



Universidad de Jaén  
*Centro de Estudios de Postgrado*

# DETERMINACIÓN DE COLORANTES ALIMENTARIOS ARTIFICIALES EN ALIMENTOS

**Alumno/a:      García Martínez, Julio**

Tutor/a:    Prof. D. Juan Francisco García Reyes

Dpto:        Química Física y Analítica

**Julio, 2018**



**DETERMINACIÓN DE COLORANTES ALIMENTARIOS ARTIFICIALES EN  
ALIMENTOS**

**Por**

**Julio García Martínez**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA Y ANALÍTICA  
UNIVERSIDAD DE JAÉN**

Trabajo Fin de Máster presentado para aspirar al Máster en Avances y  
Seguridad de los Alimentos

El Tutor del Trabajo Fin de Máster

**GARCIA  
REYES JUAN  
FRANCISCO -  
26235895W**

Firmado digitalmente por GARCIA  
REYES JUAN FRANCISCO -  
26235895W  
Nombre de reconocimiento (DN):  
c=ES, serialNumber=26235895W,  
sn=GARCIA REYES,  
givenName=JUAN FRANCISCO,  
cn=GARCIA REYES JUAN  
FRANCISCO - 26235895W  
Fecha: 2018.06.29 08:18:49 +01'00'

Fdo. Juan Francisco García Reyes

**Profesor Titular del Dpto. de Química Física y  
Analítica de la Universidad de Jaén**



Fdo. Julio García Martínez

Jaén, Julio de 2018



# ÍNDICE

	<i>Página</i>
1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
2.1. Colorantes alimentarios artificiales.....	2
2.2. Legislación.....	4
2.3. Controversia de los colorantes alimentarios artificiales.....	6
2.3.1. Alteraciones en niños provocadas por colorantes alimentarios artificiales.....	7
2.3.2. Prohibición de colorantes alimentarios artificiales.....	7
2.4. Métodos de determinación.....	8
2.4.1. Colorantes artificiales estudiados.....	10
2.5. Cromatografía líquida acoplada a Espectrometría de masas (LC-MS).....	17
2.5.1. Cromatografía de líquidos.....	17
2.5.2. Espectrometría de masas.....	18
3. OBJETIVOS.....	22
4. EXPERIMENTAL.....	22
4.1. Materiales y reactivos.....	22
4.2. Tratamiento de muestra.....	23
4.3. Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo (LC-TOFMS).....	23
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
5.1. Optimización del método.....	26
5.2. Parámetros analíticos.....	32
5.3. Aplicación a muestras reales.....	34
6. CONCLUSIONES.....	41
7. BIBLIOGRAFÍA.....	43

# ÍNDICE DE FIGURAS

	<i>Página</i>
Figura 1. Esquema de la clasificación de colorantes alimentarios.....	3
Figura 2. Estructuras, fórmulas y masas moleculares de los colorantes estudiados en este trabajo.....	12
Figura 3. Estructuras, fórmulas y masas moleculares de los Sudán (I-IV) estudiados en este trabajo.....	13
Figura 4. Esquema de un cromatógrafo de líquidos.....	18
Figura 5. Componentes de un espectrómetro de masas.....	18
Figura 6. Esquema del proceso de formación de electrospray.....	19
Figura 7. Esquema del proceso de analizador de tiempo de vuelo (TOF).....	21
Figura 8. Gradiente de elución utilizado en la separación cromatográfica.....	24
Figura 9. Equipo cromatográfico con espectrómetro de masas con analizador TOF acoplado empleado en este trabajo.....	25
Figura 10. Cromatograma EIC de Carmoisina, comparando $[M-H]^-$ y $[M-2H]^{2-}$ ...	27
Figura 11. EICs de Carmoisina (1 mg/L), obtenidos empleando unas fases móviles con 0,1% de ácido fórmico (trazo rojo) y con 10 mM de formiato amónico (trazo morado). Otros detalles experimentales en el apartado 4.3. ....	28
Figura 12. TIC (A) y EICs (B) utilizando ionización positiva (0-5 min; 10-25 min) y negativa (5-10 min), de todos los colorantes artificiales estudiados. Identificación de los picos como sigue a continuación. 1: <i>Tartracina</i> ; 2: <i>Amarillo de quinoleína disulfónico</i> ; 3: <i>Amarillo anaranjado</i> ; 4: <i>Ácido carmínico</i> ; 5: <i>Rojo Allura AC</i> ; 6: <i>Carmoisina</i> ; 7: <i>Azul Brillante FCF</i> ; 8: <i>Amarillo de quinoleína monosulfónico</i> ; 9: <i>Sudán I</i> ; 10: <i>Sudán II</i> ; 11: <i>Sudán III</i> ; 12: <i>Sudán IV</i> .....	31
Figura 13. Diagrama para la identificación de Carmoisina en la muestra 1.....	36
Figura 14. Cromatogramas EIC correspondientes a Carmoisina (A) con $m/z$ 228,0048, Azul brillante FCF (B) con $m/z$ 373,0719 y Tartracina (C) con $m/z$ 469,0118.....	37
Figura 15. Espectros de masas extraídos correspondientes a Carmoisina, en la muestra 1 (A) y su patrón a 1 mg/L (B), Azul Brillante FCF, en la muestra 2 (C) y su patrón a 1 mg/L (D), y Tartracina, en la muestra 3 (E) y su patrón a 1 mg/L (F).....	38

## ÍNDICE DE TABLAS

	<i>Página</i>
Tabla 1. Información adicional para etiquetado en algunos colorantes alimentarios, causantes de cambios en la actividad de niños, según Reglamento (CE) 1333/2008.....	5
Tabla 2. Colorantes certificados permitidos para su uso alimentarios.....	6
Tabla 3. Métodos analíticos usados en la determinación de colorantes artificiales alimentarios.....	14
Tabla 4. Condiciones de la fuente de ionización.....	25
Tabla 5. Iones producidos, según modo de ionización utilizado, de colorantes alimentarios artificiales.....	26
Tabla 6. Colorantes artificiales determinados y sus tiempos de retención.....	29
Tabla 7. Parámetros analíticos estudiados para la validación del método.....	33
Tabla 8. Datos experimentales obtenidos referentes a la identificación de colorantes artificiales en muestras reales.....	34
Tabla 9. Determinación de colorantes artificiales en las muestras.....	39



## 1. RESUMEN

En este trabajo, se ha desarrollado un método para la determinación simultánea de colorantes alimentarios artificiales en alimentos. Se estudiaron aquellos que presentan controversia o que están prohibidos para uso alimentario, como son Tartracina, Amarillo de quinoleína, Amarillo anaranjado, Carmoisina, Rojo Allura AC, Ácido carmínico, Azul Brillante FCF y Sudán (I-IV). Para ello, se utilizó un tratamiento de muestra basado en extracción en fase sólida seguido de cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo equipado con una interfase de electrospray, tanto en modo de ionización positivo como negativo. La metodología propuesta permite la determinación de iones positivos y negativos en un único análisis de 25 minutos. La identificación de los compuestos se hizo con medidas de masa exacta. El uso de curvas de calibración externas condujo a límites de detección y cuantificación que variaron desde 0,0005 a 0,3 mg/L y 0,0017 a 1 mg/L, respectivamente. El método propuesto se aplicó a muestras reales, cuatro golosinas líquidas, que contenían algunos de los colorantes alimentarios estudiados en este trabajo: Tartracina, Carmoisina, Rojo Allura AC y Azul Brillante FCF.

## ABSTRACT

In this work, a method for the simultaneous determination of synthetic food dyes in food has been developed. The study was focused on controversial dyes which are forbidden for selected food uses. Among them, Tartrazine, Quinoline Yellow, Sunset Yellow FCF, Carmoisine, Allura Red AC, Carminic Acid, Brilliant Blue FCF and Sudan (I-IV) were studied. A sample treatment based on solid phase extraction followed by liquid chromatography coupled to electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry was used in both positive and negative ionization modes. The proposed methodology allows the simultaneous determination of all the tested dyes in a single run of 25 min. Accurate mass measurements were used for compound identification. External calibration curves led to limits of detection and quantification ranged between 0,0005 to 0,3 mg/L and 0,0017 to 1 mg/L, respectively. The proposed method was applied to real samples, four liquid candies, where Tartrazine, Carmoisine, Allura Red AC and Brilliant Blue FCF were detected.

## 2. INTRODUCCIÓN

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación (FAO), se define *seguridad alimentaria* como “*el estado en que todas las personas tienen acceso físico, social y económico permanente a alimentos seguros, nutritivos y en cantidad suficiente para satisfacer sus requerimientos nutricionales y preferencias alimentarias, y así llevar una vida activa y saludable*”. Dentro de este concepto tan amplio se encuentran diversas ramas de conocimiento, las cuales trabajan para garantizar el cumplimiento de la idea de seguridad alimentaria. Una de estas áreas de estudio es la Química Analítica, encargada de analizar los alimentos con el fin de comprobar que sean aptos para el consumo y cumplir con las características esperadas. Dichos análisis abarcan desde la determinación de la composición y comprobación del etiquetado del producto, hasta la detección de fraudes, como pueden ser adulteraciones, contaminaciones, falsificaciones, etc. A continuación, se expondrán en mayor profundidad el objeto de estudio de este trabajo, así como la metodología e instrumentación utilizada para su determinación.

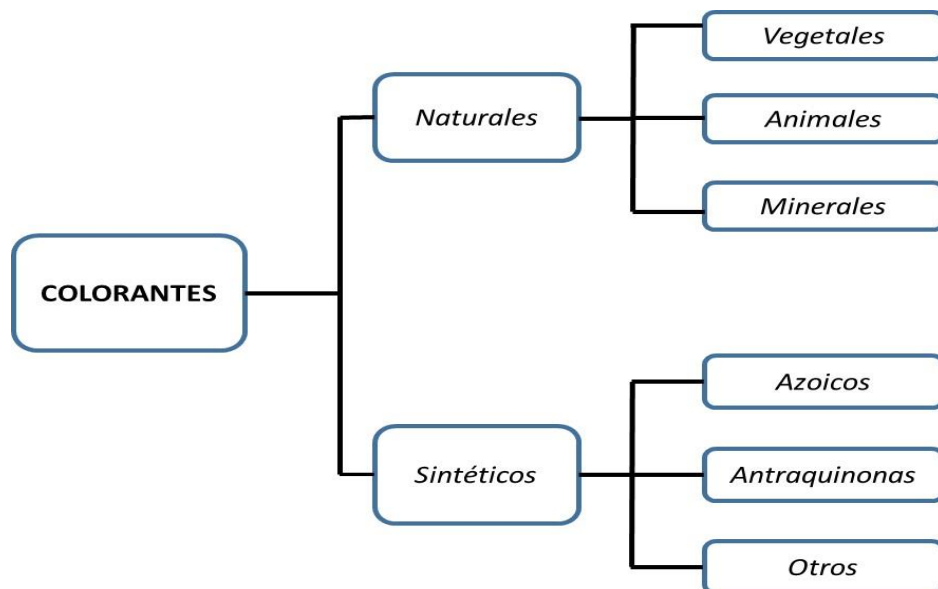
### 2.1. Colorantes alimentarios artificiales

El color es una de las principales características que definen a un alimento; tanto es así que la industria alimentaria utiliza colorantes para recuperar el color perdido durante los procesos de elaboración o incluso para dar un color más atractivo a algunos productos (Primo Yúfera, E., 1998). Estos colorantes, que se encuentran dentro del gran grupo de aditivos alimentarios, se definen como “*sustancias que dan color a un alimento o le devuelven su color original; [...] normalmente no se consumen como alimentos en sí mismas ni se emplean como ingredientes característicos de los alimentos.*” (Reglamento 1333/2008 CE). Estos aditivos se pueden clasificar en dos tipos según su origen: naturales y sintéticos (**Figura 1**) (García-Garibay, M., 1993).

- Los colorantes naturales se extraen por procesos exclusivamente físicos con una etapa posterior de purificación. El color puede variar tras estos procesos y dejar restos de los disolventes utilizados. Se cuenta con pocos colorantes

naturales y sus restricciones legales son bajas. Destacan en este grupo los carotenoides, las clorofilas y las antocianinas.

- Los colorantes sintéticos o artificiales se obtienen mediante síntesis orgánica o bien, por modificación de algunos compuestos de origen natural. Tienen algunas ventajas en comparación con los colorantes naturales: bajo coste, ausencia de aromas y/o sabores, gran firmeza del color, gran cantidad de producción, etc. Este tipo de colorantes están sometidos a unas altas exigencias legales para su autorización, valorándose su pureza y requiriendo un certificado de aptitud para uso alimentario. En este grupo destacan los colorantes azoicos (con un grupo  $-N=N-$  en su estructura) y las antraquinonas (con un grupo  $R-COOH$  en su estructura). La mayoría de colorantes alimentarios, en torno a un 70%, son de tipo azoico, y pueden dar colores amarillos, rojos, azules y negros. Según las necesidades del mercado, los colorantes azoicos amarillos y rojos son los más utilizados.



**Figura 1.** Esquema de la clasificación de colorantes alimentarios. (García-Garibay, M., 1993)

## 2.2. Legislación

A medida que ha aumentado el uso de aditivos alimentarios, y más concretamente de colorantes, se han ido desarrollando leyes que deben regular todo lo relacionado con la utilización de este tipo de sustancias. En dichas legislaciones se consideran tanto parámetros como cantidades diarias recomendadas o si su consumo supone un riesgo para la salud. En este apartado se explicarán las legislaciones vigentes de la Unión Europea y los Estados Unidos.

- Legislación europea:

Antes de 2008, la Unión Europea tenía una normativa referente a aditivos alimentarios bastante compleja. Esto cambió cuando se creó el Reglamento (CE) 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo relativo a aditivos alimentarios. Cada sustancia de este grupo se identificará con un código alfanumérico que se compondrá de la letra E y tres o cuatro dígitos, *p. ej.* E 102. Este Reglamento crea una lista de colorantes permitidos y aquellos con alguna restricción; en total hay 40 colorantes alimentarios distintos, de los cuales, 15 son artificiales.

El artículo 3 de dicho Reglamento es utilizado para las distintas definiciones propias de la materia de estudio. En el Capítulo II se describe el listado de aditivos alimentarios, el cual se puede consultar en el Anexo II del mismo Reglamento; concretamente, en el artículo 8, se especifican las condiciones para que una sustancia adquiera el nivel de colorante:

- *“Devolver la apariencia original a un alimento cuyo color se haya visto afectado, [...] pudiendo haber quedado mermado su atractivo visual”.*
- *“Aumentar el atractivo visual de los alimentos”.*
- *“Dar color a un alimento que, de otro modo, sea incoloro”.*

El artículo 24 del Reglamento hace referencia a los requisitos de etiquetado de alimentos que contienen colorantes alimentarios, indicando la información adicional que debe aparecer en la etiqueta (**Tabla 1**), si un producto contiene alguno de los colorantes especificados, cuyos efectos pueden ser negativos en el comportamiento de los niños.

**Tabla 1.** Información adicional para etiquetado en algunos colorantes alimentarios, causantes de cambios en la actividad de niños, según Reglamento (CE) 1333/2008.

Alimentos que contienen uno o varios de los siguientes colorantes alimentarios	Información
Amarillo anaranjado (E 110) Amarillo de quinoleína (E 104) Carmoisina (E 122) Rojo Allura AC (E 129) Tartracina (E 102) Rojo cochinita A (E 124)	«Nombre o número E del/de los colorante(s): Puede tener efectos negativos sobre la actividad y la atención de los niños.»

Cada cierto tiempo, la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (*European Food Security Agency, EFSA*) hace reevaluaciones de los aditivos alimentarios permitidos, estudiando parámetros como su toxicidad o la cantidad diaria recomendada para poder determinar que siguen siendo seguros.

- Legislación estadounidense:

La Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (*US Food and Drug Administration, FDA*) regula los colorantes alimentarios siguiendo la Ley Federal de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos (*Federal Food, Drug, Cosmetic Act, FFDC*) de 1938. Los colorantes deben ser pre-aprobados por la FDA y ser incluidos en el Código de Regulaciones Federales antes de que puedan ser usados. Los parámetros regulados son la identidad, las especificaciones químicas, sus usos, generales o específicos, y las posibles restricciones asociadas. Algunos lotes de colorantes deben estar certificados, siendo la FDA la encargada de comprobar que se cumplen las especificaciones. Esta administración no hace distinciones entre colorante natural y artificial, ya que considera que cualquier colorante se añade al producto de forma artificial. Cada sustancia de este grupo se identificará con un código alfanumérico que se compondrá de las letras FD&C + color + número, *p. ej.* FD&C Red No. 3.

Se establecen varias categorías, aunque las principales son: colorantes alimentarios exentos de certificación y colorantes alimentarios sujetos a certificación. El primer grupo incluye aditivos procedentes de plantas, animales y minerales (*p. ej.*  $\beta$ -caroteno), aunque no necesiten certificación, deben cumplir las especificaciones requeridas en sus respectivas regulaciones. En la otra categoría se encuentran colorantes artificiales producidos a partir de síntesis orgánica, siendo en esta

categoría, siete los colorantes permitidos para su uso general en alimentos y otros dos con restricciones (**Tabla 2**). (Scotter, M.J. (ed.), 2015)

**Tabla 2.** Colorantes certificados permitidos para su uso alimentario. (Scotter, M.J. (ed.), 2015)

Nombre de los colorantes		Usos y restricciones
Con certificación	Sin certificación	
FD&C Blue No. 1	Azul Brillante FCF	Uso general
FD&C Blue No. 2	Índigotina	Uso general
FD&C Green No. 3	Verde rápido FCF	Uso general
FD&C Red No. 3	Eritrosina	Uso general
FD&C Red No. 40	Rojo Allura AC	Uso general
FD&C Yellow No. 5	Tartracina	Uso general
FD&C Yellow No. 6	Amarillo Anaranjado	Uso general
Orange B	-	Superficies de salchichas, con un de máximo de 150 ppm
Citrus Red No. 2	-	Pieles de naranjas, con un máximo de 2 ppm

Se permiten mezclas de dos o más colorantes, o bien diluyendo un colorante con disolventes de uso alimentario reconocidos como seguros (*Generally Recognized As Safe, GRAS*).

La certificación de los lotes de aditivos alimentarios se requiere cuando la composición de los colorantes debe ser controlada en el ámbito sanitario. La solicitud de certificación debe ir acompañada de ciertos aspectos técnicos: nombre del colorante y del fabricante, peso del lote, condiciones de almacenamiento y usos para los que se solicita la certificación. El personal de la FDA evaluará los distintos parámetros para comprobar que cumplen la legislación.

### 2.3. Controversia de los colorantes alimentarios artificiales

El uso de colorantes alimentarios artificiales ha suscitado cierta controversia, desde el punto de vista de alteraciones que pueden surgir a raíz de su consumo, principalmente en niños. Por otra parte, para determinados colorantes se ha demostrado su potencial riesgo para la salud (IARC), dando como resultado su prohibición por la Unión Europea.

### 2.3.1. Alteraciones en niños provocadas por colorantes alimentarios artificiales

En el año 2007, la Agencia de Seguridad Alimentaria de Reino Unido publicó un estudio (McCann *et al.*, 2007) en el que se relacionaba la ingesta de algunos colorantes alimentarios con cambios en el comportamiento de niños. El estudio explicaba que, por sí solos, los seis colorantes (Amarillo anaranjado, Amarillo de quinoleína, Carmoisina, Rojo Allura AC, Tartracina y Rojo cochinilla A) no producían efectos adversos, sino que estos aparecían al existir interacción con otros aditivos alimentarios. Concretamente se habla de la mezcla de alguno de estos colorantes con el conservante *benzoato de sodio* (E 211). La EFSA concluyó que este estudio sólo aportaba evidencias limitadas del efecto de la mezcla de aditivos sobre el comportamiento de los niños, no siendo suficientemente fundadas como para variar la cantidad recomendada. Sin embargo, la Comisión Europea decidió incluir en el etiquetado de los productos que contuvieran dichos colorantes alimentarios una mención sobre sus riesgos, como se ha podido ver anteriormente en la **Tabla 1**. La aparición de este artículo propició un cambio en el uso de colorantes artificiales por aquellos obtenidos de fuentes naturales.

Como se ha visto en el apartado 2.2, la legislación estadounidense tiene en su lista de colorantes, algunos de los que aparecen en el estudio de McCann como son la Tartracina, el Amarillo anaranjado y el Rojo Allura AC, manteniéndolos para uso general sin hacer ninguna distinción o mención especial hacia los efectos adversos que podrían provocar.

### 2.3.2. Prohibición de colorantes alimentarios artificiales

Muchos colorantes han sido prohibidos a nivel internacional al ser clasificados como sustancias carcinogénicas por el Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (*International Agency for Research on Cancer, IARC*). Los colorantes Sudán (I-IV) se clasificaron dentro de la lista realizada por el IARC en base a su capacidad de inducir cáncer en humanos; dichos compuestos se ubicaron en el grupo 3 de la lista, que alberga sustancias cuya carcinogenia no está demostrada en humanos pero sí, con limitaciones, en animales (IARC). El Sudán I se prohibió en 1995 en la Unión

Europea, y a partir de 2004, se prohibieron el resto de colorantes de este tipo para su uso alimentario. (Calbiani *et al.*, 2004).

En el verano de 2003 se produjo una alerta sanitaria relacionada con el Sudán I, presente en cayena y pimentón en polvo procedentes de India, derivando en la retirada del mercado de dichas especias. En 2005, se volvió a dar otra alerta en Reino Unido relacionada con el Sudán I, que se encontró en Chile en polvo procedente de India.

A partir de 2003, todos los condimentos alimentarios en polvo que entran en la Unión Europea deben llevar un certificado que demuestre que están libres de Sudán I. En 2004, la Comisión Europea empezó a detener las importaciones de productos alimentarios que llevaran cualquier tipo de Sudán (I-IV). Si se detectaran estos colorantes en cualquier producto alimenticio, los Estados miembros están en la obligación de crear una alerta, poniéndolo en conocimiento de la EFSA, para la retirada y destrucción de dichos productos a la mayor brevedad. (Scotter, M.J. (ed.), 2015)

#### **2.4. Métodos de determinación de colorantes artificiales**

La matriz de los alimentos se caracteriza por su gran complejidad, dado el alto número de componentes distintos en ella; por lo que la determinación de cualquier compuesto en alimentos tendrá un grado añadido de dificultad. Para ello, deben aplicarse tratamientos de muestra y técnicas adecuadas para la correcta identificación de los analitos, concretamente en este trabajo, colorantes alimentarios artificiales.

- Tratamiento de muestra:

En muestras líquidas simples, bastaría con diluir y filtrar la muestra, seguido de su inyección en el equipo. En bebidas carbonatadas, se deben desgasificar primero, seguidas de centrifugación y filtración para eliminar posibles partículas en suspensión. Para el tratamiento de muestras sólidas se deberá reducir el tamaño de partícula para realizar una extracción con disolventes específicos. El principal problema presentado en muestras, tanto líquidas como sólidas, es la afinidad y/o enlazamiento que puedan presentar los colorantes a diversos constituyentes de los alimentos, como por ejemplo proteínas e hidratos de carbono.

Para la purificación y concentración de los colorantes alimentarios se utilizan distintos métodos como cromatografía líquida preparativa, empleando un adsorbente adecuado para producir una retención selectiva de los colorantes, y la eliminación de otros aditivos presentes en la muestra, como por ejemplo azúcares. Otro método ampliamente utilizado es la extracción en fase sólida (*Solid Phase Extraction, SPE*), que permite separar y concentrar los analitos. Básicamente el proceso en SPE consiste en la retención del analito en un cartucho, con la posterior elución de éste utilizando un disolvente apropiado y eliminando sustancias no deseadas. Últimamente se han desarrollado nuevas técnicas basándose en la utilización de líquidos iónicos, obteniendo una mayor sensibilidad con una menor cantidad de muestra y disolventes. (Nollet, L. (ed.), 2015)

- Técnicas de separación:

Los distintos colorantes a estudiar deben separarse para lograr una correcta identificación y cuantificación. Suelen emplearse técnicas cromatográficas (cromatografía en capa fina o cromatografía líquida) y electroforesis. La cromatografía está basada en la separación de los distintos componentes de una mezcla; se produce la elución de cada uno de estos compuestos, con un tiempo de retención característico, tras el uso de un disolvente. Las separaciones de colorantes mediante electroforesis, tanto en gel como capilar, tienen lugar gracias a la presencia de grupos funcionales con carga permanente que les permite migrar en el seno de una disolución al aplicar un campo eléctrico. (Nollet, L. (ed.), 2015)

- Detección de colorantes alimentarios:

Para la identificación y cuantificación de los colorantes alimentarios tras su separación, la técnica más utilizada es la espectrofotometría UV-Vis ya que cuenta con una probada confianza. Esta técnica se basa en la selección de una longitud de onda característica para cada analito que proporcione un máximo de absorbancia, para su detección. La cuantificación se realiza a partir de una curva de calibrado preparada a distintos niveles de concentración conocidos. Otra de las técnicas con mayor acogida para la detección de este tipo de sustancias es la espectrometría de masas. (Nollet, L. (ed.), 2015)

#### 2.4.1. Colorantes artificiales estudiados

Un total de 11 colorantes alimentarios han sido estudiados en el presente trabajo, incluyendo colorantes que presentan efectos negativos sobre el comportamiento de niños y otros que están prohibidos. A continuación, se describen los diferentes compuestos estudiados:

- Tartracina:

Es un colorante azoico amarillo con fórmula molecular  $C_{16}H_9N_4Na_3O_9S_2$  (**Figura 2**) y un peso molecular de 534,36 g/mol. Este compuesto es soluble en agua y poco soluble en etanol. En Europa, tiene asignado el código E 102 para su comercialización. El rango de concentraciones máximas permitidas en varios alimentos es desde 50 hasta 500 mg/kg. Para bebidas no alcohólicas, el límite máximo permitido es 100 mg/L. La cantidad diaria recomendada por la EFSA es de 7,5 mg/kg de peso corporal. (Reevaluación EFSA, 2009)

- Amarillo de quinoleína:

Es un colorante de quinoftalona que se comercializa bajo una mezcla de derivados de ácido mono, di y trisulfónico, siendo el más abundante de estos tres el derivado disulfónico (80% aproximadamente). La composición de la mezcla no puede ser inferior a 80% para el derivado disulfónico, 15% para el monosulfónico y 7% para el trisulfónico. Fórmula molecular  $C_{18}H_9NO_8S_2Na_2$  (**Figura 2**) y peso molecular de 477,38 g/mol. Es soluble en agua, siendo insoluble en etanol y aceites vegetales. Su código europeo de comercialización es E 104. El rango de concentraciones máximas permitidas en varios alimentos es desde 50 hasta 500 mg/kg. Para bebidas no alcohólicas, el límite máximo permitido es 100 mg/L. La cantidad diaria recomendada por la EFSA es de 0,5 mg/kg de peso corporal. (Reevaluación EFSA, 2009)

- Amarillo anaranjado:

Es un colorante azoico de fórmula molecular  $C_{16}H_{10}N_2Na_2O_7S_2$  (**Figura 2**) y peso molecular 452,37 g/mol. Es soluble en agua y poco soluble en etanol. En Europa tiene asignado el código E 110. El rango de concentraciones máximas permitidas en varios alimentos va desde 50 hasta 500 mg/kg. Para bebidas no alcohólicas, el límite máximo permitido es 50 mg/L. La cantidad diaria recomendada por la EFSA es de 1 mg/kg de peso corporal. Existen estudios que demuestran la degradación de este colorante por radiación UV en ambientes oxidantes y reductores. (Reevaluación EFSA, 2009)

- Carmoisina:

Es un colorante azoico rojo con fórmula molecular  $C_{20}H_{12}N_2Na_2O_7S_2$  (**Figura 2**) y peso molecular 502,44 g/mol. Es soluble en agua y poco soluble en etanol. En Europa tiene asignado el código E 122. El rango de concentraciones máximas permitidas en varios alimentos se establece desde 50 hasta 500 mg/kg. Para bebidas no alcohólicas, el límite máximo permitido es 50 mg/L. La cantidad diaria recomendada por la EFSA es de hasta 4 mg/kg de peso corporal. (Reevaluación EFSA, 2009)

- Rojo Allura AC:

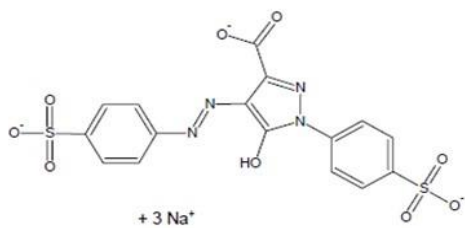
Es un colorante azoico con fórmula molecular  $C_{18}H_{14}N_2Na_2O_8S_2$  (**Figura 2**) y peso molecular 496,43 g/mol. Es soluble en agua y poco soluble en etanol. En Europa tiene asignado el código E 122. El rango de concentraciones máximas permitidas en varios alimentos varía desde 25 hasta 500 mg/kg. Para bebidas no alcohólicas, el límite máximo permitido es 100 mg/L. La cantidad diaria recomendada por la EFSA es de 7 mg/kg de peso corporal. (Reevaluación EFSA, 2009)

- Ácido carmínico:

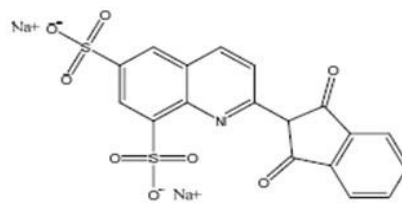
Es un colorante rojo oscuro extraído de los cuerpos secos de las hembras de la especie *Dactylopius coccus* Costa, con fórmula molecular  $C_{22}H_{20}O_{13}$  (**Figura 2**) y peso molecular 492,39 g/mol. Es soluble en agua, etanol y éter. Este compuesto puede asociarse con cationes  $NH_4^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $K^+$  y  $Na^+$ , variando su solubilidad en función del contraión. Asociado con el catión amonio será soluble en agua con un rango de pH 3-8,5, mientras que con calcio sólo lo será a pH 8,5. El rango de concentraciones máximas permitidas en varios alimentos va desde 50 hasta 500 mg/kg. Para bebidas no alcohólicas, el límite máximo permitido es 100 mg/L. La cantidad diaria recomendada por la EFSA es de 2,5 mg/kg de peso corporal. El código asignado en la Unión Europea para su comercialización es E 120. (Reevaluación EFSA, 2015)

- Azul Brillante FCF:

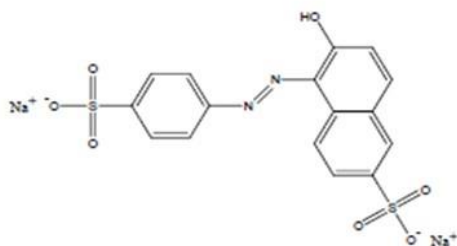
Es un colorante sintético del tipo triarilmetano con fórmula molecular  $C_{37}H_{34}N_2Na_2O_9S_3$  (**Figura 2**) y peso molecular 792,85 g/mol. Este compuesto se describe como una sal de sodio y es soluble en agua, pero no mucho en etanol. Su código de comercialización en Europa es E 133. El rango de concentraciones máximas permitidas en varios alimentos se establece desde 20 hasta 500 mg/kg. Para bebidas no alcohólicas, el límite máximo permitido es 100 mg/L. La cantidad diaria recomendada por la EFSA es de 6 mg/kg de peso corporal. (Reevaluación EFSA, 2010)



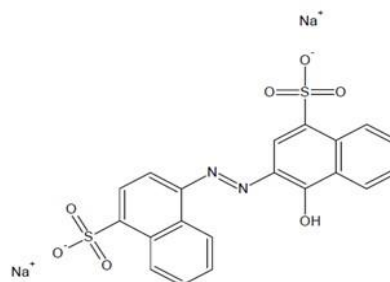
**Tartracina**  
 $C_{16}H_9N_4Na_3O_9S_2$   
 M: 534,36 g/mol



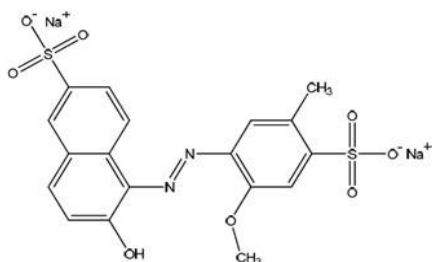
**Amarillo de quinoleína**  
 $C_{18}H_9NO_8S_2Na_2$   
 M: 477,38 g/mol



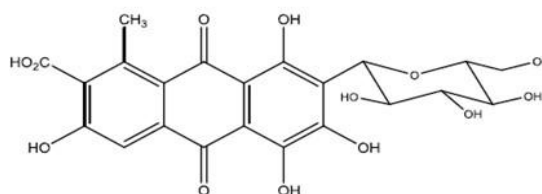
**Amarillo anaranjado**  
 $C_{16}H_{10}N_2Na_2O_7S_2$   
 M: 452,37 g/mol



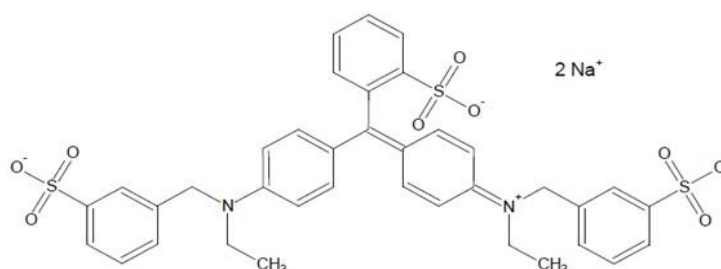
**Carmoisina**  
 $C_{20}H_{12}N_2Na_2O_7S_2$   
 M: 502,44 g/mol



**Rojo Allura AC**  
 $C_{18}H_{14}N_2Na_2O_8S_2$   
 M: 496,43 g/mol



**Ácido carmínico**  
 $C_{22}H_{20}O_{13}$   
 M: 492,39 g/mol

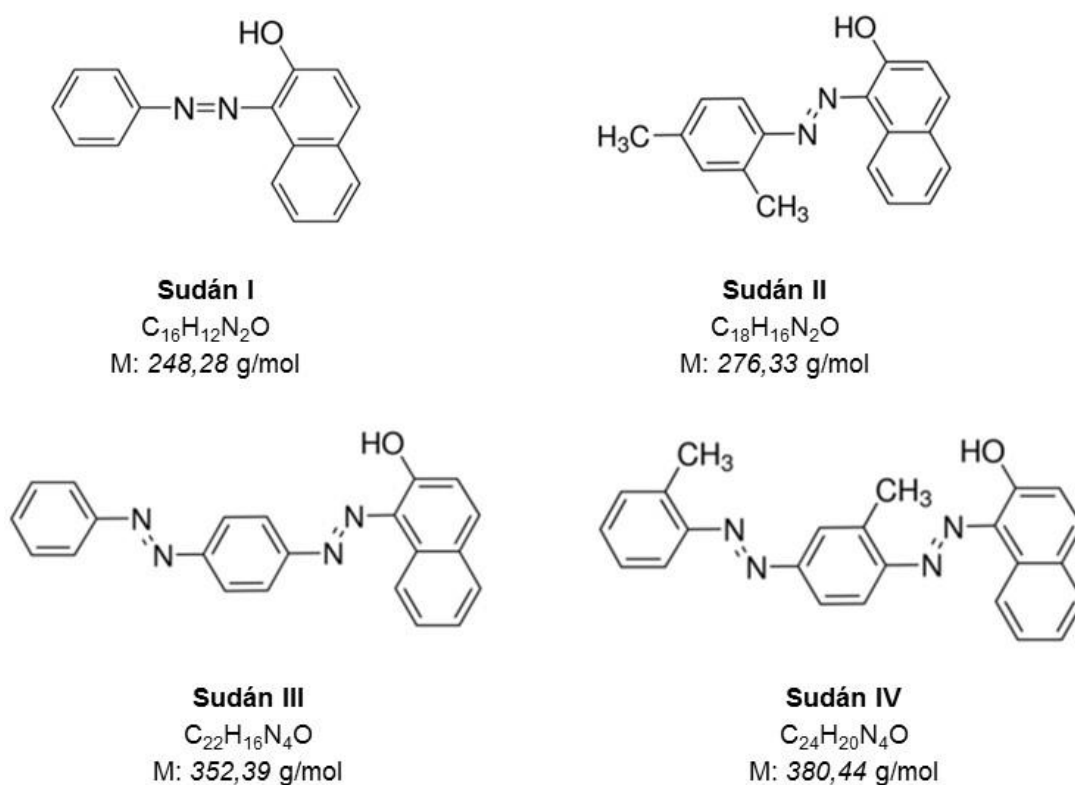


**Azul Brillante FCF**  
 $C_{37}H_{34}N_2Na_2O_9S_3$   
 M: 792,85 g/mol

**Figura 2.** Estructuras, fórmulas y masas moleculares de los colorantes estudiados en este trabajo.

- Sudán (I-IV):

Son colorantes azoicos, concretamente derivados fenólicos, de apariencia anaranjada. Estas sustancias están prohibidas para uso alimentario en la Unión Europea por su clasificación en el Grupo 3 de carcinogénicos de la IARC. Entre sus usos destacan: tinte de laboratorio para detectar lípidos, productos del hogar, betún para zapatos, etc. (Qi *et al.*, 2011). En la **Figura 3** se pueden observar las estructuras, así como sus fórmulas y pesos moleculares de Sudán I, II, III y IV. (Review the toxicity EFSA, 2005)



**Figura 3.** Estructuras, fórmulas y masas moleculares de los Sudán (I-IV) estudiados en este trabajo.

Al iniciar este Trabajo Fin de Máster, se hizo una búsqueda bibliográfica para conocer los distintos métodos analíticos y los tratamientos de muestra utilizados en la determinación de los analitos de interés en alimentos (Yamjala *et al.*, 2016). Algunos de estos se describen brevemente en la **Tabla 3**.

**Tabla 3.** Métodos analíticos usados en la determinación de colorantes artificiales alimentarios.

Analito	Tratamiento de muestra	Determinación	Comentarios	Referencia
Sudán(I-IV)	Pesar 1 g de muestra y mezclar con 10 mL de acetona. Centrifugar el extracto 10 min. A 4500 rpm. Tomar 1 mL del sobrenadante y añadir a 1 mL de agua grado HPLC. Filtrar en un filtro de 0,45 µm	LC-ESI(+)-Q-TOF-MS Columna C18, 0,32x150 mm Fase móvil A: H <sub>2</sub> O/ACN (85:15), 0,1% ác. fórmico Fase móvil B: ACN/Acetona (80:20), 0,1% ác. fórmico	Matriz: Condimento de chile en polvo LOD: 0,02-0,05 µg/mL	Calbiani <i>et al.</i> , 2004
Sudán(I-IV)	Muestra sólida: Pesar 1 g y añadir 10 mL de ACN. Mezclar en el vortex 30 segundos y sonicar durante 20 minutos. Tomar 1 mL del sobrenadante y filtrar en un filtro de 0,45 µm. Mezclar 300 µL del extracto con 700 µL de agua  Muestra líquida: Mezclar 2 mL de la muestra con 2 mL de ACN. Filtrar 1 mL de la fase acuosa en un filtro de 0,45 µm	LC-ESI(+)-TOF-MS Columna C8, 150x4,6 mm Fase móvil A: H <sub>2</sub> O, 0,1% ác. fórmico Fase móvil B: MeOH, 0,1 % ác. fórmico	Matriz: Condimento de chile en polvo y salsa de carne LOD: 2-20 µg/L	Ferrer <i>et al.</i> , 2007
Sudán(I-IV)	-	(1) HPLC-UV/Vis Columna: C18, 150x3,0 mm  (2) HPLC-ESI(+)-QqQ-MS/MS Columna: C18, 150x4,6 mm  Fase móvil A: H <sub>2</sub> O Fase móvil B: MeOH/ACN	Desarrollo de método a partir de patrones analíticos  (1) LOD: 60-890 µg/L LOQ: 200-2990 µg/L  (2) LOD: 4,54-14,3 µg/L LOQ: 15,0-47,6 µg/L	Noguerol-Cal <i>et al.</i> , 2008

Analito	Tratamiento de muestra	Determinación	Comentarios	Referencia
Sudán(I-IV)	Pesar 5 g de muestra. Añadir mezcla de colorantes, como patrón interno, y extraer con PLE. Se añaden 10 mL de acetona a la alícuota y se mezclan durante 10 min a 4500 rpm. El extracto se lleva a sequedad con N <sub>2</sub> , reconstituyéndolo en 2,5 mL de diclorometano y filtrando con un filtro de 0,22 µm	LC-ESI(+)-MS/MS Columna: 150x2,0 mm Fase móvil A: ACN/H <sub>2</sub> O (9:1), 2 mM formiato amónico, 0,2% ác. fórmico Fase móvil B: Solución tampón de formiato, 2 mM formiato amónico, 0,2% ác. fórmico (97:3)	Matriz: Salsas y condimentos en polvo de chile. curry y cúrcuma LOD: 0,002-0,022 ng/g LOQ: 0,006-0,036 ng/g	Pardo <i>et al.</i> , 2009
Sudán(I-IV)	Pesar 5 g de muestra y añadir 20 mL de acetato de etilo; centrifugar a 10000 rpm durante 1 minuto. Centrifugar el extracto a 4000 rpm durante 10 min. Filtrar la fase orgánica y volver a extraer el pellet con 20 mL de acetato de etilo.  Pesar 10 g de salsa y añadir 20 mL de ACN/acetato de etilo (50:50). Centrifugar a 10000 rpm durante 1 min. Filtrar la fase orgánica y volver a extraer el pellet con 20 mL de ACN/acetato de etilo (50:50). Llevar a sequedad con un rotavapor y disolver en 10 mL de acetato de etilo/ciclohexano (50:50)	LC-ESI(+)-MS/MS Columna: C18, 250x2,1 mm Fase móvil A: H <sub>2</sub> O, 0,1% ácido fórmico Fase móvil B: MeOH	Matriz: Condimentos de chile en polvo y salsa de chile LOD: 0,1-1,8 µg/kg LOQ: 0,4-5,0 µg/kg	Sun. <i>et al.</i> , 2007

Analito	Tratamiento de muestra	Determinación	Comentarios	Referencia
Tartracina, Amarillo anaranjado, Azul Brill. FCF, Allura Red AC, Sudán(I-IV)	Pesar 10 g de muestra y extraer con 50 mL de ACN (por duplicado) durante 2,5 minutos. Centrifugar a 4000 rpm. Filtrar en sobrenadante en un filtro de 0,45 µm	LC-ESI (+/-)-MS/MS Columna: C16, 150x4,6 mm Fase móvil A: ACN Fase móvil B: Solución tampón de 20 mM de acetato amónico y 1% ác. acético	Matriz: Almíbar LOQ: 0,001-1 mg/kg	Tsai <i>et al.</i> , 2015
Tartrazina, Amarillo anaranjado, Azul Brill. FCF, Sudán(I-IV)	Desgasificar y pasar por un filtro de 0,45 µm	HPLC-DAD-ESI(+/-)-MS Columna: C18, 4,6x250 mm Fase móvil A: Solución tampón de acetato, 20 mM acetato amónico y 1% ác. acético Fase móvil B: Metanol	Matriz: Refresco LOD: 0,01-3 ng LOQ: 0,03-10,5 ng	Ma <i>et al.</i> , 2006

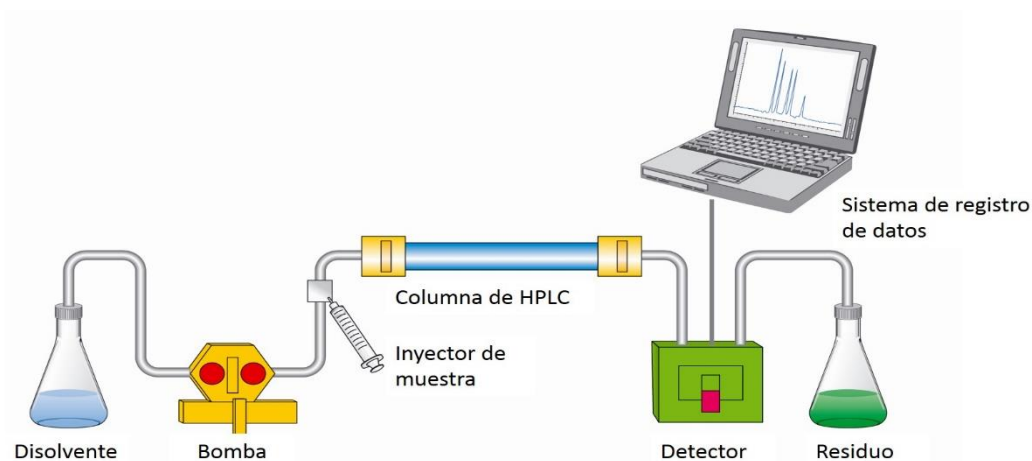
## 2.5. Cromatografía líquida acoplada a Espectrometría de masas (LC-MS)

### 2.5.1. Cromatografía de líquidos

La cromatografía líquida de alta resolución (*High Performance Liquid Chromatography, HPLC*) es una técnica de separación donde se utiliza alta presión para hacer pasar el disolvente (fase móvil) por una columna que contiene unas partículas de entre 3 y 10  $\mu\text{m}$  de diámetro (fase estacionaria). Se consiguen separaciones con gran resolución en el análisis de compuestos no volátiles. Una variante de esta técnica también utilizada es la cromatografía líquida de ultra alta resolución (*Ultra High Performance Liquid Chromatography, UHPLC*) que, a diferencia de HPLC, el tamaño de partícula utilizado en la columna es inferior a 2  $\mu\text{m}$ ; además, las columnas son más cortas (3-7,5 mm). Esto conlleva un aumento de presión en el interior de la columna cromatográfica, reducir el volumen de disolventes utilizados, disminuir el tiempo de análisis y obtener una mayor resolución de los picos cromatográficos (Nollet, L. (ed.), 2015)

Las partes de un cromatógrafo de líquidos son: depósito para los disolventes, sistema de bombeo para dotar de presión al sistema, inyector, columna cromatográfica, detector, sistema de registro de datos y colector de residuos. En la **Figura 4** se observan los componentes del cromatógrafo de líquidos.

El 80-90% de las veces se trabaja en “*fase reversa*”, modo de trabajo donde la fase móvil es un compuesto polar y la fase estacionaria, no polar. Entre sus ventajas se encuentra la alta reproducibilidad y su mayor rapidez. La separación se puede realizar mediante elución *isocrática*, donde la composición de la fase móvil permanece constante, o bien elución *por gradiente*, variando la composición de la misma durante el análisis. (Nollet, L. (ed.), 2015)



**Figura 4.** Esquema de un cromatógrafo de líquidos.

### 2.5.2. Espectrometría de masas

La espectrometría de masas es una técnica instrumental que permite la separación y determinación simultánea de iones en función de su relación masa-carga ( $m/z$ ). Los iones provenientes de un compuesto, se originan en la fuente de ionización, y tras la aplicación de una serie de campos eléctricos y magnéticos en el analizador, se separan por su  $m/z$ . Un espectrómetro de masas se compone de: fuente de ionización donde se generan los iones, analizador que diferencia los distintos iones generados en base a su  $m/z$  y un detector que registra y amplifica la señal eléctrica producida por los iones. En la **Figura 5** se esquematizan los componentes de un espectrómetro de masas (Downard, K., 2003).

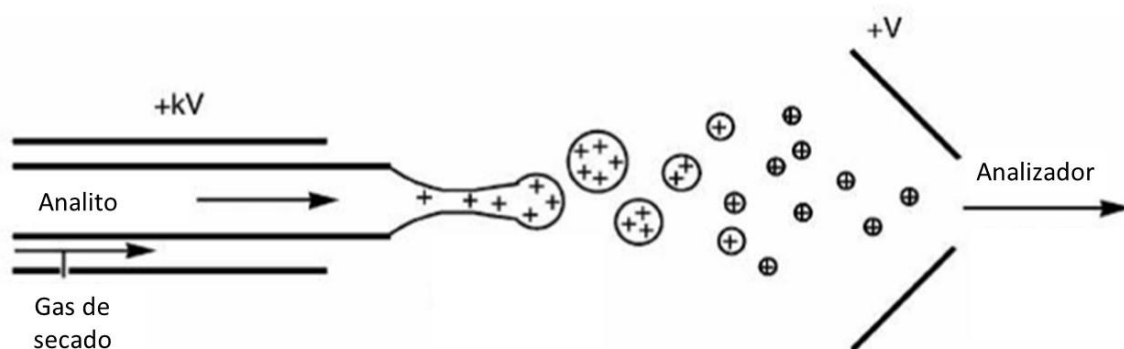


**Figura 5.** Componentes de un espectrómetro de masas.

- Fuente de ionización: produce la ionización de las moléculas, para su posterior introducción en el espectrómetro de masas. Gracias al desarrollo de algunas interfases, se han podido acoplar exitosamente la cromatografía de líquidos y la espectrometría de masas; estas interfases adecúan los compuestos al estado de agregación (fase gaseosa) necesario para poder desarrollar

correctamente la espectrometría de masas. Algunas de las interfases desarrolladas son (Downard, K., 2003):

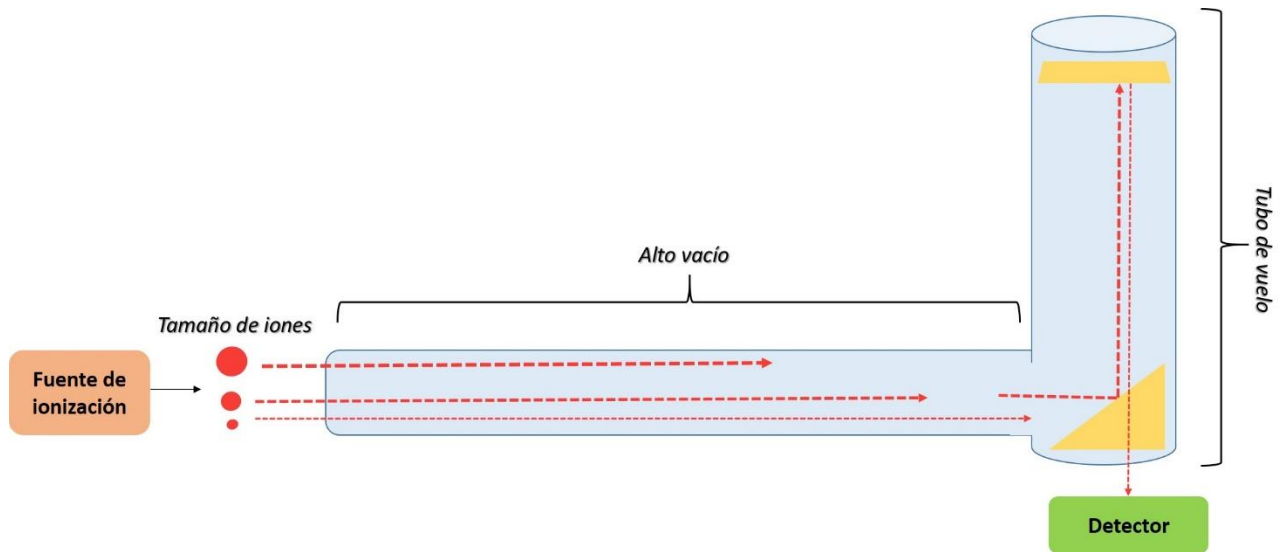
- Plasma acoplado inductivamente (*Inductive Plasma Coupled, ICP*) principalmente empleado para determinación de elementos metálicos.
- Bombardeo por átomos rápidos (*Fast Atom Bombardment, FAB*) que se utiliza para el estudio de la naturaleza química de materiales y superficies, bombardeando con  $Xe^+$  y  $Cs^+$ .
- Ionización química a presión atmosférica (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI*) que ioniza las moléculas polares directamente de la disolución, utilizando una descarga eléctrica. Este proceso es menos eficiente para ionizar compuestos de gran peso molecular, pero es muy útil para biomoléculas de menos de 1000 Da.
- Ionización por electrospray o electronebulización (*Electrospray Ionization, ESI*). También ioniza las moléculas directamente de la disolución, haciéndola pasar por una aguja a alto voltaje. Se produce una neblina de gotas, con carga neta (positiva o negativa), que sale de la aguja en base a la polaridad seleccionada. A medida que las gotas se evaporan, los iones se van acercando; en algún punto hay suficientes fuerzas de repulsión coulombianas entre los iones para superar las tensiones superficiales líquidas del disolvente. Se utiliza un gas de secado para evaporar las moléculas de disolvente y que sólo queden los iones de analito, avanzando hacia el analizador (**Figura 6**). Dadas estas características, se pueden ionizar moléculas grandes a diferencia de APCI.



**Figura 6.** Esquema del proceso de formación de electrospray.

- Analizador: Tras la ionización de los compuestos en la fuente de ionización, estos son guiados al interior del analizador y ahí se separan, dependiendo de su  $m/z$ . Se trabaja a vacío para evitar colisiones entre los iones generados, que se desplazan al detector, y moléculas de gas residual. En espectrometría de masas hay varios tipos de analizadores (Downard, K., 2003):
  - Cuadrupolos (Q): consiste en cuatro barras metálicas con forma de rodillo ovalado, paralelas entre sí dos a dos y conectadas eléctricamente. Los iones, una vez en el interior del analizador, empiezan a oscilar describiendo una trayectoria estable, en base a su  $m/z$ , hasta llegar al detector; el resto de iones presentarán una trayectoria inestable, con lo que se descartarán antes de llegar al detector.
  - Analizador de triple cuadrupolo (QqQ): se utiliza en muestras con muchas impurezas e interferentes. Consiste en tres cuadrupolos conectados en serie; el primero (Q<sub>1</sub>) selecciona la  $m/z$  deseada del ión precursor, en el segundo (Q<sub>2</sub>) se produce la fragmentación de dicho ión y el tercero (Q<sub>3</sub>) se encarga de separar los iones producidos en Q<sub>2</sub> en base a su  $m/z$ .
  - Trampa de iones (IT): consiste en dos electrodos y una lente circular, con un fundamento similar al cuadrupolo. Los iones se quedan atrapados en un pequeño volumen entre los electrodos y la lente, pasando posteriormente a la trampa y liberándose hacia el detector.
  - Analizador de tiempo de vuelo (*Time of Flight, TOF*): se utiliza en espectrometría de masas de alta resolución. Su nombre proviene del tiempo que tardan los iones en alcanzar el detector desde la fuente de ionización. Los iones se generan en la fuente de ionización y atraviesan el tubo de vuelo, por la aplicación de un campo eléctrico que los acelera. Todos los iones tendrán la misma energía cinética inicial al salir de la fuente, pero a menor tamaño de ión, mayor será su aceleración y por lo tanto, antes alcanzará el detector (**Figura 7**). La presencia de un tubo de vuelo convencional lineal no podría separar iones con  $m/z$  similares. Una solución a este problema es colocar en el tubo de vuelo un sistema reflector, que incluye lentes para duplicar el recorrido de los iones,

permitiendo obtener una mayor resolución en la determinación de los iones.



**Figura 7.** Esquema del proceso de analizador de tiempo de vuelo (TOF).

- Sistemas híbridos: surgen al combinar distintos analizadores en un espectrómetro de masas, produciendo un aumento del rendimiento. En la práctica, hay algunos analizadores que se acoplan mejor con otros, como por ejemplo un Q-TOF.
- Detector: Los iones llegan a este componente, donde generan una corriente eléctrica; ésta se amplifica y detecta, traduciéndose en datos objetivos con los que se puede trabajar (Downard, K., 2003).

### 3. OBJETIVOS

En este Trabajo Fin de Máster se estudiarán distintos colorantes artificiales presentes en alimentos. La atención se centra en aquellos colorantes que presentan controversia, por estar relacionados con trastornos de hiperactividad en niños y aquellos que se encuentran prohibidos.

Los principales objetivos del trabajo son:

- 1) Desarrollo de un método para la determinación de los colorantes Tartracina, Amarillo de quinoleína, Amarillo anaranjado, Carmoisina, Rojo Allura AC, Ácido carmínico, Azul Brillante FCF y Sudán (I-IV), mediante UHPLC-TOF.
- 2) Aplicar el método desarrollado a muestras reales, concretamente golosinas líquidas.

### 4. EXPERIMENTAL

#### 4.1. Materiales y reactivos

Todos los disolventes empleados fueron grado HPLC. Agua, acetato de etilo, metanol (MeOH), acetonitrilo (ACN), ácido fórmico y formiato amónico, fueron adquiridos en Sigma Aldrich (Madrid, España). Los patrones de los colorantes artificiales estudiados, fueron suministrados por Sigma Aldrich. Para extracción en fase sólida se emplearon cartuchos Supelclean LC-C18 (500 mg, 6 mL) de Supelco (Bellefonte, PA, USA).

Las disoluciones de cada analito se prepararon en metanol a una concentración de 200 mg/L. excepto las de Sudán III y Sudán IV, que se prepararon en acetato de etilo a una concentración de 50 mg/L. Todas las disoluciones se mantuvieron a -18°C hasta su uso. A partir de las diferentes disoluciones patrón, se preparó una disolución intermedia de concentración 4 mg/L, en cada uno de analitos de estudio en metanol. A partir de esta disolución, se prepararon curvas de calibrado, siete puntos a concentración de 0,01; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75 y 1 mg/L en MeOH:H<sub>2</sub>O (25:75).

## 4.2. Tratamiento de muestra

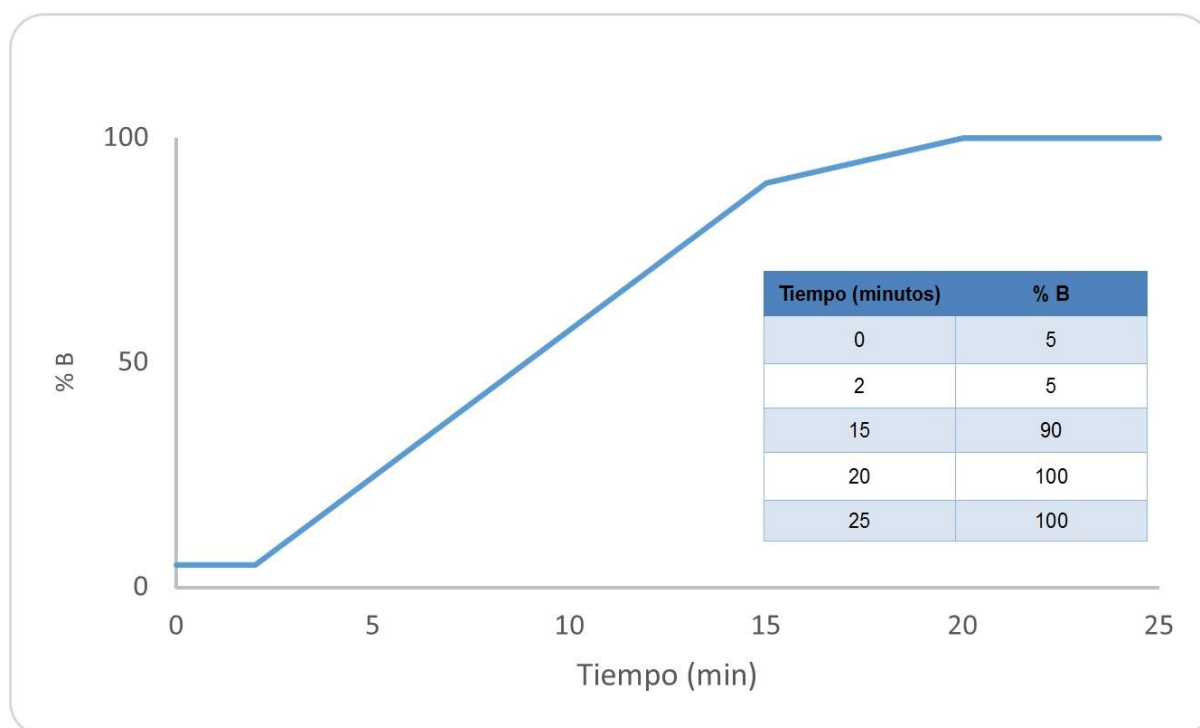
Las muestras estudiadas son cuatro golosinas líquidas. Un volumen de 1 mL de cada una de las muestras se llevó a un volumen final de 10 mL con agua. A continuación, se realizó una extracción en fase sólida (*Solid Phase Extraction, SPE*), para eliminar posibles impurezas e interferentes de la muestra, *p. ej.* azúcares. Los diferentes pasos que se siguieron para la SPE se detallan a continuación:

- 1) Acondicionamiento: el cartucho se acondiciona con tres volúmenes de 1 mL de MeOH, a un flujo de 3 mL/min aproximadamente; seguido de 1 mL (por triplicado) de agua, con un flujo de 4 mL/min.
- 2) Carga de muestra: se pasan por el cartucho los 10 mL de muestra diluida (1:10), con un flujo de 1 mL/min.
- 3) Elución: la etapa de elución se realizó con 1 mL de 2-propanol (por triplicado) con un flujo de 0.85 mL/min. El extracto obtenido (eluato) se recoge en un tubo de ensayo y se homogeneiza en el Vortex.
- 4) Evaporación del extracto: se etiqueta el correspondiente tubo de ensayo y se introduce en un evaporador TurboVap LV (Biotage), que se compone de un baño de agua a 40°C y una corriente de N<sub>2</sub>; con el fin de evaporar el eluato hasta casi sequedad.
- 5) Reconstitución del extracto: se añaden 10 mL de una disolución MeOH:H<sub>2</sub>O (25:75, v:v), y se agita durante 1 minuto en el Vortex para la correcta homogenización de la muestra. Las muestras así obtenidas, presentan una dilución 1:10. Una nueva dilución 1:50, se preparó por dilución de las mismas en MeOH:H<sub>2</sub>O (25:75, v:v).

## 4.3. Cromatografía de líquidos acopada a espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo (LC-TOFMS)

Se empleó un sistema de cromatografía de líquidos UHPLC (Agilent Series 1290 Infinity, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) provisto de una columna analítica de fase reversa C<sub>18</sub> de 100 mm x 3,0 mm y 1,8 µm de tamaño de partícula (Zorbax Eclipse Plus C18, Agilent, USA).

Como fases móviles se emplearon, agua y ACN, ambas con 0,1% de ácido fórmico, fases móviles A y B, respectivamente. Con un flujo de 0,4 mL/min, se realizó una elución en gradiente (**Figura 8**). Un volumen de 10 µL de inyección, realizada en el modo “flush port”, donde tras la carga de la muestra, se realiza un lavado de aguja durante 7 segundos con MeOH, fue empleado para inyección de estándares y muestras. El tiempo total de análisis fue 25 minutos, seguido de un post-run de 10 minutos para acondicionar la columna.



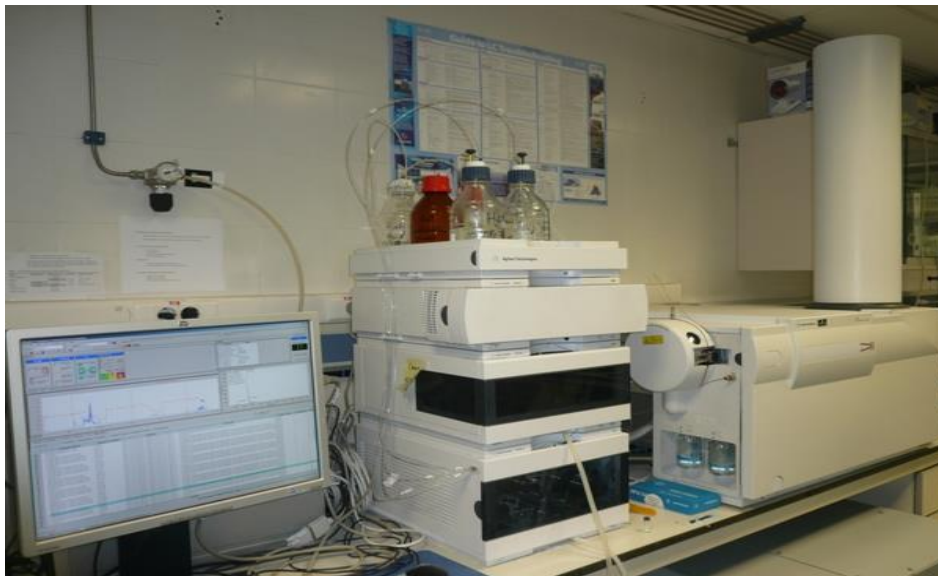
**Figura 8.** Gradiente de elución utilizado en la separación cromatográfica.

El sistema UHPLC está acoplado a un espectrómetro de masas con analizador de tiempo de vuelo Agilent 6220 TOF (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipado con una fuente de ionización electrospray (ESI), trabajando tanto en modo positivo como negativo. En la **Tabla 4**, se muestran los diferentes parámetros de trabajo en la fuente de ionización y espectrómetro de masas.

**Tabla 4.** Condiciones de la fuente de ionización.

Voltaje del capilar	4000 V
Voltaje de fragmentación	170 V
Presión del gas de nebulización	40 psi
Caudal del gas de secado	9,0 L/min
Temperatura del gas de secado	300 °C
Rango de masas	50-1100 <i>m/z</i>

En la **Figura 9** se muestra el equipo que empleado en este trabajo.



**Figura 9.** Equipo cromatográfico con espectrómetro de masas con analizador TOF acoplado empleado en este trabajo.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Optimización del método

Los primeros experimentos realizados en este estudio se centraron en la optimización de la separación cromatográfica de los distintos analitos propuestos. Para ello, se inyectó una disolución mezcla de los distintos patrones con una concentración de 1 mg/L empleando elución en gradiente y las condiciones de la fuente ESI y espectrómetro de masas indicados en el apartado 4.3. Las condiciones cromatográficas iniciales, se fijaron en base a un trabajo previamente publicado (Ferrer *et al.*, 2007), modificándose para su adecuación a los analitos de interés en el presente trabajo. Las condiciones establecidas, dieron lugar a la correcta separación de los estándares estudiados.

La identificación de los picos correspondientes a cada analito de interés, se hizo en base a la  $m/z$  teórica, correspondiente a las diferentes posibilidades de ionización, para cada colorante estudiado. A partir de las estructuras moleculares de los analitos de interés, en la fuente ESI se espera encontrar distintos iones ( $[M+H]^+$ ,  $[M-H]^-$  o  $[M-2H]^{2-}$ ), con una  $m/z$  característica cada uno. A partir de dicha relación, se podrá identificar cada analito en el correspondiente cromatograma. Una vez inyectados los estándares analíticos de cada compuesto, se obtuvo el cromatograma de iones totales (*Total Ion Current, TIC*) en modo de ionización positiva y negativa. A partir de éste, y utilizando las  $m/z$  teóricas correspondientes para cada analito, se obtuvo el cromatograma de iones extraídos (*Extracted Ion Chromatogram, EIC*) en polaridad positiva y negativa. En la **Tabla 5** se observan los distintos iones que se pueden producir a partir de la estructura química de cada colorante.

**Tabla 5.** Iones producidos, según modo de ionización utilizado, de colorantes alimentarios artificiales.

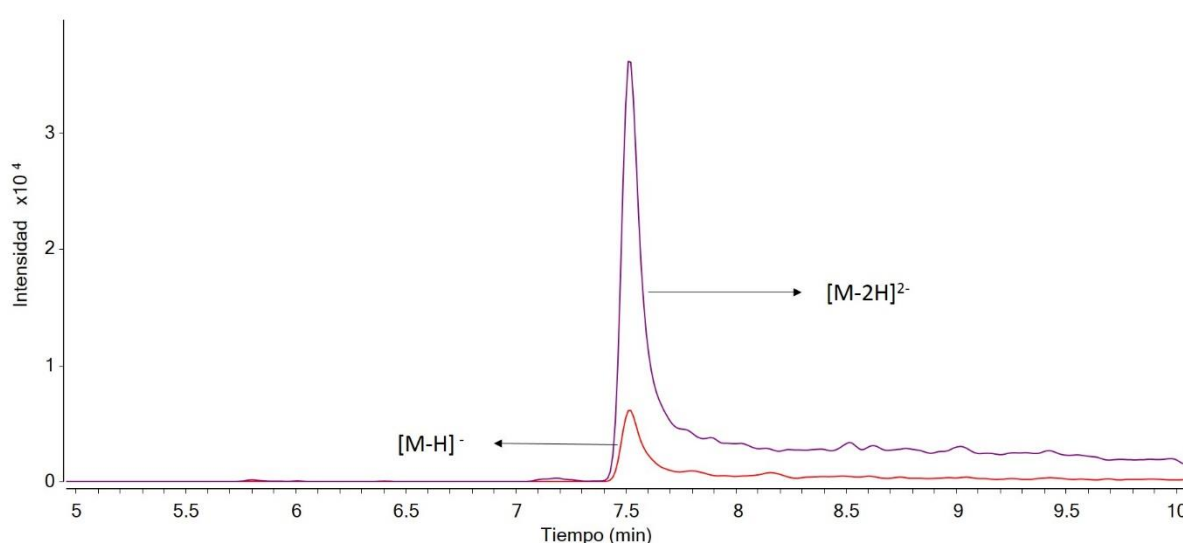
Compuesto	Ionización	
	ESI+	ESI-
Tartracina	$[M+H]^+$	$[M-H]^-$ / $[M-2H]^{2-}$
Amarillo de quinoleína (monosulfónico)	$[M+H]^+$	$[M-H]^-$
Amarillo de quinoleína (disulfónico)	$[M+H]^+$	$[M-H]^-$ / $[M-2H]^{2-}$
Amarillo anaranjado	$[M+H]^+$	$[M-H]^-$ / $[M-2H]^{2-}$
Carmoisina	$[M+H]^+$	$[M-H]^-$ / $[M-2H]^{2-}$

**Tabla 5.** Iones producidos, según modo de ionización utilizado, de colorantes alimentarios artificiales. (Continuación)

Compuesto	Ionización	
	ESI+	ESI-
<i>Rojo Allura AC</i>	$[M+H]^+$	$[M-H]^- / [M-2H]^{2-}$
<i>Ácido carmínico</i>	$[M+H]^+$	$[M-H]^-$
<i>Azul Brillante FCF</i>	$[M+H]^+$	$[M-H]^-$
<i>Sudán I</i>	$[M+H]^+$	$[M-H]^-$
<i>Sudán II</i>	$[M+H]^+$	$[M-H]^-$
<i>Sudán III</i>	$[M+H]^+$	$[M-H]^-$
<i>Sudán IV</i>	$[M+H]^+$	$[M-H]^-$

Se observó que, en polaridad negativa, podían aislarse los compuestos sufriendo una única desprotonación ( $[M-H]^-$ ) o dos ( $[M-2H]^{2-}$ ); cabe decir que no todos los compuestos podrán sufrir doble desprotonación en base a su estructura.

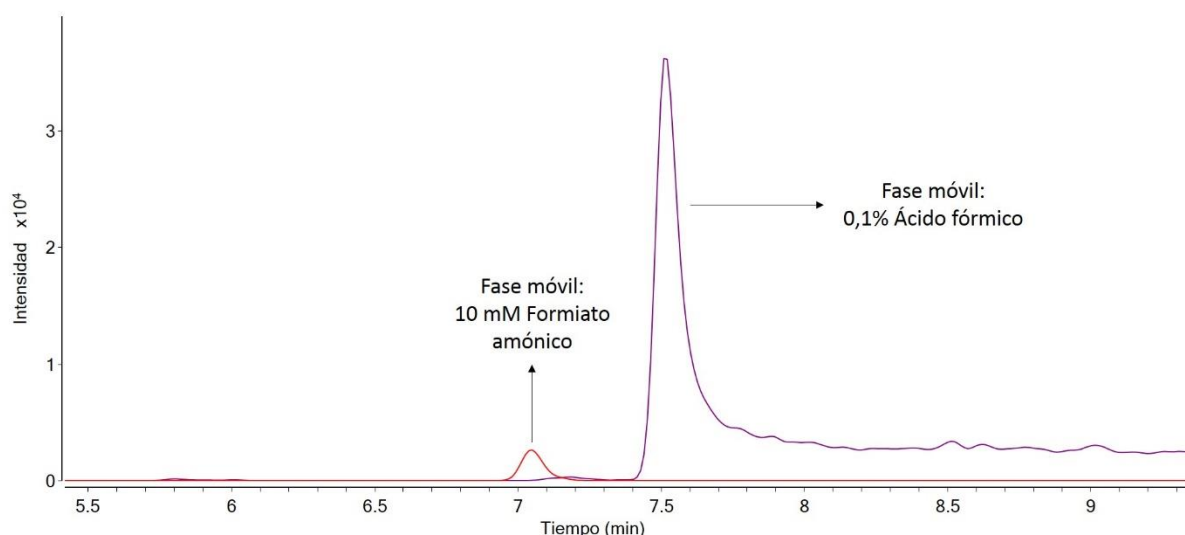
Tras comprobar los cromatogramas EIC de cada analito con polaridad negativa, teniendo en cuenta su relación  $m/z$ , se obtuvieron resultados que mostraban que, en los compuestos que pueden presentar doble desprotonación, existía una mayor intensidad de dichos iones que aquellos con sólo una desprotonación. En la **Figura 10** se observa la comparación de los cromatogramas EIC para los iones  $[M-H]^-$  y  $[M-2H]^{2-}$  del compuesto Carmoisina con una concentración de 1mg/L, que avala la afirmación anterior.



**Figura 10.** Cromatograma EIC de Carmoisina, comparando  $[M-H]^-$  y  $[M-2H]^{2-}$ .

El criterio seleccionado para elegir entre aplicar ionización positiva o negativa para la identificación de los analitos objeto de estudio se basó en la intensidad de los picos cromatográficos obtenidos. Es por ello que, debido a la mayor intensidad mostrada por los compuestos que se podrían desprotonar doblemente, se intentó potenciar este efecto aumentando el pH de las fases móviles utilizadas en el análisis. La finalidad de adicionar compuestos, como acetato amónico o formiato amónico (Sun *et al.*, 2007), a las fases móviles reside en propiciar la doble desprotonación de los analitos que tengan esa capacidad y evitar el desdoblamiento de algunos picos cromatográficos (López-Gutiérrez, N., 2011). Para ello, se realizó una comparación entre fases móviles: una que contenía 0,1% de ácido fórmico y otra con 10 mM de formiato amónico, que reducía el pH; ambas se prepararon en ACN y H<sub>2</sub>O.

Una disminución en el tiempo de retención fue observada al emplear fases móviles con formiato amónico (López-Gutiérrez, N., 2011). Los picos cromatográficos obtenidos, utilizando fases móviles con formiato amónico, fueron de menor intensidad que aquellos conseguidos usando fases móviles con ácido fórmico; esto concuerda con la bibliografía consultada (Sun *et al.*, 2007) utilizando este compuesto. En la **Figura 11** se pueden ver los cromatogramas de ión extraído para Carmoisina, obtenidos empleando fases móviles con formiato amónico y ácido fórmico; se comprueba que la intensidad del pico cromatográfico, en el que se utiliza formiato como fase móvil, es bastante menor que la del pico en que se usa ácido fórmico.

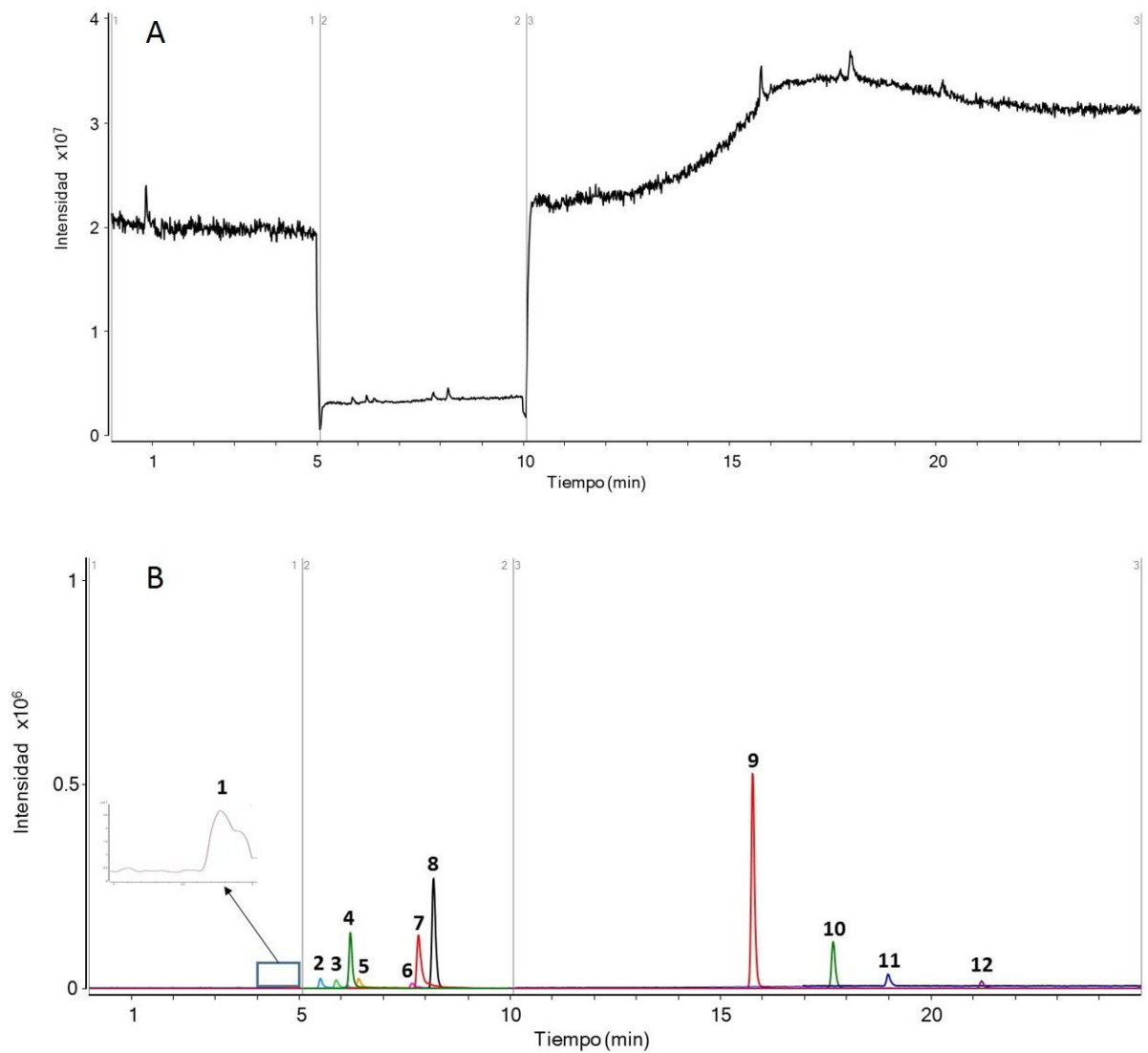


**Figura 11.** EICs correspondientes a la Carmoisina (1 mg/L), obtenidos empleando unas fases móviles con 0,1% de ácido fórmico (trazo rojo) y con 10 mM de formiato amónico (trazo morado). Otros detalles experimentales en el apartado 4.3.

**Tabla 6.** Colorantes artificiales determinados y sus tiempos de retención.

	Compuesto	Fórmula molecular	Ión detectado	m/z	t <sub>R</sub> (min)
1	<i>Tartracina</i>	C <sub>16</sub> H <sub>9</sub> N <sub>4</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>9</sub> S <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	469,0118	4,77
2	<i>Amarillo de quinoleína (disulfónico)</i>	C <sub>18</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>8</sub> S <sub>2</sub> Na <sub>2</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	215,4890	5,52
3	<i>Amarillo anaranjado</i>	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>7</sub> S <sub>2</sub>	[M-2H] <sup>2-</sup>	202,9970	5,90
4	<i>Ácido carmínico</i>	C <sub>22</sub> H <sub>20</sub> O <sub>13</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	491,0831	6,22
5	<i>Rojo Allura AC</i>	C <sub>18</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>8</sub> S <sub>2</sub>	[M-2H] <sup>2-</sup>	225,0101	6,42
6	<i>Carmoisina</i>	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>7</sub> S <sub>2</sub>	[M-2H] <sup>2-</sup>	228,0048	7,70
7	<i>Azul Brillante FCF</i>	C <sub>37</sub> H <sub>34</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>9</sub> S <sub>3</sub>	[M-2H] <sup>2-</sup>	373,0719	7,84
8	<i>Amarillo de quinoleína (monosulfónico)</i>	C <sub>18</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>5</sub> SNa	[M-2H] <sup>2-</sup>	352,0285	8,19
9	<i>Sudán I</i>	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O	[M+H] <sup>+</sup>	249,1022	15,78
10	<i>Sudán II</i>	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O	[M+H] <sup>+</sup>	277,1335	17,68
11	<i>Sudán III</i>	C <sub>22</sub> H <sub>16</sub> N <sub>4</sub> O	[M+H] <sup>+</sup>	353,1397	18,98
12	<i>Sudán IV</i>	C <sub>24</sub> H <sub>20</sub> N <sub>4</sub> O	[M+H] <sup>+</sup>	381,1710	21,23

Una vez que el método cromatográfico fue optimizado, se realizó un análisis, con un tiempo total de 25 minutos, inyectando una mezcla de patrones con concentración 1mg/L. En dicho procedimiento se utilizaron ventanas de extracción de ionización positiva (0-5 minutos y 10-25 minutos) e ionización negativa (5-10 minutos), donde todos los analitos deseados fueron determinados. Las ventanas del método de detección se seleccionaron en base a los tiempos de retención característicos. La selección entre polaridad positiva y negativa se fundamentó en la intensidad de los iones que se generaron. En la **Tabla 6** se pueden consultar los tiempos de retención, los iones determinados y  $m/z$  de cada compuesto. Para los compuestos Tartracina y Sudán (I-IV) se observó una mayor intensidad de pico cromatográfico en el modo de ionización positivo; mientras que los compuestos Amarillo de quinoleína (mono y disulfónico), Amarillo anaranjado, Ácido carmínico, Rojo Allura AC, Carmoisina y Azul Brillante FCF tuvieron una mayor intensidad en el modo de ionización negativo. En la **Figura 12** se muestra el cromatograma TIC (A) y EIC, con la respectiva determinación de cada uno de los colorantes artificiales estudiados (B). Se comprueba la separación de los 12 colorantes artificiales estudiados en un único análisis de 25 minutos.



**Figura 12.** TIC (A) y EICs (B) utilizando ionización positiva (0-5 min; 10-25 min) y negativa (5-10 min), de todos los colorantes artificiales estudiados. Identificación de los picos: 1: *Tartracina*; 2: *Amarillo de quinoleína disulfónico*; 3: *Amarillo anaranjado*; 4: *Ácido carmínico*; 5: *Rojo Allura AC*; 6: *Carmoisina*; 7: *Azul Brillante FCF*; 8: *Amarillo de quinoleína monosulfónico*; 9: *Sudán I*; 10: *Sudán II*; 11: *Sudán III*; 12: *Sudán IV*

## 5.2. Parámetros analíticos

Diversos parámetros analíticos fueron estudiados, tales como el rango lineal, la regresión lineal, el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) (**Tabla 7**).

La estimación del rango lineal, así como la linealidad, del método fue realizada con una curva de calibración con patrones de los distintos analitos, en una disolución mezcla, con un rango de concentraciones de 0,001 a 1 mg/L. Se utilizaron los valores de área de pico cromatográfico para poder construir el gráfico. El rango lineal se estableció considerando que el límite inferior corresponde al LOQ calculado, mientras que el límite superior corresponde al último punto de la curva de calibrado donde no se pierde la linealidad de la misma.

Los límites de detección y cuantificación fueron calculados para cada compuesto. En cromatografía, concretamente en un cromatograma de ión extraído, el LOD se calcula como la concentración mínima detectada, multiplicada por 3 y dividida entre la relación señal-ruido (S/N) obtenida del propio cromatograma; por otro lado, el LOQ se calculará al multiplicar por 10 la concentración mínima detectada, y esto dividido por la relación señal-ruido (S/N) (**Ecuación 1**).

$$\text{LOD} = \frac{[\text{Concentración}]_{\text{mínima}} * 3}{S/N} \quad ; \quad \text{LOQ} = \frac{[\text{Concentración}]_{\text{mínima}} * 10}{S/N}$$

**Ecuación 1.** Cálculo de los límites de detección y cuantificación.

En base al LOD y LOQ, el método desarrollado se puede comparar con otros presentados en bibliografía. Por ejemplo, este método es más sensible que el presentado por Noguero-Cal, *et al.*, en 2008 sobre sudanes, dado que su LOD y LOQ son 4,54 y 15,0 µg/L, respectivamente; en el presente se han obtenido 4,18 y 13,93 µg/L, para LOD y LOQ, respectivamente.

En estudios anteriores (Tsai *et al.*, 2015), donde analizaron otros colorantes como Tartracina, Azul Brillante FCF y Amarillo anaranjado, los LOQ (0,5, 0,5 y 0,25 mg/kg, respectivamente) son peores, en la mayoría, a los obtenidos en este trabajo. Se puede afirmar, por tanto, que el método aplicado en este estudio ofrece ventajas frente a los descritos anteriormente en bibliografía.

**Tabla 7.** Parámetros analíticos estudiados para la validación del método.

Compuesto	Rango lineal (µg/L)	Pendiente	R <sup>2</sup>	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)
<i>Tartracina</i>	-	10,9	0,9958	304,0	1000
<i>Amarillo de quinoleína (disulfónico)</i>	10,6-500	303,4	0,9950	3,2	10,6
<i>Amarillo anaranjado</i>	51,6-750	152,2	0,9983	15,5	51,6
<i>Ácido carmínico</i>	6,4-750	432,9	0,9996	1,9	6,4
<i>Rojo Allura AC</i>	90,9-1000	188,4	0,9848	27,3	90,9
<i>Carmoisina</i>	75,2-1000	114,3	0,9864	22,6	75,2
<i>Azul Brillante FCF</i>	5,1-750	818,6	0,9984	1,5	5,1
<i>Amarillo de quinoleína (monosulfónico)</i>	1,7-750	1138,4	0,9994	0,5	1,7
<i>Sudán I</i>	13,9-1000	841,8	0,9982	4,2	13,9
<i>Sudán II</i>	33,6-750	592,7	0,9994	10,1	33,6
<i>Sudán III</i>	81,4-750	154,5	0,9851	24,4	81,4
<i>Sudán IV</i>	220-500	75,6	0,9948	65,8	220

El rango lineal del compuesto Tartracina no se pudo determinar adecuadamente, dado que el LOQ es 1000 µg/L y la curva de calibrado externa tenía su máximo en 1000 µg/L.

### 5.3. Aplicación a muestras reales

El método desarrollado en los apartados anteriores se aplicó a muestras reales, concretamente a golosinas líquidas. La finalidad es identificar y cuantificar, utilizando un calibrado externo, los distintos colorantes presentes en las muestras. Se analizaron cuatro muestras diferentes de golosina líquida, todas ellas de la misma marca, pero de distintos colores. El etiquetado proporcionado por el fabricante indica que puede contener los siguientes colorantes artificiales: E 150d, E 133, E 122, E 102 y E 129.

- Muestra 1: Color rojo
- Muestra 2: Color azul
- Muestra 3: Color marrón
- Muestra 4: Color amarillo

A todas ellas se les aplicó el tratamiento de muestra descrito anteriormente en el apartado 4.2. Se trabajó con el método desarrollado para determinar, en el mismo análisis, todos los colorantes artificiales presentes. En la **Tabla 8** se observan los resultados obtenidos.

**Tabla 8.** Datos experimentales obtenidos referentes a la identificación de colorantes artificiales en muestras reales.

M	Compuesto	$t_R$ (min)	Fórmula	Ión detectado	$m/z$ teórica	$m/z$ experimental	Error  (ppm)
1	Carmoisina	7,69	$C_{20}H_{12}N_2Na_2O_7S_2$	$[M-2H]^-$	228,0048	228,0056	3,51
2	Azul Brillante	7,84	$C_{37}H_{34}N_2Na_2O_9S_3$	$[M-2H]^-$	373,0719	373,0746	7,24
3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
4	Tartracina	4,80	$C_{16}H_9N_4Na_3O_9S_2$	$[M+H]^+$	469,0118	469,0102	3,41

**Tabla 8.** Datos experimentales obtenidos referentes a la identificación de colorantes artificiales en muestras reales. (Continuación)

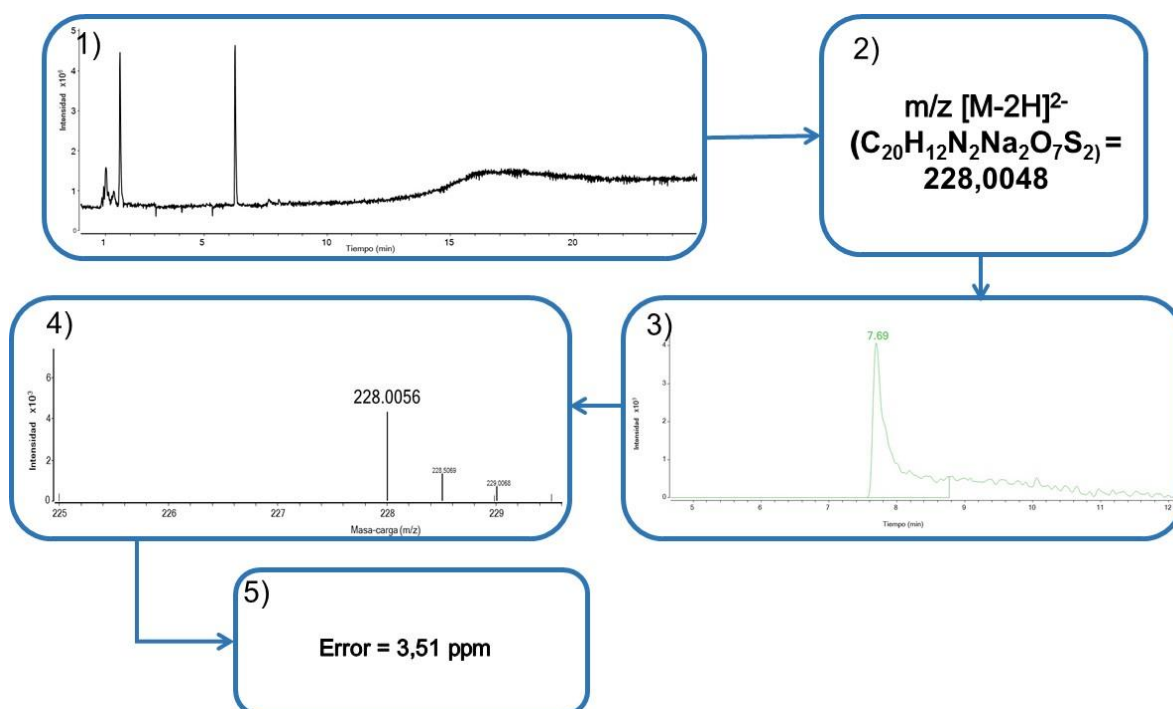
M	Compuesto	t <sub>R</sub> (min)	Fórmula	Concentración (mg/L)
1	Carmoisina	7,69	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>7</sub> S <sub>2</sub>	34,7
2	Azul Brillante	7,84	C <sub>37</sub> H <sub>34</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>9</sub> S <sub>3</sub>	18,8
3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
4	Tartracina	4,8	C <sub>16</sub> H <sub>9</sub> N <sub>4</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>9</sub> S <sub>2</sub>	3,34

Para una correcta identificación, hay que realizar una serie de etapas (**Figura 13**):

- 1) Obtención del cromatograma TIC de cada muestra tras su análisis.
- 2) Cálculo de la relación masa-carga ( $m/z$ ) teórica, a partir de la fórmula molecular propia de cada sustancia, del ión que vaya a ser objeto de estudio. Según el modo de ionización, positivo o negativo, habrá que sumar ó restar (según el número de desprotonaciones) la masa del protón a la del ión de interés.
- 3) Obtención del cromatograma EIC, utilizando para ello la  $m/z$  que corresponda en cada caso ( $[M+H]^+$ ,  $[M-H]^-$  o  $[M-2H]^{2-}$ ). Para cerciorarse de que los picos cromatográficos corresponden a los compuestos estudiados, se obtuvieron los espectros de masas de cada uno, comprobando su  $m/z$  experimental con hasta cuatro cifras decimales.
- 4) Obtención del espectro de masas resultante del pico cromatográfico, con un tiempo de retención característico del compuesto que se esté estudiando para cerciorarse de que el pico cromatográfico corresponde al analito objeto de estudio. Debe buscarse un pico con  $m/z$  experimental, con cuatro cifras decimales, que corresponda al ión de interés.
- 5) Cálculo del error, en partes por millón (ppm), de la medida exacta de  $m/z$  experimental, comparándola con la  $m/z$  teórica obtenida en el paso número 2. El valor de este parámetro debe ser igual o inferior 10 ppm para verificar que la masa obtenida corresponde con el compuesto de estudio. El error, calculado en valor absoluto, se obtiene a partir de la **Ecuación 2**:

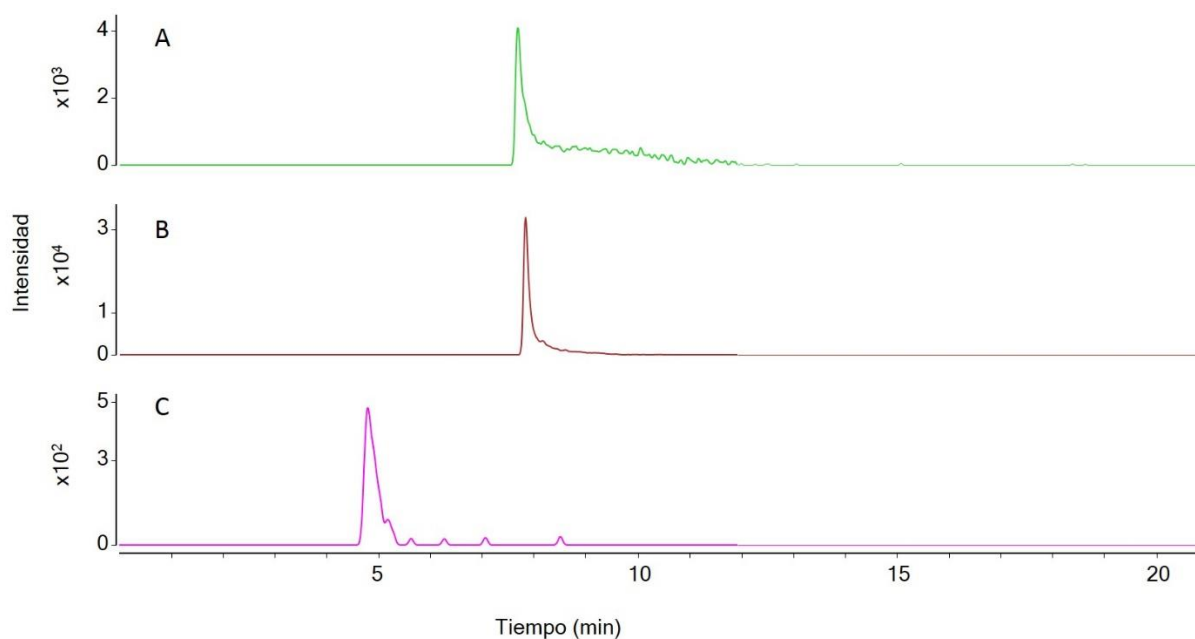
$$|\text{Error (ppm)}| = \left| \frac{m/z [M+H]^+ \text{ experimental} - m/z [M+H]^+ \text{ teórica}}{m/z [M+H]^+ \text{ teórica}} \times 10^6 \right| \leq 5 \text{ ppm}$$

**Ecuación 2.** Cálculo del error relativo para la relación  $m/z$ .



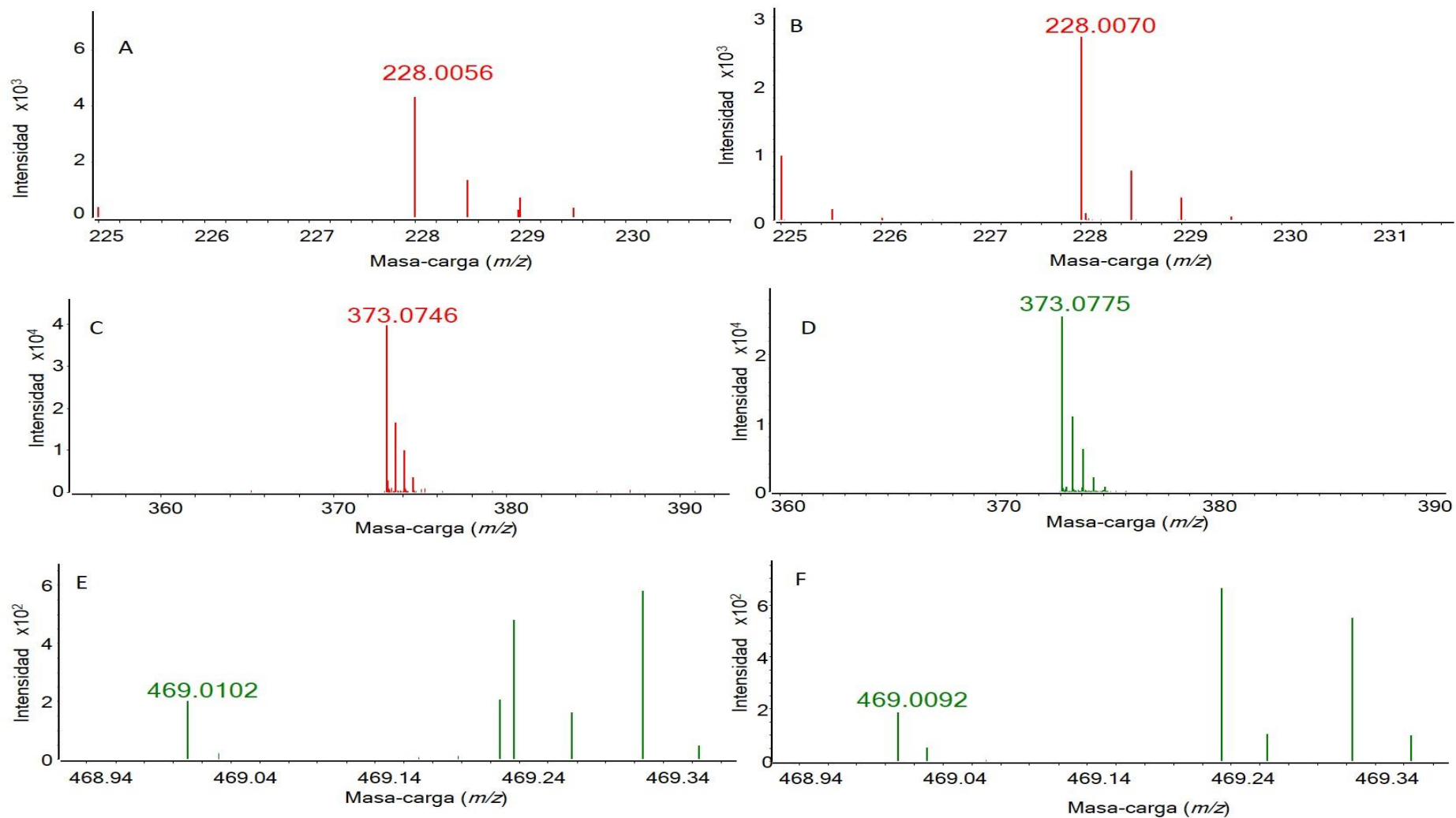
**Figura 13.** Diagrama para la identificación de Carmoisina en la muestra 1.

En la **Figura 14** se muestran los EICs obtenidos a partir de las muestras estudiadas, cada uno con su tiempo de retención característico. En la muestra 1, se determinó la presencia de Carmoisina (A) en una concentración de 34,68 mg/L; para la muestra 2, se extrajo un cromatograma de ión extraído correspondiente a Azul Brillante FCF (B), con una concentración de 18,83 mg/L y, para la muestra 4, se determinó una concentración de 3,34 mg/L para Tartracina.



**Figura 14.** Cromatogramas EIC correspondientes a Carmoisina (A) con  $m/z$  228,0048, Azul brillante FCF (B) con  $m/z$  373,0719 y Tartracina (C) con  $m/z$  469,0118.

En la **Figura 15** se muestran, en la parte izquierda, los espectros de masas obtenidos de los picos cromatográficos de Carmoisina en la muestra 1 (7,69 minutos) (A), Azul brillante FCF en la muestra 2 (7,84 minutos) (C) y Tartracina en la muestra 4 (4,80 minutos) (E); además, también se observan, en la parte derecha de la figura, los espectros de masas correspondientes a los estándares de cada analito a una concentración de 1 mg/L. Para la identificación de los compuestos estudiados se obtiene un  $m/z$  experimental de cada espectro, el cual debe compararse con el  $m/z$  teórico para calcular el error relativo de masa medida.



**Figura 15.** Espectros de masas extraídos correspondientes a Carmoisina, en la muestra 1 (A) y su patrón a 1 mg/L (B), Azul Brillante FCF, en la muestra 2 (C) y su patrón a 1 mg/L (D), y Tartracina, en la muestra 3 (E) y su patrón a 1 mg/L (F).

En la **Tabla 9** se muestran los colorantes artificiales (en base a su código E) y si se ha producido su identificación y cuantificación (mg/L) o no (*No Determinado, N.D.*) en las muestras.

**Tabla 9.** Determinación de colorantes artificiales en las muestras.

Colorante	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4
E 102	N.D.	N.D.	N.D.	3,34 mg/L
E 122	34,7 mg/L	N.D.	N.D.	N.D.
E 129	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
E 133	N.D.	18.9 mg/L	N.D.	N.D.

Una vez calculadas las concentraciones de los colorantes Carmoisina (E 122) y Azul Brillante FCF (E 133), también se pueden determinar las cantidades añadidas de estos compuestos en cada envase de golosina líquida de 100 mL.

Los niveles de Carmoisina en la muestra 1, 34,7 mg/L, están por debajo del límite máximo establecido (50 mg/L) (Reevaluación EFSA, 2009). Se calculó que la cantidad presente de este colorante es de 3,47 mg en cada envase de golosina líquida (100 mL). La cantidad diaria recomendada de este colorante alimentario para un niño o niña de 8 años, con un peso medio de 23,5 kg, sería de 94 mg, en base al valor recomendado por la EFSA (4 mg/kg peso corporal). Por tanto, se observa que la cantidad presente en este producto no es perjudicial para los niños; para que hubiera efectos negativos, se deberían de ingerir alrededor de 28 unidades de la golosina líquida.

Las concentraciones de Azul Brillante en la muestra 2, 18,9 mg/L, están por debajo de los límites establecidos por la Unión Europea (100 mg/L) (Reevaluación EFSA, 2009). La cantidad calculada de este colorante alimentario para cada envase de golosina líquida es 1,89 mg por cada 100 mL. La cantidad diaria recomendada, para un supuesto niño o niña de 8 años y 23,5 kg, es de 141 mg, basándose en los 6 mg/kg peso corporal que recomienda la EFSA. Se puede confirmar que la cantidad presente en el producto no es perjudicial; para que empezara a observarse efectos negativos, habría que tomar 75 unidades de esta golosina líquida.

Las concentraciones de Tartracina en la muestra 4, 3,34 mg/L, son inferiores a los límites máximos permitidos por la legislación europea (100 mg/L) (Reevaluación EFSA, 2009). Se calculó que la cantidad de este colorante alimentario para cada envase de golosina líquida es de 0,33 mg por cada 100 mL. La cantidad diaria recomendada de este compuesto para un supuesto niño o niña de 8 años y 23,5 kg sería de 176 mg aproximadamente, según el valor recomendado por la EFSA (7,5 mg/kg peso corporal). Se comprueba que la cantidad presente de dicho colorantes alimentario en este producto no es perjudicial para los niños; para que hubiera efectos negativos, se deberían tomar unas 534 unidades del producto.

## 6. CONCLUSIONES

En este Trabajo Fin de Máster se ha desarrollado un método capaz de identificar y cuantificar colorantes artificiales en alimentos, concretamente en golosinas líquidas, utilizando como técnica UHPLC-TOFMS. Mediante el uso de esta técnica, se pudieron determinar los 12 colorantes alimentarios artificiales estudiados (Tartracina, Amarillo de quinoleína, Amarillo anaranjado, Carmoisina, Rojo Allura AC, Ácido carmínico, Azul Brillante FCF y Sudán (I-IV)), en un único análisis de 25 minutos. Se estudiaron varias fases móviles, así como diversos parámetros analíticos (LOD, LOQ, etc.) con la intención de optimizar el método. Se comprobó que el método desarrollado es más sensible que otros publicados. (Noguerol-Cal, *et al.*, 2008) (Tsai *et al.*, 2015)

Para poder aplicar el método desarrollado a muestras reales, se optó por hacer un tratamiento de muestra basado en extracción en fase sólida, con la finalidad de purificar y separar los colorantes del resto de los componentes de la muestra.

En base al color observado y la etiqueta de cada envase, se ha confirmado la presencia de los colorantes esperados en su composición. Esto es, la muestra 1, de color rojo, contiene colorante artificial Carmoisina en una concentración 34,7 mg/L; mientras que la muestra 2, de color azul, contiene colorante Azul Brillante FCF en una concentración de 18,8 mg/L. Por último, la muestra 4, de color amarillo, contiene colorante Tartracina en una concentración de 3,34 mg/L.

En cuanto a legislación europea, el fabricante de los productos utilizados cumple con la normativa establecida, ya que:

➤ En base a los resultados obtenidos, se ha comprobado que las concentraciones de colorantes alimentarios artificiales no superan los límites máximos permitidos para Carmoisina (50 mg/L), Azul Brillante (100 mg/L) y Tartracina (100 mg/L).

➤ Dado que los productos contienen los colorantes alimentarios Tartracina (E 102), Carmoisina (E 122) y Rojo Allura AC (E 129), en su etiqueta tienen información adicional respecto al efecto negativo de sobre la actividad y atención de los niños con el uso de estos compuestos (**Tabla 1**).



## 7. BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Ardrey, R.E., *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction*, 2003, Ed. Wiley.
- ❖ Calbiani, F., Careri, M., Elviri, L., Mangia, A., Zagnoni, I., Accurate mass measurements for the confirmation of Sudan azo-dyes in hot chilli products by capillary liquid chromatography-electrospray tandem quadrupole orthogonal-acceleration time of flight mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1058 (2004), 127-135.
- ❖ Codex Alimentarius, Norma General para los Aditivos Alimentarios, *Codex Stan 192-1995*, Revisión 2017.
- ❖ Consulta sobre leyes de la Unión Europea referentes a aditivos alimentarios (En línea): <http://eur-lex.europa.eu/homepage.html>
- ❖ Consulta sobre leyes de los Estados Unidos referentes a aditivos alimentarios (En línea): <https://www.fda.gov/Food/default.htm>
- ❖ Downard, K., *Mass Spectrometry: A Foundation Course*, 2004, Ed. Royal Society of Chemistry.
- ❖ EFSA, Review the toxicology of a number of dyes illegally present in food in the EU, *The EFSA Journal*, 2005.
- ❖ EFSA, Scientific Opinion on the re-evaluation of Brilliant Blue FCF (E 133) as a food additive, *EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food*, 2010.
- ❖ EFSA, Scientific Opinion on the re-evaluation of Allura Red AC (E 129) as a food additive, *EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food*, 2009.

- ❖ EFSA, Scientific Opinion on the re-evaluation of Carminic acid (E 120) as a food additive, *EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food*, 2015.
- ❖ EFSA, Scientific Opinion on the re-evaluation of Carmoisine (E 122) as a food additive, *EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food*, 2009.
- ❖ EFSA, Scientific Opinion on the re-evaluation of Quinoline Yellow (E 104) as a food additive, *EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food*, 2009.
- ❖ EFSA, Scientific Opinion on the re-evaluation of Sunset Yellow FCF (E 110) as a food additive, *EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food*, 2009.
- ❖ EFSA, Scientific Opinion on the re-evaluation of Tartrazine (E 102) as a food additive, *EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food*, 2009.
- ❖ Ferrer, C., Fernández-Alba, A. R., Ferrer, I., Analysis of ilegal dyes in food by LC/TOF-MS, *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 87 (2007), 999-1012.
- ❖ Fuh, M., Chia, K., Determination of sulphonated azo dyes in food by ion-pair liquid chromatography with photodiode array and electrospray mass spectrometry detection, *Talanta*, 56 (2002), 663-671.
- ❖ García-Garibay, M., Biotecnología alimentaria, *Capítulo 16: Producción de colorantes*, 1993, México D.F., Ed. Limusa.

- ❖ IARC. Consulta de la clasificación de sustancias carcinogénicas (En línea): [http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/latest\\_classif.php](http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/latest_classif.php)
  
- ❖ Kucharska, M., Grabka, J., A review of chromatographic methods for determination of synthetic food dyes, *Talanta*, 80 (2010), 1045-1051.
  
- ❖ López-Gutiérrez, N., Determinación de colorantes alimentarios en productos alimenticios del mar, *Trabajo Fin de Máster, Máster Universitario Oficial en Residuos de Plaguicidas y Contaminantes. Control Alimentario y Ambiental*, Universidad de Almería, 2011.
  
- ❖ McCann, D., Barrett, A., Cooper, A., Crumpler, D., Dalen, L., Grimshaw, K., Kitchin, E., Lok, K., Porteous, L., Prince, E., Sonuga-Barke, E., O'Warner, J., Stevenson, J., Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: a randomised, double-blinded, placebo-controlled trial, *Lancet*, 370 (2007), 1560-1567.
  
- ❖ Ma, M., Luo, X., Chen, B., Su, S., Yao, S., Simultaneous determination of water-soluble and fat-soluble synthetic colorants in foodstuff by high-performance liquid chromatography-diode array detection-electrospray mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1103 (2006), 170-176.
  
- ❖ Noguerol-Cal, R., López-Vilariño, J.M., Fernández-Martínez, G., Barral-Losada, L., González-Rodríguez, M.V., High-performance liquid chromatography analysis of ten dyes for control of safety of commercial articles, *Journal of Chromatography A*, 1179 (2008), 152-160.
  
- ❖ Nollet, L. (ed.), Toldrá, F. (ed.), Beatriz, M., Glória, A., Fernandes, C., Handbook of Food Analysis, *Capítulos 8: Colorantes sintéticos*, 2015, Ed. CRC Press.
  
- ❖ Pardo, O., Yusà, V., León, N., Pastor, A., Development of a method for the analysis of seven banned azo-dyes in chilli and hot chilli food samples by

pressurised liquid extraction and liquid chromatography with electrospray ionization-tandem mass spectrometry, *Talanta*, 78 (2009), 178-186.

- ❖ Primo Yúfera, E., Química de los alimentos, *Capítulo 13: Aditivos*, 1998, Madrid, Ed. Síntesis.
- ❖ Qi, P., Zeng, T., Wen, Z., Liang, X., Zhang, X., Interference-free simultaneous determination of Sudan dyes in chili foods using solid phase extraction coupled with HPLC-DAD, *Food Chemistry*, 125 (2011), 1462-1467.
- ❖ Rebane, R., Leito, I., Yurchenko, S., Herodes, K., A review of analytical techniques for determination of Sudan I-IV dyes in food matrixes, *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010), 2747-2757.
- ❖ Scotter, M.J. (ed.), *Colour Additives for Foods and Beverages*, 2015, WoodHead Publishing.
- ❖ Seguridad Alimentaria y Nutricional, FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*), 2011. (En línea): <http://www.fao.org/3/a-at772s.pdf>
- ❖ Sun, H., Wang, F., Ai, L., Determination of banned 10 azo-dyes in hot chili products by gel permeation chromatography-liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1164 (2007), 120-128.
- ❖ Tsai, C., Kuo, C., Shih, D., Determination of 20 synthetic dyes in chili powders and syrup-preserved fruits by liquid chromatography/tándem mass spectrometry, *Journal of Food and Drug Analysis*, 23 (2015), 453-462.
- ❖ Xu, H., Heinze, T.M., Paine, D.D., Cerniglia, C.E., Chen, H., Sudan azo dyes and Para Red degradation by prevalent bacteria of the human gastrointestinal tract, *Anaerobe*, 2009, 1-6.

- ❖ Yamjala, K., Nainar, M.S., Remiseti, N.R., Methods for the analysis of azo dyes employed in food industry – A review, *Food Chemistry*, 192 (2016), 813-824.