

Determinación de ciclamato mediante electroforesis capilar.

Gustavo Zamarripa Mondragón, Araceli Castañeda Ovando, Ma de Lourdes Pacheco Hernández
Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Centro de Investigaciones Químicas, Laboratorio de Química Analítica. Ciudad Universitaria. Carr. Pachuca-Tulancingo Km. 4.5, Pachuca, Hidalgo. México. C.P. 42076. Tel: +52 (771) 717 2000 ext 6785, Fax: +52 (771) 717 2109. e-mail: ovando_8@yahoo.com.mx

1. Introducción

El uso de edulcorantes artificiales ha sido objeto de múltiples polémicas en lo que respecta a su seguridad a largo plazo, un grupo de éstos son los ciclamatos (sales del ácido ciclohexilsulfámico) [1] cuya estructura se muestra en la Figura 1.

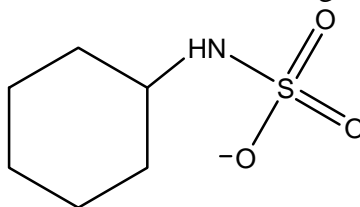


Figura 1. Estructura de los ciclamatos.

Entre las características que presenta este edulcorante se encuentran: PE 30-50 (poder edulcorante); es muy estable, y no le afecta la acidez ni el calentamiento; su utilización fundamental está en las bebidas carbonatadas, en algunos yogures edulcorados y como edulcorante de mesa [2].

Se han publicado trabajos indicando que, en animales de experimentación, dosis altas de esta sustancia actúan como cancerígeno y teratogénico, además de otros posibles efectos nocivos producidos por su ingestión en dosis enormes, como la elevación de la presión sanguínea o la producción de atrofia testicular [3].

Dada la importancia que tiene el ciclamato como aditivo en alimentos, se han propuesto algunas metodologías para su determinación, entre las que destacan la gravimetría[4], la colorimetría[4], HPLC [5] y MEKC [6].

La electroforesis capilar es una técnica analítica que no se ha explotado ampliamente en la determinación del compuesto de interés, a pesar de las ventajas que ofrece, entre las que destacan los tiempos de análisis cortos, su amplia diversidad, su gran sensibilidad, entre otras [7]. Thompson y colaboradores [6] proponen el uso de MEKC (cromatografía micelar electrocinética), una modalidad de la electroforesis capilar, para la determinación de ciclamato mediante detección indirecta a 254 nm.

En el presente trabajo se sugiere el uso de CZE (electroforesis capilar de zona), por detección indirecta, utilizando el detector de arreglo de diodos a 400 nm. Las condiciones bajo las cuales se trabajó fueron: capilar de sílice fundida (75µm i.d., L=41.7 cm L_d= 31.7 cm). Dado que el ciclamato es una especie que no absorbe en la región del UV-vis, se agregó al buffer (citratos 50 mM, pH 9.41) un grupo cromóforo (CrO₄²⁻, 0.5 mM) para lograr dicha detección.

2. Experimentación

2.1 Reactivos y disoluciones.

Todas las disoluciones fueron preparadas disolviendo el respectivo reactivo en agua desionizada mediante un equipo Milli-Q (18 MΩ cm⁻¹). Se preparó una solución patrón de 1000 mg L⁻¹ de ciclamato en agua desionizada. Las distintas soluciones estándar fueron preparadas mediante

dilución de la solución patrón, las cuales fueron aforadas con solución de CrO_4^{2-} ($5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), con el fin de lograr la detección indirecta. Se utilizó como electrolito de corrida (BGE) una solución de citratos (50mM, pH 9.41).

2.2 Equipo

Los estudios se realizaron en un equipo P/ACE 5500 de Beckman Coulter utilizando el detector PDA (Photo Diode Array, con una ventana espectral de 200 a 600 nm), a una longitud de onda de 400 nm.

En todas las separaciones se utilizó un capilar de sílice fundida, con las siguientes características: $L=41.7 \text{ cm}$, $L_d= 31.7 \text{ cm}$, i.d.= $75 \mu\text{m}$, o.d.= $375\mu\text{m}$.

2.3 Metodología

La secuencia de lavado en todos los experimentos al inicio y al final del día fue: NaOH 0.1 M a 60 psi (10 min), H_2O a 60 psi (5 min).

La secuencia de lavado de cada corrida fue: H_2O a 30 psi (1 min), NaOH 0.1 M a 30 psi (2 min), BGE a 30 psi (3 min). La inyección fue de 0.5 psi durante 5 s, polaridad inversa, -20 kV de voltaje y a una temperatura de 20°C .

3. Resultados y discusión

3.1 Determinación de ciclamato mediante el método gravimétrico.

Para tener un dato comparativo con respecto a métodos ya establecidos, se realizaron determinaciones de ciclamato mediante el método gravimétrico aceptado por la AOAC [4] (método 957.10). Dicho método se fundamenta primeramente en la hidrólisis en medio ácido del ciclamato, dando como productos la ciclohexilamina y el ión sulfito ácido (HSO_3^-) para su posterior oxidación del ión HSO_3^- a SO_4^{2-} en presencia de NO_2^- . Finalmente, en presencia de ión Ba^{2+} , precipita el BaSO_4 obteniéndose un factor gravimétrico de 0.8621 para la determinación del edulcorante. En la Tabla 1 se presentan los contenidos medios de ciclamato en cada una de las muestras, de la cual se pueden observar %DER menores al 5%.

Tabla 1. Contenido promedio de ciclamato en muestras de bebidas light comerciales (%DER, n=3). Muestra 1: bebida de cola light, muestra 2: bebida refrescante sin calorías.

Muestra	Contenido promedio de ciclamato (mg L^{-1})	%DER
1	242.66	0.63
2	N. D.	

En la muestra 2 no fue posible determinar el contenido de ciclamato ya que no hubo formación del precipitado de BaSO_4 .

Se realizó el mismo tratamiento de la muestra para una cantidad específica del compuesto (30 mg) para conocer el % de recuperación que se obtiene de este método, obteniéndose un % de recuperación promedio de 86.33% para muestras por triplicado con un %DER de 1.02 %.

3.2 Determinación de ciclamato mediante electroforesis capilar.

Como se mencionó anteriormente, dicha determinación se realizó de forma indirecta, utilizando como cromóforo una solución de CrO_4^{2-} $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, obteniéndose electroferogramas similares como el mostrado en la Figura 2. En tal electroferograma se puede observar un pico en 4.02 min correspondiente al anión CrO_4^{2-} , dadas las condiciones de separación (polaridad

inversa), dicho pico se ve afectado por la adición de ciclamato (especie no absorbente), por lo que se tiene una disminución en su intensidad.

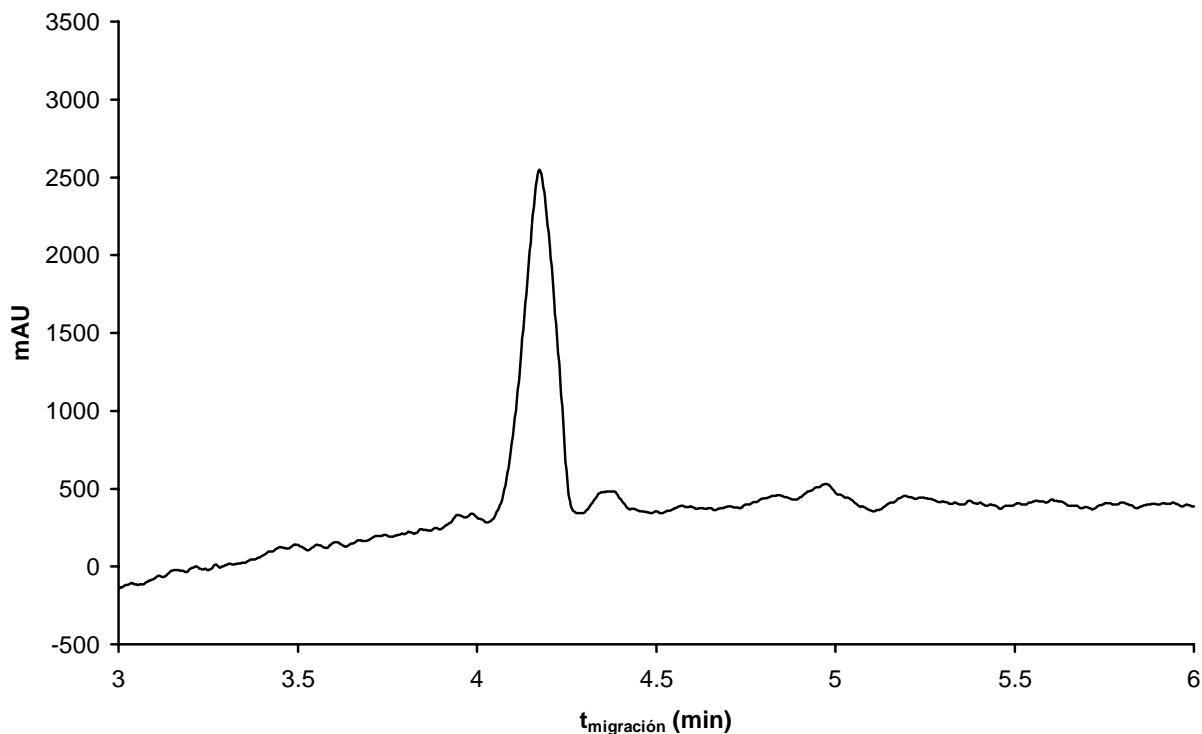


Figura 2. Electroferograma correspondiente al estándar de 10 ppm de coclamato ($t_{migración}= 4.02$ min).

De acuerdo a estos resultados se realizó asimismo una correlación de la altura de pico (H) con la concentración de ciclamato de los estándares, cuya curva de calibración se muestra en la Figura 3.

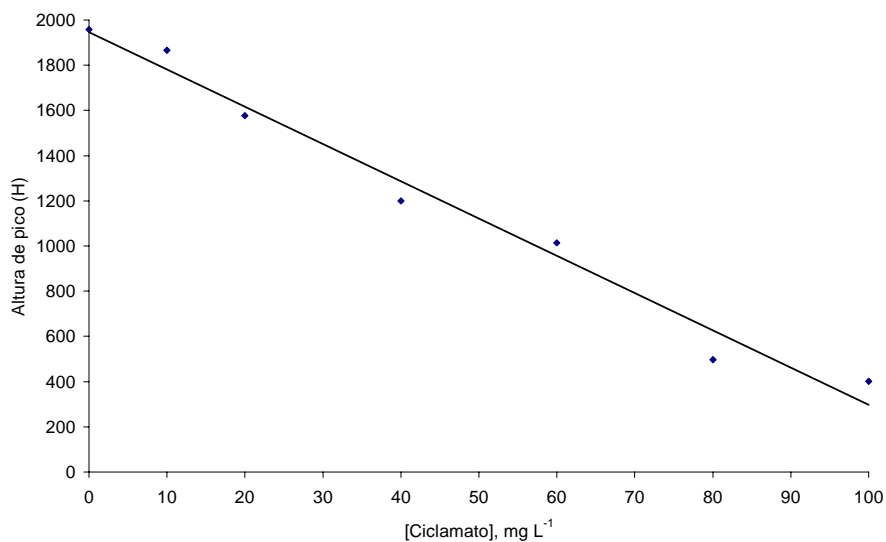


Figura 3. Curva de calibración para la determinación de ciclamato mediante EC.

Los datos para la curva de calibración se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Parámetros de regresión de las líneas de calibrado, altura de pico vs [ciclamato], mg L⁻¹.

Número de estándares, n	7
pendiente (m±s _m)	-16.50±1.064
Ordenada al origen (b±s _b)	1946.99±59.772
coeficiente de correlación (r ²)	0.9755
Límite máximo de cuantificación, mgL ⁻¹	111.37

Para probar una correlación significativa entre la concentración de ciclamato y la altura de pico, se planteó como H₀ que no existe correlación entre dichos resultados se llevó a cabo el cálculo del estadístico t [8], el valor de t_{calculado} se comparó con el valor de t_{crítico} para 5 grados de libertad y un nivel de significación del 95 % (t_{crítico}= 2.57). El valor de t_{calculado} (14.11) es mayor que el de t_{crítico}, por lo que se rechaza la hipótesis nula, concluyendo así que existe una correlación significativa.

Se inyectó la muestra 2, de la cual no fue posible determinar el contenido de ciclamato por el método gravimétrico, obteniéndose el electroferograma mostrado en la Figura 4.

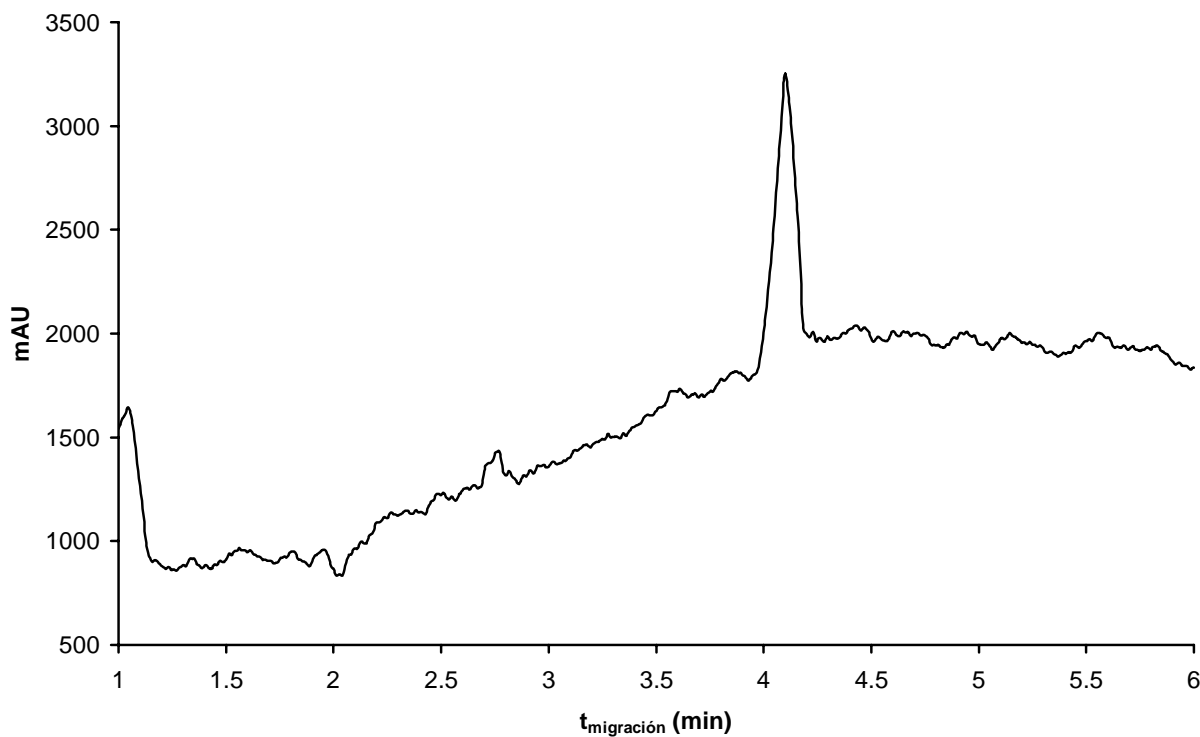


Figura 4. Electroferograma correspondiente a la muestra de bebida refrescante sin calorías (t_{migración}= 4.02 min).

Tomando la altura del pico en t_{migración}=4.02 min del electroferograma de la muestra y calculando la concentración de ciclamato por el método propuesto se obtiene un contenido de edulcorante de 126.79 mg L⁻¹ (s_{x0}=0.0088 mg L⁻¹). El intervalo de confianza al nivel del 95 % (t₅=2.57) es de 126.79±0.0086 mg L⁻¹.

Conclusiones

De los resultados obtenidos para la muestra se puede concluir que con el método propuesto es posible determinar concentraciones menores de ciclamato que no son posibles por el método gravimétrico.

Con el método propuesto se obtiene un $r^2 = 0.9755$, por lo que una de las perspectivas del presente trabajo es mejorar dicho método, con la utilización de otros grupos cromóforos.

Una de las ventajas del método que se propone es que se acorta el tiempo de análisis, comparado con el método gravimétrico (1 día) y el método colorimétrico (10 h). En lo que respecta al método MEKC, la ventaja es que no se requiere del uso de tensoactivos, facilitando así el análisis de las muestras.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Dra. María Elena Páez Hernández las facilidades prestadas para la realización del trabajo. Araceli Castañeda agradece al CONACyT por la beca otorgada para realizar estudios de doctorado.

Referencias

- [1]European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General, Scientific Committee on Food. Revised opinion on cyclamic acid and its sodium and calcium salts. Brussel – Belgium, (2000).
- [2]Hhttp://www.sweeteners.org/pdf/fs-Cyclamate_English.pdfH. Enero, 2006.
- [3]Corti, A. Low-Calorie Sweeteners: Present and Future. Vol. 85. Ed Karger-Publisher (1999).
- [4]AOAC Official Methods of Analysis. 1168-1169 (1990).
- [5]Zhu, Y.; Guo, Y.; Ye, M.; James, F. S. J. Chrom. A. 1085, 143-146, (2005).
- [6]Thompson, C.O.; Trenerry, V. C.; Kemmerly, B. J. Chrom. A. 704, 203-210, (1995).
- [7]Westermeier, R. Electrophoresis in Practice. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Fourth Edition. Weinheim (2005).
- [8]Miller, J. N., Miller, J.C. Estadística y quimiometría para química analítica. Ed. Prentice Hall España. (2002).