

# **DETERMINACIÓN DE EDULCORANTES EN PECES**

**Estefanía Sánchez Chicharro**

**Curso 2014-2015**

**Tutor: José Juan Santana  
Rodríguez**

**Departamento de Química, grupo Análisis  
Químico Medioambiental. Universidad de  
las Palmas de Gran Canaria (ULPGC)**

**Co-Tutor/es: Eva Pocerull Aixalà  
y Núria Fontanals Torroja**

**Departamento de Química Analítica y  
Química Orgánica. Universidad Rovira i  
Virgili (URV)**

# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	3
2. PARTE EXPERIMENTAL .....	9
2.1 MATERIALES Y MÉTODOS .....	9
2.1.1 Reactivos y materiales .....	9
2.1.2 Preparación de la muestra.....	9
2.1.3 Extracción con líquidos presurizados .....	10
2.1.4 <i>Clean-up</i> .....	10
2.1.5 Análisis mediante cromatografía de líquidos con detector de diodos en fila 11	
2.1.6 Análisis mediante cromatografía de líquidos- espectrometría de masas de alta resolución.....	11
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	13
3.1 Optimización de la separación cromatográfica .....	13
3.2 Optimización de la extracción con líquidos presurizados .....	14
3.3 Determinación de edulcorantes mediante espectrometría de masas.....	17
3.4 Estrategia de limpieza de la matriz .....	18
3.5 Aplicación del método en muestras reales .....	21
4. CONCLUSIONES .....	21
5. BIBLIOGRAFÍA .....	23

## ***Agradecimientos***

*Querría darle las gracias al grupo CROMA por haberme brindado la oportunidad de formar parte de su grupo y haberme acogido como una más. En especial, quería agradecerlo a Mireia por ayudarme en todo momento y tener mucha paciencia conmigo. También, me gustaría agradecerle a José Juan toda su ayuda recibida en todo momento. A David por aguantarme y apoyarme en todo momento. Y por último, a mis padres y iaia Montse por todo el apoyo que me han dado y porque sin ellos, esto no habría sido posible.*

## 1. INTRODUCCIÓN

La contaminación ambiental y en particular, la contaminación marina costera son la introducción directa o indirecta por parte del hombre, de sustancias en el ecosistema que tiene como resultado el deterioro de los recursos vivos. Estas sustancias pueden ser nocivas para la salud humana y pueden resultar ser perjudiciales para los organismos. Por lo tanto, la contaminación marina costera es un tema actual de preocupación y de estudio [1]. Estas sustancias (denominadas contaminantes) pueden ser de diversos tipos: naturales o antropogénicas. Entre los contaminantes antropogénicos, un grupo de contaminantes que destaca hoy en día son los contaminantes orgánicos emergentes (COE), los cuáles son sustancias químicas emitidas constantemente al medioambiente y que pueden ser peligrosas para los ecosistemas y el hombre [2].

Los COE son un grupo muy amplio: fármacos, drogas de abuso, hormonas, compuestos perfluorados, retardantes de llama, nanopartículas, aditivos industriales, productos de higiene personal,... y que va en aumento gracias a los estudios que lleva a cabo la comunidad científica. Algunos de ellos están incluidos en la lista de contaminantes prioritarios de la EPA (Agencia de Protección Ambiental) y en la directiva marco de aguas de la Unión Europea (EU) [3, 4], sin embargo, la mayoría de ellos no están regulados debido a la falta de estudios sobre su presencia y toxicidad. Generalmente, estos compuestos se introducen en el medio ambiente a través de las plantas de tratamiento de aguas residuales, las cuáles no están diseñadas para eliminarlos completamente [5]. Por ello, muchos de estos contaminantes acaban siendo emitidos en los ríos y en el mar; motivo de preocupación científica y para las entidades ambientales reguladoras [2].

Un grupo de COE muy utilizado y de gran interés actual para la comunidad científica y en el que se ha centrado este trabajo son los edulcorantes (principalmente artificiales). Éstos, tal como se ha explicado anteriormente, son emitidos al medioambiente [6, 7]. Los edulcorantes pueden dividirse en dos categorías: edulcorantes naturales y edulcorantes artificiales. Los edulcorantes naturales son aquellos obtenidos a partir de frutas, bayas, vegetales y hongos. Algunos ejemplos de éstos son esteviósido, glicirricina, taumatina, brazzeína, entre otros [8]. Los edulcorantes artificiales no pueden ser metabolizados por el cuerpo humano, en consecuencia, éstos proporcionan muy pocas calorías -por ello reciben también el nombre de edulcorantes no nutritivos. En la década de 1950, se introdujo la primera generación de edulcorantes artificiales que fueron sacarina, ciclamato y aspartamo. Más tarde, se sintetizaron los denominados “nueva generación” que fueron acesulfamo, sucralosa, alitamo y neotamo [9].

Debido a las bajas calorías inherentes de éstos, los edulcorantes están sufriendo un aumento significativo de su uso como resultado de la conciencia pública sobre la diabetes y sus necesidades, además de que están aumentando los consumidores preocupados por padecer obesidad, hipertensión y caries dental. En consecuencia, los edulcorantes artificiales se han vuelto omnipresentes en muchos alimentos [10, 11]. Se utilizan en todo el mundo como sustitutos del azúcar en la industria de los alimentos (bebidas, industrias de confitería, industria de alimentación animal), industria del tabaco, productos farmacéuticos y sanitarios, tales como enjuagues bucales entre otros [11-13]. Para controlar el consumo de estos edulcorantes existe una legislación de las cantidades recomendadas en alimentos donde se indican los edulcorantes sintéticos autorizados, ya que estudios preliminares han demostrado que pueden llegar a ser perjudiciales para la salud [14]. En 2005, la universidad de Texas realizó un estudio sobre el uso de las bebidas de dieta (contienen edulcorantes) y concluyó que aquellos que consumían refrescos de dieta eran más propensos a ganar peso que aquellos que consumían refrescos endulzados naturalmente [15].

En la UE, los edulcorantes autorizados como aditivos en alimentos son acesulfamo, aspartamo, ciclamato, neotamo, NHDC, sacarina, ácido glicirricínico, sucralosa y esteviósido [14, 16]. No obstante, no existe ningún tipo de legislación de los edulcorantes referente al medio ambiente. En la Tabla 1, se presentan las principales características de los edulcorantes seleccionados para el presente estudio.

Los edulcorantes artificiales han recibido mucha atención por la comunidad científica en los últimos años debido a su amplia presencia en el medio acuático, elevada persistencia y baja biodegradabilidad [9]. La excreción de los edulcorantes como consecuencia del consumo humano es, sin duda, una de las principales fuentes de su presencia en el medio ambiente, pero no es la única. En la UE, la sacarina está autorizada para su uso como aditivo en la alimentación animal para cochinitos, cerdos, bovinos y terneros [17]. Los vertidos procedentes de la industria, hogares, cría de animales colman de edulcorantes las plantas de tratamiento de aguas residuales que no son capaces de eliminar totalmente estos compuestos, por ello, los edulcorantes a través de los efluentes, entran al medio ambiente. De todos los edulcorantes artificiales, los estudios científicos llevados a cabo hasta el momento se han centrado especialmente en sacarina, ciclamato, acesulfamo y sucralosa, debido a dos razones: la primera, por sus altas concentraciones en el medio acuático y terrestre; y la segunda, su limitada eliminación en las aguas residuales [5].

**Tabla 1.** Características principales de los edulcorantes determinados [5, 18].

Nombre	Fórmula molecular	Masa monoisotópica	Estructura
--------	----------------------	-----------------------	------------

Tabla 1. (Continuación)

		(Da)	
<b>Acesulfamo K (ACS-K)</b> <i>Potassium 6-methyl-2,2-dioxo-2H-1,2λ6,3-oxathiazin-4-olate.</i>	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> KNO <sub>4</sub> S	161,986	
<b>Alitame (ALI)</b> <i>L-alpha-Aspartyl-N-(2,2,4,4-tetramethyl-3-thietanyl)-D-alaninamide.</i>	C <sub>14</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S	330,150	
<b>Aspartamo (ASP)</b> <i>N-(L-alpha-Aspartil)-L-fenilalanina, 1-metil ester.</i>	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	293,115	
<b>Ciclamato (CYC)</b> <i>Sodium N-cyclohexylsulfamate.</i>	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>3</sub> S	178,054	
<b>Ácido Glicirricínico (GLY)</b> <i>(3β,18α)-30-hydroxy-11,30-dioxoolean-12-en-3-yl 2-O-β-D-glucopyranuronosyl-β-D-glucopyranosiduronic acid.</i>	C <sub>42</sub> H <sub>65</sub> NO <sub>16</sub>	821,398	
<b>Neotame (NEO)</b> <i>(3S)-3-(3,3-Dimethylbutylamino)-4-[[[(2S)-1-methoxy-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl]amino]-4-oxobutanoic acid.</i>	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	377,209	
<b>Neoesperidina dihidrocalcona (NHDC)</b> <i>1-[4-[[[(2S,3R,4S,5S,6R)-4,5-Dihydroxy-6-(hydroxymethyl)-3-[[[(2S,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-methyl-2-tetrahydropyranyl]oxy]-2-tetrahydropyranyl]oxy]-2,6-dihydroxyphenyl]-3-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)propan-1-one.</i>	C <sub>28</sub> H <sub>36</sub> O <sub>15</sub>	611,199	
<b>Sacarina sódica (SAC)</b> <i>2H-1λ6,2-benzothiazol-1,1,3-trione.</i>	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> NNaO <sub>3</sub> S	181,991	
<b>Sucralosa (SCL)</b> <i>1,6-Dichloro-1,6-dideoxy-β-D-fructofuranosyl-4-chloro-4-deoxy-α-D-galactopyranoside.</i>	C <sub>12</sub> H <sub>19</sub> Cl <sub>3</sub> O <sub>8</sub>	395,008	
<b>Esteviósido (STV)</b> <i>13-[(2-O-beta-D-Glucopyranosyl-alpha-D-glucopyranosyl)oxy]kaur-16-en-18-oic acid beta-D-glucopyranosyl ester.</i>	C <sub>38</sub> H <sub>60</sub> O <sub>18</sub>	849,378	

Existen estudios acerca de la determinación de edulcorantes en lodos, aguas residuales, aguas subterráneas y ríos. Un estudio realizado en Alemania detectó sucralosa, acesulfamo, sacarina y ciclamato en las aguas residuales de plantas de tratamiento [11]. Las concentraciones en las aguas residuales de entrada a una planta de tratamiento oscilaban entre 34 y 50  $\mu\text{g/L}$  en el caso de acesulfamo y sacarina, 190  $\mu\text{g/L}$  para ciclamato y por debajo de 1  $\mu\text{g/L}$  para sucralosa. En las plantas de tratamiento de aguas residuales, acesulfamo se logró eliminar hasta un 41% y sucralosa se eliminó aproximadamente el 20%, mientras que sacarina y ciclamato se eliminaron más del 90%. Además, en este mismo estudio se determinaron cuatro edulcorantes artificiales en las aguas superficiales alemanas; acesulfamo se encontró en concentraciones superiores a 2  $\mu\text{g/L}$ , sacarina y ciclamato se hallaron en concentraciones entre 50 y 150  $\text{ng/L}$ , y por último, sucralosa se determinó de 60 a 80  $\text{ng/L}$  [11]. En Europa, se realizó un estudio sobre la distribución de sucralosa en el medio acuático. Este trabajo se centró en arroyos y ríos procedentes de 27 países. Los ríos de Reino Unido, Bélgica, Francia, Suiza, Italia, España, Países Bajos, Noruega y Suecia mostraron que las concentraciones obtenidas de sucralosa fueron en torno a 1  $\mu\text{g/L}$ . Sin embargo, los datos obtenidos de los ríos de Alemania y Europa Oriental mostraron que las concentraciones de sucralosa fueron inferiores a 100  $\text{ng/L}$  [19]. Por otra parte, se ha realizado un estudio sobre la determinación de sucralosa en aguas oceánicas costeras y abiertas de América del Norte. En este estudio destaca la distribución generalizada de sucralosa en las aguas de Estados Unidos (EE.UU) debido a la importante corriente oceanográfica del Golfo. Este estudio se llevó a cabo en la zona norte y centro de Florida Keys, Cape Fear River, el estuario de Carolina del Norte y se alcanzaron concentraciones de 67, 147, 372, y 392  $\text{ng/L}$ , respectivamente [20].

Aunque recientemente se ha prestado especial atención a los ríos y al mar, existen pocos estudios de los edulcorantes en organismos acuáticos. De hecho, todos los estudios realizados en organismos acuáticos se han centrado exclusivamente en la sucralosa. Se sabe que la ingesta de sucralosa en humanos es segura pero sus efectos en el ecosistema todavía no han sido estudiados en profundidad [5]. Hasta ahora, la sucralosa tiene un bajo potencial de bioacumulación y baja toxicidad en organismos acuáticos, por ello, no parece que afecte a su crecimiento ni reproducción; sin embargo, no hay estudios de los efectos en combinación con otros contaminantes emergentes [21-23]. En 2010, se realizó un estudio sobre los efectos a corto plazo (96 h) de la sucralosa en los ecosistemas del Ártico. Se evaluó la producción de huevos, la tasa de eclosión, la ingesta de alimentos y la mortalidad de dos especies de copépodos árticos: *C. glacialis* y *C. finmarchicus*. Estas especies fueron expuestas a diversas concentraciones de sucralosa (0-50  $\text{mg/L}$ ), simulando las concentraciones que se encontraron en estudios previos. Los resultados obtenidos mostraron que ambas especies prácticamente no se

veían alteradas por la sucralosa, aunque *C. glacialis* se veía un poco más afectada que *C. finmarchicus* [24]. Recientemente, se ha demostrado por primera vez que la exposición de sucralosa puede afectar a la fisiología y al comportamiento locomotor de *D. magna*. Se observó que el movimiento y la velocidad de natación de estos crustáceos se vio alterado debido a la exposición de este compuesto [23]. Así, estos estudios pueden apuntar a posibles efectos adversos de los edulcorantes hacia diferentes especies del ecosistema marino. Además, se espera que aumente la demanda de edulcorantes artificiales en los próximos años, en especial la sucralosa y acesulfamo, debido a esto se puedan observar efectos a largo plazo resultante de la exposición crónica a bajos niveles de estos compuestos [5].

En los estudios para la determinación de bajos niveles de concentración de edulcorantes se emplean diferentes tipos de técnicas de extracción: extracción en fase sólida (SPE) y extracción líquido-líquido para muestras líquidas [11, 17]. Para las muestras sólidas se utiliza la extracción con líquidos presurizados (PLE) [25, 26].

La PLE es conocida también como extracción con disolvente a alta presión (HPSE) o más comúnmente, extracción acelerada con disolventes (ASE). Se trata de una técnica sencilla y proporciona unas recuperaciones cuantitativas en poco tiempo [26]. La PLE funciona a altas temperaturas (normalmente hasta 200°C) y altas presiones (generalmente hasta 200 bar) para extraer más rápido a volúmenes bajos de disolvente orgánico. Una de las muchas ventajas que posee la PLE frente a técnicas tradicionales (por ejemplo, extracción Soxhlet) son el tiempo de extracción, el bajo consumo de disolvente y la filtración adicional del extracto. Sin embargo, una de las principales desventajas/limitaciones de la PLE es la falta de selectividad lo cual provoca que muchos interferentes puedan ser co-extraídos durante el proceso de extracción [25, 27]. Debido a la complejidad de la matriz, en ocasiones, se utilizan diferentes técnicas de *clean-up* (SPE, florisil, silica gel) [11, 17, 19, 28-31]. Generalmente, el análisis de las muestras se realiza mediante la cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas [19, 28, 29, 31].

El objetivo del presente trabajo es el desarrollo y validación de un método analítico que nos permita la determinación simultánea de diez edulcorantes (acesulfamo K, alitame, aspartamo, ciclamato de sodio, ácido glicirricínico, neotame, neoesperidina dihidrocalcona, sacarina sódica, sucralosa y esteviósido) en peces empleando la PLE seguido de SPE como *clean-up* y cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (LC-HRMS). Este objetivo general se divide en:

- Optimizar el método de extracción de los edulcorantes en peces mediante la PLE a través de la modificación de los principales parámetros en el proceso de extracción (disolvente, temperatura y tiempo).

- Estudiar diferentes estrategias para minimizar el efecto matriz y así, conseguir disminuirlo y lograr unos buenos resultados en las recuperaciones y en los límites de detección.
- Validar el método en la determinación de edulcorantes y aplicarlo al análisis de diferentes especies de peces.
- Aplicar los resultados de los análisis para el control de la calidad costera, es decir, gestión de los organismos marinos (en este caso los peces) en la zona costera.

A continuación, se detallará como se prepararon las muestras de pez, y cómo se analizaron, incluyendo la optimización de las diferentes técnicas analíticas. También, se discutirán los resultados obtenidos comparándolos con otros trabajos suscritos en la bibliografía. Seguidamente, se expondrán las conclusiones derivadas del presente trabajo, y por último, se presentará la bibliografía consultada.

## 2. PARTE EXPERIMENTAL

### 2.1 MATERIALES Y MÉTODOS

#### 2.1.1 Reactivos y materiales

Los diez edulcorantes seleccionados para realizar el estudio fueron: acesulfamo K (ACS), alitame (ALI), aspartamo (ASP), ciclamato de sodio (CYC), ácido glicirricínico (GLY), neotame (NEO), neoesperidina dihidrocalcona (NHDC), sacarina sódica (SAC), sucralosa (SCL), esteviósido (STV). Todos ellos fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). Asimismo, todos estos estándares presentan un grado de pureza  $\geq 97\%$  excepto el ácido glicirricínico ( $\geq 70\%$ ). Los compuestos deuterados aspartamo-d<sub>3</sub> y sucralosa-d<sub>6</sub> se adquirieron de LGC Standards (Wesel, Alemania), con un grado de pureza del 98%.

Las soluciones estándares individuales de los edulcorantes se prepararon en metanol (MeOH) a una concentración de 1000 mg/L. Además, se preparó una solución de trabajo que contenía todos los compuestos a 100 mg/L en MeOH. Todas las soluciones se almacenaron a -20°C en frascos de vidrio opaco para su correcta conservación.

Los disolventes acetonitrilo (ACN) y MeOH de grado HPLC fueron suministrados por J.T. Baker (Deventer, Holanda). El ácido clorhídrico (HCl), el hidróxido de amonio (NH<sub>4</sub>OH) y el ácido fórmico (HCOOH) fueron adquiridos en Sigma-Aldrich. Por último, el agua ultrapura se obtuvo utilizando un sistema de purificación de Veolia Water (Sant Cugat del Vallès, España) y el gas nitrógeno se adquirió en Carburos Metálicos (Tarragona, España).

#### 2.1.2 Preparación de la muestra

Las especies elegidas para optimizar y validar el método fue el salmonete (*Mullus surmuletus*) y la carpa (*Cyprinus carpio*). Todos los peces fueron comprados en una pescadería del mercado de Reus (Tarragona, España) y almacenados en nevera a 4°C antes de su uso. De cada individuo, se separaron los músculos dorsales para realizar el estudio, el resto se desechó. Éstos se trituraron con una batidora de mano Taurus robot 300 inox (Lleida, España) para ser homogeneizados y se congelaron. Las muestras congeladas fueron liofilizadas empleando un sistema de liofilización Labconco (Kansas City, MO, EE.UU). Posteriormente, las muestras se pasaron por un mortero para homogeneizar y se tamizaron para conseguir una medida de partícula inferior a 125 µm.

Para la preparación de las muestras adicionadas, los edulcorantes se añadieron a la concentración deseada en 1 g de pez liofilizado. Además, para conseguir una mayor homogeneización, se añadió acetona a la muestra hasta cubrirla. Todo ello, se dejó

durante la noche en una campana extractora para que el disolvente se evaporara completamente.

### 2.1.3 Extracción con líquidos presurizados

Las muestras liofilizadas fueron extraídas con el empleo de un extractor de líquidos presurizados modelo ASE 200 Dionex (Sunnivale, CA, EE.UU).

Para realizar el proceso de extracción se mezcló 1 g de muestra liofilizada con 0.17 g de tierra de diatomeas. En cada celda de 11 mL, se transfirieron unos 0.17 g de tierra de diatomeas, la mezcla que contenía la muestra, otros 0.17 g de tierra de diatomeas, aproximadamente, y se añadió en la parte superior e inferior un filtro de celulosa Ahlstrom (Alpharetta, Georgia, EE.UU). El esquema a seguir para montar una celda se puede observar en la Figura 1.



**Figura 1.** Esquema de una celda montada para su extracción en la PLE.

Las condiciones óptimas para la extracción fueron: MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) como disolvente, tiempo de precalentamiento de 5 min, temperatura de extracción 60°C, presión de extracción 1500 psi, tiempo estático de extracción de 5 min, un ciclo, volumen de descarga 50% y purga de nitrógeno de 360 s. El volumen del extracto final fue 20 mL aproximadamente, el cual se evaporó hasta la mitad (para eliminar el MeOH) bajo una corriente de nitrógeno y se volvió a reconstituir con H<sub>2</sub>O y MeOH en un matraz de 25 mL para obtener una solución final en H<sub>2</sub>O:MeOH (9:1, v/v). Posteriormente, se filtró el extracto con un filtro de membrana de 0.2 µm GHP (Llinars del Vallès, España).

### 2.1.4 Clean-up

Para disminuir el efecto matriz, se utilizó la técnica de SPE como *clean-up*. Se utilizaron cartuchos Oasis HLB (500 mg) Waters (Wexford, Ireland). Los cartuchos Oasis HLB estaban conectados a un colector Teknokroma (Sant Cugat del Vallès, España) utilizando una bomba de vacío. Los cartuchos se acondicionaron con 5 mL de MeOH y 5 mL de H<sub>2</sub>O a pH=3. Seguidamente, se cargó 25 mL de muestra, ajustada a pH=3 con HCOOH, a una velocidad de 10-15 mL/min. Después, se llevó a cabo una etapa de limpieza con 5 mL de una mezcla H<sub>2</sub>O:MeOH (9:1, v/v) y se dejaron secar los cartuchos por completo empleando vacío. Una vez completada esta fase, se eluyeron los analitos del cartucho con 2.5 mL de MeOH y 2.5 mL de una mezcla MeOH:NH<sub>4</sub>OH

(95:5, v/v) y los extractos se evaporaron en el concentrador miVAC Duo (Suffolk, UK) hasta sequedad. Los residuos se volvieron a disolver con H<sub>2</sub>O:MeOH (9:1, v/v) a 10 mL. Los extractos se filtraron con un filtro de membrana de 0.2 µm GHP y posteriormente se analizaron en el LC-HRMS.

### **2.1.5 Análisis mediante cromatografía de líquidos con detector de diodos en fila**

Este equipo se utilizó para optimizar los parámetros de la PLE. La separación cromatográfica de los edulcorantes seleccionados se llevó a cabo utilizando un sistema de LC Agilent serie 1200, Agilent Technologies (Santa Clara, CA, EE.UU), equipado con una bomba binaria, inyector automático, horno de columna y un detector de diodos en fila (DAD). La columna analítica de fase inversa Zorbax Eclipse XDB-C8 (150 mm × 4.6 mm, 5 µm) de Agilent (Madrid, España) se utilizó para la separación. La fase móvil utilizada fue ACN como disolvente A, y agua acidificada con HCl a pH= 2.5 como disolvente B. El gradiente óptimo fue 15% del disolvente A al inicio, incrementándose hasta alcanzar un 45% en el minuto 13; después se llega al 100% de A al minuto 15, manteniéndose hasta el minuto 18. Por último, se vuelve a las condiciones iniciales en 2 minutos. El flujo de fase móvil fue 0.6 mL/min, y el volumen de inyección de 25 µl, con una temperatura de 25°C, eluyendo todos los compuestos antes de 16 minutos. El detector de diodos en fila adquirió a tres longitudes de onda: 210 nm para SAC, ASP, ALI, NHDC, STV, NEO; 230 nm para ACS; y 250 nm para GLY. SCL y CYC no se pudieron detectar con este equipo ya que no se absorben en la región UV- visible.

### **2.1.6 Análisis mediante cromatografía de líquidos- espectrometría de masas de alta resolución**

Este equipo se utilizó para el estudio del efecto matriz, analizar diversas muestras y optimizar el *clean-up*. Se usó un cromatógrafo UHPLC Acela 1240 acoplado a un analizador de masas Orbitrap Exactive, ambos de Thermo Fisher Scientific (Bremen, Alemania). El equipo está compuesto por una bomba cuaternaria (1250 bar) y un automuestrador Acela, con inyector automático refrigerado a 10°C y horno de la columna a 25°C. Como interfase se utilizó una fuente de ionización de electrospray de segunda generación (HESI-II). Las condiciones cromatográficas, que incluyen la columna, gradiente y volumen de inyección, fueron las mismas que en el apartado anterior. La fase móvil utilizada fue ACN y agua acidificada con HCOOH a pH= 2.5.

Para la optimización de los parámetros del Orbitrap se empleó una mezcla de los compuestos en una solución de H<sub>2</sub>O:MeOH (9:1 v/v) por infusión directa mediante bomba de jeringa. Se trabajó en modo negativo y para cada compuesto se monitoreó el

ion precursor  $[M-H]^-$  ó  $[M]^-$ , dependiendo del tipo de edulcorante. Las condiciones fueron optimizadas en modo *full scan* con una alta resolución (50.000 FWHM) en un rango de masas comprendido entre 100 y 1000 m/z. Los parámetros óptimos fueron: *spray voltage*, 3.5 kV; *sheath gas*, 40 AU; *auxiliary gas*, 10 AU; *capillary voltage*, -25 V; *skimmer voltage*, -26 V; *tube lens voltage*, -90 V; la temperatura de *heater* y del capilar fueron 350°C y 300°C, respectivamente. La posición de la *probe* fue vertical (C), horizontal (0) y del micrómetro (0.50).

Los iones de los fragmentos característicos y más abundantes de los analitos fueron seleccionados para la confirmación (Tabla 4 recoge dichos iones). El HCD (*Higher-energy collisional dissociation*) fue optimizado para obtenerlos. Se seleccionaron 4 ventanas. En la primera (0 a 8.01 min) y tercera (12.01 a 14.01 min) ventana se trabajó en el modo *full scan* a una resolución de 50.000 FWHM con un tiempo de inyección de 250 ms y un intervalo de masas de 100 a 1000 m/z; y un scan de fragmentación a resolución 10.000 FWHM con un tiempo de inyección de 50 ms y un intervalo de masas de 60 a 1000 m/z, y con una energía de colisión en el HCD de 20 eV. La segunda (8.01 a 12.01 min) y cuarta (14.01 a 18 min) ventana utilizó los mismos eventos de *scan* y una energía en el HCD de 40 eV.

El analizador de masas fue calibrado semanalmente con solución calibrante Pierce® LQT ESI NEG ION, empleando un flujo de 7µL/min.

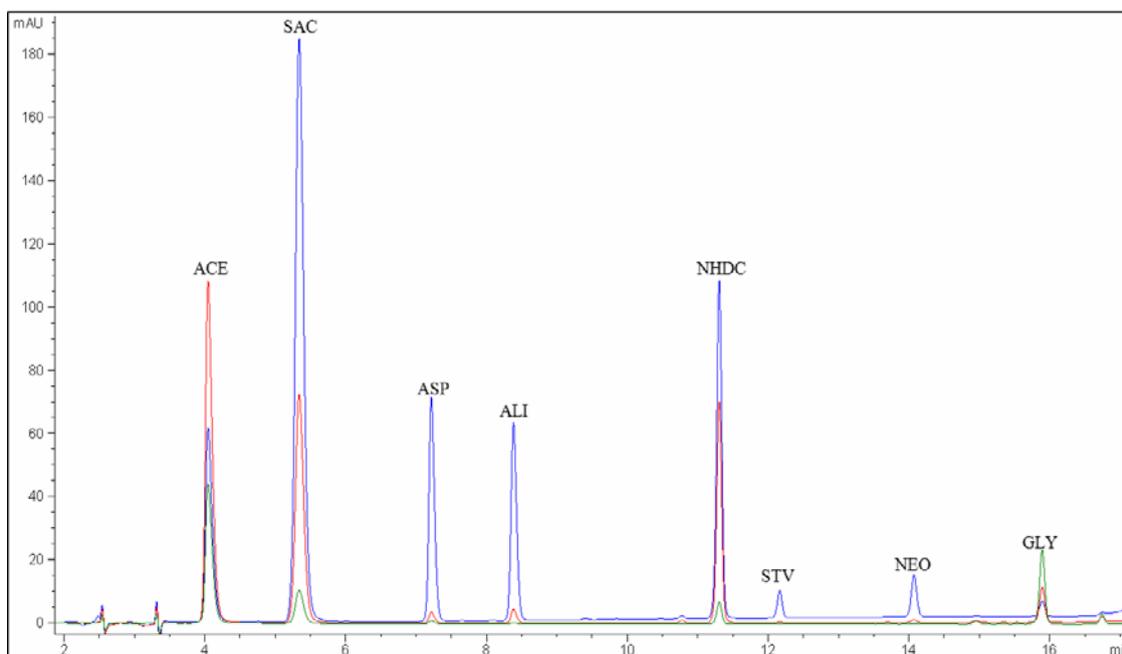
### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 Optimización de la separación cromatográfica

La optimización de la separación cromatográfica de los edulcorantes (ACS, SAC, ASP, ALI, NHDC, STV, NEO y GLY) se llevó a cabo mediante un LC-DAD para facilitar el análisis. SCL y CYC no se incluyeron ya que dichos compuestos no absorben en la región UV-visible. Para la optimización de la separación cromatográfica se utilizó una solución patrón de 10 mg/L de una mezcla de todos los compuestos en H<sub>2</sub>O:MeOH (9:1 v/v). Para dicha optimización se probaron dos columnas: Acentis Express RP amide (100 X 2.1 mm, 2.7 μm) y Zorbax Eclipse XDB-C8 (150 X 4.6 mm, 5 μm) y de éstas se escogió la Zorbax Eclipse XDB-C8, que proporcionaba una mejor separación de los compuestos. Además, se probaron diversos gradientes para conseguir una buena separación de los compuestos, entre todos ellos se seleccionó el gradiente suscrito en el apartado 2.1.5. Bajo condiciones seleccionadas se previó que no se produciría solapamiento al incluir SCL y CYC cuando se trabajara con el equipo basado en un detector MS, según la bibliografía consultada [28]. Como se observa en la Figura 2, todos los edulcorantes se separaron en 16 minutos y se previó que SCL eluiría entre ASP y ALI; y CYC entre SAC y ASP.

Las máximas absorbancias de los edulcorantes se presentaban a diferentes longitudes de onda, siendo: 210 nm para SAC, ASP ALI, NHDC, STV y NEO; 230 nm para ACS y 250 nm para GLY. La longitud de onda se seleccionó a partir de su espectro adquirido para cada compuesto; además, se corroboró cada longitud escogida con la suscrita en la bibliografía.

Una vez optimizada la separación cromatográfica, se determinó el intervalo de linealidad instrumental para cada compuesto. Todos los edulcorantes seleccionados mostraron buena linealidad ( $R^2 > 0.9992$ ) en el intervalo de 0.5 mg/L hasta 20 mg/L.



**Figura 2.** Separación cromatográfica de los ocho edulcorantes mediante LC-DAD a una longitud de onda de 210 nm (azul), 230 nm (roja) y 250 nm (verde).

### 3.2 Optimización de la extracción con líquidos presurizados

Los parámetros que fueron optimizados en la PLE son los siguientes: disolvente de extracción, temperatura de extracción, tiempo estático y volumen de descarga. Éstos fueron optimizados ya que la variación de cualquiera de ellos afecta significativamente a los resultados obtenidos. En cuanto al resto de los parámetros tales como: presión, tiempo de precalentamiento y purga de nitrógeno no se optimizaron porque es bien conocido que sus variaciones no influyen significativamente en la extracción [26]. Para la optimización, la muestra de pez fue enriquecida con 250 mg/Kg (p.s, peso seco) de cada compuesto. Esta concentración se seleccionó ya que la concentración al final de la extracción (10 mg/L) era apropiada para su cuantificación instrumental, que como ya se ha mencionado se hizo en LC-DAD. Las condiciones iniciales fueron escogidas de acuerdo a la experiencia previa del grupo de investigación [32]: 1500 psi de presión, temperatura 80°C, tiempo de precalentamiento de 5 min, tiempo estático de 10 min, 100% de volumen de descarga, 360 segundos purga de nitrógeno, el tamaño de la celda de 11 mL, 1 ciclo y 1 g de muestra. En la optimización de la PLE, se analizaron varias muestras sin enriquecer (denominadas blanco) para comprobar la presencia de estos compuestos en la muestra. En todos los blancos realizados no se observó la presencia de nuestros compuestos.

El primer parámetro optimizado fue el disolvente de extracción. Los disolventes seleccionados fueron agua ajustada con HCl a pH=2,5, agua ajustada a pH=5 con HCl, MeOH, ACN y una mezcla de H<sub>2</sub>O:MeOH (1:1, v/v). Los extractos (≈30 mL) de MeOH

y ACN se evaporaron a sequedad bajo una corriente de nitrógeno y se reconstituyeron en 25 mL de H<sub>2</sub>O:MeOH (9:1, v/v), para evitar la distorsión de los picos en LC-DAD. El extracto de la mezcla H<sub>2</sub>O:MeOH (1:1, v/v) se evaporó a la mitad (eliminar el MeOH) bajo una corriente de nitrógeno y se reconstituyó también en 25 mL, H<sub>2</sub>O:MeOH (9:1 v/v). Los extractos de H<sub>2</sub>O ajustada a pH=5 y H<sub>2</sub>O ajustada a pH=2,5 se llevaron a un volumen de 25 mL de H<sub>2</sub>O:MeOH (9:1, v/v). En la Tabla 2, se muestran las recuperaciones de todos los compuestos; excepto para ALI que no se disponía de su patrón en el momento de optimizar este parámetro, y SCL y CYC que no presentaban señal en el UV-visible. Se realizaron varias repeticiones (n=3) de todos los disolventes para comprobar que los resultados obtenidos eran reproducibles y como se observa en la Tabla 2, los mejores disolventes para la extracción fueron: MeOH y H<sub>2</sub>O:MeOH (1:1, v/v) ya que se obtuvieron mejores recuperaciones para la mayoría de los compuestos. De estos dos disolventes, se eligió H<sub>2</sub>O:MeOH (1:1 v/v) ya que, en general, obteníamos recuperaciones más altas que con MeOH, en particular GLY aumenta significativamente aunque para el caso de NHDC y NEO las recuperaciones seguían siendo bajas.

**Tabla 2.** Recuperaciones obtenidas utilizando distintos disolventes de extracción.

	ACN	MeOH	Agua pH=5	Agua pH=2,5	Agua:MeOH (1:1 v/v)
<b>ACS</b>	66	94	100	96	91
<b>SAC</b>	52	95	100	93	92
<b>CYC</b>	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
<b>ASP</b>	14	50	59	45	65
<b>SCL</b>	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
<b>ALI</b>	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
<b>NHDC</b>	0	12	0	0	15
<b>STV</b>	0	128	110	81	144
<b>NEO</b>	54	75	0	0	20
<b>GLY</b>	0	33	102	90	92

n.d= no determinado

%RSD $\leq$  11 (n=3)

Como se mencionó anteriormente, el extracto de PLE (aproximadamente 30 mL) se evaporó hasta la mitad (para eliminar el MeOH) y se reconstituyó en 25 mL con H<sub>2</sub>O:MeOH (9:1 v/v). La pérdida por evaporación mediante corriente de nitrógeno se evaluó de la siguiente forma: se preparó una mezcla de todos los compuestos a 10 mg/L, se disolvió en una solución de H<sub>2</sub>O:MeOH (1:1 v/v), posteriormente se evaporó bajo una corriente de nitrógeno y se reconstituyó con H<sub>2</sub>O:MeOH (9:1 v/v). Los resultados se compararon con la señal de cada compuesto a 10 mg/L disuelto en H<sub>2</sub>O:MeOH (9:1 v/v), sin ser sometidos a evaporación. No se observó pérdida por evaporación para ningún compuesto.

En estudios previos se han descrito que algunos de los edulcorantes quedaban retenidos en el filtro cuando el extracto era filtrado previo al LC-DAD [28]. Por ello, se probaron diversos tipos de filtros: FILTER-LAB PTFE 0.45  $\mu\text{m}$ , FILTER-LAB Nylon 0.22  $\mu\text{m}$ , FILTER-LAB NY 0.22  $\mu\text{m}$  y GHP Acrodisc 0.2  $\mu\text{m}$ . El filtro que dio mejores resultados fue GHP Acrodisc ya que en el resto de los filtros quedaban retenidos algunos edulcorantes (NHDC, STV y GLY). Por tanto, este es el filtro que se usó en todas las pruebas descritas.

El segundo parámetro optimizado fue la temperatura de extracción. Las temperaturas escogidas fueron 40°C, 60°C y 80°C, siendo el resto de las condiciones las mismas que las iniciales pero usando H<sub>2</sub>O:MeOH (1:1 v/v) como disolvente de extracción. Se incluyó ALI puesto que ya se disponía del patrón. Se observó que a medida que iba aumentando la temperatura surgía una interferencia con un edulcorante (NEO), lo que provocaba que su cuantificación no fuese correcta y por tanto obtuviéramos una baja recuperación. Como se observa en la Tabla 3, para la mayoría de edulcorantes las recuperaciones eran similares en las temperaturas estudiadas, a excepción de GLY el cual se pasaba a extraer cuantitativamente a partir de 60°C. Teniendo en cuenta las recuperaciones y la interferencia observada, se determinó que la mejor temperatura de extracción era 60°C.

**Tabla 3.** Recuperaciones obtenidas utilizando distintas temperaturas de extracción.

	40°C	60°C	80°C
<b>ACS</b>	99	94	96
<b>SAC</b>	105	99	97
<b>CYC</b>	n.d	n.d	n.d
<b>ASP</b>	96	86	79
<b>SCL</b>	n.d	n.d	n.d
<b>ALI</b>	96	91	91
<b>NHDC</b>	45	39	20
<b>STV</b>	123	129	126
<b>NEO</b>	95	86	26
<b>GLY</b>	74	100	120

n.d= no determinado

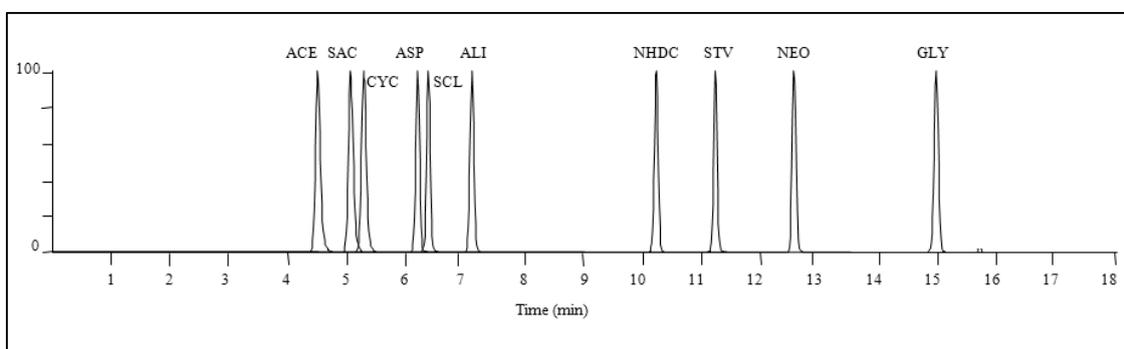
%RSD $\leq$ 10 (n=3)

En cuanto al tercer parámetro, se optimizó el tiempo estático y se probaron tres tiempos: 5 min, 10 min y 20 min. Las recuperaciones obtenidas fueron muy similares (no se muestran) entre ellas, con lo que, se seleccionó como mejor tiempo estático de extracción 5 min para acortar el tiempo de análisis.

El volumen de descarga, que afecta al volumen final del extracto, fue el último parámetro que se optimizó. Se probaron tres volúmenes: 50%, 75% y 100%. Las recuperaciones de los diferentes compuestos fueron semejantes (no se muestran) y por ello, se decidió que el mejor volumen de descarga era 50% porque se obtenía el menor volumen de extracto, 20 mL aproximadamente, y se conseguía acortar el tiempo de evaporación, y por tanto el de análisis.

### 3.3 Determinación de edulcorantes mediante espectrometría de masas

Los parámetros del LC-HRMS fueron optimizados para los edulcorantes mediante infusión directa. Los compuestos se inyectaron individualmente a una concentración de 1 mg/L y una mezcla de todos ellos en una solución de 1 mg/L preparadas en H<sub>2</sub>O:MeOH (9:1 v/v). Se incluyeron SCL y CYC puesto que sí dan respuesta en un espectrómetro de masas. Con todos los analitos se obtuvieron iones HESI-II en modo negativo. En cuanto a los parámetros de la fuente de ionización se eligieron a partir de estudios previos del grupo de investigación [33], los cuales también se comprobaron que fuesen los óptimos. Una vez obtuvimos el ión precursor, se optimizó la energía (denominada energía de colisión) para fragmentar los iones precursores, así, se podrá identificar y confirmar cada analito. La energía de colisión fue 20 eV para: ACS, SAC, CYC, ASP, SCL, ALI y NEO y 40 eV para NHDC, STV y GLY. Estas energías proporcionaban en cada caso fragmentos característicos de máxima respuesta. La Tabla 4 recoge toda la información referente a los iones precursores e iones fragmento. En la Figura 3, se muestra la separación de los diez compuestos seleccionados en menos de 17 minutos. Los tiempos de retención de estos compuestos son ligeramente diferentes debido al cambio de equipo. También puede observarse que la separación de SCL y CYC es buena, tal y como se esperaba según la bibliografía.



**Figura 3.** Separación cromatográfica mediante LC-HRMS.

Una vez optimizados los parámetros del HRMS, se determinó el límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) instrumentales para cada compuesto, los cuales

se muestran en la Tabla 5. Todos los edulcorantes seleccionados mostraron buena linealidad ( $R^2 > 0.9989$ ) en el intervalo de 0.25  $\mu\text{g/L}$  a 500  $\mu\text{g/L}$  para ACS; de 2.5  $\mu\text{g/L}$  a 500  $\mu\text{g/L}$  para SAC, CYC y NHDC; de 10  $\mu\text{g/L}$  a 500  $\mu\text{g/L}$  para ASP, SCL y ALI y por último, de 5  $\mu\text{g/L}$  a 500  $\mu\text{g/L}$  para STV, NEO y GLY.

**Tabla 4.** Resultados obtenidos de iones precursores e iones productos y su masa exacta

Analito	Fórmula	Ión Precursor teórico (m/z)	Ión Precursor experimental (m/z)	Ión fragmento experimental (m/z)	Energía de colisión (eV)
ACS	C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>4</sub> S	161,987	161,986	82,028	20
SAC	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>3</sub> S	181,992	181,991	105,960	20
CYC	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>3</sub> S	178,054	178,054	79,956	20
ASP	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	293,114	293,115	200,071	20
SCL	C <sub>12</sub> H <sub>19</sub> Cl <sub>3</sub> O <sub>8</sub>	395,007	395,008	397,005	20
ALI	C <sub>14</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S	330,149	330,150	312,140	20
NHDC	C <sub>28</sub> H <sub>36</sub> O <sub>15</sub>	611,198	611,199	303,088	40
STV	C <sub>38</sub> H <sub>60</sub> O <sub>18</sub>	849,377	849,378	641,319	40
NEO	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	377,208	377,209	200,072	20
GLY	C <sub>42</sub> H <sub>63</sub> O <sub>16</sub>	821,396	821,398	351,058	40

**Tabla 5.** Límites de detección (LODs) y cuantificación (LOQs) para cada compuesto.

	LODs ( $\mu\text{g/L}$ )	LOQs ( $\mu\text{g/L}$ )
ACS	0,025	0,25
SAC	1	2,5
CYC	1	2,5
ASP	0,25	10
SCL	0,25	10
ALI	0,1	10
NHDC	0,1	2,5
STV	0,1	5
NEO	1	5
GLY	2,5	5

### 3.4 Estrategia de limpieza de la matriz

Es bien conocido que la matriz influye la eficacia de ionización de los analitos principalmente cuando en un sistema LC-MS se utiliza interfase ESI. Este fenómeno se conoce como efecto matriz y dado que puede ocasionar tanto un aumento como una disminución de la señal, puede provocar una sobreestimación o subestimación de la

concentración del analito. Dado que los peces son muestras con una alta complejidad, se observó que había efecto matriz, generalmente supresión iónica, y por tanto se provó la SPE como etapa de *clean-up* aplicando un método desarrollado previamente en el grupo de investigación [28], el cual está descrito en la sección 2.1.4. Diversos estudios han probado la SPE como *clean-up* para mejillones [34, 35]. Por ello, se decidió probar como *clean-up* la SPE en las muestras de salmonete y carpa e intentar disminuir el efecto matriz.

Para evaluar la SPE se utilizaron muestras de pez enriquecidas en diferentes etapas del método a una concentración teórica final de 100 µg/L para cada compuesto. Así, se doparon antes de la PLE, antes de la SPE y después de la SPE. Además, se utilizaron muestras de pez sin dopar (denominadas blancos). Todas estas etapas son necesarias para poder calcular el efecto matriz (% ME), la recuperación aparente (% AppRE), la recuperación de la PLE (% PLE) y la recuperación de la SPE (% SPE).

Para evaluar el ME (ecuación 1), el área obtenida de una muestra de pez enriquecida después de realizar la extracción PLE y SPE como *clean-up*, se comparó con un blanco y con un patrón (100 µg/L), inyectado directamente a LC-HRMS. El porcentaje de ME refleja el impacto de los componentes de la matriz en la respuesta analítica para los analitos. Si ME (%)<0, el impacto de la matriz es negativo, esto genera una señal inferior a la medida por analito en una solución patrón (supresión iónica); sin embargo, si ME (%)>0, la intensidad de la señal se ve aumentada; y por último, si ME (%) =0 no hay efecto matriz [36]. La % AppRE (ecuación 2) informa acerca de la recuperación de todo el método (incluye las recuperaciones de la etapa de extracción, *clean-up* y el ME). Se calcula comparando una muestra de pez enriquecida antes del proceso de extracción PLE con un blanco y con un patrón (100 µg/ L) inyectado directamente a LC-HRMS. % PLE (ecuación 3) se calcula comparando una muestra de pez enriquecida inicialmente y otra muestra de pez enriquecida después de realizar la PLE. En cuanto al % SPE (ecuación 4) se calcula comparando una muestra de pez enriquecida antes de realizar la SPE y después de la SPE.

$$\% \text{ ME} = - (100 - ((B-C)/A) \cdot 100) \quad \text{Ecuación 1}$$

$$\% \text{ AppRE} = ((D-C)/ A) \cdot 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

$$\% \text{ RE PLE} = ((D/E) \cdot 100) \quad \text{Ecuación 3}$$

$$\% \text{ RE SPE} = ((E/B) \cdot 100) \quad \text{Ecuación 4}$$

A= área de un patrón

B= área de la muestra de pez enriquecida después de realizar la extracción PLE y SPE

C= blanco de muestra (muestra de pez no enriquecida)

D= área de la muestra de pez enriquecida antes de la extracción PLE

E= área de la muestra de pez enriquecida antes de la SPE

Los resultados obtenidos (Tabla 6) muestran las recuperaciones aparentes y el ME incluyendo o no la etapa de *clean-up* de la SPE. Como puede observarse en la Tabla 6, existe un elevado efecto matriz, en forma de supresión iónica, para la mayoría de los compuestos. Además, los valores RE PLE son mayores al 73%, a excepción del NHDC y GLY; sin embargo, los valores RE SPE son más bajos, ya que la mayoría de los compuestos se pierden, ya sea en la etapa de la carga, en la etapa de limpieza de los cartuchos o bien porque queden retenidos en éstos.

**Tabla 6.** Recuperaciones aparentes y efecto matriz en muestras de salmonete.

	% App RE	%App RE sin SPE	%ME	%ME sin SPE	%RE PLE	%RE SPE
ACS	44	95	6	-4	93	51
SAC	45	54	-28	-34	93	73
CYC	20	44	-39	-8	93	40
ASP	13	14	-79	-50	78	58
SCL	36	47	-37	-9	85	71
ALI	19	30	-55	36	81	66
NHDC	2	1	-91	-71	42	75
STV	3	5	-97	-100	86	11
NEO	26	23	-62	-39	83	84
GLY	9	10	-78	-40	42	59

%RSD= 16 (n=2)

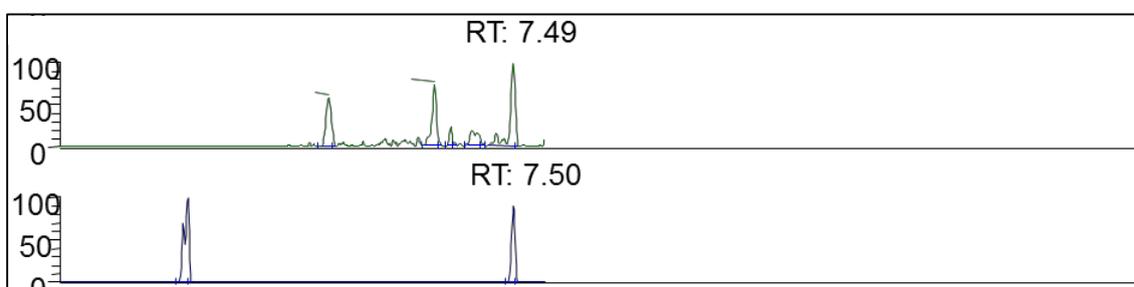
Como la SPE no mejoraba el efecto matriz se probó a utilizar otro tipo de disolvente en la etapa de la elución. Se probó añadir 5 mL 100% MeOH en lugar de 2,5 mL MeOH y 2,5 mL MeOH:NH<sub>4</sub>OH (95:5 v/v). Los resultados obtenidos no mejoraban respecto a la anterior elución y por ello, se decidió seguir utilizando 2,5 mL MeOH y 2,5 mL MeOH:NH<sub>4</sub>OH (95:5 v/v).

Para intentar compensar el efecto matriz se probó de introducir deuterados (aspartamo-d<sub>3</sub> y sucralosa-d<sub>6</sub>). Para cada compuesto se calculó la recuperación relativa con cada uno de los deuterados para saber cuál de los dos funcionaba mejor. Para calcular la recuperación relativa se dopó una muestra de pez previamente a la etapa de extracción por PLE y se interpoló la relación área compuesto/área deuterado con una recta instrumental donde se había graficado área compuesto/área deuterado. Se vio que aspartamo-d<sub>3</sub> sólo funcionaba bien con él mismo, mientras que para sucralosa-d<sub>6</sub> se compensan las pérdidas CYC, SCL, ALI, STV, NEO y GLY, obteniéndose una % APP RE >61% para estos compuestos. Para los compuestos ACS, SAC y NHDC no se

obtenían unas recuperaciones correctas y se decidió que no se aplicarían los deuterados con estos compuestos.

### 3.5 Aplicación del método en muestras reales

En este punto y con el método optimizado hasta el momento (descrito en la sección 2.1) se procedió a aplicar el método en muestras reales. Se analizaron varias especies de pez: salmonete (*Mullus surmuletus*), carpa (*Cyprinus carpio*), merluza (*Merluccius merluccius*) y atún (*Thunnus thynnus*) para buscar la presencia de los compuestos estudiados. Para poder identificar los compuestos en muestras reales se debe realizar todo el método con blancos y analizarlas en LC-HRMS. Una vez tenemos los resultados debemos fijarnos que los tiempos de retención de los compuestos y el ión precursor y fragmentado coincidan entre ellos (Figura 4). En el caso del salmonete, la carpa y la merluza no se hallaron ninguno de los compuestos. Sin embargo, en una de las muestras de atún aparecía el edulcorante ALI. Esta muestra constaba de una repetición, en la cual no se observaba la presencia de estos compuestos. Por ello, no podemos afirmar rotundamente que el atún pudiera contener este edulcorante, se deberían de hacer más repeticiones para afirmar que ALI está presente en el atún.



**Figura 4.** Cromatograma ALI en la muestra de atún (*Thunnus thynnus*).

## 4. CONCLUSIONES

En este estudio se desarrolló un método para la determinación de diez edulcorantes en peces usando la PLE y Oasis HLB 500 mg como *clean-up* seguido del análisis por LC-HRMS. Las principales conclusiones del presente trabajo se enumeran a continuación:

- La separación cromatográfica de los compuestos se llevó a cabo con la columna Zorbax Eclipse XDB-C8 (150 X 4.6 mm, 5µm) mediante LC-DAD y LC-HRMS. Se eligió utilizar LC-DAD para realizar la separación cromatográfica y la optimización de la PLE ya que es un equipo de manejo muy sencillo. Sin embargo, el LC-HRMS es un equipo mucho más selectivo y preciso, por ello, se utilizó para calcular el efecto matriz y la recuperación aparente de cada compuesto.
- Se observó que las recuperaciones de los compuestos variaba en función de los parámetros de la PLE, por lo que se optimizaron los distintos parámetros de la PLE (disolvente, temperatura, tiempo y volumen de descarga) para obtener las recuperaciones más altas posibles.
- Se decidió probar como *clean-up* la SPE ya que durante la extracción de los compuestos se observó que éstos se veían influenciados por interacciones de la matriz.
- Aplicando la SPE como *clean-up* se observó que no había una mejora respecto al método sin esta etapa. Por ello, se decidió probar a añadir los deuterados aspartamo-d<sub>3</sub> y sucralosa-d<sub>6</sub> para intentar compensar el efecto matriz y así mejorar los resultados.
- El método fue aplicado para analizar diversas muestras de distintas especies marinas. De entre todas las especies, en una muestra de atún se hallaron ALI. Sin embargo, esta muestra no es concluyente ya que la repetición de dicha muestra no presentaba los edulcorantes citados anteriormente.

En futuras investigaciones se validará el método y se aplicará en más especies de peces.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] J. Escobar, La contaminación de los ríos y sus efectos en las áreas costeras y el mar, United Nations Publications, 2002.
- [2] L.M. Barceló D, Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes, Jornadas de presentación de resultados: el estado ecológico de las masas de agua. Panel científico-técnico de seguimiento de la política de aguas, Sevilla, (2008).
- [3] USEPA, <http://www.epa.gov/espanol/>. Acceso el 21 de mayo de 2015 a las 12 h.
- [4] European Council Directive 2000/60/CE in: E. Commun. (Ed.) L327, 2000.
- [5] M.G. Kokotou, A.G. Asimakopoulos, N.S. Thomaidis, Artificial sweeteners as emerging pollutants in the environment: analytical methodologies and environmental impact, *Anal. Methods*, 4 (2012) 3057-3070.
- [6] D.B. Mawhinney, R.B. Young, B.J. Vanderford, T. Borch, S.A. Snyder, Artificial sweetener sucralose in U.S. drinking water systems, *Environmental science & technology*, 45 (2011) 8716-8722.
- [7] M. Wu, Y. Qian, J.M. Boyd, S.E. Hrudey, X.C. Le, X.F. Li, Direct large volume injection ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination of artificial sweeteners sucralose and acesulfame in well water, *Journal of chromatography. A*, 1359 (2014) 156-161.
- [8] J.R. Alonso, Edulcorantes naturales, *La Granja*, 12 (2010) 3-12.
- [9] J.-D. Berset, N. Ochsenbein, - Stability considerations of ace in the direct analysis of artificial sweeteners in water samples using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS), *Chemosphere*, 88 (2012) 563-569.
- [10] I. Ferrer, E.M. Thurman, Analysis of sucralose and other sweeteners in water and beverage samples by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry, *Journal of chromatography. A*, 1217 (2010) 4127-4134.
- [11] M. Scheurer, H.J. Brauch, F.T. Lange, 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.
- [12] B. Subedi, S. Lee, H.B. Moon, K. Kannan, Emission of artificial sweeteners, select pharmaceuticals, and personal care products through sewage sludge from wastewater treatment plants in Korea, *Environment international*, 68 (2014) 33-40.
- [13] A. Zygler, A. Wasik, J. Namieśnik, Analytical methodologies for determination of artificial sweeteners in foodstuffs, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 28 (2009) 1082-1102.
- [14] C.-S. Chang, T.S. Yeh, Detection of 10 sweeteners in various foods by liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Journal of Food and Drug Analysis*, 22 (2014) 318-328.

- [15] K.R. Tandel, Sugar substitutes: Health controversy over perceived benefits, *J. Pharmacol. pharmacotherapeutics*, 2 (2011) 236.
- [16] H.-S. Lim, S.-K. Park, I.-S. Kwak, H.-I. Kim, J.-H. Sung, S.-J. Jang, M.-Y. Byun, S.-H. Kim, HPLC-MS/MS analysis of 9 artificial sweeteners in imported foods, *Food Sci. Biotechnol.*, 22 (2013) 233-240.
- [17] I.J. Buerge, M. Keller, H.R. Buser, M.D. Muller, T. Poiger, Saccharin and other artificial sweeteners in soils: estimated inputs from agriculture and households, degradation, and leaching to groundwater, *Environmental science & technology*, 45 (2011) 615-621.
- [18] ChemSpider, [www.chemspider.com](http://www.chemspider.com), Royal Society of Chemistry 2015. Acceso el 10 de mayo de 2015 a las 10:23 h.
- [19] R. Loos, K. Gawlik Bm Fau - Boettcher, G. Boettcher K Fau - Locoro, S. Locoro G Fau - Contini, G. Contini S Fau - Bidoglio, B. G. - Sucralose screening in European surface waters using a solid-phase extraction-liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry method, *Journal of chromatography. A*, 13 (2009) 1126-1131.
- [20] R.N. Mead, J.B. Morgan, G.B. Avery Jr, R.J. Kieber, A.M. Kirk, S.A. Skrabal, J.D. Willey, Occurrence of the artificial sweetener sucralose in coastal and marine waters of the United States, *Mar. Chem.*, 116 (2009) 13-17.
- [21] A. Lillicrap, K. Langford, K.E. Tollefsen, Bioconcentration of the intense sweetener sucralose in a multitrophic battery of aquatic organisms, *Environmental toxicology and chemistry / SETAC*, 30 (2011) 673-681.
- [22] L. Soh, K.A. Connors, B.W. Brooks, J. Zimmerman, Fate of sucralose through environmental and water treatment processes and impact on plant indicator species, *Environ. Sci. Technol.*, 45 (2011) 1363-1369.
- [23] A.-K.E. Wiklund, M. Breitholtz, B.-E. Bengtsson, M. Adolfsson-Erici, Sucralose—An ecotoxicological challenger?, *Chemosphere*, 86 (2012) 50-55.
- [24] M. Hjorth, J.H. Hansen, L. Camus, Short-term effects of sucralose on *Calanus finmarchicus* and *Calanus glacialis* in Disko Bay, Greenland, *Chem. Ecol.*, 26 (2010) 385-393.
- [25] M.S. Díaz-Cruz, M.J.L. de Alda, D. Barceló, Determination of antimicrobials in sludge from infiltration basins at two artificial recharge plants by pressurized liquid extraction–liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Journal of chromatography. A*, 1130 (2006) 72-82.
- [26] A. Nieto, F. Borrull, E. Pocurull, R.M. Marcé, Pressurized liquid extraction: A useful technique to extract pharmaceuticals and personal-care products from sewage sludge, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 29 (2010) 752-764.
- [27] A. Nieto, F. Borrull, R.M. Marce, E. Pocurull, Determination of personal care products in sewage sludge by pressurized liquid extraction and ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of chromatography. A*, 1216 (2009) 5619-5625.

- [28] P. Arbeláez, F. Borrull, E. Pocurull, R.M. Marcé, Determination of high-intensity sweeteners in river water and wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Journal of chromatography. A*, 1393 (2015) 106-114.
- [29] M.G. Kokotou, N.S. Thomaidis, Determination of eight artificial sweeteners in wastewater by hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Methods*, 5 (2013) 3825-3833.
- [30] F. Lange, M. Scheurer, H.-J. Brauch, Artificial sweeteners—a recently recognized class of emerging environmental contaminants: a review, *Anal. Bioanal. Chem.*, 403 (2012) 2503-2518.
- [31] E.Y. Ordonez, R. Rodil, J.B. Quintana, R. Cela, Determination of artificial sweeteners in beverages with green mobile phases and high temperature liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Food chemistry*, 169 (2015) 162-168.
- [32] P. Herrero Gil, Analytical methods for the determination and evaluation of emerging organic contaminants in environmental waters and sludge [Manuscrit] / Pol Herrero Gil ; doctoral thesis supervised by Rosa María Marcé and Eva Pocurull, in: Departament de Química Analítica y Química Orgànica, Tesi doctoral - Universitat Rovira i Virgili. Departament de Química Analítica i Química Orgànica, 2014, 2014.
- [33] D. Salas, F. Borrull, N. Fontanals, R.M. Marce, Hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry to determine artificial sweeteners in environmental waters, *Anal. Bioanal. Chem.*, 407 (2015) 4277-4285.
- [34] S. Chu, C.D. Metcalfe, Analysis of paroxetine, fluoxetine and norfluoxetine in fish tissues using pressurized liquid extraction, mixed mode solid phase extraction cleanup and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of chromatography. A*, 1163 (2007) 112-118.
- [35] K. Wille, J.A. Kiebooms, M. Claessens, K. Rappe, J. Vanden Bussche, H. Noppe, N. Van Praet, E. De Wulf, P. Van Caeter, C.R. Janssen, H.F. De Brabander, L. Vanhaecke, Development of analytical strategies using U-HPLC-MS/MS and LC-ToF-MS for the quantification of micropollutants in marine organisms, *Anal. Bioanal. Chem.*, 400 (2011) 1459-1472.
- [36] J. Smeraglia, S.F. Baldrey, D. Watson, Matrix effects and selectivity issues in LC-MS-MS, *Chromatographia*, 55 (2002) S95-S99.