

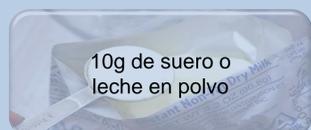
ABSTRACT

Benzoyl Peroxide (BP) has been used for more than 50 years as a bleaching agent in four and white cheese industries. Added Benzoyl Peroxide is decomposed easily to Benzoic Acid (BA), so it is necessary to analyze Benzoic Acid too in order to control the use of Benzoyl Peroxide. Uruguay exports dairy products, so the control of these analytes in these products is necessary. Besides, there are no normalized methods or modern chromatographic methods to control the presence of both analytes in dairy products. Due to this, we developed and validated chromatographic methods in order to analyze BP and BA in dairy products. This work shows the development of an HPLC-DAD method to analyze Benzoyl Peroxide and Benzoic Acid in whey and powder milk. Samples are extracted with acetonitrile and filtered previous to the HPLC-DAD analysis using reversed phase. The technique is fit for purpose and meets the validation criteria of AOAC International

INTRODUCCIÓN

Existen a nivel internacional diferentes regulaciones en cuanto al uso del Peróxido de Benzoilo en la industria. Por ejemplo en Uruguay el uso está permitido solo en harinas y en algunos tipos de quesos. El Codex Alimentarius establece su uso en sueros líquidos y en polvo (salvo para su uso posterior en fórmulas infantiles) y en harinas, con niveles máximos de 100 y 75 mg/kg respectivamente. La FDA ha listado al Peróxido de Benzoilo como GRAS (Generally Recognized As Safe) cuando es usado como blanqueador en los alimentos mencionados anteriormente y siguiendo las Buenas Prácticas de Manufactura durante su uso. Sin embargo, países como China han prohibido su uso en todo tipo de alimentos. Debido a que Uruguay es un país exportador de productos lácteos, es necesaria una metodología para analizar la posible presencia de Peróxido de Benzoilo en los mismos. Como el Peróxido de Benzoilo adicionado se descompone fácilmente a Acido Benzoico incluso durante los procesos de elaboración, es necesario analizar la presencia de Acido Benzoico en el producto final. Debido a que no hay métodos normalizados para la determinación de estos analitos en productos lácteos, así como tampoco métodos modernos publicados, nuestro laboratorio desarrolló y validó metodologías para determinar conjuntamente Peróxido de Benzoilo y Acido Benzoico en distintos productos lácteos.

PARTE EXPERIMENTAL



10g de suero o
leche en polvo



Agregar 50,0mL
de Acetonitrilo



Extraer con agitador
magnético a temperatura
ambiente por 30 minutos.



Filtrar por 0,22µm



HPLC



Equipamiento.

HPLC: Agilent 1100 y Shimadzu LC-20AT
Columna: C18 Phenomenex Luna 250 mm x 4,6 mm x 5 µm
Flujo: 1 mL/min
Temperatura horno: 25°C
Detector: DAD, λ = 235nm

PARAMETROS DE VALIDACIÓN

PARAMETROS				RESULTADOS		ESPECIFICACIÓN AOAC	
				ÁCIDO BENZOICO	PERÓXIDO DE BENZOILO		
EXACTITUD	VERACIDAD	RECUPERACIÓN	SUERO EN POLVO	1 µg/g	112% (n=11)	91% (n=23)	75-120%
			10 µg/g	106% (n=11)	91% (n=11)	80-115%	
		LECHE EN POLVO	1 µg/g	93% (n=6)	92% (n=6)	75-120%	
		10 µg/g	95% (n=6)	91% (n=6)	80-115%		
	PRECISIÓN	REPETIBILIDAD RSDr (n=6)	SUERO EN POLVO	1 µg/g	3,2-3,6 %	2,1-16,0 %	< 16%
			10 µg/g	6,8%	7,3%	< 12%	
		REPRODUCIBILIDAD INTERMEDIA iRSD _R	LECHE EN POLVO	1 µg/g	0,9-4,0 %	1,9-4,8 %	< 16%
			10 µg/g	4,2%	5,2%	< 12%	
LINEALIDAD				0,1- 430 ng en columna r ² = 0,999 n=16 Residuales aleatorios	0,1- 316 ng en columna r ² = 0,999 n=16 Residuales aleatorios	----	
LÍMITE DE DETECCIÓN				0,1 µg/g		----	
LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN				1 µg/g		----	
EFECTO MATRIZ				3,6% despreciable	0,7% despreciable	----	
SELECTIVIDAD				En las condiciones cromatográficas ensayadas no se evidencian interferencias en las distintas muestras.		----	
ROBUSTEZ				Las muestras una vez extraídas deben ser inyectadas antes de las 10h. El peróxido de benzoilo se descompone en ácido benzoico como producto principal por un mecanismo radicalario. Ver figura 2. Las soluciones de estándares son estables al menos por 12días a 4°C y protegidos de las luz.		----	

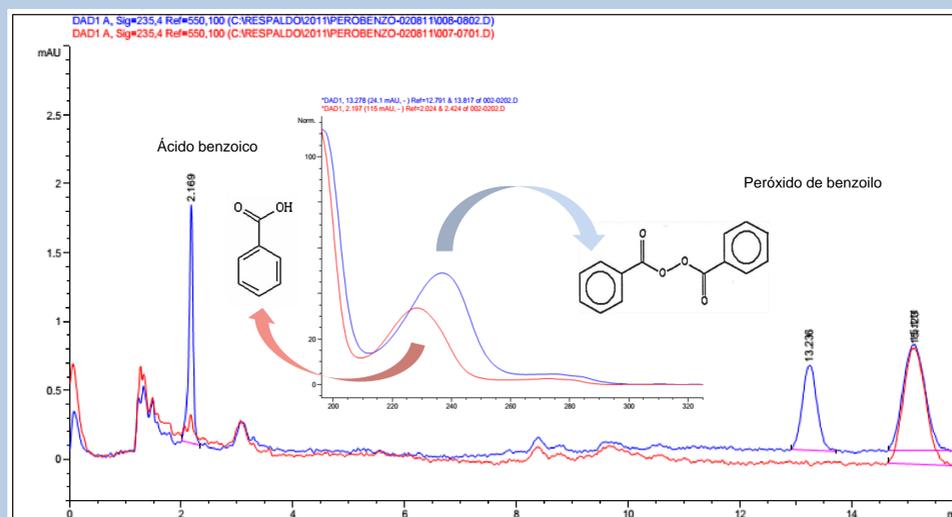


Figura 1- cromatograma típico de muestra (en rojo) y su fortificado (en azul).

CONCLUSIÓN

Este trabajo muestra el desarrollo de un método rápido de HPLC-DAD para analizar peróxido de benzoilo y ácido benzoico en sueros de leche y leches en polvo. La técnica es adecuada para el propósito y cumple con los criterios de validación de la AOAC Internacional.

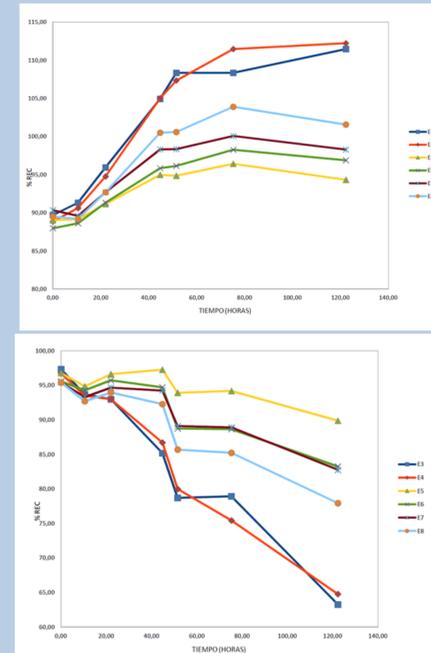


Figura 2 a- arriba: curva de formación del ácido benzoico a partir de peróxido de benzoilo. b- abajo: curva de degradación del peróxido de benzoilo. En las ordenadas figura el tiempo transcurrido entre la extracción y la inyección en el HPLC