

**Cuantificación de Aspartame y Acesulfame-k
por Cromatografía Líquida de Alta
Resolución (HPLC)**

Jesson Estefan Morales Tot

Zamorano, Honduras
Diciembre, 2007

ZAMORANO
CARRERA AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

Cuantificación de Aspartame y Acesulfame-k por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero en Agroindustria Alimentaria en el Grado
Académico de Licenciatura.

Presentado por:
Jesson Estefan Morales Tot

Zamorano, Honduras
Diciembre, 2007

El autor concede a Zamorano permiso
para reproducir y distribuir copias de este
trabajo para fines educativos. Para otras personas
físicas o jurídicas se reservan los derechos de autor.

Jesson Estefan Morales Tot

Zamorano, Honduras
Diciembre, 2007

Cuantificación de Aspartame y Acesulfame-k por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

Presentado por:

Jesson Estefan Morales Tot

Aprobado:

Francisco J. Bueso, Ph.D.
Asesor Principal

Luís Fernando Osorio, Ph.D.
Director
Carrera Agroindustria Alimentaria

Julio R. López, M.Sc.
Asesor

Raúl Espinal, Ph.D.
Decano Académico

Kenneth L. Hoadley, D.B.A.
Rector

DEDICATORIA

A Dios, por brindarme la vida, por estar siempre a mí lado y por mantenerme en el buen camino.

A mi familia, quienes me han apoyado y han sido la fuente de mi inspiración.

A mi hermano y amigo Rony Marlon Morales (Q.E.P.D) quien siempre me apoyó en todas las decisiones.

A mis amigos por estar siempre a mi lado, por la lealtad y confianza en todo momento.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme la oportunidad de concluir exitosamente una meta más en mi vida y acompañarme siempre en mi camino.

A mi madre por ser lo que es, por ser mi madre, el mejor regalo que Dios me ha dado.

A mi tía Aurelia quien siempre me ha apoyado, ha luchado a mi lado y me ha inspirado a salir adelante.

A mis hermanos Ezequiel e Isabel quienes me han inspirado para salir adelante. Por ser de mis motivos más grandes de lucha y entrega, por ser mis hermanos.

A mi padre, porque a través de sus consejos y apoyo he logrado alcanzar una meta más. Por estar a mi lado en todos los momentos y en aquellos en los que más lo he necesitado.

A mis asesores el Dr. Francisco Bueso y el Ing. Julio López por su ayuda en la elaboración de este proyecto.

Al personal del laboratorio de análisis de alimentos de Zamorano. Al Ing. Rafael López, Iván e Isabel muy agradecido por su apoyo y colaboración

Al Ing. Víctor Taleón por sus enseñanzas, su paciencia y colaboración en el desarrollo de este proyecto.

A mis profesores de Zamorano por brindarme los conocimientos que me ayudarán a ser mejor académica y profesionalmente, pero más agradecido también por que me enseñaron valores que me harán ser mejor persona.

A mis amigos de Zamorano, a la clase “Centaurus 07” con quienes compartí cuatro años que nunca olvidare. En especial a Edin, Jorge, Axel, Dionisio, Johngesson, José, Lia, Alicia y Marcela.

AGRADECIMIENTO A PATROCINADORES

A la fundación W.K. Kellogg por contribuir financieramente para la realización de mis estudios en Zamorano.

RESUMEN

Morales, J. 2007. Cuantificación de Aspartame y Acesulfame-k por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). Proyecto Especial de Programa de Ingeniería en Agroindustria Alimentaria. Zamorano. Honduras. 52 p.

Los edulcorantes artificiales son aditivos alimenticios que han generado gran controversia debido a los posibles efectos carcinogénicos que algunos autores han reportado. Entre los edulcorantes más populares se encuentran la sacarina, ciclamato, acesulfame-k, y aspartame. El objetivo de este estudio fue desarrollar una curva de calibración para la detección y cuantificación simultánea de aspartame y acesulfame-k, utilizando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Además, se evaluaron cuatro bebidas refrescantes bajas en calorías y dos bebidas carbonatadas bajas en calorías, obtenidas en centros comerciales de Tegucigalpa, para monitorear que los niveles de aspartame y acesulfame-k estuvieran por debajo de los niveles máximos de 600 mg/Kg y 750 mg/Kg respectivamente, establecidos por el comité de expertos en aditivos alimenticios (JECFA, por sus siglas en inglés). La curva de calibración se validó comparando concentraciones conocidas con las reportadas por el HPLC, utilizando una prueba *t-student* donde no se encontró diferencia significativa ($P \leq 0.05$). También se evaluaron pérdidas debido al proceso de extracción de la muestra. Por medio de una prueba *t-student* se comparó la concentración inicial y la concentración reportada por el HPLC, donde no se encontró diferencia significativa ($P \leq 0.05$). Las seis bebidas bajas en calorías evaluadas presentaron en promedio 113.29 mg/Kg de acesulfame-k y 153.35 mg/Kg de aspartame, las cuales estuvieron por debajo del límite máximo permitido. Sin embargo, en dos bebidas de una misma marca se detectó la presencia de acesulfame-k aunque no estaba listado entre los ingredientes. Los resultados indican que la curva de calibración pudo medir niveles de acesulfame-k desde 0 a 1000 mg/Kg y 0 a 600 mg/Kg de aspartame, utilizando una curva de regresión con 0.9999 y 0.9998 como coeficiente de correlación múltiple (R^2) para acesulfame-k y aspartame respectivamente.

Palabras clave: bebidas bajas en calorías, calibración, edulcorantes artificiales.

Francisco J. Bueso, Ph.D.

CONTENIDO

Portadilla.....		i
Autoria.....		ii
Página de firmas		iii
Dedicatoria		iv
Agradecimientos.....		v
Agradecimiento a patrocinadores		vi
Resumen		vii
Contenido		viii
Índice de cuadros.....		x
Índice de figuras		xi
Índice de anexos		xii
1. INTRODUCCIÓN.....		1
1.2 OBJETIVOS.....		2
1.2.1 Objetivo general		2
1.2.2 Objetivos específicos.....		2
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....		3
2.1 ADITIVOS ALIMENTICIOS.....		3
2.2 EDULCORANTES		3
2.2.1 Aspartame (AMP)		5
2.2.2 Acesulfame-k (AK)		6
2.3 CONTROVERSIA SOBRE EL USO DE EDULCORANTES		6
2.4 MÉTODOS PARA CUANTIFICACIÓN DE ASPARTAME Y ACESULFAME-K		8
2.5 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN.....		8
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....		10
3.1 UBICACIÓN.....		10
3.2 MATERIALES		10
3.3 EQUIPO		10
3.4 DISEÑO EXPERIMENTAL.....		11
3.4.1 Calibración del HPLC		11
3.4.2 Monitoreo de bebidas refrescantes bajas en calorías.....		11
3.5 METODOLOGÍA		11
3.6 DETERMINACIÓN DE CONDICIONES		11

3.7	PREPARACIÓN DE ESTÁNDARES	12
3.8	DESARROLLO DE LA CURVA	12
3.9	VALIDACIÓN CON ESTÁNDARES.....	13
3.10	VALIDACIÓN CON BEBIDAS DE CONCENTRACIÓN CONOCIDA	13
3.11	EVALUACIÓN DE BEBIDAS REFRESCANTES BAJAS EN CALORÍAS.	13
3.12	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	13
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	14
4.1.	CURVA DE CALIBRACIÓN DE ACESULFAME-K	14
4.1.1	Validación con estándares de acesulfame-k	15
4.1.2	Validación con bebidas de concentración conocida	16
4.2	CURVA DE CALIBRACION DE ASPARTAME	16
4.2. 1	Validación con estándares de aspartame	17
4.2.2	Validación con bebida de concentración conocida	18
4.3	EVALUACIÓN DE BEBIDAS REFRESCANTES BAJAS EN CALORÍAS.	18
5.	CONCLUSIONES	21
6.	RECOMENDACIONES	22
7.	BIBLIOGRAFIA	23
8.	ANEXOS	26

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Clasificación de edulcorantes y dulzura comparada con sacarosa.	4
2. Métodos para la determinación simultánea de intensificadores de dulzura por HPLC.....	9
3. Precisión de curva de Acesulfame-k	14
4. Validación de curva de calibración de acesulfame-k	15
5. Recuperación de acesulfame-k.....	16
6. Precisión de la curva de calibración de aspartame.	16
7. Validación de curva de calibración de aspartame	17
8. Recuperación de aspartame.	18
9. Concentración promedio de aspartame en bebidas bajas en calorías.	18
10. Concentración promedio de acesulfame-k en bebidas bajas en calorías.....	19

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Estructura de N-L- α -asparti- <i>L</i> -fenilalanina-1-metil ester.	5
2. Estructura de 4,-dihidro-6-metil-1,2,3-oxatiazina-4-uno-2,2-dióxido	6
3. Curva de calibración de acesulfame-k.....	15
4. Curva de calibración de Aspartame.....	17
5. Comportamiento de concentraciones de aspartame encontradas en bebidas bajas en calorías.	19
6. Comportamiento de concentraciones de acesulfame-k encontradas en bebidas bajas en calorías.....	20

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo		Página
1.	Cromatograma de calibración, nivel 1000 mg/Kg ASP y AK.	27
2.	Cromatograma de calibración, nivel 800 mg/Kg ASP y AK.	28
3.	Cromatograma de calibración, nivel 600 mg/Kg ASP y AK.	29
4.	Cromatograma de calibración, nivel 400 mg/Kg ASP y AK.	30
5.	Cromatograma de calibración, nivel 200 mg/Kg ASP y AK.	31
6.	Cromatograma de calibración, nivel 100 mg/Kg ASP y AK.	32
7.	Cromatograma de calibración, nivel 50 mg/Kg ASP y AK.	33
8.	Cromatograma de calibración, nivel 25 mg/Kg AK.....	34
9.	Cromatograma de calibración, nivel 10 mg/Kg ASP y AK.	35
10.	Cromatograma de calibración, nivel 0 mg/Kg ASP y AK.	36
11.	Cromatograma de calibración, nivel 25 mg/Kg ASP.....	37
12.	Cromatograma de validación, nivel 750 mg/Kg ASP y AK.	38
13.	Cromatograma de validación, nivel 500 mg/Kg ASP y AK.	39
14.	Cromatograma de validación, nivel 250 mg/Kg ASP y AK.	40
15.	Cromatograma de validación, nivel 150 mg/Kg ASP y AK.	41
16.	Cromatograma de validación, nivel 75 mg/Kg ASP y AK.	42
17.	Cromatograma de validación, nivel 30 mg/Kg ASP y AK.	43
18.	Prueba <i>T-student</i> validación de curva de ASP y AK.....	44
19.	Cromatograma de recuperación, nivel 500 mg/Kg ASP y AK.	44
20.	Cromatograma de recuperación, nivel 250 mg/Kg ASP y AK.	45
21.	Cromatograma de recuperación, nivel 100 mg/Kg ASP y AK.	46
22.	Análisis estadístico de recuperación de ASP y AK.....	47
23.	Cromatograma bebida marca “V”	47

24.	Cromatograma bebida marca “U”	48
25.	Cromatograma bebida marca “W”	49
26.	Cromatograma bebida marca “Z”	50
27.	Cromatograma bebida marca “Y”	51
28.	Cromatograma bebida marca “X”	52

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad la preocupación de los consumidores respecto a la calidad e inocuidad de los alimentos que diariamente consumen se ha incrementado. Los aditivos alimenticios son usados en gran cantidad de alimentos y han creado gran controversia por los posibles efectos carcinogénicos que algunos pueden causar. Entre ellos los edulcorantes han creado mayor controversia, es por eso, que el uso está limitado por el *Codex Alimentarius* y el consumo diario aceptable determinado por el Comité de Expertos en Aditivos Alimenticios (JECFA, por sus siglas en inglés)

Es necesario realizar análisis cuantitativos para evaluar el cumplimiento del uso de los edulcorantes en los alimentos, verificando que las concentraciones cumplan con las regulaciones establecidas y la presencia de ellos sea reportada en sus ingredientes. Para ello, se han publicado varias técnicas y metodologías. El JECFA ha establecido métodos para la detección y cuantificación de aspartame y acesulfame-k, metodologías que se basan en separación física por cromatografía líquida y cromatografía de gases. Armata *et al.* (2004), indica que la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), es actualmente la técnica más utilizada para la detección simultánea de aspartame y acesulfame-k.

Según Scott (2003), la cromatografía es un proceso de separación, que se logra mediante la distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases, una fase estacionaria y una fase móvil. Dossi *et al.* (2006), publicó una metodología que permite la cuantificación de varios aditivos alimenticios, entre ellos aspartame y acesulfame-k. Tal metodología fue modificada durante el desarrollo de este proyecto, de manera que permita la detección y cuantificación simultánea de aspartame y acesulfame-k utilizando cromatografía líquida de alta resolución.

El objetivo de este proyecto fue implementar un método y validar las curvas de calibración para cuantificar aspartame y acesulfame-k en bebidas refrescantes y bebidas carbonatadas. Además, contribuir con la Escuela Agrícola Panamericana con una herramienta de investigación y generación de ingresos por servicios.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo general

Desarrollar una curva de calibración para la medición de edulcorantes artificiales, en bebidas carbonatadas y bebidas refrescantes bajas en calorías mediante el uso de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

1.2.2 Objetivos específicos

- Desarrollar y validar un método que permita detectar acesulfame-k y aspartame de manera simultánea haciendo uso de cromatografía líquida de alta resolución.
- Analizar bebidas carbonatadas y bebidas refrescantes bajas en calorías del mercado hondureño, para determinar si cumplen con los límites máximos permitidos por el JECFA.
- Generar una herramienta que permita al laboratorio de Análisis de Alimentos de Zamorano (LAAZ) detectar y cuantificar edulcorantes artificiales.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 ADITIVOS ALIMENTICIOS

Cualquier sustancia que no se consume normalmente como alimento por sí misma, ni se usa normalmente como ingrediente típico del alimento, tenga o no valor nutritivo, cuya adición intencional al alimento para un fin tecnológico (inclusive organoléptico) en la fabricación, elaboración, tratamiento, envasado, empaque, transporte o almacenamiento provoque, o pueda esperarse razonablemente que provoque directa o indirectamente, el que ella misma o sus subproductos lleguen a ser un complemento del alimento o afecten sus características. Esta definición no incluye los contaminantes, ni las sustancias añadidas al alimento para mantener o mejorar las cualidades nutricionales (*Codex Alimentarius*, 2006).

Los aditivos alimenticios juegan un rol vital en la industria alimenticia moderna y generalmente, son usados para mantener la calidad y características de los alimentos. (Zhu *et al.*, 2005). Los preservantes son aditivos alimenticios, y entre los comúnmente utilizados están el ácido sórbico y sus sales, ácido benzoico y sus sales. La Vanilina, es un aditivo alimenticio importante que actúa como compuesto saborizante. Otro tipo de aditivo alimenticio son los edulcorantes y los más comunes son: sacarina, aspartame (α -Aspartame) y acesulfame-k, cuyo uso está permitido en 90 países. (Demiralay *et al.*, 2006).

2.2 EDULCORANTES

Son compuestos que brindan sabor dulce a los alimentos, pueden clasificarse en dos categorías: los que dan cuerpo o masivos y los intensificadores de dulzura. (Abreu, 2000). Los intensificadores de dulzura son aquellos que en cantidades diminutas incrementan el sabor dulce de los alimentos. Los edulcorantes que dan cuerpo, son aquellos que su dulzura es menor a la sacarosa y son usados como compuestos que brindan consistencia (Mortensen, 2006). Ejemplos de ambos tipos de edulcorantes pueden observarse en el Cuadro 1.

La dulzura de los edulcorantes intensificadores varía entre 30 y 3000 veces más que la sacarosa. Los edulcorantes que dan cuerpo son usados en la industria alimentaria como agentes intensificadores de sabor, dan cuerpo y presentan efecto preservante, estos son metabolizados en el cuerpo y proveen calorías (Abreu, 2000). Según Mortensen (2006), el aporte calórico de los edulcorantes que dan cuerpo es aproximadamente de 10 kJ/g (2.4 Cal/g) mientras que la sacarosa aporta 17 kJ/g (4 Cal/g).

Los edulcorantes pueden ser naturales o artificiales, pueden no poseer o poseen un insignificante valor nutricional (edulcorantes no nutritivos) en relación con otros edulcorantes (Yebra-Biurrun, 2000). Los edulcorantes artificiales son ampliamente usados en la industria de los alimentos, bebidas, industria confeccionaria y farmacéutica a través del mundo (Chen *et al.*, 1997). Los objetivos principales de usar edulcorantes en alimentos y bebidas son: para el tratamiento de la obesidad, mantenimiento del peso corporal, control de la diabetes y reducción de caries dentales (Yebra-Biurrun, 2000).

Cuadro 1. Clasificación de edulcorantes y dulzura comparada con sacarosa.

Edulcorante	Dulzura relativa
Intensificador de dulzura	
Acesulfame-K	200
Aspartame	180-200
Ciclamato: ácido ciclámico y sus sales de Na y Ca	30
Neospiridina	1900
Sacarina y sus sales de Na, K y Ca.	300-500
Sucralosa	600
Taumatina	2000-3000
Edulcorantes masivos	
Eritol	0,6 – 0.8
Isomalta	0.5
Lactitol	0.5
Malitol y sirope de malitol	1
Manitol	0.7
Sorbitol	0.5- 0.7
Xilitol	1

Fuente: Mortensen, 2006

El uso de los edulcorantes de alta intensidad, también llamados edulcorantes artificiales o edulcorantes bajos en calorías, se ha incrementado en alimentos dietéticos y algunas bebidas. En efecto, el crecimiento del consumo de los edulcorantes artificiales los posiciona como la tercera opción edulcorante de mayor consumo, después del azúcar y sirope de maíz (Buzzanell y Gray, 1993). Las bebidas dietéticas libres de calorías son aquellas que poseen menos de 5 Cal por cantidad de referencia o porción; los alimentos bajos en calorías son aquellos que poseen 40 Cal o menos que la cantidad de referencia y los productos reducidos en calorías son aquellos que su contenido calórico es 25% menos que la cantidad de referencia (FDA/CFSAN, 2004).

Demiralay *et al.* (2006), indica que en los últimos años, la preocupación sobre la presencia de edulcorantes artificiales en los alimentos ha crecido. El uso de aditivos alimenticios en diferentes países está limitado por regulaciones específicas. Sin embargo, el uso en muchos países está regido por las regulaciones del JECFA.

Actualmente en Centroamérica se está generando el reglamento de aditivos alimenticios, la cual es una adaptación de la Norma General de Aditivos Alimentarios norma “CodexStan 192-1995(Rev. 2005) Norma General de Aditivos Alimentarios” donde indican que la concentración máxima de acesulfame-k en zumos (jugos) de hortalizas y bebidas a base de agua aromatizada es de 600 mg/Kg néctares de frutas 350 mg/Kg y los concentrados para zumos de hortalizas 3000 mg/Kg. Las propuesta también indica que la concentración máxima de aspartame en zumos (jugos) de hortalizas es de 2000 mg/Kg, néctares de frutas y bebidas a base de agua aromatizada de 600 mg/Kg y los concentrados para zumos de hortalizas 2000 mg/Kg (UAC, 2007).

2.2.1 Aspartame (AMP)

Aspartame (N-L- alpha-asparti-L-fenilalanina-1-metil ester; Nutrasweet) es usado para reemplazar edulcorantes naturales. Es muy popular debido a que es aproximadamente 200 veces más dulce que la sacarosa y su dulzura depende del tipo de alimento donde se usa, variando en el rango de 170 a 230 veces mayor a la sacarosa (Sales *et al.*, 2003). AMP es encontrado en más de 6,000 productos incluyendo: bebidas carbonatadas, bebidas no alcohólicas en polvo, chocolates, gomas de mascar, caramelos, postres, yogurt, edulcorantes de mesa y algunos productos farmacéuticos, como vitaminas y grajeas sin azúcar para la tos (Soffritti *et al.*, 2006)

La molécula de aspartame está compuesta por dos aminoácidos naturales: fenilalanina y ácido aspártico, los cuales le dan al aspartame características hidrofóbicas e hidrofílicas (Cuppen *et al.*, 2004). El aspartame es susceptible a la degradación bajo un amplio rango de condiciones (calor, humedad y pH). La estabilidad del aspartame fue examinada por Moler en 1984 (Scotter y Castle, 2004) donde demostró que bebidas carbonatadas que contenían aspartame, presentaron dulzura aceptable luego de haber sido almacenadas por 6 meses a 20 °C. Según el JECFA (2006) el límite máximo permitido de aspartame en bebidas carbonatadas y jugos es 750 mg/Kg Puthrasingam *et al.*, (1996) indica que una lata de refresco (280 ml) contiene aproximadamente 200 mg de aspartame y un vaso de yogurt dietético contiene 50 mg.

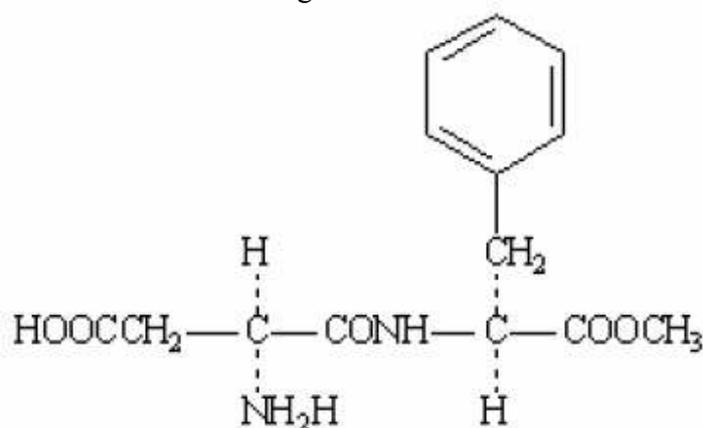


Figura 1. Estructura de N-L- alpha-asparti-L-fenilalanina-1-metil ester.
Fuente: JECFA, 2001

2.2.2 Acesulfame-k (AK)

El acesulfame-k una sal de potasio de 3,4,-dihidro-6-metil-1,2,3-oxatiazina-4-uno-2,2-dióxido. Es un edulcorante no calórico de alta intensidad, actualmente usado en alimentos, bebidas, productos para el higiene oral y productos farmacéuticos en aproximadamente 90 países (Armeta *et al.*, 2004). AK también es usado en cosméticos, edulcorantes de mesa y vitaminas (Chu, 2005).

Acesulfame-k es una sustancia cristalina de color blanco, de aceptable sabor y estabilidad. No aporta calorías en los alimentos debido a que no es metabolizado en el cuerpo humano, es excretado en la orina y es aproximadamente 180 a 200 veces más dulce que la sacarosa (Sandrou y Arvanitoyannis, 2000). No presenta señales de descomposición a temperatura ambiente por varios años. En soluciones acuosas (pH 3.0-3.5 a 20 °C) no se ha observado alguna reducción de su poder edulcorante por períodos de aproximadamente dos años. Según Chu (2005), la estabilidad a altas temperaturas es buena, la esterilización y pasteurización no afecta el sabor de acesulfame-k. Abreu (2000), indica que el acesulfame-k es un polvo higroscópico que se descompone a temperaturas arriba de 225 °C. El límite máximo permitido en jugos y bebidas carbonatadas es 600 mg/Kg (JECFA, 2006) y un consumo diario recomendado de 0-15 mg/Kg de peso corporal (Demiralay, 2006). Dossi *et al.*, (2006) analizaron 6 muestras de bebidas gaseosas detectando concentraciones de 129.4 ± 6.5 mg/Kg (ppm) 3 Gatorades 172.3 ± 8.6 ppm y 6 bebidas dietéticas sabor naranja 236.1 ± 8.5 ppm

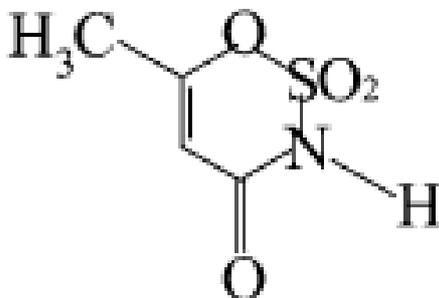


Figura 2. Estructura de 4,-dihidro-6-metil-1,2,3-oxatiazina-4-uno-2,2-dióxido
Fuente: Dossi *et al.*, 2006.

2.3 CONTROVERSIA SOBRE EL USO DE EDULCORANTES

Entre las preocupaciones derivadas por el uso de edulcorantes Mortensen (2006), indica que el aspartame es metabolizado en el cuerpo en sus tres componentes: 50% fenilalanina, 40% ácido aspártico y 10% alcohol metílico, siendo este último agregado en el proceso de manufactura. Blatter (1984), citado por Sales y Cardeal (2003), indica que el metanol es extremadamente tóxico, es fácilmente absorbido después de la ingestión, inhalación o exposición dermal y metabolizado por el hígado a formaldehído.

Además, debido a un grupo pequeño de personas quienes tienen la enfermedad hereditaria fenilquetonuria, los cuales son sensibles a fenilalanina (uno de los metabolitos del aspartame) todos los productos que contengan ASP deben ser debidamente etiquetados (Zhu *et al.* 2005). La fenilquetonuria clásica (PKU) se produce por defecto del gen que codifica la enzima fenilalanina hidroxilasa (FAH) ubicado en el cromosoma 12q22-24.1. se caracteriza por presentar niveles de fenilalanina (FA) en la sangre arriba de 20 mg/dl. Si esta enfermedad no es diagnosticada y tratada precozmente, ocasiona deterioro progresivo en el sistema nervioso central, produciendo retardo mental moderado o profundo (Cornejo *et al.*, 2003)

Soffritti *et al.*, (2006) del Instituto Ramazzini de Italia, estudiaron 7 grupos de ratas que fueron alimentadas administrándoles concentraciones de 0 a 100,000 ppm de aspartame en la dieta. Fueron alimentadas desde la semana 8 de vida hasta que se produjo la muerte natural. Las ratas fallecidas fueron sometidas a una biopsia completa para revisar el estado de sus órganos. Como resultado observaron por primera vez de forma experimental que, el aspartame aumenta la incidencia de tumores malignos, incrementa la aparición de linfomas y leucemias, aumenta la incidencia de carcinomas de pelvis renal y uréteres, y por último, aumenta la incidencia de Schwannomas de nervios periféricos. Por lo tanto, según la fundación Ramazzini APM es un compuesto multcarcinogénico, donde los efectos son evidentes en dosis diaria de 20 mg/Kg de masa corporal, mucho menor que el actual consumo diario aceptable de 40 mg/Kg y 50 mg/Kg de masa corporal para Europa y Estados Unidos respectivamente.

Respecto al estudio del Instituto Ramazzini, la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) publicó en mayo de 2006 que la revisión realizada por la Autoridad Europea en Inocuidad Alimentaria (EFSA, por sus siglas en inglés) indica que las conclusiones realizadas por el instituto no están sustentadas por los datos y no ven la necesidad de futuras revisiones acerca de la seguridad del aspartame o de revisar la ingesta diaria aceptable. Además, la FDA solicitó los datos del estudio para ser evaluados. Sin embargo, el 28 de febrero de 2006 la agencia recibió una porción de los datos, la FDA actualmente se encuentra revisando detalladamente los resultados y anunciarán las conclusiones respecto a ellos cuando hayan finalizado (Herndon, 2006).

En abril de 2006, fue presentado en Washington DC, un nuevo estudio epidemiológico realizado por el Instituto Nacional de Cáncer, donde fueron evaluados 500,000 hombres y mujeres con edades comprendidas entre 50 y 69 años, durante un periodo de 5 años (1999-2000). Evaluaron el consumo de bebidas con aspartame y la incidencia de tumores cerebrales y cáncer hematopoyético. Los investigadores concluyeron que, en comparación con las personas que no habían consumido aspartame, no había aumentado el riesgo de contraer leucemia, linfomas o tumores cerebrales. (Lindanbaum, 2007)

2.4 MÉTODOS PARA CUANTIFICACIÓN DE ASPARTAME Y ACESULFAME-K

Existen varias metodologías publicadas en diferentes revistas científicas para la cuantificación de aspartame y acesulfame-k. Sin embargo, no se encontró método oficial publicado por Asociación Oficial de Analistas Químicos (AOAC, por sus siglas en inglés)

El JECFA (2001) estableció las siguientes condiciones para la medición de acesulfame-k utilizando cromatografía líquida de alta resolución: columna C18 de sílica gel, de 25cmx4.6mm, 3-5 μ m; elusión isocrática, fase móvil de acetonitrilo/0.01mol/l tetrabutilamonio sulfato hidrogenado (TBAHS) en agua; 40/60 v/v, flujo de 1 ml/min; detección UV o arreglo de diodos a 227 nm.

Para la cuantificación de aspartame según el JECFA (2001), se debe medir con un adecuado equipo de cromatografía de gases, con detector de flama ionizada de hidrógeno y diseñada para manipular columnas de vidrio con columnas de inyección (micro-Tex 220 o equivalente) conteniendo una columna de vidrio de 1.83 m x 4 mm (d.i.) cubierta con 3% OV-1 en 80/100 tamaño de agujero Supercoport (Supelco, Inc. o equivalente). Los parámetros de operación pueden variar, dependiendo en particular del instrumento a usar. Un adecuado cromatograma puede ser obtenido usando las siguientes condiciones de flujo: temperatura de columna 200°C, temperatura de entrada 200°C, temperatura del detector 275°C, helio como gas acarreador a 75 ml/ min. Flujo de hidrógeno y aire a la hornilla para mayor sensibilidad.

Según Dossi *et al.* (2006), los métodos más prometedores para la detección de aditivos son aquellos que se basan en procedimientos de separación, entre ellos están la electroforesis capilar (CE, por sus siglas en inglés) y la cromatografía líquida de alta resolución. Armata *et al.* (2004), indica que cromatografía líquida de alta resolución es el método más usado hoy en día para detectar aspartame y acesulfame-k, basándose en un flujo isocrático con fase reversa, separación cromatográfica y detección por absorbancia ultravioleta. El Cuadro 2 presenta diferentes condiciones utilizadas para la detección simultánea de diversos aditivos alimenticios como: acesulfame-k, aspartame y los productos de su degradación, sacarina, ciclamato, dulcina y alitamina.

2.5 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN

Cromatografía es un proceso de separación que se logra mediante la distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases, una fase estacionaria y una fase móvil (Scott, 2003). Los procesos cromatográficos tienen lugar como resultado de repetidas adsorciones y desorciones, estas ocurren durante el movimiento de los componentes de la muestra a lo largo del lecho estacionario, alcanzándose la separación, gracias a las diferencias en los coeficientes de distribución de los distintos componentes en la muestra (Yost *et al.*, 1980)

Cuadro 2. Métodos para la determinación simultánea de intensificadores de dulzura por HPLC

Edulcorante	Columna	Fase móvil	Detección
AK, ASP y SAC	Superspher RP-select B 4µm	20 mM búfer de fosfato:Acetonitrilo (9:1 v/v)	UV
AK, ASP y SAC	Nucleosil 100-5 C18	7-20% acetonitrilo en búfer de fosfato, pH 4.8-6.7	Arreglo de diodos
AK, ASP y SAC	Finepak C18S	metanol:agua (2:8 v/v), pH 4, 0.1 M hidróxido de tetra- <i>n</i> -propilamonio.	UV-210 nm
AK, ASP y SAC	ODS Hypersil RP-18, 5µm, 100x4.6mm	17-40% metanol en 5 mM Sulfato Hidrogenado de Tetrabutilamonio.	UV-210 nm
AK, ASP y SAC	Dionex AS4A columna de separación de aniones	Na ₂ CO ₃ (140 mg/ml)	Conductividad
AK, Dulcina, SAC	Columna C18	Acetonitrilo:50 mM ácido α-hidroxisobúrico (2.2:3.4 v/v) con 2.5 mM bromuro de hexadeciltrimetil-amonio	UV-233 nm
AK, ASP, CYC y SAC	LiChrosorb C18	0-20% acetonitrilo en H ₃ PO ₄ pH 2.34 con pentasulfonato (2g/L)	UV-254 nm
AK, ASP, Dulcina y SAC	µBondpak C18,10 µm, 300x3.9 mm	Metanol:ácido acético:agua (20:5:75, v/v)	UV-254 nm
AK, ASP, Dulcina y SAC	µBondpak C18 10 µm, 300x3.9 mm	Metanol:85% ácido fosfórico, pH 6 con 34 mM de hidróxido de tetrametilamonio (2:8 v/v)	UV-210 nm
ASP, CYC, Dulcina y SAC	Hypersil MOS RP8 3 µm, 100x4mm	5 mM tetrabutilamonio p-toluenosulfonato con 10 mM de glicina, pH 3.5:metanol (88;12 v/v)	fonometría indirecta, 267 nm
AK, Alitamina, ASP, Dulcina y SAC	µBondpak C18, 10 µm, 300x3.9 mm	Búfer de 12.5 Mm K ₂ PO ₄ pH 3.5:acetonitrilo (9.1 v/v)	UV-220
AK, Alitamina, AK y los Productos de su degradación, CYC, Dulcina, SAC y Sacarosa	Supelcosil LC-18 5 µm, 150x4.6mm	20mM KH ₂ PO ₄ :Acetonitrilo en gradiente 97:3 (pH 5) a 80:20 (pH 3.5), 1 ml/min, post-columna de derivatización con violeta de metilo 2B	UV-200 o 210 nm, Sucralosa: RI, Ciclamato; 585 nm

AK=Acesulfame-k, ASP=Aspartame, SAC=Sacarina, CYC= ciclamato

Fuente: Abreu, 2000

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 UBICACIÓN

El estudio fue realizado en el Laboratorio de Análisis de Alimentos (LAAZ) de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, ubicado en el Valle del Yeguaré, a 32 km. de Tegucigalpa, departamento Francisco Morazán, Honduras, C.A.

3.2 MATERIALES

- Estándar de acesulfame-K, Lote: LB24615, Supelco.
- Estándar de aspartame, Lote: 25823, Supelco
- Fosfato de Potasio en polvo (K_2HPO_4) Fisher ChemAlert[®]
- Ácido fosfórico 99% ALDRICH
- Metanol (CH_3OH) grado HPLC UV, Cutoff 205 nm, Fisher ChemAlert[®]
- Cristales de Fosfato de Potasio Monobásico (KH_2PO_4) Baker Analyzed[®] Reagent J.T. Baker Inc.
- Búfer de calibración para medidor de pH 4.0
- Bebidas bajas en calorías.

3.3 EQUIPO

- Sistema HPLC, Agilent serie1100
- Columna Agilent, Eclipse-XDB-C18 (150 mm x 4.6mm x 5 μ m), precolumna C18, bomba cuaternaria y detector DAD a 228 y 198 nm.
- Computadora
- Balanza analítica: Adventure TM OHAUS Máx. Cap. 210 gr HAUS Corp
- Medidor de pH: Orion Reserch Model 701A digital IONALYZER
- Micropipeta 10-100 uL, Wheaton Socorex.
- Puntas de micropipeta, 200 uL, Fisherbrand Redi-Tip.
- Filtros Iso-DiscTM, Filtres N-13-2, Nylon 13mm* 0.2 um, Supelco
- Filtros de bomba de filtrado, Supelco, Nylon 66 membranes, 0.45 um x 47 mm
- Bomba para filtrar, GAST.
- Sistema de filtrado FisherBrand.

3.4 DISEÑO EXPERIMENTAL

3.4.1 Calibración del HPLC

Para el desarrollo de la curva de calibración de aspartame y acesulfame-k se utilizaron 10 concentraciones: 0, 10, 25, 50, 100, 200, 400, 600, 800 y 1000 mg/Kg debido a que la regulación indica que el máximo permitido en refrescos y jugos de frutas es de 750 y 600 mg/Kg de aspartame y acesulfame-k respectivamente (*Codex Alimentarius*, 2006). Se realizaron tres repeticiones por nivel de concentración, se midió el área bajo la curva expresada en miliequivalencias de absorbancia (mAU*), área que fue utilizada para desarrollar el la curva de calibración mediante regresión lineal.

3.4.2 Monitoreo de bebidas refrescantes bajas en calorías

Dos bebidas carbonatadas bajas en calorías y cuatro bebidas refrescantes bajas en calorías fueron recolectadas en distintos centros comerciales de la ciudad de Tegucigalpa, con la finalidad de evaluar si las concentraciones de AK y ASP en dichas bebidas no sobrepasan los límites máximos permitidos por *Codex Alimentarius*.

3.5 METODOLOGÍA

Las curva de calibración para la detección y cuantificación simultánea de aspartame y acesulfame-k, se realizó basándose en el método expuesto por Dossi *et al.* (2006). Método que permite la detección simultánea de aditivos alimenticios en bebidas, utilizando cromatografía líquida de fase reversa (RP-LC). Las muestras de bebidas carbonatadas se prepararon según lo indicado por Chen y Wang (2001) y los refrescos según lo indicado por Zhu *et al* (2005). La metodología cambió en el tipo de columna, para lo cual se utilizó la indicada por Galletti y Bochini (1996) y se utilizó una precolumna C18 para alargar la vida útil de la columna C18.

3. 6 DETERMINACIÓN DE CONDICIONES

Dossi *et al.* (2006), indica que la corrida cromatográfica se logra con un flujo de 1.2 ml/min de fase móvil binaria, 95% (v/v) de búfer de agua y fosfato (0.1 M KH_2PO_4 , adicionando H_3PO_4 ó 0.1 M K_2HPO_4 para ajustar el pH a 4.0) y metanol 5% (v/v) durante los primeros cinco minutos; luego un incremento de la concentración de metanol a 40% durante cinco minutos (gradiente); seguido por fase isocrática de 40% metanol durante 10 minutos y finalmente una disminución de la concentración de metanol a 5% durante cinco minutos, logrando preparar el sistema para la siguiente inyección.

Se evaluaron diferentes concentraciones de fase móvil durante el tiempo de corrida, logrando establecer una línea base homogénea y permitir una buena separación de picos. La máxima absorbancia de los compuestos fue evaluada para establecer las longitudes de onda a medir en el método. Por lo tanto, las condiciones que se establecieron son: fase móvil (1.2 ml/min) de búfer de fosfato y agua (95% v/v) y metanol (5 % v/v) por 8.50

minutos; entre el minuto 8.50 y 9.50 se incrementó la concentración de metanol a 30%, concentración que se mantiene hasta el minuto 22; entre el minuto 22 y 23 disminuye la concentración de metanol a 5% y al minuto 25 se detiene el método. La absorbancia fue medida con detector de arreglo de diodos a longitudes de 198 nm para aspartame y acesulfame-k a 228 nm.

3.7 PREPARACIÓN DE ESTÁNDARES

Aspartame puro (Supelco, Lote: 25823) y acesulfame-k (Supelco, Lote: LB24615) fueron utilizados, donde 0.015 gr de ASP y AK fueron diluidos en 15 ml de agua destilada y desionizada, logrando así una solución madre de 1000 mg/Kg

Preparación de niveles de concentración:

- 800 mg/kg: 3.2 ml de solución madre y 0.8 de agua destilada fueron mezclados en un vial color ámbar.
- 600 mg/kg: 2.4 ml de solución madre y 1.6 de agua destilada fueron mezclados en un vial color ámbar.
- 400 mg/Kg 1.6 ml de solución madre y 2.4 de agua destilada fueron mezclados en un vial color ámbar.
- 200 mg/kg: 0.8 ml de solución madre y 3.2 ml de agua destilada fueron mezclados en un vial color ámbar.
- 100 mg/kg: 0.4 ml de solución madre y 3.6 ml de agua destilada fueron mezclados en un vial color ámbar.
- 50 mg/kg: 0.2 ml de solución madre y 3.8 ml de agua destilada fueron mezclados en un vial color ámbar.
- 25 mg/kg: 0.1 ml de solución madre y 3.9 ml de agua destilada fueron mezclados en un vial color ámbar.
- 10 mg/kg: 0.04 ml de solución madre y 3.96 ml de agua destilada fueron mezclados en un vial color ámbar.
- Para obtener el nivel de 0 mg/Kg (blanco) se utilizó agua destilada y desionizada.

3.8 DESARROLLO DE LA CURVA

Para desarrollar de la curva de calibración se estabilizó la temperatura ambiente a 20 °C y se homogenizó una línea base para reducir el ruido en los cromatogramas. La presión promedio de la bomba fue 120 bares y se nombró el método como ASP-ACEK. Fueron tomados 20 µl de cada uno de los viales donde se encontraban los estándares diluidos de AK y ASP, los cuales fueron inyectados al sistema HPLC Agilent serie 1100. Se realizaron 5 inyecciones para eliminar cualquier residuo existente en el inyector debido a inyecciones previas y se realizaron tres repeticiones por cada nivel. Luego de inyectar las tres repeticiones para cada uno de los niveles de los compuestos se procedió a realizar la tabla de calibración. El análisis de regresión lineal se realizó con el Software ChemStation versión 2004, para relacionar el área bajo la curva y la concentración del compuesto.

3.9 VALIDACIÓN CON ESTÁNDARES.

La validación del método se realizó inyectando AK y ASP puro en concentraciones conocidas. Las concentraciones utilizadas para AK fueron: 30, 75, 150, 250, 500 y 750 mg/Kg. La curva de calibración para aspartame fue validada con las concentraciones de 30, 75, 150, 250 y 500 mg/Kg. La validación se realizó con el objetivo de evaluar la exactitud y precisión del método. Todos estos niveles de validación fueron analizados y cuantificados bajo las mismas condiciones de los niveles de calibración.

3.10 VALIDACIÓN CON BEBIDAS DE CONCENTRACIÓN CONOCIDA

Concentraciones conocidas de aspartame y acesulfame fueron mezcladas con bebidas que no poseían estos compuestos. Las bebidas fueron sometidas al proceso de extracción previo a ser inyectadas, para así conocer la eficiencia del método de extracción, las pérdidas de ASP y AK durante el proceso, y evaluar posibles interferencias debido a otros componentes existentes en las bebidas.

3.11 EVALUACIÓN DE BEBIDAS REFRESCANTES BAJAS EN CALORÍAS

El proceso de extracción de la muestra en bebidas carbonatadas se basó en lo indicado por Chen y Wang (2001). Donde cinco ml de bebidas carbonatadas fueron desgasificadas en baño ultrasónico por cinco minutos y luego filtradas (Filtros Iso-Disc™, Filtros N-13-2, Nylon 13mm* 0.2 um, Supelco) previo al análisis cromatográfico. Las muestras de bebidas refrescantes bajas en calorías "Light" solamente fueron filtradas (Filtros Iso-Disc™, Filtros N-13-2, Nylon 13mm* 0.2 um, Supelco) previo a ser inyectadas al equipo HPLC.

3.12 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó el programa Sistema de Análisis Estadístico (SAS®), por sus siglas en inglés) versión 2006 para validar la curva de calibración. El análisis se realizó por medio de una prueba *T-student* con un nivel de significancia de 5% ($p < 0.05$), esto para conocer diferencias estadísticas entre la concentración conocida que se inyectó y la concentración reportada por el sistema HPLC.

La validación con muestras de concentración conocida fue evaluada por medio de una prueba *T-student* utilizando el programa SAS®. Se evaluó la concentración inicial de ASP y AK antes de someter la muestra al proceso de extracción y la concentración reportada por el sistema HPLC. Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA), para conocer diferencias estadísticas entre las concentraciones de aspartame y acesulfame-k en las bebidas bajas en calorías.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. CURVA DE CALIBRACIÓN DE ACESULFAME-K

EL Cuadro 3 muestra el área y coeficiente de variación de los diez niveles de concentración de acesulfame-k, utilizados para realizar la curva de calibración (Anexos 1 al 10). El tiempo promedio de elusión del acesulfame-k fue 4.75 minutos.

Cuadro 3. Precisión de curva de Acesulfame-k

Concentración (mg/Kg)	Área bajo la curva (mAU)*	% CV*
1000	55929.80	0.85
800	44309.77	0.66
600	33830.88	0.07
400	22560.97	1.53
200	11383.63	2.15
100	5851.08	1.731
50	3058.07	1.59
25	1498.33	5.99
10	569.40	2.27
0	0	0

* Área promedio y %CV de tres repeticiones por cada nivel de concentración.

El nivel de precisión obtenido por el sistema HPLC Agilent 1100 al determinar las áreas bajo la curva fue aceptable debido a los bajos %CV. Sin embargo, en la concentración de 25 mg/Kg el %CV fue 6, lo cual representa que los valores se desviaron 6% de la media.

El área bajo la curva en mAU* (variable dependiente Y) y la concentración de acesulfame-k en mg/Kg (variable independiente X) fueron utilizados para desarrollar la curva de calibración. La curva de calibración proporcionó una ecuación lineal con pendiente de 55.71 mAU*, un intercepto de 139.13 mAU* y un coeficiente de determinación (R^2) de 0.9999 muy aceptable (Figura 3). La curva de calibración desarrollada para de acesulfame-k permitió medir los niveles de concentración en un rango de 0 a 1000 mg/Kg siendo los niveles máximos permisibles según el *Codex Alimentarius* 600 mg/Kg para jugos y bebidas carbonatadas.

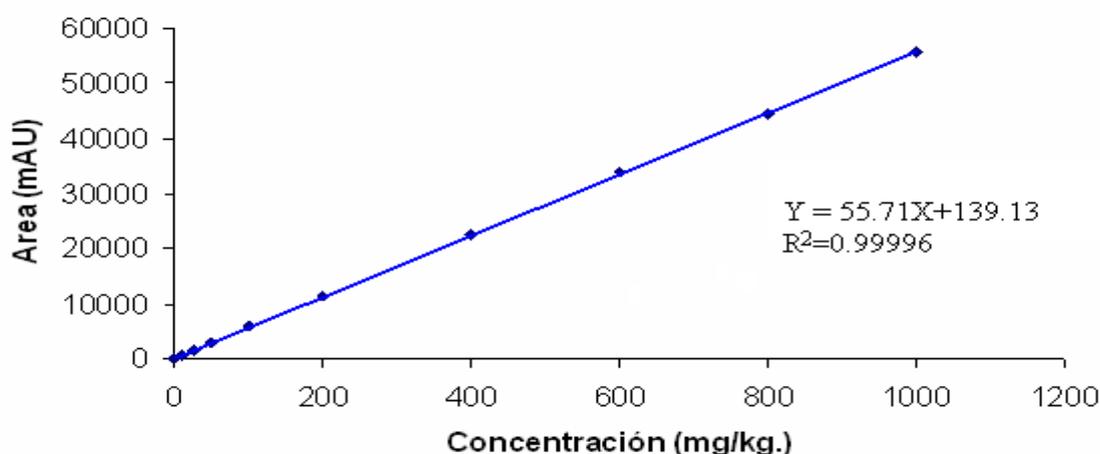


Figura 3. Curva de calibración de acesulfame-k

4.1.1 Validación con estándares de acesulfame-k

El Cuadro 4 muestra las concentraciones conocidas y las reportadas por el HPLC en el proceso de validación de la curva (Anexo 12 al 17).

Cuadro 4. Validación de curva de calibración de acesulfame-k

Concentración conocida (mg/Kg)	Concentración reportada (mg/Kg)	Promedio (mg/Kg)	%CV
750.00	747.51	748.75	0.98
	757.85		
500.00	494.47	499.51	1.43
	504.54		
250.00	254.90	254.65	0.15
	254.35		
150.00	152.44	152.67	0.11
	152.90		
75.00	77.84	77.72	0.22
	77.60		
30.00	29.75	29.62	0.59
	29.50		

Las concentraciones reportadas por el HPLC en el proceso de validación fueron sometidas a una prueba *T-student* (Anexo 18), para conocer si existía diferencia estadística entre la concentración conocida y la reportada por el HPLC. La prueba *T-student* ($Pr > |t| 0.1079$) indicó que no hay diferencia estadística entre las concentraciones conocidas al momento de inyectar y los valores reportados por la curva de calibración. Además, el sistema HPLC fue muy preciso al determinar las concentraciones de acesulfame-k.

4.1.2 Validación con bebidas de concentración conocida

El acesulfame-k en concentración conocida fue mezclado con bebidas refrescantes y luego fueron sometidas al proceso de extracción, con la finalidad de conocer posibles pérdidas por el proceso de extracción de la muestra (Anexos 19, 20 y 21). Estos resultados se muestran en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Recuperación de acesulfame-k

Concentración conocida (mg/Kg)	Concentración reportada (mg/Kg)	Promedio (mg/Kg)	%CV
500	487.24	498.96	3.32
	510.68		
200	260.16	256.66	1.92
	253.16		
100	112.22	109.45	3.58
	106.68		

Las concentraciones de acesulfame-k reportadas por el HPLC fueron estadísticamente iguales a las concentraciones reales de la muestra ($Pr > |t| 0.2426$) lo cual indicó que la curva de calibración es útil (Anexo 22).

4.2 CURVA DE CALIBRACION DE ASPARTAME

EL Cuadro 6 muestra los datos utilizados para desarrollar la curva de calibración (Anexos 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10 y 11). También muestra el coeficiente de variación obtenido para cada concentración en la calibración como indicador de precisión. El tiempo promedio de elusión del aspartame fue de 17.76 minutos.

Cuadro 6. Precisión de la curva de calibración de aspartame.

Concentración mg/Kg	Área (mAU*)	%CV
600	34790	0.14
400	23534	0.95
200	12075	1.98
100	5973	0.68
50	2927	0.13
25	1750	1.74
10	566	0.23
0	0	0

El aparato HPLC agilent 1100 fue preciso al detectar aspartame en el rango de 0 a 600 mg/Kg esto debido a los bajos coeficiente de variación (%CV). El límite de aspartame en jugos y bebidas gaseosas es de 750 mg/Kg la curva de calibración está diseñada con un

nivel máximo de 600 mg/Kg. Por lo tanto, se recomienda diluir la muestra si se esperan concentraciones mayores a 600 mg/Kg. Las concentraciones de 800 y 1000 mg/Kg fueron eliminadas ya que reducían el coeficiente de correlación, aumentaban el intercepto de la curva, lo cual podría generar error al momento de cuantificar muestras con bajas concentraciones de aspartame.

La Figura 4 muestra el modelo de regresión lineal para aspartame. La variable dependiente (Y) es el área bajo la curva expresada en mAU* y la variable independiente (X) la concentración conocida de aspartame en mg/Kg. La ecuación generada posee un intercepto de 120.75 mAU* y una pendiente de 58.14 mAU* y coeficiente de correlación (R^2) de 0.99989 muy aceptable.

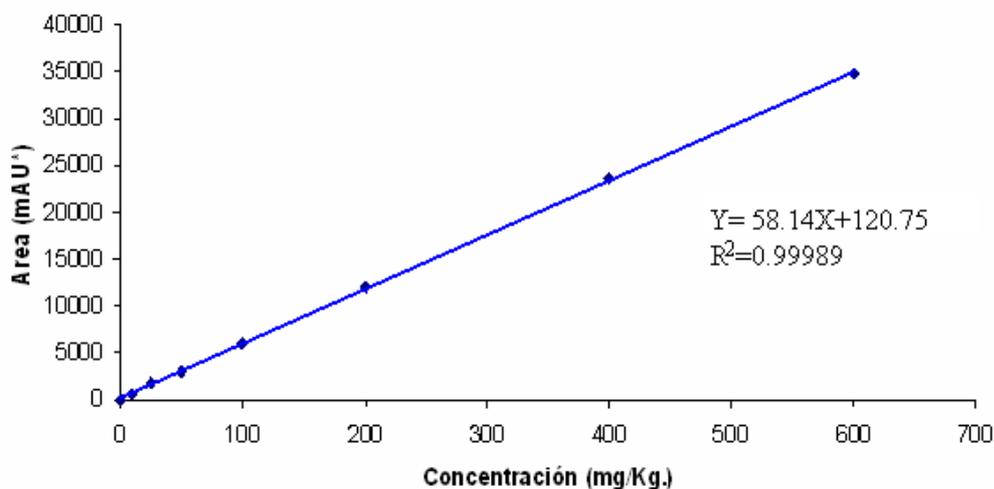


Figura 4. Curva de calibración de Aspartame

4.2.1 Validación con estándares de aspartame

La concentración conocida y la reportada de las muestras usadas para la validación (Anexo 13 al 17) pueden verse en el Cuadro 7, así como el coeficiente de variación.

Cuadro 7. Validación de curva de calibración de aspartame

Concentración conocida (mg/Kg)	Concentración reportada (mg/Kg)	Promedio (mg/Kg)	%CV
500.00	491.60	493.35	0.50
	495.10		
250.00	254.90	254.63	0.15
	254.35		
150.00	152.44	152.67	0.21
	152.90		
75.00	77.84	77.72	0.22
	77.60		
30.00	29.75	29.63	0.60
	29.50		

La prueba *T-student* ($Pr > |t|$ 0.6251) indicó que no existió diferencia estadística entre las concentraciones conocidas al momento de inyectar y los valores reportados por el modelo de regresión lineal del HPLC (Anexo 18).

4.2.2 Validación con bebida de concentración conocida

Las concentraciones de aspartame reportadas por el HPLC luego del proceso de extracción fueron comparadas con la concentración inicial (Anexos 19, 20 y 21), para ello se utilizó la prueba *T-student* (Anexo 22) en la cual indicó que no existió diferencia estadística entre la concentración inicial previo a la extracción de la muestra y la reportada ($Pr > |t|$ 0.1908) los resultados se presentan en el Cuadro 8 concluyendo que la curva de calibración es útil para la medición de aspartame en bebidas carbonatadas y refrescantes.

Cuadro 8. Recuperación de aspartame.

Concentración conocida (mg/Kg)	Concentración reportada (mg/Kg)	Promedio (mg/Kg)	%CV
500	460.01	452.73	2.27
	445.45		
200	246.63	246.56	0.04
	246.48		
100	106.67	103.94	3.72
	101.20		

4.3 EVALUACIÓN DE BEBIDAS REFRESCANTES BAJAS EN CALORÍAS

Un Análisis de Varianza (ANDEVA) indicó que existió diferencia estadística significativa ($P \leq 0.05$) entre la concentración de aspartame de las distintas bebidas bajas en calorías evaluadas (Anexos 23 al 28). Los resultados del Cuadro 9 indican que las bebidas evaluadas cumplieron con lo indicado por el *Codex Alimentarius*, ya que las concentraciones fueron menores a 350 mg/Kg (Figura 5)

Cuadro 9. Concentración promedio de aspartame en bebidas bajas en calorías.

Marca	Media	Separación de Medias
X	334.19 ± 3.51	A
Y	254.06 ± 15.97	B
Z	171.63 ± 3.18	C
W	160.25 ± 2.36	C
U	0 ± 0	D
V	0 ± 0	D

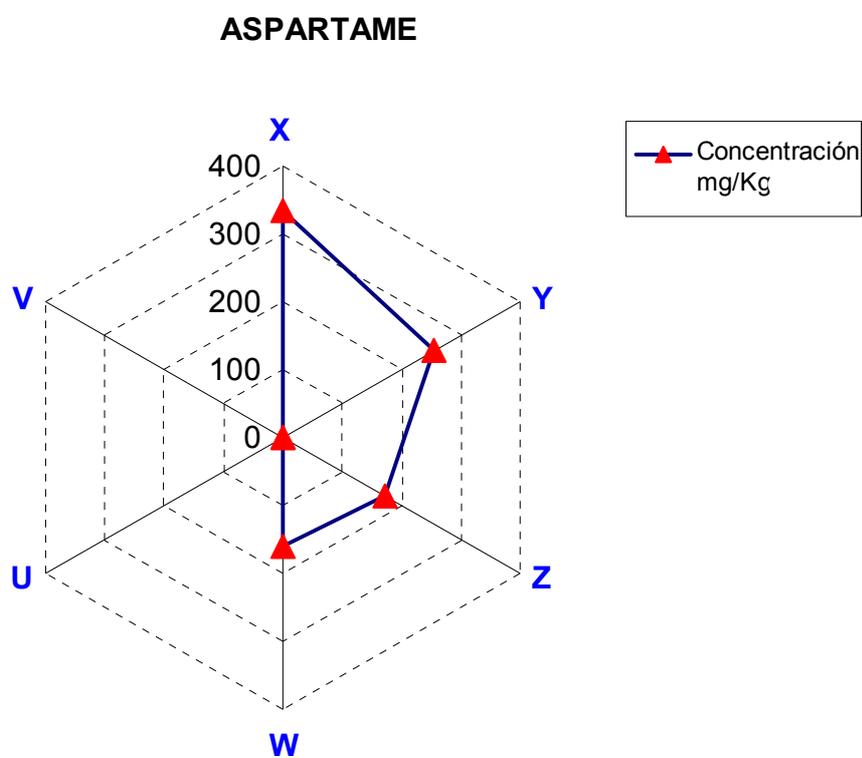


Figura 5. Comportamiento de concentraciones de aspartame encontradas en bebidas bajas en calorías.

El análisis de varianza para la concentración de AK en las bebidas bajas en calorías evaluadas (Anexo 23 al 28) demostró que existieron diferencias significativas entre las concentraciones ($P \leq 0.05$). Las bebidas evaluadas cumplieron con las regulaciones del *Codex Alimentarius*, todas fueron menores a 175 mg/Kg (Cuadro 10 y Figura 6). Sin embargo, existieron dos bebidas de la misma marca que en la tabla de ingredientes indicaron que solamente estaban endulzadas con sucralosa y se encontraron concentraciones de 165.022 y 163.679 mg/Kg de acesulfame-k respectivamente

Cuadro 10. Concentración promedio de acesulfame-k en bebidas bajas en calorías

Marca	Media	Separación de medias
V	165.02 ± 0.68	A
U	163.67 ± 0.26	BA
Y	158.02 ± 1.70	B
Z	100.00 ± 5.86	C
W	93.04 ± 0.71	D
X	0 ± 0	E

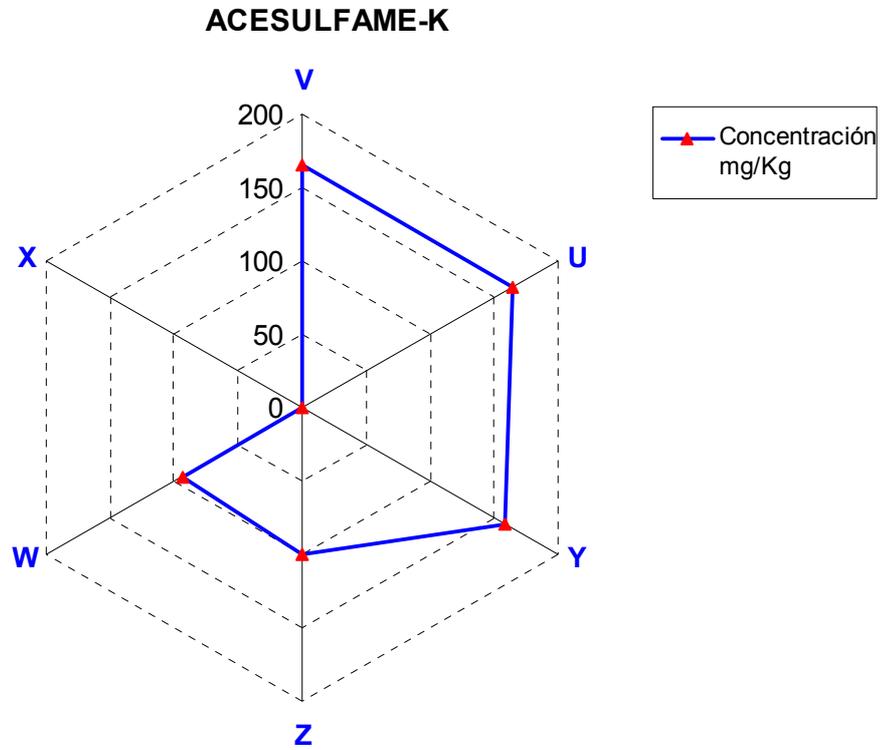


Figura 6. Comportamiento de concentraciones de acesulfame-k encontradas en bebidas bajas en calorías.

5. CONCLUSIONES

- Se desarrolló una curva de calibración con alta precisión que permite la detección simultánea de aspartame en concentraciones de 0 a 600 mg/Kg y acesulfame-k en concentraciones de 0 a 1000 mg/Kg por HPLC
- Las bebidas bajas en calorías recolectadas en distintos centros comerciales de Tegucigalpa presentaron concentraciones dentro de los límites establecidos por el *Codex Alimentarius*.
- Se detectaron dos bebidas de una misma marca que no reportan el uso de acesulfame-k entre sus ingredientes
- Se desarrolló una herramienta que le permitirá al Laboratorio de Análisis de Alimentos Zamorano (LAAZ) detectar y cuantificar aspartame y acesulfame-k, herramienta que se podrá utilizar para la generación de ingresos por servicios y fines investigativos

6. RECOMENDACIONES

- Establecer métodos de extracción de acesulfame K y aspartame para otro tipo de alimentos, debido a posibles interferencias o pérdidas al momento de hacer las extracciones y extracción de la muestra.
- Ampliar la curva de aspartame a niveles de detección de 1000 mg/Kg
- Crear una curva de calibración para sucralosa, sacarina y D-sorbitol.

7. BIBLIOGRAFIA

Abreu, MB. 2000. Food Analysis by HPLC. Intense Sweeteners and Synthetic Colorants. Ed. ML, Nollet. 2 ed. Bélgica. CRC Press. 1072p.

Armeta, S; Garrigues S; Guardia, M. 2004. FTIR Determination of Aspartame and Acesulfame-K in Tabletop Sweeteners. Journal of Agricultural and food chemistry. 4(52): 7798-7803.

Buzzanell, P; Gray, F. 1993. Have High-intensity Sweeteners reached their Peak? Food Review. 16(3): 44-50

Chen, QC. *et al.* 1997. Separation and Determination of Four Artificial Sweeteners and Citric Acid by High-Performance Anion-Exchange Chromatography. Journal of Chromatography A. 771: 135-143

Chen, QC. y Wang J. 2001. Simultaneous Determination of Artificial Sweeteners, Preservatives, Caffeine, Theobromine and Theophylline in Food and Pharmaceutical Preparations by Ion Chromatography. Journal of Chromatography A. 973:57-64

Chu, JH. 2005. Acesulfame Potassium. Handbook of Pharmaceutical Excipients. 15 ed. Gran Bretaña,

Codex Alimentarius. 2006. Codex General Standard for Food Additives. CODEX STAN 192-1995. 186p.

Cornejo, V. *et al.* 2003. Fenilquetonuria de Diagnóstico Neonatal y Lactancia Materna. Revista Medica de Chile. 131:1280-1287.

Cuppen, HM; Van Eard, A; Meekes, H. 2004. Needlelike Morphology of Aspartame. Crystal Growth and Design. 4(5):989-997

Demiralay, C. Özkan, G. y Guzel-Seydim, Z. 2006. Isocratic Separation of Some Food Additives by Reversed Phase Liquid Chromatography. Chromatography. 63(1):91-96.

Dossi, N. *et al.* 2006. Simultaneous RP-LC determination of Additives in Soft Drinks. Chromatographia. 63(11):557-562

FDA (U.S. Food and Drug Administration)/CFSAN (Center for Food Safety and Applied Nutrition). 2004. A Food Labeling Guide-Appendix A. (En línea). Consultado el 1 de octubre de 2007. Disponible en: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/flg-6a.html>

Galletti, G. y Bocchini, P. 1996. High-performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection of Aspartame with a Post-column Photochemical Reactor. *Journal of Chromatography A*. 729(1996)393-398

Herndon, M. 2006. FDA Statement on European Aspartame Study. (en línea). Food and Drug Administration. Consultado el 30 de septiembre de 2007. Disponible en: <http://www.fda.gov/bbs/topics/NEWS/2006/NEW01369.html>

JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, IT). 2001. Acesulfame Potassium. (En línea) 15ed. Roma, IT. FAO. Consultado el 18 de septiembre de 2007. pdf. Disponible en: <http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/details.html?id=841>

JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, IT). 2001. Aspartame. (En línea) 15ed. Roma, IT. FAO. Consultado el 18 de septiembre de 2007. <http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/details.html?id=44>

Lindanbaum, D. 2007. Seguridad del Aspartame en Nutrición Humana. *Informe Médico*. 9(1):24-27

Mortensen, A. 2006. Sweeteners Permitted in the European Union: Safety Aspects. *Scandinavian Journal of Food and Nutrition*, 50(3):104-116

Puthrasingam, S. *et al.* 1996. Aspartame Pharmacokinetics-The effect of Ageing. *Age and Ageing*. 25:217-220

Sales, JA; Cardeal, Z. 2003. Headspace solid-phase micro-extraction gas chromatography method for the determination of methanol in aspartame sweeteners. *Food Additives and Contaminants*. 20(6):519-523

Sandrou, DK; Arvanitoyannis, IS. 2000. Low-Fat/Calories Foods: Currents State and Perspectives. *Critical Reviews in Foods Science and Nutrition*. 40(5)427-447

Scotter, M. y Castle, L. 2004. Chemical interaction between additives in foodstuffs: a review. *Food Additives and contaminants*. 21(2):93-124

Scott, R. 2003. Principles and Practice of Chromatography. *Chrom-Ed Book Series*. Book 1. Pdf. Consultado el 20 de sep. de 2007. Disponible en: <http://www.chromatography-online.org/1/contents.html>

Soffritti, M. *et al.* 2006. First Experimental Demonstration of the Multipotential Carcinogenic Effects of Aspartame Administrated in the Feed to Sprague-Dawley rats. *Environmental Health Perspectives*. 114(3):379-385

UAC (Unión Aduanera Centroamericana). 2007. Reglamento Técnico de Aditivos Alimentarios. 705p. *Sin publicar*.

Yebra-Biurrun, MC. 2000. Flow Injection Determination of Artificial Sweeteners: a review. *Food Additives and Contaminants*. 17(9):733-738

Yost, R.W., Ettre, L.S y Conlon R.D. 1980. *Practical Liquid Chromatography: An Introduction*. Norwalk (CT): Parkin-Elmer. 1st edición, 255pp.

Zhu, Y. et al. 2005. Separation and Simultaneous Determination of Four Artificial Sweeteners in Food and Beverages by Ion Chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1085:143-146.

8. ANEXOS

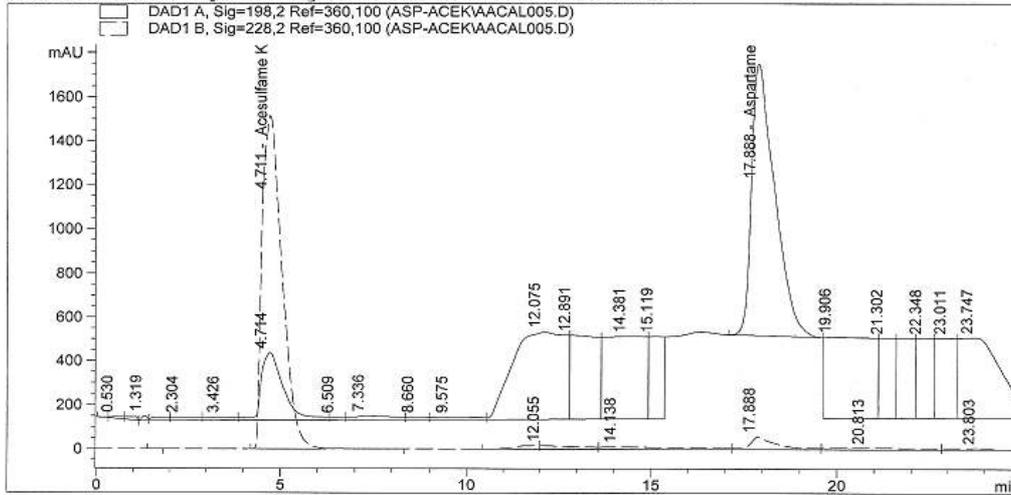
Anexo 1. Cromatograma de calibración, nivel 1000 mg/Kg ASP y AK.

Archivo: C:\HPCHEM\1\DATA\ASP-ACEK\AACAL005.D Sample Name:1000 ug/kg R2
 Cal ASP-AK: ASP Lot: LB24615, AK Lot: LB25823; 0 ug/kg.

Fecha de Inyección: Sat, 25. Aug. 2007
 Muestra : 1000 ug/kg R2
 Operador : Jesson Morales

Método de Adquisición : ASP-ACEK.M
 Método de Análisis : C:\HPCHEM\1\METHODS\LAZ\ASP-ACEK.M
 Último cambio : Fri, 21. Sep. 2007, 09:17:43 pm
 (modificado después de cargado)

Método para cuantificación de aspartame y acesulfame-k
 C18. MeOH-buffer pH4 con gradiente. DAD 210 nm. 1.2 ml/min



Resumen de concentración de compuestos

Compuestos ordenados según : Signal
 Fecha de Modificación de tabla de calibración: Fri, 21. Sep. 2007,09:18:13 pm
 Picos no Calibrados : No reportados

Señal	#	Tiempo	Area	Concentración (ug/mL)	Nombre del compuesto
DAD1	1	5	56478.020	1010.955	Acesulfame K

Señal	#	Tiempo	Area	Concentración (ug/mL)	Nombre del compuesto
DAD1	1	18	53449.465	917.224	Aspartame

*** Fin del Reporte ***

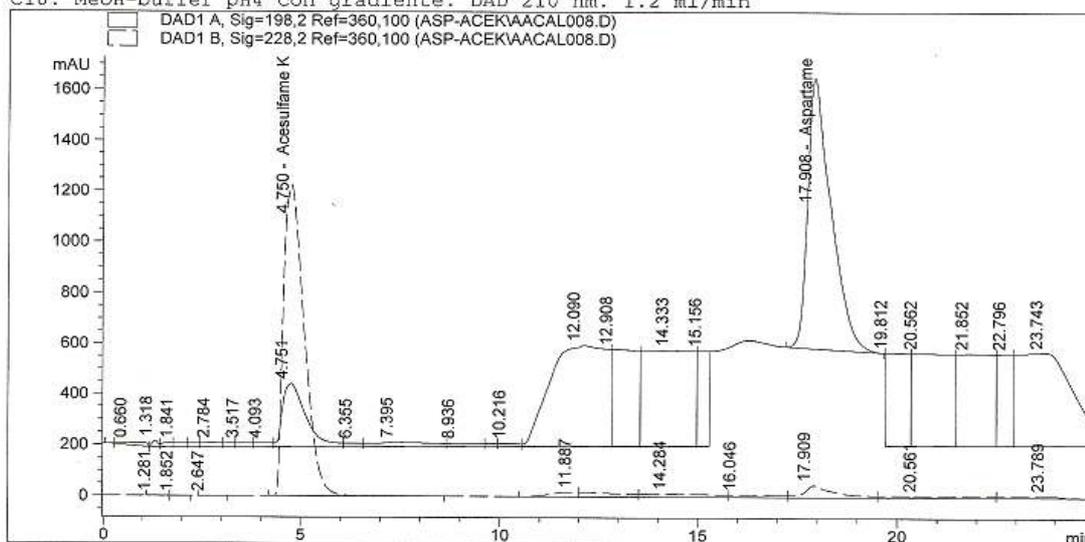
Anexo 2. Cromatograma de calibración, nivel 800 mg/Kg ASP y AK.

Archivo: C:\HPCHEM\1\DATA\ASP-ACEK\AACAL008.D Sample Name: 800 ug/kg R2
 Cal ASP-AK: ASP Lot: LB24615, AK Lot: LB25823; 800 ug/k

Fecha de Inyección: Sat, 25. Aug. 2007
 Muestra : 800 ug/kg R2
 Operador : Jesson Morales

Método de Adquisición : ASP-ACEK.M
 Método de Análisis : C:\HPCHEM\1\METHODS\LAZ\ASP-ACEK.M
 Último cambio : Fri, 21. Sep. 2007, 09:17:43 pm
 (modificado después de cargado)

Metodo para cuantificación de aspartame y acesulfame-k
 C18. MeOH-buffer pH4 con gradiente. DAD 210 nm. 1.2 ml/min



Resumen de concentración de compuestos

Compuestos ordenados según : Signal
 Fecha de Modificación de tabla de calibración: Fri, 21. Sep. 2007, 09:18:59 pm
 Picos no Calibrados : No reportados

Señal	#	Tiempo	Area	Concentración (ug/mL)	Nombre del compuesto
DAD1	1	5	44372.789	793.834	Acesulfame K

Señal	#	Tiempo	Area	Concentración (ug/mL)	Nombre del compuesto
DAD1	1	18	43264.305	742.045	Aspartame

*** Fin del Reporte ***

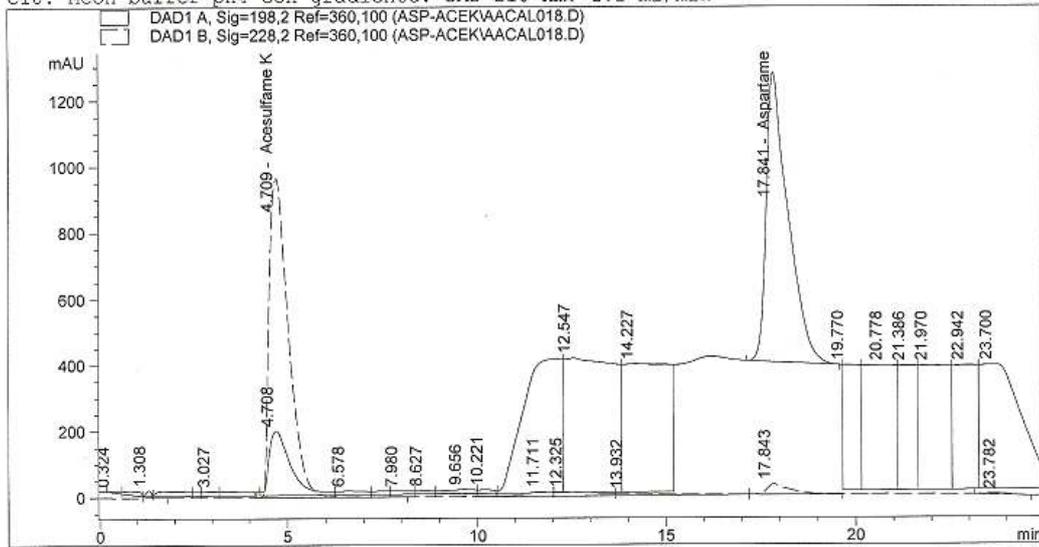
Anexo 3. Cromatograma de calibración, nivel 600 mg/Kg ASP y AK.

Archivo: C:\HPCHEM\1\DATA\ASP-ACEK\AACAL018.D Sample Name: CAL600 ug/kg->
 Cal ASP-AK: ASP Lot: LB24615, AK Lot: LB25823; 600 ug/k

Fecha de Inyección: Sat, 25. Aug. 2007
 Muestra : CAL600 ug/kg r2
 Operador : Jesson Morales

Método de Adquisición : ASP-ACEK.M
 Método de Análisis : C:\HPCHEM\1\METHODS\LAZ\ASP-ACEK.M
 Último cambio : Fri, 21. Sep. 2007, 09:17:43 pm
 (modificado después de cargado)

Metodo para cuantificación de aspartame y acesulfame-k
 C18, MeOH-buffer pH4 con gradiente. DAD 210 nm. 1.2 ml/min



Resumen de concentración de compuestos

Compuestos ordenados según : Signal
 Fecha de Modificación de tabla de calibración: Fri, 21. Sep. 2007,09:18:59 pm
 Picos no Calibrados : No reportados

Señal	#	Tiempo	Area	Concentración (ug/mL)	Nombre del compuesto
DAD1	1	5	33854.305	605.174	Acesulfame K

Señal	#	Tiempo	Area	Concentración (ug/mL)	Nombre del compuesto
DAD1	1	18	34776.715	596.063	Aspartame

*** Fin del Reporte ***

Anexo 4. Cromatograma de calibración, nivel 400 mg/Kg ASP y AK.

Archivo: C:\HPCHEM\1\DATA\ASP-ACEK\AACAL025.D

Sample Name: CAL 400 ug/k

Cal ASP-AK: ASP Lot: LB24615, AK Lot: LB25823; 400 ug/k

Fecha de Inyección: Sun, 26. Aug. 2007

Muestra : CAL 400 ug/kg r2

Operador : Jesson Morales

Método de Adquisición : ASP-ACEK.M

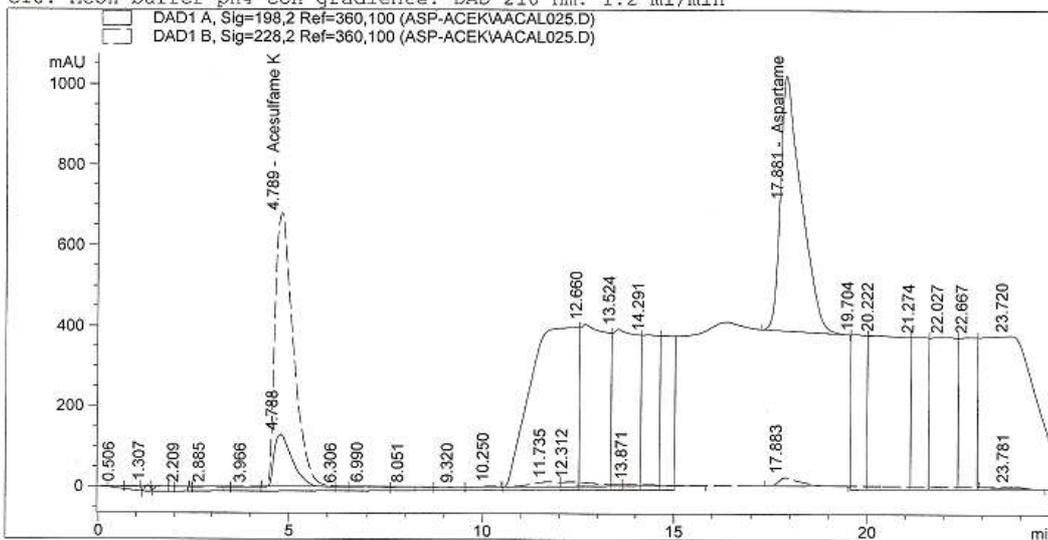
Método de Análisis : C:\HPCHEM\1\METHODS\LAZ\ASP-ACEK.M

Último cambio : Fri, 21. Sep. 2007, 09:17:43 pm

(modificado después de cargado)

Metodo para cuantificación de aspartame y acesulfame-k

C18. MeOH-buffer pH4 con gradiente. DAD 210 nm. 1.2 ml/min



Resumen de concentración de compuestos

Compuestos ordenados según : Signal

Fecha de Modificación de tabla de calibración: Fri, 21. Sep. 2007, 09:18:59 pm

Picos no Calibrados : No reportados

Señal	#	Tiempo	Area	Concentración (ug/mL)	Nombre del compuesto
DAD1	1	5	22549.648	402.412	Acesulfame K

Señal	#	Tiempo	Area	Concentración (ug/mL)	Nombre del compuesto
DAD1	1	18	23654.129	404.761	Aspartame

*** Fin del Reporte ***

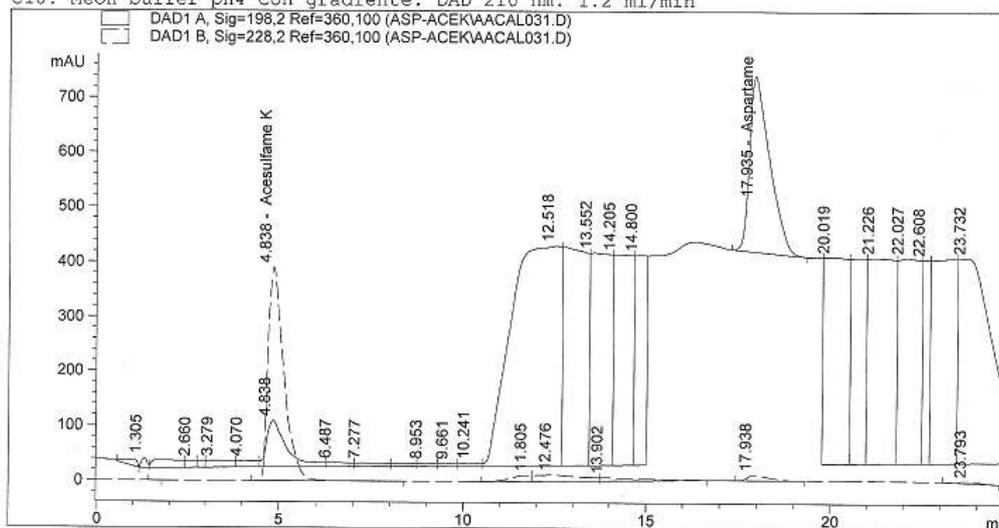
Anexo 5. Cromatograma de calibración, nivel 200 mg/Kg ASP y AK.

Archivo: C:\HPCHEM\1\DATA\ASP-ACEK\AACAL031.D Sample Name: CAL 200 ug/k->
 Cal ASP-AK: ASP Lot: LB24615, AK Lot: LB25823; 400 ug/k

Fecha de Inyección: Sun, 26. Aug. 2007
 Muestra : CAL 200 ug/kg r2
 Operador : Jesson Morales

Método de Adquisición : ASP-ACEK.M
 Método de Análisis : C:\HPCHEM\1\METHODS\LAZ\ASP-ACEK.M
 Último cambio : Fri, 21. Sep. 2007, 09:17:43 pm
 (modificado después de cargado)

Metodo para cuantificación de aspartame y acesulfame-k
 C18. MeOH-buffer pH4 con gradiente. DAD 210 nm. 1.2 ml/min



Resumen de concentración de compuestos

Compuestos ordenados según : Signal
 Fecha de Modificación de tabla de calibración: Fri, 21. Sep. 2007, 09:18:59 pm
 Picos no Calibrados : No reportados

Señal	#	Tiempo	Area	Concentración (ug/mL)	Nombre del compuesto
DAD1	1	5	11657.195	207.044	Acesulfame K

Señal	#	Tiempo	Area	Concentración (ug/mL)	Nombre del compuesto
DAD1	1	18	12116.051	206.312	Aspartame

*** Fin del Reporte ***

Anexo 6. Cromatograma de calibración, nivel 100 mg/Kg ASP y AK.

Archivo: C:\HPCHEM\1\DATA\ASP-ACEK\AACAL035.D

Sample Name: CAL 100 ug/

Cal ASP-AK: ASP Lot: LB24615, AK Lot: LB25823; 400 ug/k

Fecha de Inyección: Sun, 26. Aug. 2007

Muestra : CAL 100 ug/kg r2

Operador : Jesson Morales

Método de Adquisición : ASP-ACEK.M

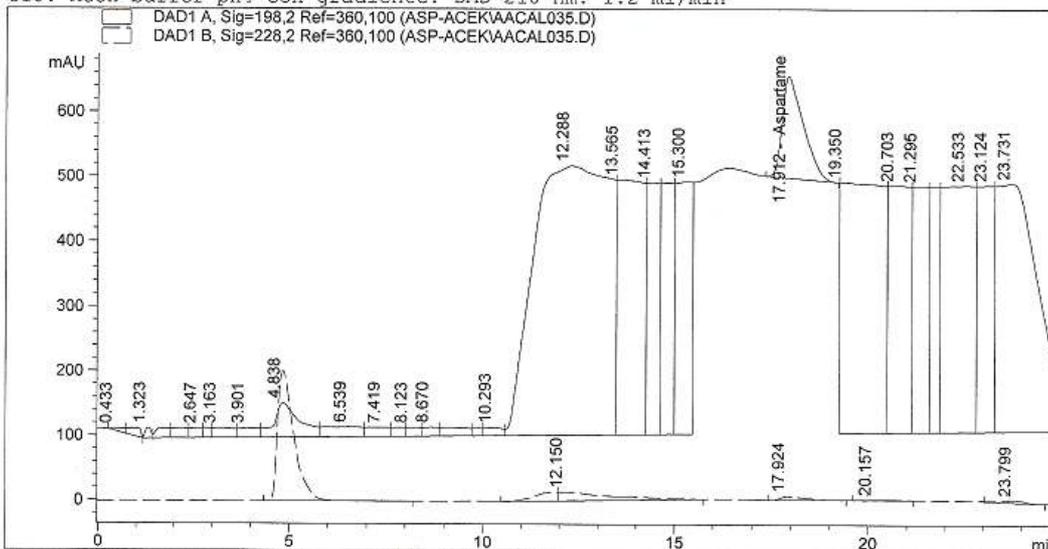
Método de Análisis : C:\HPCHEM\1\METHODS\LAAZ\ASP-ACEK.M

Último cambio : Fri, 21. Sep. 2007, 09:17:43 pm

(modificado después de cargado)

Método para cuantificación de aspartame y acesulfame-k

C18. MeOH-buffer pH4 con gradiente. DAD 210 nm. 1.2 ml/min



Resumen de concentración de compuestos

Compuestos ordenados según : Signal

Fecha de Modificación de tabla de calibración: Fri, 21. Sep. 2007, 09:18:59 pm

Picos no Calibrados : No reportados

Señal	#	Tiempo	Area	Concentración (ug/mL)	Nombre del compuesto
DAD1	1	5	5915.879	104.068	Acesulfame K

Señal	#	Tiempo	Area	Concentración (ug/mL)	Nombre del compuesto
DAD1	1	18	5960.621	100.442	Aspartame

*** Fin del Reporte ***

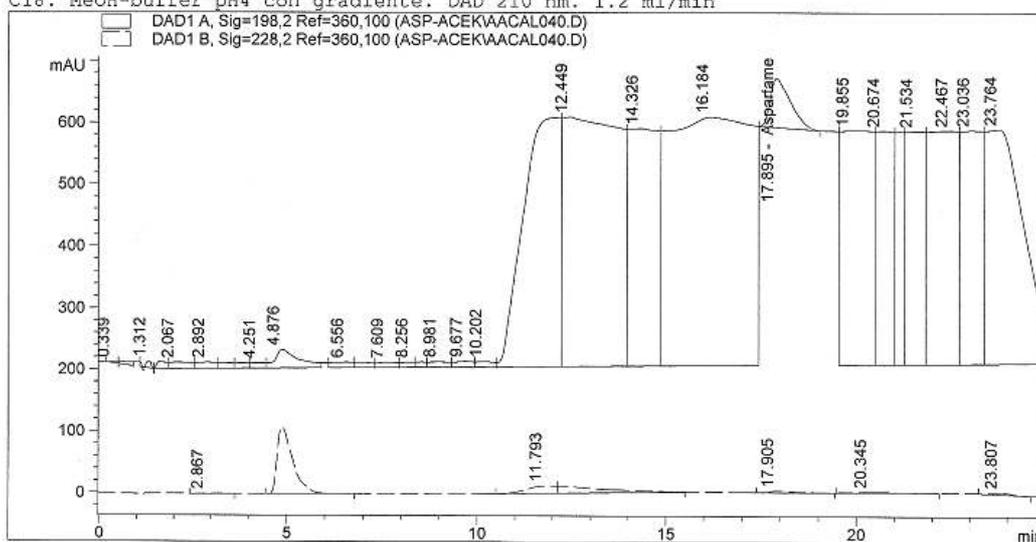
Anexo 7. Cromatograma de calibración, nivel 50 mg/Kg ASP y AK.

Archivo: C:\HPCHEM\1\DATA\ASP-ACEK\AACAL040.D Sample Name: CAL 50 ug/kg->
 Cal ASP-AK: ASP Lot: LB24615, AK Lot: LB25823; 50 ug/kg

Fecha de Inyección: Sun, 26. Aug. 2007
 Muestra : CAL 50 ug/kg r4
 Operador : Jesson Morales

Método de Adquisición : ASP-ACEK.M
 Método de Análisis : C:\HPCHEM\1\METHODS\LAZ\ASP-ACEK.M
 Último cambio : Sun, 23. Sep. 2007, 09:04:14 pm
 (modificado después de cargado)

Metodo para cuantificación de aspartame y acesulfame-k
 Cl8. MeOH-buffer pH4 con gradiente. DAD 210 nm. 1.2 ml/min



Resumen de concentración de compuestos

Compuestos ordenados según : Signal
 Fecha de Modificación de tabla de calibración: Sun, 23. Sep. 2007, 09:04:14 pm
 Picos no Calibrados : No reportados

Señal	#	Tiempo	Area	Concentración (ug/mL)	Nombre del compuesto
DAD1	1	5	3099.525	53.132	Acesulfame K

Señal	#	Tiempo	Area	Concentración (ug/mL)	Nombre del compuesto
DAD1	1	18	2925.599	48.242	Aspartame

*** Fin del Reporte ***

Anexo 8. Cromatograma de calibración, nivel 25 mg/Kg AK.

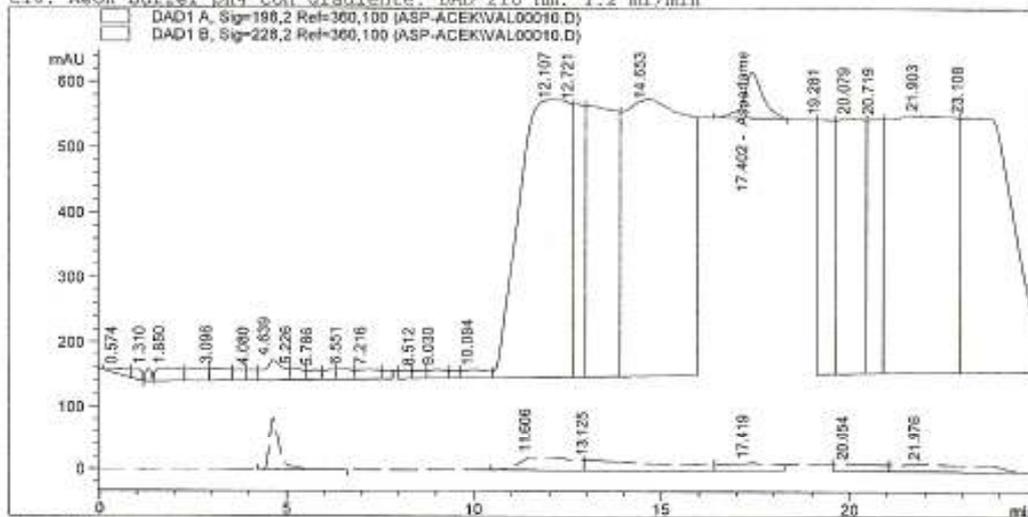
Archivo: C:\HPCHEM\1\DATA\ASP-ACEK\VAL00010.D
Validación de curva 25 mg/kg ASP-AK r2

Sample Name: 25 mg/kg r2

Fecha de Inyección: Tue, 4. Sep. 2007
Muestra : 25 mg/kg r2
Operador : Jesson Morales

Método de Adquisición : ASP-ACEK.M
Método de Análisis : C:\HPCHEM\1\METHODS\LAAS\ASP-ACEK.M
Último cambio : Tue, 4. Sep. 2007, 09:12:13 am
(modificado después de cargado)

Método para cuantificación de aspartame y acesulfame-k
c18, MeOH-buffer pH4 con gradiente, DAD 210 nm, 1.2 ml/min



Resumen de concentración de compuestos

Compuestos ordenados según : Signal
Fecha de Modificación de tabla de calibración: Tue, 4. Sep. 2007, 10:26:32 am
Picos no Calibrados : No reportados

Señal	#	Tiempo	Area	Concentración (ug/mL)	Nombre del compuesto
DAD1	1	15	1560.433	25.948	Acesulfame K

Señal	#	Tiempo	Area	Concentración (ug/mL)	Nombre del compuesto
DAD1	1	17	2415.288	40.006	Aspartame

*** Fin del Reporte ***

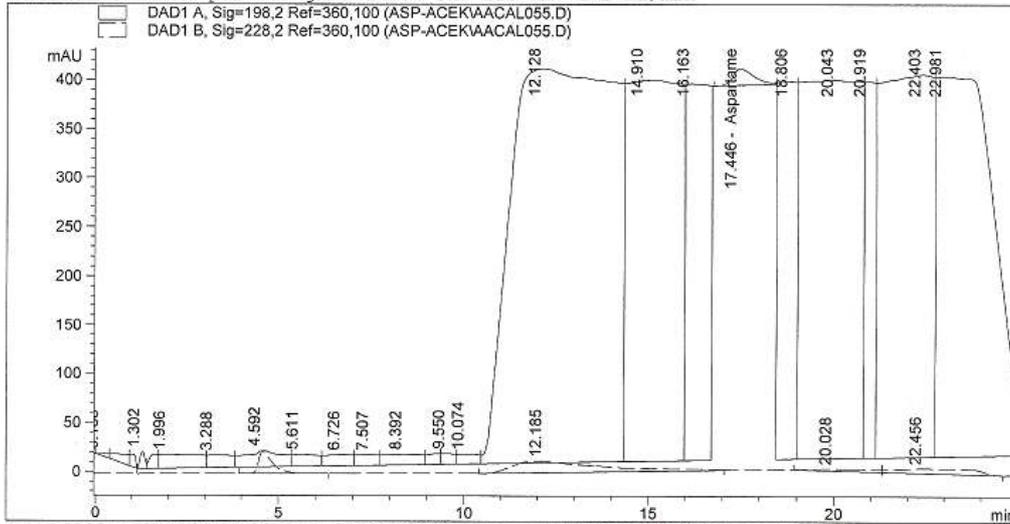
Anexo 9. Cromatograma de calibración, nivel 10 mg/Kg ASP y AK.

Archivo: C:\HPCHEM\1\DATA\ASP-ACEK\AACAL055.D Sample Name:10 ug/kg rl
 Cal ASP-AK: ASP Lot: LB24615, AK Lot: LB25823; 10 ug/kg

Fecha de Inyección: Mon, 27. Aug. 2007
 Muestra : 10 ug/kg rl
 Operador : Jesson Morales

Método de Adquisición : ASP-ACEK.M
 Método de Análisis : C:\HPCHEM\1\METHODS\LAAZ\ASP-ACEK.M
 Último cambio : Fri, 21. Sep. 2007, 09:17:43 pm
 (modificado después de cargado)

Metodo para cuantificación de aspartame y acesulfame-k
 C18. MeOH-buffer pH4 con gradiente. DAD 210 nm. 1.2 ml/min



Resumen de concentración de compuestos

Compuestos ordenados según : Signal
 Fecha de Modificación de tabla de calibración: Fri, 21. Sep. 2007,09:18:59 pm
 Picos no Calibrados : No reportados

Señal	#	Tiempo	Area	Concentración (ug/mL)	Nombre del compuesto
DAD1	1	5	578.940	8.344	Acesulfame K

Señal	#	Tiempo	Area	Concentración (ug/mL)	Nombre del compuesto
DAD1	1	17	657.395	9.230	Aspartame

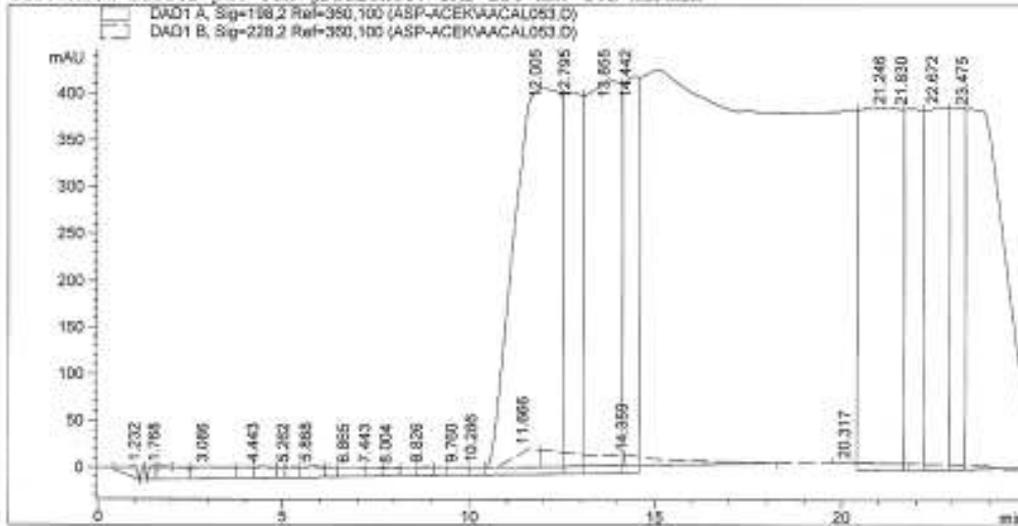
*** Fin del Reporte ***

Anexo 10. Cromatograma de calibración, nivel 0 mg/Kg ASP y AK.

Archivo: C:\HPCHEM\1\DATA\ASP-ACEK\AACAL053.D Sample Name: BLANCO
 Cal ASP-AK: ASP Lot: LB24615, AK Lot: LB25823; 0 ug/kg.

Fecha de Inyección: Mon, 27. Aug. 2007
 Muestra : BLANCO
 Operador : Jesson Morales

Método de Adquisición : ASP-ACEK.M
 Método de Análisis : C:\HPCHEM\1\METHODS\LAAG\ASP-ACEK.M
 Último cambio : Fri, 21. Sep. 2007, 09:51:26 pm
 [Modificado después de cargado]
 Metodo para cuantificación de aspartame y acesulfame-k
 C18, MeOH-buffer pH4 con gradiente. DAD 210 nm. 1.2 ml/min



Resumen de concentración de compuestos

Compuestos ordenados según : Signal
 Fecha de Modificación de tabla de calibración: Fri, 21. Sep. 2007,09:51:26 pm
 Picos no Calibrados : No reportados

Señal	#	Tiempo	Area	Concentración (ug/mL)	Nombre del compuesto
DAD1	1	0	0.000	0.000	Acesulfame K

Señal	#	Tiempo	Area	Concentración (ug/mL)	Nombre del compuesto
DAD1	1	0	0.000	0.000	Aspartame

*** Fin del Reporte ***

Anexo 11. Cromatograma de calibración, nivel 25 mg/Kg ASP.

Archivo: C:\HPCHEM\1\DATA\ASP-ACEK\AACAL085.D
 CALIBRACION de curva 25 mg/kg ASP-AK r3

Sample Name: 25 mg/kg r3

Fecha de Inyección: Wed, 5. Sep. 2007

Muestra : 25 mg/kg r3

Operador : Jesson Morales

Método de Adquisición : ASP-ACEK.M

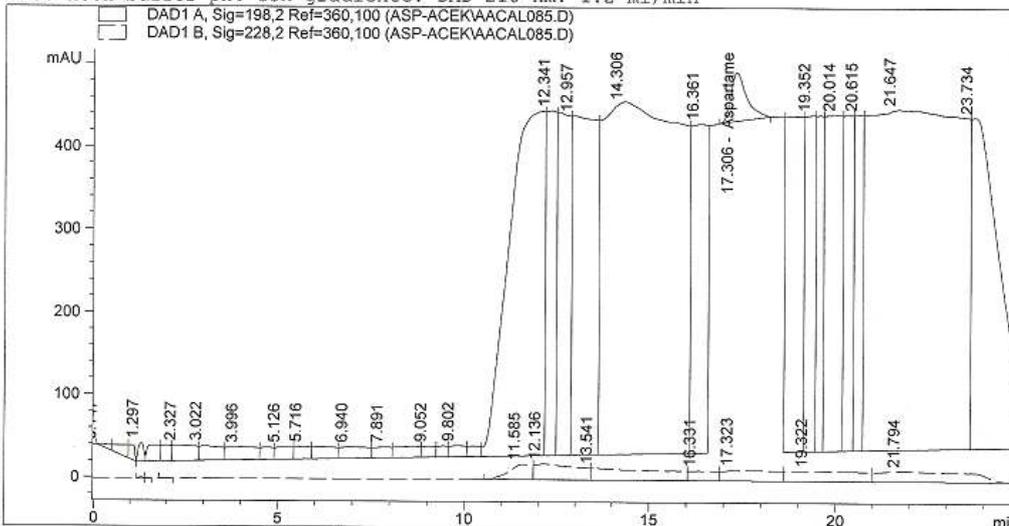
Método de Análisis : C:\HPCHEM\1\METHODS\LAZ\ASP-ACEK.M

Último cambio : Fri, 21. Sep. 2007, 09:41:21 pm

(modificado después de cargado)

Metodo para cuantificación de aspartame y acesulfame-k

C18. MeOH-buffer pH4 con gradiente. DAD 210 nm. 1.2 ml/min



Resumen de concentración de compuestos

Compuestos ordenados según : Signal

Fecha de Modificación de tabla de calibración: Fri, 21. Sep. 2007,09:41:21 pm

Picos no Calibrados : No reportados

Señal	#	Tiempo	Area	Concentración (ug/mL)	Nombre del compuesto
DAD1	1	0	0.000	0.000	Acesulfame K

Señal	#	Tiempo	Area	Concentración (ug/mL)	Nombre del compuesto
DAD1	1	17	1684.949	26.903	Aspartame

*** Fin del Reporte ***

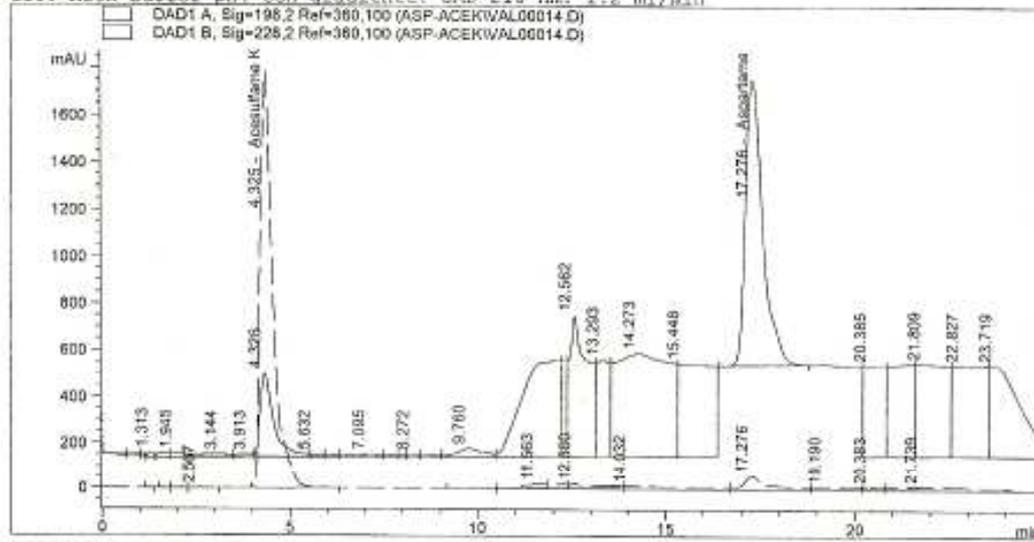
Anexo 12. Cromatograma de validación, nivel 750 mg/Kg ASP y AK.

Archivo: C:\HPCHEM\1\DATA\ASP-ACEK\VAL\0014.D Sample Name: 750 mg/kg r1
 validación de curva 750 mg/kg ASP-AK r1

Fecha de Inyección: Wed, 5. Sep. 2007
 Muestra : 750 mg/kg r1
 Operador : Jesson Morales

Método de Adquisición : ASP-ACEK.M
 Método de Análisis : C:\HPCHEM\1\METHODS\LAAS\ASP-ACEK.M
 Último cambio : Wed, 5. Sep. 2007, 08:29:08 pm
 (modificado después de cargado)

Metodo para cuantificación de aspartame y acesulfame-k
 Cl8. MeOH-buffer pH4 con gradiente. DAD 210 nm. 1.2 ml/min



Resumen de concentración de compuestos

Compuestos ordenados según : Signal
 Fecha de Modificación de tabla de calibración: Wed, 5. Sep. 2007, 08:29:47 pm
 Picos no Calibrados : No reportados

Señal	#	Tiempo	Area	Concentración (ug/mL)	Nombre del compuesto
DAD1	1	4	42366.387	757.847	Acesulfame K

Señal	#	Tiempo	Area	Concentración (ug/mL)	Nombre del compuesto
DAD1	1	17	38547.027	660.910	Aspartame

*** Fin del Reporte ***

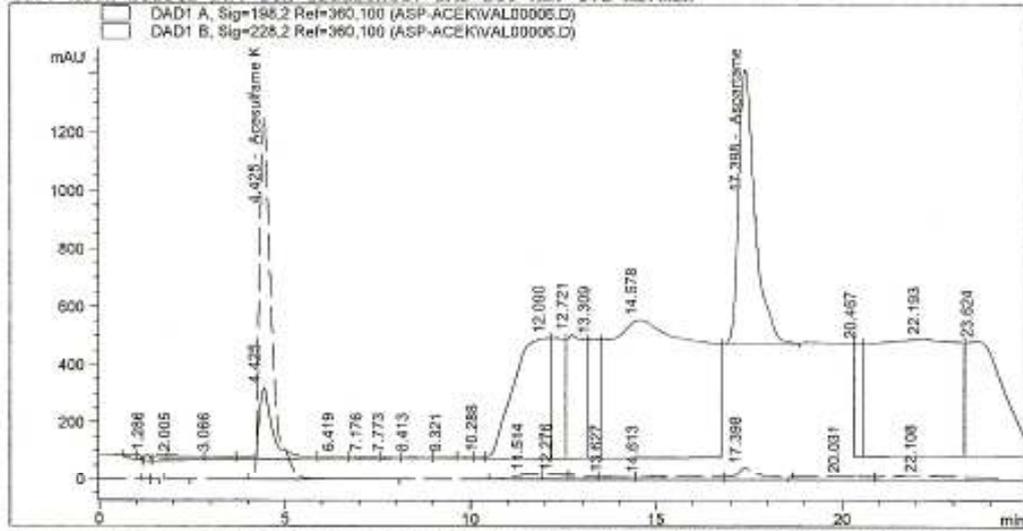
Anexo 13. Cromatograma de validación, nivel 500 mg/Kg ASP y AK.

Archivo: C:\HPCHEM\1\DATA\ASP-ACEK\VAL00006.D Sample Name:500 mg/kg r2
 Validación de curva 500 mg/kg ASP-AK r2 ->

Fecha de Inyección: Tue, 4. Sep. 2007
 Muestra : 500 mg/kg r2
 Operador : Jesson Morales

Método de Adquisición : ASP-ACEK.M
 Método de Análisis : C:\HPCHEM\1\METHODS\LA02\ASP-ACEK.M
 Último cambio : Tue, 4. Sep. 2007, 09:12:13 am
 (modificado después de cargado)

Metodo para cuantificación de aspartame y acesulfame-k
 Cl8, MeOH-buffer pH4 con gradiente, DAD 210 nm, 1.2 ml/min



Resumen de concentración de compuestos

Compuestos ordenados según : Signal
 Fecha de Modificación de tabla de calibración: Tue, 4. Sep. 2007, 10:26:32 am
 Picos no Calibrados : No reportados

Señal	#	Tiempo	Area	Concentración (ug/mL)	Nombre del compuesto
DAD1	1	4	27682.271	494.472	Acesulfame K

Señal	#	Tiempo	Area	Concentración (ug/mL)	Nombre del compuesto
DAD1	1	17	28705.252	491.602	Aspartame

*** Fin del Reporte ***

Anexo 14. Cromatograma de validación, nivel 250 mg/Kg ASP y AK.

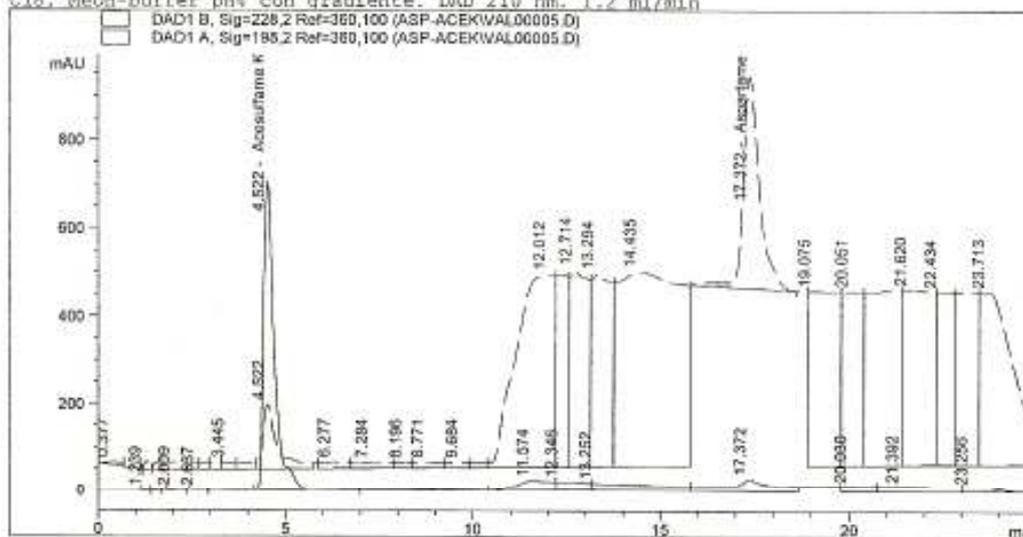
Archivo: C:\HPCHEM\1\DATA\ASP-ACEK\VAL00005.D
Validación de curva 250 mg/kg ASP-AK rl

Sample Name: 250 mg/kg rl

Fecha de Inyección: Tue, 4. Sep. 2007
Muestra : 250 mg/kg rl
Operador : Jesson Morales

Método de Adquisición : ASP-ACEK.M
Método de Análisis : C:\HPCHEM\1\METHODS\LAAX\ASP-ACEK.M
Último cambio : Tue, 4. Sep. 2007, 09:12:13 am
(modificado después de cargado)

Método para cuantificación de aspartame y acesulfame-k
C18, MeOH-buffer pH4 con gradiente. DAD 210 nm. 1.2 ml/min



Resumen de concentración de compuestos

Compuestos ordenados según : Signal
Fecha de Modificación de tabla de calibración: Tue, 4. Sep. 2007, 10:26:32 am
Picos no Calibrados : No reportados

Señal	#	Tiempo	Area	Concentración (ug/mL)	Nombre del compuesto
DAD1	11	5	14280.133	254.090	Acesulfame K

Señal	#	Tiempo	Area	Concentración (ug/mL)	Nombre del compuesto
DAD1	11	17	14268.329	243.612	Aspartame

*** Fin del Reporte ***

Anexo 15. Cromatograma de validación, nivel 150 mg/Kg ASP y AK.

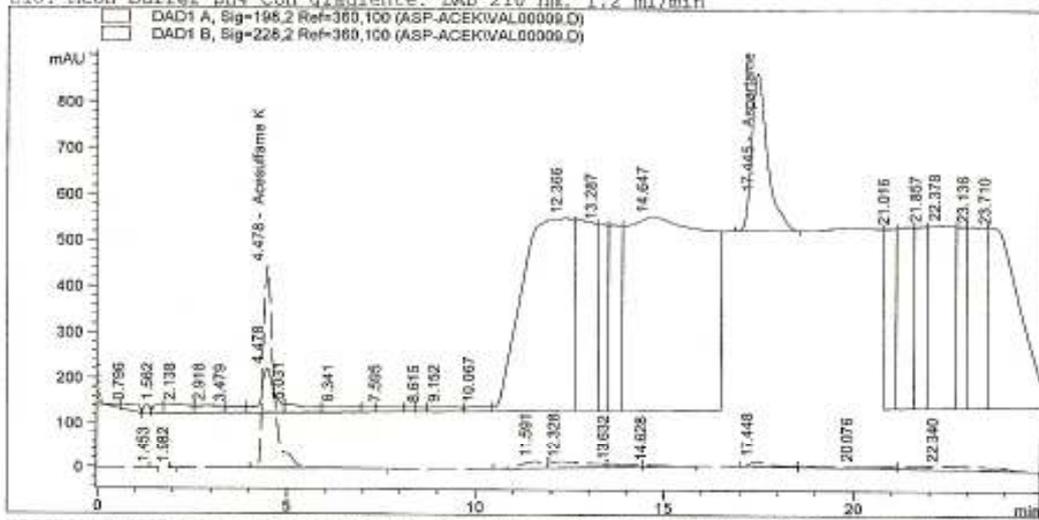
Archivo: C:\HPCHEM\1\DATA\ASP-ACEK\VAL000009.D
Validación de curva 150 mg/kg ASP-AK r2

Sample Name:150 mg/kg r2

Fecha de Inyección: Tue, 4. Sep. 2007
Muestra : 150 mg/kg r2
Operador : Jesson Morales

Método de Adquisición : ASP-ACEK.M
Método de Análisis : C:\HPCHEM\1\METHODS\LAZ\ASP-ACEK.M
Último cambio : Tue, 4. Sep. 2007, 09:12:13 am
(modificado después de cargado)

Método para cuantificación de aspartame y acesulfame-k
C18, MeOH-buffer pH4 con gradiente. DAD 210 nm, 1.2 ml/min



Resumen de concentración de compuestos

Compuestos ordenados según : Signal
Fecha de Modificación de tabla de calibración: Tue, 4. Sep. 2007, 10:26:32 am
Picos no Calibrados : No reportados

Señal	#	Tiempo	Area	Concentración (ug/mL)	Nombre del compuesto
DAD1	1	4	8612.877	152.441	Acesulfame K

Señal	#	Tiempo	Area	Concentración (ug/mL)	Nombre del compuesto
DAD1	1	17	9721.440	165.508	Aspartame

*** Fin del Reporte ***

Anexo 16. Cromatograma de validación, nivel 75 mg/Kg ASP y AK.

Archivo: C:\HPCHEM\1\DATA\ASP-ACEK\VAL00010.D
 validación de curva 75 mg/kg ASP-AK rl

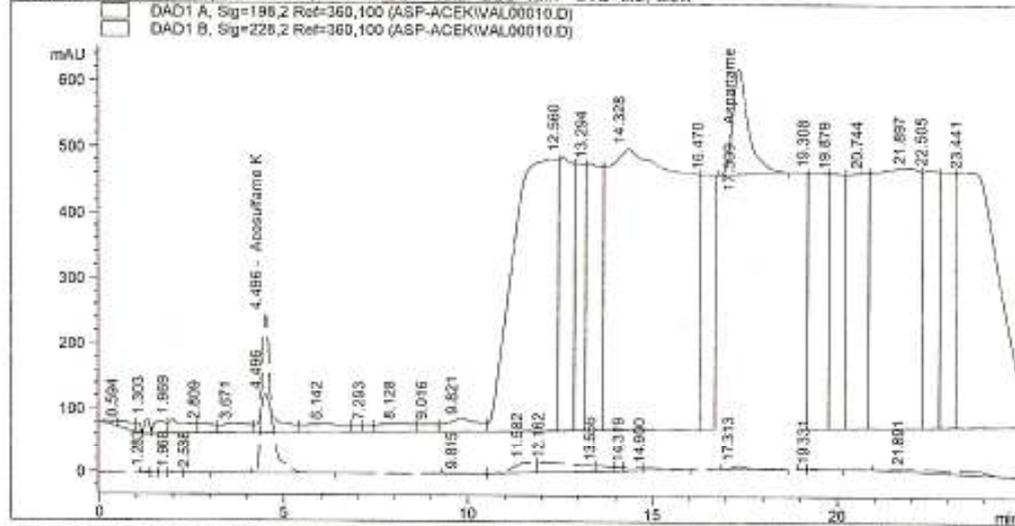
Sample Name: 75 mg/kg rl

-3

Fecha de Inyección: Wed, 5. Sep. 2007
 Muestra : 75 mg/kg rl
 Operador : Jesson Morales

Método de Adquisición : ASP-ACEK.M
 Método de Análisis : C:\HPCHEM\1\METHODS\LAA2\ASP-ACEK.M
 Último cambio : Wed, 5. Sep. 2007, 08:29:08 pm
 (modificado después de cargado)

Metodo para cuantificación de aspartame y acesulfame-k
 C18, MeOH-buffex pH4 con gradiente, DAD 210 nm, 1.2 ml/min



Resumen de concentración de compuestos

Compuestos ordenados según : Signal
 Fecha de Modificación de tabla de calibración: Wed, 5. Sep. 2007, 08:29:47 pm
 Picos no Calibrados : No reportados

Señal	#	Tiempo	Area	Concentración (ug/mL)	Nombre del compuesto
DAD1	1	4	4453.761	77.843	Acesulfame K

Señal	#	Tiempo	Area	Concentración (ug/mL)	Nombre del compuesto
DAD1	1	17	4597.201	76.992	Aspartame

*** Fin del Reporte ***

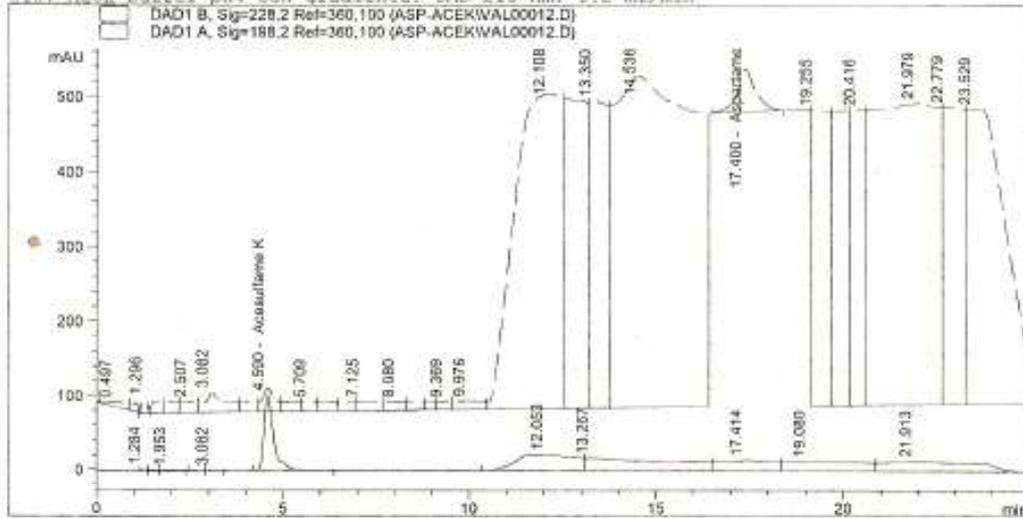
Anexo 17. Cromatograma de validación, nivel 30 mg/Kg ASP y AK.

Archivo: C:\HPCHEM\1\DATA\ASP-ACEK\VAL00012.D Sample Name:30 mg/kg
 validación de curva 30 mg/kg ASP-AK r2

Fecha de Inyección: Thu, 6. Sep. 2007
 Muestra : 30 mg/kg
 Operador : Jason Morales

Método de Adquisición : ASP-ACEK.M
 Método de Análisis : C:\HPCHEM\1\METHODS\LAAS\ASP-ACEK.M
 Último cambio : Thu, 6. Sep. 2007, 00:01:00 am
 (modificado después de cargado)

Método para cuantificación de aspartame y acesulfame-k
 C18, NaOH-buffer pH4 con gradiente, DAD 210 nm, 1.2 ml/min



Resumen de concentración de compuestos

Compuestos ordenados según : Signal
 Fecha de Modificación de tabla de calibración: Thu, 6. Sep. 2007, 00:00:57 am
 Picos no Calibrados : No reportados

{Señal} #	Tiempo	Area	Concentración (ug/mL)	Nombre del compuesto
{DAD} 1	5	1772.127	29.745	Acesulfame K

{Señal} #	Tiempo	Area	Concentración (ug/mL)	Nombre del compuesto
{DAD} 1	17	1908.493	30.748	Aspartame

*** Fin del Reporte ***

Anexo 18. Prueba *T-student* validación de curva de ASP y AK

Edulcorante	MEDIA	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	VALOR T	Pr > t
Acesulfame-k	-10.185	20.16	-1.75	0.1079
Aspartame	1.374	8.588	-0.51	0.6251

Anexo 19. Cromatograma de recuperación, nivel 500 mg/Kg ASP y AK.

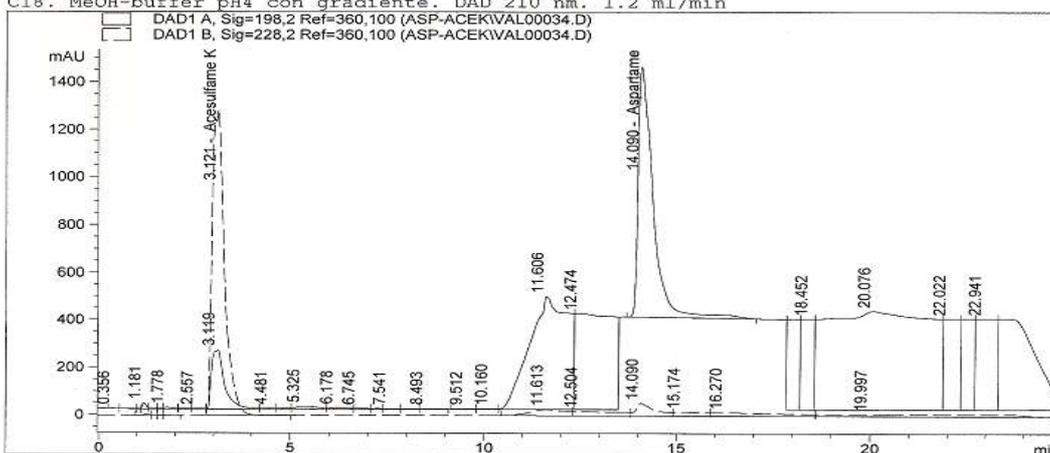
Archivo: C:\HPCHEM\1\DATA\ASP-ACEK\VAL00034.D
recuperación 500 mg/kg

Sample Name:500

Fecha de Inyección: Sun, 16. Sep. 2007
Muestra : 500
Operador : JESSON MORALES

Método de Adquisición : ASP-ACEK.M
Método de Análisis : C:\HPCHEM\1\METHODS\LAZ\ASP-ACEK.M
Último cambio : Sat, 15. Sep. 2007, 10:33:24 pm

Método para cuantificación de aspartame y acesulfame-k
C18. MeOH-buffer pH4 con gradiente. DAD 210 nm. 1.2 ml/min



Resumen de concentración de compuestos

Compuestos ordenados según : Signal
Fecha de Modificación de tabla de calibración: Sat, 15. Sep. 2007, 02:36:09 pm
Picos no Calibrados : No reportados

Señal	#	Tiempo	Area	Concentración (ug/mL)	Nombre del compuesto
DAD1	1	3	28570.887	510.410	Acesulfame K

Señal	#	Tiempo	Area	Concentración (ug/mL)	Nombre del compuesto
DAD1	1	14	28329.508	485.175	Aspartame

*** Fin del Reporte ***

Anexo 20. Cromatograma de recuperación, nivel 250 mg/Kg ASP y AK.

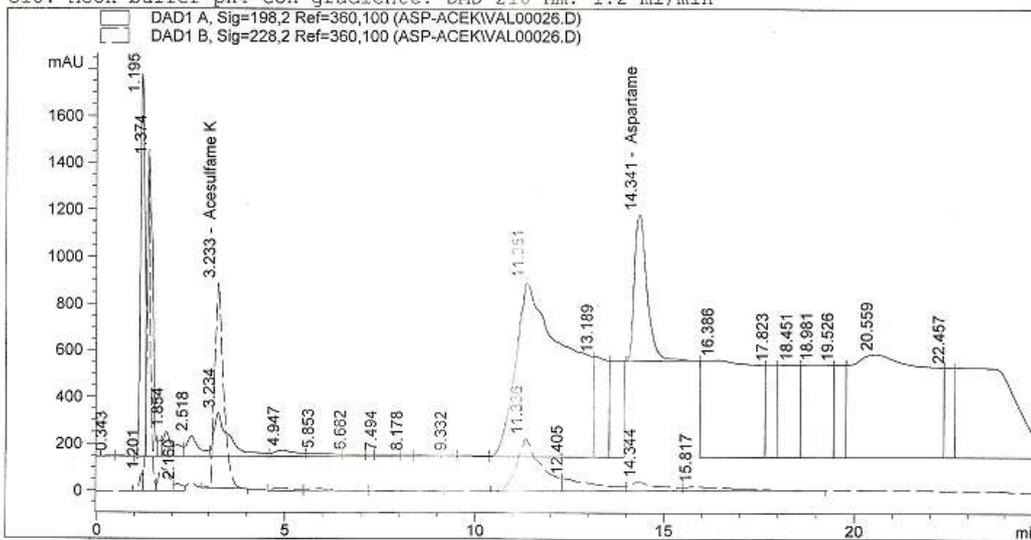
Archivo: C:\HPCHEM\1\DATA\ASP-ACEK\VAL00026.D
 Validación ASP Y AK, Recuperación 250 mg/kg R1

Sample Name: Rec 250 mg/kg

Fecha de Inyección: Sat, 15. Sep. 2007
 Muestra : Rec 250 mg/kg
 Operador : JESSON MORALES

Método de Adquisición : ASP-ACEK.M
 Método de Análisis : C:\HPCHEM\1\METHODS\LAZ\ASP-ACEK.M
 Último cambio : Sat, 15. Sep. 2007, 10:33:24 pm

Método para cuantificación de aspartame y acesulfame-k
 C18, MeOH-buffer pH4 con gradiente. DAD 210 nm. 1.2 ml/min



Resumen de concentración de compuestos

Compuestos ordenados según : Signal
 Fecha de Modificación de tabla de calibración: Sat, 15. Sep. 2007, 02:36:09 pm
 Picos no Calibrados : No reportados

Señal	#	Tiempo	Area	Concentración (ug/mL)	Nombre del compuesto
DAD1	1	3	14228.724	253.168	Acesulfame K

Señal	#	Tiempo	Area	Concentración (ug/mL)	Nombre del compuesto
DAD1	1	14	14451.592	246.489	Aspartame

*** Fin del Reporte ***

Anexo 21. Cromatograma de recuperación, nivel 100 mg/Kg ASP y AK.

Archivo: C:\HPCHEM\1\DATA\ASP-ACEK\VAL00028.D
 validacion ASP Y AK, Recuperación 100 mg/kg R1

Sample Name: Rec 100 mg/k

Fecha de Inyección: Sat, 15. Sep. 2007

Muestra : Rec 100 mg/kg

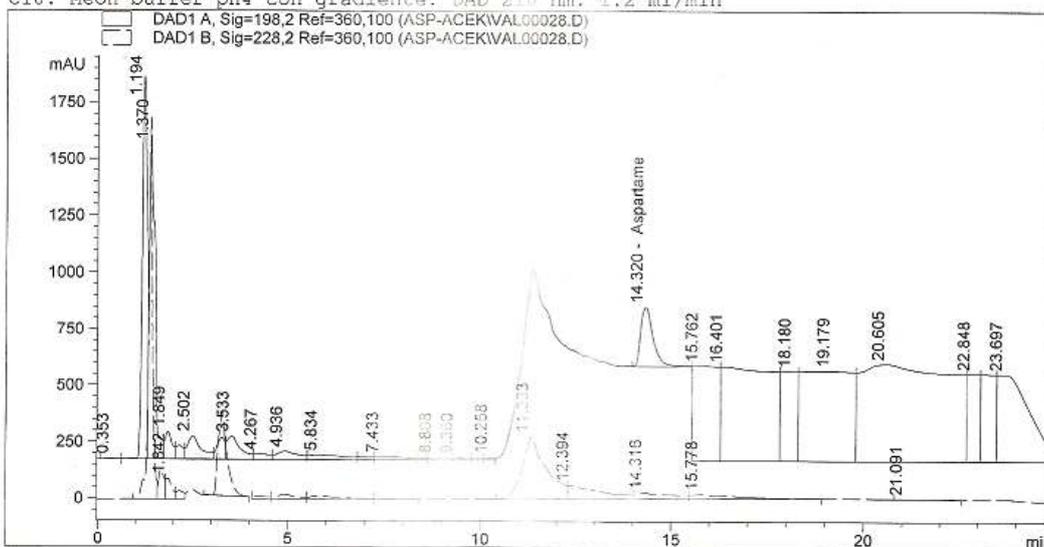
Operador : JESSON MORALES

Método de Adquisición : ASP-ACEK.M

Método de Análisis : C:\HPCHEM\1\METHODS\LAAS\ASP-ACEK.M

Último cambio : Sat, 15. Sep. 2007, 10:33:24 pm

Metodo para cuantificación de aspartame y acesulfame-k
 C18, MeOH-buffer pH4 con gradiente. DAD 210 nm. 1.2 ml/min



Resumen de concentración de compuestos

Compuestos ordenados según : Signal
 Fecha de Modificación de tabla de calibración: Sat, 15. Sep. 2007, 02:36:09 pm
 Picos no Calibrados : No reportados

Señal	#	Tiempo	Area	Concentración	Nombre del compuesto
				(ug/mL)	
DAD1	1	3	6061.897	106.687	Acesulfame K

Señal	#	Tiempo	Area	Concentración	Nombre del compuesto
				(ug/mL)	
DAD1	1	14	6005.063	101.200	Aspartame

*** Fin del Reporte ***

Anexo 22. Análisis estadístico de recuperación de ASP y AK.

	MEDIA	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	VALOR T	Pr > t
Acesulfame-k	-5.029	9.3	-1.32	0.2426
Aspartame	15.58	25.24	1.51	0.1908

Anexo 23. Cromatograma bebida marca "V"

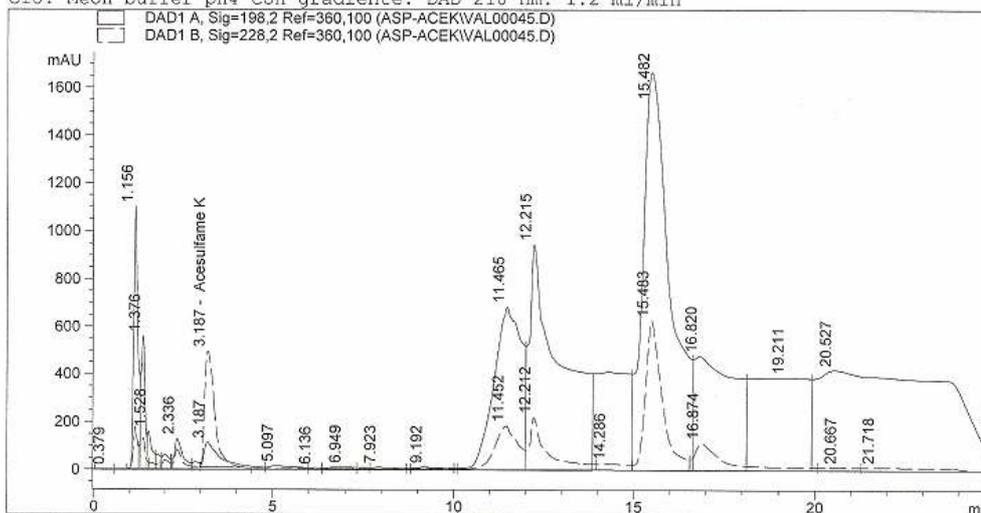
Archivo: C:\HPCHEM\1\DATA\ASP-ACEK\VAL00045.D
Muestra marca "V"

Sample Name: Zlv-Lt

Fecha de Inyección: Sun, 16. Sep. 2007
Muestra : Zlv-Lt
Operador : JESSON MORALES

Método de Adquisición : ASP-ACEK.M
Método de Análisis : C:\HPCHEM\1\METHODS\LAZ\ASP-ACEK.M
Último cambio : Sat, 15. Sep. 2007, 10:33:24 pm

Metodo para cuantificación de aspartame y acesulfame-k
C18. MeOH-buffer pH4 con gradiente. DAD 210 nm. 1.2 ml/min



Resumen de concentración de compuestos

Compuestos ordenados según : Signal
Fecha de Modificación de tabla de calibración: Sat, 15. Sep. 2007,02:36:09 pm
Picos no Calibrados : No reportados

Señal	#	Tiempo	Area	Concentración (ug/mL)	Nombre del compuesto
DAD1	1	3	9318.548	165.098	Acesulfame K
DAD1	1	0	0.000	0.000	Aspartame

*** Fin del Reporte ***

Anexo 24. Cromatograma bebida marca "U"

Archivo: C:\HPCHEM\1\DATA\ASP-ACEK\VAL00036.D

Sample Name: ZRB

Muestra marca "U"

Fecha de Inyección: Sun, 16. Sep. 2007

Muestra : ZRB

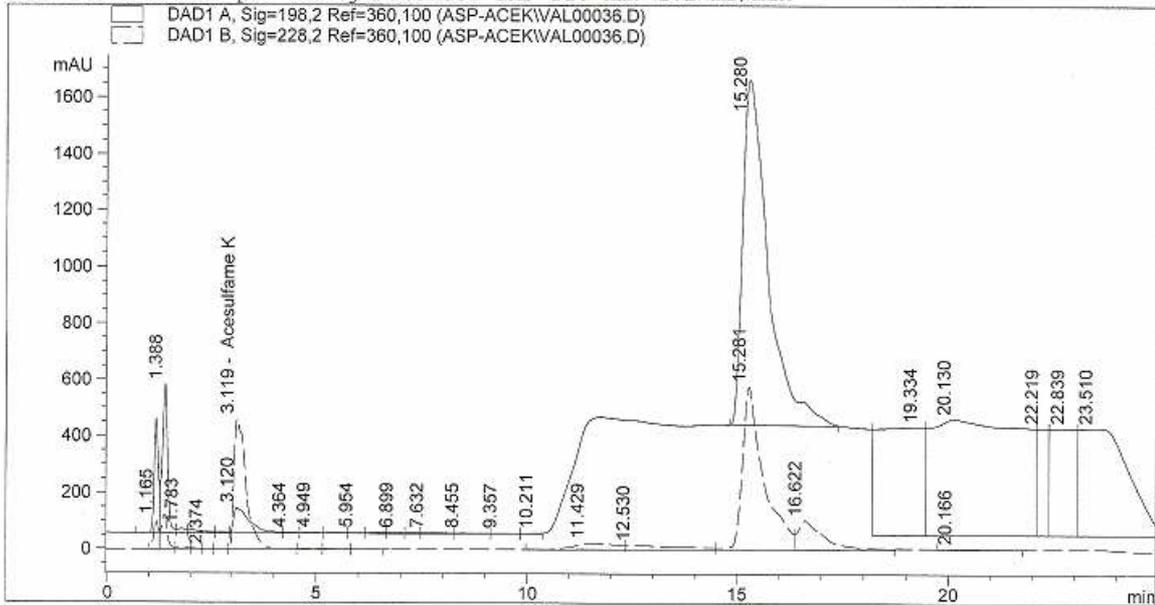
Operador : JESSON MORALES

Método de Adquisición : ASP-ACEK.M

Método de Análisis : C:\HPCHEM\1\METHODS\LAZ\ASP-ACEK.M

Último cambio : Sat, 15. Sep. 2007, 10:33:24 pm

Metodo para cuantificación de aspartame y acesulfame-k
 C18. MeOH-buffer pH4 con gradiente. DAD 210 nm. 1.2 ml/min



Resumen de concentración de compuestos

Compuestos ordenados según : Signal
 Fecha de Modificación de tabla de calibración: Sat, 15. Sep. 2007, 02:36:09 pm
 Picos no Calibrados : No reportados

Señal	#	Tiempo	Area	Concentración (ug/mL)	Nombre del compuesto
DAD1	1	3	9245.013	163.779	Acesulfame K

Señal	#	Tiempo	Area	Concentración (ug/mL)	Nombre del compuesto
DAD1	1	0	0.000	0.000	Aspartame

*** Fin del Reporte ***

Anexo 25. Cromatograma bebida marca "W"

Archivo: C:\HPCHEM\1\DATA\ASP-ACEK\VAL00030.D

Sample Name:DLF

Muestra marca "W"

Fecha de Inyección: Sat, 15. Sep. 2007

Muestra : DLF

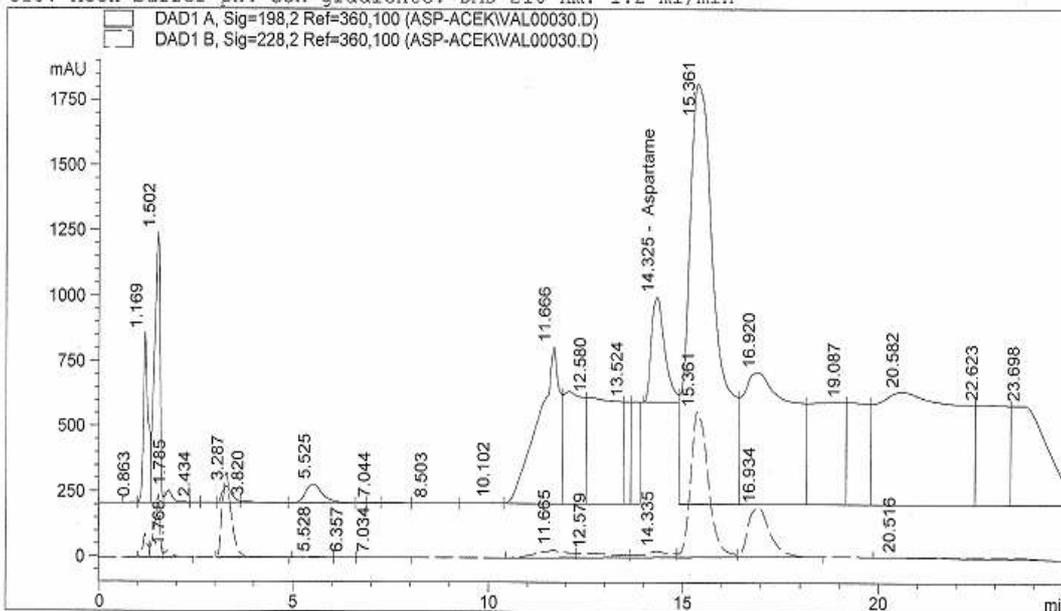
Operador : JESSON MORALES

Método de Adquisición : ASP-ACEK.M

Método de Análisis : C:\HPCHEM\1\METHODS\LAZ\ASP-ACEK.M

Último cambio : Sat, 15. Sep. 2007, 10:33:24 pm

Metodo para cuantificación de aspartame y acesulfame-k
 Cl8. MeOH-buffer pH4 con gradiente. DAD 210 nm. 1.2 ml/min



Resumen de concentración de compuestos

Compuestos ordenados según : Signal
 Fecha de Modificación de tabla de calibración: Sat, 15. Sep. 2007,02:36:09 pm
 Picos no Calibrados : No reportados

Señal	#	Tiempo	Area	Concentración (ug/mL)	Nombre del compuesto
DAD1	1	3	5270.855	92.498	Acesulfame K

Señal	#	Tiempo	Area	Concentración (ug/mL)	Nombre del compuesto
DAD1	1	14	9561.935	162.383	Aspartame

*** Fin del Reporte ***

Anexo 26. Cromatograma bebida marca "Z"

Archivo: C:\HPCHEM\1\DATA\ASP-ACEK\VAL00019.D

Sample Name: Recuperación->

Muestra marca "Z"

Fecha de Inyección: Sat, 15. Sep. 2007

Muestra : Recuperación 500

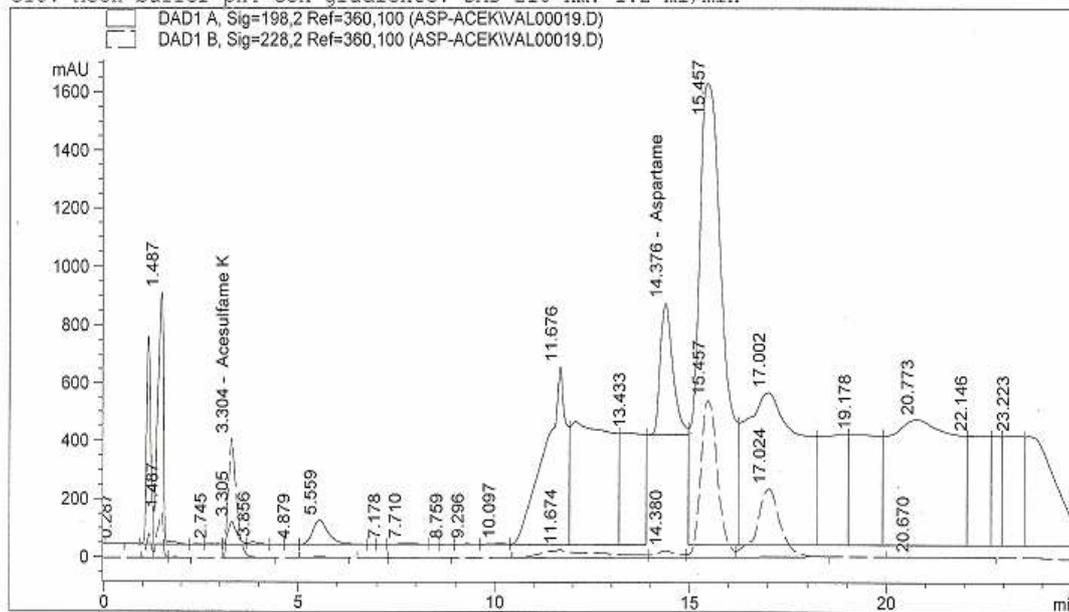
Operador : Rafael López

Método de Adquisición : ASP-ACEK.M

Método de Análisis : C:\HPCHEM\1\METHODS\LAZ\ASP-ACEK.M

Último cambio : Sat, 15. Sep. 2007, 10:33:24 pm

Metodo para cuantificación de aspartame y acesulfame-k
C18. MeOH-buffer pH4 con gradiente. DAD 210 nm. 1.2 mL/min



Resumen de concentración de compuestos

Compuestos ordenados según : Signal

Fecha de Modificación de tabla de calibración: Sat, 15. Sep. 2007,02:36:09 pm

Picos no Calibrados : No reportados

Señal	#	Tiempo	Area	Concentración (ug/mL)	Nombre del compuesto
DAD1	1	3	5978.225	105.186	Acesulfame K

Señal	#	Tiempo	Area	Concentración (ug/mL)	Nombre del compuesto
DAD1	1	14	10142.448	172.367	Aspartame

*** Fin del Reporte ***

Anexo 27. Cromatograma bebida marca "Y"

Archivo: C:\HPCHEM\1\DATA\ASP-ACEK\VAL00051.D

Sample Name:SPT-B

Muestra marca "Y"

Fecha de Inyección: Sun, 16. Sep. 2007

Muestra : SPT-B

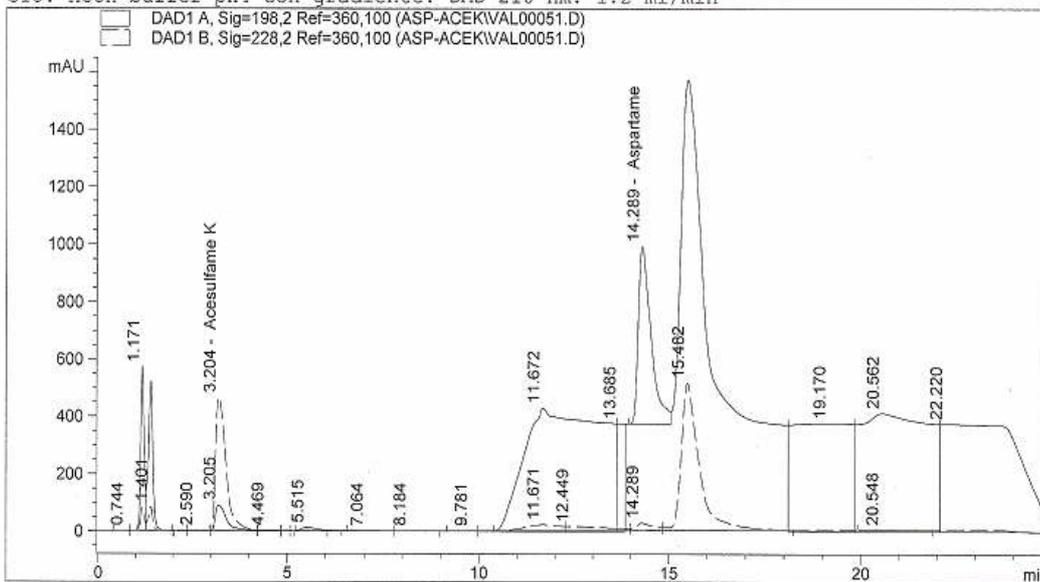
Operador : JESSON MORALES

Método de Adquisición : ASP-ACEK.M

Método de Análisis : C:\HPCHEM\1\METHODS\LAAZ\ASP-ACEK.M

Último cambio : Sat, 15. Sep. 2007, 10:33:24 pm

Metodo para cuantificación de aspartame y acesulfame-k
 C18. MeOH-buffer pH4 con gradiente. DAD 210 nm. 1.2 ml/min



Resumen de concentración de compuestos

Compuestos ordenados según : Signal
 Fecha de Modificación de tabla de calibración: Sat, 15. Sep. 2007,02:36:09 pm
 Picos no Calibrados : No reportados

Señal	#	Tiempo	Area	Concentración (ug/mL)	Nombre del compuesto
DAD1	1	3	8844.425	156.594	Acesulfame K

Señal	#	Tiempo	Area	Concentración (ug/mL)	Nombre del compuesto
DAD1	1	14	14428.569	246.086	Aspartame

*** Fin del Reporte ***

Anexo 28. Cromatograma bebida marca "X"

Archivo: C:\HPCHEM\1\DATA\ASP-ACEK\VAL00047.D

Sample Name: CALD-A

Muestra marca "X"

Fecha de Inyección: Sun, 16. Sep. 2007

Muestra : CALD-A

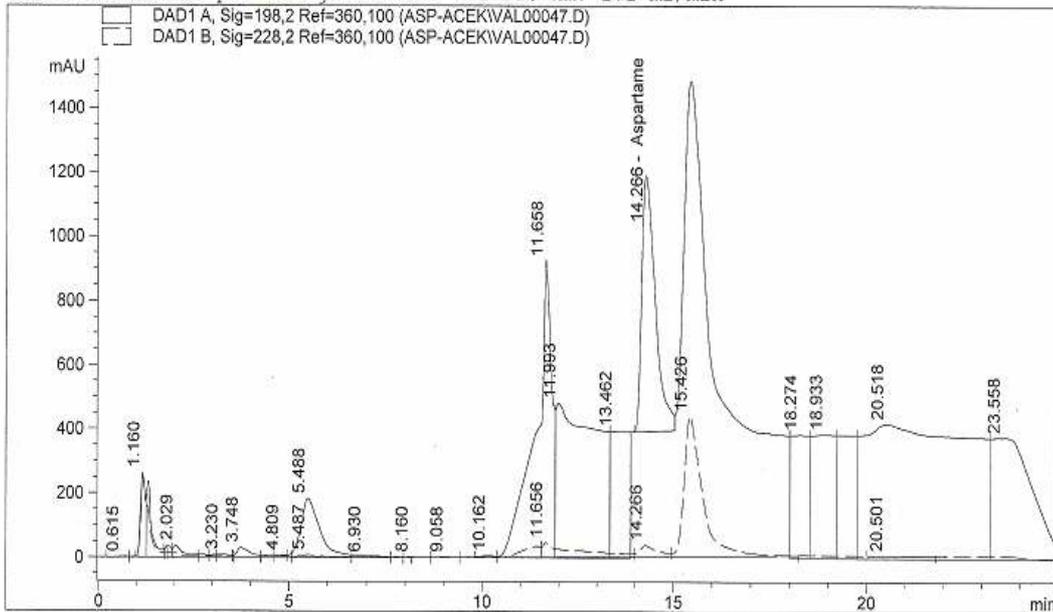
Operador : JESSON MORALES

Método de Adquisición : ASP-ACEK.M

Método de Análisis : C:\HPCHEM\1\METHODS\LAAZ\ASP-ACEK.M

Último cambio : Sat, 15. Sep. 2007, 10:33:24 pm

Método para cuantificación de aspartame y acesulfame-k
 C18. MeOH-buffer pH4 con gradiente. DAD 210 nm. 1.2 ml/min



Resumen de concentración de compuestos

Compuestos ordenados según : Signal
 Fecha de Modificación de tabla de calibración: Sat, 15. Sep. 2007,02:36:09 pm
 Picos no Calibrados : No reportados

Señal	#	Tiempo	Area	Concentración (ug/mL)	Nombre del compuesto
DAD1	1	3	54.981	0.000	Acesulfame K

Señal	#	Tiempo	Area	Concentración (ug/mL)	Nombre del compuesto
DAD1	1	14	19616.334	335.313	Aspartame

*** Fin del Reporte ***