



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Determinación de edulcorantes artificiales en bebidas

Alumno: Virginia Joyanes Cárdenas

Julio, 2014



UNIVERSIDAD DE JAÉN

FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA Y
ANALÍTICA

GRADO EN QUÍMICA
Trabajo Fin de Grado

Determinación de edulcorantes artificiales en bebidas

VIRGINIA JOYANES CÁRDENAS

JAÉN, JULIO 2014

Resumen

En este trabajo de fin de grado, se ha desarrollado un método para la determinación simultánea de varios edulcorantes (acesulfamo-K, sacarina, ciclamato, aspartamo y sucralosa) en bebidas empleando extracción en fase sólida (SPE) seguida de cromatografía líquida de alta resolución acoplada con espectrómetro de masas (HPLC-MS) con un analizador de tiempo de vuelo (TOF) y una fuente de ionización de electrospray en modo negativo (ESI). Con el método SPE desarrollado, las recuperaciones obtenidas fueron próximas al 100% con valores de desviación estándar por debajo del 10% en la mayoría de los casos. Los límites de cuantificación (LOQ) para acesulfamo-K, sacarina, ciclamato, aspartamo y sucralosa fueron 2.37, 3.78, 3.47, <1 y 14.70 µg/L respectivamente. El método propuesto fue aplicado al estudio de 31 muestras de diferentes marcas de refrescos. El rango de concentración se encuentra entre 2,5 y 153,5 mg/L. En ningún caso se superan los valores especificados por las diferentes normativas aplicables.

Abstract

In this work, a method for simultaneous determination of five sweeteners (acesulfame-K, saccharin, cyclamate, aspartame and sucralose) in soft drinks has been developed based on solid-phase extraction (SPE) followed by high performance liquid chromatography/mass spectrometry (HPLC-MS) using a time-of-flight analyzer (TOF) and a electrospray ionization source operated in the negative ion mode. With the proposed SPE sample treatment method, recovery rates obtained were close to 100% with RSD values below 10% for most of cases. Limits of quantification for acesulfame-K, saccharin, cyclamate, aspartame and sucralose were 2.37, 3.78, 3.47, <1 y 14.70µg/L respectively. The proposed method was applied to 31 samples of different brands of soft drinks. Range of concentration was between 2,5 and 153,5mg/L. All cases tested were in compliance with the established regulations.

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1. Edulcorantes	1
1.2. Tipos y clasificación	1
1.2.1. Edulcorantes naturales	1
1.2.2. Edulcorantes artificiales	2
1.2.3. Edulcorantes de origen vegetal	3
1.3. Efectos sobre la salud y toxicidad	4
1.4. Legislación	6
1.4.1. Legislación europea	7
1.4.2. Legislación española	8
1.5. Métodos de análisis	9
1.5.1. Extracción en fase sólida (SPE)	11
1.5.2. Acoplamiento HPLC-MS	12
1.6. Objetivos del trabajo	15
2. Experimental	16
2.1. Reactivos y patrones	16
2.2. Muestras	16
2.3. Procedimiento	18
2.3.1. Extracción en fase sólida de edulcorantes	18
2.3.2. Instrumental y método HPLC-TOFMS	20
3. Resultados y discusión	21

3.1. Optimización del método HPLC	21
3.2. Identificación de edulcorantes mediante HPLC-TOFMS	23
3.3. Parámetros analíticos	26
3.3.1. Optimización de la SPE y factor de dilución	26
3.3.2. Estudios de recuperación	26
3.3.3. Límite de cuantificación y detección	27
3.4. Análisis de edulcorantes en muestras reales	28
4. Conclusiones	33
REFERENCIAS	34

1. Introducción

1.1. Edulcorantes

Se conoce como edulcorante a cualquier sustancia que endulza, es decir, que sirve para dotar de sabor dulce a un alimento que carece de este. Los edulcorantes artificiales nacen con la necesidad de encontrar un sustituto del azúcar que contentan el mismo poder endulzante y mejoren las propiedades de los productos alimenticios. Cuando contienen este tipo de aditivo se denominan productos “light” o bajos en calorías.

Las finalidades que se le atribuyen a los edulcorantes es reducir las calorías que aporta el azúcar manteniendo el sabor y favorecer la pérdida de peso. Esta última es la principal razón del aumento de la demanda de estos productos. En personas con diabetes o hipoglucemia reactiva es recomendable tomar este tipo de alimentos.

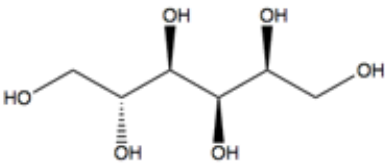
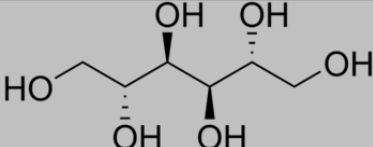
1.2. Tipos y clasificación

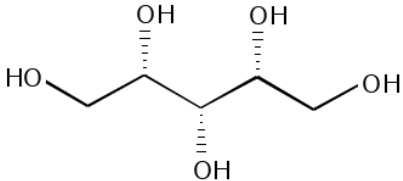
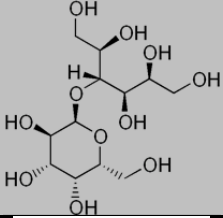
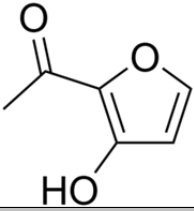
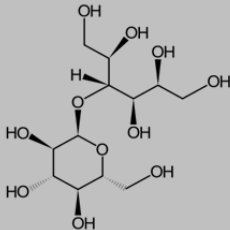
Hay varias formas de clasificar los edulcorantes. En la siguiente clasificación se pueden distinguir entre edulcorantes naturales, artificiales y de origen vegetal.

1.2.1. Edulcorantes naturales

Se extraen de la caña de azúcar y de la remolacha. Este tipo de edulcorantes son menos dulces que el azúcar. Se desarrollarán varios polioles (alcohol de azúcar) en la **Tabla 1** los cuales son más difíciles de extraer por lo que son menos rentables y no provocan caries.

Tabla 1: Edulcorantes naturales

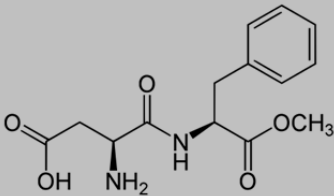
Monosacáridos			
Edulcorante	Estructura	Propiedades [1]	Siglas
Sorbitol		Sólido higroscópico, se obtiene por reducción de la glucosa, se metaboliza lentamente.	E420
Manitol		Sólido higroscópico, se obtiene por hidrogenación de manosa.	E421

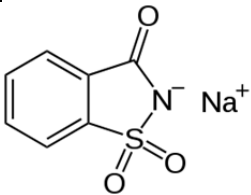
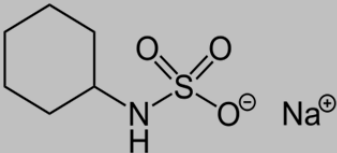
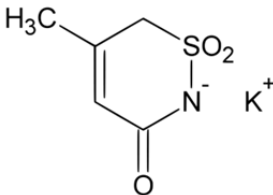
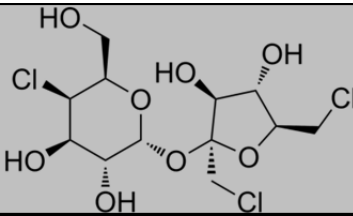
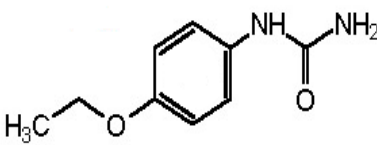
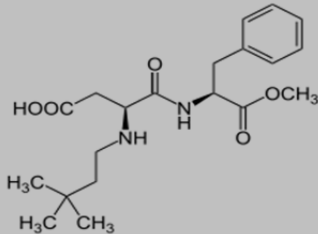
Xilitol		Se obtiene por la reducción del azúcar xilosa.	E967
Disacáridos			
Edulcorante	Estructura	Propiedades [1]	Siglas
Lactitol		Se obtiene a partir de la lactosa, gran estabilidad y solubilidad.	E966
Isomaltol		Furano obtenido por la degradación enzimática del almidón, insoluble en agua.	E953
Maltitol		Se sintetiza por hidrogenación de maltosa, no afecta al sabor de los alimentos.	E965

1.2.2. Edulcorantes artificiales

Se consideran de este tipo aquellos que son obtenidos sintéticamente. Normalmente suelen proporcionar un mayor poder endulzante sin aporte adicional de calorías (**Tabla 2**). Sin embargo, en algunos casos hay cierta controversia sobre la conveniencia de su consumo.

Tabla 2: Edulcorantes artificiales

Edulcorante	Estructura	Propiedades [1]	Siglas
Aspartamo		200 veces más dulce que el azúcar, polvo blanco, cristalino, sin olor, inestable a T ^a ambiente y pH.	E951

Sacarina		300 veces más dulce que el azúcar, sal sódica, sabor amargo, resistente al calor y medios ácidos.	E954
Ciclamato		30 veces más dulce que el azúcar.	E952
Acesulfamo-K		200 veces más dulce que el azúcar, soporta altas Tª, no se metaboliza, se elimina rápidamente por vía renal.	E950
Sucralosa		600 veces más dulce que el azúcar, estable frente a Tª y pH, se elimina un porcentaje, el otro se metaboliza.	E955
Dulcina		600 veces más dulce que el azúcar, estable en medio ácido y a altas Tª.	-
Neotamo		10000 veces más dulce que el azúcar, estable al calor y eliminado rápidamente.	E961

1.2.3. Edulcorantes de origen vegetal

En la **Tabla 3** se encuentran extractos vegetales que pueden extraerse directamente o modificarse químicamente para que aparezca su poder edulcorante o se intensifique.

Tabla 3: Edulcorantes de origen vegetal

Edulcorante	Propiedades [1]	Siglas
Esteviósido	300 veces más dulce que el azúcar, reduce la absorción de hidratos de carbono, estable frente al calor.	E960

Taumatina	2500 veces más dulce que el azúcar, el más poderoso de esta clasificación, se metaboliza, estable a Tª y pH.	E957
Monelina	2000 veces más dulce que el azúcar, inestable con variación de Tª y pH extremos	-
Miraculina	200 veces más dulce que el azúcar, inhibe los receptores que detectan el sabor ácido y amargo.	-

1.3. Efectos sobre la salud y toxicidad

En los últimos años se han realizado investigaciones sobre los efectos de los edulcorantes para comprobar si realmente benefician a las personas.

Un estudio con ratas donde se comparaba sacarosa, aspartamo y sacarina determinó que en las mismas condiciones aquellos roedores que tomaron los edulcorantes artificiales aumentaron de peso [2].

Otros estudios relacionados con estos mismos analitos concluyeron que el aumento de peso no estaba relacionado con la ingesta de calorías, está causado por el aumento del apetito que causa el sabor dulce sin calorías [3, 4] lo que también provoca un desajuste metabólico, tomar edulcorantes activa el metabolismo igual que si se tratase del azúcar produciendo secreción de insulina que no puede actuar sobre nada [5].

Existen varias investigaciones en humanos. Una de ellas se examinó a adultos durante siete u ocho años, con características de género y alimentaciones similares donde midiendo el índice de masa corporal (IMC) se obtuvo un aumento de peso en los que tomaban bebidas edulcoradas [6].

Aunque en los últimos años se han realizado numerosas investigaciones, ya en la década de los 80 se estudiaban los edulcorantes en especial la sacarosa en mujeres donde se obtenían los mismos resultados [7, 8].

A pesar de todos los estudios se está sustituyendo el azúcar por estas sustancias en muchos productos alimentarios, la razón es que para las industrias sale mucho más rentable el uso de edulcorantes artificiales debido a que endulzan mucho más con menor cantidad y su producción no es cara. Estos son los motivos por esto se hacen grandes campañas publicitarias para promover el consumo de este tipo de bebidas o alimentos.

Desde que se empezaron a utilizar los edulcorantes artificiales para productos alimenticios, se han realizado estudios para determinar los posibles efectos perjudiciales en el organismo, además de legislar concentraciones máximas permitidas. Algunas de las organizaciones que se encargan de esto son la Administración de Alimentos y Fármacos (FDA), la Autoridad de Seguridad Alimentaria Europea (EFSA), el Comité Científico de la Alimentación Humana (CCAH) y la Organización Mundial de la Salud (OMS).

A continuación se describe la información sobre la toxicidad disponible para cada uno de los edulcorantes artificiales [9].

Aspartamo: La ingesta diaria recomendada es de alrededor de 40 mg/kg de peso corporal aunque existe una pequeña variación en la cantidad dependiendo de la organización. Hay numerosos estudios relacionando el aspartamo y determinadas enfermedades, todos ellos rechazados por la FDA y EFSA, que han determinado que el consumo de este edulcorante dentro del nivel recomendado es seguro para los seres humanos. El aspartamo se transforma en el organismo en ácido aspártico y fenilalanina. Este último tiene que estar especificado en el producto ya que si afecta a los que sufren fenilcetonuria, una enfermedad hereditaria poco común.

Sacarina: Se recomienda un consumo máximo de 6 mg/Kg de peso corporal. Existen dudas sobre las consecuencias que podría producir. Por esto hay países donde se ha prohibido totalmente su uso como son Francia y Canadá, y otros como en Estados Unidos, que permiten su uso siempre y cuando este indicado en los productos. Esta situación está cambiando y en algunos estados se está empezando a aceptar.

Ciclamato: 11 mg/kg de peso corporal es cantidad recomendada, ha sido estudiado intensamente, aparecen opiniones distintas entre las distintas organizaciones, en Estados Unidos se ha retirado el ciclamato de todos los productos y en algunas zonas de Latinoamérica por la FDA, mientras que en países de Europa, como España se usa. Destacando que este edulcorante puede pasar a ciclohexilamina en el tracto intestinal pudiendo ser cancerígeno.

Acesulfamo k: IDA (Ingesta Diaria Admisible) de 15 mg/kg de peso corporal, está permitido en más de 90 países, entre ellos España y gran parte de los países europeos, Estados Unidos, Australia y Japón, etc. Después de todos los estudios realizados, no se ha determinado que provoque algún tipo de trastorno en el organismo, en gran parte porque se elimina rápidamente sin ser degradado.

Sucralosa: Se aconseja no superar 5 mg/kg de peso corporal al día, junto con al acesulfamo-K es una de las más aceptadas, siendo aceptada por la FDA entre otras, a pesar de que por lo general se considera como no tóxica, existe una preocupación con el cloro que se pudiese desprender al metabolizar la sucralosa y que pueda acusar efectos tóxicos que aún no hayan podido determinarse.

Dulcina: Alrededor de 1950 se prohibió debido a que cuando se hidroliza genera p-aminofenol, demostrado que produce cáncer hepático.

Neotamo: Presenta estructura similar al aspartamo, la diferencia con este hace que se reduzca la producción de fenilalanina. Esta es la razón por la que no es necesario indicar su contenido en las etiquetas. Estudios que se han realizado indican que no es cancerígeno.

1.4. Legislación

La Unión Europea regula el uso de edulcorantes en alimentos para todos sus países miembros, indicando el contenido máximo según el tipo de producto, así como la pureza de estos o la cantidad máxima ingerida recomendada.

Para facilitar su reconocimiento se le asignan un código a cada uno para identificarlos en las etiquetas, este código consta de una letra (E) seguida de tres cifras.

Además de la Unión Europea existen otros organismos que se encargan de dar recomendaciones sobre el uso de estos aditivos que el respectivo gobierno deberá tener en cuenta a la hora de elaborar la legislación correspondiente, una de estos organismos en la OMS.

1.4.1. Legislación Europea

- Directiva 94/35/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 30 de junio de 1994 relativa a los edulcorantes utilizados en los productos alimenticios.

Donde se enumeran los distintos edulcorantes que pueden comercializarse para ser vendidos al consumidor o para utilizarlos en la fabricación de productos alimenticios, y sus condiciones de uso en los productos alimenticios. Las dosis sólo se refieren a los productos alimenticios listos para el consumo.

Modificaciones de esta directiva:

- Directiva 96/83/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 19 de diciembre de 1996 por la que se modifica la Directiva 94/35/CE.

Donde se incluye la prohibición de edulcorantes para lactantes o niños de corta edad.

- Directiva 2003/115/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de diciembre de 2003 por la que se modifica la Directiva 94/35/CE.

Se añade en un apartado que la sal de aspartamo y acesulfamo: “contiene una fuente de fenilalanina”.

- Directiva 2006/52/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 5 de julio de 2006 por la que se modifica la Directiva 94/35/CE.

Se cambian determinados valores en distintos alimentos.

- Directiva 2008/60/CE de la Comisión de 17 de junio de 2008 por la que se establecen criterios específicos de pureza de los edulcorantes que pueden emplearse en los productos alimenticios.
- Directiva 96/21/CE de la Directiva del Consejo, de 29 de marzo de 1996 que se establece que el etiquetado de los productos alimenticios debe incluir una

menCIÓN adecuada en la que se indique qué tipo de edulcorantes contienen. Deben incluirse menciones de advertencia en el etiquetado de los productos que contengan aspartamo o polioles.

- Directiva 2008/5/CE de la Comisión de 30 de enero de 2008 relativa a la indicación en el etiquetado de determinados productos alimenticios de otras menciones obligatorias.

Un ejemplo: «Envasado en atmósfera protectora», «Contiene una fuente de fenilalanina», «Contiene regaliz», etc.) para informar mejor al consumidor.

1.4.2. Legislación Española

- Real Decreto 3177/1983, de 16 de noviembre por el que se aprueba la reglamentación técnico-sanitaria de aditivos alimentarios.

Modificaciones de este Real Decreto:

- Real Decreto 1339/1988, de 28 de octubre, por el que se modifica el Real Decreto 3177/1983 de 16 de noviembre.

Se incluye una nueva denominación según el número de aditivos y la acción que producen.

- Real Decreto 1111/1991 de 12 de julio. por el que se modifica el Real Decreto 3177/1983 de 16 de noviembre y el Real Decreto 1339/1988 de 28 de octubre.

Regulación del uso de aditivos, que deben cumplir una serie de normas, y su clasificación según su acción.

- Real Decreto 2002/1995, de 7 de diciembre, por el que se aprueba la lista positiva de aditivos edulcorantes autorizados para su uso en la elaboración de productos alimenticios, así como sus condiciones de utilización.

- Real Decreto 2106/1996, de 20 de septiembre, por el que se establecen las normas de identidad y pureza de los edulcorantes utilizados en los productos alimenticios.

Modificaciones de este Real Decreto:

- Real Decreto 299/2009, de 6 de marzo, por el que se modifica el Real Decreto 2106/1996, de 20 de septiembre.

Que establece criterios específicos de pureza de los edulcorantes que pueden emplearse en los productos alimenticios.

1.5. Métodos de análisis

Los principales métodos de análisis para la determinación de edulcorantes emplean técnicas separativas como HPLC o electroforesis capilar.

En la siguiente **Tabla 4** se presenta un resumen de algunas de las metodologías descritas para el análisis de edulcorantes en alimentos y bebidas.

Tabla 4: Resumen de los principales métodos de análisis de edulcorantes descritos en la bibliografía

Matriz/muestra	Analitos	Rango de concentración	Método	Referencia
Agua potable	Sucralosa	10-2000 ng/L	SPE-LC-MS/MS	[10]
Refrescos de extractos	Acesulfamo K	116,75-399,13 mg/L	HPLC	[11]
	Aspartamo	153,69-876,42 mg/L		
	Sacarina	35,11-134,59 mg/L		
	Ciclamato	80,13-627,38 mg/L		
Zumos de fruta	Acesulfamo K	90,45-420,60 mg/L		
	Aspartamo	80,29-435,05 mg/L		
	Sacarina	40,01-55,24 mg/L		
	Ciclamato	70,10-583,94 mg/L		
Bebidas artificiales	Acesulfamo K	206,25-451,47 mg/L		
	Aspartamo	198,22-709,36 mg/L		
	Sacarina	65,77-76,91 mg/L		
	Ciclamato	203,68-621,75 mg/L		
Bebidas no alcohólicas	Neotamo	0.5–100 µg/mL	SPE/CZE	[12]

Bebidas	Ciclamato	6-200 mg/L	Microextracción/ CG	[13]
Coca-cola, zumo de frutas, leche	Sacarina	0,5-20 µg/mL	Cromatografía iónica	[14]
	Aspartamo	1-40 µg/mL		
	Acesulfamo K	1-40 µg/mL		
Comida	Sacarina	37,55-549,54 mg/L	Espectrofotometría	[15]
Fruta seca	Ciclamato	50-5000 ng/mL	HPLC-ESI MS	[16]
Refrescos	Ciclamato	113,14-280,07 mg/L	HPLC/UV	[17]
	Sacarina	17,96-50,94 mg/L		
	Aspartamo	9,94-296,82 mg/L		
Edulcorantes de mesa	Aspartamo	20-180 ng/L	HPLC	[18]
Edulcorantes de mesa	Aspartamo	10-100 µg/mL	FIA	[19]
	Acesulfamo K	40-100 µg/mL		
Bebidas	Aspartamo	0,02-8 mg/mL	RP-HPLC	[20]
	Ciclamato	0,02-8 mg/mL		
	Acesulfamo K	0,125- 50 µg/mL		
Refrescos (cola, naranja y guaraná) y edulcorantes de mesa	Aspartamo	20-100 mg/L	Electroforesis capilar (CE)	[21]
	Ciclamato	40-200 mg/L		
	Sacarina	20-60 mg/L		
	Acesulfamo K	20-100 mg/L		
Bebidas (vino, cerveza, zumo de naranja y manzana y té), melocotón mango y manzana confitada y pasteles	Aspartamo	0,2-20 µg/mL	HPLC/ESI-MS	[22]
	Sacarina	0,05-5 µg/mL		
	Acesulfamo K	0,1-15 µg/mL		
	Neotamo	0,1-10 µg/mL		
	Sucralosa	0,3-30 µg/mL		
	Ciclamato	0,05-5 µg/mL		
	Alitamo	0,08-8 µg/mL		
	Estevia	0,5-15 µg/mL		
Agua	Acesulfamo K	0,1-100 ng/L	SPE/HPLC- MS/MS	[23]
	Aspartamo	10-1000 ng/L		
	Ciclamato	5-1000 ng/L		
	NHDC	3-1000 ng/L		
	Sacarina	0,5-100 ng/L		
	Sucralosa	25-1000 ng/L		
Agua superficial y residuales	Acesulfamo K	0,4-53-7 µg/L	SPE/HPLC/MS	[24]
	Sucralosa			
	Ciclamato			
Vinagre	Acesulfamo K	0,01-05 mg/L	SPE-HPLC/ESI- MS	[25]
	Ciclamato			
	Sacarina			

Comida y refrescos	Aspartamo	L.plug: 5,8-294 mg/L	Electroforesis capilar (CE)	[26]
		S.plug: 73,5-294 mg/L		
	Ciclamato	L.plug: 3-201 mg/L		
		S.plug: 30,2-201 mg/L		
	Sacarina	L.plug: 3,1-205 mg/L		
		S.plug: 30,7-205 mg/L		
	Acesulfamo K	L.plug: 2-201 mg/L		
		S.plug: 20,1-201 mg/L		

La determinación de los edulcorantes en muestras líquidas se llevará a cabo mediante el acoplamiento de cromatografía de líquidos de alta resolución y espectrometría de masas (HPLC/MS) por obtener resultados precisos y fiables. Antes de realizar el análisis por HPLC/MS es necesario un pre-tratamiento de la muestra para eliminar los posibles interferentes que puedan provocar un error en el resultado o dificultar el análisis. Esta parte se llevará a cabo mediante una extracción en fase sólida (SPE).

1.5.1. Extracción en fase sólida (SPE)

La extracción en fase sólida (SPE) es una técnica de preparación de muestra. Es un proceso por el que la muestra se limpia para eliminar pigmentos, vitaminas o pesticidas entre otros además de concentrar la muestra. Es una técnica rápida, sencilla, emplea poco disolvente, es efectiva para compuestos polares y apolares y se puede automatizar. La SPE se basa en la retención sobre un adsorbente sólido de los compuestos deseados disueltos en una muestra líquida. Para ello se utilizan unos tubos desechables con forma de jeringa denominados cartuchos (**Figura1**). Existen de diferentes tamaños y tipos de adsorbentes dependiendo de esto se puede clasificar en distintos tipos:



Figura 1: Cartucho para SPE

- Fase reversa: la fase sólida es de sílice enlazada con cadenas alquílicas (tipo C18, C8 o C4) aunque existen alternativas a la sílice. Es apolar mientras que la fase líquida es polar por lo que se retienen los analitos no polares. Se producen interacciones hidrofóbicas por fuerzas de Van der Waals o puentes de hidrógeno que pueden romperse con acetonitrilo o metanol.
- Fase normal: al contrario que la anterior, la fase sólida es polar y la fase líquida es apolar reteniéndose los analitos polares. Se producen interacciones hidrofílicas como son puentes de hidrógeno o dipolo-dipolo.
- Intercambio iónico: la fase sólida está cargada. Las interacciones son electrostáticas. Pueden ser:

Intercambio catiónico débil: extracción de bases débiles.

Intercambio catiónico fuerte: extracción de bases fuertes.

Intercambio aniónico débil: extracción de ácidos fuertes.

Intercambio aniónico fuerte: extracción de ácidos débiles.

En este tipo de cartuchos de tipo aniónico o catiónico debe ajustarse cuidadosamente el pH de la muestra. Para la elución se debe interrumpir estas interacciones modificando el pH o incrementando la concentración de sal.

1.5.2. Acoplamiento HPLC/MS

El HPLC es una técnica que se utiliza para la determinación de componentes de una mezcla basándose en interacciones específicas que se producen entre los analitos y la columna a diferencia de la cromatografía de gases. No está limitado por la volatilidad o la estabilidad térmica de la muestra. Es capaz de separar macromoléculas y especies iónicas, productos naturales lábiles y materiales poliméricos. Se pueden clasificar en distintos tipos:

- Cromatografía de líquidos (HPLC) en fase normal: utiliza una fase estacionaria polar y una fase móvil apolar, y se utiliza cuando el compuesto de interés es bastante polar. A mayor polaridad más retención y aumenta el tiempo de retención.

- Cromatografía de líquidos (HPLC) en fase reversa: tiene una fase estacionaria apolar y una fase móvil de polaridad moderada. Eluyen primero las moléculas polares. Se basa en el principio de las interacciones hidrofóbicas. También tiene en cuenta la estructura. Por ejemplo, un compuesto con una cadena alquílica larga tendrá con un tiempo de retención mayor porque aumenta la hidrofobicidad de la molécula. Las sales inorgánicas y el pH también afectan la retención de los compuestos.
- Cromatografía de exclusión molecular (SEC): separa las partículas de la muestra en función de su tamaño. La fase estacionaria consiste en largos polímeros entrecruzados formando una red tridimensional porosa donde las partículas de mayor tamaño quedarán más retenidas. Tiene baja resolución por lo que se usa para procesos de purificación.

En este caso como detector se emplea un espectrómetro de masas. La espectrometría de masas permite analizar con gran precisión la composición de diferentes especies químicas separándolas en función de su relación masa/carga (m/z). En este caso se utiliza electrospray como fuente de ionización. Útil para la formación de iones a partir de macromoléculas añadiendo H^+ . Hay dos tipos de ionización:

- ESI en modo positivo, donde preferentemente se forma $[M+H]^+$.
- ESI en modo negativo, donde se forma preferentemente $[M-H]^-$. Este modo es el empleado para el estudio.

Los espectrómetros de masas se diferencian en función del tipo de analizador que se emplee. El analizador es el elemento clave del espectrómetro de masas, ya que permite la separación física de un haz de iones con valores de carga (normalmente $Z=1$) y masa muy parecida.

La separación de los iones está basada en principios físicos básicos relacionados con el comportamiento de partículas cargadas en el seno de campos magnéticos y/o eléctricos.

Los analizadores se pueden clasificar en función de sus características:

- En función de su resolución:
 - o Analizadores de alta resolución.
 - o Analizadores de baja resolución.

- En función de del modo de trabajo:
 - o Analizadores de MS sencillos.
 - o Analizadores masas/masas (MS/MS o en tándem).

Los principales equipos HPLC-MS usan los siguientes analizadores:

- Cuadrupolo sencillo (Q).
- Tiempo de vuelo (TOF).
- Trampa de iones (IT).
- Trampa de iones orbital (ORBITRAP).
- Triple cuadrupolo (QQQ).
- Analizador híbrido cuadrupolo-tiempo de vuelo (Q-TOF).

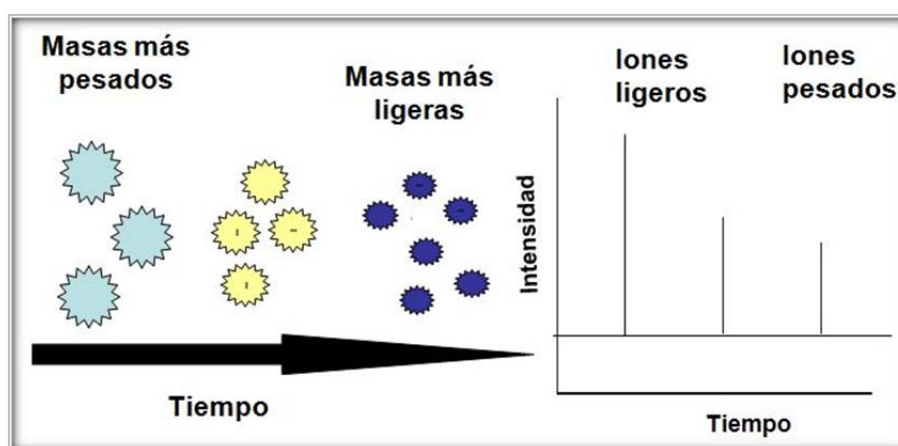


Figura 2: Fundamento de la separación de iones en un analizador de tiempo de vuelo (TOF)

En el presente estudio, se ha empleado un analizador de tiempo de vuelo. En la **Figura 2 y 3** se muestra el funcionamiento básico de este analizador.

El funcionamiento de este tipo de detector consiste en separar los iones según su masa mediante un impulso durante el cual se separan las partículas en función del tamaño. Llegando al detector las partículas de menor tamaño en primer lugar. Es un sistema rápido y sencillo.

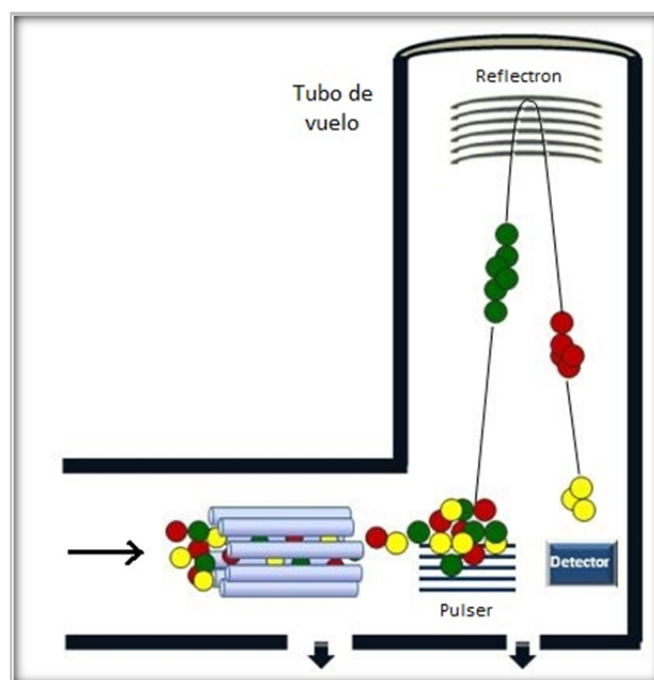


Figura 3: Esquema del funcionamiento del analizador de tiempo de vuelo (TOF)

1.6. Objetivos del trabajo

El objetivo del presente estudio es poner a punto un método de análisis para la determinación simultánea de edulcorantes artificiales en bebidas empleando técnicas separativas, así como la aplicación del método propuesto para la prospección y estudio de los niveles de concentración presentes en muestras reales.

Los objetivos específicos son los siguientes:

- Desarrollar y optimizar de un método eficaz para la detección y determinación de edulcorantes en distintas marcas de bebidas refrescantes.
- Estudiar muestras reales de supermercados y comprobar que los resultados coincidan con el etiquetado de las latas y que no superen la cantidad de edulcorantes establecida por las correspondientes organizaciones.

2. Experimental

2.1 Reactivos y patrones

Los patrones utilizados para su estudio son:

Aspartamo, acesulfamo K y ciclamato de la marca comercial Supelco analytical, la sacarina y sucralosa de la marca comercial Sigma Aldrich.

La cantidad pesada aproximadamente es de 25 mg de cada uno. Fueron pesados en una balanza analítica y disueltos en metanol hasta 50 ml en un matraz obteniendo concentraciones aproximadas de 500 mg/L y guardadas en el congelador a -20°C. Para la extracción en fase sólida se usan cartuchos Bond Elud Plexa (200 mg, 6ml). Para el HPLC se usa ácido fórmico, acetonitrilo para la fase móvil y un sistema de agua Mili-Q.

2.2 Muestras

En total se analizaron 31 muestras de distintas bebidas refrescantes. En la **Tabla 5** se incluyen las características.

Tabla 5: Descripción de las muestras analizadas

Nº de muestra	Nombre	Recipiente	Compañía	Edulcorantes*
1	Coca-cola zero	Lata 33cl	Coca-Cola™	ASP, CYC, ACE-K
2	Coca-cola light	Lata 33cl	Coca-Cola™	ASP, CYC, ACE-K
3	Pepsi zero Max	Lata 33cl	Pepsi-Cola™	ASP, ACE-K
4	Pepsi light	Lata 33cl	Pepsi-Cola™	ASP, ACE-K
5	Cola (alteza)	Lata 33cl	Font Salem S.L.	CYC, ACE-K, ASP
6	Cola discount	Lata 33cl	Carrefour S.A.	ACE-K, SUC
7	TAB	Lata 33cl	Coca-Cola™	ACE-K, CYC, SAC, ASP
8	Cola zero Carrefour	Lata 33cl	Carrefour S.A.	CYC, SUC
9	Cola light Carrefour	Lata 33cl	Carrefour S.A.	ACE-K, SUC
10	Naranja (alteza)	Lata 33cl	Font Salem S.L.	SUC

11	Fanta naranja zero	Lata 33cl	Coca-Cola™	ACE-K, ASP, SUC
12	Kas naranja	Lata 33cl	Pepsi-Cola™	SUC
13	Limón (alteza)	Lata 33cl	Font Salem S.L.	SUC
14	Fanta limón zero	Lata 33cl	Coca-Cola™	ACE-K, CYC, ASP
15	Schweppes limón	Lata 33cl	Schweppes™	SUC
16	Trina limón	Lata 33cl	Schweppes™	CYC, SUC
17	Schweppes limón zero	Lata 33cl	Schweppes™	CYC, ACE-K, SUC
18	7 up free	Lata 33cl	Pepsi-Cola™	ASP, ACE-K
19	Limón discount	Lata 33cl	Carrefour S.A.	ACE-K, SUC
20	La casera	Lata 33cl	Schweppes™	SAC, CYC
21	Blue tonic	Lata 25cl	Pepsi-Cola™	SUC
22	Schweppes light	Lata 33cl	Schweppes™	CYC, ACE-K, SAC
23	Casera discount	Lata 33cl	Carrefour S.A.	CYC, SAC
24	Aquarius	Lata 33cl	Coca-Cola™	ACE-K, SUC
25	Nestea limón	Lata 33cl	Nestlé Waters™	CYC, ACE-K, ASP
26	Nestea té	Lata 33cl	Nestlé Waters™	SUC
27	Shandy de manzana Carrefour	Lata 33cl	Carrefour S.A.	CYC, ACE-K, SAC
28	Shandy de limón Carrefour	Lata 33cl	Carrefour S.A.	ACE-K, SUC
29	Bitter kas	Lata 33cl	Pepsi-Cola™	SUC
30	Tinto la Casera	Lata 33cl	Schweppes™	CYC, ACE-K, SAC
31	Zumo	Botella 33cl	Solan de cabras	SUC, ACE-K

*ASP: aspartamo, CYC: ciclamato, SAC: sacarina, ACE-K: acesulfamo-K, SUC: sucralosa.

2.3 Procedimiento

2.3.1 Extracción en fase sólida (SPE)

Las finalidades de la SPE son:

- Aislar y preconcentrar los analitos.
- Eliminar interferentes para evitar que puedan dañar el detector o que no se pueda detectar correctamente los analitos.

El procedimiento SPE normal estándar es el siguiente.

1. Acondicionamiento: la preparación del adsorbente se consigue pasando un volumen de solvente o a través de la columna. Para activar adsorbentes hidrofóbicos se usa generalmente metanol o acetonitrilo, mientras que para los hidrofílicos se usa hexano o cloruro de metileno.
2. Adición de muestra: añadir la muestra por la parte superior del cartucho controlando el caudal para obtener una mayor eficacia. Los contaminantes de matriz pueden pasar por la columna sin ser retenidos, y otros componentes de la matriz pueden retenerse más o menos fuertemente en la superficie del adsorbente.
3. Lavado: el lavado permite la eliminación de cualquier resto de compuestos que puedan interferir manteniendo los analitos en el adsorbente. Se pueden usar solventes o mezcla de solventes de diferente tipo para mejorar la eficacia del lavado.
4. Elución: se pasa un solvente adecuado por la columna para eliminar la interacción analito-solvente y eluir el 100% de los compuestos de interés. El solvente adecuado ha de tener la máxima interacción con el analito y una interacción mínima con las demás impurezas, dejándolas en el lecho de adsorbente. El volumen de elución ha de ser el menor posible para mantener alto el factor de concentración.

Se ha procedido de la siguiente forma:

- Desgasificar las muestras.
- Acondicionar el cartucho con 2x4mL de metanol y 2x4 mL de agua.
- Cargar 4mL de muestra.
- Eluir con 2x4mL de metanol.
- Agitar con un Vortex.
- Evaporar empleando un sistema TurboVap a 10 bares de presión y un baño de agua a 35°C.
- Reconstituir con 100µL de metanol y 700µL de agua.
- Agitar con un Vortex
- Filtrar con una jeringa y un filtro de 0,45µm de poro para volúmenes inferiores a 1mL (PTFE filter, Millex FG, Millipore, Milford, MA) sobre un vial.
- Diluir 50µL de la muestra con 4,95mL de agua y congelar a -20°C.

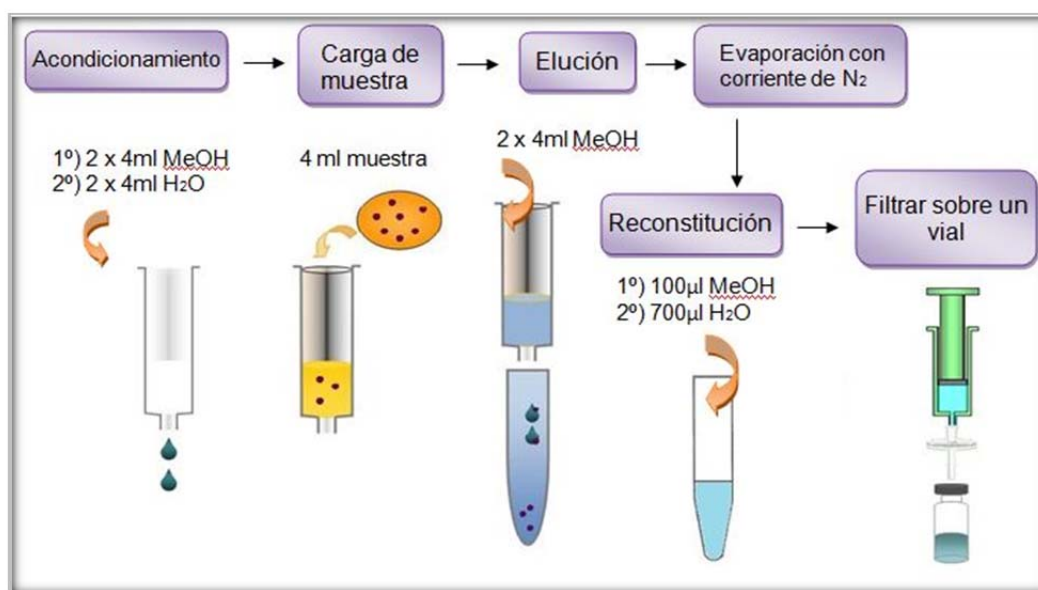


Figura 4: Esquema de pretratamiento de la muestra antes de medir

2.3.2. Instrumental y método HPLC-TOFMS

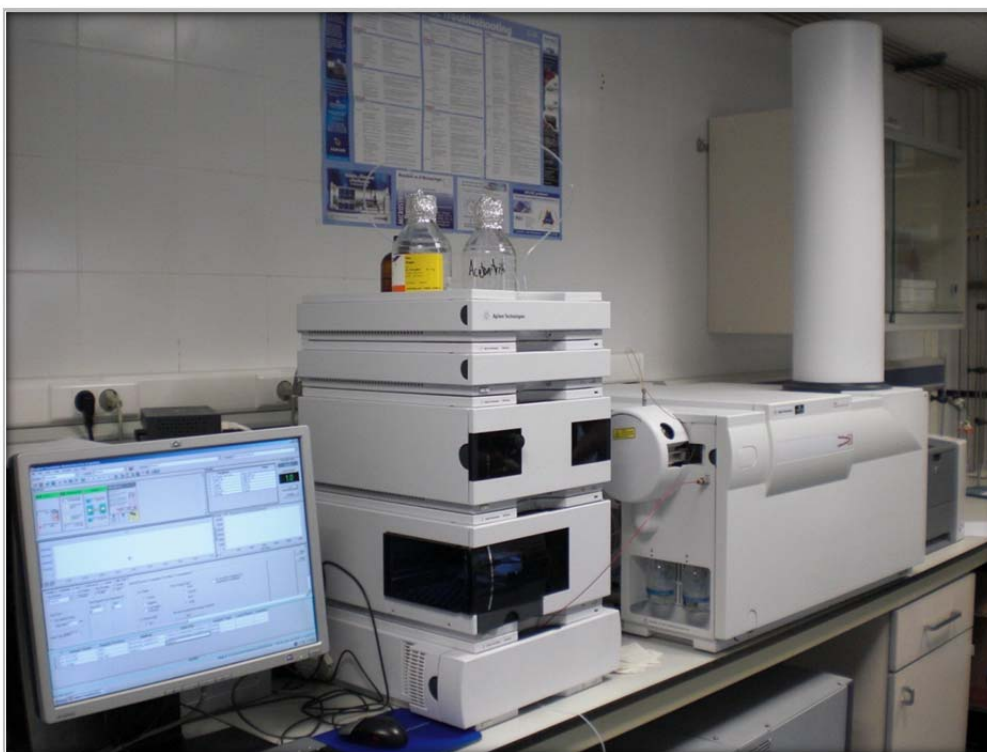


Figura 5: Fotografía del equipo HPLC-TOFMS empleado en el estudio

Las medidas se llevaron a cabo por HPLC (Agilent series 1290, Infinity Agilent Technologies, Santa Clara, EEUU) que consta de un automuestreador y una bomba binaria. Se empleó HPLC de fase reversa, es decir, la fase móvil es polar y se usará acetonitrilo mientras que la fase estacionaria es apolar y se utiliza una columna apolar del tipo C-18 (Agilent Zorbax XDB-C18). Lo primero en eluir serán los compuestos polares. Para la fase móvil A se usa agua Milli-Q con 0,1% de ácido fórmico que carga las moléculas para facilitar y mejorar la ionización electrospray y como fase móvil B se usa acetonitrilo. La columna analítica XDB-C18 utilizada es de 4,6mm x50mm y un tamaño de partícula de 1,8 μ m. Se trabaja a una presión de 200 bares aproximadamente.

El HPLC está acoplado a un espectrómetro de masas con un detector de tiempo de vuelo (Agilent Technologies, Santa Clara, EEUU) en modo negativo y compuesto por un electrospray como fuente de ionización (ESI) en modo de ionización negativo. En la **Tabla 6** se incluyen los parámetros con los que se llevó a cabo el análisis.

Tabla 6: Principales parámetros del método HPLC-TOFMS

HPLC	Columna		Columna C18 de 50 mm × 4.6 mm y 1.8 µm de tamaño de partícula (Agilent Zorbax XDB-C18)
	Flujo		0.5 mL/ min
	Volumen de inyección		2.0 µL
	Fases móviles		A: agua Milli-Q con 0,1% de ácido fórmico B: acetonitrilo
MS	Voltaje de fragmentación		170V
	Fuente ESI	Voltaje del capilar	4 KV
		Flujo del gas de secado (N ₂)	9 L · min ⁻¹
		Temperatura del gas de secado	325 °C
		Presión del nebulizador	40 psi
		Polaridad	ESI (-)
	Parámetros MS	Skimmer	65V
		Octopolo RF	250V

3. Resultados y discusión

3.1. Optimización del método HPLC

Una de las claves en un método de HPLC es la selección apropiada de la columna que permita la separación de los analitos de forma satisfactoria. Para determinar la columna apropiada para HPLC con la que se produzca una separación adecuada de todos los edulcorantes que se van a medir. Se realizó un ensayo con diferentes columnas midiendo una disolución patrón de una mezcla preparada en el laboratorio conteniendo todos los analitos.

Con los patrones preparados anteriormente, se prepara una mezcla de 1mL de 50 mg/L al 100% de metanol. Se realizaron varias diluciones de 2,5 mg/L, y otra de 0,25 mg/L a partir de esta última al 10% de metanol.

1º ensayo:

La primera columna XDB-C18 que se probó tenía un tamaño de 4,6x100mm y un tamaño de partícula de 1,8µm. El gradiente de elución que se utilizó duraba 15 minutos, más el tiempo añadido para equilibrar la columna con el porcentaje de la fase móvil inicial (**Tabla 7**).

Tabla 7: Características del 1º ensayo

Tiempo	% Fase móvil B	Flujo
0	10	0,5
3	10	0,5
12	100	0,5
15	100	0,5

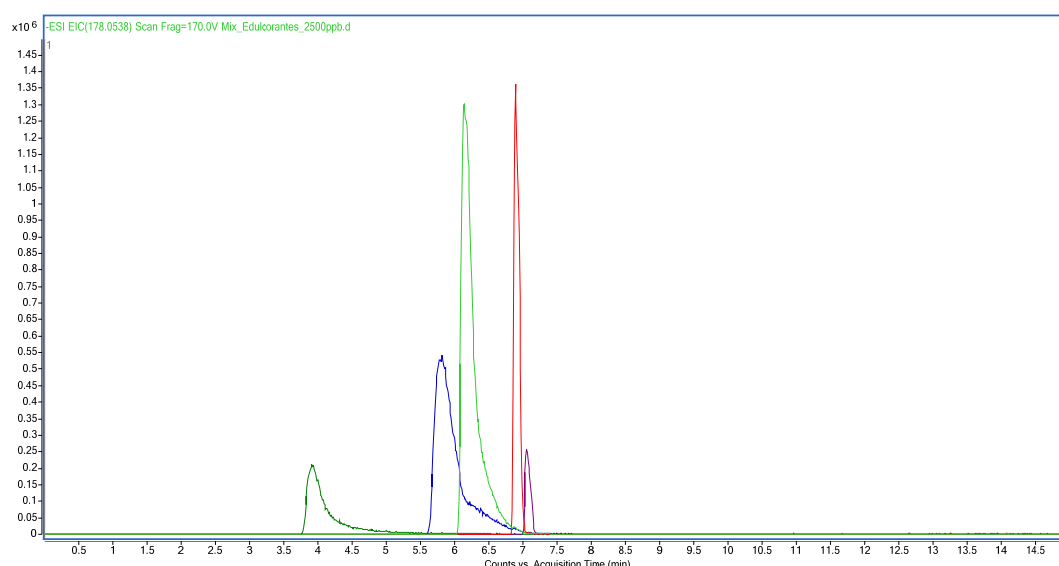


Figura 6: Cromatograma del 1º ensayo (concentración de cada compuesto: 2.5 mg/L)

Como puede observarse en la **Figura 6** el cromatograma obtenido muestra solapamiento parcial de los picos, y tres de ellos están poco definidos, con anchura de pico y formas no aceptables dificultando su integración por lo que se descarta la columna de 100mm.

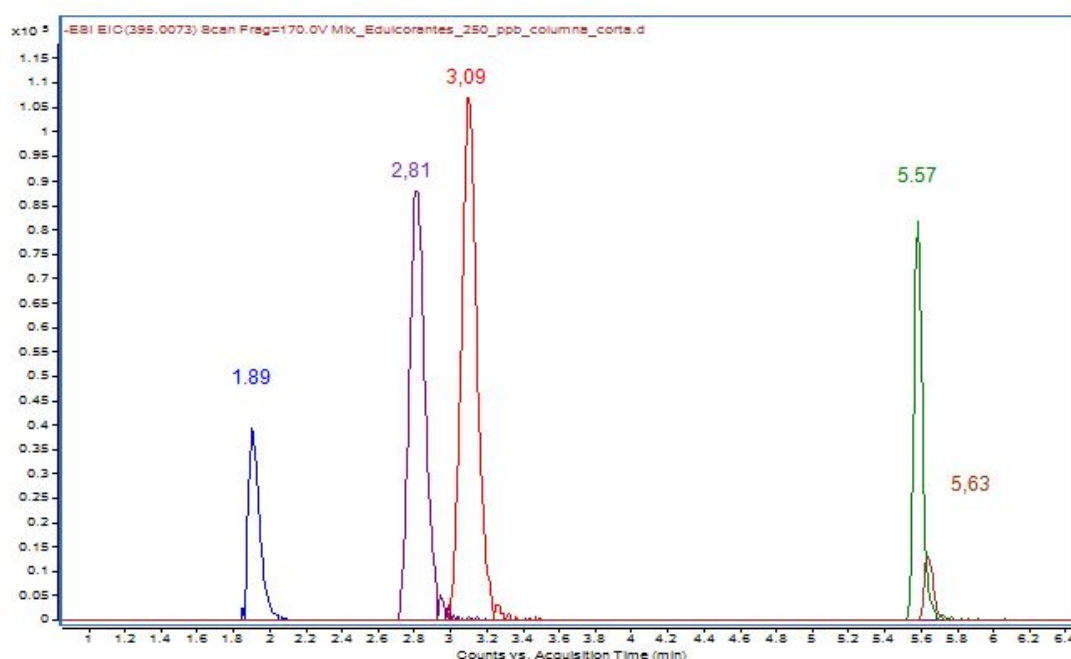
2º ensayo:

En este caso la columna XDB-C18 que se probó tenía un tamaño de 4,6mm x50mm y un tamaño de partícula de 1,8µm. El gradiente de elución que se utilizó duraba 12 minutos, más el tiempo añadido para equilibrar la columna con el porcentaje de la fase móvil inicial (**Tabla 8**).

Tabla 8: Características del 2º ensayo

Tiempo	% Fase móvil B	Flujo
0	10	0,5
3	10	0,5
8	60	0,5
10	100	0,5
12	100	0,5

En el cromatograma que se puede ver a continuación (**Figura 7**), se pueden distinguir unos picos bien definidos de anchura y forma adecuada por lo que se usará la columna de 50 mm para realizar el estudio. Se observa una coelución del aspartamo y la sucralosa que se separarán con el detector de masas.

**Figura 7:** Cromatograma del 2º ensayo (concentración de cada compuesto: 2.5mg/L)

3.2. Identificación de edulcorantes mediante HPLC-TOFMS.

Una vez medidas las muestras y conocidos sus tiempos de retención, se lleva a cabo la identificación de los compuestos. Con este método se obtienen distintos resultados (TIC, EIC y MS) que aseguran la correcta identificación de cada analito mediante el tiempo de retención y la confirmación con el espectro de masa exacta del ion de interés con un error que debe ser menor de 5 mg/L (de error de masa relativa). Los resultados obtenidos cumplen esta condición que se encuentran en la **Tabla 9**.

El error expresado en mg/L se calcula a través de la siguiente fórmula:

$$\frac{M_{\text{experimental}} - M_{\text{teórica}}}{M_{\text{teórica}}} * 10^6$$

A partir del TIC, se generan los demás cromatogramas indicando la masa del ion que se desea conocer.

Tabla 9: Parámetros para la identificación de los edulcorantes (concentración de cada compuesto: 1mg/L)

Compuesto	Fórmula	t _r (min)	Ión detectado	m/z teórica	m/z exp	Error (mg/L)
Acesulfamo-K	C ₄ H ₅ NO ₄ S	1,89	[M-H] ⁻	161,9867	161,9867	0,00
Sacarina	C ₇ H ₅ NO ₃ S	2,81	[M-H] ⁻	181,9917	181,9920	1,65
Ciclamato	C ₆ H ₁₂ NO ₃ S	3,09	[M-H] ⁻	178,0538	178,0542	2,25
Aspartamo	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₅	5,57	[M-H] ⁻	293,1143	293,1151	2,73
Sucralosa	C ₁₂ H ₁₉ Cl ₃ O ₈	5,63	[M-H] ⁻	395,0073	395,0081	2,02

En las siguientes figuras se observan los cromatogramas obtenidos para la identificación de los edulcorantes en la coca-cola light que corresponde con la muestra 2.

En la **Figura 8** se representa el cromatograma de iones totales que corresponde con la suma de las masas de todos los iones detectados representándolos en función del tiempo formando un cromatograma de barrido.

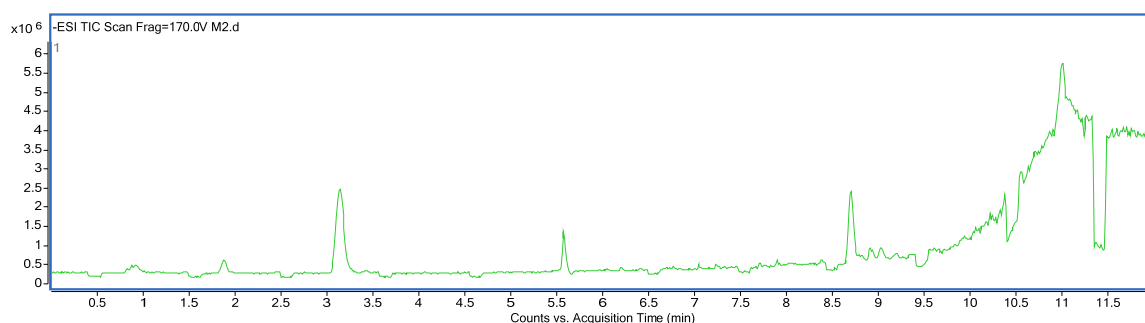


Figura 8: Cromatograma de iones totales (TIC)

En las siguientes **Figuras 9,10 y 11**, están representados los cromatogramas de iones extraídos en donde se representa los valores de m/z de cada analito, la intensidad del pico depende de la cantidad de iones y por tanto la concentración de la especie en la

muestra analizada. Además permite determinar su área y el tiempo de retención. También se encuentra el espectro de masas que permite confirmar el analito del que se trata.

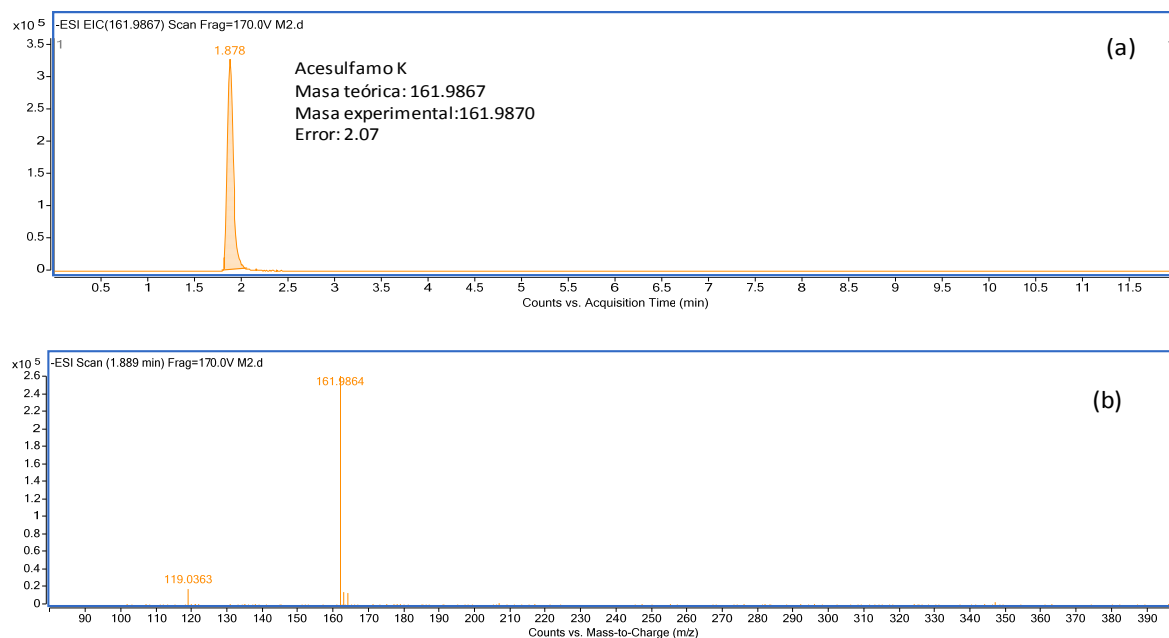


Figura 9: Cromatograma extraído de iones (EIC) (a) y espectro de masas (b) del acesulfamo-K. Valor de m/z 161.9867 (concentración 0.5 mg/L)

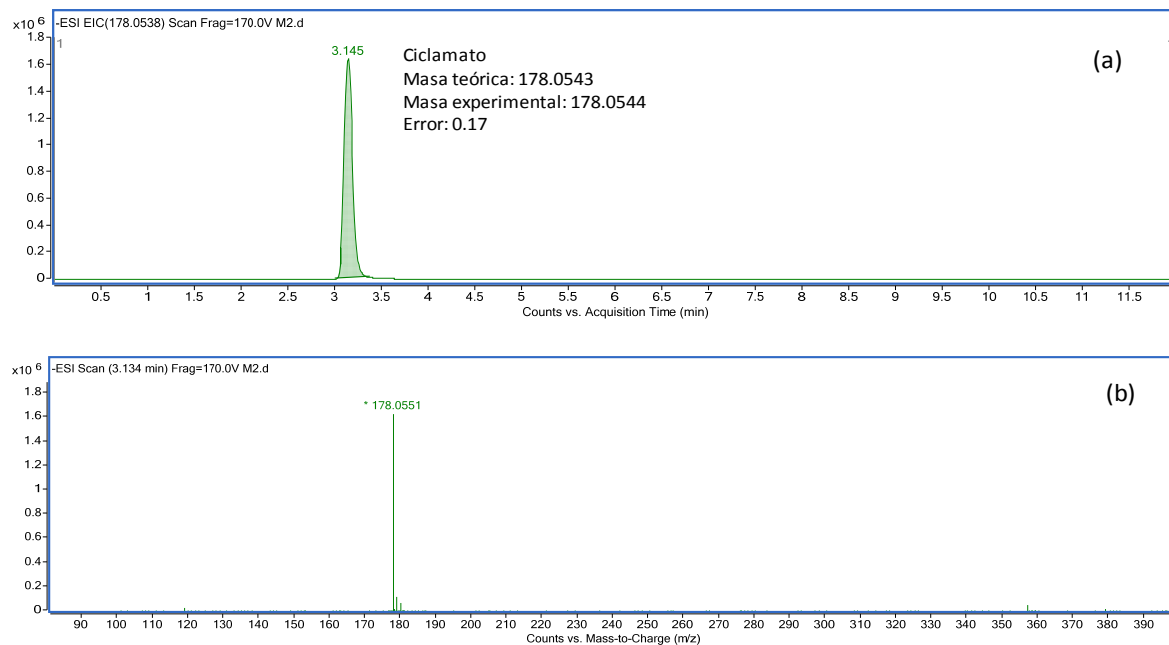


Figura 10: Cromatograma extraído de iones (EIC) (a) y espectro de masas (b) del ciclamato. Valor de m/z 178.0543 (concentración 0.5 mg/L)

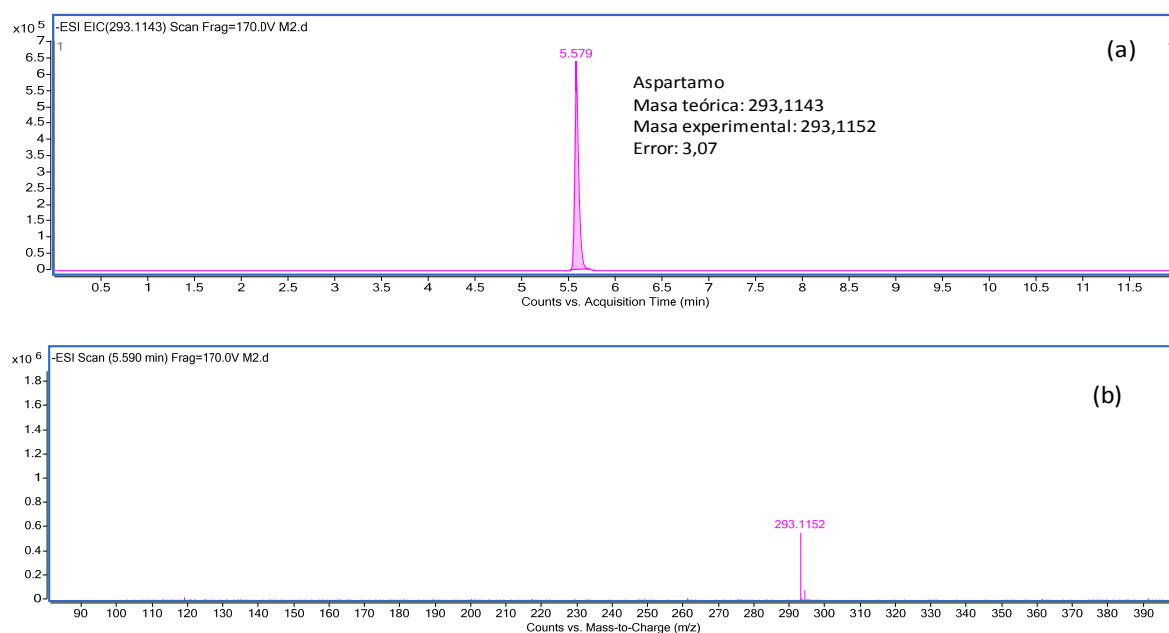


Figura 11: Cromatograma extraído de iones (EIC) (a) y espectro de masas (b) del aspartamo. Valor 293.1143 (concentración 0.5 mg/L)

3.3. Parámetros analíticos del método.

3.3.1. Optimización de la SPE y factor de dilución

Una vez medidas las muestras (1:20) se comprobó que el detector se saturaba en algunas muestras con elevada concentración de analitos por lo que se hizo una nueva dilución mayor (1:100). Para ello se toman 50 μ L de muestra sin diluir y 4,95mL de H₂O en un tubo de ensayo se agita, se mide 1 mL y se lleva a un nuevo vial.

Con la realización de la extracción en fase sólida se pasa de un volumen de 4 mL de muestra a 0,8mL (preconcentración 5:1). Seguida de una dilución 1:100 a partir de 0,05mL de muestra y añadiendo agua hasta 5mL el hecho de que este 100 veces diluida permite una calibración sencilla y se puede aplicar una calibración externa (con patrones puros). De este modo se evita el uso de calibrado en matriz o de adición de patrón. Teniendo en cuenta la preconcentración y la posterior dilución hace un factor de dilución total de 1:20.

3.3.2. Estudio de recuperación.

Para realizar este estudio se prepara una muestra sintética con los 5 analitos estudiados de concentración conocida, en este caso de 1mg/L, de la que se hacen 6 replicas del método analítico con las mismas condiciones con las que se han tratado las muestras, la concentración se calcula a partir de una recta de calibrado por interpolación. Para

construirla se preparan disoluciones de 5, 1, 0.5, 0.2, 0.1 y 0.05 mg/L. Los datos están reflejados en la **Tabla 10**.

Tabla 10: Datos de los estudios de recuperación

Compuesto	Recta de calibrado	R ²	Rango de concentración (mg/L)	%	RSD (%) n=6
Acesulfamo-K	y=806094x+2277,8	0,9916	0,05-5	88,54	14,96
Ciclamato	y=3508232x-121521	0,9854	0,05-5	115,06	5,41
Sacarina	y=2157276x-48663	0,9981	0,05-5	113,02	4,17
Aspartamo	y=1139961x+15706	0,9891	0,05-5	125,80	6,39
Sucralosa	y=196502x-3728,6	0,9856	0,05-5	116,74	6,86

3.3.3. Límite de cuantificación y de detección.

Para llevar a cabo el cálculo del límite de cuantificación (LOQ) se utilizó como criterio la concentración de analito cuyo cromatograma de ión extraído presenta una relación señal/ruido de 10 (S/N=10). En el caso del límite de detección (LOD) se estableció como criterio una relación de 3 (S/N=3).

La relación de señal/ruido se obtiene directamente del EIC correspondiente a una disolución patrón de 10µg/L. En la siguiente **Tabla 11** se muestran los datos referentes a los límites.

Tabla 11: Límites de detección y cuantificación instrumentales

	LOQ (µg/L)	LOD (µg/L)
Acesulfamo-K	2,37	0,72
Sacarina	3,78	1,14
Ciclamato	3,47	1,05
Aspartamo	<1	<0,3
Sucralosa	14,70	4,45

En el caso del aspartamo, debido al bajo ruido de fondo en modo de ionización negativo, la relación señal/ruido es muy alta y en este caso no se ha podido calcular con exactitud el límite de detección instrumental, que en cualquier caso está por debajo de 1µg/L.

3.4. Análisis de edulcorantes en muestras reales.

En la **Tabla 12** se exponen los datos de concentración y cantidad de edulcorantes encontrados en las muestras. El cálculo de las concentraciones se ha llevado a cabo mediante la interpolación del área en la recta de calibrado teniendo en cuenta tanto la etapa de extracción en fase sólida como la dilución final.

Tabla 12: Análisis de edulcorantes en bebidas

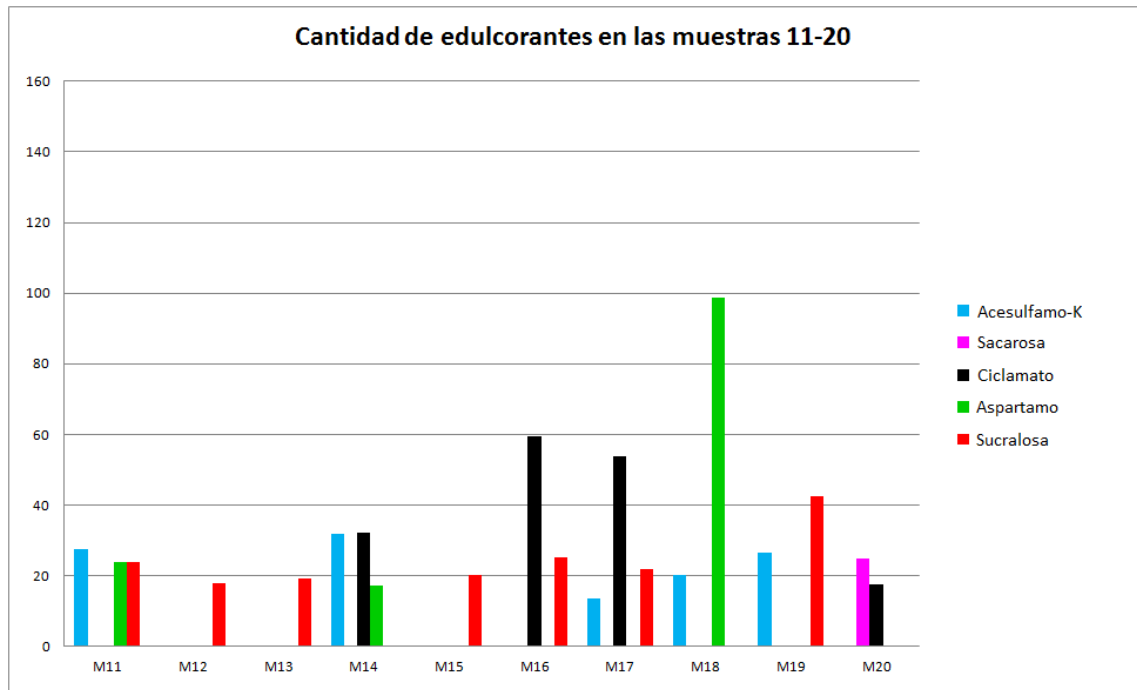
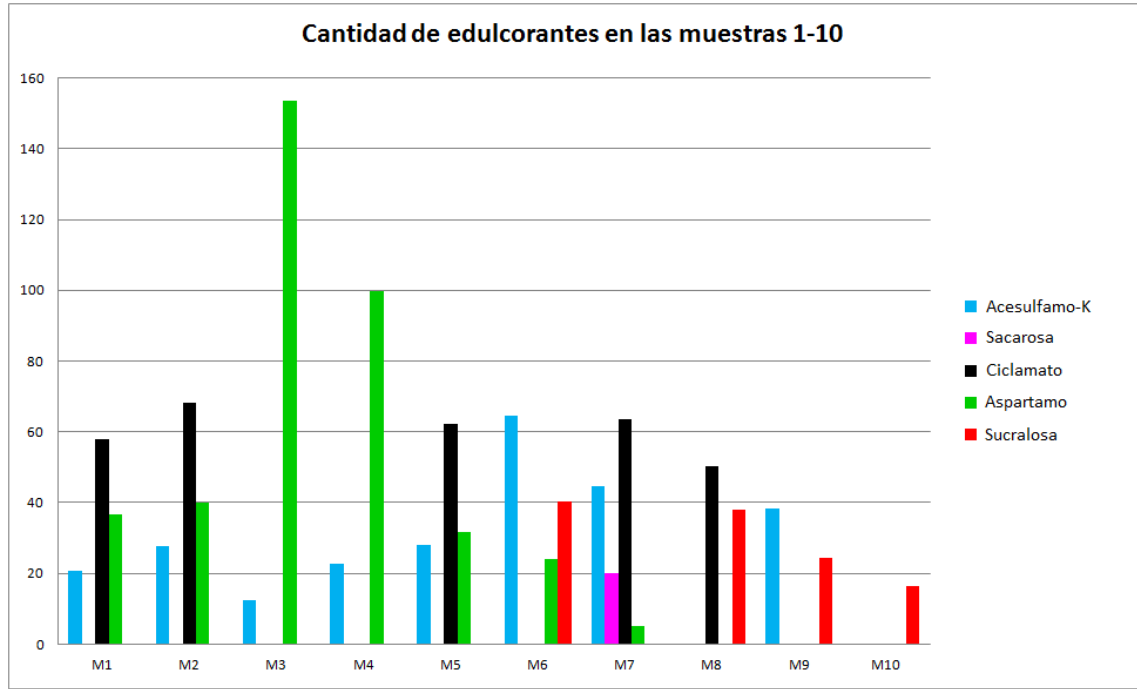
Muestras	Edulcorante	Concentración (mg/L)	mg edulcorante por lata
1	Acesulfamo-K	63,2	20,9
	Ciclamato	175,6	58,0
	Aspartamo	111,0	36,6
2	Acesulfamo-K	84,2	27,8
	Ciclamato	206,9	68,3
	Aspartamo	120,8	39,8
3	Acesulfamo-K	38,1	12,6
	Aspartamo	465,3	153,5
4	Acesulfamo-K	68,9	22,7
	Aspartamo	302,4	99,8
5	Acesulfamo-K	84,5	27,9
	Ciclamato	188,5	62,2
	Aspartamo	95,8	31,6
6	Acesulfamo-K	195,3	64,4

	Sucralosa	122,1	40,3
7	Acesulfamo-K	135,0	44,5
	Ciclamato	192,2	63,4
	Sacarina	61,1	20,2
	Aspartamo	15,0	4,9
8	Ciclamato	151,9	50,1
	Sucralosa	115,0	37,9
9	Acesulfamo-K	116,2	38,3
	Sucralosa	74,2	24,5
10	Sucralosa	50,0	16,5
11	Acesulfamo-K	83,9	27,7
	Aspartamo	72,1	23,8
	Sucralosa	72,5	23,9
12	Sucralosa	54,3	17,9
13	Sucralosa	58,6	19,3
14	Acesulfamo-K	97,0	32,0
	Ciclamato	97,3	32,1
	Aspartamo	52,6	17,4
15	Sucralosa	61,3	20,2
16	Ciclamato	180,1	59,4
	Sucralosa	76,7	25,3
17	Acesulfamo-K	40,9	13,5
	Ciclamato	162,8	53,7
	Sucralosa	66,3	21,9
18	Acesulfamo-K	61,4	20,2
	Aspartamo	299,7	98,9

19	Acesulfamo-K	80,6	26,6
	Sucralosa	128,9	42,5
20	Ciclamato	53,0	17,5
	Sacarina	75,5	24,9
21	Sucralosa	21,2	5,3
22	Acesulfamo-K	66,7	22,0
	Ciclamato	204,2	67,4
	Sacarina	55,6	18,3
23	Ciclamato	151,1	49,9
	Sacarina	61,4	20,3
24	Acesulfamo-K	60,3	19,9
	Sucralosa	80,8	26,7
25	Acesulfamo-k	48,8	16,1
	Ciclamato	126,6	41,8
	Aspartamo	49,8	16,5
26	Sucralosa	84,8	28,0
27	Acesulfamo-K	26,1	8,6
	Ciclamato	52,2	17,2
	Sacarina	7,6	2,5
28	Acesulfamo-K	67,8	22,4
	Sucralosa	38,3	12,6
29	Sucralosa	36,6	12,1
30	Acesulfamo-K	35,7	11,8
	Ciclamato	81,5	26,9
	Sacarina	40,6	13,4
31	Acesulfamo-K	86,5	28,5

	Sucralosa	128,2	42,3
--	-----------	-------	------

La **Figura 12** representa los datos (mg de edulcorante por lata) de la tabla anterior. Se puede observar de forma general cuales y que cantidad de edulcorantes contienen las muestras.



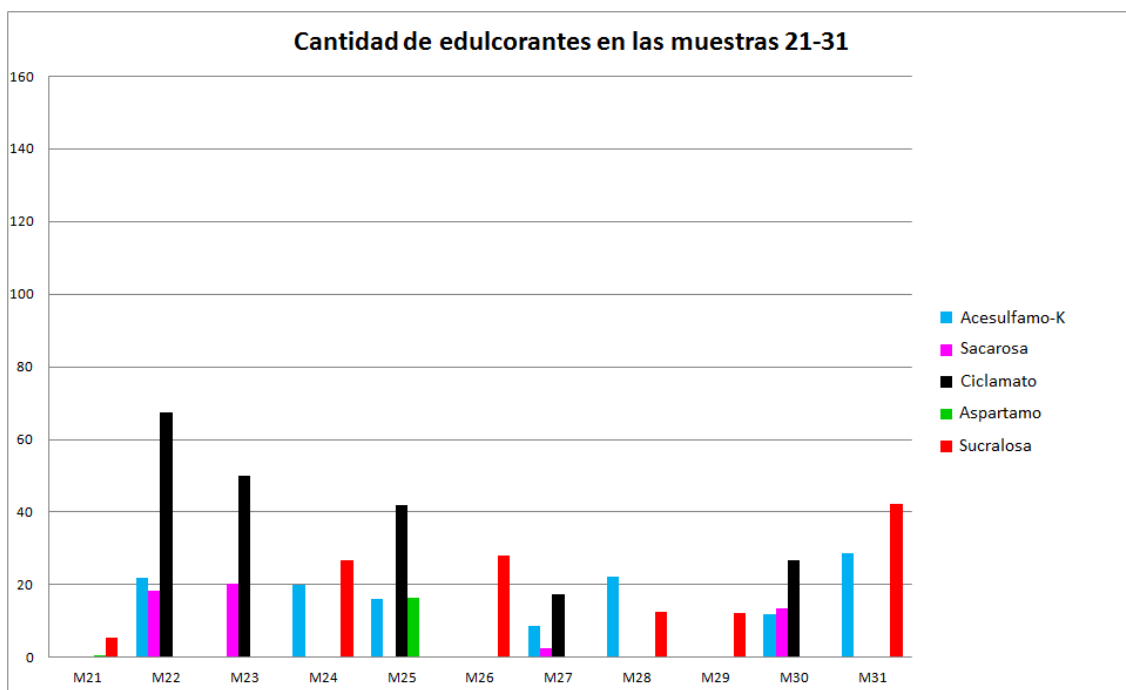


Figura 12: Representación gráfica del contenido de edulcorantes en las latas

En la siguiente **Figura 13**, se representa la suma de los edulcorantes en todas las muestras, de donde se puede comprobar que el ciclamato es el edulcorantes mas utilizado con un 30% seguido del aspartamo y el acesulfamo-K.

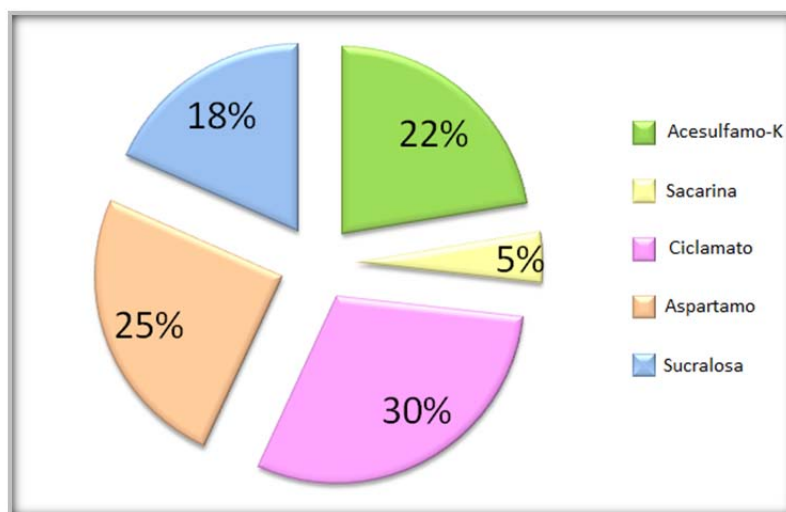


Figura 13: Porcentaje del uso de cada edulcorante

El consumo recomendado de aspartamo y sucralosa según la FAO es de 40 y 5mg/kg peso corporal al día respectivamente [27, 28]. A continuación se describe algunos ejemplos del número de latas que deben tomarse para sobrepasar este índice de consumo recomendado.

En el primer caso tomando el mayor valor obtenido para el aspartamo en esta caso la muestra 3 (Pepsi 0 Max) con 153,5 mg de edulcorante en una lata.

Para un niño de unos 30 kg, haría un total de unas 8 latas al día para superar los 40mg/kg al día.

Para un adulto de unos 70 kg, se necesitarían más de 18 latas para superarlo.

Para la sucralosa, cogiendo el valor más alto que corresponde con la muestra 19 (Limón discount) con 42,6 mg de edulcorante por lata.

Para un niño de unos 30 kg, haría un total de más de 3 latas al día para superar los 5mg/kg al día.

Para un adulto de unos 70 kg, se necesitarían más de 8 latas para superarlo.

4. Conclusiones

Con la realización de este trabajo, se ha podido determinar que el uso de una cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a un espectrómetro de masas es un buen método para determinar edulcorantes en bebidas, donde la mejor opción con respecto a la columna del HPLC es que sea de 50 mm. El empleo de columnas de mayor longitud propicia picos con colas y con anchuras mayores a las deseadas.

El método propuesto tiene una alta especificidad ya que se diferencian perfectamente los distintos analitos del resto de compuestos. Es un método preciso y reproducible ya que se obtienen valores de desviación estándar relativa por debajo del 10% teniendo en cuenta tanto la etapa de extracción como la etapa de determinación mediante HPLC-MS.

Los estudios de recuperación llevados a cabo demuestran eficiencia en la extracción de los analitos con una recuperación total del 100% de todos los edulcorantes.

En ninguna de las muestras estudiadas el contenido en edulcorantes supera la ingesta diaria admisible (IDA) en una lata.

REFERENCIAS

1. <http://nutricion nichese.com/edulcorantes.html>.
2. Matos Feijó F, Reis Ballard C, Carraro Foletto K, Aparecida B, Batista M, Magagnin Neves A, Flávia Marques M, Casaccia Bertoluci M. 2012. "Saccharin and aspartame, compared with sucrose, induce greater weight gain in adult Wistar rats, at similar total caloric intake levels." *Appetite* 60:203–207.
3. Swithers SE, Davidson TL. 2008. "A role for sweet taste: Calorie predictive relations in energy regulation by rats". *Behavioral neuroscience* 122(1):161-73.
4. Yang Q. 2010. "Gain weight by "going diet?" Artificial sweeteners and the neurobiology of sugar cravings". *Yale journal of biology and medicine* 83 (2010):101-108.
5. Swithers SE. 2013. "Artificial sweeteners produce the counterintuitive effect of inducing metabolic derangements". *TEM* 88:11
6. Fowler SP, Williams K, Resendez RG, Hunt KJ, Hazuda HP, Stern MP. 2008. "Fueling the obesity epidemic? Artificially sweetened beverage use and long-term weight gain". *Obesity (Silver Spring)* 16(8):1894-900.
7. Stellman SD, Garfinkel L. 1986. "Artificial sweetener use and one-year weight change among women". *Prev Med* 15(2):195-202.
8. Colditz GA, Willett WC, Stampfer MJ, London SJ, Segal MR, Speizer FE. 1990. "Patterns of weight change and their relation to diet in a cohort of healthy women". *American Society for Clinical Nutrition* 51:1100-5.
9. http://es.wikipedia.org/wiki/Sustitutos_del_az%C3%BAcar

10. Batchu SR, Quinete N, Panditi VR, Gardinali PR. 2013. "Online solid phase extraction liquid chromatography tandem mass spectrometry (SPE-LC-MS/MS) method for the determination of sucralose in reclaimed and drinking waters and its photo degradation in natural waters from South Florida". *Chem Cent J*. 22(1):7-141.
11. Serdar M, Knezevic Z. 2011. "Determination of artificial sweeteners in beverages and special nutritional products using high performance liquid chromatography". *Arh Hig Rada Toksikol* 62:169-173.
12. Hu F, Xu L, Luan F, Liu H, Gao Y. 2013. "Determination of neotame in non-alcoholic beverage by capillary zone electrophoresis".
13. Hashemi M, Habibi A, Jahanshahi N. 2011. "Determination of cyclamate in artificial sweeteners and beverages using headspace single-drop microextraction and gas chromatography flame-ionisation detection". *Food Chemistry* 124:1258–1263.
14. Chen Q, Wang J. 2001. "Simultaneous determination of artificial sweeteners, preservatives, caffeine, theobromine and theophylline in food and pharmaceutical preparations by ion chromatography". *Journal of Chromatography A*, 937:57–64.
15. Los Weinert P, Redigolo Pezza H, de Oliviera JE, Pezza L. 2004. "A simplified spectrophotometric method for routine analysis of saccharin in commercial noncaloric sweeteners". *J. Agric. Food Chem* 52:7788-7792.
16. Huang Z, Ma J, Chen B, Zhang Y, Yao S. 2005. "Determination of cyclamate in foods by high performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry". *Analytica Chimica Acta* 555:233–237.
17. Croitoru MD, Fülöp I, Kincses Ajtay M, BaloghC, Dogaru MT. 2011. "Direct HPLC-UV determination of cyclamate, saccharine and aspartame from soft drinks". *Acta alimentaria* 40:459-465.

18. Idris, M., Varshney, K.M., Sudhakar, P., Shukla, S.K., Baggi, T.R. 2012. "HPLC determination of aspartame in tabletop sweeteners by precolumn derivatization using 2,4-dinitrofluorobenzene". *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 4(1):522-527.
19. García-Jiménez JF, Valencia MC, Capitán-Vallvey LF. 2007. "Improved Multianalyte Determination of the Intense Sweeteners Aspartame and Acesulfame-K with a Solid Sensing Zone Implemented in an FIA Scheme". *Analytical Letters* 39(7): 1333-1347.
20. Liu T, Jiang Z-T, Li,R, Tan J. 2013. "Simultaneous determination of cyclamate, acesulfame, and aspartame in beverages by Titania-Based RP-HPLC". *Food Analytical Methods* 1-7.
21. Bergamo AB, Fracassi JA, Pereira de Jesus D. 2010. "Simultaneous determination of aspartame, cyclamate, saccharin and acesulfame-K in soft drinks and tabletop sweetener formulations by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection". *Food Chemistry* 124:1714–1717.
22. Yang DJ, Chen B. 2009. "Simultaneous Determination of Nonnutritive Sweeteners in Foods by HPLC/ESI-MS". *Journal Agricultural Food Chemistry* 57:3022–3027.
23. Tran NH, Hu J, Leong Ong S. 2013. "Simultaneous determination of PPCPs, EDCs, and artificial sweeteners in environmental water samples using a single-step SPE coupled with HPLC–MS/MS and isotope dilution". *Talanta* 113:82–92
24. Ordoñez EY, Benito Quintana J, Rodil R, Cela R. 2012. "Determination of artificial sweeteners in water samples by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry". *Journal of Chromatography A*, 1256:197– 205.

25. Yin F, Ding Z, Cao X, Gao J, Jiang D, Kuang D, Gu Y, He G. 2011. "Determination of thress sweeteners in vinegars by solid extraction-high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry". Chinese Journal of Chromatography (Se Pu) 6:554-557.
26. Stojkovic M, Duc Mai T, Hauser PC. 2013. "Determination of artificial sweeteners by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection optimized by hydrodynamic pumping". Analytica Chimica Acta 787:254– 259.
27. European Commission. 2002. "Opinion of the Scientific Committee on Food: Update on the safety of aspartame". SCF/CS/ADD/EDUL/222 Final.
28. European Commission. 2000. "Opinion of the Scientific Committee on Food on sucralose". SCF/CS/ADDS/EDUL/190 Final.