



TESIS DOCTORAL

**NUEVAS METODOLOGÍAS PARA LA
DETERMINACIÓN DE EDULCORANTES Y
OTRAS SUSTANCIAS POLARES
MEDIANTE CROMATOGRFÍA LÍQUIDA**

EDGAR YESID ORDÓÑEZ ORJUELA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA, NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA

PROGRAMA DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA QUÍMICA

FACULTAD DE QUÍMICA

Santiago de Compostela

2017



D. José Benito Quintana Álvarez, Dña. M^a del Rosario Rodil Rodríguez y D. Rafael Cela Torrijos, profesores del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología,

Como directores de la Tesis Doctoral titulada **“NUEVAS METODOLOGÍAS PARA LA DETERMINACIÓN DE EDULCORANTES Y OTRAS SUSTANCIAS POLARES MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA”** presentada por **D. Edgar Yesid Ordóñez Orjuela** alumno del Programa de Doctorado Ciencia y Tecnología Química,

AUTORIZAN la presentación de la Tesis indicada, considerando que reúne los requisitos exigidos en el artículo 34 del reglamento de Estudios de Doctorado y que como directores de la misma no incurrir en las causas de abstención establecidas en la Ley 30/1992.

Santiago de Compostela, 24 de febrero de 2017.

Fdo. D. José Benito Quintana Álvarez

Fdo. Dña. M^a del Rosario Rodil Rodríguez

Fdo. D. Rafael Cela Torrijos



D. José Benito Quintana Álvarez, Dña. M^a del Rosario Rodil Rodríguez y D. Rafael Cela Torrijos, como directores de la Tesis Doctoral titulada **“NUEVAS METODOLOGÍAS PARA LA DETERMINACIÓN DE EDULCORANTES Y OTRAS SUSTANCIAS POLARES MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA”**,

Por la presente **DECLARAN:**

Que la tesis presentada por **D. Edgar Yesid Ordóñez Orjuela** es idónea para ser presentada, de acuerdo con el artículo 41 del Reglamento de Estudios de Doctoramiento, por la modalidad de compendio de **ARTICULOS**, en los que el doctorando tuvo participación en el peso de la investigación y su contribución fue decisiva para llevar a cabo este trabajo.

Que los artículos que forman parte del trabajo de esta Tesis han sido realizados durante la etapa de los estudios de doctorado y que han sido aceptados en revistas de reconocido prestigio internacional con revisión anónima por pares de acuerdo con el artículo 41 del presente Reglamento.

Que está en conocimiento de los coautores, tanto doctores como no doctores, participantes en los artículos, que ninguno de los trabajos reunidos en esta tesis serán presentados por ninguno de ellos en otra tesis de Doctorado, lo que firmamos bajo nuestra responsabilidad.

Y, para que así conste, firmamos el presente informe en Santiago de Compostela, 24 de febrero de 2017.

D. José Benito Quintana Álvarez

Dña. María del Rosario Rodil Rodríguez

D. Rafael Cela Torrijos



AGRADECIMIENTOS

Durante todo este tiempo de trabajo científico y a punto de finalizar una de las etapas más largas de mi vida académica no me resta más que expresar un sincero agradecimiento a todos aquellos que han hecho realidad este sueño.

Recuerdo cuando decidí emprender este camino que para muchos loco, pero para mí el más gratificante, viajar desde 8000 Km de distancia a una tierra completamente desconocida de costumbres y cultura diferente a la natal pero llena de riqueza humana y mítica en su sentir. Que linda tierra Gallega la que me acogió por este tiempo con enseñanzas en su cultura, en su gastronomía, en su historia en fin gracias señores gallegos, eso son ustedes unos señores en todo el sentido de la palabra que acogen al extranjero con cariño y abrigo como si fuese uno más de su casa.

Agradecer al Ministerio de Ciencia e Innovación / de Economía y Competitividad, a los fondos europeos (FEDER) y autonómicos (Xunta de Galicia) por la financiación recibida a través de los proyectos CTQ2009-08377, CTQ2010-18927, CTQ2012-33080 y GRC2013-020.

Gracias grupo de compañeros con los cuales compartí momentos especiales de tertulia a la hora de la comida o en momentos diferentes a los académicos pero siempre haciéndome participe de ustedes me refiero a Inés, Eugenia Tamara, Sarita, Tania, Iria, Jorge, Juan, en fin tanto otros que pasaron por el laboratorio durante este lapso de tiempo les presento excusas si no los recuerdo a todos pero es normal que con el pasar de los años los nombres se olviden pero nunca sus rostros o sus vivencias gracias compañeros.

No puedo dejar de agradecer a Rafael Cela que confió en mí y me acepto en su grupo de investigación sin poner reparo alguno y siempre dispuesto ayudarme y hacer lo mejor de mí. A mis demás tutores Tito y Charo gracias por formarme, por escucharme por permitirme aprender aunque haya sido un poco de todo ese mar de ciencia que son ustedes, unos lideres verdaderos que

realmente se comprometen con su quehacer diario, no importa la juventud o el clima, solamente importan sus compromisos académicos ejemplos dignos de imitar, pocos como ustedes siempre dispuestos a aportar lo mejor de sí para cada uno de sus investigadores. Gracias señores.

Esposa mía no puedo dejar de terminar este escrito sin decirte gracias preciosa por ser como eres fuerte como un roble incólume ante las adversidades y sobre todo ese apoyo irrestricto que siempre has sido, me apoyaste en esta locura de estudiar en tierras lejanas sin dinero solamente con las ganas del querer ser. Eso amor mío vale más que mil palabras como reza el adagio popular “no basta con ser la mujer del Cesar si no parecerlo”. Una dama que me apoyo a lo largo de este proceso desde el inicio y ahora hasta el final. Gracias... esposa mía.

No puedo dejar de agradecer al pueblo español y en especial a Santiago de Compostela que hermosa ciudad, los secretos que encierra en sus calles estrechas en los bares antiguos y lúgubres en sus calles adoquinadas, en ese sentir de pueblo pero a la vez de ciudad moderna a ese encanto indescriptible que tiene el pueblo de Santiago a eso que solamente se puede describir si has vivido en Santiago. A mi universidad llena de conocimiento de historias, de lugares llenos de secretos, de laboratorios antiguos y modernos en fin un millón de gracias.



“La constancia vence lo que la dicha no alcanza”

(Anónimo)





ÍNDICE



I.	JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	1
II.	INTRODUCCIÓN.....	5
1.	EDULCORANTES	7
1.1.	Aspectos generales de los edulcorantes artificiales.....	7
1.1.1.	Acesulfamo	9
1.1.2.	Ácido ciclámico	9
1.1.3.	Alitamo.....	10
1.1.4.	Aspartamo	10
1.1.5.	Neotame	11
1.1.6.	Neohesperidina dihidrochalcona.....	11
1.1.7.	Sacarina	14
1.1.8.	Sucralosa	14
1.1.9.	Esteviósido.....	14
1.2.	Legislación de edulcorantes según la UE.....	15
1.3.	Toxicidad y ecotoxicidad	16
1.4.	Presencia de edulcorantes en el medio ambiente	18
1.4.1.	Edulcorantes en agua de depuradora.....	18
1.4.2.	Edulcorantes en aguas superficiales y subterráneas	20
1.4.3.	Edulcorantes en lodos.....	20
2.	METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE EDULCORANTES .	23
2.1.	Extracción en fase sólida (SPE)	23
2.1.1.	Etapas del proceso de extracción mediante SPE.....	24
2.1.2.	Dispositivos comerciales	26
2.1.3.	Mecanismos de interacción	26
2.1.4.	Tipos de adsorbentes.....	27
2.2.	Extracción con disolventes presurizados (PLE)	30
2.2.1.	Parámetros que afectan la PLE	30
2.2.2.	Equipamiento para PLE.....	32

2.2.3.	Etapas del proceso de extracción por PLE	33
2.3.	Cromatografía Líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS)	34
2.3.1.	Cromatografía Líquida de alta resolución (HPLC)	34
2.3.1.1.	Mecanismos de separación en HPLC	34
2.3.1.1.1.	Cromatografía de fase reversa (RPLC)	34
2.3.1.1.2.	Cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC)	35
2.3.1.1.3.	Cromatografía líquida de intercambio iónico.....	36
2.3.1.1.4.	Cromatografía de modo mixto.....	37
2.3.2.	Espectrometría de masas (MS).....	39
2.3.2.1.	Ionización por electrospray (ESI)	40
2.3.2.2.	Analizadores de masa.....	42
2.4.	Química analítica verde	45
2.4.1.	Cromatografía Líquida de alta temperatura (HTLC).....	47
2.4.1.1.	Parámetros en los que influye la temperatura	48
2.4.1.1.1.	Velocidad de análisis	48
2.4.1.1.2.	Resolución.....	49
2.4.1.2.	Instrumentación de alta temperatura	52
2.5.	Aplicaciones a edulcorantes.....	53
2.5.1.	Preparación de muestra	54
2.5.1.1.	Edulcorantes en muestras de bebida	54
2.5.1.2.	Edulcorantes en muestras de agua superficial y residual	55
2.5.1.3.	Edulcorantes en lodos de depuradora.....	57
2.5.2.	Análisis instrumental	57
3.	OPTIMIZACIÓN COMPUTERIZADA DE SEPARACIONES EN HPLC... 59	
3.1.	Etapas en el desarrollo de un método de HPLC asistido por computador	61
3.1.1.	Definición de los objetivos del procedimiento	61
3.1.2.	Diseño de experimentos requerido	61
3.1.3.	Realización de experimentos	62

3.1.4.	Análisis y procesamiento de los datos generados (construcción del modelo de retención)	63
3.1.5.	Selección de condiciones de operación óptima	63
3.1.6.	Estudio de la robustez del procedimiento	64
3.1.7.	Transferencia del procedimiento.....	65
3.2.	Programa PREGA	66
3.2.1.	Aplicaciones del PREGA	71
4.	REFERENCIAS.....	73
5.	ÍNDICE DE TABLAS.....	89
6.	ÍNDICE DE FIGURAS.....	91
7.	ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS.....	93
III.	METODOLOGÍA DESARROLLADA.....	95
1.	ARTÍCULO CIENTÍFICO 1.....	97
2.	ARTÍCULO CIENTÍFICO 2.....	111
3.	ARTÍCULO CIENTÍFICO 3.....	121
4.	ARTÍCULO CIENTÍFICO 4.....	137
5.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS INTEGRADORA	163
IV.	CONCLUSIONES.....	171
V.	ANEXO	177





I. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS



En la última década una serie de contaminantes que ha suscitado gran atención e importancia son los denominados contaminantes emergentes. Esto se debe a la gestión insostenible de productos químicos sintéticos y algunos naturales que a través de su ciclo de vida han dado lugar a una contaminación generalizada y masiva del medio ambiente. La regulación para este tipo de compuestos no es lo suficientemente estricta, aunque investigaciones muy sólidas han encontrado efectos adversos en la salud. Por ello es necesario monitorizar su comportamiento e incidencia en el medio ambiente.

Entre los contaminantes emergentes se encuentran los edulcorantes, en general sintéticos, que aportan bajo contenido calórico utilizados por un amplio espectro de la población. Los edulcorantes sintéticos más conocidos han sido la sacarina y el ciclamato, cuyo uso ha generado una fuerte controversia a nivel internacional que perdura hasta la fecha, dado que algunos estudios vinculan su empleo en altas dosis con el cáncer de vejiga en animales de laboratorio, mientras que otros estudios lo niegan [1]. El aspartamo, menos tóxico que los anteriores, presenta sin embargo efectos secundarios neuropsíquicos así como ciertos efectos paradójales que pueden provocar inhibición del supresor del apetito cuando son consumidos en dosis elevadas. En los últimos tiempos han surgido los edulcorantes obtenidos a partir de productos naturales como taumatina y esteviosidos, entre otros, los que parecen presentar menores efectos tóxicos [2].

Estos compuestos se encuentran a niveles traza en matrices de mayor o menor complejidad. Por ello, para su determinación se requieren metodologías analíticas con bajos límites de cuantificación, buena repetibilidad y exactitud, que además resulten sostenibles, atendiendo al consumo de disolventes y la generación de residuos, y aplicables a efectos prácticos en base a su robustez y su coste. La principal dificultad para la determinación de estos compuestos reside en su alta polaridad, que dificulta su extracción y determinación.

Para la realización de esta tesis se han seleccionado un grupo de edulcorantes (acesulfamo, ácido ciclámico, alitamo, esteviosido, aspartamo, neotamo, neohesperidina dihidrochalcona, sacarina y sucralosa) altamente consumidos. Estos contaminantes se introducen en el medio ambiente, fundamentalmente, a través de las aguas residuales urbanas (como resultado, en último lugar, de tratamientos de depuración incompletos). Por este motivo, los principales objetivos de la presente tesis doctoral han sido:

- Desarrollar metodologías analíticas, robustas, selectivas y sensibles que permitan determinar la presencia de estos analitos altamente polares en muestras de aguas residuales (tratadas y sin tratar), así como en aguas de río, lagos y lagunas, buscando mejorar en la medida de lo posible metodologías existentes.
- Aplicar las metodologías desarrolladas a muestras reales con el fin de validarlas y comprobar la robustez de las mismas.
- Desarrollar metodologías analíticas robustas, sensibles y selectivas para la determinación de edulcorantes en lodos de depuradora para determinar su posible asociación con los mismos.
- Evaluar nuevas metodologías cromatográficas ambientalmente más amigables para la determinación de compuestos altamente polares.
- Desarrollar técnicas analíticas capaces de ser amigables con el medio ambiente disminuyendo el consumo de disolventes orgánicos tóxicos y aumentando el consumo de agua como disolvente verde.



II. INTRODUCCIÓN



1. EDULCORANTES

1.1. Aspectos generales de los edulcorantes artificiales

Los edulcorantes artificiales de alta intensidad también llamados edulcorantes no nutritivos forman una clase importante de aditivos usados en alimentos, bebidas, confitería e industria farmacéutica. Estos compuestos permiten la sensación dulce sin ingesta de calorías o en una muy pequeña cantidad. Hay un gran número de edulcorantes conocidos, pero solamente algunos se usan en la industria moderna. El listado de edulcorantes artificiales permitidos varía de país en país. En la Unión Europea (UE) existen ocho edulcorantes de alta intensidad autorizados: Acesulfamo (ACE), Aspartamo (ASP), Ciclamato de Sodio (CIC), Neotamo (NEO), Sacarosa (SAC), Sucralosa (SUC), Neohesperidina Dihidrochalcona (NHDC) y Estevióside (STEV), que se muestran en la Figura 1 [3, 4], mientras que en los Estados Unidos (EEUU) el listado correspondiente no incluye CIC ni NHDC [5]. Además, existe un edulcorante de altísima intensidad, 2000 veces más endulzante que la sacarosa, el Alitamo (ALI), el cual aún no se ha aprobado en los EEUU ni en la UE, pero sí en otros países como Australia, China y Nueva Zelanda [2]

La estructura química y a las propiedades físico-químicas de los edulcorantes estudiados en el presente trabajo se muestran en la Figura 1 y en la *Tabla 1*.

INTRODUCCIÓN

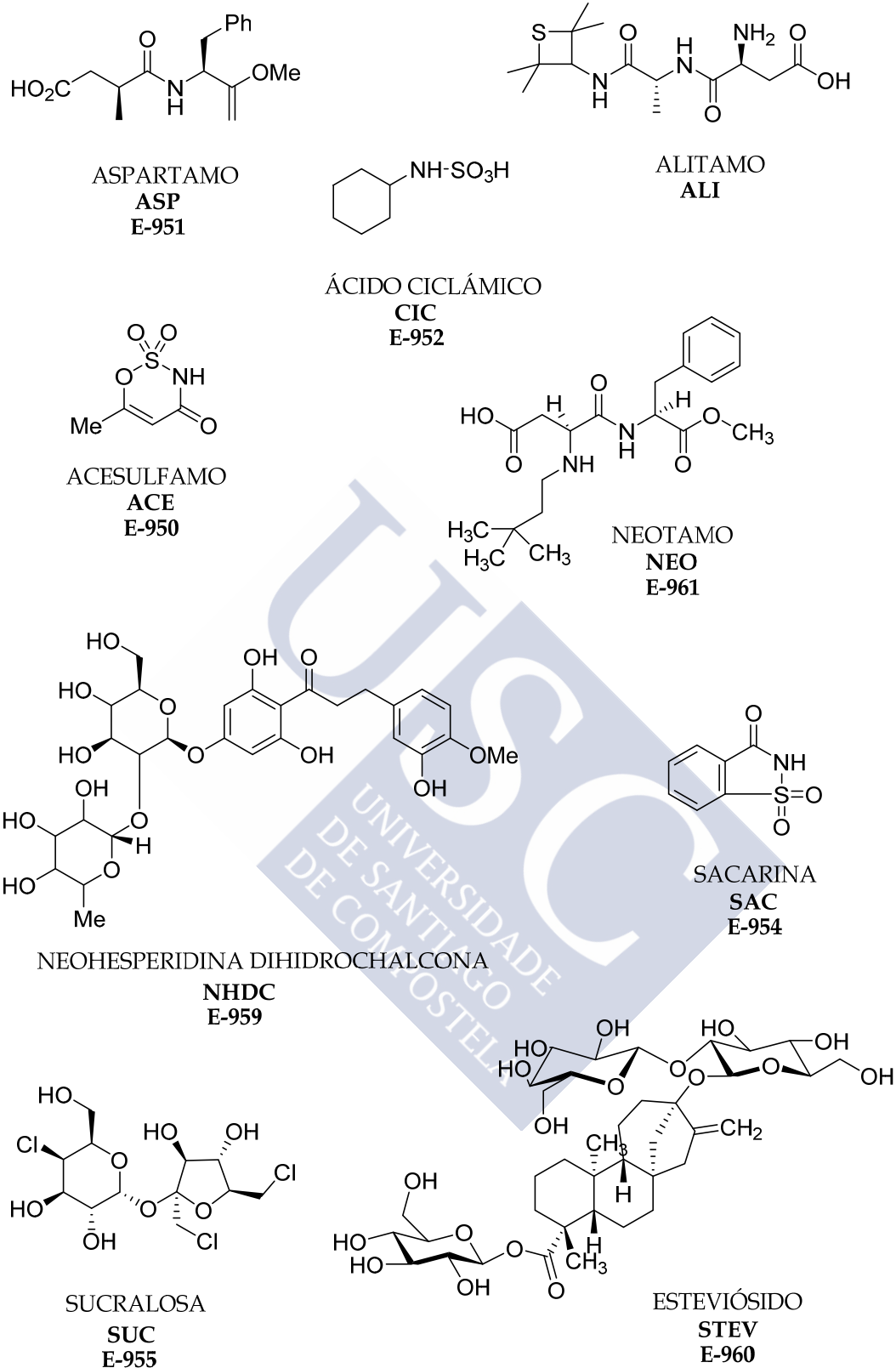


Figura 1. Edulcorantes artificiales estudiados en este trabajo. Para aquellos aprobados por la UE se muestra el código E

1.1.1. Acesulfamo

El acesulfamo (ACE), también llamado acesulfamo K debido a que se utiliza como sal de potasio, es un polvo blanco cristalino, aproximadamente 200 veces más dulce que la sacarosa, tan dulce como el ASP, pero presenta un sabor ligeramente amargo. Fue descubierto de manera accidental en 1967. Se utiliza normalmente en mezclas con otros edulcorantes como SUC o ASP. Una vez combinado, su perfil endulzante es muy similar al de la sacarosa [6]. Es estable térmicamente por lo que se puede utilizar como aditivo en la cocina y el horneado [7]. Es estable también a diversos pHs, incluyendo exposición prolongada en medio acuoso y pH ácido [8]. El ACE no es metabolizado por el cuerpo humano, y se elimina inalterado a través de la orina [2]. Es un compuesto muy polar que se encuentra en disolución siempre ionizado debido a que posee un pK_a muy bajo (-0,28).

1.1.2. Ácido ciclámico

El ácido ciclámico (CIC) se utiliza en forma de sal de Na o Ca. Es un polvo sólido cristalino inodoro entre 30 y 50 veces más dulce que la sacarosa, por lo que es el menos potente de los edulcorantes artificiales comercializados. Fue descubierto en 1937. Debe usarse en mezcla con otros edulcorantes, el más común SAC. Su uso como edulcorante está permitido en al menos 130 países pero está prohibido en EEUU desde 1970 [5]. Es estable térmicamente por lo que se puede utilizar como aditivo en la cocina y el horneado [9, 10]. No se metaboliza en el cuerpo humano y se elimina sin modificar. Es un compuesto polar ($\log K_{ow} = 1.033$) que se encuentra ionizado en disoluciones acuosas, debido a su bajo pK_a (ver *Tabla 1*).

1.1.3. Alitamo

El alitamo, como el ASP, es un dipeptido, en este caso contiene ácido aspártico y alanina. A diferencia del ASP, no contiene fenilalanina por lo que puede ser utilizado por personas con fenilcetonuria. El ALI es un polvo blanco cristalino inodoro soluble en disolventes polares como agua, metanol, etanol y propilenglicol [11]. Es un edulcorante intenso, con una capacidad endulzante 2000 veces más potente que la sacarosa, haciendo que se necesite una muy pequeña cantidad al ser usado en alimentos y bebidas [2]. Su vida media en condiciones de calor y ácidas es el doble que el ASP, pero menos estable que ACE o SAC.

Fue sintetizado en 1980 y fue solicitada su aprobación por la administración de drogas y alimentos de los EEUU (FDA) en 1986 y aún no se ha aprobado al igual que en la UE. Está aprobado en países como Australia, Nueva Zelanda, China, México y Colombia entre otros [12, 13].

El ALI es absorbido en el tracto gastrointestinal y rápidamente metabolizado, formando ácido aspártico y alanina. El ácido aspártico del ALI es metabolizado, mientras que la amida del aminoácido alanina es excretada con mínimos cambios metabólicos. Sin embargo, a pesar de que el aspártico se metaboliza completamente el aporte de calorías es mínimo [12].

1.1.4. Aspartamo

El ASP es un éster metílico del dipeptido de aminoácidos ácido aspártico y fenilalanina, no es libre de calorías ya que produce 4 calorías por gramo, es 180-200 veces más dulce que la sacarosa [14]. Fue descubierto en 1965. Bajo condiciones ácidas o alcalinas fuertes puede generar metanol por hidrólisis. Además, a elevadas temperaturas o elevados pHs los enlaces peptídicos se hidrolizan, lo que lo hace indeseable para el uso en cocina y horneado. ASP se metaboliza rápidamente en el intestino delgado formando ácido aspártico

(40%), fenilalanina (50%) y metanol (10%). Debido a la formación de fenilalanina no puede ser utilizado por personas con fenilcetonuria.

1.1.5. Neotame

Es un derivado de un dipeptido de los aminoácidos ácido aspártico y fenilalanina y se obtiene por N - alquilación del ASP [12, 15]. Es un polvo inodoro de color blanco, puede ser obtenido anhidro o usualmente hidratado. Es moderadamente estable térmicamente y muy potente, es 7000 a 13000 veces más dulce que la sacarosa y cerca de 30 a 60 veces más dulce que el ASP [16]. Es muy soluble en alcoholes y en agua, pero menos soluble que el ASP. En el 2002 fue aprobado como edulcorante general por la FDA después de una exhaustiva investigación científica y aún se encuentra en estudio para su aprobación por la UE. Es rápidamente metabolizado mediante la hidrólisis del éster metílico para formar el neotame desesterificado (92%) y metanol (8%). Debido a que no se forma fenilalanina es seguro para personas con fenilcetonuria.

1.1.6. Neohesperidina dihidrochalcona

El NHDC es conocido desde 1963, se obtiene por hidrogenación de un flavonoide presente en las naranjas amargas [17]. Es un compuesto muy dulce, considerado 1500-1800 veces más potente que la sacarosa con un sabor a mentol o regaliz, por ello se usa en combinación con otros edulcorantes [18]. Es estable frente elevadas temperaturas y condiciones ácidas o básicas, condiciones habituales en el procesado de alimentos y en el almacenamiento de bebidas [17]. Es utilizado en UE pero no está aprobado en EEUU. El NHDC se metaboliza en humanos, en primer lugar mediante la ruptura de la cadena glucosídica dando lugar a hesperetina dihidrochalcone que posteriormente es metabolizado a ácido 3-(3-hidroxi-4-metoxifenil)propiónico y floroglucinol.

Tabla 1. Principales propiedades físico-químicas de los edulcorantes estudiados.

Abrev.	N°CAS	Fórmula empírica	MW	Log Kow ^a	pKa ^a	Poder edulcorante ^c	IDA ^d (mg/kg peso corporal)
ACE	33665-90-6	C ₄ H ₅ NO ₄ S	163,15	-1,33 ^b	-0,28 ^b	200	15
CIC	100-88-9	C ₆ H ₁₃ NO ₃ S	179,24	1,033 ^b	-8,66	30-50	11
ALI	80863-62-3	C ₁₄ H ₂₅ N ₃ O ₄ S	331,43	3,834	3,71 ^b (ácido) 7,64 ^b (Básico)	2000	1
ASP	22839-47-0	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₅	294,31	0,07 ^b	3,71 ^b (ácido) 7,55 ^b (básico)	180-200	40
NEO	165450-17-9	C ₂₀ H ₃₀ N ₂ O ₅	378,47	3,834	3,68 (ácido) 8,33 (básico)	7000-13000	2

^aValores experimentales recogidos de la base de datos PhysProp (syracures Research Corporation); ^b Valores proporcionados por la base de datos SciFinder; ^c Relativo a la sacarosa; ^d ingesta diaria admisible (IDA) establecido por el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) [19]

Tabla 1. Principales propiedades físico-químicas de los edulcorantes estudiados. (continuación)

Abrev.	N°CAS	Fórmula empírica	MW	Log Kow ^a	pKa ^a	Poder edulcorante ^c peso corporal)	IDA ^d (mg/kg)
NHDC	20702-77-6	C ₂₈ H ₃₆ O ₁₅	612,58	0,205 ^b	6,85	1800	5 ^e
SAC	81-07-2	C ₇ H ₅ NO ₃ S	183,19	0,910 ^b	1,60	300	5
SUC	56038-13-2	C ₁₂ H ₁₉ C ₁₃ O ₈	397,63	0,229 ^b	12,52	600	15
STEV	57817-89-7	C ₃₈ H ₆₀ O ₁₈	804,87	0,636	12,51	250-300	4

^avalores experimentales recogidos de la base de datos PhysProp (syracures Research Corporation); ^b Valores proporcionados por la base de datos SciFinder; ^c Relativo a la sacarosa; ^d ingesta diaria admisible (IDA) establecido por el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA)[19]; ^e Establecido por el Comité Científico en Alimentación de la UE [20]

1.1.7. Sacarina

La SAC fue el primer edulcorante artificial descubierto (1878). Es 300 veces más dulce que la sacarosa pero tiene un sabor amargo y metálico. Es un polvo blanco e inodoro. Como el compuesto original es poco soluble en agua se utilizan las sales de sodio y de calcio altamente solubles [21]. No es muy estable térmicamente por lo que no es la primera opción para la cocina. La estabilidad química de este edulcorante y su bajo coste lo hace disponible para una gran variedad de aplicaciones. La SAC no es metabolizada por el cuerpo humano.

1.1.8. Sucralosa

La SUC fue sintetizada en 1976 a partir de la sacarosa por un proceso que sustituye 3 grupos hidroxilo por 3 átomos de cloro en la molécula de sacarosa. Es 450 - 650 veces más dulce que la sacarosa con un agradable sabor dulce y la calidad en cuanto al sabor es muy similar a la sacarosa [22]. Es estable a amplios rangos de pH (1 - 10) y temperatura por lo que puede utilizarse en productos de horneado y en productos que requieren una elevada vida útil. La mayor parte de la SUC ingerida se excreta a través de las heces sin metabolizar, sólo un 11-27% se absorbe. De la SUC absorbida un 70-80% se elimina a través de la orina y un 20-30% se metaboliza, es decir un 2-8% del total de SUC ingerida se metaboliza.

1.1.9. Esteviósido

El STEV es uno de los azúcares obtenidos naturalmente de la *Stevia rebaudiana bertonii* planta de la familia de los crisantemos y presente en la parte norte de Paraguay [2]. Es uno de los principales ingredientes de algunos edulcorantes comercializados con el nombre genérico de Estevia. El STEV tiene una capacidad endulzante de 250 a 300 veces mayor que la sacarosa, es un polvo cristalino higroscópico, soluble en agua, metanol y etanol. No pierde sus propiedades al ser sometido a altas temperaturas o cambios en el pH,

haciéndolos muy útiles en el proceso de pasteurización [23, 24]. No se metaboliza en el cuerpo humano.

1.2. Legislación de edulcorantes según la UE

Muchos países tienen regulados las dosis máximas de edulcorantes sintéticos que se pueden usar. En la UE, todos los productos que son comercializados se ven expuestos a estándares de calidad muy altos y la regulación es muy exigente para todo tipo de compuestos. Los edulcorantes no son la excepción a la norma y de hecho independiente de que una gran variedad de edulcorantes artificiales hayan sido aprobados en otros países del mundo, la UE ha aceptado solamente algunos de ellos o en su defecto otros que no son aprobados en los demás países si son aprobados para la UE. Actualmente en la UE se permite el uso de 7 edulcorantes artificiales que son ASP, ACE, CIC, NEO, SAC, SUC y NHDC [3]. Además, está regulado en uso de STEV en alimentos [4]. La legislación es específica para los distintos productos en los que se utilizan así como en los diferentes procesos de fabricación, es decir, algunos edulcorantes solamente pueden ser usados en combinación con otros o solamente pueden usarse en procesos específicos como la cocción, el horneado, producto terminado o a lo largo de la cadena de producción, esto va a depender del tipo de edulcorante [7]. En la Tabla 2 se pueden observar las concentraciones de los edulcorantes analizados permitidas por la Unión Europea en variedad de productos para beber.

Tabla 2. Legislación de la UE de uso en bebidas para los edulcorantes estudiados [4, 25]

Compuestos	TIPO DE BEBIDA				
	Concentración en mg/L				
	Néctares de fruta, tal como se definen en la Directiva 2001/112/CE, y néctares de productos similares ^a	Bebidas aromatizadas ^a	Cervezas y bebidas a base de malta ^d	Sidra y Perada	Otras bebidas alcohólicas ^e
ACE	350	350	350, 25 ^a	350	350
CIC	250	250	NP	NP	250
ALI	NP	NP	NP	NP	NP
STEV	100	80	70	NP	150
ASP	600	600	600, 25 ^a	600	600
NEO	20	20	20, 1 ^a	20	20
NHDC	30	30, 50 ^b	10, 10 ^a	20	30
SAC	80	80, 100 ^c	80	80	80
SUC	300	300	250, 10 ^a	50	250

^a Solo de valor energético reducido o sin azúcares añadidos; ^b solo leche y bebidas lácteas aromatizadas de valor energético reducido o sin azúcares añadidos; ^c solo bebidas carbónicas de valor energético reducido o sin azúcares añadidos; ^d solo cerveza sin alcohol o con grado alcohólico inferior a 1,2 % vol., Table Beer (que contenga menos de un 6 % de mosto primitivo), cervezas con una acidez mínima de 30 miliequivalentes expresada en NaOH y cervezas negras del tipo oud bruin; ^e exceptuando vino, hidromiel y bebidas espirituosas; NP No permitido.

1.3. Toxicidad y ecotoxicidad

Para la caracterización de riesgo de los edulcorantes no nutritivos, el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) ha establecido niveles de ingesta diaria admisible (IDA). Estos niveles varían de un compuesto a otro (Tabla 1), pero se encuentran entre 1 mg/kg de peso corporal para ALI a 40 mg/kg de peso corporal para ASP [19]. Para el CIC no existe un IDA establecido por el JECFA pero si por el Comité Científico en Alimentación de la UE en 5 mg/kg de peso corporal [20].

Desde el comienzo del uso de edulcorantes artificiales, hay un debate continuo sobre sus posibles riesgos para la salud. Numerosos estudios evalúan dichos riesgos y otras cuestiones de seguridad sobre estos compuestos [2, 22, 26-28]. Muchas investigaciones relacionan la SAC con problemas de cáncer de vejiga en ratas y la correlación en humanos con este tipo de cáncer en pacientes que consumen habitualmente SAC [1, 29-31].

Aunque algunos estudios correlacionan el consumo de ACE, SUC, STEV y CIC y la incidencia de cáncer en ratas, perros y monos [23, 28, 32-35]. A pesar de todos los estudios realizados aún no se puede afirmar que los edulcorantes artificiales produzcan cáncer en humanos. Existen algunas investigaciones donde se le atribuye a la SUC ser un potenciador de la migraña [32]. Además, otros estudios sobre SUC dicen que la mezcla con otros edulcorantes como maltodextrinas produce efectos adversos en las ratas macho, como alteraciones en el peso corporal, problemas en la microflora intestinal, cambio en la actividad enzimática intestinal y fallos a nivel proteico [36].

Una posible causa de los efectos tóxicos del consumo de edulcorantes artificiales podría ser debida a los productos de degradación de estos compuestos. Por ejemplo el CIC por sí mismo presenta baja toxicidad, pero es parcialmente metabolizado por las bacterias intestinales a ciclohexilamina, la cual es muy tóxica para el organismo humano [9]. Algunas personas al consumir CIC durante un largo periodo de tiempo lo excretan sin transformarse y otras lo metabolizan en ciclohexilamina [37].

Uno de los productos de degradación del ACE es la acetoacetamida, la cual, si se consume en grandes cantidades, es tóxica para el ser humano [38]. Este compuesto es producido durante el almacenamiento prolongado de bebidas que contienen ACE.

El ASP es metabolizado por el cuerpo humano en sus estructuras fundamentales: ácido aspártico, fenilalanina y metanol. La fenilalanina es tóxica para personas que presentan fenilcetonuria (enfermedad metabólica). El ASP al

almacenarlo por largos periodos de tiempo a altas temperaturas también se degrada en ácido aspártico, fenilalanina, metanol así como un subproducto la dicetopiperazina que en altas concentraciones es tóxica para el ser humano [2].

La única información que existe sobre ecotoxicidad de los edulcorantes se remite a la SUC. En una investigación sobre bioacumulación de SUC, se estudió el comportamiento y los efectos fisiológicos de la SUC en crustáceos [39]. Se encontró que tanto la fisiología como el comportamiento de locomoción se vieron afectados por la exposición a este edulcorante. Independiente de si estas repuestas de comportamiento se iniciaron mediante mecanismos tradicionales tóxicos o efectos estimulantes, debe considerarse como una advertencia, ya que los organismos pueden cambiar de comportamiento normal, lo que en última instancia puede tener consecuencias ecológicas de gran impacto [40]. Es necesario realizar más investigaciones sobre el impacto ecotoxicológico de los edulcorantes artificiales, debido a que los efectos a largo plazo de una exposición continua a niveles bajos de estos compuestos es bastante desconocida [41].

1.4. Presencia de edulcorantes en el medio ambiente

1.4.1. Edulcorantes en agua de depuradora

Los edulcorantes artificiales son contaminantes traza, que al igual que los productos farmacéuticos y los productos de cuidado personal (PPCPs), se encuentran en las aguas residuales y de allí migran a las aguas superficiales. De los siete edulcorantes artificiales que se suelen analizar en las aguas residuales (ACE, ASP, CIC, NEO, NHDC, SAC y SUC) sólo cuatro, ACE, CIC, SAC y SUC, suelen ser detectados [41-43], esto es esperable ya que ASP, NEO, ALI y NHDC se metabolizan en el cuerpo humano por lo que será más probable encontrar en las aguas residuales los principales metabolitos que los compuestos originales [37].

La mayoría de estudios existentes concentran sus esfuerzos en la SUC. Las determinaciones de SUC han sido realizadas en efluentes e influentes de plantas de tratamiento de aguas residuales en Suecia [44-46], Suiza [47-49], Alemania [43, 49, 50], Austria [49], Canadá [51, 52] e Israel [43]. En todos estos estudios la concentración de SUC se encontró entre 0,02 y 80 $\mu\text{g/L}$. Los estudios realizados en Suiza, Alemania y Suecia además mostraron que no existe una eliminación significativa de la SUC durante los tratamientos mecánico-biológicos de aguas residuales.

Otro edulcorante que no se elimina en las plantas de tratamiento de aguas residuales es el ACE, que se ha encontrado en aguas residuales de Suiza [47, 49], Alemania [43, 49, 50], Austria [49], Canadá [51, 52] e Israel [43]. Los niveles de ACE encontrados en Suiza y Alemania fueron 1 o 2 órdenes de magnitud mayores que los niveles de SUC.

Por otro lado el CIC si es eliminado en más de un 99% durante los tratamientos secundarios y terciarios en las plantas de tratamiento de aguas residuales. En influentes se ha encontrado en aguas residuales de Suiza y Alemania en [47, 49] a concentraciones entre 10 y 200 $\mu\text{g/L}$.

La eliminación de SAC en las plantas de tratamiento de aguas residuales es similar al CIC, mayor del 90%, encontrándose concentraciones en influentes en de varias decenas de $\mu\text{g/L}$ y en efluente del orden de 1 $\mu\text{g/L}$ [47, 49].

Debido a las altas concentraciones de ACE y SUC [42, 47, 53, 54], combinado con su persistencia [42], la alta solubilidad en agua, su baja absorción en sólidos, y la alta sensibilidad de los métodos analíticos modernos para la detección de trazas, los hacen marcadores antropogénicos ideales de contaminación con aguas residuales [47, 50, 52, 54, 55]. Usando el ACE como marcador, se pueden detectar incluso aportaciones de agua residual en las corrientes de agua de menos del 1% [47].

1.4.2. Edulcorantes en aguas superficiales y subterráneas

Al igual que en aguas residuales los edulcorantes artificiales que han sido encontrados en aguas superficiales y subterráneas son SUC, ACE, CIC y SAC, siendo ACE y SUC los compuestos encontrados con mayor frecuencia y mayor concentración [43, 47]. Como se desarrolla a continuación las concentraciones de ACE y SUC encontradas estuvieron en el rango de ng/L a µg/L en ríos y lagos.

La SUC ha sido el edulcorante más estudiado y su distribución ha sido monitorizada de forma muy extensa en Europa por Loss y col. [56], encontrando concentraciones de hasta 1 µg /L de SUC a lo largo de 120 ríos en 23 países. Las primeras mediciones en aguas de lago se realizaron en Suiza en 2008, donde la SUC no fue detectada en grandes concentraciones [47]. En otro estudio realizado en agua de lago, en este caso en el lago Constanza en Suiza se encontraron concentraciones de SUC entre 0,013 y 0,009 µg/L en el epilimnio y el hipolimnio del lago respectivamente [49]. Además de los estudios de agua dulce, existen algunas publicaciones sobre la presencia de SUC en agua de mar, detectándose en concentraciones de 0,0008 a 0,39 µg/L en aguas de la costa de EEUU [57, 58]. En otro estudio realizado en agua del mar Ártico de Noruega no se detectó SUC, hay que tener en cuenta que este mar noruego tiene un aporte insignificante de aguas residuales [58].

El ACE se encontró en ríos de Alemania y Suiza a concentraciones mayores que la SUC, entre 0,01 y 2,7 µg/L [43, 47]. En aguas subterráneas en un estudio llevado a cabo por Buerge y col. en el área de Zurich (Suiza) se encontraron concentraciones de hasta 4,7 µg/L [47]. En agua subterránea en Alemania los niveles de ACE fueron más altos, entre 12 y 6,9 µg/L [59].

1.4.3. Edulcorantes en lodos

Los principales estudio en lodos se realizaron en Suecia, con lodos de dos plantas de tratamiento de aguas residuales [45, 46], y en Suiza, en lodo digerido

de cuatro plantas de tratamiento de aguas residuales [53]. Estos estudios concluyen que no existe una adsorción significativa de los edulcorantes ACE, CIC, SAC [53] y SUC [45, 46, 53] en partículas de lodo.

En el estudio suizo, ACE se encontró a mayor concentración entre 23-43 $\mu\text{g/L}$, para los otros compuestos las concentraciones estaban en el rango entre 0,6 y 16 $\mu\text{g/L}$. En general las concentraciones medidas en el lodo digerido fueron similares a las concentraciones en las aguas residuales sin tratar, a excepción de CIC, que se degrada en aproximadamente un 90% en los tanques de digestión [53].





2. METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE EDULCORANTES

Uno de los puntos clave en el proceso de análisis para la determinación de cualquier analito es la preparación de la muestra. El principal objetivo es aislar el analito de la matriz que lo contiene haciendo que este sea compatible con el sistema de determinación a utilizar. Lo ideal es poder separar el analito de otras especies que puedan causar interferencia en el momento del análisis, buscando así mejorar la selectividad del método. También se debe incrementar la concentración, con el fin de mejorar la sensibilidad del método. En esta tesis doctoral se ha abordado la determinación de edulcorantes artificiales en agua, lodos y bebidas siendo las técnicas de extracción usadas: la extracción en fase sólida (SPE) y extracción por líquidos presurizada (PLE). El análisis cromatográfico de los analitos extraídos por las técnicas descritas anteriormente se realizó mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (HPLC-MS/MS).

En esta sección se recoge una revisión de las técnicas utilizadas en la presente tesis.

2.1. Extracción en fase sólida (SPE)

Se trata de una técnica de preparación y tratamiento de muestras que data de la década de los 70 cuando columnas empaquetadas con partículas de resina Rohm y Haas XAD fueron usadas para concentrar a muy bajas concentraciones contaminantes orgánicos de muestras de agua. Está basada en la retención selectiva de analitos en un adsorbente sólido y su posterior elución en un disolvente adecuado. Con la SPE se pretende conseguir uno o varios de los siguientes objetivos:

- **Enriquecimiento de trazas:** extracción de grandes cantidades de muestra a pequeños volúmenes de elución. De esta manera, los analitos a niveles de trazas se ven concentrados antes de la etapa de medida.

- **Limpieza de las muestras:** debido a la selectividad del adsorbente y/o utilizando los disolventes de lavado adecuados se eliminan interferencias presentes en la muestra.

- **Fraccionamiento de la muestra:** ésta se divide en grupos de compuestos que son eluidos con el disolvente adecuado en cada caso.

- **Almacenamiento de analitos:** se pueden guardar de esta manera analitos que son inestables en medio líquido o que tienen una alta volatilidad.

Entre sus múltiples ventajas se destacan frente a la extracción líquido-líquido: baja manipulación de muestra, bajo consumo de disolventes orgánicos y facilidad de automatización [60].

Por estos y otros motivos, la SPE es la técnica de referencia en la preparación de muestras de agua [61] y de matrices líquidas en general.

2.1.1. Etapas del proceso de extracción mediante SPE

Las etapas de la técnica de SPE se detallan a continuación (Figura 2) [60, 62]:

- **Acondicionamiento:** Etapa necesaria para obtener resultados reproducibles cuando se trabaja con fases ligadas o enlazadas sobre partículas, específicamente con fases no polares como C18. Consiste en tratar el adsorbente con uno o varios disolventes capaces de solvatarlo, facilitando así su posterior contacto con los componentes de la muestra. Entre los disolventes más empleados están el metanol (que interacciona tanto con los grupos silanoles polares como con los grupos funcionales ligados apolares), el acetonitrilo, el isopropanol, el tetrahidrofurano y la acetona. Con otros materiales, el

acondicionamiento puede realizarse o no, y si se lleva a cabo su principal objetivo es limpiar el adsorbente.

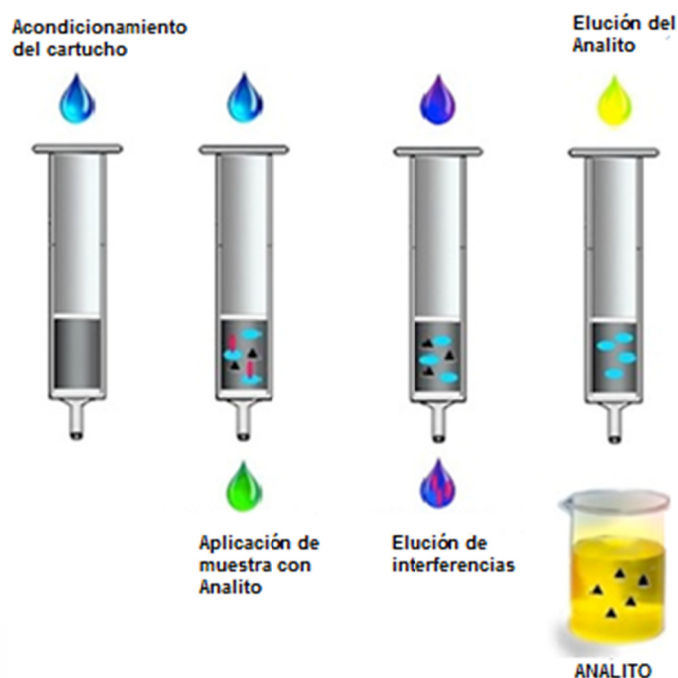


Figura 2. Etapas típicas de un procedimiento de SPE

➤ **Paso de la muestra:** se hace pasar la muestra a través de la fase sólida, que retiene selectivamente los analitos y algunos de los compuestos interferentes. La retención se produce porque entre estas moléculas y el adsorbente se genera una atracción intermolecular.

➤ **Lavado o elución de la matriz:** una vez cargada la muestra, se pasa un disolvente que tenga más afinidad por las interferencias que la fase sólida; es importante que en este proceso no se vean arrastrados los analitos, para lo cual se debe prestar especial atención a la elección del disolvente de lavado (suficientemente selectivo) y de la fase estacionaria. Esta etapa no siempre se realiza.

➤ **Elución de los analitos:** los analitos concentrados y purificados son eluidos del adsorbente mediante una fase líquida que interacciona más fuertemente con ellos que las partículas de fase sólida. La cantidad de

disolvente utilizada en esta etapa debe ser mínima para asegurar la obtención de unos buenos factores de preconcentración.

2.1.2. Dispositivos comerciales

Existen tres dispositivos comerciales para llevar a cabo una SPE: jeringas, cartuchos y discos [60]. Sin embargo, en este trabajo sólo hablaremos de los cartuchos ya que son los más utilizados.

2.1.3. Mecanismos de interacción

Entre los mecanismos más comunes de interacción se encuentran los siguientes [60, 62]:

- **Mecanismo de fase normal:** la unión con los analitos se establece a través de puentes de hidrógeno, interacciones Π - Π , interacciones dipolo-dipolo o interacciones dipolo-dipolo inducido. Sirve para aislar analitos más polares que la matriz, y se utiliza principalmente para la limpieza de extractos orgánicos o para la extracción de analitos desde líquidos apolares (no se aplica a muestras acuosas).
- **Mecanismo de fase reversa:** los mecanismos de interacción son tradicionalmente del tipo Fuerzas de Van der Waals y permiten aislar analitos orgánicos de matrices polares como el agua.
- **Intercambiadores iónicos:** están formados por un soporte de sílice (o un polímero de estireno-divinilbenceno) con grupos iónicos enlazados. Las interacciones son de naturaleza electrostática y se establecen entre las moléculas de analito cargadas y los grupos funcionales del adsorbente con carga opuesta a la del analito. Para que la retención sea efectiva la matriz debe estar a un pH donde ambos (analito y adsorbente) estén cargados y además no debe presentar concentraciones elevadas de otras especies iónicas.

2.1.4. Tipos de adsorbentes

Las fases sólidas utilizadas en SPE son similares a las empleadas en cromatografía líquida en columna; las más comunes son el carbón activo, el gel de sílice, el silicato de magnesio (Florisil), las sílices enlazadas, los óxidos de aluminio derivatizados y los materiales poliméricos [60, 62].

Sílices enlazadas: Son un sustrato de sílice unido a grupos organosilanoles a través de enlaces silil-éter. Las sílices se pueden modificar con diferentes grupos funcionales como amino, ciano, fenol, C18, entre otros.

Carbón grafitizado: es un adsorbente no específico y no poroso con una gran superficie específica. Permite concentrar compuestos orgánicos altamente polares mediante interacciones hidrofóbicas e interacciones interelectrónicas. Pero además, se piensa que contiene complejos carbono-oxígeno que proporcionan sitios con carga positiva para el intercambio de aniones; en este sentido se puede considerar como un adsorbente mixto (fase reversa y cambiador aniónico) de alta capacidad. Una de las desventajas del carbón grafitizado es la excesiva retención de algunos analitos, efecto que puede remediarse (si la retención no es irreversible) realizando la elución en sentido opuesto al de la carga [63].

Adsorbentes poliméricos: los más comunes son los copolímeros de poliestireno-divinilbenceno (PS-DVB), cuya superficie hidrófoba contiene un gran número de sitios aromáticos activos capaces de establecer interacciones Π - Π con moléculas insaturadas. Superan algunas limitaciones de las sílices enlazadas, ya que retienen más fuertemente a los analitos polares y son estables en un mayor intervalo de pH.

Tabla 3. Características de diferentes adsorbentes poliméricos

Adsorbente	Proveedor	Estructura ^a	Tamaño de poro (Å)	Diámetro de partícula (µm)	Superficie específica (m ² /g)
Amberlita XAD-2	Supelco	PS-DVB	90	20 - 60	300
PLRS	Polymer Lab	PS-DVB	100	15 - 60	550
Bond Elut ENV+	Varian	PS-DVB	450	125	500
Bond Elut Plexa	Agilent	PS-DVB	100	45	550
Bond Elut Plexa PAX	Agilent	PS-DVB cm	100	45	550
Envichrom P	Supelco	PS-DVB hc	140	80 - 160	900
Isolute ENV+	IST	PS-DVB-OH	100	90	1000
Lichrolut EN	Merck	PS-DVB hc	80	40 - 120	1200
Porapax RDX	Waters	DVB-VP	55	120	550
Oasis HLB	Waters	DVB-VP	80	30 - 60	810
Oasis MCX	Waters	DVB-VP -SO ₃ ⁻²	-	30 - 60	-
Oasis MAX	Waters	DVB-VP - NH ₃) ₂ (CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃)	-	30 - 60	-
Oasis WAX	Waters	DVB-VP - N(CH ₂) ₂ N(CH ₂) ₂	-	30 - 60	-
Oasis WCX	Waters	DVB-VP -(COOH) ₂	-	30 - 60	-
Strata X	Phenomenex	PS-DVB-VP	85	33	800
Bond Elut PPL	Varian	PS-DVB cm	100	125	600

^a PS: Poliestireno-Divinilbenceno; DVB: Divinilbenceno; VP: Vinil pirrolidona; hc: "hypercrosslinked"; cm: modificado químicamente

En la Tabla 3 se muestran las características de los principales adsorbentes poliméricos. La eficiencia de estos adsorbentes depende de varios parámetros físico-químicos: tamaño de partícula, diámetro y volumen de poro, área superficial y grado de reticulación.

Las resinas Amberlita XAD-2 han sido comúnmente utilizadas para la extracción de contaminantes orgánicos en aguas. Sin embargo, su popularidad

ha descendido con la aparición de nuevos materiales ya que plantean algunos problemas: bajos volúmenes de ruptura y velocidad de muestreo, pérdida de selectividad y necesidad de etapas de limpieza antes del paso de la muestra. Varias casas comerciales producen “resinas químicamente modificadas”. Se trata de polímeros convencionales a los que se les introducen grupos funcionales polares que incrementan su hidrofiliidad, resultando excelentes para la extracción de compuestos orgánicos muy polares desde grandes volúmenes de agua.

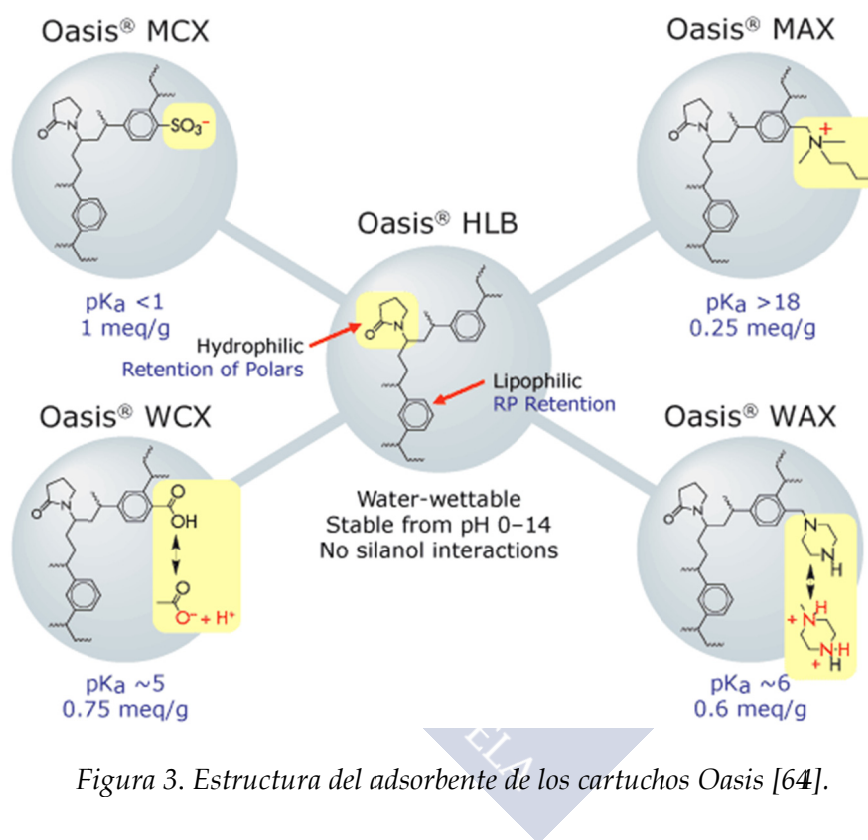


Figura 3. Estructura del adsorbente de los cartuchos Oasis [64].

También se han desarrollado adsorbentes como los Porapak RDX, Oasis HLB, Strata X e Isolute Env⁺ los cuales están formados por copolímeros de divinilbenceno-vinilpirrolidona (DVB-VP) o modificados con VP y son capaces de aislar compuestos orgánicos de diferente polaridad de matrices acuosas (Tabla 3). En la

Figura 3 se observa la estructura de los diferentes cartuchos Oasis comercializados por Waters Corporation. Entre ellos se encuentran los cartuchos de las fases de modo mixto Oasis MCX y Oasis MAX las cuales combinan las propiedades adsorbentes de la fase Oasis HLB con las características de un cambiador catiónico fuerte (con grupos sulfonato) y un

cambiador aniónico fuerte (con grupos amino cuaternario), respectivamente. Adicionalmente, los Oasis WCX y WAX ofrecen los mismos beneficios y características que la química HLB con la habilidad de retener y liberar ácidos y bases fuertes.

2.2. Extracción con disolventes presurizados (PLE)

La extracción con disolventes presurizados (PLE), también denominada extracción acelerada con disolventes (ASE), es una técnica de preparación de muestra que combina el uso de altas temperaturas (40 - 200 °C) y presiones elevadas (500-3000 psi) para extraer rápida y eficazmente los analitos de matrices sólidas o semisólidas [65-67].

El modo más usual de hacer la extracción es el modo estático, en el que el disolvente es introducido en la celda y ésta se mantiene a presión constante un tiempo determinado. Tras esta etapa, la celda se vacía recogiendo todo el extracto en un vial colector [65-67].

2.2.1. Parámetros que afectan la PLE

Los parámetros fundamentales que afectan a la eficacia de extracción, y que deben tenerse en cuenta a la hora de desarrollar un método de PLE, son los siguientes [65-68] :

➤ *Temperatura*

Tiene que ser suficientemente elevada como para aumentar las recuperaciones y favorecer la cinética de extracción, sin degradar a los compuestos objeto de estudio. Normalmente, es superior al punto de ebullición del disolvente, pero ligeramente inferior a su punto crítico. Al aumentar la temperatura, el disolvente disminuye su viscosidad y penetra con mayor facilidad en los poros de la matriz, favoreciendo la difusión de los analitos, es

decir la cinética de extracción. De este modo, la eficacia de extracción se incrementa, minimizando el volumen de disolvente empleado.

➤ *Disolvente*

Debe ser capaz de solubilizar los analitos sin arrastrar el resto de los componentes de la matriz. Las mezclas de disolventes de diferentes polaridades pueden ser usadas para la extracción de un amplio rango de familias de compuestos. La mayoría de disolventes pueden emplearse en PLE, incluyendo agua y mezclas acuosas tamponadas. No se recomiendan ácidos fuertes debido a su reacción con el acero, pero se pueden usar ácidos débiles, como ácido acético o fosfórico, añadidos a agua o a disolventes polares en porcentajes de hasta un 10% (v/v).

➤ *Presión*

Ésta debe ser elevada para mantener el disolvente en estado líquido a la temperatura de trabajo. Sin embargo, no es un factor que afecte en gran medida a la eficacia de extracción, de modo que puede ser fijado de antemano.

➤ *Tiempo*

El aumento del tiempo estático a elevadas temperaturas favorece la difusión de los analitos al disolvente de extracción evitando su retención en la matriz.

➤ *Número de ciclos*

El uso de varios ciclos de extracción estáticos fue desarrollado para introducir fracciones nuevas de disolvente durante el proceso de extracción. El uso de varios ciclos de extracción es útil para muestras difíciles de penetrar o que presenten muy alta concentración de analito.

➤ *Porcentaje de flush*

Después de cada ciclo de extracción en modo estático, se hace pasar un volumen de disolvente a través de la celda, expresado en porcentaje (% flush)

de su volumen interior, para arrastrar posibles trazas de los analitos que pudiesen quedar en ella. Ese volumen, en el caso de que se usen dos o más ciclos de extracción, es dividido entre el número de los mismos.

2.2.2. Equipamiento para PLE

La técnica de PLE fue comercializada en 1995 por la compañía Dionex y el modelo más utilizado es el extractor ASE 200, cuya fotografía se muestra en la Figura 4.

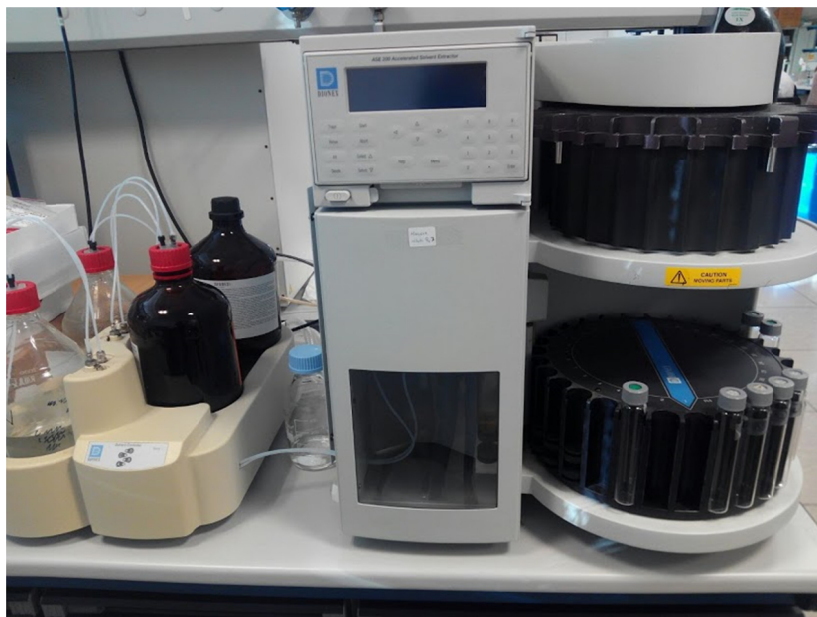


Figura 4. Equipo ASE 200 de Dionex.

Independientemente del modelo y la casa comercial, los equipos de PLE constan de:

- una bomba para impulsar el disolvente,
- un horno donde se introducen las celdas de acero para mantenerlas a la temperatura seleccionada,
- un vial colector en donde se recoge el extracto líquido,
- nitrógeno para purgar la celda al final del proceso de extracción.

2.2.3. Etapas del proceso de extracción por PLE

Las etapas del proceso de extracción por PLE se explican a continuación [68]:

Preparación de muestra: Con esta etapa se pretende reducir el tamaño de partícula para aumentar la superficie de contacto entre la muestra y el disolvente, evitando también la agregación de las partículas de la muestra. Para ello, se utilizan agentes dispersantes como la arena o la tierra de diatomeas. La muestra debe secarse para evitar la presencia de agua que dificulte la penetración de disolvente en sus poros, sobre todo cuando se trata de extraer analitos poco polares con disolventes apolares. Para ello, se aconseja la liofilización de la muestra, el secado en horno o la adición de agentes desecantes.

Preparación de celda: Se colocan filtros de celulosa y/o fibra de vidrio en los extremos de la celda con el fin de evitar la obturación de los conductos del extractor de PLE. La celda se rellena con la muestra y con una matriz inerte (tierra de diatomeas, arena) para ocupar el volumen muerto. Además se pueden introducir co-adsorbentes para purificar el extracto en la misma etapa.

Extracción: La celda se introduce en el horno a la temperatura de extracción, se rellena con disolvente y se presuriza. También se puede precalentar la celda previamente y mantenerla a esa temperatura un tiempo determinado. Después de recoger el disolvente con los analitos en el vial colector, se bombea disolvente fresco a través de los conectores y celda (% de *flush*). Finalmente, se purga la celda con nitrógeno para arrastrar el disolvente que permanece impregnando la muestra, el dispersante y, en su caso, el co-adsorbente en la celda.

2.3. Cromatografía Líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS)

2.3.1. Cromatografía Líquida de alta resolución (HPLC)

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una técnica para separar componentes usando una variedad de interacciones químicas entre el analito y la columna cromatográfica. Físicamente es un sistema compuesto de un reservorio de fase móvil, bomba, inyector, columna de separación y detector. El analito se pasa a través de una columna de la fase estacionaria bombeando la fase móvil líquida con alta presión. La muestra se introduce en pequeños volúmenes al flujo de la fase móvil y allí se retarda por medio de interacciones químicas con la fase estacionaria mientras atraviesa la columna [69, 70].

El retardo se conoce como **tiempo de retención** para cada analito. Depende de la naturaleza del analito, de la fase estacionaria y de la composición de la fase móvil. Los disolventes más comunes usados en la fase móvil son combinaciones de agua purificada con disolventes orgánicos, normalmente metanol o acetonitrilo [70, 71].

Estas combinaciones introducen el concepto de **gradiente de elución**. Este consiste en la variación de la composición de la fase móvil, para adaptarse a los diferentes analitos y conseguir mejores resultados. El gradiente separa la matriz del analito y de otros analitos en función de la afinidad del analito por la composición de la fase móvil [72].

2.3.1.1. Mecanismos de separación en HPLC

2.3.1.1.1. Cromatografía de fase reversa (RPLC)

Es uno de los principales métodos para la separación de moléculas en disolución, se estima que entre el 80 y 90% de las separaciones cromatográficas actuales por HPLC se realizan por RPLC [73]. Se caracteriza por una fase

estacionaria apolar, por lo general, con cadenas alquílicas de longitud entre 1 a 18 carbonos injertados sobre la superficie de la sílice y una fase móvil de polaridad moderada [74-76]. Por ello, los tiempos de retención serán mayores para moléculas apolares y las de carácter polar eluirán antes de la columna. Así mismo, los tiempos de retención disminuyen al aumentar la proporción de fase móvil apolar. Sin embargo, todos los procesos de retención dependen de la organización molecular de las cadenas injertadas a la fase estacionaria [74, 77]. También es importante el control del pH por medio de modificadores que actúan como tampón.

Existe una gran variedad de disolventes orgánicos que mezclados con fase acuosa pueden ser utilizados en RPLC, pero en la práctica solamente se utilizan unos pocos. Los dos más ampliamente usados son acetonitrilo y metanol. El isopropanol (2- propanol) puede emplearse debido a sus fuertes propiedades de elución, pero está muy limitado por su alta viscosidad que se traduce en menor eficiencia de las columnas y por ende genera presiones muy altas. La elución suele llevarse a cabo en gradiente. La fase estacionaria más común en la RPLC es la octadecil silano (C18), aunque existen otras como la C8 y la C4, empleadas en menor medida.

2.3.1.1.2. Cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC)

Las primeras aplicaciones de cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC) se publicaron hace más de 30 años, y fueron durante mucho tiempo específicas para el análisis de carbohidratos [78].

HILIC es una valiosa alternativa a las separaciones de RPLC de analitos polares, débilmente ácidos o básicos. En principio, este modo de separación puede ser caracterizado como fase normal, con la particularidad de realizarse sobre columnas polares en fases móviles acuoso-orgánicas ricas en disolventes orgánicos miscibles con agua, por lo general acetonitrilo [79].

Con fases móviles altamente orgánicas en el modo HILIC generalmente se mejora la ionización en la fuente de iones del electrospray (ESI) de un espectrómetro de masas (MS), en comparación con fases móviles con mayores concentraciones de agua utilizadas generalmente en fase reversa.

Las fases estacionarias más comunes en HILIC son: gel de sílice y gel de sílice derivatizada con grupos amino, amida, ciano, carbamato, diol, polioliol, sulfobetaina zwitteriónica o poli (2-sulfoetil aspartamida) y otras fases estacionarias polares [80, 81].

2.3.1.1.3. Cromatografía líquida de intercambio iónico

La cromatografía de intercambio iónico es un modo cromatográfico que permite la separación de iones y moléculas polares basado en las propiedades de carga de las moléculas. Puede ser usada en casi cualquier tipo de molécula cargada, incluyendo grandes proteínas, pequeños nucleótidos y aminoácidos [82, 83].

La fase estacionaria (resina de intercambio) presenta en la superficie grupos funcionales iónicos que interactúan con iones de carga opuesta. Por ello podemos dividir este modo cromatográfico en cromatografía de intercambio catiónico y cromatografía de intercambio aniónico.

La cromatografía de intercambio catiónico retiene cationes cargados positivamente debido a que la fase estacionaria muestra un grupo funcional cargado negativamente (ej: SO_3^- , CO_2^-). Las resinas cuyo grupo funcional activo es un sulfonato (SO_3^-) se consideran resinas intercambiadoras ácidas fuertes, mientras que aquellas cuyo grupo funcional activo es un ión carboxilato (CO_2^-) se consideran resinas ácidas débiles.

La cromatografía de intercambio aniónico retiene aniones usando grupos funcionales cargados positivamente, como un catión de amonio cuaternario, cambiador fuerte, o un catión amonio terciario, cambiador débil.

La separación se produce porque las sustancias tienen variedad de grados de interacción con la resina de intercambio iónico debido a las diferencias en sus cargas, densidades de carga y distribución de carga en la superficie. Estas interacciones pueden ser controladas por condiciones tales como la fuerza iónica y la variación del pH [82, 83].

2.3.1.1.4. Cromatografía de modo mixto

En algunos casos, la RPLC no puede separar simultánea y selectivamente mezclas complejas de compuestos polares. Durante mucho tiempo la solución a estos problemas estaba en tratar las muestras con procedimientos alternativos por ejemplo formación de par-iónico cromatográfico o por derivatización o reinyectando los extractos por diferentes modos cromatográficos (modo normal, intercambio iónico o par-iónico). Sin embargo, estos métodos generan problemas conocidos con el tipo de fase móvil, la clase de par iónico, tiempos largos de equilibrio de la columna, aparición de picos fantasma o la no compatibilidad con HPLC-MS entre otros. Como solución a estos problemas se han desarrollado fases polares embebidas estables a altos pHs como es el caso de la HILIC la cual ha resuelto parcialmente algunos de los inconvenientes [84]. Alternativamente a ello, hace 20 años aparecieron las fases estacionarias en modo mixto como una opción interesante ya que estas fases incluyen los modos de RPLC e intercambio iónico [85, 86]. Son por lo tanto capaces de retener analitos polares como no polares o analitos cargados. De esta manera permiten el análisis de muestras complejas.

Los primeros experimentos fueron desarrollados con columnas en serie con diferentes funcionalidades [87], aunque actualmente existen diferentes tipos de columnas de modo mixto:

- Columnas tipo I: Empaquetamientos específicos con diferentes funcionalidades.

- Columnas tipo II: Fases químicamente unidas que incorporan funcionalidades usando mezcla de ligandos.

Teniendo en cuenta el tipo de ligando y la forma como este está unido a la sílice las columnas tipo II podemos clasificarlas en:

- Columnas tipo III: Los grupos funcionales son incrustados en la mitad de las cadenas hidrofóbicas unidos a la sílice.
- Columnas tipo IV: Donde los grupos funcionales se colocan en el extremo de las cadenas hidrófobas.

Por otro lado existen columnas trimodales fase reversa, intercambio aniónico e intercambio catiónico (RP/AX/CX) basadas en el sistema de doble funcionalización de los ligandos y en una nanotecnología de sílice desarrollada recientemente [88].

Las columnas de modo mixto se usaron inicialmente para separar biomoléculas tales como aminoácidos, ácidos nucleicos, péptidos y proteínas [89-92]. A medida que pasa el tiempo el campo de aplicación se ha extendido al desarrollo de fármacos e impurezas en el desarrollo de drogas [93, 94], estudios de metabolismo [95, 96], análisis de especiación [97], vitaminas liposolubles [98] entre otros.

El número de variables de operación con estas columnas es mayor por ende se debe tener cuidado con el pH de la fase móvil, la fuerza iónica y la proporción del modificador orgánico ya que variables necesarias para controlar la retención y la selectividad de la fase estacionaria para analitos iónicos, polares e hidrofóbicos.

En general, todo tipo de moléculas ácidas, básicas y neutras son menos retenidas cuando la proporción de modificador orgánico se incrementa, aunque cambios importantes en la selectividad pueden aparecer si las otras variables se modifican simultáneamente. Por otro lado, si el modificador orgánico sobrepasa el 80 ó 90%, las columnas pueden presentar un modo HILIC en vez de un modo

de RP. Ambos modos cromatográficos proveen mecanismos de separación eficiente.

2.3.2. Espectrometría de masas (MS)

La espectrometría de masas (MS) es una técnica analítica que proporciona información tanto cualitativa (estructura) como cuantitativa (concentración) de las moléculas analizadas previamente convertidas en iones. Las moléculas de interés se introducen en primer lugar a una fuente de ionización donde se ionizan adquiriendo carga negativa o positiva. Los iones se separan en el analizador de masas hasta que alcanzan el detector de acuerdo con su relación masa/carga (m/z). Una vez en contacto con el detector, se generan señales que son registradas en el ordenador y son representadas en un espectro de masas que muestra la abundancia relativa de las señales en función de su relación m/z .

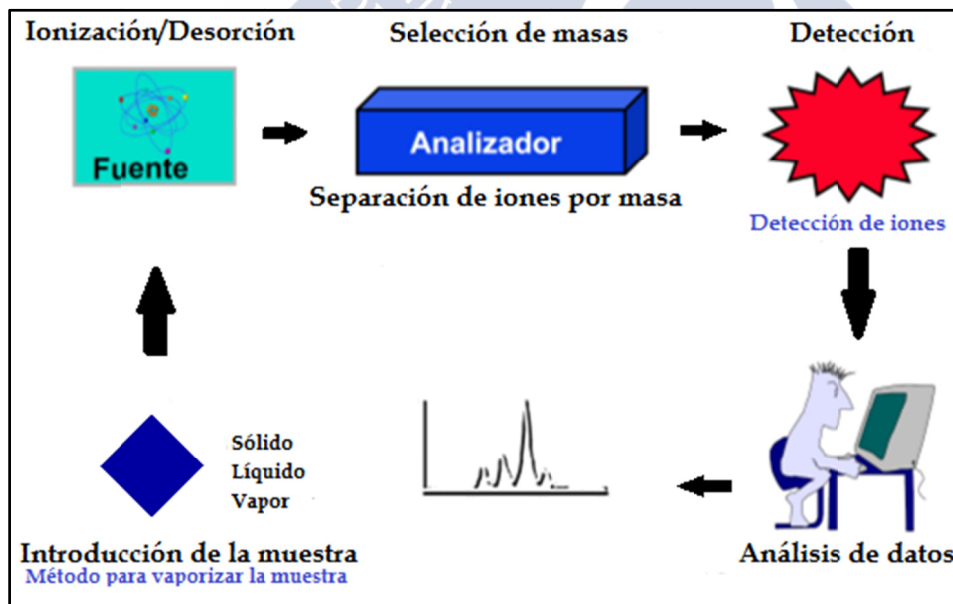


Figura 5. Etapas del análisis por MS

Así pues, para el análisis de las muestras por MS se producen 4 procesos básicamente, los cuales se resumen en la Figura 5:

- ✓ Ionización de la muestra
- ✓ Separación de los iones según m/z
- ✓ Detección de los iones
- ✓ Tratamiento de los datos

2.3.2.1. Ionización por electrospray (ESI)

La ionización de la muestra es clave y puede llevarse a cabo de diferentes formas, según la naturaleza de la propia muestra y lo que se pretenda detectar en el análisis. En HPLC las técnicas más habituales hoy en día son las técnicas de ionización a presión atmosférica (API). Existen fundamentalmente tres tipos de ionización: la ionización química a presión atmosférica (APCI), la fotoionización a presión atmosférica (APPI) y ESI.

Teniendo en cuenta la polaridad de los edulcorantes, en este estudio se empleó ESI como técnica de ionización, siendo además la más ampliamente utilizada.

El fenómeno de electrospray se conoce desde hace cientos de años, pero hasta comienzos del siglo XX no se comprendió verdaderamente lo que podía significar su aplicación a la ciencia [99]. A finales de los años 1960, los experimentos pioneros de Dole [100] desarrollaron la primera aplicación por ESI. Pasaron otros 20 años hasta que el trabajo realizado en el laboratorio de John Fenn demostrara por primera vez la utilidad de la ESI para ionizar compuestos de importancia biológica y alta masa molecular, lo que abrió la puerta a su consiguiente análisis por MS. Este trabajo le proporcionó a John Fenn el premio Nobel de Química en 2002, como uno de los pioneros de la MS [101]. En las publicaciones originales de finales de los años 1980, Fenn y sus colaboradores demostraron los principios básicos experimentales de la técnica

ESI y describieron las primeras aplicaciones: la ionización suave de compuestos no volátiles y térmicamente lábiles, de proteínas con cargas múltiples y de complejos intactos. La fuente ESI ha experimentado un desarrollo continuo desde sus inicios, pero el esquema básico continúa siendo el mismo (Figura 6).

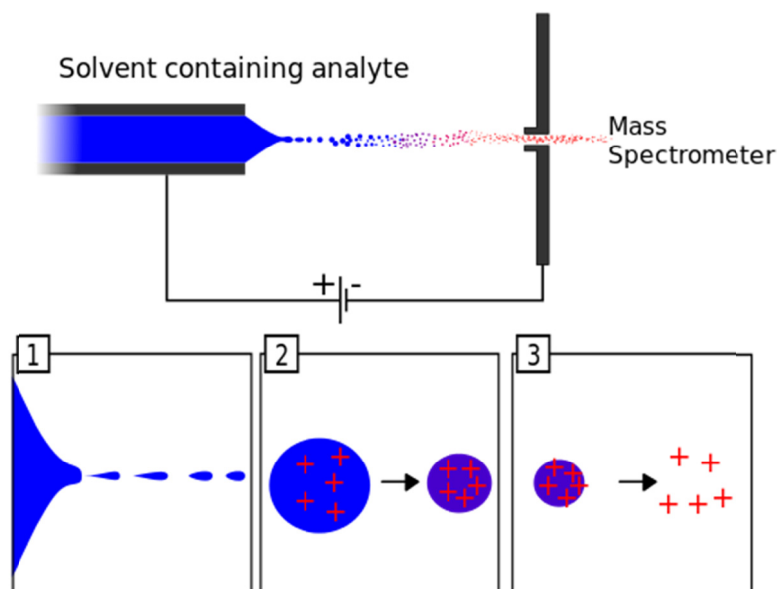


Figura 6. Esquema de ionización en una fuente por electrospray (creada por Evan Mason, licencia Creative Commons Attribution-Share Alike 4.0 International, https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Electrospray_Ionization_Spectroscopy.svg#filelinks).

El analito es introducido en la fuente en disolución bien mediante una bomba inyectora, o bien, procedente de la elución de un sistema de HPLC, y pasa a través de un tubo capilar de acero inoxidable, cuarzo sílice o cerámica al cual se le aplica una elevada diferencia de potencial. Esto fuerza la nebulización de las gotas cargadas en el capilar, con una carga superficial de la misma polaridad que el propio capilar. Las gotas son repelidas del capilar hacia el cono de la fuente de muestreo del contraelectrodo. Con la ayuda de una elevada temperatura en la fuente ESI y/o de gas nitrógeno, a medida que las gotas atraviesan el espacio entre el capilar y el cono van reduciendo continuamente su tamaño por evaporación del disolvente, lo que supone un incremento de la densidad de carga superficial conforme disminuye el radio de las gotas. Finalmente, la fuerza del campo eléctrico en las gotas cargadas alcanza un punto crítico en el cual es cinética y energéticamente posible el paso a fase gaseosa para los iones de la superficie. En ese momento, la tensión superficial

no es capaz de mantener la carga (límite de Rayleigh), por lo que se produce una “explosión Coulombica” y la gota se rompe en gotas más pequeñas. El proceso se repite hasta que sólo existen moléculas de analito cargadas en fase gas, y pueden tener una o varias cargas [102-104]. Así pues, la transferencia de las especies iónicas desde una disolución a la fase gaseosa por medio de ESI implica tres etapas (Figura 6):

1. Dispersión de un spray fino de gotas cargadas, seguido de
2. Evaporación del disolvente, y
3. Liberación de los iones de las gotas altamente cargadas

2.3.2.2. Analizadores de masa

Para la separación de iones con diferente relación m/z se dispone de un analizador de masa y existen varios dispositivos. Lo ideal es que el analizador sea capaz de distinguir entre diferencias muy pequeñas de masa. Además, los analizadores deberían permitir el paso del número de iones suficiente para producir corrientes iónicas fáciles de medir.

Podríamos clasificar los analizadores en los que funcionan en “tiempo” (pulsos) como las trampas de iones, o los analizadores de tiempo de vuelo (ToF) y los que funcionan en el “espacio” (barrido continuo) como el analizador de sector magnético o el cuadrupolo lineal (Q). Existen además instrumentos comerciales que utilizan combinaciones de más de un analizador. En esta memoria se usó triple cuadrupolo (QqQ).

Cuadrupolos (Q): El corazón de un instrumento cuadrupolar es el conjunto de cuatro barras cilíndricas paralelas que actúan como electrodos. Las barras opuestas se conectan eléctricamente, un par está unido al polo positivo y el otro par al negativo de una fuente variable de corriente continua (DC).

Además, se aplican a cada par de barras potenciales variables de corriente alterna de radiofrecuencia (RF), que están desfasados 180 grados (Figura 7).

Para obtener un espectro de masas con este dispositivo, los iones se aceleran en el espacio entre las barras. Además las tensiones de corriente continua y alterna se incrementan simultáneamente. De esta manera, todos los iones excepto aquellos que tengan un determinado valor de m/z inciden en las barras y se convierten en moléculas neutras. Por tanto, sólo los iones cuyo valor de m/z esté dentro de un intervalo limitado alcanzarán el detector [105].

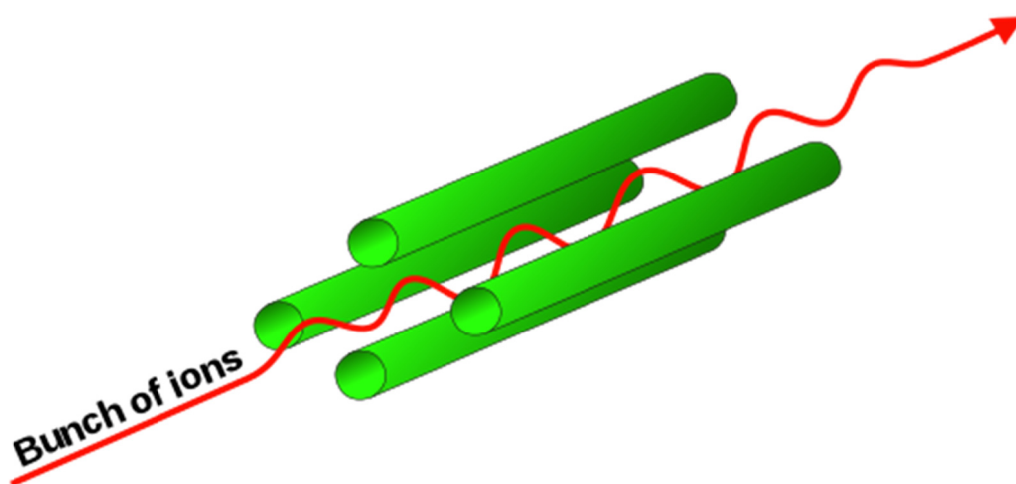


Figura 7. Esquema de un analizador cuadrupolo By Angelus (own work based on: *Quadrupole en.gif*) [CC BY-SA 3.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0>) or GFDL (<http://www.gnu.org/copyleft/fdl.html>)], via Wikimedia Common

Los cuadrupolos tienen distintos modos de transmisión de iones:

Modo scan: los potenciales (RF y DC) se varían linealmente manteniendo constante la relación RF/DC; el resultado es la filtración continua de los iones con m/z crecientes, dando lugar al espectro de masas de la molécula de partida.

Modo SIM: los potenciales de RF y DC se mantienen constantes y solo los iones con un valor específico de m/z pueden atravesar el analizador; el resto de iones chocan con los rodillos y se convierten en moléculas neutras. Este modo proporciona la mayor sensibilidad.

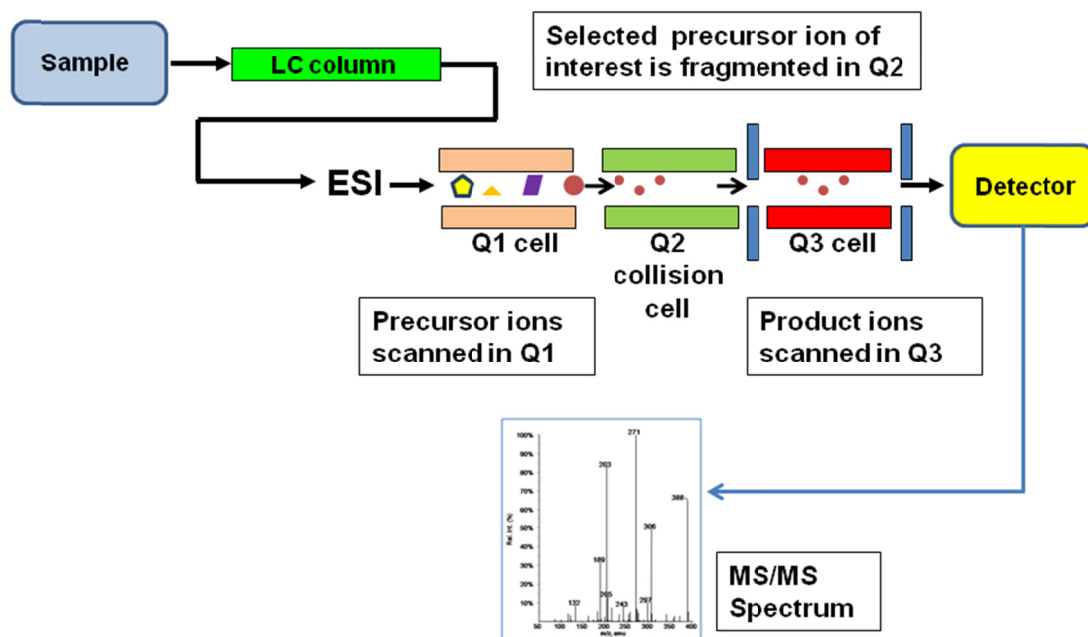


Figura 8. Esquema de un QqQ similar al usado en este estudio. By Lmaps (talk) - I created this work entirely by myself., CC BY-SA 3.0, <https://en.wikipedia.org/w/index.php?curid=21285568>

Acoplando tres cuadrupolos (QqQ o triple cuadrupolo) y utilizando el segundo como celda de colisión (un dispositivo donde se introduce un gas inerte que colisiona con los iones fragmentándolos) se puede llevar a cabo espectrometría de masas en tándem (Figura 8). Esta técnica permite operar en cuatro modos de trabajo dependiendo de la combinación de modos de transmisión en los dos cuadrupolos exteriores:

Product Ion Scanning: el primer analizador opera en modo SIM, seleccionando una relación m/z característica del analito y el tercero opera en modo scan, generando el espectro de fragmentación del ión anterior.

Precursor Ion Scanning: el primer cuadrupolo hace un barrido de iones precursores y el tercero sólo deja pasar al detector aquellos fragmentos comunes con una determinada relación m/z .

Neutral Loss Scanning: ambos cuadrupolos operan en modo scan, monitorizando pérdidas específicas en el proceso de fragmentación.

Multiple Reaction Monitoring (MRM): ambos analizadores operan en modo SIM. Este modo de trabajo es el más sensible y, por tanto, el que se emplea en análisis cuantitativo.

2.4. Química analítica verde

La química verde es en general una filosofía de la química definida por 12 principios postulados por Anastas y Warner [106]. Dichos principios se pueden aplicar a cualquier área de la química. En todas las disciplinas, la atención se centra en minimizar los riesgos y maximizar la eficiencia de cualquier proceso químico. La química verde tiene por objetivo, reducir y en lo posible eliminar la contaminación en su origen para favorecer la salud humana.

Varios principios de la química verde se aplican a la química analítica, por ejemplo reducir o eliminar el uso de disolventes peligrosos en el análisis cromatográfico y en los métodos de preparación de muestras. Namiesnik [107, 108] propuso la definición más completa de química analítica verde a finales de los noventa: *“El uso de técnicas químicas analíticas y metodologías que reduzcan o eliminen los disolventes, reactivos, conservantes y otros productos químicos que sean peligrosos para la salud humana o el medio ambiente y que también puedan permitir análisis más rápidos y de mayor eficiencia energética sin comprometer el criterio de rendimiento”*.

El acetonitrilo es el disolvente más usado en HPLC por su amplia capacidad de disolución de solutos, la baja acidez, su mínima reactividad química, bajo corte al UV y compatibilidad con MS. La reducción de acetonitrilo es la primera opción de química verde en cromatografía líquida. Pero los principios se pueden aplicar a otros disolventes y aditivos. Como ejemplo tenemos la sustitución del ácido trifluoroacético (TFA) que es citotóxico,

corrosivo y persistente en el medio ambiente por ácido fórmico que tiene baja toxicidad y se descompone en CO₂ y H₂O [109].

Un instrumento de cromatografía líquida equipado con una columna convencional de 15 a 25 cm de longitud de 4,6 mm de d.i. y de 5 μm, que opera generalmente a un flujo de 1 mL/min, consume en funcionamiento continuo cerca de 1,5 L de disolvente cada día el cual es aproximadamente de 500 L al año, de los cuales el 50% es un disolvente orgánico. Por ello se han estado buscando estrategias para reducir el consumo de disolvente orgánico. Una vía para reducir el consumo de disolvente es sin duda disminuir el flujo, pero sin reducir la eficiencia. La teoría muestra que al menos en HPLC la eficiencia de la columna (N) es independiente del diámetro interno a diferencia de cromatografía de gases. En HPLC, N depende de la longitud y del tamaño de partícula. Se ha buscado reducir la longitud de la columna, el diámetro interno y el tamaño de partícula para disminuir el consumo de disolventes orgánicos [110]. Sin embargo el consumo sigue siendo alto y por ello se ha querido cambiar los disolventes orgánicos por disolventes verdes.

Para solucionar el problema del disolvente se ha buscado trabajar con agua pura como fase móvil sobre todo a temperaturas superiores a 100 °C a partir de la cual la fuerza eluyente es suficientemente elevada [111]. De este modo, a medida que se incrementa la temperatura, la cantidad de modificador orgánico en la fase móvil puede reducirse. Un incremento de temperatura de 3,75 °C tiene un efecto en la retención similar al incremento de un 1% de acetonitrilo, y un incremento de 5 °C es similar al aumento de un 1% de metanol [112].

A elevada temperatura el agua presenta las mismas características que un eluyente acuoso-orgánico en términos de fuerza elutropea. El uso de agua pura como fase móvil en cromatografía líquida de alta temperatura (HTLC) se conoce con el nombre de “cromatografía de agua super calentada” o “cromatografía de agua subcrítica”.

La principal ventaja del uso de “agua subcrítica” es su no toxicidad y la posibilidad de trabajar con detectores especiales [113] incluyendo ionización en llama, baja longitud de onda UV, ICP-MS y NMR [113, 114]. Sin embargo, esta técnica presenta algunos inconvenientes [114]: la fuerza eluyente no aumenta durante el proceso de análisis, excepto que el gradiente de disolvente se reemplace por un gradiente de temperatura; los solutos no polares son retenidos incluso a elevada temperatura; el “agua subcrítica” es un disolvente agresivo; las fases estacionarias para trabajar en estas condiciones son muy limitadas y algunos solutos presentan baja solubilidad en agua fría [115]. Además del agua se han trabajado otros disolventes verdes como el etanol en separaciones cromatográficas líquidas. Existe un gran número de separaciones líquidas que se pueden hacer con agua / etanol (metanol) / CO₂ y aditivos ecológicos tales como acetato de amonio, formiato, ácido fórmico, y amoniaco [116].

2.4.1. Cromatografía Líquida de alta temperatura (HTLC)

Cuando se habla de cromatografía Líquida de alta temperatura (HTLC) se refiere a separaciones cromatográficas llevadas a cabo a temperaturas superiores a la temperatura ambiente con rangos entre 40 °C a 200°C con una fase móvil en estado líquido.

Aunque el uso de la nomenclatura HTLC es bastante reciente, el interés de la temperatura como un posible parámetro de optimización de los métodos de HPLC surgió desde los principios del desarrollo de dicha técnica [117].

Los factores influyentes en el hecho de que hasta ahora la temperatura no haya sido considerada un parámetro clave a optimizar en los métodos de rutina son diversos. Por un lado, la falta de instrumentación comercial equipada con hornos que alcancen temperaturas por encima de los 90 °C, así como la existencia de fases estacionarias realmente estables a estas temperaturas.

Además, los cambios de temperatura afectan a un elevado número de procesos, tanto cinéticos como termodinámicos, relevantes en una separación

cromatográfica, por lo que su inclusión como un parámetro más a controlar aumenta sustancialmente la complejidad del proceso de optimización. Por consiguiente, todavía hoy en un gran número de equipos de cromatografía líquida, cuando se habla de *controlar la temperatura de la columna* se refiere a *termostatar el sistema* a una temperatura que sea posible mantenerla a lo largo del tiempo de análisis y se logre la estabilidad de la misma alrededor del 1% [61].

La temperatura de la columna juega un papel importante en la disminución del tiempo de análisis y la retención, alterando la selectividad, eficiencia y resolución. Además, la disminución de la presión permite reducir la concentración de modificador orgánico en la fase móvil, pudiendo emplearse fases móviles formadas por disolventes puros y disolventes menos perjudiciales para el medioambiente (cromatografía verde). En algunos casos el gradiente de disolvente puede ser sustituido o combinado con el gradiente de temperatura.

La HTLC requiere fases estacionarias capaces de soportar temperaturas superiores a 100°C y, puesto que, las columnas tradicionalmente empleadas en cromatografía líquida basada en sílice no pueden ser utilizadas a temperaturas superiores a 60 °C, aunque en algunos casos pueden soportar temperaturas de hasta 100 ó 150 °C dependiendo del tiempo de exposición [118-122], se han intentado desarrollar fases estacionarias basadas en sílice capaces de alcanzar temperaturas de trabajo de hasta 200 °C. Sin embargo, las fases estacionarias más adecuadas para trabajar a temperatura elevada son las de carbono grafitizado, óxido de circonio y PS-DVB [119, 123] (en este último caso el límite de temperatura está en 150 °C).

2.4.1.1. Parámetros en los que influye la temperatura

2.4.1.1.1. Velocidad de análisis

La influencia de la temperatura en la retención cromatográfica puede ser expresada según parámetros termodinámicos. La constante de equilibrio (K) de

un analito entre la fase estacionaria y la fase móvil es función de la energía libre de Gibbs (ΔG) (Ecuación 1):

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ = -RT \ln K$$

Ecuación 1

$$k = K\phi$$

Ecuación 2

$$\ln k = -\left(\frac{\Delta H^\circ}{RT}\right) + \left(\frac{\Delta S^\circ}{R}\right) + \ln\phi$$

Ecuación 3

La retención de una molécula en la fase estacionaria está relacionada con la variación de entalpía (ΔH°) y la de entropía (ΔS°) del sistema. T es la temperatura absoluta (en Kelvin), R es la constante de los gases (8,31441 J mol⁻¹K⁻¹); k es el factor de retención y ϕ es la relación entre el volumen de la fase móvil y la fase estacionaria.

La ecuación de Van't Hoff (Ecuación 3) es la que describe la relación entre la temperatura y la retención (1/T frente a $\ln k$) empleada en estudios termodinámicos para determinar la contribución de la (ΔH°) y (ΔS°) a la retención. En la mayoría de las separaciones en RPLC un aumento de la temperatura provoca una disminución en la retención. Otra consecuencia del incremento de la temperatura es la disminución de la viscosidad de la fase móvil, lo que permite trabajar a flujos más altos, aumentando la velocidad de análisis.

2.4.1.1.2. Resolución

Cuando se requiere un aumento de la resolución en la separación de muestras complejas el tiempo de análisis aumenta. Una solución a este problema vendría proporcionada por el empleo de la HTLC o mediante programas de temperatura. En cromatografía, todos los factores que afectan a la

Resolución (R_s): eficiencia (N), selectividad (α) y retención (k), están influenciados por la temperatura (Ecuación 4).

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k}{1 + k} \right)$$

Ecuación 4

- Eficiencia

La eficiencia, en cromatografía, se define en base a la altura del plato (H) y al número de platos (N). La eficiencia de la columna aumenta cuanto mayor es el número de platos, y cuanto menor es la altura de plato. La eficiencia o número de platos N , nos da una idea del ancho de banda, y por tanto, de la efectividad de separación de la columna. Un aumento en el número de platos supondrá una disminución del ancho de banda y en consecuencia, un aumento de la resolución si la retención se mantiene constante. En el año 2006, Yang [124] desarrolló un modelo para el estudio del efecto de la temperatura en la eficiencia de la columna en HTLC, concluyendo que la temperatura es un parámetro que puede emplearse como una variable a controlar para optimizar la eficiencia de la separación

La máxima eficiencia se conseguirá empleando columnas largas con un tamaño de partícula pequeño. Sin embargo, en la práctica esta opción tiene dos grandes inconvenientes: largos tiempos de análisis y presiones de trabajo demasiado elevadas para los equipos convencionales de cromatografía líquida. En este caso el uso de altas temperaturas es una buena alternativa para superar estos inconvenientes.

- Selectividad

La selectividad describe la capacidad de la cromatografía para separar o diferenciar entre varios compuestos. Está determinada por la fase estacionaria, fase móvil, así como otros parámetros, donde la temperatura juega un papel

importante, especialmente en compuestos polares e ionizables donde los equilibrios de ionización son función de la temperatura [125-128].

El empleo de la temperatura como un factor de selectividad presenta la ventaja de su facilidad de control y modificación. Además, el orden de elución de los compuestos puede alterarse variando la temperatura, manteniendo la misma composición de la fase estacionaria y fase móvil.

Buckenmaier y col. [129] han demostrado como la temperatura modifica la selectividad en cromatografía como consecuencia de la modificación de la ionización de los analitos por cambios en los valores de pK_a . La selectividad se ve incrementada por la combinación de programas de temperatura y gradientes de fase móvil. La influencia de la temperatura en la selectividad abre nuevas posibilidades, aunque incrementa la complejidad del desarrollo de los métodos, ya que se convierte en un parámetro adicional en el desarrollo de los mismos. Por ello, la gran mayoría de los programas de software desarrollados incluyen la temperatura como una variable.

- Retención

Bowermaster [130] y Chen [131] han demostrado que el uso de programas de temperatura tiene un efecto similar al empleo de gradientes de disolventes en análisis cromatográfico, pudiendo variar la retención según se empleen programas de temperatura o de composición de la fase móvil. Variaciones de 3-5 °C presentan el mismo efecto en la retención que un aumento de 1% de la concentración de modificador orgánico.

Una de las principales ventajas de trabajar a elevada temperatura es que permite reducir la cantidad de disolvente orgánico, utilizando disolventes menos agresivos con el medio ambiente, por reducción de la viscosidad con la temperatura, tales como etanol o 2-propanol, o emplear incluso agua pura como fase móvil [121, 132, 133]

2.4.1.2. Instrumentación de alta temperatura

La HTLC requiere un control exhaustivo de la temperatura de la columna, así como de la fase móvil, pudiendo realizarse el calentamiento de la misma a través de bloques de calentamiento que requieren contacto adecuado con la columna, camisas de agua o baños, que proporcionan una mayor eficacia y una elevada capacidad calorífica, aunque presenta el inconveniente de la imposibilidad de utilizar agua a $T > 100^{\circ}\text{C}$ o mediante hornos de circulación de aire, donde la temperatura se modifica rápidamente, siendo los más adecuados y más empleados para el control de la temperatura [112, 117, 133, 134].

Actualmente existe un único equipo comercial el horno a alta temperatura Polaratherm que se observa en la Figura 9 capaz de calentar la fase móvil a la misma temperatura que la columna. El calentamiento de la fase móvil se realiza introduciendo un tubo de acero inoxidable inmediatamente antes de la entrada a la columna, pudiendo estar colocado en el interior del horno o en contacto con el bloque de calentamiento o con las camisas. La variación entre la temperatura de la fase móvil y la temperatura de la columna debe ser, como máximo, del orden de $\pm 5^{\circ}\text{C}$ para evitar el ensanchamiento de bandas. La elevada temperatura de la fase móvil a la salida de la columna puede ser un problema para determinados tipos de detectores, conduciendo a una línea base inestable, por lo que puede ser necesario un sistema de enfriamiento de la fase móvil antes de su entrada en el detector.

En este estudio se utilizó un horno Polaratherm 9000 (SandraSelerity Technologies, Kortrijk, Belgium) (Figura 9), un horno comercial adecuado para trabajar a alta temperatura, que permite un control de la temperatura desde 5°C por encima de la temperatura ambiente (en ausencia de la opción criogénica), y hasta 200°C , aumentando la temperatura a una velocidad de $1\text{--}30^{\circ}\text{C}/\text{min}$ y con una capacidad de enfriamiento de 200°C a 50°C en 3,5 min y de 50°C a 5°C superior a la temperatura ambiente en 2,5 min. Cuenta con un pre-calentador de la fase móvil de volumen inferior a $1\mu\text{L}$, el cual permite una precisión en el

control de la temperatura de la fase móvil en la columna de ± 1 °C. Posee a su vez un sistema de enfriamiento del eluyente a la salida de la columna, lo que permite trabajar con detectores sensibles a la elevada temperatura. Además, permite emplear columnas empaquetadas con diámetros internos de 1 mm a 4,6 mm y de longitudes de hasta 25 cm. El control del horno se realiza a través de un panel frontal numérico el cual permite memorizar hasta un total de 9 métodos diferentes, tanto a temperatura constante como en gradiente de temperatura.



Figura 9. Imagen del horno de alta temperatura Polaratherm 9000

2.5. Aplicaciones a edulcorantes

A la determinación de edulcorantes artificiales pueden aplicarse una gran variedad de técnicas analíticas. La mayoría de los métodos se han desarrollado para la determinación de un edulcorante de manera individualizada. Para los edulcorantes que se llevan utilizando décadas como ASP, SAC, CYC y ACE y para otros como SUC que ha centrado una gran atención, existen muchos métodos desarrollados para su determinación, mientras que para aquellos edulcorantes que han sido recientemente aprobados como NHDC, NEO, ALI o STEV existe mucha menos bibliografía. La mayoría de los métodos multiresiduo publicados se han enfocado en sólo 3 o 4

compuestos, sin embargo en la última década si se han empezado a desarrollar métodos que cubren un amplio rango de edulcorantes artificiales. En este capítulo nos vamos a centrar en estos últimos métodos, es decir, aquellos que cubren un gran rango de edulcorantes artificiales, especialmente los que determinan los edulcorantes artificiales permitidos en la UE.

2.5.1. Preparación de muestra

2.5.1.1. Edulcorantes en muestras de bebida

Las muestras de bebidas (zumos, refrescos, cervezas, bebidas energéticas, etc) se caracterizan por ser matrices relativamente simples y tener elevados niveles de edulcorantes (mg/L) por lo que simplemente antes de su determinación se realiza un pretratamiento que normalmente consiste en dilución de la muestra en agua ultrapura, en un tampón apropiado o mezcla de tampón con metanol o etanol, normalmente entre 2 y 50 veces [135-138]. Si la bebida es carbonatada, se debe incluir un paso de desgasificación antes de realizarse el análisis, normalmente por sonicación, o burbujeo de nitrógeno o bajo vacío. En algunos métodos se incluye también un paso de precipitación de las proteínas utilizando el reactivo de Carrez, ZnSO₄/NaOH u otro similar. Posteriormente todas las muestras, independientemente de los pasos anteriores, se filtran con filtros de membrana o se centrifugan antes de su análisis. Estos tratamientos de muestra son rápidos, simples y baratos y son universalmente utilizados [139].

En algunos casos se han utilizado tratamientos de muestra algo más complejos usando SPE [139]. Al igual que con la metodología anterior las muestras carbonatadas tienen que ser previamente desgasificadas. Por ejemplo, Zygler y col. [140] determinaron ACE, SAC, CIC, ASP, SUC, ALI, NHDC, NEO y Dulcina (DUL) en bebidas y zumos utilizando SPE con cartuchos Strata X adicionando ácido fórmico-N,N-diisopropil etilamina (FA- DIPEA) a la muestra obteniendo recuperaciones entre 83 y 107 %. Otro estudio desarrollado

por Gao y col. [141] determinaron 30 aditivos sintéticos en bebidas entre ellos los edulcorantes ACE, SAC, CIC, ASP y NEO utilizando SPE con cartuchos Oasis HLB encontrándose las recuperaciones entre 81 y 99% [141].

2.5.1.2. Edulcorantes en muestras de agua superficial y residual

Aunque la inyección de la muestra directamente (tras la filtración) como en muestras de bebidas puede utilizarse para el análisis de muestras de agua, los límites de detección alcanzados ($\mu\text{g/L}$) no son suficientemente bajos para la determinación de estos compuestos en muestras de agua superficial (bajos ng/L) o residual (ng/L).

La técnica que ha sido seleccionada por múltiples autores para la extracción de edulcorantes artificiales en aguas de diversa naturaleza es la SPE. En la bibliografía está recogido el uso de diversos cartuchos: adsorbentes poliméricos de fase reversa (Oasis HLB, Isolute ENV+, HR-X, Bakerbond SDB-1, Strata X-RP), adsorbentes poliméricos de modo mixto (Oasis MAX, Oasis MCX, Strata X-AW) y adsorbente de base sílice de fase reversa (Isolute C18, Chromabond C18ec) [41]. La selección de la fase adsorbente es de gran importancia ya que los edulcorantes artificiales pertenecen a tres clases químicas diferentes (sulfamatos, péptidos y derivados de carbohidratos). Esta tarea está exhaustivamente estudiada en dos trabajos realizados por Zygler y col. [142] y Scheurer y col. [43] que evalúan una gran variedad de parámetros que afectan a la recuperación de edulcorantes en la SPE y sus conclusiones se comentan a continuación. Cabe indicar que las conclusiones alcanzadas por Zygler y col. [142] y Scheurer y col. [43] pueden parecer contradictorias ya que Zygler y col. obtiene mejores recuperaciones con cartuchos de base sílice mientras que Scheurer y col. lo hace con cartuchos de base polimérica.

Scheurer y col. [43] compararon 10 cartuchos de SPE de diferentes tipos C18 (Isolute C18), poliméricos de fase reversa (Isolute ENV+, Strata X-RP, Oasis HLB, Varian PPL, Bakerbond SPE SDB-1) y poliméricos de modo mixto (Strata X-AW, Oasis MAX, Oasis MCX, Oasis WAX) y examinaron el efecto del pH

sobre las recuperaciones ACE, ASP, CIC, NHDC, SAC, SUC y NEO en aguas residuales y superficiales. Los mejores resultados de recuperación los obtuvieron con los cartuchos poliméricos de fase reversa Bakerbond SBD-1 y ajustando el pH de la muestra a 3, con un rango entre 53 y 113% para aguas residuales y entre 60 y 102% para aguas superficiales. Sin embargo, los rendimientos no fueron óptimos para todos los compuestos. Para ASP y NHDC en agua embotellada las recuperaciones fueron del 41% y 59% respectivamente. Por otro lado, las recuperaciones de ACS, CIC, SAC y SUC parecen descender con el aumento de la materia orgánica disuelta, es decir, las recuperaciones descendían en el orden: agua de bebida > agua superficial > agua residual.

Por otro lado, Zigler y col. [142] realizaron un estudio comparativo de siete adsorbentes con base sílice (Chromabond C18ec, Bakerbond SPE Octadecyl, Bakerbond SPE Pheny, LiChrolut RP-18, Supelclean LC-18, Discovery DSC-18 y Zorbax C18) y tres poliméricos de fase reversa (Strata X-RP, Oasis HLB y Bakerbond SPE SDB-1) para la extracción de edulcorantes artificiales de un tampón acuoso, pero no fue aplicado a muestras reales. Las características de los adsorbentes (estructura, porosidad, diámetro de partícula, contenido de carbón, área superficial y existencia o no de "end-capping") se correlacionaron con las recuperaciones. Además también se estudió el efecto del pH y del tipo de tampón sobre la recuperación. Se concluyó que todos los cartuchos C18 retienen bien los edulcorantes estudiados con eficiencias alrededor del 95%. Los edulcorantes que presentaron resultados más bajos en todos los cartuchos fueron el ACE y el CIC. En los cartuchos poliméricos de fase reversa Bakerbond SDB1 el ASP y ALI se perdieron totalmente y el NEO solamente se recuperó en un 74%. Los cartuchos poliméricos Strata X presentaron buenas recuperaciones para todos los compuestos del estudio, mientras que los Oasis HLB presentaron recuperaciones más bajas. El ACE y CIC se recuperaron en un 74 y 41%, cuando solamente se usaron 60 mg de adsorbente Oasis HLB, y al rellenar un cartucho con 300 mg de este mismo adsorbente la recuperación fue cuantitativa.

Por otro lado, hay que tener en cuenta que se necesitan elevados factores de preconcentración para la determinación de edulcorantes en agua por lo que es necesario extraer grandes volúmenes de muestra, normalmente entre 50 mL y 1 L, y eluir con pequeños volúmenes entre 3 y 7 mL y en muchos casos disminuir este volumen final mediante evaporación. Además, hay que tener en cuenta que las muestras de agua residual no pueden concentrarse en tanta extensión como las muestras de agua de bebida debido a la complejidad de la matriz, particularmente debido a los efectos de matriz que se producen durante el análisis mediante HPLC-ESI-MS.

2.5.1.3. Edulcorantes en lodos de depuradora

Existen pocos estudios que determinen edulcorantes en lodos de depuradora y esto conlleva que existan pocos artículos que desarrollen una metodología dedicada a su determinación en esta matriz. Las técnicas que han sido aplicadas para la extracción de edulcorantes en lodos de depuradora son la extracción sólido-líquido [45, 46], extracción con disolventes asistida por ultrasonidos [143] y PLE [144, 145]. Todos estas técnicas de preparación de muestra en las metodologías publicadas se combinan con una etapa de preconcentración y limpieza del extracto basada en SPE normalmente con cartuchos Oasis HLB [45, 46] [144, 145].

2.5.2. Análisis instrumental

Teniendo como base la naturaleza iónica de los edulcorantes artificiales la mayoría de los métodos de análisis están basados en RPLC [138, 146-154], HPLC de intercambio iónico [146, 147, 155] y electroforesis capilar [42, 139, 156-158]. También se ha aplicado para la separación de edulcorantes las columnas HILIC [159].

La técnica más popular es RPLC que se ha aplicado con diferentes sistemas de detección, UV-VIS [148-151, 153], dispersión de radiación (ELSD)

[154] y MS. El uso de UV hace necesaria una etapa de derivatización para la determinación de CIC y SUC y ELSD no tiene la sensibilidad necesaria, por lo que la combinación más utilizada es HPLC-ESI-MS, tanto en muestras de alimentos como en muestras medioambientales [43, 44, 47, 53, 56, 160-162]. ASP, SAC y SUC pueden ionizarse tanto en modo positivo como negativo mientras el resto de edulcorantes solo se ionizan en modo negativo, por lo que la mayoría de los métodos utilizan este último modo para la determinación simultánea de todos los edulcorantes artificiales.



3. OPTIMIZACIÓN COMPUTERIZADA DE SEPARACIONES EN HPLC

El desarrollo asistido por computador (CAMD) de separaciones por HPLC fue propuesto por primera vez a inicio de los 70 al mismo tiempo que los ordenadores empezaron a utilizarse en los laboratorios de química analítica y se vio como una solución mágica a todos esos problemas de separación que se venían presentando. El equipo podía realizar las tareas más difíciles, controlar los instrumentos, pero la toma de decisiones y el desarrollo de experimentos no. El primer sistema auto - optimizable fue comercializado por la otrora Dupont y se le dio el nombre de Sentinel, el cual solucionaba el problema de la separación. De ahí en adelante surgió una intensa investigación en el campo de la ciencia de la separación dando origen a avances teóricos esenciales y a herramientas prácticas que se convirtieron en productos comerciales en algunos casos y en otros solamente quedaron como propuestas económicas. Después de 40 años de estudio e investigación solamente algunas herramientas de software se encuentran en el mercado y se usan a necesidad.

Sin embargo en la mayoría de laboratorios donde se usa el HPLC de forma rutinaria, el CAMD no se utiliza para mejorar los métodos de separación. Existen varios softwares en el mercado pero la popularidad de los CAMD es baja. Existen varias explicaciones posibles para esta aparente contradicción. En primer lugar hay que reconocer que los CAMD han seguido siempre las necesidades del cromatografista. Esto es lógico teniendo en cuenta que la transferencia y adaptación de los métodos de cromatografía a los nuevos desarrollos instrumentales y teóricos en HPLC son un proceso más lento, que requiere una experimentación cuidadosa y extensa para demostrar su validez. La consecuencia inmediata de esto es que cuando una herramienta informática está disponible, la mayoría de los cromatografistas ya se han acostumbrado a resolver los problemas y explotar las nuevas posibilidades ya sea por ensayo y

error o por procesos donde se usan técnicas de optimización tradicionales, es decir totalmente experimental.

Una segunda razón de la limitada aceptación de los CAMD es que las herramientas quimiométricas todavía no son muy fáciles de usar, y muchos cromatografistas no se sienten cómodos con ellas. Aunque los usuarios pueden aplicar estas herramientas en la fase final del procedimiento analítico y tratar los datos generados, son mucho menos receptivos a aplicarlos en la primera etapa del proceso [163].

En la Figura 10 se resume un esquema de operación práctico de una CAMD. Este esquema es muy similar al usado por los analistas de cromatografía para desarrollar un procedimiento de separación con un enfoque totalmente experimental, excepto que la construcción del modelo no es llevada cabo siguiendo reglas, sino por intuición, pero siempre basada en el conocimiento de la cromatografía.

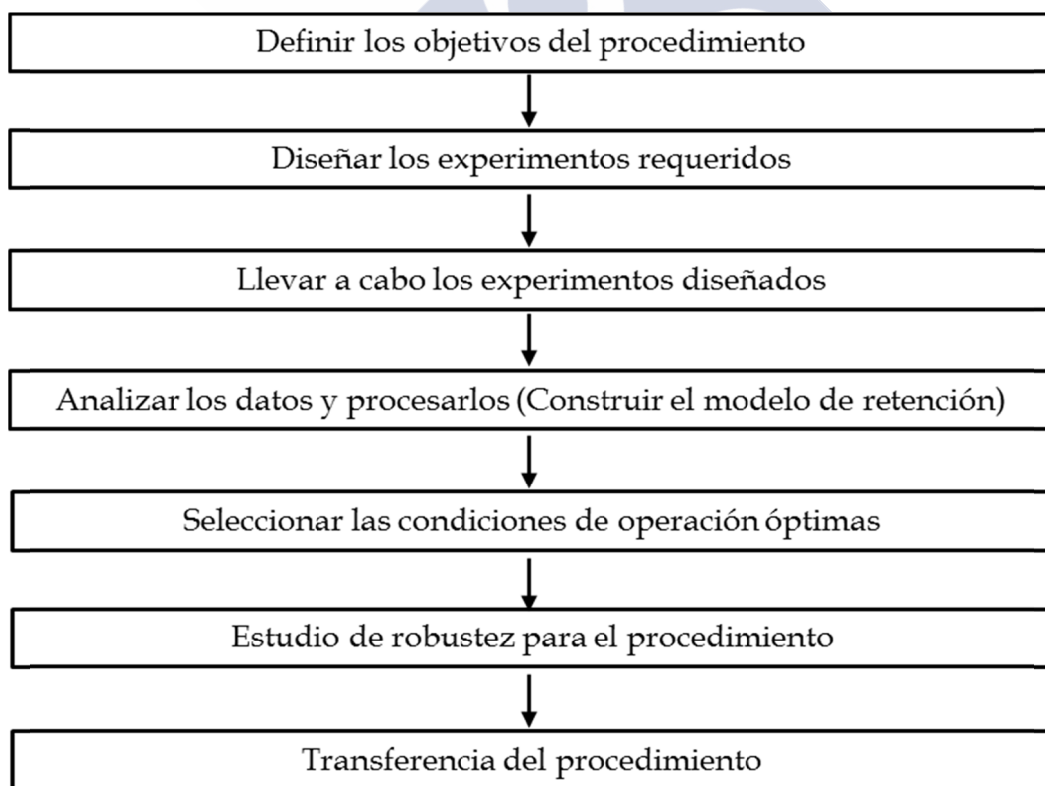


Figura 10. Diagrama de flujo de un CAMD

3.1. Etapas en el desarrollo de un método de HPLC asistido por computador

3.1.1. Definición de los objetivos del procedimiento

La industria farmacéutica es el mayor consumidor en el mundo de instrumentación de HPLC en sus laboratorios de control de calidad e investigación y desarrollo. Lo que tiene que ver con el desarrollo de procedimientos de separación en la industria farmacéutica es de preferencia para los fabricantes de equipos analíticos y softwares de HPLC debido a su alto consumo. Se hace necesario controlar la pureza de los principios activos farmacéuticos, el control de materias primas del proceso, los intermedios y finalmente el producto terminado. En otras palabras, esto implica el control de los productos de degradación, las pruebas de ensayo, la identificación de metabolitos, entre otros.

Los primeros pasos en la investigación son por lo general los más críticos, se debe escoger la mejor columna para la separación, así como el pH óptimo de la fase móvil y la temperatura, está a veces tiene efectos similares a los cambios en el pH. También se debe seleccionar el modificador orgánico y las proporciones a usar, además, del perfil de gradiente optimizado. Se hace necesario finalmente verificar que las condiciones sean robustas y que se puedan aplicar de forma rutinaria [164].

3.1.2. Diseño de experimentos requerido

El objetivo es completar esta etapa con la menor cantidad de esfuerzo y por lo tanto con el menor número de experimentos posible. La situación es diferente cuando el número de compuestos a separar se conoce y cuando las mezclas a ser separadas contienen un número desconocido de compuestos. Sin embargo, la mejor opción, a priori, es utilizar el diseño estadístico de experimentos (DOE). Este permite la definición de un grupo de datos los cuales

permitirán construir un modelo empírico que relaciona los parámetros del instrumento, los factores físicos y químicos, las propiedades cromatográficas de los compuestos que se separan y también evaluar la influencia de cada uno de los factores que afectan la separación para modelar la superficie de respuesta. En una segunda etapa, un modelo de superficie de respuesta que considere los factores identificados como importantes en el proceso de selección inicial permite la localización de los valores de los factores que son óptimas para la separación [165]. La metodología comprende los siguientes pasos: (1) la selección de los factores instrumentales que se sabe que influyen o por lo menos se presume puedan influir en las propiedades cromatográficas. Los niveles de variación en cada uno de los factores seleccionados también se debe definir en esta etapa; (2) la selección de un diseño apropiado para el conjunto de factores que garantiza la evaluación de los efectos principales, (3) la ejecución de los experimentos definidos por el diseño aceptados en la anterior etapa y la aplicación de análisis de regresión para calcular los coeficientes del modelo matemático de la superficie de respuesta; (4) el uso de este modelo matemático permite encontrar la respuesta óptima en la región delimitada por los intervalos definidos para cada uno de los factores considerados. Dicha solución óptima se debe verificar experimentalmente con el fin de validar el modelo. (5) Si el resultado de la separación es satisfactorio el proceso se concluye. Sin embargo, si no se logran los objetivos propuestos, el proceso se repite, cambiando los niveles de los factores en el modelo o simplemente adicionando unos nuevos.

3.1.3. Realización de experimentos

En esta etapa se busca llevar a cabo los experimentos requeridos para obtener los datos de retención que serán usados para la construcción del modelo de retención. Independiente de la estrategia usada, el problema es similar cuando el objetivo es separar los picos en una mezcla o cuando algunos de estos son de interés particular. El objetivo esencial de esta etapa del proceso es determinar el número de picos en la mezcla y donde cada pico aparece en los

diferentes cromatogramas generados de la secuencia de experimentos. La complejidad de esta etapa va a diferir en función de la complejidad de la mezcla y de la instrumentación disponible. Aunque, algunas herramientas de quimiometría disponibles pueden ayudar bastante al analista de cromatografía en esta tarea, permitiendo en algunos casos que el proceso sea automático o semi automático.

3.1.4. Análisis y procesamiento de los datos generados (construcción del modelo de retención)

En algunos casos, se utilizan procedimientos convencionales, tales como ajuste de modelos de superficie de respuesta lineal o cuadrática de los datos, de modo que la retención de cada pico se modela de forma individual y los modelos de superficie de respuesta se utilizan para estimar las condiciones óptimas para la separación. Aunque en diversos estudios [166, 167] los investigadores han optado por ajustarse al par crítico u otros criterios derivados directamente de la retención, generalmente es preferible el modelo de retención de picos y luego derivar las magnitudes porque la naturaleza discontinua de la inmensa mayoría de los criterios hacen que sea muy difícil obtener una superficie de respuesta manejable.

3.1.5. Selección de condiciones de operación óptima

Independientemente del procedimiento utilizado para ajustar el modelo de retención, la optimización de la separación comienza con este modelo, y se utilizan diversos enfoques para determinar las condiciones óptimas, que van desde las búsquedas de redes simples en el espacio de simulación definido por el modelo restringido en mayor o menor medida por las condiciones impuestas por el analista de cromatografía o procedimientos iterativos, con mayor o menor participación directa por el analista de cromatografía a procedimientos

totalmente automáticos que concluyen con la propuesta de una o más posibilidades que deben ser verificadas experimentalmente por el operador.

3.1.6. Estudio de la robustez del procedimiento

La robustez es uno de los elementos clave en la validación de los métodos de separación. La robustez es una medida de la capacidad del procedimiento para proporcionar resultados que no se vean afectados por los pequeños cambios que pueden tener lugar en los parámetros del procedimiento. Obviamente en los estudios de robustez, estos cambios son intencionales y por lo general de mayor magnitud que los previstos en virtud de la operación de rutina de las condiciones del procedimiento. Si estos cambios intencionales demuestran que el procedimiento es robusto, a continuación, la aplicación rutinaria del procedimiento puede llevarse a cabo sin problemas. Sin embargo, los límites de tolerancia de los diferentes parámetros que garantizan el funcionamiento controlado del proceso de separación deben ser evaluados. Normalmente, las evaluaciones de consistencia se realizan por DOE. Sin embargo, como la separación puede verse afectada por un gran número de parámetros, se utilizan diseños factoriales fraccionados o de Plackett - Burman (en ambos casos, se utilizan diseños de resolución III) con el objetivo de reducir el número de experimentos requeridos [168, 169].

Normalmente, los estudios de robustez son conducidos en la etapa de validación del procedimiento de separación. Por ejemplo cuando el método se considera definitivo o semi definitivo. Obviamente, si los resultados del estudio de robustez demuestran que el procedimiento no es robusto, el tiempo, el dinero y el esfuerzo invertidos en el desarrollo pueden haber sido desaprovechados. Es claro que el método se puede re optimizar para establecer un set final de condiciones que garanticen un suficiente grado de robustez.

Alternativamente, el estudio de robustez puede llevarse a cabo durante el desarrollo del procedimiento. Es decir, el diseño debería tener en cuenta la

solidez, utilizando un diseño de enfoque QbD [170-172]. Para este fin, el procedimiento se desarrolla por un diseño experimental adecuado que toma en cuenta los factores que pueden ser críticos para la robustez, junto con otros factores que afectan a la separación. Factores tales como la temperatura, el pH, la composición de la fase móvil, el tiempo de ejecución del gradiente, además del flujo de la fase móvil y los porcentajes iniciales y finales del modificador que generalmente también son importantes. Si el estudio de robustez se lleva a cabo con el fin de transferir el procedimiento a otros equipos o laboratorios, el tipo de columna y el tiempo de desfasaje en el instrumento son importantes. Los CAMD son de gran interés en este tipo de enfoque ya que el esfuerzo experimental se reduce al mínimo y casi sin experimentos, haciendo uso de los datos obtenidos durante el establecimiento del modelo de retención.

3.1.7. Transferencia del procedimiento

La transferencia de los procedimientos de separación de un instrumento a otro, de un laboratorio a otro, o de una columna a otra de diferente longitud o de diferente diámetro interno o el mantener la fase estacionaria constante para lograr una separación más rápida y eficiente, se pueden realizar mediante CAMD.

En la práctica, tiene poco sentido la optimización de un procedimiento de separación, si el proceso que implica inversión de tiempo y costo, solamente se limita a uso exclusivo en el equipo en que se desarrolló. Por definición, un método de rutina está destinado para la distribución y el funcionamiento en numerosos laboratorios. Por lo tanto, la transferencia de los procedimientos de separación debe ser considerada como un paso más en el desarrollo y la optimización de la separación. Obviamente, para una transferencia exitosa, el procedimiento debe haber superado claramente los estudios de robustez. La transferencia de procedimientos isocráticos es mucho más simple que la transferencia de procedimientos de gradiente [164].

3.2. Programa PREGA

El grupo de investigación en Cromatografía y Quimiometría (ChromChem) del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología del Instituto de Investigación y Análisis Alimentario (IIAA) de la Universidad de Santiago de Compostela ha desarrollado un programa informático denominado PREGA. Esta herramienta informática consta de un conjunto de programas que pretenden facilitar el proceso de optimización en sistemas de HPLC.

Se parte de un número pequeño de datos experimentales, capaces de generar un modelo de retención para una mezcla de compuestos a separar. Este modelo se utiliza con fines predictivos, logrando realizar optimizaciones isocráticas y también de variedad de gradientes (lineales, curvos, multilineales y escalonados) de cualquier perfil, también se puede manipular la temperatura a la que se desarrolla la separación y el flujo de la fase móvil. Es un programa con una interfaz muy amigable la cual permite abordar optimizaciones de tipo más convencional (utilizando funciones de respuesta de tipo CRF) o por primera vez, realizar optimización Pareto en cromatografía líquida. La versión más reciente disponible públicamente (www.usc.es/gcqprega) es la 7.0.

El módulo DM en la versión PREGA 7.0 se encarga de todo el trabajo de manipulación de los datos de inicialización y creación de los modelos de retención. Podemos entrar a PREGA desde este módulo para generar nuevos problemas de separación.

Todas las versiones de PREGA mantienen la misma filosofía, y esto teniendo en cuenta que cada vez se introducen mejoras que facilitan el manejo del mismo. Lo que se busca con este programa es generar aproximaciones sistemáticas a la optimización de las diferentes separaciones por HPLC. Permite procesos de aproximación rápidos (que requieren mínimo trabajo experimental

previo), y a su vez procesos más seguros y precisos pero son más lentos y los cuales requerirán un mayor trabajo experimental previo.

En PREGA se pueden realizar dos tipos de proyectos:

- **Proyectos de tipo I** (PREGA convencionales), que utilizan tanto datos de retención isocráticos como en gradiente para construir los modelos de retención de los picos en la mezcla.
- **Proyectos de tipo II**, que utilizan solamente gradientes de “Scouting” para construir los modelos de retención de los picos.

Las dos opciones son compatibles y están diseñadas para utilizar todo el trabajo experimental realizado. Uno de los objetivos en cualquier aproximación al desarrollo de métodos asistido por ordenador es limitar al máximo el trabajo experimental previo, necesario para disponer de los datos de inicialización que requiere el desarrollo del modelo de retención, el cual permitirá la simulación de las separaciones. Dicho trabajo es función del número de parámetros incluidos en el modelo, de modo que si solamente nos interesa estudiar la influencia de la variación en el contenido de modificador de la fase móvil, el número de datos necesario es mucho menor que si queremos estudiar además, la influencia del pH y/o de la temperatura, etc.

En muchas ocasiones con nuevas mezclas de compuestos a separar, no es fácil predecir cuales de estos factores tendrán influencia real en la calidad de las separaciones (es decir, qué parámetros nos permitirán optimizar realmente la separación), pero tampoco se sabe si se llega a una solución suficientemente satisfactoria. Por tanto, una aproximación de tipo general, que incluya desde el principio todos los factores en el modelo y que exija un gran número de experimentos previos al objeto de disponer de los datos necesarios para ajustar el modelo es poco recomendable. Por el contrario, es preferible una aproximación de tipo secuencial que aprovechando el trabajo realizado en cada momento nos permita evaluar con seguridad cual es la influencia de cada parámetro y cuales son realmente las posibilidades de lograr una solución

suficientemente satisfactoria. PREGA 7.0 ha sido desarrollado con esta filosofía y además permite explorar este tipo de aproximación de una forma sencilla y eficiente.

Los proyectos de tipo II son los más rápidos y simples de construir, requiriendo menor trabajo experimental. Están basados en los desarrollos y ecuaciones publicadas por Snyder y colaboradores a lo largo de varias décadas de trabajos fundamentales en el desarrollo de la HPLC [173]. Constituyen además la base de los principales programas comerciales para el desarrollo de métodos asistido por ordenador en HPLC (Drylab, ACD-labs LC-Simulator, etc.).

PREGA 7.0 incorpora la versión más simple de estas ecuaciones [174], requiriendo de esta manera un número mínimo de experimentos previos. La aproximación implica registrar dos gradientes con un amplio intervalo de porcentajes de modificador para garantizar que todos los picos de la mezcla eluirán durante el desarrollo de dichos gradientes y realizar estos gradientes con tiempos diferentes (o lo que es lo mismo, variar la pendiente del cambio del % de modificador con el tiempo). Los datos de retención de los picos en estos gradientes se utilizan para ajustar un modelo lineal simple que relaciona el logaritmo neperiano de K con el porcentaje de modificador ϕ , y, por tanto, nos proporciona un mapa de retención aproximado para cada pico. A partir de ese mapa de retención se pueden generar simulaciones de las separaciones, bien utilizando el propio modelo para la elución en gradientes o bien, calculando los valores de retención isocrática y con ellos, los datos de entrada para otros modelos de simulación como, por ejemplo, PREGA.

Los proyectos de **tipo I** son los convencionales de PREGA ya disponibles en anteriores versiones del programa. Estos modelos se construyen a partir de datos de retención en eluciones isocráticas y también de datos de retención en eluciones programadas [175]. El proceso de generación de un modelo de retención en PREGA asume la utilización de datos isocráticos para la creación del modelo, pero también la ausencia de algunos de tales datos, caso frecuente

por la elevada retención de algunos picos a ciertos porcentajes de modificador, etc.

El proceso de generación de un modelo de retención para cualquiera de los picos en la mezcla se realiza en dos etapas. En primer lugar se genera un modelo de retención “en bruto” utilizando los datos isocráticos disponibles para ese pico (el número de datos disponibles para cada pico, obviamente no tiene por qué ser el mismo, aunque deberá disponerse al menos de tres datos de retención para poder ajustar el modelo a un pico).

En la Figura 11 podemos observar el modelo de retención representado por la curva roja. En dicha figura, se han dibujado con símbolos diferentes los datos de retención isocrática disponibles realmente (cuadrados de color rojo) y los datos no disponibles, que utilizando el modelo de retención en bruto, han sido calculados por extrapolación.

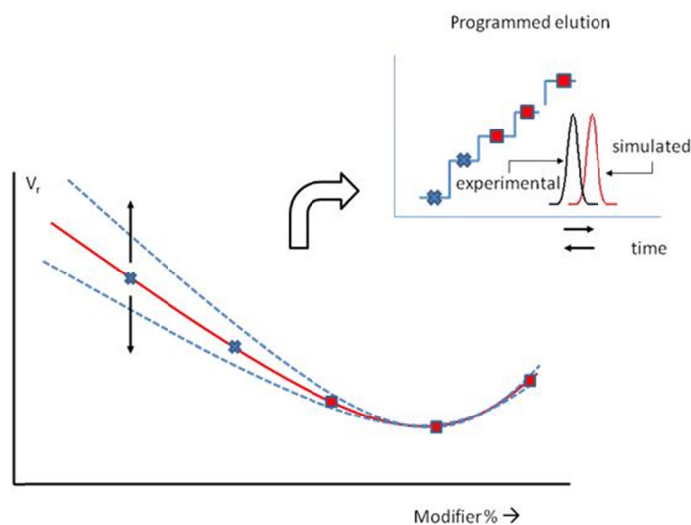


Figura 11. Ejemplo de un modelo de retención en PREGA 7.0

Claramente, esos datos extrapolados son poco fiables y podemos imaginar que el verdadero modelo de retención estará comprendido en un intervalo que viene representado en el esquema por las líneas de puntos en color azul. Dicho intervalo será tanto más amplio cuanto más nos alejamos de los valores realmente experimentales. Esta situación es completamente habitual

en modelos de retención calculados a partir de datos de retención isocrática. Habitualmente, se renuncia a evaluar el modelo fuera de los límites definidos por los datos realmente disponibles, lo que convierte el sistema en poco útil puesto que normalmente la región a explorar es mucho más amplia que la cubierta por los datos experimentales. La alternativa utilizada por PREGA tanto en sus versiones anteriores como en la versión 7.0 consiste en validar y re-calibrar el modelo de retención en bruto mediante un cierto número de gradientes registrados experimentalmente. Este proceso de re-calibración del modelo se esquematiza en la parte superior de la figura. En este esquema superior se representa como se efectúa el cálculo en PREGA para la retención del pico en un programa de elución cualquiera, teniendo en cuenta que PREGA siempre transforma los programas de elución en programas de tipo escalonado para efectuar los cálculos mediante el denominado modelo de escalones (desarrollado por Cela y colaboradores en 1986 [176] y formalizado a partir de 2000 por Nikitas y colaboradores [177])

Tal y como vemos en el esquema el cálculo de la retención se basa en estimar la velocidad de avance del pico en la columna en etapas isocráticas sucesivas que equivalen al programa de gradiente original. Es evidente que no se dispone de datos experimentales para todas y cada una de esas etapas (nuevamente, se han señalado con símbolos diferentes y coincidentes con los empleados en el esquema del modelo de la parte inferior). Por tanto, lo que se hace es permitir una cierta variación de los valores de velocidad de pico para las etapas que no disponen de datos reales y ajustar esos valores para lograr coincidencia entre los tiempos predichos para la retención del pico en gradiente y los medidos experimentales. En la práctica, PREGA utiliza un algoritmo genético para efectuar este ajuste.

El resultado de este proceso es un modelo de retención re-calibrado que permite ajustar tanto la retención en modo isocrático como en modo programado y que puede permitir simulaciones en un amplio rango de valores

y con ello, convertirse en una herramienta eficiente para la optimización asistida por ordenador de separaciones en HPLC.

Adicionalmente, y tal como se ha indicado previamente, los gradientes utilizados por un modelo PREGA convencional para la re-calibración son los mismos que el programa propone para calcular modelos SCOUT, de modo que el trabajo experimental realizado siempre es utilizado de la forma más eficiente posible y el proceso de creación del modelo de retención resulta así un proceso secuencial que va incorporando más parámetros y exigiendo más trabajo según se va comprobando la necesidad de realizar esos experimentos y no a priori.

Este modelo de retención es utilizado posteriormente para el desarrollo del proceso de optimización de las separaciones. Tanto el proceso de desarrollo del modelo de retención isocrático como la re-calibración del mismo y el propio proceso de optimización de las separaciones son realizados mediante algoritmos evolutivos [178, 179], adaptados a cada uno de estos objetivos. En el caso de la optimización de las separaciones, se usan cualquiera de las funciones de respuesta cromatográficas (CRFs) como función objetivo [180].

3.2.1. Aplicaciones del PREGA

Como se mencionó anteriormente El PREGA es una herramienta de quimiometría que facilita el trabajo a los analistas cuando utilizan cromatografía líquida, permitiendo a estos mejorar las separaciones cromatográficas y lograr procesos de desarrollo más eficientes. Puede ser aplicado a cualquier tipo de compuesto que se quiera separar. Es decir compuestos ionizable o no ionizables, polares, etc. Ejemplo de las separaciones hechas con PREGA encontramos polifenoles, arilaminas, pirotardantes, edulcorantes, pesticidas y fármacos entre otros [163, 181].



4. REFERENCIAS

1. Jensen OM, Kamby C; *Intra-uterine exposure to saccharin and risk of bladder cancer in man*. Int J Cancer 29 (1982) 507-509.
2. Kroger M, Meister K, Kava R; *Low-calorie Sweeteners and Other Sugar Substitutes: A Review of the Safety Issues*. Comp Rev Food Sci Food Saf 5 (2006) 35-47.
3. *Reglamento (CE) n o 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008 , sobre aditivos alimentarios* DO L 354 de 31.12.2008, p. 16/33
4. *Reglamento (UE) n o 1131/2011 de la Comisión, de 11 de noviembre de 2011 , por el que se modifica el anexo II del Reglamento (CE) n o 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que respecta a los glucósidos de esteviol*. DO L 295 de 12.11.2011, p. 205/211
5. *PART 172 – Food Additives permitted for direct addition to food for human consumption*. Electronic Code of Federal Regulations. [http://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID=37a9fb03e97399cdf82271354cca825a&mc=true&tpl=/ecfrbrowse/Title21/21cfrv3_02.tpl#0]. Acceso: 19/01/2017
6. Horne J, Lawless H, Speirs W, Sposato D; *Bitter taste of saccharin and acesulfame-K*. Chem Senses 27 (2002) 31-38.
7. Nabors L; *Sweet choices: sugar replacements for foods and beverages*. Food Technol 56 (2002) 28-32.
8. Haley S, Toasa J, Valdes C, Jerardo A; *Sugar and Sweeteners Outlook*. United States Department of Agriculture, 2009. <http://usda.mannlib.cornell.edu/usda/ers/SSS//2010s/2010/SSS-01-14-2010.pdf>.
9. Bopp BA, Sonders RC, Kesterson JW; *Toxicological aspects of cyclamate and cyclohexylamine*. Crit Rev Toxicol 16 (1986) 213-306.
10. Nabors LOB. *Alternative sweeteners: an overview*. CRC Press. New York, 2011.
11. Grenby TH. *Progress in Sweeteners*. Elsevier Applied Science. New York, 1990.
12. Chattopadhyay S, Raychaudhuri U, Chakraborty R; *Artificial sweeteners – a review*. J Food Sci Technol (2011) 1-11.

13. Hutchinson SA, Ho GS, Ho C-T; *Stability and degradation of the high-intensity sweeteners: aspartame, alitame, and sucralose*. Food Rev Int 15 (1999) 249-261.
14. Mazur RH, Goldkamp AH, James PA, Schlatter JM; *Structure-taste relation of aspartic acid amides*. J Med Chem 13 (1970) 1217-1221.
15. Nofre C, Tinti J-M; *Neotame: discovery, properties, utility*. Food Chem 69 (2000) 245-257.
16. Prakash I, Corliss G, Ponakala R, Ishikawa G; *Neotame: The next-generation sweetener*. Food Technol 56 (2002) 36-40.
17. Horowitz RM, Gentili B; *Flavonoids of citrus. VI. Structure of neohesperidose*. Tetrahedron 19 (1963) 773-782.
18. DuBois GE, Crosby GA, Stephenson RA, Wingard RE; *Dihydrochalcone sweeteners. Synthesis and sensory evaluation of sulfonate derivatives*. J Agric Food Chem 25 (2000) 763-772.
19. Evaluations of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) [<http://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/search.aspx?fc=66>]. Acceso: 20/01/2017.
20. EFSA Panel on Food Contact Materials E, Flavourings and Processing Aids (CEF); *Flavouring Group Evaluation 32 (FGE.32): Flavonoids (Flavanones and dihydrochalcones) from chemical groups 25 and 30*. EFSA J 8 (2010) 1065.
21. Priebe PM, Kauffman GB; *Making governmental policy under conditions of scientific uncertainty: a century of controversy about saccharin in Congress and the laboratory*. Minerva 18 (1980) 556-574.
22. Whitehouse CR, Boullata J, McCauley LA; *The potential toxicity of artificial sweeteners*. AAOHN J 56 (2008) 251-259; quiz 260-251.
23. Geuns JMC, Augustijns P, Mols R, Buyse JG, Driessen B; *Metabolism of stevioside in pigs and intestinal absorption characteristics of stevioside, rebaudioside A and steviol*. Food Chem Toxicol 41 (2003) 1599-1607.
24. Heeren S, Schultze D, Meurer P, Flick G; *Stevia Rebaudiana - Analytik zur Stabilität von Steviosid und Rebaudiosid in Verarbeitungsprodukten*. VDLUFA-Schriftenr 66 (2010) 393-400.
25. *Reglamento (UE) n o 1129/2011 de la Comisión, de 11 de noviembre de 2011, por el que se modifica el anexo II del Reglamento (CE) n o 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo para establecer una lista de aditivos alimentarios de la Unión* DO L 295 de 12.11.2011, p. 1/177
26. Grice HC, Goldsmith LA; *Sucralose - an overview of the toxicity data*. Food Chem Toxicol 38 (2000) S1-S6.

27. Magnuson BA, Burdock GA, Doull J, Kroes RM, Marsh GM, Pariza MW, Spencer PS, Waddell WJ, Walker R, Williams GM; *Aspartame: A safety evaluation based on current use levels, regulations, and toxicological and epidemiological studies*. Crit Rev Toxicol 37 (2007) 629-727.
28. Weihrauch MR, Diehl V; *Artificial sweeteners--do they bear a carcinogenic risk?* Ann Oncol 15 (2004) 1460-1465.
29. Armstrong B, Doll R; *Bladder cancer mortality in England and Wales in relation to cigarette smoking and saccharin consumption*. Br J Prev Soc Med 28 (1974) 233-240.
30. Armstrong B, Doll R; *Bladder cancer mortality in diabetics in relation to saccharin consumption and smoking habits*. Br J Prev Soc Med 29 (1975) 73-81.
31. Yu Y, Hu J, Wang PP, Zou Y, Qi Y, Zhao P, Xe R; *Risk factors for bladder cancer: a case-control study in northeast China*. Eur J Cancer Prev 6 (1997) 363-369.
32. Bigal ME, Krymchantowski AV; *Migraine Triggered by Sucralose – A Case Report*. Headache 46 (2006) 515-517.
33. Mukhopadhyay M, Mukherjee A, Chakrabarti J; *In vivo cytogenetic studies on blends of aspartame and acesulfame-K*. Food Chem Toxicol 38 (2000) 75-77.
34. Soffritti M, Belpoggi F, Esposti DD, Lambertini L, Tibaldi E, Rigano A; *First experimental demonstration of the multipotential carcinogenic effects of aspartame administered in the feed to Sprague-Dawley rats*. Environ Health Perspect 114 (2006) 379-385.
35. Suttajit M, Vinitketkaumnue U, Meevatee U, Buddhasukh D; *Mutagenicity and human chromosomal effect of stevioside, a sweetener from Stevia rebaudiana bertonii*. Environ Health Perspect 101 (1993) 53-56.
36. Abou-Donia MB, El-Masry EM, Abdel-Rahman AA, McLendon RE, Schiffman SS; *Splenda Alters Gut Microflora and Increases Intestinal P-Glycoprotein and Cytochrome P-450 in Male Rats*. J Toxicol Environ Health 71 (2008) 1415-1429.
37. Renwick AG; *The metabolism of intense sweeteners*. Xenobiotica 16 (1986) 1057-1071.
38. George V, Arora S, Wadhwa BK, Singh AK; *Analysis of multiple sweeteners and their degradation products in lassi by HPLC and HPTLC plates*. J Food Sci Technol 47 (2010) 408-413.

39. Lillicrap A, Langford K, Tollefsent KE; *Bioconcentration of the intense sweetener sucralose in a multitrophic battery of aquatic organisms*. Environ Toxicol Chem 30 (2011) 673–681.
40. Wiklund A-KE, Breitholtz M, Bengtsson B-E, Adolfsson-Erici M; *Sucralose – An ecotoxicological challenger?* Chemosphere 86 (2012) 50-55.
41. Kokotou MG, Asimakopoulos AG, Thomaidis NS; *Artificial sweeteners as emerging pollutants in the environment: analytical methodologies and environmental impact*. Anal Methods 4 (2012) 3057-3070.
42. Lange FT, Scheurer M, Brauch HJ; *Artificial sweeteners – a recently recognized class of emerging environmental contaminants: a review*. Anal Bioanal Chem 403 (2012) 2503-2518.
43. Scheurer M, Brauch HJ, Lange FT; *Analysis and occurrence of seven artificial sweeteners in German waste water and surface water and in soil aquifer treatment (SAT)*. Anal Bioanal Chem 394 (2009) 1585-1594.
44. Schmit Neset TS, Singer H, Longré P, Bader H-P, Scheidegger R, Wittmer A, Martin Andersson JC; *Understanding consumption-related sucralose emissions – A conceptual approach combining substance-flow analysis with sampling analysis*. Sci Total Environ 408 (2010) 3261–3269.
45. Brorström-Lundén E, Svenson A, Viktor T, Woldegiorgis A, Remberger M, Kaj L, Dye C, Bjerke A, Schlabach M; *Measurements of sucralose in the Swedish screening program 2007. PART II. Sucralose in biota samples and regional STP samples*. Swedish Environmental Research Institute, 2008.
46. Brorström-Lundén E, Svenson A, Viktor T, Woldegiorgis A, Remberger M, Kaj L, Dye C, Bjerke A, Schlabach M; *Measurements of sucralose in the Swedish screening program 2007. PART I. Sucralose in surface waters and STP samples*. Swedish Environmental Research Institute, 2008.
47. Buerge IJ, Buser H-R, Kahle M, Müller MD, Poiger T; *Ubiquitous Occurrence of the Artificial Sweetener Acesulfame in the Aquatic Environment: An Ideal Chemical Marker of Domestic Wastewater in Groundwater*. Environ Sci Technol 43 (2009) 4381-4385.
48. Gotz CW, Kase R, Kienle C, Hollender J; *Mikroverunreinigungen aus kommunalem Abwasser*. GWA Gas, Wasser, Abwasser 90 (2010) 575-585.
49. Longree P, Singer H, Moschet C, Goetz C, Scharer M, Keusen M; *Organische Mikroverunreinigungen im Bodensee. Analyse und Bewertung der Situation in See und Einzugsgebiet*. GWA Gas, Wasser, Abwasser 91 (2011) 495-505.
50. Scheurer M, Storck FR, Graf C, Brauch H-J, Ruck W, Lev O, Lange FT; *Correlation of six anthropogenic markers in wastewater, surface water, bank filtrate, and soil aquifer treatment*. J Environ Monit 13 (2011) 966-973.

51. Van Stempvoort DR, Robertson WD, Brown SJ; *Artificial sweeteners in a large septic plume*. *Ground Water Monit Rem* 31 (2011) 95-102.
52. Van Stempvoort DR, Roy JW, Brown SJ, Bickerton G; *Artificial sweeteners as potential tracers in groundwater in urban environments*. *J Hydrol* 401 (2011) 126-133.
53. Buerge IJ, Keller M, Buser H-R, Müller MD, Poiger T; *Saccharin and Other Artificial Sweeteners in Soils: Estimated Inputs from Agriculture and Households, Degradation, and Leaching to Groundwater*. *Environ Sci Technol* 45 (2011) 615-621.
54. Soh L, Connors KA, Brooks BW, Zimmerman J; *Fate of Sucralose through Environmental and Water Treatment Processes and Impact on Plant Indicator Species*. *Environ Sci Technol* 45 (2011) 1363-1369.
55. Gan Z, Sun H, Wang R, Feng B; *A novel solid-phase extraction for the concentration of sweeteners in water and analysis by ion-pair liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry*. *J Chromatogr A* 1274 (2013) 87-96.
56. Loos R, Gawlik BM, Boettcher K, Locoro G, Contini S, Bidoglio G; *Sucralose screening in European surface waters using a solid-phase extraction-liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry method*. *J Chromatogr A* 1216 (2009) 1126-1131.
57. Mead RN, Morgan JB, Avery GB, Kieber RJ, Kirk AM, Skrabal SA, Willey JD; *Occurrence of the artificial sweetener sucralose in coastal and marine waters of the United States*. *Mar Chem* 116 (2009) 13-17.
58. *Screening of new contaminants in samples from the Norwegian Arctic. Silver, platinum, sucralose, bisphenol A, tetrabrombisphenol A, siloxanes, phthalates (DEHP) and phosphororganic flame retardants, screening of new contaminants in samples from the Norwegian arctic. Statens forurensningstilsyn (SFT)*. Evenset A, Leknes H, Christensen GN, Warner N, Remberger M, Gabrielsen GW. Norwegian Pollution Control Authority. [<http://www.miljodirektoratet.no/old/klif/publikasjoner/2510/ta2510.pdf>]. Acceso: 20/01/2017
59. Prasse C, Wagner M, Schulz R, Ternes TA; *Biotransformation of the Antiviral Drugs Acyclovir and Penciclovir in Activated Sludge Treatment*. *Environ Sci Technol* 45 (2011) 2761-2769.
60. Thurman EM, Mills MS. *Chemical Analysis*. John Wiley and Sons. New York, 1998.
61. Cela R, Lorenzo RA, Casais C. *Técnicas de separación en química analítica*. Síntesis. Madrid, 2002.

62. Fritz JS, Dumont PJ, Schmidt LW; *Methods and materials for solid-phase extraction*. J Chromatogr A 691 (1995) 133-140.
63. Hennion M-C; *Graphitized carbons for solid-phase extraction*. J Chromatogr A 885 (2000) 73-95.
64. Productos Oasis para extracción de muestras [http://www.waters.com/waters/es_ES/Oasis-Sample-Extraction-Products/nav.htm?cid=513209&locale=es_ES]. Acceso: 20/01/2017.
65. Nieto A, Borrull F, Pocurull E, Maria Marce R; *Pressurized liquid extraction: A useful technique to extract pharmaceuticals and personal-care products from sewage sludge*. Trends Anal Chem 29 (2010) 752-764.
66. Schantz MM; *Pressurized liquid extraction in environmental analysis*. Anal Bioanal Chem 386 (2006) 1043-1047.
67. Subedi B, Aguilar L, Robinson EM, Hageman KJ, Bjorklund E, Sheesley RJ, Usenko S; *Selective pressurized liquid extraction as a sample-preparation technique for persistent organic pollutants and contaminants of emerging concern*. Trends Anal Chem 68 (2015) 119-132.
68. Richter BE, Jones BA, Ezzell JL, Porter NL, Avdalovic N, Pohl C; *Accelerated Solvent Extraction: A Technique for Sample Preparation*. Anal Chem 68 (1996) 1033-1039.
69. Lindsay S. *High Performance Liquid Chromatography*. John Wiley and Sons. New York, 1992.
70. Douglas A, Skoog F, Holler J, Nieman TA. *Principios de análisis instrumental*. McGraw-Hill/Interamericana de España. Madrid, 2001.
71. Reineccius G. *Instrumental methods of analysis*. In *Food Flavour Technology*. Edited by Taylor AJ, Linforth RST. Wiley-Blackwell. Oxford, 2010: 229-265
72. McNair HM, Esquivel H. B. *Cromatografía líquida de alta presión OEA*. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Washington, 1973.
73. Put R, Vander HY; *Review on modelling aspects in reversed-phase liquid chromatographic quantitative structure-retention relationships*. Anal Chim Acta 602 (2007) 164-172.
74. Dill KA; *The mechanism of solute retention in reversed-phase liquid chromatography*. J Phys Chem 91 (1987) 1980-1988.
75. Dorsey JG, Cooper WT; *Retention mechanisms of bonded-phase liquid chromatography*. Anal Chem 66 (1994) 857A-867A.

76. Sander LC, Callis JB, Field LR; *Fourier transform infrared spectrometric determination of alkyl chain conformation on chemically bonded reversed-phase liquid chromatography packings*. Anal Chem 55 (1983) 1068-1075.
77. Lochmueller CH, Hangac HH, Wilder DR; *The effect of bonded ligand structure on solute retention in reversed-phase high performance liquid chromatography*. J Chromatogr Sci 19 (1981) 130-136.
78. Hemström P, Irgum K; *Hydrophilic interaction chromatography*. J Sep Sci 29 (2006) 1784-1821.
79. Alpert AJ; *Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds*. J Chromatogr 499 (1990) 177-196.
80. McCalley DV; *Is hydrophilic interaction chromatography with silica columns a viable alternative to reversed-phase liquid chromatography for the analysis of ionisable compounds?* J Chromatogr A 1171 (2007) 46-55.
81. Jandera P; *Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review*. Anal Chim Acta 692 (2011) 1-25.
82. Fritz JS; *Factors affecting selectivity in ion chromatography*. J Chromatogr A 1085 (2005) 8-17.
83. Kuban P, Dasgupta PK; *Capillary ion chromatography*. J Sep Sci 27 (2004) 1441-1457.
84. Dejaegher B, Vander HY; *HILIC methods in pharmaceutical analysis*. J Sep Sci 33 (2010) 698-715.
85. McLaughlin LW; *Mixed-mode chromatography of nucleic acids*. Chem Rev 89 (1989) 309-319.
86. Laemmerhofer M; *HILIC and mixed-mode chromatography: the rising stars in separation science*. J Sep Sci 33 (2010) 679-680.
87. Halfpenny AP, Brown PR; *Mixed mode chromatography via column switching for the simultaneous HPLC analysis of ionic and nonionic nucleic acid constituents*. Chromatographia 21 (1986) 317-320.
88. Liu X, Pohl CA; *HILIC behavior of a reversed-phase/cation-exchange/anion-exchange trimode column*. J Sep Sci 33 (2010) 779-786.
89. Bischoff R, McLaughlin LW; *Nucleic acid resolution by mixed-mode chromatography*. J Chromatogr 296 (1984) 329-337.
90. Gao D, Lin D-Q, Yao S-J; *Mechanistic analysis on the effects of salt concentration and pH on protein adsorption onto a mixed-mode adsorbent with cation ligand*. J Chromatogr B 859 (2007) 16-23.

91. McCullagh JSO, Juchelka D, Hedges REM; *Analysis of amino acid ¹³C abundance from human and faunal bone collagen using liquid chromatography/isotope ratio mass spectrometry*. Rapid Commun Mass Spectrom 20 (2006) 2761-2768.
92. Nogueira R, Laemmerhofer M, Lindner W; *Alternative high-performance liquid chromatographic peptide separation and purification concept using a new mixed-mode reversed-phase/weak anion-exchange type stationary phase*. J Chromatogr A 1089 (2005) 158-169.
93. Li J, Shao S, Jaworsky MS, Kurtulik PT; *Simultaneous determination of cations, zwitterions and neutral compounds using mixed-mode reversed-phase and cation-exchange high-performance liquid chromatography*. J Chromatogr A 1185 (2008) 185-193.
94. Strege MA, Stevenson S, Lawrence SM; *Mixed-Mode Anion-Cation Exchange/Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography-Electrospray Mass Spectrometry as an Alternative to Reversed Phase for Small Molecule Drug Discovery*. Anal Chem 72 (2000) 4629-4633.
95. Bicker W, Laemmerhofer M, Lindner W; *Determination of chlorpyrifos metabolites in human urine by reversed-phase/weak anion exchange liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry*. J Chromatogr B 822 (2005) 160-169.
96. Mashige F, Ohkubo A, Matsushima Y, Takano M, Tsuchiya E, Kanazawa H, Nagata Y, Takai N, Shinozuka N, et al; *High-performance liquid chromatographic determination of catecholamine metabolites and 5-hydroxyindoleacetic acid in human urine using a mixed-mode column and an eight-channel electrode electrochemical detector*. J Chromatogr B 658 (1994) 63-68.
97. Peachey E, Cook K, Castles A, Hopley C, Goenaga-Infante H; *Capabilities of mixed-mode liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry for the simultaneous speciation analysis of inorganic and organically-bound selenium*. J Chromatogr A 1216 (2009) 7001-7006.
98. Dabre R, Azad N, Schwaemmle A, Laemmerhofer M, Lindner W; *Simultaneous separation and analysis of water- and fat-soluble vitamins on multi-modal reversed-phase weak anion exchange material by HPLC-UV*. J Sep Sci 34 (2011) 761-772.
99. Chapman S; *Carrier-mobility spectra of spray-electrified liquids*. Phys Rev 52 (1937) 184-190.
100. Mack LL; *Disertation: Molecular beams of macroions*. Northwestern Univ., 1969.
101. Fenn JB; *Electrospray Wings for Molecular Elephants (Nobel Lecture)*. Angew Chem Int Ed 42 (2003) 3871-3894.

102. Glish GL, Vachet RW; *The basics of mass spectrometry in the twenty-first century*. Nat Rev Drug Discovery 2 (2003) 140-150.
103. Yamashita M, Fenn JB; *Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme*. J Phys Chem 88 (1984) 4451-4459.
104. Konermann L, Ahadi E, Rodriguez AD, Vahidi S; *Unraveling the Mechanism of Electrospray Ionization*. Anal Chem 85 (2013) 2-9.
105. El-Aneed A, Cohen A, Banoub J; *Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers*. Appl Spectrosc Rev 44 (2009) 210-230.
106. Anastas PT, Warner JC. "Green Chemistry: Theory and Practice". Oxford University Press. New York, USA, 1998.
107. Namiesnik J; *Pro-ecological education: Chemical faculty of the Technical University of Gdansk, Poland*. Environ Sci Pollut Res Int 6 (1999) 243-244.
108. Namiesnik J; *Green analytical chemistry - some remarks*. J Sep Sci 24 (2001) 151-153.
109. Sandra P, Sandra K, Pereira A, Vanhoenacker G, David F; *Green chromatography. Part 1: introduction and liquid chromatography*. LC-GC Eur 23 (2010) 242, 244, 246, 248, 250, 252, 254, 256, 258-259.
110. Sandra K, Moshir M, D'Hondt F, Verleysen K, Kas K, Sandra P; *Highly efficient peptide separations in proteomics*. J Chromatogr B 866 (2008) 48-63.
111. Smith RM; *Superheated water chromatography - a green technology for the future*. J Chromatogr A 1184 (2008) 441-455.
112. Vanhoenacker G, Sandra P; *High temperature and temperature programmed HPLC: possibilities and limitations*. Anal Bioanal Chem 390 (2008) 245-248.
113. Guillarme D, Heinisch S, Gauvrit JY, Lanteri P, Rocca JL; *Optimization of the coupling of high-temperature liquid chromatography and flame ionization detection*. J Chromatogr A 1078 (2005) 22-27.
114. Trones R, Tangen A, Lund W, Greibrokk T; *Packed capillary high-temperature liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry*. J Chromatogr A 835 (1999) 105-112.
115. Breeden SW, Clark JH, Macquarrie DJ, Sherwood J. *Green solvents*. In *Green Techniques for Organic Synthesis and Medicinal Chemistry*. Edited by Zhang W, Cue B. John Wiley & Sons Ltd. Chichester, West Sussex 2012: 243-261
116. Sandra P, Pereira A, Dunkle M, Brunelli C, David F; *Green chromatography (part 2): The role of GC and SFC*. LC-GC Eur 23 (2010) 396, 398, 400, 402-405.

117. Heinisch S, Rocca J-L; *Sense and nonsense of high-temperature liquid chromatography*. J Chromatogr A 1216 (2009) 642-658.
118. Kondo T, Yang Y; *Comparison of elution strength, column efficiency, and peak symmetry in subcritical water chromatography and traditional reversed-phase liquid chromatography*. Anal Chim Acta 494 (2003) 157-166.
119. Louden D, Handley A, Lafont R, Taylor S, Sinclair I, Lenz E, Orton T, Wilson ID; *HPLC analysis of ecdysteroids in plant extracts using superheated deuterium oxide with multiple on-line spectroscopic analysis (UV, IR, ¹H NMR, and MS)*. Anal Chem 74 (2002) 288-294.
120. Saha S, Smith RM, Lenz E, Wilson ID; *Analysis of a ginger extract by high-performance liquid chromatography coupled to nuclear magnetic resonance spectroscopy using superheated deuterium oxide as the mobile phase*. J Chromatogr A 991 (2003) 143-150.
121. Smith RM, Burgess RJ; *Superheated water - a clean eluent for reversed-phase high-performance liquid chromatography*. Anal Commun 33 (1996) 327-329.
122. Yarita T, Nakajima R, Shibukawa M; *Superheated water chromatography of phenols using poly(styrene-divinylbenzene) packings as a stationary phase*. Anal Sci 19 (2003) 269-272.
123. Smith RM, Burgess RJ; *Superheated water as an eluent for reversed-phase high-performance liquid chromatography*. J Chromatogr A 785 (1997) 49-55.
124. Yang Y; *A model for temperature effect on column efficiency in high-temperature liquid chromatography*. Anal Chim Acta 558 (2006) 7-10.
125. Bolliet D, Poole CF; *Influence of temperature on retention and selectivity in reversed phase liquid chromatography*. Analyst 123 (1998) 295-299.
126. Dolan JW; *Temperature selectivity in reversed-phase high performance liquid chromatography*. J Chromatogr A 965 (2002) 195-205.
127. Mao Y, Carr PW; *The thermally tuned tandem column approach to optimizing selectivity in HPLC*. LCGC North Am 21 (2003) 150, 152, 154, 158-160, 162, 164, 166-167.
128. Snyder LR; *Changing reversed-phase high performance liquid chromatography selectivity. Which variables should be tried first?* J Chromatogr B 689 (1997) 105-115.
129. Buckenmaier SMC, McCalley DV, Euerby MR; *Rationalisation of unusual changes in efficiency and retention with temperature shown for bases in reversed-phase high-performance liquid chromatography at intermediate pH*. J Chromatogr A 1060 (2004) 117-126.
130. Bowermaster J, McNair HM; *Temperature programmed microbore HPLC - Part I*. J Chromatogr Sci 22 (1984) 165-170.

131. Chen MH, Horvath C; *Temperature programming and gradient elution in reversed-phase chromatography with packed capillary columns*. J Chromatogr A 788 (1997) 51-61.
132. Coym JW, Dorsey JG; *Reversed-phase retention thermodynamics of pure-water mobile phases at ambient and elevated temperature*. J Chromatogr A 1035 (2004) 23-29.
133. Hartonen K, Riekkola M-L; *Liquid chromatography at elevated temperatures with pure water as the mobile phase*. Trends Anal Chem 27 (2008) 1-14.
134. Vanhoenacker G, Sandra P; *Elevated temperature and temperature programming in conventional liquid chromatography - fundamentals and applications*. J Sep Sci 29 (2006) 1822-1835.
135. Chang C-S, Yeh TS; *Detection of 10 sweeteners in various foods by liquid chromatography/tandem mass spectrometry*. J Food Drug Anal 22 (2014) 318-328.
136. Kubica P, Namiesnik J, Wasik A; *Determination of eight artificial sweeteners and common Stevia rebaudiana glycosides in non-alcoholic and alcoholic beverages by reversed-phase liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry*. Anal Bioanal Chem 407 (2015) 1505-1512.
137. Lim H-S, Park S-K, Kwak I-S, Kim H-I, Sung J-H, Jang S-J, Byun M-Y, Kim S-H; *HPLC-MS/MS analysis of 9 artificial sweeteners in imported foods*. Food Sci Biotechnol 22 (2013) 233-240.
138. Yang D-j, Chen B; *Simultaneous Determination of Nonnutritive Sweeteners in Foods by HPLC/ESI-MS*. J Agric Food Chem 57 (2009) 3022-3027.
139. Zygler A, Wasik A, Namiesnik J; *Analytical methodologies for determination of artificial sweeteners in foodstuffs*. Trends Anal Chem 28 (2009) 1082-1102.
140. Zygler A, Wasik A, Kot-Wasik A, Namiesnik J; *Determination of nine high-intensity sweeteners in various foods by high-performance liquid chromatography with mass spectrometric detection*. Anal Bioanal Chem 400 (2011) 2159-2172.
141. Gao H, Yang M, Wang M, Zhao Y, Cao Y, Chu X; *Determination of 30 synthetic food additives in soft drinks by HPLC/electrospray ionization-tandem mass spectrometry*. J AOAC Int 96 (2013) 110-115.
142. Zygler A, Wasik A, Namiesnik J; *Retention behaviour of some high-intensity sweeteners on different SPE sorbents*. Talanta 82 (2010) 1742-1748.
143. Subedi B, Lee S, Moon H-B, Kannan K; *Emission of artificial sweeteners, select pharmaceuticals, and personal care products through sewage sludge from wastewater treatment plants in Korea*. Environ Int 68 (2014) 33-40.

144. Arbelaez P, Borrull F, Maria Marce R, Pocurull E; *Trace-level determination of sweeteners in sewage sludge using selective pressurized liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry.* J Chromatogr A 1408 (2015) 15-21.
145. Ordonez EY, Quintana JB, Rodil R, Cela R; *Determination of artificial sweeteners in sewage sludge samples using pressurised liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry.* J Chromatogr A 1320 (2013) 10-16.
146. Chen Q-C, Mou S-F, Liu K-N, Yang Z-Y, Ni Z-M; *Separation and determination of four artificial sweeteners and citric acid by high-performance anion-exchange chromatography.* J Chromatogr A 771 (1997) 135-143.
147. Chen Q-C, Wang J; *Simultaneous determination of artificial sweeteners, preservatives, caffeine, theobromine and theophylline in food and pharmaceutical preparations by ion chromatography.* J Chromatogr A 937 (2001) 57-64.
148. Demiralay EC, Ozkan G, Guzel-Seydim Z; *Isocratic separation of some food additives by reversed phase liquid chromatography.* Chromatographia 63 (2006) 91-96.
149. Di PAM, Cavrini V, Bonazzi D, Benfenati L; *HPLC analysis of aspartame and saccharin in pharmaceutical and dietary formulations.* Chromatographia 30 (1990) 215-219.
150. Dossi N, Toniolo R, Susmel S, Pizzariello A, Bontempelli G; *Simultaneous RP-LC determination of additives in soft drinks.* Chromatographia 63 (2006) 557-562.
151. Hannisdal A; *Analysis of acesulfame K, saccharin, and preservatives in beverages and jams by HPLC.* Z Lebensm-Unters Forsch 194 (1992) 517-519.
152. Koyama M, Yoshida K, Uchibori N, Wada I, Akiyama K, Sasaki T; *Analysis of nine kinds of sweeteners in foods by LC/MS.* Shokuhin Eiseigaku Zasshi 46 (2005) 72-78.
153. Matsumoto H, Hirata K, Sakamaki N, Hagino K, Ushiyama H; *Simultaneous determination of neotame, alitame and aspartame in foods by HPLC.* Shokuhin Eiseigaku Zasshi 49 (2008) 31-36.
154. Wasik A, McCourt J, Buchgraber M; *Simultaneous determination of nine intense sweeteners in foodstuffs by high performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection – Development and single-laboratory validation.* J Chromatogr A 1157 (2007) 187-196.
155. Zhu Y, Guo Y, Ye M, James FS; *Separation and simultaneous determination of four artificial sweeteners in food and beverages by ion chromatography.* J Chromatogr A 1085 (2005) 143-146.

156. Boyce MC; *Simultaneous determination of antioxidants, preservatives and sweeteners permitted as additives in food by mixed micellar electrokinetic chromatography*. J Chromatogr A 847 (1999) 369-375.
157. Frazier RA, Inns EL, Dossi N, Ames JM, Nursten HE; *Development of a capillary electrophoresis method for the simultaneous analysis of artificial sweeteners, preservatives and colours in soft drinks*. J Chromatogr A 876 (2000) 213-220.
158. Herrmannova M, Krivankova L, Bartos M, Vytras K; *Direct simultaneous determination of eight sweeteners in foods by capillary isotachopheresis*. J Sep Sci 29 (2006) 1132-1137.
159. Kokotou MG, Thomaidis NS; *Determination of eight artificial sweeteners in wastewater by hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Anal Methods 5 (2013) 3825-3833.
160. Mawhinney DB, Young RB, Vanderford BJ, Borch T, Snyder SA; *Artificial Sweetener Sucralose in U.S. Drinking Water Systems*. Environ Sci Technol 45 (2011) 8716-8722.
161. Oppenheimer J, Eaton A, Badruzzaman M, Haghani AW, Jacangelo JG; *Occurrence and suitability of sucralose as an indicator compound of wastewater loading to surface waters in urbanized regions*. Water Res 45 (2011) 4019-4027.
162. Minten J, Adolfsson-Erici M, Bjorlenius B, Alsberg T; *A method for the analysis of sucralose with electrospray LC/MS in recipient waters and in sewage effluent subjected to tertiary treatment technologies*. Int J Environ Anal Chem 91 (2011) 357-366.
163. Garcia-Lavandeira J, Losada B, Martinez-Pontevedra JA, Lores M, Cela R; *Computer-assisted method development in liquid chromatography-mass spectrometry: New proposals*. J Chromatogr A 1208 (2008) 116-125.
164. Cela R, Ordonez EY, Quintana JB, Rodil R; *Chemometric-assisted method development in reversed-phase liquid chromatography*. J Chromatogr A 1287 (2013) 2-22.
165. Siouffi AM, Phan-Tan-Luu R; *Optimization methods in chromatography and capillary electrophoresis*. J Chromatogr A 892 (2000) 75-106.
166. Jancic-Stojanovic B, Popovic I, Malenovic A, Ivanovic D, Medenica M; *Factorial Design in Optimization of Chromatographic Separation of Ramipril and Its Impurities*. Chromatographia 71 (2010) 799-804.
167. Gennaro MC, Marengo E, Gianotti V, Angioi S; *Simultaneous reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of mono-, di- and trichloroanilines through a gradient elution optimised by experimental design*. J Chromatogr A 945 (2002) 287-292.

168. Vander HY, Nijhuis A, Smeyers-Verbeke J, Vandeginste BGM, Massart DL; *Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation*. J Pharm Biomed Anal 24 (2001) 723-753.
169. Apostol I, Krull I, Kelner D. *Analytical method validation for biopharmaceuticals*. In *Analytical Chemistry*. Edited by Krull IS. InTech 2012: 115-134
170. Borman PJ, Chatfield MJ, Damjanov I, Jackson P; *Method ruggedness studies incorporating a risk based approach: A tutorial*. Anal Chim Acta 703 (2011) 101-113.
171. Monks K, Molnar I, Rieger HJ, Bogati B, Szabo E; *Quality by Design: Multidimensional exploration of the design space in high performance liquid chromatography method development for better robustness before validation*. J Chromatogr A 1232 (2012) 218-230.
172. Grupo de Cromatografía y Quimiometría (ChromChem), Universidad de Santiago de Compostela [www.usc.es/gcqprega]. Acceso: 20/01/2017.
173. Snyder LR, Dolan JW. *High-performance gradient elution. The practical application of the linear-solvent-strength model*. Wiley-Interscience. Hoboken, New York, 2007.
174. Quarry MA, Grob RL, Snyder LR; *Prediction of precise isocratic retention data from two or more gradient elution runs. Analysis of some associated errors*. Anal Chem 58 (1986) 907-917.
175. Ordonez EY, Quintana JB, Rodil R, Cela R; *Computer assisted optimization of liquid chromatographic separations of small molecules using mixed-mode stationary phases*. J Chromatogr A 1238 (2012) 91-104.
176. Cela R, Barroso CG, Viseras C, Perez-Bustamante JA; *The PREOPT package for pre-optimization of gradient elutions in high-performance liquid chromatography*. Anal Chim Acta 191 (1986) 283-297.
177. Pappa-Louisi A, Nikitas P, Balkatzopoulou P, Malliakas C; *Two- and three-parameter equations for representation of retention data in reversed-phase liquid chromatography*. J Chromatogr A 1033 (2004) 29-41.
178. Michalewicz Z. *Genetic algorithms + data structures = evolution programs*. Springer. Berlin, 1996.
179. Goldberg DE; *Genetic Algorithms in Search, Optimization and Machine Learning*. New York, NY, USA,; Addison-Wesley Longman Publishing Co., Inc.,; 1989.
180. Cela R, Martinez JA, Gonzalez-Barreiro C, Lores M; *Multi-objective optimisation using evolutionary algorithms: its application to HPLC separations*. Chemom Intell Lab Syst 69 (2003) 137-156.

181. Garcia-Lavandeira J, Oliveri P, Martinez-Pontevedra JA, Bollain MH, Forina M, Cela R; *Computer-assisted modelling and optimization of reversed-phase high-temperature liquid chromatographic (RP-HTLC) separations*. *Anal Bioanal Chem* 399 (2011) 1951-1964.





5. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales propiedades físico-químicas de los edulcorantes
estudiados..... 12

Tabla 2. Legislación de la UE de uso en bebidas para los edulcorantes
estudiados..... 16

Tabla 3. Características de diferentes adsorbentes poliméricos..... 28





6. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Edulcorantes artificiales estudiados en este trabajo	8
Figura 2. Etapas típicas de un procedimiento de SPE.....	25
Figura 3. Estructura del adsorbente de los cartuchos Oasis.....	29
Figura 4. Equipo ASE 200 de Dionex.....	32
Figura 5. Etapas del análisis por MS.....	39
Figura 6. Esquema de ionización en una fuente por electrospray.....	41
Figura 7. Esquema de un analizador cuadrupolar	43
Figura 8. Esquema de un QqQ similar al usado en este estudio	44
Figura 9. Imagen del horno de alta temperatura Polaratherm 9000	53
Figura 10. Diagrama de flujo de un CAMD.....	60
Figura 11. Ejemplo de un modelo de retención en PREGA 7.0.....	69





7. ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

ACE	Acesulfamo
ALI	Alitamo
APCI	Ionización química a presión atmosférica
API	Ionización a presión atmosférica
APPI	Fotoionización a presión atmosférica
ASE	Extracción acelerada con disolventes
ASP	Aspartamo
AX	Intercambio aniónico
C18	Octadesil silano
CAMD	Desarrollo asistido por computador
CIC	Ciclamato de Sodio
CRF	Funcion de respuesta cromatográficas
CX	Intercambio catiónico
DC	Corriente continua
DIPEA	N,N-diisopropil etilamina
DOE	Diseño estadístico de experimentos
DUL	Dulcina
DVB	Divinilbenceno
EEUU	Estados Unidos
ELSD	Detector de dispersión de radiación
ESI	Ionización por electrospray
FA	Ácido fórmico
FDA	Administración de drogas y alimentos de los EEUU
HILIC	Cromatografía de interacción hidrofílica
HPLC	Cromatografía Líquida de alta resolución
HTLC	Cromatografía líquida de alta temperatura
IDA	Ingesta diaria admisible
JECFA	Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios

INTRODUCCIÓN

MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	Espectrometría de masas
NEO	Neotamo
NHDC	Neohesperidina Dihidrochalcona
PLE	Extracción por líquidos presurizada
PPCPs	Productos farmacéuticos y los productos de cuidado personal
PS	Poliestireno
Q	Cuadrupolo
QqQ	Triple cuadrupolo
RF	Radiofrecuencia
RPLC	Cromatografía de fase reversa
SAC	Sacarosa
SPE	Extracción en fase sólida
STEV	Esteviósido
SUC	Sucralosa
TFA	Ácido trifluoroacético
ToF	Analizador de tiempo de vuelo
UE	Unión Europea
VP	Vinil pirrolidona



III.METODOLOGÍA DESARROLLADA



1. ARTÍCULO CIENTIFICO 1

“Determination of artificial sweeteners in water samples by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry”

E.Y. Ordoñez, J.B. Quintana, R. Rodil, R.Cela

Journal of Chromatography A 1256 (2012) 197-205

[DOI: 10.1016/j.chroma.2012.07.073](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.07.073)





2. ARTÍCULO CIENTÍFICO 2

“Determination of artificial sweeteners in sewage sludge samples using pressurised liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry”

E.Y. Ordóñez, J.B. Quintana, R. Rodil, R. Cela

Journal of Chromatography A 1320 (2013) 10-16

[DOI: 10.1016/j.chroma.2013.10.049](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.10.049)





3. ARTÍCULO CIENTÍFICO 3

“Determination of artificial sweeteners in beverages with green mobile phases and high temperature liquid chromatography–tandem mass spectrometry “

E. Y. Ordoñez, R. Rodil, J.B. Quintana, R. Cela

Food Chemistry 169 (2015) 162–168

[DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.07.132](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.132)





4. ARTÍCULO CIENTÍFICO 4

“Computer assisted optimization of liquid chromatographic separations of small molecules using mixed-mode stationary phases”

E. Y. Ordoñez, J. B. Quintana, R. Rodil, R. Cela

Journal of Chromatography A 1238 (2012) 91-104

[DOI: 10.1016/j.chroma.2012.03.055](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.03.055)





5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS INTEGRADORA

Esta tesis ha investigado la determinación de edulcorantes de alta intensidad, en su mayoría sintéticos, en muestras medioambientales, de aguas y lodos, y en muestras de bebidas. Para ello se han investigado diferentes metodologías de preparación de muestra, de separación cromatográfica por cromatografía líquida (HPLC), la detección mediante espectrometría de masas en tándem (MS/MS) y finalmente se ha aplicado a muestras reales. A continuación se discuten los resultados obtenidos en las diferentes partes del proceso analítico, así como tras su aplicación a muestras.

PREPARACIÓN DE MUESTRA

En esta tesis se han considerado tres matrices muy diferentes en cuanto a niveles de concentración esperables de los edulcorantes y a su complejidad. Las muestras menos complejas son las bebidas, donde debido a la sensibilidad del sistema HPLC-MS/MS y las concentraciones a medir de estos compuestos (mg/L) la preparación de muestra se limita a una desgasificación (caso de las bebidas carbonatadas), dilución y filtración, obteniéndose buenos resultados, tal y como se demuestra en el [artículo científico 3](#).

En el caso de las muestras de agua residual y superficial, se hace necesario una etapa de preconcentración previa a la determinación, porque aunque las concentraciones son elevadas para estas muestras medioambientales (en torno a 1 $\mu\text{g/L}$), no lo suficiente en todos los casos. En el caso de los edulcorantes, su polaridad tan elevada hace que no sean buenos candidatos para el uso de técnicas de microextracción, siendo la extracción en fase sólida (SPE) la técnica de referencia. Además, no son un grupo de compuestos con una estructura homogénea, existiendo compuestos neutros, muy ácidos e incluso anfóteros, lo que implica que obtener un método de SPE satisfactorio es algo altamente desafiante. Por eso en el [artículo científico 1](#), se han evaluado hasta 7 tipos de adsorbentes diferentes de SPE, incluyendo algunos de modo mixto, que combinan retención mediante fase reversa y cambio iónico. Sin embargo,

los resultados obtenidos demuestran que estas fases de modo mixto no son las mejores en este caso, debido al diferente carácter ácido/base de los analitos, algunos de los cuales no se pueden después eluir del cartucho al estar demasiado retenidos. Por ello finalmente se ha usado un adsorbente Oasis HLB, que proporciona interacciones de fase reversa e hidrofílicas, pero sin interacciones iónicas. Por ello el volumen de muestra a percolar debe limitarse a un máximo de 50 mL. De hecho, investigaciones posteriores [1] a la publicación del [artículo científico 1](#), han optado también por evitar el uso de cartuchos de modo mixto, utilizando también finalmente el mismo adsorbente y el mismo volumen de muestra. Otra alternativa publicada recientemente [2], consiste en la inyección directa de grandes volúmenes de muestra en el HPLC-MS/MS (sin etapa previa de SPE), pero dicha aproximación solo se ha probado para dos de los edulcorantes y requiere una configuración especial del equipo de HPLC.

Finalmente, la matriz más compleja corresponde a los lodos de plantas de tratamiento de aguas residuales (WWTP) ([artículo científico 2](#)), ya que presentan una carga de materia orgánica muy elevada. Cuando se abordó el desarrollo del método no existía metodología específica para estos compuestos en esta matriz y se optó por emplear extracción con líquidos presurizados (PLE), debido a su fácil automatización y la posibilidad de introducir una etapa de limpieza simultánea a la extracción. De hecho otros autores han seguido el mismo camino posteriormente, empleando también PLE en lodos [3] e incluso para la determinación de edulcorantes en pescado [4]. Los resultados obtenidos indicaron que era posible realizar la extracción con agua tamponada y posteriormente concentrar el extracto empleando el método de SPE optimizado en el [artículo científico JJ](#). Un aspecto relevante a tener en cuenta es la hidrólisis del ASP, que ocurre si no se controla bien el pH del tampón de extracción. Sin embargo, este edulcorante no se ha encontrado finalmente en muestras de agua ni de lodos, ya que la hidrólisis también ocurre en el propio cuerpo humano durante su metabolismo y no se excreta ASP como tal, Figura 1.

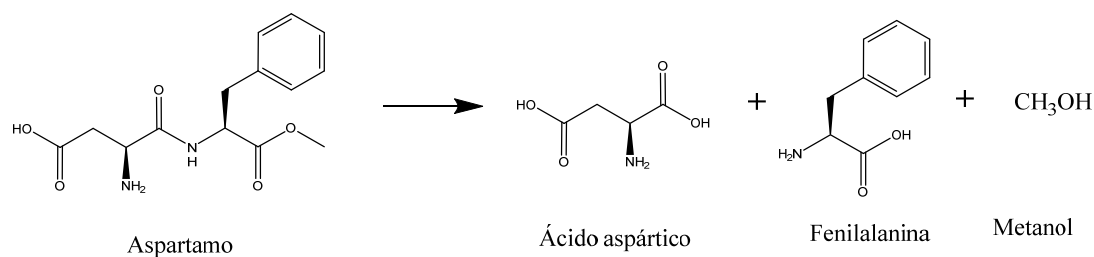


Figura 1. Productos de la hidrólisis y metabolismo del ASP [5]

SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA

En esta tesis se han evaluado tres tipos de columnas de HPLC: fase reversa (RPLC), interacción hidrofílica (HILIC) y modo mixto (MMLC), que combina RPLC con cambio aniónico y catiónico simultáneamente. Además en el caso de RPLC se han empleado gradientes convencionales de modificador y además gradientes simultáneos de temperatura y modificador.

En realidad, aunque aparece un último lugar ([artículo científico 4](#)), la MMLC fue la primera alternativa probada, para un amplio rango de compuestos de diferentes propiedades (no sólo edulcorantes). En este trabajo se demostró que era posible la optimización computerizada de este tipo de separaciones tan complejas, debido a todos los mecanismos que tienen lugar. De hecho las funciones usuales probadas fallaron para modelizar algunos compuestos y se tuvo que recurrir a funciones Hoerl, con las que se obtuvieron resultados satisfactorios. Estas columnas de MMLC trimodales (con cambio tanto catiónico como aniónico además de RPLC) han demostrado poseer un gran potencial. Sin embargo, un problema detectado con el tipo de columna probado fue la falta de robustez, sobre todo comparada con RPLC. Estudios más reciente realizados en el grupo de investigación [6] demuestran, sin embargo, que otros fabricantes han conseguido producir columnas de MMLC altamente reproducibles, por lo que es una técnica con alto potencial.

En cuanto a RPLC, ha demostrado ser todavía el modo de trabajo de referencia en HPLC, dando resultados buenos para estos compuestos polares. De hecho, en el [artículo científico 1](#) se comparó con HILIC, empleando una

columna de tipo Diol. Los resultados demostraron que HILIC es prometedora para la separación de compuestos polares, pero es más difícil su optimización, la forma de pico no es siempre la mejor e incluso, a pesar de usar más disolvente orgánico (a priori beneficioso para la ionización mediante ESI), los LOQs obtenidos fueron mejores mediante RPLC. Diversos estudios posteriores a dicho trabajo han intentado aplicar HILIC para la determinación de edulcorantes [7, 8]. Por ejemplo Salas et al. [8] compararon dos columnas HILIC diferentes, una de tipo de sílice pura y otra zwitteriónica de tipo sulfoalquilbetaína, tras un proceso complejo de optimización. Sus resultados empleando detección con un sistema Orbitrap no fueron mejores que los obtenidos en el [artículo científico 1](#). Con todo, es preferible usar RPLC para la mayoría de las aplicaciones, por su fácil optimización.

Finalmente, en el [artículo científico 3](#), se estudió el uso de HPLC de alta temperatura (HTLC) en separaciones mediante RPLC. La principal dificultad en este caso es que no es posible usar columnas en base de sílice (ej. C18) y hay que emplear columnas poliméricas o de carbón, además de ser necesario disponer del módulo específico para trabajar en HTLC. En esta aplicación, una vez más el disponer de la optimización computerizada de la separación es de gran valor, ya que permite emular miles de gradientes, combinando gradientes de temperatura y modificador. Inicialmente el objetivo era obtener una separación puramente acuosa, sin embargo tres de los edulcorantes (esteviósido, neotamo y neohesperidina dihidrochalcona) son suficientemente hidrófobos para impedir alcanzar dicho objetivo. Por ello se recurrió al uso de pequeñas cantidades de un disolvente orgánico benigno con el medioambiente (etanol) que en HPLC convencional no suele emplearse debido a su alta viscosidad, pero que el uso de altas temperaturas permite. Para conseguir alcanzar el objetivo de no usar disolvente orgánico, sería necesario disponer de columnas que aguantasen mayor temperatura (la empleada era estable hasta 150°C). Por otro lado, el uso de tanto disolvente acuoso no facilita la ionización en ESI, lo que empeora algo los LOQs respecto a RPLC convencional, pero fueron suficientes para la matriz empleada. Además este inconveniente se puede mitigar en los

equipos de HPLC-ESI-MS más modernos, que emplean mayor temperatura y gas para promover la desolvatación.

DETERMINACIÓN

Aunque en principio los edulcorantes son compuestos altamente polares y aparentemente ideales para su determinación mediante ESI, la sensibilidad obtenida en algunos casos fue solo aceptable. Este es el caso por ejemplo de la sucralosa (SUC), ya que al ser simplemente un producto de halogenación de la sacarosa común, no presenta en su estructura grupos especialmente básicos ni ácidos; solamente grupos alcohol alifáticos. Por ello en el [artículo científico 1](#) se obtuvo inicialmente un LOQ de 25 ng/mL cuando se empleaban transiciones MRM a partir del ion molecular desprotonado. Este LOQ se mejoró substancialmente (unas 60 veces) en el [artículo científico 2](#), mediante el uso del aducto con acetato, como precursor de las transiciones MRM. Posteriormente, otros autores [2] han usado el aducto con formiato, reportando una mejora de unas 20 veces. Sin embargo este proceso de selección del aducto debe realizarse con cuidado, ya que es altamente dependiente de la fase móvil empleada, así como del instrumento. Por ejemplo, la Figura 2 presenta el espectro de MS de alta resolución (HRMS) obtenido con un sistema cuadrupolo - tiempo de vuelo (QTOF). En él puede observarse que en este equipo el aducto predominante corresponde al ión $[M+Cl]^-$. Esto puede atribuirse a posibles impurezas o al diseño de la fuente del equipo que incluye la nebulización de una disolución de referencia en continuo para mantener la exactitud de masas. De hecho también se observa, aunque con menor intensidad la presencia del aducto con formiato.

La presencia del aducto con cloruro ha sido también descrita por Wu y col. [2] y atribuida a impurezas o a cesión de cloro por otras moléculas de SUC en la fuente del equipo, aunque de menor intensidad, ya que como se menciona anteriormente, en su caso el ion seleccionado fue el aducto con formiato.

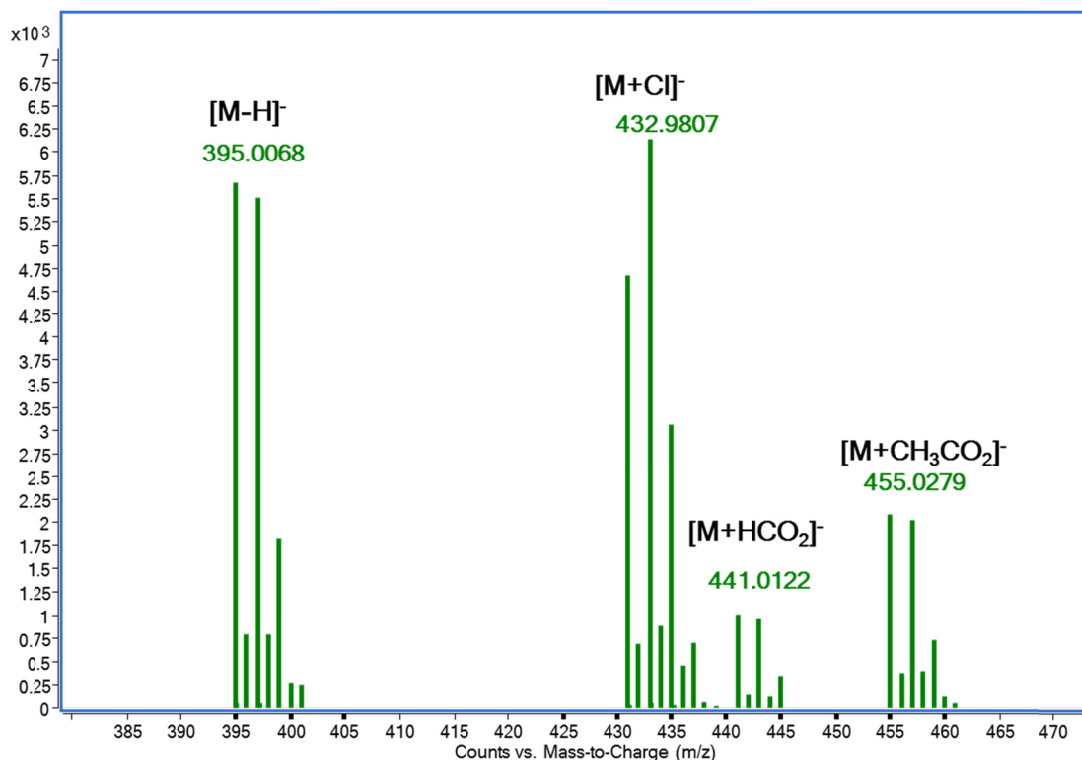


Figura 2. Espectro obtenido en el sistema QTOF-MS disponible en el laboratorio para la SUC.

PRESENCIA DE EDULCORANTES EN LAS MUESTRAS

Los métodos desarrollados se han aplicado en mayor o menor medida a diversas muestras. En el caso de las bebidas ([artículo científico 3](#)) se analizaron un total de 25 bebidas compradas en supermercados de la zona. Los análisis mostraron que estaban correctamente etiquetadas, respecto a los edulcorantes que contenían, siendo acesulfamo (ACE), ciclamato (CIC), aspartamo (ASP) y SUC los más empleados. Además, en el caso del ASP una de las muestras contenía una concentración superior a la permitida, mientras que otras 3 rozaban el límite legal.

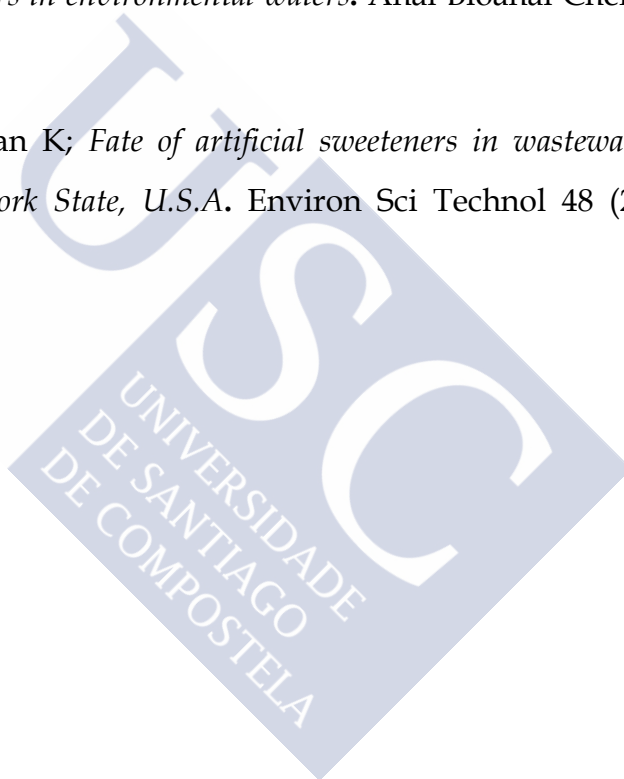
Su elevado uso en productos alimenticios y su no metabolización en el cuerpo humano hacen que ACE, CIC, SUC y sacarina (SAC) sean compuestos omnipresentes en las aguas, detectados en el [artículo científico 1](#) en concentraciones de hasta 50 µg/L en aguas de río e incluso detectables en regatos en principio poco afectados por contaminación antropogénica. Su elevada polaridad y persistencia hace que esto sea algo habitual. Además, en el

artículo científico 2 se investigaron lodos de depuradora, siendo detectados en concentraciones del orden de la centena de ng/g. Sin embargo, una vez considerado el contenido en agua de los lodos en fresco, se concluyó que estas concentraciones provienen del agua que contienen y no de una adsorción sustancial en los mismos (de acuerdo con su carácter polar). Dichos resultados son similares a los anteriores. También estudios posteriores reportan similares concentraciones y el hecho de que la adsorción en los lodos no juega un papel decisivo en su eliminación en las WWTP [3, 9].

REFERENCIAS

1. Arbelaez P, Borrull F, Pocurull E, Marce RM; *Determination of high-intensity sweeteners in river water and wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. J Chromatogr A 1393 (2015) 106-114.
2. Wu M, Qian Y, Boyd JM, Hrudey SE, Le XC, Li XF; *Direct large volume injection ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination of artificial sweeteners sucralose and acesulfame in well water*. J Chromatogr A 1359 (2014) 156-161.
3. Arbelaez P, Borrull F, Maria Marce R, Pocurull E; *Trace-level determination of sweeteners in sewage sludge using selective pressurized liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. J Chromatogr A 1408 (2015) 15-21.
4. Nuñez M, Borrull F, Pocurull E, Fontanals N; *Pressurised liquid extraction and liquid chromatography-high resolution mass spectrometry to determine high-intensity sweeteners in fish samples*. J Chromatogr A 1479 (2017) 32-39.
5. Humphries P, Pretorius E, Naude H; *Direct and indirect cellular effects of aspartame on the brain*. Eur J Clin Nutr 62 (2008) 451-462.

6. Montes R, Aguirre J, Vidal X, Rodil R, Cela R, Quintana JB; *Screening for polar chemicals in water by trifunctional mixed-mode liquid chromatography-high resolution mass spectrometry*. Environ Sci Technol (2017) en revisión.
7. Kokotou MG, Thomaidis NS; *Determination of eight artificial sweeteners in wastewater by hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Anal Methods 5 (2013) 3825-3833.
8. Salas D, Borrull F, Fontanals N, Marce RM; *Hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry to determine artificial sweeteners in environmental waters*. Anal Bioanal Chem 407 (2015) 4277-4285.
9. Subedi B, Kannan K; *Fate of artificial sweeteners in wastewater treatment plants in New York State, U.S.A*. Environ Sci Technol 48 (2014) 13668-13674.



IV. CONCLUSIONES





En esta tesis se han investigado diferentes metodologías analíticas basadas en cromatografía de líquidos de alta resolución combinada con espectrometría de masas (HPLC-MS) para la determinación de edulcorantes de alta intensidad, en su mayoría sintéticos, en muestras medioambientales, de aguas y lodos, y en muestras de bebidas. Las principales conclusiones que se pueden derivar de la misma son las siguientes:

1. Los edulcorantes son compuestos de elevada polaridad, por lo que es necesario optimizar cuidadosamente el proceso de extracción en fase sólida (SPE) para su determinación en aguas. Entre los distintos adsorbentes utilizados, el Oasis HLB ha proporcionado los mejores resultados.
2. La comparación de cromatografía líquida de interacción hidrofílica (HILIC) frente a cromatografía líquida de fase reversa (RPLC) mostró que, en general, ambos modos cromatográficos proporcionan una buena separación, sin embargo, la RPLC proporcionó mejores límites de detección (LODs) y cuantificación (LOQs) y menores efectos de matriz.
3. Los edulcorantes están presentes de manera ubicua en las aguas residuales y superficiales en niveles elevados ($\mu\text{g/L}$) debido a su alta polaridad y persistencia.
4. La extracción con fluidos presurizados (PLE) usando un tampón acuoso permite una buena extracción automatizada de los edulcorantes de lodos de depuradora. Posteriormente, estos extractos pueden tratarse como si fuesen una muestra de agua, mediante SPE.
5. Los edulcorantes están también presentes en los lodos de depuradora e niveles de hasta 630 ng/g . Estas concentraciones se deben sin embargo al agua presente en los lodos y no a una eliminación por adsorción en los mismos.

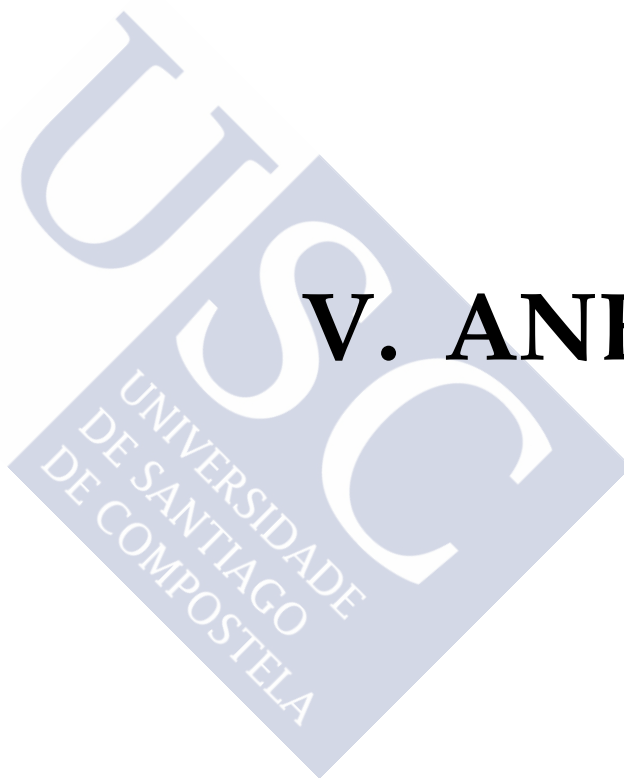
6. Ni el aspartamo ni la neohesperidina dihidrochalcona fueron encontrados en las muestras medioambientales, debido probablemente a que se metabolizan en el cuerpo humano y es posible que también en las aguas residuales.
7. La cromatografía de líquidos de alta temperatura (HTLC) permite la separación de los edulcorantes presentes en bebidas hipocalóricas de manera eficiente, reduciendo el consumo de disolvente orgánico a menos de 1 mL de etanol por inyección. Esto es mucho menos que los varios mL empleados en métodos convencionales, que usan disolventes más tóxicos, como metanol o acetonitrilo.
8. La combinación HTLC-MS permite la determinación de los edulcorantes (se consideraron 9) en bebidas hipocalóricas tras la simple dilución, desgasificación y filtración de las muestras, con LOQs entre 0.2 y 33 mg/L.
9. Tras el análisis de 25 bebidas hipocalóricas, se pudo comprobar como en el caso del ciclamato, una de las 9 muestras que lo contenía presentaba niveles superiores a los permitidos, mientras que otras 3 estaban en el límite legal.
10. El uso de la optimización computerizada de separaciones (CAMD) en HPLC es de gran utilidad, ya que permite obtener de manera eficiente el óptimo de separación y simular miles de gradientes en múltiples modos cromatográficos. En esta tesis se ha empleado en HTLC con una columna de RPLC, y también en cromatografía de modo mixto (MMLC).
11. Por primera vez se ha descrito un procedimiento de CAMD en MMLC, un tipo de cromatografía especialmente complejo, por incluir mecanismos de RPLC, cambio catiónico y aniónico, y en ciertas circunstancias HILIC.

12. Para la CAMD en MMLC se ha recurrido a ecuaciones empíricas de Hoerl, que han producido resultados con errores de predicción menores del 5% en la mayoría de los casos.





V. ANEXO





PUBLICACIONES RELACIONADAS

“Chemometric-assisted method development in reversed-phase liquid chromatography”

R. Cela, E.Y. Ordóñez, J.B. Quintana, R. Rodil

Journal of Chromatography A 1287 (2013) 2-22

[DOI: 10.1016/j.chroma.2012.07.081](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.07.081)



