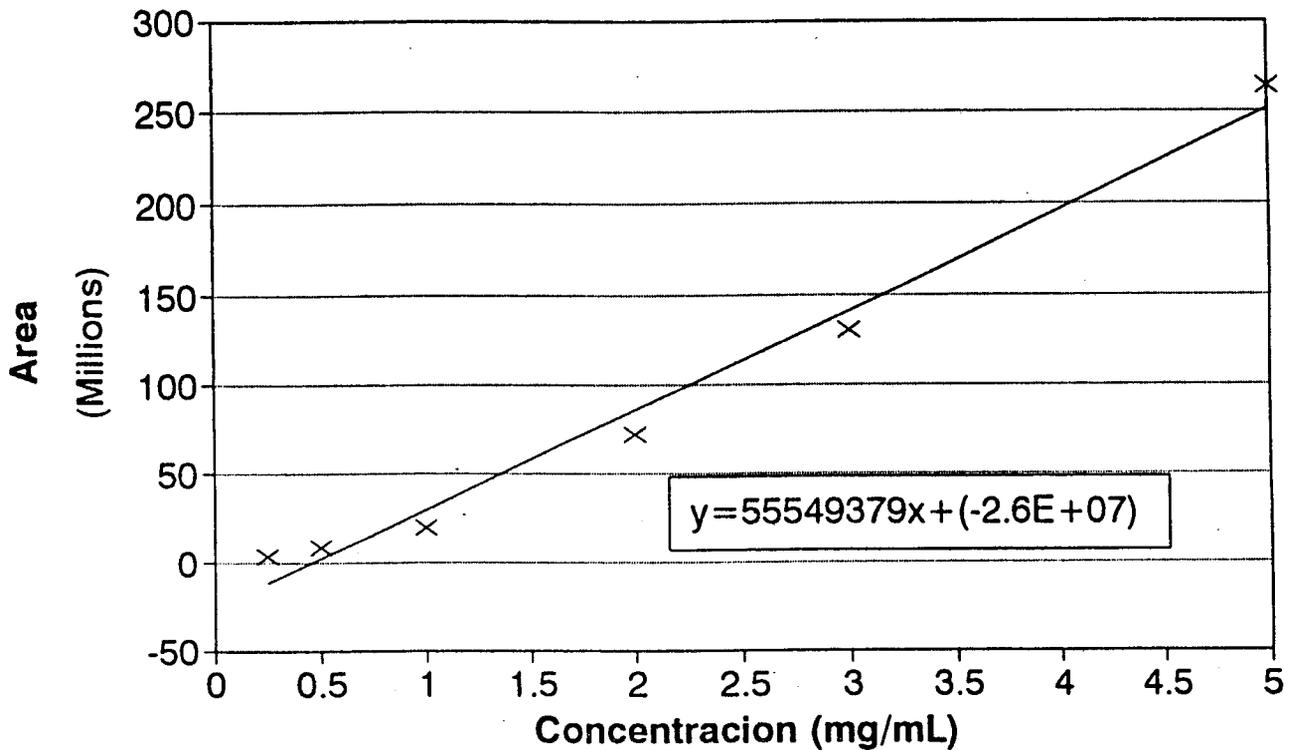
Fase móvil No. 1

Acido acético 5% - Acetato de amonio saturado - Metanol (60-20-20) 100%

Rango de tiempo de retención

3.32 - 3.41 min.

GRAFICA No. 1 CONCENTRACION CONTRA AREA ACIDO ASCORBICO



× Experimentales — Regresion

TABLA DE RESULTADOS No. 3
CONCENTRACION VRS. AREA
ACIDO BENZOICO

CONCENTRACION (MG/ML)	AREA	PROMEDIO AREA
0.01	6,298	6,298
0.05	175,050 175,800	175,425
0.10	393,160 448,790	420,975
0.25	1,368,000 1,415,200	1,391,600
0.50	2,679,600 2,733,300	2,706,450
1.00	5,535,200 5,308,700	5,421,950
2.00	12,801,000 12,938,000	12,869,500
3.00	12,317,000 13,310,000	12,813,500
5.00	24,657,000 24,479,000	24,568,000

Fase móvil No. 2

Acido acético 20% (pH = 3)

96%

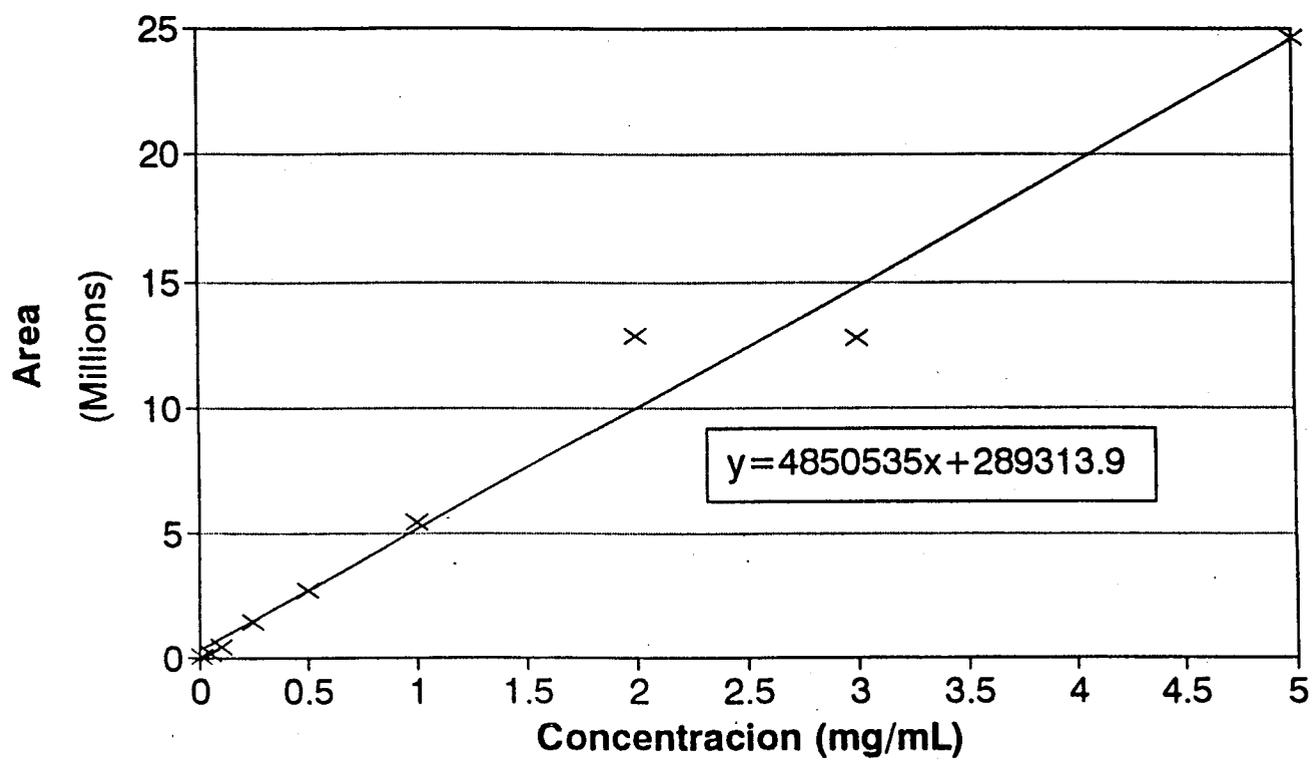
Isopropanol

4%

Rango de tiempo de retención

11.89 - 13.30 min.

GRAFICA No. 2 CONCENTRACION CONTRA AREA ACIDO BENZOICO



× Experimentales — Regresion

TABLA DE RESULTADOS No. 4

CONCENTRACION VRS. AREA

ACIDO CITRICO

CONCENTRACION (MG/ML)	AREA	PROMEDIO AREA
0.10	118,320 135,920	127,120
0.25	111,230 125,500	118,365
0.50	147,440 164,820	156,130
1.00	265,670 261,380	263,525
2.00	538,250 516,490	527,370
3.00	767,900 661,020	714,460

Fase móvil No. 2

Acido acético 20% (pH = 3)

96%

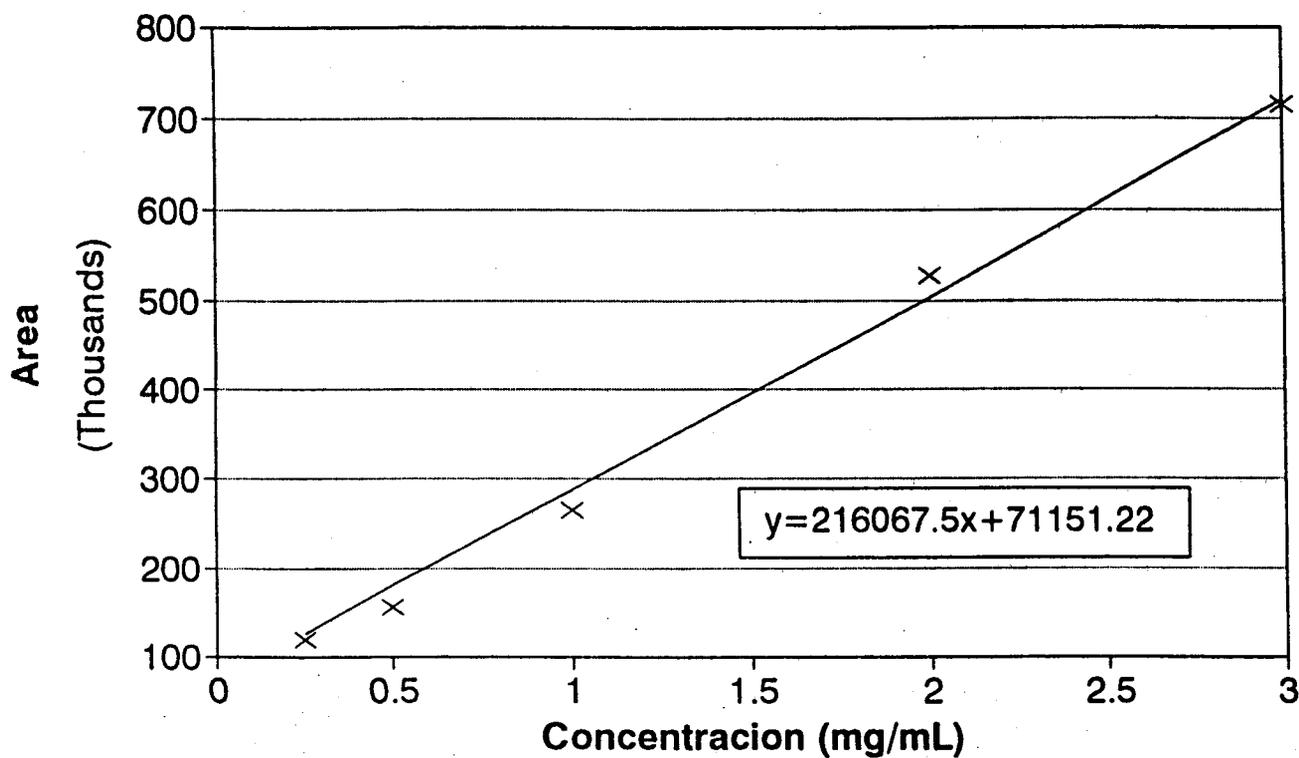
Isopropanol

4%

Rango de tiempo de retención

2.70 - 2.95 min.

GRAFICA No. 3 CONCENTRACION CONTRA AREA ACIDO CITRICO



× Experimentales — Regresion

TABLA DE RESULTADOS No. 5**CONCENTRACION VRS. AREA****CAFEINA**

CONCENTRACION (MG/ML)	AREA	PROMEDIO AREA
0.05	1,460,500 1,523,800	1,492,150
0.10	2,414,000 2,445,300	2,429,650
0.25	6,186,200 6,141,500	6,163,850
0.50	10,345,000 10,249,000	10,297,000
1.00	25,767,000 25,850,000	25,808,500
2.00	44,413,000 43,703,000	44,058,000
3.00	72,816,000 71,801,000	72,308,500
5.00	125,700,000 123,080,000	124,390,000

Fase móvil No. 2

Acido acético 20% (pH = 3)

96%

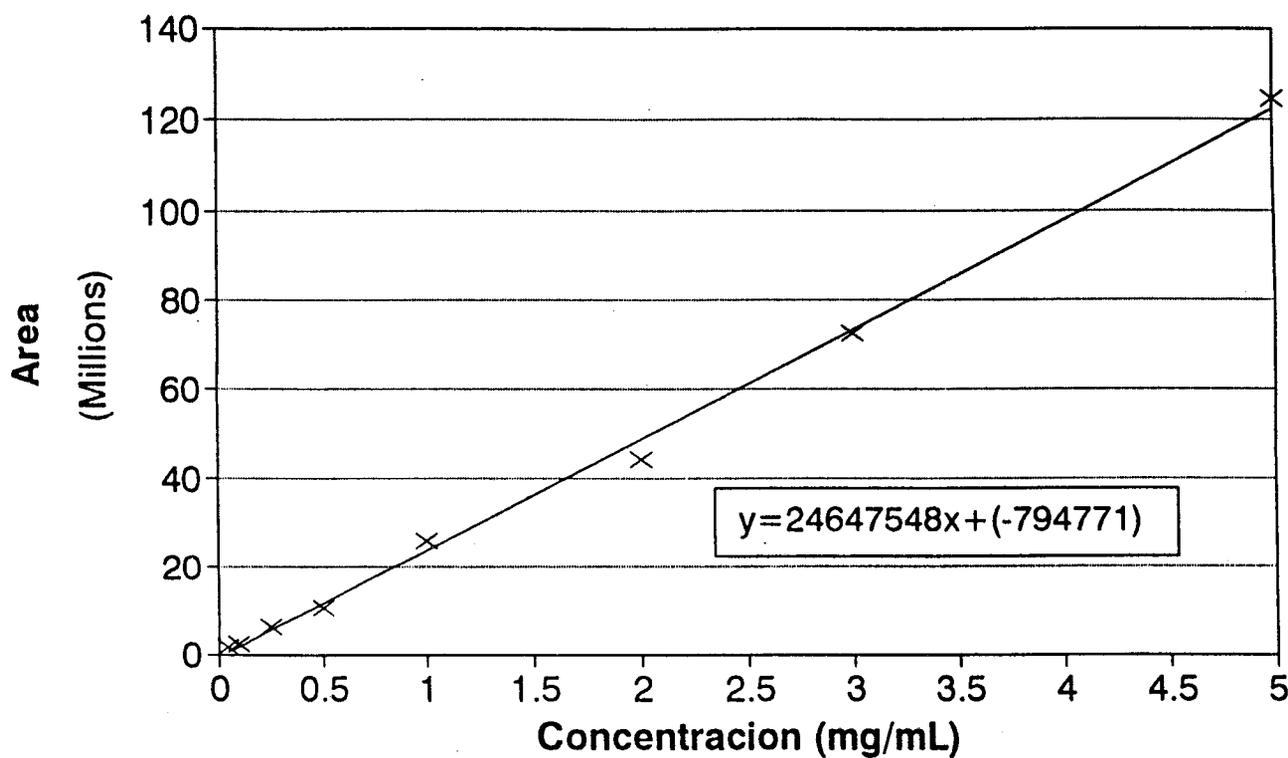
Isopropanol

4%

Rango de tiempo de retención

13.36 - 14.11 min.

GRAFICA No. 4 CONCENTRACION CONTRA AREA CAFEINA



× Experimentales — Regresion

TABLA DE RESULTADOS No. 6

CONCENTRACION VRS. AREA

SACARINA SODICA

CONCENTRACION (MG/ML)	AREA	PROMEDIO AREA
0.005	42,341 40,368	41,354.5
0.05	542,200 505,830	524,015
0.10	803,080 794,640	798,860
0.25	2,235,600 2,249,700	2,242,650
0.50	4,197,400 4,193,200	4,195,300
1.00	7,362,900 7,450,500	7,406,700
2.00	14,705,000 14,582,000	14,643,500
3.00	19,718,000 19,459,000	19,588,500
5.00	32,224,000 32,296,000	32,260,000

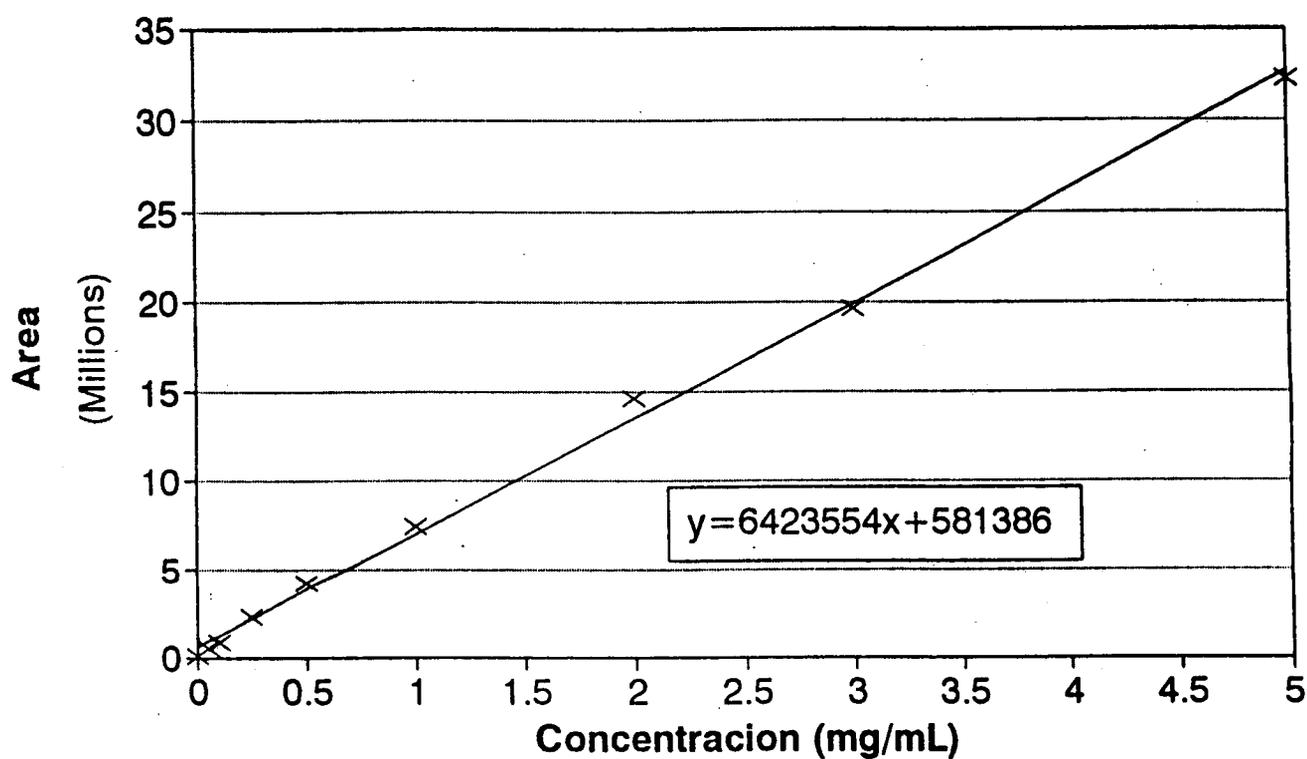
Fase móvil No. 1

Acido acético 5% - Acetato de amonio saturado - Metanol (60-20-20) 100%

Rango de tiempo de retención

6.20 - 7.25 min.

GRAFICA No. 5 CONCENTRACION CONTRA AREA SACARINA SODICA



× Experimentales — Regresion

2. Precisión

Se utilizó una solución de concentración conocida para cada patrón (de 1 mg/mL para el ácido benzoico, ácido cítrico y cafeína; y de 0.5 mg/mL para el ácido ascórbico) obteniéndose para cada uno de ellos, una desviación estándar relativa adecuada (ver Tablas de Resultados Nos. 7-10, presentadas a continuación), los valores de ésta son los siguientes:

PATRON	DESVIACION ESTANDAR RELATIVA
Acido ascórbico	2.42%
Acido benzoico	3.20%
Acido cítrico	4.09%
Cafeína	1.05%

TABLA DE RESULTADOS No. 7

PRECISION

ACIDO ASCORBICO

$$SR(\%) = 100/x * \sqrt{\text{SUMATORIA } (xi - x)^2 / N - 1}$$

Donde:

x = Promedio de área

xi = Valor de cada área

N = Número de repiticiones

AREA	xi - x	(xi - x) ²
12,634	- 411	168,921
12,751	- 294	86,436
12,896	- 149	22,201
12,982	- 63	3,969
13,378	333	110,888
x = 12,928		SUM = 392,416

$$SR(\%) = 100/12,928 * \sqrt{392,416 / 4}$$

$$= 2.42\%$$

NOTA:

- Se trabajó con una concentración de 0.5 mg/mL
- Fase móvil utilizada:
Fase móvil No. 1
Acido acético 5% - Acetato de amonio saturado - Metanol (60-20-20) 100%

TABLA DE RESULTADOS No. 8

PRECISION

ACIDO BENZOICO

$$SR(\%) = 100/x * \sqrt{\text{SUMATORIA } (xi - x)^2 / N - 1}$$

Donde:

x = Promedio de área

xi = Valor de cada área

N = Número de repeticiones

AREA	xi - x	(xi - x) ²
51,113	- 2,219	4,923,961
53,127	- 1,205	1,452,025
52,858	- 205	42,025
51,162	- 2,170	4,708,900
53,069	- 263	69,169
x = 52,266		SUM = 11,196,080

$$SR(\%) = 100/52,266 * [11,196,080 / 4]^{1/2}$$

$$= 3.20\%$$

NOTA:

- Se trabajó con una concentración de 1 mg/mL

- Fase móvil utilizada:

Fase móvil No. 2

Acido acético 20% (pH = 3)

Isopropanol

96%

4%

TABLA DE RESULTADOS No. 9

PRECISION

ACIDO CITRICO

$$SR(\%) = 100/x * \sqrt{\text{SUMATORIA } (xi - x)^2 / N - 1}$$

Donde:

x = Promedio de área

xi = Valor de cada área

N = Número de repiticiones

AREA	xi - x	(xi - x) ²
25,538	- 720	518,400
27,992	1,734	3,006,756
25,482	- 776	602,176
25,141	- 1,117	1,247,689
26,798	540	291,600
26,598	340	115,600
x = 26,258		SUM = 5,782,221

$$SR(\%) = 100/26,258 * [5,782,221 / 5]^{1/2}$$

$$= 4.09\%$$

NOTA:

- Se trabajó con una concentración de 1 mg/mL

- Fase móvil utilizada:

Fase móvil No. 2

Acido acético 20% (pH = 3)

Isopropanol

96%

4%

TABLA DE RESULTADOS No. 10

PRECISION

CAFEINA

$$SR(\%) = 100/x * \sqrt{[SUMATORIA (xi - x)^2 / N - 1]^{1/2}}$$

Donde:

x = Promedio de área

xi = Valor de cada área

N = Número de repiticiones

AREA	xi - x	(xi - x) ²
30,590	- 29	841
31,102	319	101,761
30,783	483	233,289
30,300	- 164	26,896
30,233	- 386	148,996
30,704	85	7,225
x = 30,619		SUM = 519,008

$$SR(\%) = 100/30,619 * [519,008 / 5]^{1/2} = 1.05\%$$

NOTA:

- Se trabajó con una concentración de 1 mg/mL

- Fase móvil utilizada:

Fase móvil No. 2

Acido acético 20% (pH = 3)

Isopropanol

96%

4%

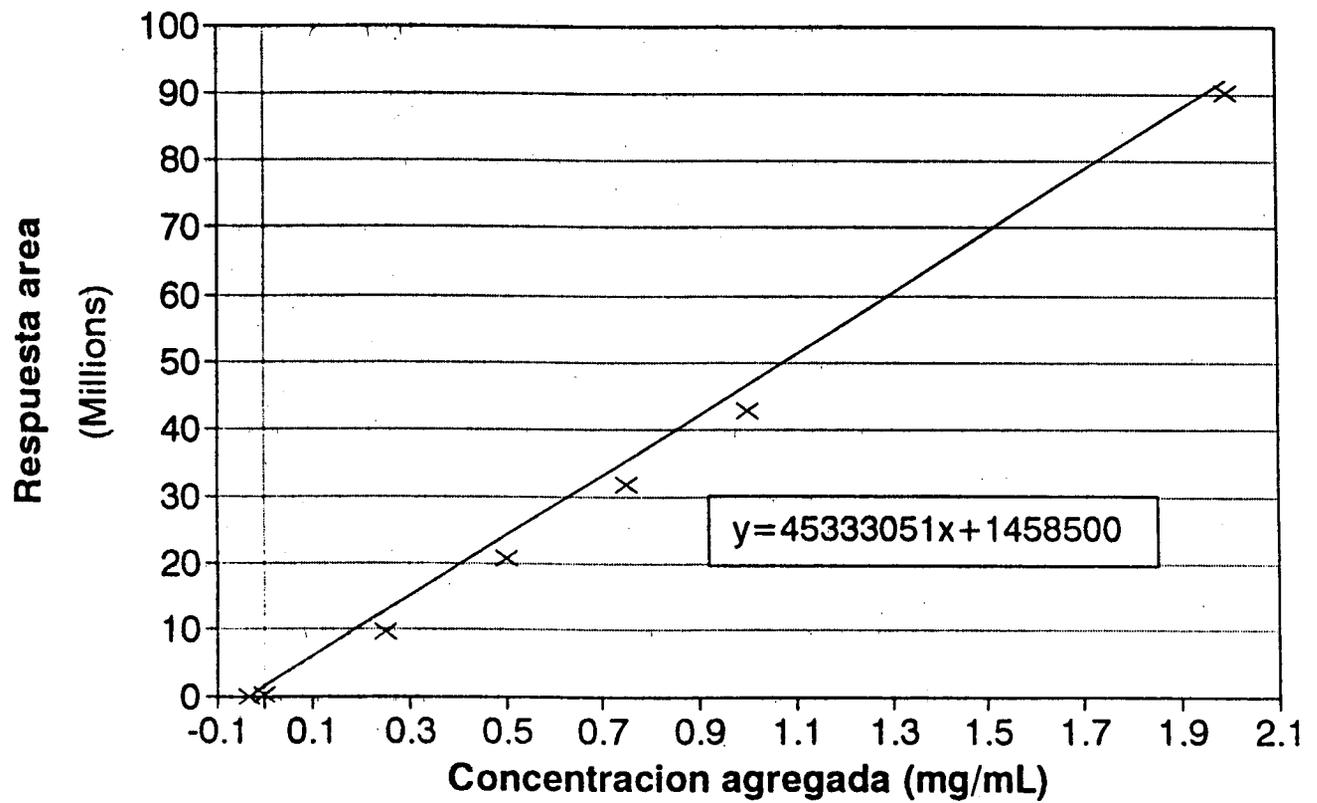
3. Exactitud

Para saber la exactitud de la técnica se calculó el porcentaje de recuperación para cada patrón (Ver Materiales y Métodos: 7.2.5.1.1), siendo este valor adecuado para cada uno.

PATRON	PORCENTAJE DE RECUPERACION
Acido ascórbico	86.2%
Acido benzoico	102.5%
Acido cítrico	86.1%
Cafeína	98.8%

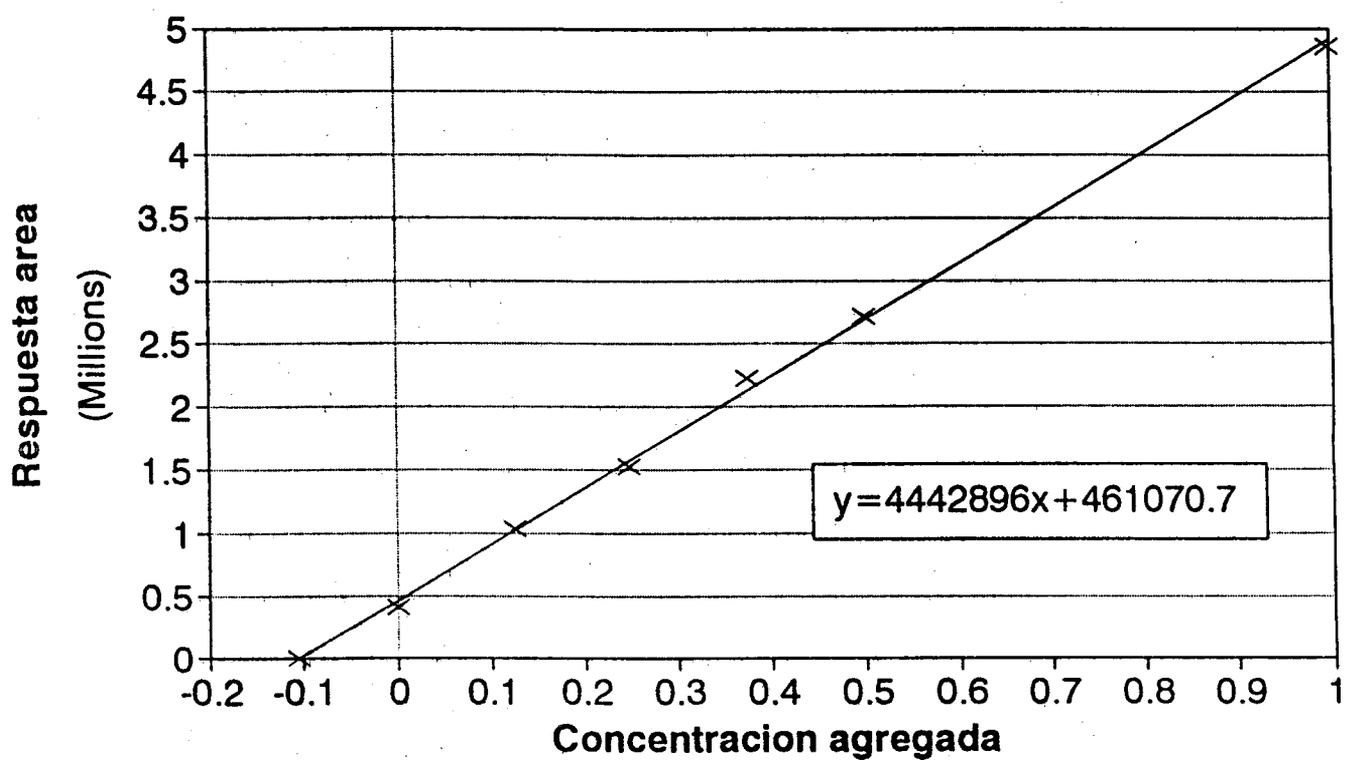
A continuación se presentan las gráficas obtenidas con el método de Adición de Estandar (Ver Materiales y Métodos, Exactitud)>

GRAFICA No. 6 ADICION DE ESTANDARES ACIDO ASCORBICO



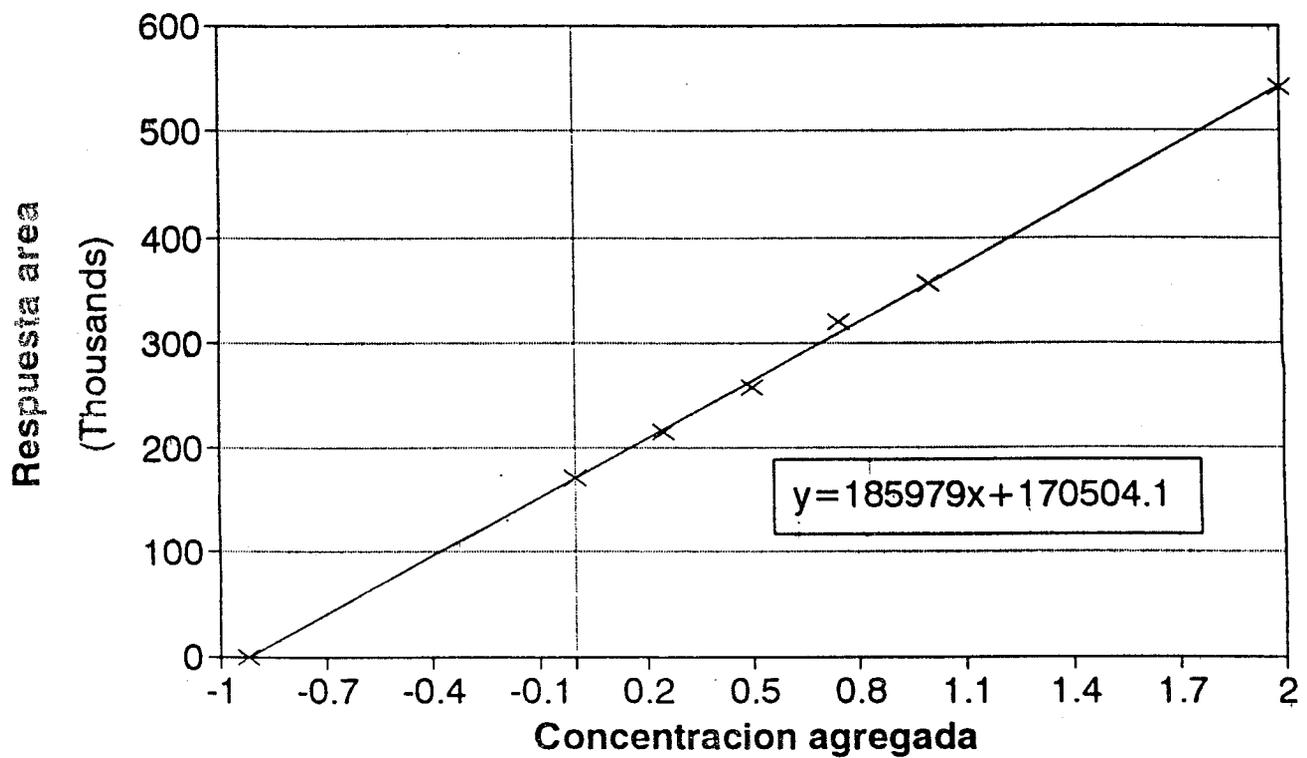
× Experimentales — Regresion

GRAFICA No. 7 ADICION DE ESTANDARES ACIDO BENZOICO



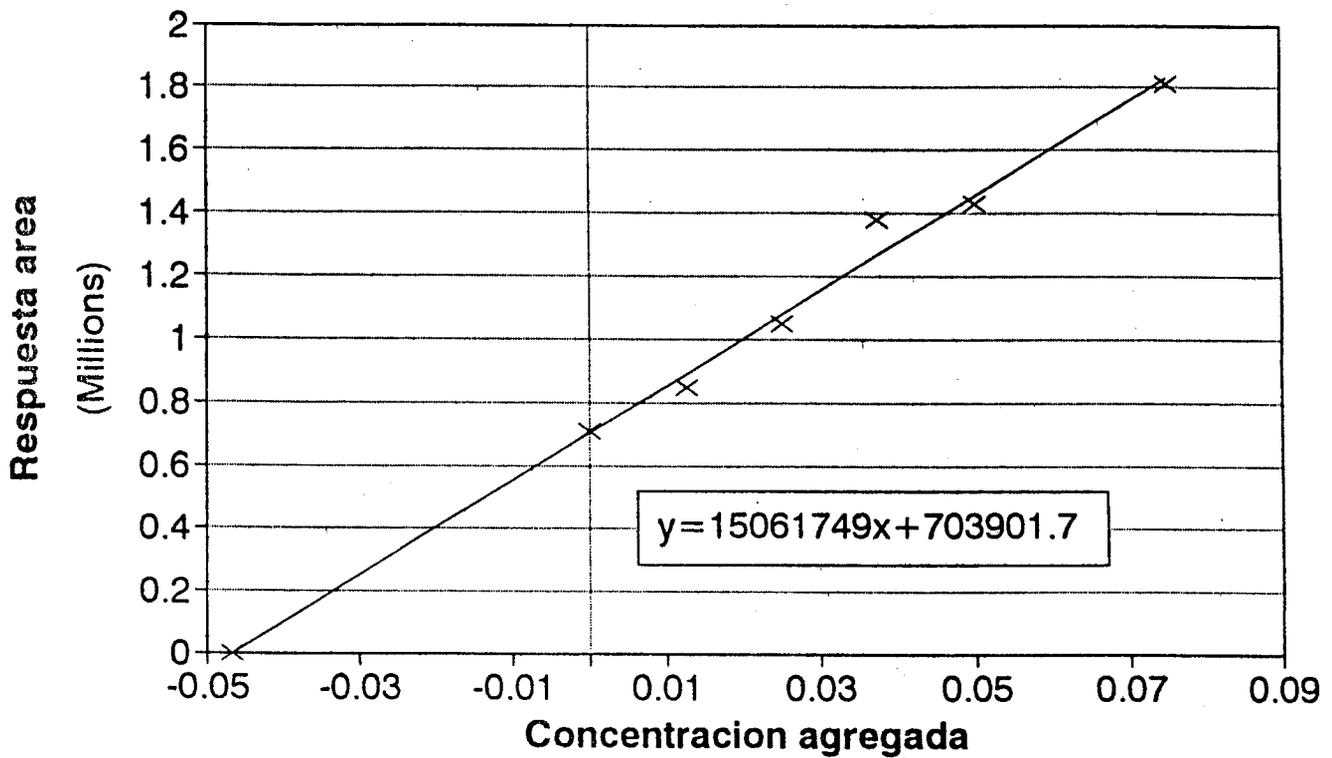
× Experimentales — Regresion

GRAFICA No. 8 ADICION DE ESTANDARES ACIDO CITRICO



× Experimentales — Regresion

GRAFICA No. 9 ADICION DE ESTANDARES CAFEINA



× Experimentales — Regresion

La sacarina no se evaluó, en cuanto a precisión y exactitud, en vista de que no se encontró presente en la formulación de ninguna de las muestras.

4. Muestras analizadas

Las muestras que se trabajaron fueron 3 sabores de cada embotelladora, identificadas de la siguiente forma:

EMBOTELLADORA	MUESTRAS		
A	A1	A2	A3
B	B1	B2	B3
C	C1	C2	C3

A continuación se presentan los resultados obtenidos para cada embotelladora.

TABLA DE RESULTADOS No. 11

EMBOTELLADORA A

COMPUESTO	RANGOS DE RT'S	No. DE MUESTRA					
		B1		B2		B3	
		AREA	CONC.	AREA	CONC.	AREA	CONC.
Ac. benzoico							
Patron	11.89 a 13.30						
Muestra	12.89 a 13.28					706180	0.09
Ac. citrico							
Patron	2.70 a 2.95						
Muestra	2.86 a 2.91			174877	0.48	1553500	6.86
Cafeina							
Patron	13.36 a 14.11						
Muestra	13.59 a 13.78	266300	0.04				

Donde RT es: Tiempo de retención

TABLA DE RESULTADOS No. 12

EMBOTELLADORA B

COMPUESTO	RANGOS DE RT'S	No. DE MUESTRA					
		A1		A2		A3	
		AREA	CONC.	AREA	CONC.	AREA	CONC.
Ac. benzoico							
Patron	11.89 a 13.30						
Muestra	12.71 a 13.43			3999387	0.76	951700	0.14
Ac. citrico							
Patron	2.70 a 2.95						
Muestra	2.95 a 3.37			9923337	45.6	727583	3.04
Cafeina							
Patron	13.36 a 14.11						
Muestra	13.72 a 14.05	1858667	0.11				

Donde RT es: Tiempo de retención

TABLA DE RESULTADOS No. 13

EMBOTELLADORA C

COMPUESTO	RANGOS DE RT'S	No. DE MUESTRA					
		C1		C2		C3	
		AREA	CONC.	AREA	CONC.	AREA	CONC.
Ac. ascorbico							
Patron	11.89 a 13.30						
Muestra	12.89 a 13.28					85249.5	0.47
Ac. benzoico							
Patron	11.89 a 13.30						
Muestra	12.89 a 13.28			733523	0.09	2058867	0.36
Ac. citrico							
Patron	2.70 a 2.95						
Muestra	2.86 a 2.91			981487	4.21	836870	3.5
Cafeina							
Patron	13.36 a 14.11						
Muestra	13.59 a 13.78	1331600	0.09				

Donde RT es: Tiempo de retención

9. DISCUSION DE RESULTADOS

Los espectros ultravioleta de cada compuesto (Ver Anexo III) mostraron el rango de absorbancia de cada uno, de allí que no se pudo trabajar con el ácido fosfórico ni con el ácido málico pues absorbían a una longitud de onda entre 210 y 215 nm, no a 254 nm como el resto de los compuestos y a estas longitudes de onda el ruido de fondo se incrementó mucho, por lo que no fue posible detectarlos.

Para establecer qué fase móvil podría dar una mejor separación de los picos correspondientes a los compuestos seleccionados, se inició el estudio con gradiente de elución. Sin embargo, se observó que la mayoría de los patrones eluían antes de que iniciara el gradiente, por lo que no fue necesario utilizarlo. Además al trabajar con gradiente se incrementaba la inestabilidad de la línea base y se perdía mucho tiempo al estabilizar la columna para regresar a las condiciones originales. Debido a estas razones se escogieron las fases móviles indicadas (Ver Resultados). Tal como indica la Tabla de Resultados No, 1 (Ver Resultados) se utilizaron dos fases móviles; en las cuales se inyectaron todos los patrones y se logró establecer los tiempos de retención para cada patrón en ambas fases móviles; la razón de ello fue que se logró una mejor separación entre algunos de los patrones con distinta fase móvil, para cada compuesto. Esto se pudo verificar al realizar la inyección de las muestras.

Para la validación de la técnica se determinaron los siguientes parámetros:

9.1 Gráfica Concentración contra Area

Se obtuvieron gráficas de Concentración contra Area con una desviación estándar menor de cinco, es decir que a diferentes concentraciones los patrones se

comportaron en una forma lineal, lo que indicó que la técnica es posible utilizarla en la determinación cuantitativa de los siguiente ácidos: ácido ascórbico, ácido benzoico, ácido cítrico, cafeína y sacarina sódica.

9.2 Precisión

Se comprobó que la técnica tiene una precisión adecuada, esto se pudo determinar a través de los valores de la desviación estándar relativa obtenidos para cada patrón, los cuales fueron menores que el 5%.

9.3 Exactitud

Este parámetro se determinó a través del porcentaje de recuperación; observándose que con esta técnica se obtuvieron mejores resultados, puesto que para todos los patrones es mayor del 85%.

Las variaciones que se observaron en los tiempos de retención de algunos compuestos se pudieron deber a que la columna que se usó había sido utilizada durante bastante tiempo, por tal razón unas semanas antes de terminar con los análisis se cambiaron los filtros de la columna pues registró una presión muy alta, al hacer este cambio bajó notablemente. Otro factor importante de mencionar es que por el tiempo de vida de los patrones se prepararon nuevamente al realizar el Método de Adición de Estandares, para establecer el porcentaje de recuperación.

9.4 Muestras analizadas

En las muestras de cola (A1, B1 y C1) se detectaron dos picos, uno de ellos cafeína con un tiempo de retención de 14 minutos aproximadamente con la fase móvil No. 2, confirmándose con la adición del patrón de cafeína a distintas

concentraciones. Para las muestras que no contenían colorante, A2, B2 y C2, se confirmó la presencia de ácido cítrico (RT en A2: 3.33 minutos; RT en B2: 2.97 minutos; RT en C2: 2.84 minutos), donde RT es Tiempo de Retención y de ácido benzoico (RT en A2: 13.19 minutos; RT en C2: 13.25 minutos); observándose con esto que la muestra B2 únicamente posee ácido cítrico. Para las muestras de naranja, específicamente la C3, se confirmó la presencia de ácido ascórbico (RT: 3.50 minutos), ácido cítrico (RT: 4.50 minutos) y ácido benzoico (RT: 12 minutos) con la fase móvil No. 1 separándose perfectamente los tres ácidos. En las muestras A3 y B3 se confirmó el ácido cítrico (RT en A3: 3.20 minutos; RT en B3: 2.86 minutos) y el ácido benzoico (RT en A3: 12.81 minutos; RT en B3: 13.15 minutos) utilizando la fase móvil No. 2 para los tres sabores de naranja.

En las tablas de resultados 12, 13 y 14 (Ver Resultados) se puede observar que los tiempos de retención de la mayoría de los compuestos en las muestras, se encuentran dentro del rango presentado por los patrones; además se verificó su presencia cuando se utilizó el método de adición de estándar, pues el pico del compuesto dentro de la muestra aumentaba su área conforme aumenta la concentración. Se puede observar que en las muestras A2 y A3 que contienen ácido benzoico y ácido cítrico, el tiempo de retención sobrepasa un poco al presentado por los patrones, esto se explica pues dentro de la muestra existen otros compuestos presentes que interfieren y hacen que este tiempo se incremente ligeramente, a diferencia de los patrones, que consisten únicamente de un compuesto conocido.

En cuanto a la comparación realizada entre los resultados obtenidos con la técnica de referencia de la AOAC y los obtenidos con las fases móviles Nos. 1 y 2 se observó que se obtienen mejores resultados con las fases móviles utilizadas en esta investigación pues con la técnica de la AOAC no se pudo obtener una separación de los tres compuestos.

10. CONCLUSIONES

- 10.1 La técnica desarrollada por el método de cromatografía líquida de alta presión utilizado es válida, confiable y reproducible para la identificación y cuantificación de algunos edulcorantes, saborizantes y preservantes que se encuentran en las bebidas carbonatadas, específicamente: ácido ascórbico, ácido benzoico, ácido cítrico, sacarina sódica, y así como cafeína.
- 10.2 Al obtener gráficas de concentración contra área lineales, desviaciones estándar menores del 5% y porcentajes de recuperación mayores del 85% se comprueba que el método es adecuado para ser aplicado en muestras de bebidas carbonatadas.
- 10.3 Con la técnica descrita fue posible identificar y cuantificar algunos compuestos presentes en las distintas muestras de bebidas carbonatadas, por lo que se comprobó su aplicación a este tipo de alimentos.

11. RECOMENDACIONES

- 11.1 Continuar estudios en los cuales se utilice esta técnica para otros tipos de alimentos en los que se determine la presencia de ácido ascórbico, ácido benzoico, ácido cítrico, cafeína y sacarina sódica y compararlo con las técnicas oficiales para poder utilizarla en forma rutinaria en los diferentes laboratorios de análisis.

- 11.2 En futuros estudios, investigar las posibilidades de aplicar esta técnica para la cuantificación del ácido (Vitamina C) en otros alimentos, ya que se encuentra en estudio la norma sobre etiquetado nutricional, donde es obligatorio incluir las cantidades de dicho compuesto.

12. REFERENCIAS

- 12.1 Norma Guatemalteca Obligatoria, NGO 34 154 Bebidas Carbonatadas. Aguas Gaseosa con sabor y sin sabor. Especificaciones. 1985.
- 12.2 Woodroof JG., Phillips GF., Beverages: Carbonated and Noncarbonated. Westport, USA: The Avi Publishing Company, Inc, 1974. 420 p. (p.99-159).
- 12.3 Jacobs MB., Manufacture and analysis of Carbonated Beverages. New York: Chemical Publishing CO, Inc, 1959. 535 p. (p. 13-125).
- 12.4 Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 15a. Edition. United States of America: Edited of Keneth Helrich, Vols. 2, vol. II, 1990. 1298 p. (p. 751-752).
- 12.5 Tyler TA., Liquid Chromatographic Determination of Sodium Saccharin, Caffeine, Aspartame, and Sodium Benzoate in Cola Beverages. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1984;67:745-747.
- 12.6 Food Additives; Sweeteners; A Multi-Sweetener Methods Employing Liquid Chromatography. Food Lab. Newslet. 1988;No.13:29-30.
- 12.7 Lawrence JF., Charbonneau CF., Determination of Seven Artificial Sweeteners in Diet Food Preparations by Reverse-Phase Liquid Chromatography with Absorbance Detection. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1988;71:934-937.
- 12.8 Sjoberg A-M., Food Additives; Artificial Sweeteners and Methods for Their Analysis. Food. Lab. Newslet. 1989; No.17:42-43.
- 12.9 Sjoberg A-M., Liquid Chromatographic Determination of Saccharin in Beverages and Desserts: Complementary Collaborative Study. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1988;71:1210-1212.
- 12.10 Puttemans ML., Dryon L., Massart DL., Extraction of Organic Acids by Ion-Pair Formation with Tri-n- Octylamine. Part V. Simultaneous Determination of Synthetic Dyes, Benzoic Acid, Sorbic Acid, and Saccharin in Soft Drinks and Lemonade Syrups. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1984;67:880-885.
- 12.11 Maeda Y., Ochi S., Masui, T., Matubara S., Liquid Chromatographic Determination of L-Ascorbic Acid in Candies and Soft Drinks. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1988;71:502-504.

- 12.12 Tsuda T., Nadanichi H., Morita T., Takebayashi J., Simultaneous Gas Chromatographic Determination of Carboxylic Acids in Soft Drinks and Jams. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1985;68:902-905.
- 12.13 Norma Guatemalteca Obligatoria, NGO 34 003 h26 Productos elaborados a partir de frutas y hortalizas. Determinación cualitativa y cuantitativa del ácido benzóico y benzoatos alcalinos. 1982.
- 12.14 Norma Guatemalteca Obligatoria, NGO 34 003 h29 Productos elaborados a partir de frutas y hortalizas. Determinación cualitativa y cuantitativa del ácido sórbico y sorbatos alcalinos. 1980.
- 12.15 Potter, Norman, La Ciencia de los Alimentos. Traducida por Anita Yates. México: Editorial Edutex, 1978. 749 p.

13. ANEXOS

ANEXOS I

BEBIDAS CARBONATADAS

Las bebidas son alimentos que se distinguen por dos características principales de los demás alimentos:

- Son líquidos
- Son utilizados para calmar la sed (3)

Dentro de este grupo se tiene las bebidas carbonatadas, las que se definen como: "bebida no alcohólica, que contiene dióxido de carbono (anhídrido carbónico) disuelto". (15)

Dentro de estas existen dos clasificaciones:

1. Agua gaseosa sin sabor:

Es una bebida carbonatada que se obtiene por disolución de dióxido de carbono (anhídrido carbónico) en agua potable, que contiene sólidos minerales disueltos (cloruros, bicarbonatos y sulfatos) y es sometida a un proceso tecnológico apropiado. (15)

2. Agua gaseosa con sabor:

Es una bebida carbonatada que se obtiene por disolución de azúcar en agua potable y adición de dióxido de carbono (anhídrido carbónico), acidificantes, colorantes naturales o artificiales, conservadores y sabores naturales o artificiales permitidos, sometida a un proceso tecnológico apropiado. (15)

ANEXOS II
BENZOATO, CAFEINA Y SACARINA EN BEBIDAS CARBONATADAS
METODO DE CROMATOGRAFIA LIQUIDA
PRIMERA ACCION 1979
ACCION FINAL 1984

A. Principio

Sacarina, benzoato, y cafeína son cuantificados simultáneamente en bebidas carbonatadas por Cromatografía Líquida con una fase móvil de ácido acético. Los colorantes artificiales y sorbatos pueden interferir. Por lo que se deben utilizar los blancos de las bebidas que contienen estos compuestos, para asegurarse que no haya ninguna interferencia por estos. En ausencia de blancos de las bebidas, los ensayos analizados con 2 diferentes fases móviles con diferentes cantidades de isopropanol y/o ácido acético por el método de adiciones de estándar. Haciendo los ajustes de la fase móvil (% de ácido y/o % de isopropanol) se pueden resolver los picos que interfieran. (4)

B. Aparato y Reactivos

(a) Cromatógrafo líquido

Waters Associates ALC/GPC con un sistema de capacidad de solvente 6000A y un inyector modelo U6K, o equivalente, detector UV a 254 nm, un registrador de 10 mv (Houston Omni Scubi, o equivalente), y una columna uBondapak C18, 300 a 4 (id) mm, o equivalente, con una velocidad de flujo de 2 mL/min. Sensibilidad del detector: ajustable de 0.02 - 0.05 AUFS. (4)

(b) Fase móvil

Acido acético 20% (v/v) llevado a pH 3.0 con una solución saturada de acetato de sodio. Modificada con isopropanol 0 -2% para obtener una resolución de la línea base y tiempos de retención de estándares de la solución mixta de estándares en aproximadamente 10 minutos. La solución es estable de 2 - 3 días. Antes de usarse primero liberar el gas. (Alternativamente, concentraciones más bajas de ácido acético pueden ser usadas, y, para algunas columnas, puede ser necesario obtener retención y la resolución. Las soluciones de ácido acético de concentraciones más bajas dan tiempos de retención más largos, por ejemplo, ácido acético 5% eluye compuestos de 35 minutos.

(4)

(c) Solución estándar

Preparar individualmente las soluciones de los estándares para compuestos de pureza conocida para dar las siguientes concentraciones: sacarina sódica, 0.50 mg/mL; cafeína, 0.050 mg/mL; y benzoato de sodio, 0.50 mg/mL. Usar estas soluciones para determinar la sensibilidad del detector y los tiempos de retención de los estándares individuales. (4)

(d) Mezcla de soluciones estándar

Preparación de soluciones conteniendo 0.50 mg/mL de sacarina sódica, 0.50 mg/mL de benzoato de sodio y 0.050 mg/mL de cafeína. Usar esta solución para mejorar las condiciones del cromatógrafo líquida para una resolución completa de los 3 compuestos y para cuantificar. (4)

C. Preparación de la muestra

(a) Bebidas carbonatadas

Liberar el gas por agitación o por tratamiento ultrasónico. Si se realiza liberación de, inyecte directamente. (4)

(b) Bebidas conteniendo partículas sólidas

Filtrar a través de un filtro Millipore (0.45 μm), descartando los primeros mililitros del filtrado. Si está presente una cantidad grande de partículas sólidas, centrifugar antes de filtrar. Inyectar la solución filtrada directamente. (4)

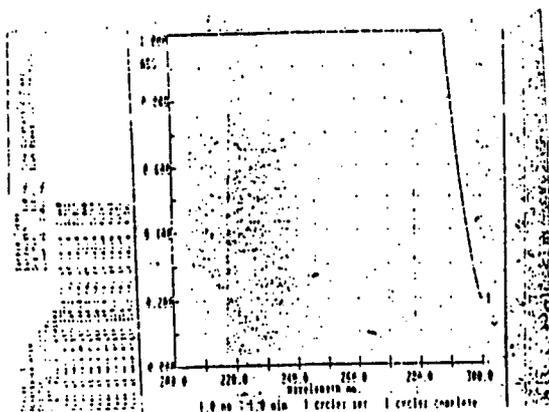
D. Determinación

Inyectar un volumen conocido (aproximadamente 10 μL) de la solución mixta de estándares en duplicado. Las alturas de los picos deberían de estar $< \text{ó} =$ a 2.5%. Inyectar un volumen conocido (aproximadamente 10 μL) de la muestra preparada en duplicado. Medir las alturas de los picos de los componentes del estándar y de la muestra.

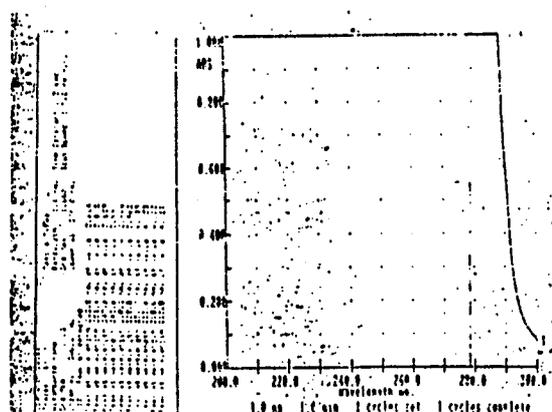
$\% \text{ Compuesto} = C' \times (H/H') \times (V/V') \times 0.1$ donde C' = concentración del estándar en mg/mL ; H y H' = promedio de las alturas de los picos de la muestra y del estándar; V y V' = volumen inyectado en μL de la muestra y del estándar. (4)

ANEXOS III

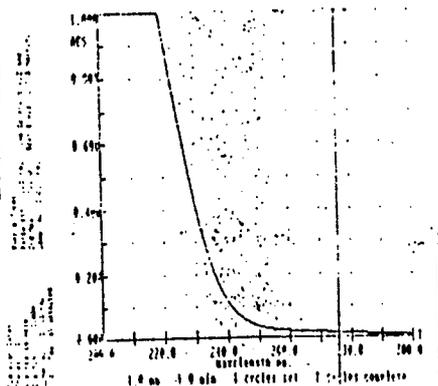
ESPECTROS DE ABSORBANCIA ULTRAVIOLETA



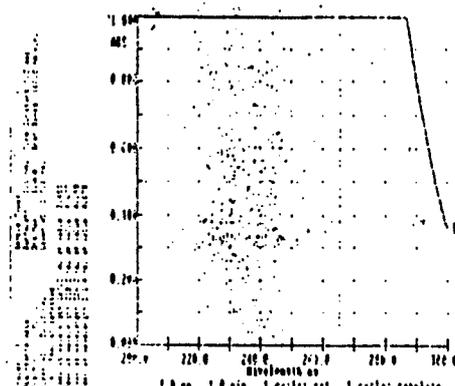
Acido ascórbico



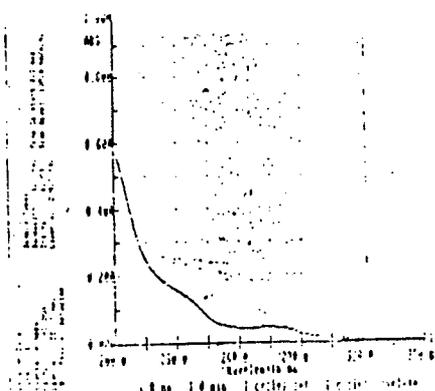
Acido benzoico



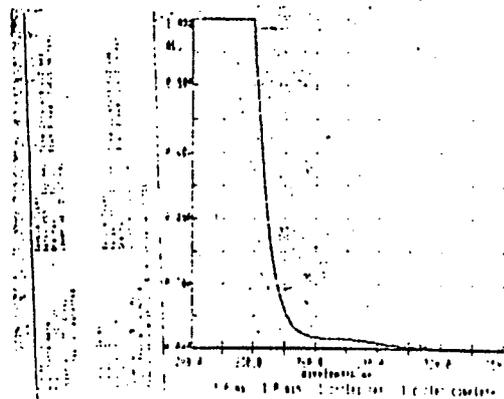
Acido cítrico



Cafeína

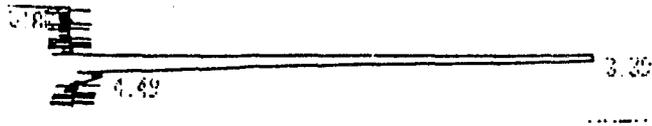


Acido fosfórico

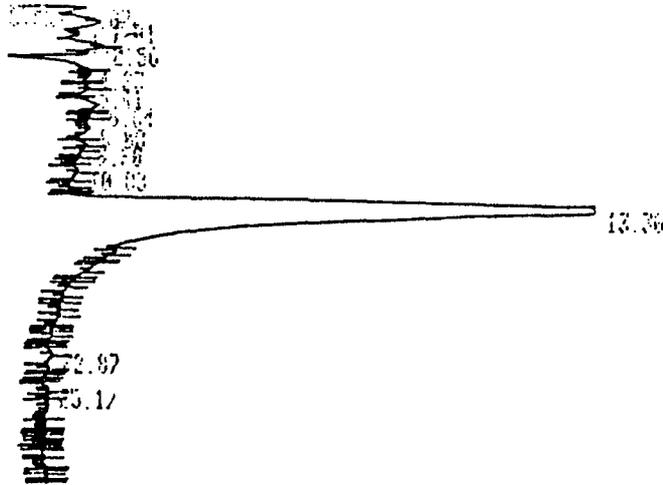


Acido Máfico

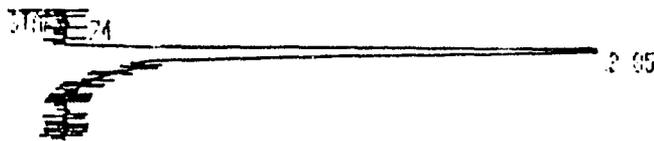
**CROMATOGRAMAS DE PATRONES DE ALGUNOS EDULCORANTES,
SABORIZANTES Y PRESERVANTES OBTENIDOS POR
CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESION UTILIZANDO COLUMNA C18**



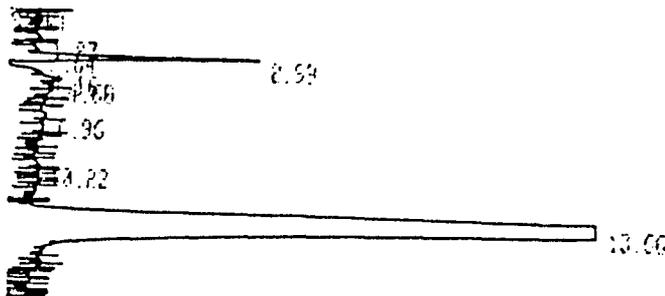
Acido ascórbico
Fase móvil No. 1



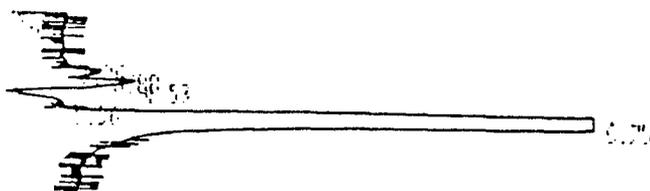
Acido benzoico
Fase móvil No. 2



Acido cítrico
Fase móvil No. 2

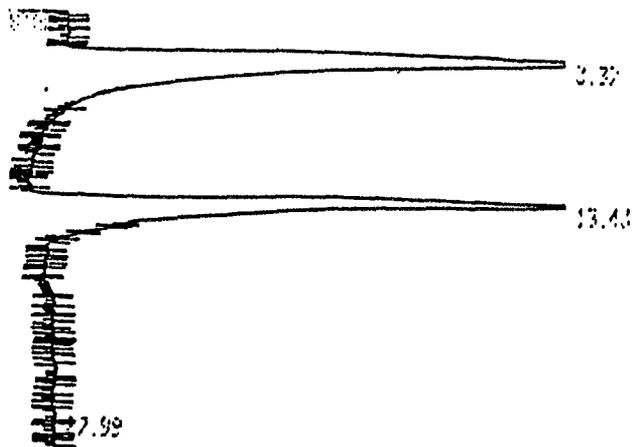


Cafeína
Fase móvil No. 2

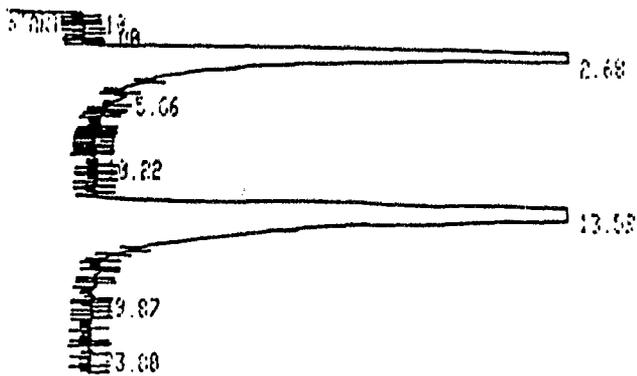


Sacarina sódica
Fase móvil No. 1

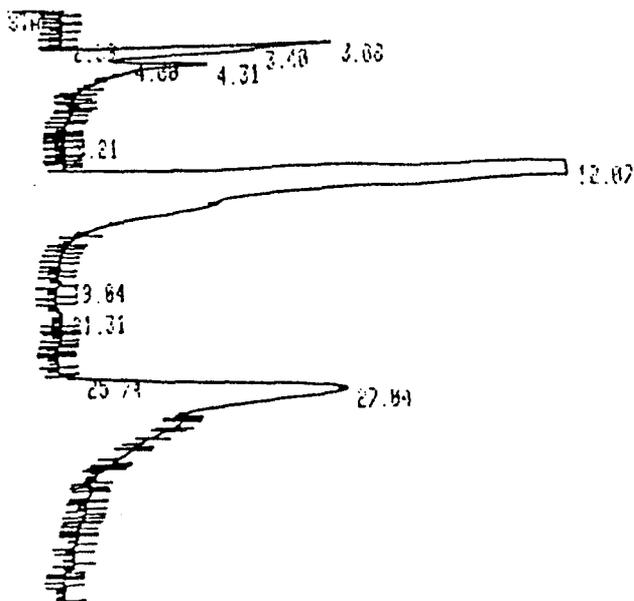
**CROMATOGRAMAS DE MUESTRAS DE BEBIDAS CARBONATADAS
OBTENIDOS POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA
DE ALTA PRESION UTILIZANDO COLUMNA C18**



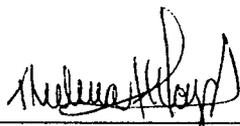
**Muestra sin colorante
Muestra A2
Fase móvil No. 2**



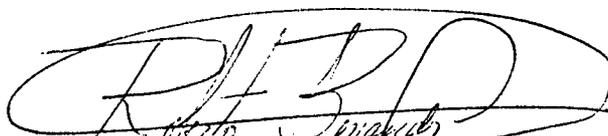
**Muestra de cola
Muestra B1
Fase móvil No. 2**



**Muestra sabor de naranja
Muestra C3
Fase móvil No. 1**



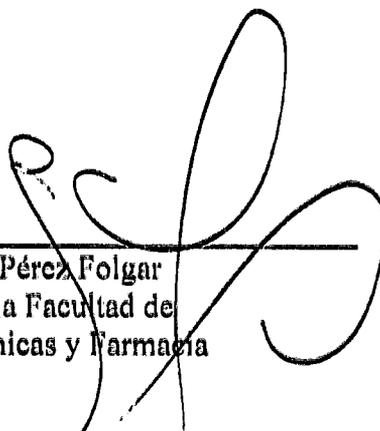
Thelma Haydée López Aguilar
Estudiante de la carrera de
Química Farmacéutica



Lic. Roberto Benavides
Asesor de Tesis



Licda. Beatriz Batres de Jimenez
Directora de la Escuela de
Química Farmacéutica



Lic. Jorge Pérez Folgar
Decano de la Facultad de
Ciencias Químicas y Farmacia