



UNIVERSIDAD DE JAÉN
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

Trabajo Fin de Grado

Estudio del metabolismo de la sucralosa en orina

Alumna: Inmaculada Molina Pérez

Septiembre, 2014



UNIVERSIDAD DE JAÉN

FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

GRADO EN QUÍMICA

Trabajo Fin de Grado

**Estudio del metabolismo de la sucralosa en
orina**

Trabajo Fin de Grado presentado por

Inmaculada Molina Pérez

Jaén, Septiembre de 2014

Fdo. Inmaculada Molina Pérez

Índice

Abstract/Resumen.....	ii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. La sucralosa: historia.....	1
1.2. Propiedades físico-químicas.....	2
1.3. Salud.....	4
1.4. Tipos de productos que contienen sucralosa.....	5
1.5. Estructura química.....	6
1.6. Síntesis.....	6
1.7. Farmacocinética.....	7
1.8. Metabolismo.....	7
1.9. Métodos de determinación de la sucralosa.....	12
1.10. Objetivos del trabajo.....	18
2. TRABAJO EXPERIMENTAL.....	18
2.1. Reactivos:.....	18
2.2. Aparataje:.....	18
2.3. Muestras de orina.....	19
2.4. Extracción en fase sólida (SPE).....	20
2.5. Cromatografía de líquidos/espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo (LC-TOF-MS).	22
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
3.1 Método para la determinación de sucralosa en orina.....	24
3.1.1. Parámetros analíticos del método.....	27
3.2 Estudio del metabolismo.....	28
3.3 Identificación de metabolitos.....	30
4. CONCLUSIONES.....	34

Abstract

Sucralose is a non-nutritive sweetener that is approximately 600 times sweeter than table sugar used in a broad range of foods and beverages. In this work, a methodology for the chromatographic separation and analysis of sucralose in urine samples was developed using liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry (LC/TOF-MS). The sweetener was extracted from urine samples using solid-phase extraction (SPE) with polymeric cartridges (PLEXA). The presence of the sweetener was confirmed by accurate mass measurements of the deprotonated molecule $[M-H]^-$ and its sodium and chlorine adducts. In order to estimate the amount of sucralose ingested and the percentage of sucralose excreted, quantitation was carried out using matrix-matched standard calibration. Finally, the analysis of these urine samples confirmed that sucralose is not metabolized easily in the body and only a small amount (approx. 15%) is excreted unaltered in urine. In addition, sucralose undergoes glucuronide conjugation (confirmed with the identification of the corresponding metabolite in urine).

Resumen

La sucralosa es un edulcorante no nutritivo y es aproximadamente 600 veces más dulce que el azúcar de mesa. Se utiliza en un amplio rango de comidas y bebidas. En este trabajo, se desarrolló una metodología para la separación cromatográfica y el análisis de la sucralosa en muestras de orina empleando cromatografía líquida/tiempo de vuelo-espectrometría de masas (LC/TOF-MS). El edulcorante se extrajo de las muestras de orina empleando extracción en fase sólida (SPE) con cartuchos poliméricos (PLEXA). La presencia del edulcorante se confirmó mediante medidas de masa exacta de la molécula desprotonada $[M-H]^-$ y sus aductos de sodio y cloro. Para estimar la cantidad de sucralosa ingerida y el porcentaje de sucralosa excretada, la cuantificación se llevó a cabo usando calibración estándar con ajuste matricial. Por último, el análisis de estas muestras de orina confirmó que la sucralosa no se metaboliza fácilmente en el cuerpo y sólo una pequeña cantidad (aprox. 15%) se excreta inalterada en la orina. Además, la sucralosa sufre conjugación glucurónica (confirmado con la identificación del correspondiente metabolito en la orina).

1. INTRODUCCIÓN

Los edulcorantes pueden dividirse en dos grupos principales: compuestos calóricos, o nutritivos, y compuestos no calóricos o no nutritivos. Los edulcorantes nutritivos son los carbohidratos o sus derivados como glucosa, fructosa y maltosa. Los edulcorantes no nutritivos no pertenecen a ningún grupo químico particular y se conocen habitualmente como edulcorantes artificiales. Los edulcorantes sintéticos están continuamente aumentando en importancia con un incremento en la conciencia pública sobre la diabetes y sus necesidades dietéticas especiales, y con más consumidores cada vez más preocupados por la obesidad y la caries. Los edulcorantes sintéticos más usados frecuentemente son: sacarina, ciclamato, aspartamo y sucralosa. Los edulcorantes artificiales son ampliamente usados en todo el mundo, y algunos de ellos tienen una larga historia. Tienen un sabor parecido al azúcar de caña, pero son bajos en calorías. Son también más baratos que el azúcar natural y pueden reducir el coste de algunas comidas y bebida [1].

1.1. La sucralosa: historia

La sucralosa fue descubierta accidentalmente en 1976 por Shashikant Phadnis, un estudiante que se graduó en la Universidad de King en Reino Unido. Phadnis participó en un equipo con investigadores del Queen Elizabeth College, de la Universidad de Londres, que buscaban sintetizar azúcares halogenados. Durante una parte del experimento, debido a la dificultad de interpretar el inglés, él erróneamente ejecutó una tarea, clorar el azúcar, y en lugar de realizarle las pruebas correspondientes, lo probó. En 1989, los científicos Leslie Hough y Khan, sucesivamente, evaluaron los diferentes efectos de los edulcorantes derivados de la sacarosa, cuando se encontraron un vínculo con determinados halógenos [2].

La molécula resultante presenta una alta estabilidad frente a la degradación en condiciones ácidas y de temperaturas altas así como hidrólisis

enzimática. La estabilidad química de la sucralosa la hace adecuada como azúcar sustituto versátil en procesos de producción de alimentos. Esta propiedad físico-química también le confiere resistencia a la digestión humana y elimina la sucralosa como una fuente de energía potencial. La sucralosa ha sido aprobada como edulcorante en muchos países [3].

En 1991, el servicio de protección de la salud de Canadá se convirtió en la primera agencia nacional reguladora que aprueba la seguridad de la sucralosa y permite su uso en comidas y bebidas. En 1998, la administración de comidas y medicamentos (FDA) de los Estados Unidos aprobó el uso de la sucralosa en 15 categorías de comidas y bebidas(la más amplia aprobación inicial jamás dada a un aditivo). Más tarde, en 1999, la FDA amplió la aprobación para permitir el uso de la sucralosa como un edulcorante de uso común en todas las comidas, bebidas, suplementos dietéticos y alimentos médicos. En 2004, la Unión Europea modificó su directiva de edulcorantes para permitir el uso de la sucralosa en un amplio rango de productos [4]. Se comercializa bajo diversas marcas como *Splenda* y en la Unión Europea se le conoce con el código aditivo E-955.

Su uso está permitido ahora en más de 60 países y lo consumen millones de personas a lo largo del mundo. Actualmente se usa en más de 4000 productos como un edulcorante no calórico, incluyendo bebidas, productos lácteos, panadería, confitería y productos farmacéuticos. El consumo diario de sucralosa aceptable es 5 mg/kg según lo establecido por la FDA [5].

Sin embargo, investigaciones científicas han mostrado que algunos edulcorantes artificiales pueden causar tumores en ciertos animales, de modo que para prevenir el peligro potencial en humanos, es necesario controlar la cantidad de edulcorantes en comidas y bebidas. Las regulaciones fijan un alto límite en la concentración de edulcorantes artificiales en comidas y bebidas. Por otra parte, las etiquetas de comidas y bebidas deberían registrar qué tipos de edulcorantes usan [6].

1.2. Propiedades físico-químicas

La sucralosa es un polvo cristalino blanco prácticamente inodoro que es fácilmente soluble en agua y tiene una alta temperatura de fusión.

Tabla 1. Propiedades físico-químicas de la sucralosa

Número de registro CAS	56038-13-2
Número EC	259-952-2
Fórmula química	$C_{12}H_{19}Cl_3O_8$
Peso molecular (g/mol)	397,64
Punto de fusión (°C)	236,8
Presión de vapor (mm Hg)	$3,25 \times 10^{-14}$
Solubilidad en agua (g/L, a 20 °C)	282
Constante Ley de Henry (atm·m ³ /mol)	$3,99 \times 10^{-19}$
Log K _{ow} (coeficiente octanol-agua, 20 °C)	-0,492
Log K _{aw} (coeficiente aire-agua)	-16,8
Log K _{oc} (coeficiente suelo-carbón orgánico)	-0,7 a 1,0
Log BCF (factor de bioconcentración)	0,5

El compuesto tiene baja la presión de vapor, la constante de la Ley de Henry, el coeficiente de partición octanol-agua y el coeficiente de partición aire-agua que mejoran la estabilidad y presencia del compuesto en agua. La sucralosa se hidroliza lentamente en dos monosacáridos 1,6-diclorofructosa (1,6-DCF) y 4-clorogalactosa (4-CG) bajo condiciones ácidas severas y su formación es improbable que se produzca en los escenarios de exposición normales en las aguas naturales [7].

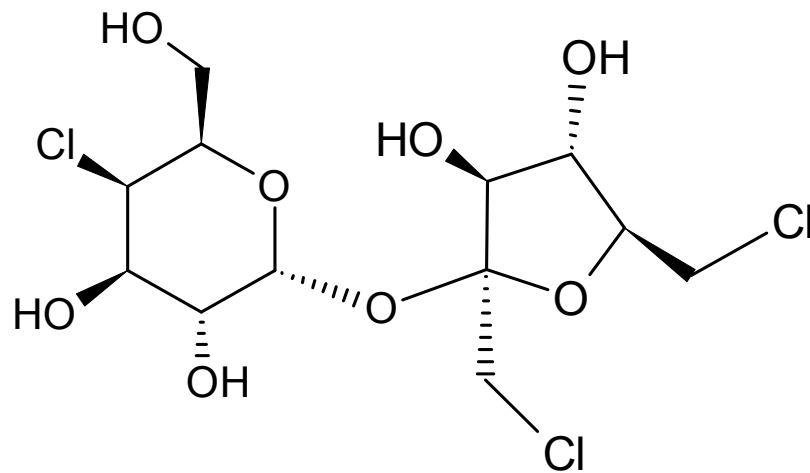


Figura 1. Estructura química de la sucralosa (4-cloro-4-desoxi- α -D-galactopiranosido de 1,6-dicloro-1,6-didesoxi- β -D-fructofuranosilo).

1.3. Salud

- La sucralosa no aporta calorías.
- El cloro (en forma de cloruro) que contiene la sucralosa no es dañino porque su incorporación a la molécula es lo que libera a la sucralosa de calorías. El cloro transforma a la molécula de sucralosa en inerte, química y biológicamente, por lo que el elemento atraviesa el cuerpo sin ser metabolizado y se elimina después de su consumo.
- Numerosos estudios han demostrado que las personas diabéticas pueden consumir sucralosa con seguridad. No es reconocida por el cuerpo como si fuera azúcar ni tampoco como un hidrato de carbono y no la metaboliza para obtener energía y tampoco afecta los niveles de glucosa en sangre. No tiene efecto en la utilización que hace la sangre de la glucosa, en el metabolismo de los hidratos de carbono ni en la producción de insulina.
- También es segura tanto para niños como para mujeres embarazadas y en períodos de lactancia, pero siempre se recomienda su uso bajo recomendación médica [8].

1.4. Tipos de productos que contienen sucralosa

La sucralosa hace posible la elaboración de versiones de bajas calorías de una amplia variedad de productos, como por ejemplo, bebidas carbonatadas, helados, productos lácteos y horneados. Una de las particularidades de la sucralosa es que se puede usar como si fuera azúcar sin que pierda su sabor dulce, incluso en aplicaciones que requieren la exposición prolongada a altas temperaturas. Por lo tanto, los productos elaborados con sucralosa mantienen su sabor dulce durante los procesos de cocción y horneado, y aunque estén almacenados por períodos prolongados.

En los Estados Unidos, la FDA ha autorizado el uso de la sucralosa en 15 categorías de alimentos y bebidas:

- Productos horneados y mezclas para hornear
- Bebidas y bases para bebidas
- Goma de mascar
- Café y té
- Confituras y coberturas para pasteles dulces
- Sustitutos de productos lácteos
- Grasas y aceites (aderezos para ensaladas)
- Postres lácteos congelados y mezclas para prepararlos
- Helados de fruta y de agua
- Gelatinas, flanes y rellenos
- Mermeladas y jaleas
- Productos lácteos
- Frutas y zumos de frutas procesados
- Sustitutos del azúcar
- Salsas, coberturas y jarabes dulces [9].

1.5. Estructura química

La sucralosa se obtiene de la sustitución selectiva de tres grupos hidroxilo de la sacarosa (azúcar de mesa) por tres átomos de cloro. Esta sustitución implica la inversión de la configuración del carbono 4 desde la forma gluco- al análogo galacto-. La molécula resultante es pequeña, altamente hidrosoluble, polihidroxilada y 600 veces más dulce que la sacarosa. No es lipofílica [10].

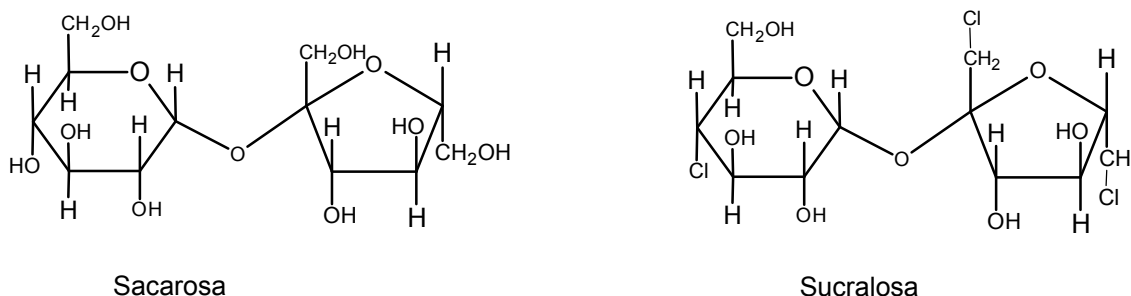


Figura 2. Estructura química de la sacarosa y la sucralosa

1.6. Síntesis

Podemos encontrar dos rutas sintéticas principales para la obtención de sucralosa.

La primera ruta sintética tiene 6 pasos fundamentales los cuales son:

1. Tritilación: Reacción de la sacarosa (S) con un agente tritilante (TriCl) para dar el 6,1',6'-tri-O-tritylsucrose (TRIS).
2. Acetilación del producto de reacción tritilado (TRIS) para dar el 6,1',6'-tri-O-tritylsucrose penta-acetate (TRISPA).
3. Detritilación del producto de reacción acetilado (TRISPA) para dar el 2, 3, 4,3',4'-penta-O-acetylsucrose (4-PAS).
4. Isomerización del penta-acetato resultante (4-PAS) para dar el 2, 3, 6,3',4'-penta-O-acetylsucrose (6-PAS).
5. Cloración del producto isomerizado (6-PAS) para dar el 4,1',6'-trichloro-4,1',6'-trideoxygalactosucrose pentaacetate (TGS-penta-acetato).

6. Deacetilación del producto de reacción clorado (TGS-penta-acetato) para dar la 4,1',6'-Tricloro-4,1',6'-trideoxy-galacto-sucrosa (TGS).

La segunda ruta sintética tiene tres pasos fundamentales:

- a) Acilación: Reacción de la sacarosa (S) con un agente acilante bajo condiciones tales para producir una mezcla de derivados de la sacarosa acilados que contiene una mayor proporción de material 6-monoacilado (S-6-éster).
- b) Cloración: Reacción del (S-6-éster) con un agente clorante capaz de clorar a las posiciones 1',4 y 6' del (S-6-éster).
- c) Deacilación y separación de la 4,1',6'-trichloro-4,1',6'-trideoxygalactosucrose (TGS) del material formado [11].

1.7. Farmacocinética

Estudios del metabolismo confirman que la sucralosa no se bioacumula, debido a su mayor afinidad por los medios polares frente a los no polares. La mayoría de la sucralosa (aproximadamente 85%) no se absorbe, y se elimina sin cambios en las heces. De la pequeña cantidad restante de sucralosa que se absorbe (aproximadamente 15% de un consumo vía oral), la mayoría es también excretada sin cambios. Alrededor del 2-3% de un consumo vía oral sufre metabolismo de fase II, concretamente, glucuronidación. Tanto la sucralosa sin cambios como sus conjugados glucurónidos se excretan en la orina y se eliminan fácilmente sin bioacumularse [12].

1.8. Metabolismo

Aunque el metabolismo es esencialmente un mecanismo de detoxificación, en ciertos casos produce todo lo contrario, es decir la toxicidad de un fármaco ya que pueden formar precisamente metabolitos tóxicos.

Por otro lado muchos compuestos denominados profármacos son inactivos y se activan a fármacos mediante procesos metabólicos, o bien puede ocurrir que la metabolización produzca cambios de la concentración farmacológica de un compuesto. Por todo ello, el conocimiento y predicción del metabolismo son esenciales en el desarrollo de fármacos.

Las biotransformaciones de los fármacos se pueden clasificar en dos grandes grupos:

- a) **Reacciones en fase I:** dirigidas a la formación de metabolitos más hidrosolubles por desenmascaramiento o introducción de grupos polares como el $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$.

Las reacciones en fase I son catabólicas (oxidación, reducción, hidrólisis) y suelen ser productos con una mayor reactividad química y paradójicamente pueden ser más tóxicos o carcinogénicos que anteriormente.

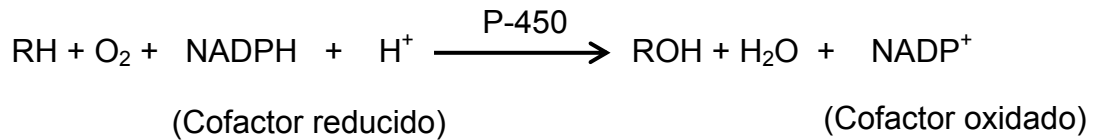
- b) **Reacciones en fase II:** que completan a las anteriores con la formación de conjugados con ácido sulfúrico, glucurónico o aminoácidos con los grupos polares existentes o creados en fase I, así se forman especies más hidrosolubles que se eliminan por vía renal. Las reacciones en fase II son anabólicas (sintéticas) y se suelen dar productos inactivos (con algunas excepciones como por ejemplo el sulfato de minoxidilo).

Las reacciones en fase I y II se producen en su mayor parte en el hígado.

REACCIONES EN FASE I

1. Reacciones de oxidación

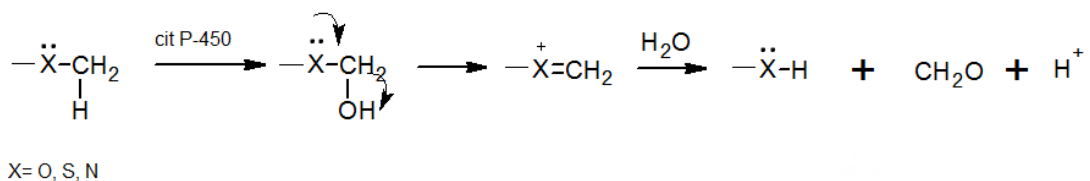
Los principales catalizadores de las reacciones de oxidación son los citocromos P-450, que son hemoproteínas. El proceso de oxidación de un fármaco RH se puede esquematizar:



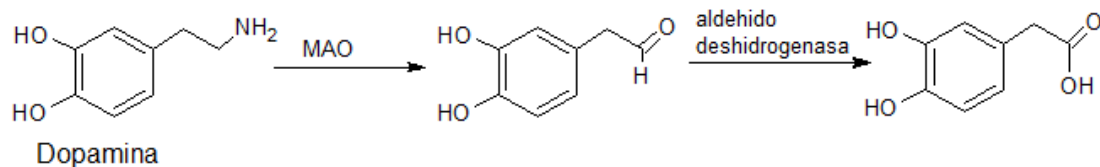
La facilidad de oxidación es paralela a la que cabría esperar por la acción de los reactivos químicos. Así se oxidan las posiciones arílicas, bencílicas, aromáticas, alquílicas, oxidación de aminas y O-, S- y N-desalquilaciones.

- 1) Las posiciones α del carbonilo experimentan oxidación.
- 2) Las oxidaciones aromáticas tienen lugar en la posición activada de los anillos frente al ataque electrofílico. La presencia de grupos e-donantes la favorecen mientras que un anillo con grupos e-atrayentes está desactivado y se dificulta su oxidación. Cuando hay más de un anillo la oxidación tiene lugar preferentemente sobre el más activado y en *para*- (porque es la posición más activada y con menos impedimento estérico).

Las O-, S- y N-desalquilaciones son reacciones de hidroxilación que tienen lugar sobre el carbono en α del heteroátomo y van seguidas de hidrólisis. El mecanismo propuesto es:



Existen otros procesos de oxidación metabólica catalizados por sistemas enzimáticos diferentes del citocromo P₄₅₀ como por ejemplo la desaminación oxidante de la dopamina:



La reacción más frecuente de las aminas primarias es la desaminación oxidativa por la acción de la monoaminoxidasa (MAO) en las aminas no sustituidas en α .

2. Reacciones de reducción

Aunque el principal camino metabólico de los fármacos en los mamíferos es el de la oxidación, determinados compuestos cuyos grupos funcionales son los grupos azo, nitro y carbonilo, tienden a biotransformarse por reducción hacia otros grupos funcionales como el amino y el hidroxilo, directamente susceptibles de conjugación.

3. Reacciones de hidrólisis

Es la forma inmediata de metabolismo de los ésteres y amidas y tiene lugar por acción de las esterasas y amidasas que están muy extendidas en el organismo.

REACCIONES EN FASE II

1. Reacciones de conjugación

Tienen lugar mediante la reacción de grupos polares existentes en un fármaco y H_2SO_4 , ácido glucurónico, glutatión, azúcares o aminoácidos como la glicina y también acetilación y metilación, dando compuestos directamente excretables. Posiblemente la conjugación con el ácido glucurónico sea la más importante de todas las reacciones en fase II. Esto es probablemente debido a que hay un buen suministro de ácido glucurónico en el organismo. Se ha encontrado que numerosos alcoholes, fenoles, aminas, tioles y algunos ácidos carboxílicos se

metabolizan por medio de esta vía. El xenobiótico reacciona con la forma activada del ácido glucurónico, el ácido glucurónico uridina difosfato (UDPGA, en inglés), para formar un conjugado glucurónico muy soluble en agua (**Figura 3**). La reacción esta catalizada por medio de uridina difosfato glucuronil tranferasas (UPDG transferasas).

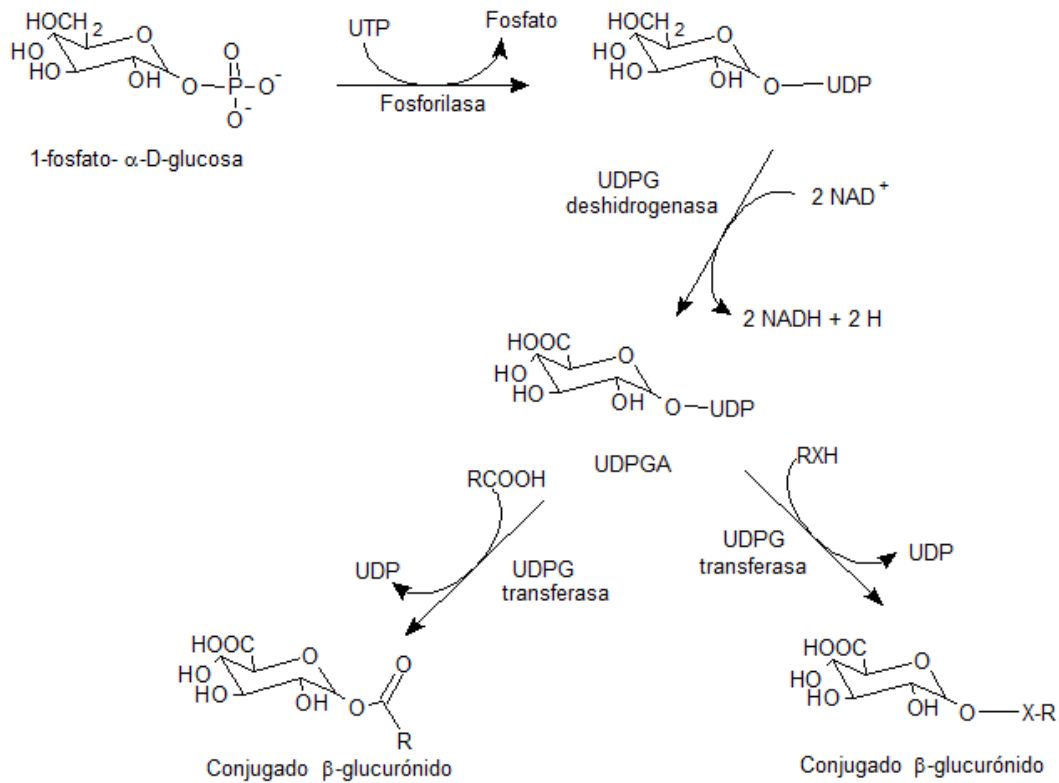


Figura 3. Esquema del mecanismo de la formación de los conjugados de glucurónidos. UTP es la uridina trifosfato y X es O (alcoholes y fenoles), S (tioles) o NH (aminas).

La reacción tiene lugar sobre el carbono anomérico del ácido glucurónico dando lugar a acetales.

Ciertos aminoácidos participan en la reacción de metabolitos de fase II a partir de ácidos carboxílicos aromáticos. La glicina es el aminoácido que interviene comúnmente en estas conjugaciones.

La acetilación es la principal vía de metabolización para los grupos amino y esta mediada por el acetyl-CoA.

2. Reacciones de conjugación con el glutatión

El glutatión es un tripéptido que contiene un grupo tiol de gran importancia en la detoxificación de fármacos y xenobióticos. En el cuerpo existe en un equilibrio entre la forma reducida (GSH) y una forma oxidada (GS-GS). Las reacciones de conjugación del GSH están catalizadas por glutatión transferasas. La reactividad conjugadora del GSH se debe al grupo tiol (pK_a 9,0), que lo hace un nucleófilo muy eficaz. El carácter nucleófilo se aumenta notablemente mediante desprotonación a una forma de tiolato. Una vez formados los conjugados de GSH se pueden excretar como tales, pero normalmente sufren posteriores biotransformaciones. La rotura de los restos de glutamilo y de cisteinilo por medio de peptidasas deja un conjugado de cisteína, que puede ser N-acetilado para dar lugar a un conjugado de N-acetilcisteína. El último tipo de conjugados se conoce como ácidos mercaptúricos.

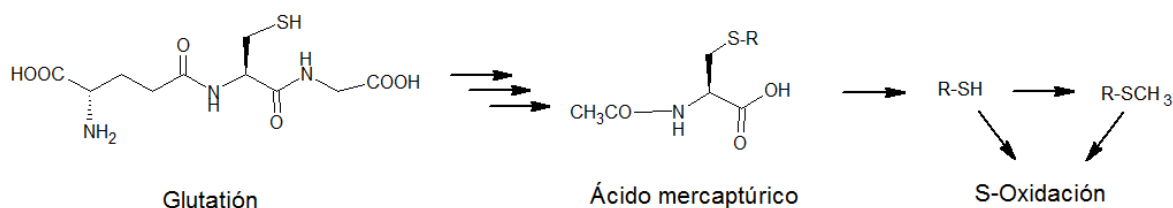


Figura 4. Rotura del glutatión

El GSH se adiciona a compuestos carbonílicos α,β -insaturados, siendo un caso típico como sustrato xenobiótico el compuesto tóxico acroleína. El ataque ocurre sobre el grupo CH₂ activado. Las quinonas (*orto*- y *para*-) y las iminoquinonas están muy relacionadas estructuralmente con los compuestos carbonílicos α, β -insaturados [13].

1.9. Métodos de determinación de la sucralosa

A continuación se presenta una clasificación de los posibles métodos para la determinación de la sucralosa, divididos en tres grandes grupos:

métodos espectroscópicos, métodos cromatográficos y determinación en fluidos corporales y tejidos mediante métodos cromatográficos.

Tabla 2. Métodos para la determinación de la sucralosa.

Métodos espectroscópicos [14]	<ul style="list-style-type: none"> • Técnica de preparación de la muestra: sin preparación previa • Muestra: sucralosa • Método de determinación: investigación cinética de la reacción de oxidación de la droga con permanganato potásico alcalino a T^a ambiente durante un tiempo fijado de 30 min. 	
	<ul style="list-style-type: none"> • Técnica de preparación de la muestra: sin preparación previa • Muestra: sucralosa • Método de determinación: la reacción de la sucralosa con sulfato de amonio y cerio (IV) en presencia de ácido perclórico con la posterior medición del exceso sin reaccionar del sulfato de amonio y cerio (IV) a 320 nm en un tiempo fijado de 30 min en un baño de agua con termostato a 60 ± 1°. 	
Métodos cromatográficos	Cromatografía de capa fina	<ul style="list-style-type: none"> • Técnica de preparación de la muestra: después de la preparación de la muestra, se llevó a cabo la separación en paralelo de hasta 7 muestras en una placa HPTLC de gel de sílice 60 F254 con una mezcla de isopropil acetato, metanol y agua (15:3:1, v/v/v) en 15 min. • Muestra: sucralosa en agua • Método de determinación: HPTLC [15].
		<ul style="list-style-type: none"> • Técnica de preparación de la muestra: para bebidas no carbonatadas, una porción de la muestra fue diluida con metanol/agua. Para bebidas carbonatadas, una porción de la muestra se desgasificó en un baño de ultrasonido antes de la dilución • Muestra: sucralosa en bebidas carbonatadas y no carbonatadas • Método de determinación: HPTLC en el cual la derivatización libre de reactivo es seguido por una detección UV/fluorescencia [16].
		<ul style="list-style-type: none"> • Técnica de preparación de la muestra: la densimetría se llevó a cabo o a 500nm después de la derivatización post-cromatográfica con el reactivo de ácido sulfúrico 2-naftol o a 405 nm después de la derivatización post-cromatográfica con el reactivo de ácido ortofosfórico difenilamina anilina. • Muestra: sucralosa en pasteles y galletas dietéticas • Método de determinación: HPTLC [17].
		<ul style="list-style-type: none"> • Técnica de preparación de la muestra: la

		<p>sucralosa fue separada en un plato de sílica gel sin ningún tratamiento prioritario de plato para analizar, derivatizada con ácido sulfúrico-rodamina y detectado densitométricamente a 456 nm como la banda verde oliva.</p> <ul style="list-style-type: none"> Muestra: determinación de sucralosa en diferentes matrices como bebidas con cola, zumos de limón, dulces sin azúcar, edulcorantes de mesa, etc. <p>Método de determinación: UV/fluorescencia [18].</p>
		<ul style="list-style-type: none"> Técnica de preparación de la muestra: el método requiere poca o ninguna preparación de la muestra para aislar o concentrar el analito. Muestra: sucralosa en varias matrices de comida <p>Método de determinación: cromatografía de capa fina (TLC) [19].</p>
	Cromatografía de gases [20]	<ul style="list-style-type: none"> Técnica de preparación de la muestra: la sucralosa fue convertida a su éter trimetilsilil Muestra: sucralosa Método de determinación: GC-MS (cromatografía de gases-espectrometría de masas) y GC-FID (cromatografía de gases-detector de ionización de llama).
	HPLC	<ul style="list-style-type: none"> Técnica de preparación de la muestra: los edulcorantes fueron extraídos de las muestras de agua usando cartuchos de extracción en fase sólida (SPE) Muestra: edulcorantes en muestras de agua y bebidas Método de determinación: LC/TOF-MS [21].
		<ul style="list-style-type: none"> Técnica de preparación de la muestra: - Muestra: sucralosa Método de determinación: combinación de cromatografía de fase inversa y un detector de índice refractivo (RID) [22].
		<ul style="list-style-type: none"> Técnica de preparación de la muestra: la extracción y limpieza se llevó a cabo con SPE utilizando columnas Oasis HBL. La detección se realizó con LC/MS. Muestra: analizar sucralosa en muestras de efluentes de una planta de tratamiento experimental de aguas residuales (STP) Método de determinación: cromatografía líquida [23].
<ul style="list-style-type: none"> Técnica de preparación de la muestra: ionización selectiva grabada con warfarina sódica Muestra: edulcorantes en comidas Método de determinación: HPLC acoplado con ESI-MS [24]. 		

		<ul style="list-style-type: none"> • Técnica de preparación de la muestra: calibración externa, así como la dilución de isotopos con estándar interno de sucralosa deuterada d₆ • Muestra: sucralosa en aguas superficiales europeas • Método de determinación: SPE-cromatografía líquida-espectrometría de masa triple cuadrupolo [25].
		<ul style="list-style-type: none"> • Técnica de preparación de la muestra:- • Muestra: análisis de sucralosa de las plantas de tratamiento de agua potable (DWTP) • Método de determinación: LC-MS/MS [26].
		<ul style="list-style-type: none"> • Técnica de preparación de la muestra: extracción de los nueve edulcorantes con una solución tampón, limpieza de la muestra usando cartuchos de extracción en fase sólida (SPE) seguido por un análisis HPLC-ELS • Muestra: edulcorantes en refrescos carbonatados y no carbonatados, frutas enlatadas o embotelladas y yogurt • Método de determinación: HPLC con una detección de dispersión de luz evaporativa (HPLC-ELSD) [27].
		<ul style="list-style-type: none"> • Siete laboratorios se unieron para validar el método analítico anterior [28].
		<ul style="list-style-type: none"> • Técnica de preparación de la muestra: muestras homogeneizadas o trituradas se envasaron en un tubo de celulosa con 0.01 mol/L de ácido clorhídrico conteniendo 10% en cloruro sódico y se dializaron frente a 0.01 mol/L de ácido clorhídrico durante 24h. El dializado se pasó a través de un cartucho y luego este fue lavado con 0.2 mol/L de NaOH y agua. Se eluyó la sucralosa del cartucho con metanol. El extracto se llevó a sequedad en un evaporador y el residuo se volvió a disolver en agua. La sucralosa se separó en una columna con una fase móvil de acetonitrilo-agua (15:85) y un detector RI (Refractive Index) • Muestra: sucralosa en varias comidas • Método de determinación: RI-HPLC y cromatografía iónica con un detector amperométrico pulsado (PAD-IC) [29].
		<ul style="list-style-type: none"> • Técnica de preparación de la muestra: convertimos la sucralosa en un derivado absorbente UV, que posee una fuerte absorción a 260 nm, por tratamiento con cloruro p-nitrobenzoil. Las muestras homogeneizadas fueron dializadas y lavadas con un cartucho Bond Elut ENV, luego el eluido se evaporó a sequedad y el residuo fue derivatizado. Posteriormente, el derivado de sucralosa se purificó con

		<p>hexano-acetato de etilo (9:1) en un cartucho de sílice, y luego se eluyó con acetona. La HPLC se llevó a cabo en una columna de fenilo, usando acetonitrilo-agua (73:27) como fase móvil con detección UV (260nm)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Muestra: sucralosa en comidas • Método de determinación: HPLC usando derivatización pre-columna [30].
	<p>Cromatografía de intercambio de iones</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Técnica de preparación de la muestra: la sucralosa se determinó en dos productos comerciales sin preparación de la muestra usando cromatografía acoplada con PAD (detector amperométrico de pulsos) • Muestra: Splenda y bebida sin azúcar • Método de determinación: cromatografía HPAE [31].
		<ul style="list-style-type: none"> • Técnica de preparación de la muestra: la sucralosa se extrajo con agua o metanol, y la solución extraída fue limpiada en un cartucho Sep-Pak Alúmina N. La separación AEC se llevó a cabo en una columna CarboPac PA1 usando una solución de 100 mmol/L de hidróxido sódico – 50 mmol/L de acetato sódico como fase móvil a una velocidad de flujo de 1 ml/min. La separación por HPLC de la fase inversa se llevó a cabo en una columna ODS-3V usando metanol-agua (25:75) como fase móvil a una velocidad de flujo de 1 ml/min. • Muestra: sucralosa en comidas • Método de determinación: cromatografía de intercambio aniónico (AEC) con detección amperométrica pulsada y HPLC de fase inversa con RID [32].
	<p>Electroforesis capilar</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Técnica de preparación de la muestra: sin ninguna limpieza de muestra a lo largo de un rango lineal de 42-1000 mg/L • Muestra: sucralosa en refrescos bajos en calorías • Método de determinación: electroforesis capilar con absorción indirecta UV en un tampón de ácido 3,5-dinitrobenzoico a pH 12,1 [33].
		<ul style="list-style-type: none"> • Técnica de preparación de la muestra: se obtuvo la separación de los componentes de la matriz en un electrolito de fondo de ácido dinitrobenzoico (3mM)/hidróxido sódico (20mM) con un pH de 12,1, un potencial de 0,11 kV/cm y una Tª de 22°C. La detección se logró a 238 nm por UV indirecta. Los test de screening, optimización y robustez fueron todos realizados con la ayuda del diseño experimental. Usando calibración de adición estándar, el método CZE se aplicó a bebidas carbonatadas, no carbonatadas y alcohólicas, yogurt y caramelos duros.

		<ul style="list-style-type: none"> • Muestra: sucralosa en matrices de comida • Método de determinación: electroforesis capilar de zona (CZE) [34].
		<ul style="list-style-type: none"> • Técnica de preparación de la muestra: la separación de la sucralosa y compuestos muy similares se logró por CEC con un empaquetado C18-sílice y la fase móvil con bajo contenido en materia orgánica • Muestra: sucralosa y compuestos de hidratos de carbono relacionados • Método de determinación: electrocromatografía capilar (CEC) [35].
<p>Determinación en fluidos corporales y tejidos</p>	<p>Métodos cromatográficos</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Técnica de preparación de la muestra: se añadió fenil-β-D-glucopiranosido (estándar interno) a 10 ml de orina, el cual luego pasó a través de un filtro de jeringa de 0,45μm. la elución fue con 30% de metanol (1ml/min) en una columna C18 de fase inversa. La detección fue por RI y la integración en base a las áreas de los picos • Muestra: sucralosa en orina • Método de determinación: HPLC-RID [36].

1.10. Objetivos del trabajo

Los objetivos de este trabajo fin de grado son:

- i. Poner a punto un método para la determinación de sucralosa en orina empleando una etapa de extracción en fase sólida seguida de cromatografía de líquidos/espectrometría de masas.
- ii. Revisitar el metabolismo urinario de la sucralosa en humanos y comparar los resultados frente a la escasa bibliografía disponible.
- iii. Identificar y proporcionar datos experimentales mediante medidas de masas exactas de los metabolitos principales que se han descrito en la escasa bibliografía disponible.

2. TRABAJO EXPERIMENTAL

2.1. Reactivos:

- Acetonitrilo (MeCN) de grado HPLC (Merck, Darmstadt, Germany)
- Metanol (MeOH) de grado HPLC (Merck, Darmstadt, Germany)
- Ácido fórmico (Fluka, Buchs, Switzerland).
- Agua de grado HPLC (Sistema de agua Mili-Q-Plus ultrapura de Millipore, Milford, MA)
- Sucralosa comercial
- Patrón de sucralosa obtenido de la marca Sigma Aldrich.

2.2. Aparataje:

- Evaporador Turbo Vap LP
- Vortex
- Pipetas automáticas
- Pipetas Pasteur
- Pie

- Pinzas
- Vasos de precipitado graduados de vidrio
- Vasos de precipitado graduados de plástico
- Soporte de pie
- Tubos de ensayo
- Rejillas
- Jeringas
- Filtros de jeringa
- Viales
- Cartuchos de SPE (BOND ELUT PLEXA 200mg 6mL 30PK)
- Recipientes de plástico desechable
- Sistema de cromatografía de líquidos/espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo (LC/TOF-MS)

2.3. Muestras de orina

Para el estudio del metabolismo urinario de la sucralosa en humanos, se siguieron las directrices del Comité de Bioética de la Universidad de Jaén utilizando el material de seguridad y tomando las precauciones adecuadas.

Para la ingesta de sucralosa, se adquirió un edulcorante líquido (El Corte Inglés). En un primer momento se calculó la concentración de sucralosa en dicho producto y en función del resultado se estimó una cantidad de 80 mg (1,2 mL de producto dosificados diluidos con 1L de agua). Dicha cantidad se encuentra por debajo del consumo mínimo diario recomendado por la FDA (5mg sucralosa/kg peso corporal).

La recogida de muestras se realizó durante las 24h posteriores (7 muestras). También se tomó una muestra de orina antes de haber ingerido la sucralosa, es decir, un blanco. Medimos el volumen de orina con unos vasos de plásticos graduados y tomamos una alícuota y lo almacenamos en frascos tipo “duquesa” hasta llegar a 2/3 del volumen de dichos recipientes. Cada frasco se etiquetaba correctamente. A continuación se muestra una tabla con el resultado:

Tabla 3. Evolución del volumen y el tiempo de las muestras de orina recogidas.

	Volumen (mL)	Tiempo (h)
Volumen 0 (primera toma de orina sin sucralosa)	56	0
Volumen 1	450	4
Volumen 2	335	7
Volumen 3	150	16
Volumen 4	50	19
Volumen 5	150	23
Volumen 6	125	26
Volumen 7	330	37

2.4. Extracción en fase sólida (SPE)

La SPE es una técnica de extracción que se basa en la retención sobre un adsorbente sólido de los compuestos de interés. La adición de un eluyente permite eluir y concentrar los analitos de interés [37].

El procedimiento seguido aparece esquematizado en la **Figura 5** y consta de las siguientes etapas:

1. Acondicionamiento del cartucho

Se acondiciona el cartucho con 4 mL (x2) de metanol (MeOH) seguidos de 5 mL (x2) de agua ultrapura, todo ello con un caudal de unos 3 mL/min.

2. Cargar la muestra

Se adicionan 3 mL de orina al cartucho con un caudal de unos 1.5 mL/min.

3. Lavado

Se cargan 4 mL de agua miliQ con un caudal de unos 1.5 mL/min.

4. Elución

Los analitos retenidos en el cartucho son eluidos con 3 mL (x2) de MeOH a un flujo de 1 mL/min. El eluato se recoge en un tubo de ensayo.

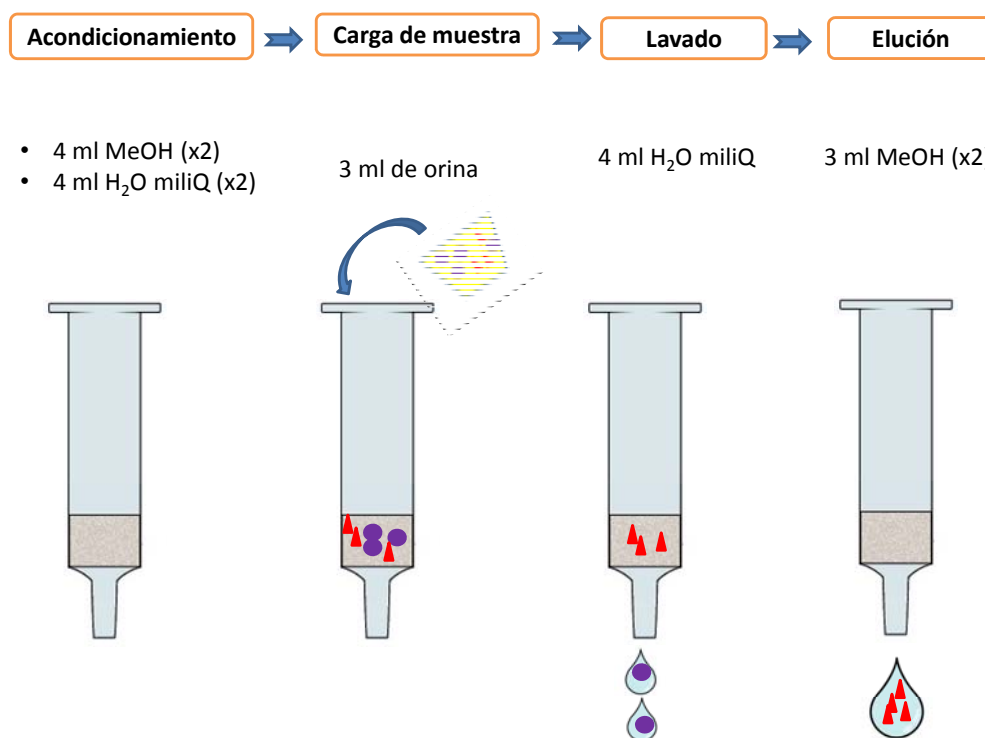


Figura 5. Esquema del método SPE usado.

Una vez recogido, etiquetaremos los tubos adecuadamente y los evaporaremos bajo corriente de N₂ hasta casi sequedad. Tras este paso, añadiremos al tubo de ensayo 100 µL de metanol y 900 µL de agua miliQ, pero teniendo en cuenta el volumen de agua que haya podido quedar en el tubo de ensayo después de ser evaporado, por lo que será una cantidad inferior a 900 µL la que realmente añadiremos. De esta forma, al partir de 3 mL de orina y después de trasvasar 1mL al vial tenemos un factor de preconcentración de 3 (3 mL → 1 mL). Por último, el extracto obtenido (aproximadamente 0,5 mL) se pasa a través de un filtro y se trasvasa a un vial para su posterior análisis.

A continuación prepararemos una recta de calibrado en disolvente y otra en matriz para conocer los mg de sucralosa ingeridos y % sucralosa excretado, respectivamente. Utilizaremos 7 viales para cada recta, el primero será la muestra, el segundo será la intermedia y a partir del cual prepararemos los restantes viales.

2.5. Cromatografía de líquidos/espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo (LC-TOF-MS).

El sistema de cromatografía de líquidos, HPLC (Agilent Series 1290 Infinity, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) está equipado con una columna analítica de fase reversa C₁₈ de 100 mm × 34.0 mm y 1.8 μm de tamaño de partícula (Zorbax Eclipse XDB-C₁₈). El gradiente de elución consistía en las fases móviles A y B siendo agua mili-Q con 0,1% de ácido fórmico y acetonitrilo, respectivamente. La fase móvil (10% acetonitrilo) mantuvo constante su composición inicial durante 3 min y, seguidamente, ésta cambió conforme a un gradiente lineal hasta alcanzar una composición correspondiente al 100% de acetonitrilo (**Tabla 4**). El flujo fue de 0.5 mL/min.

Tabla 4. Gradientes de elución

Método 1 (“método corto”)		Método 2 (“método largo”)	
Tiempo	%B	Tiempo	%B
0	10	0	10
3	10	3	10
8	60	25	40
10	100	28	100
12	100	30	100

Este sistema HPLC estaba conectado con un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo Agilent MSD TOF 6220 (Agilent Technologies, Santa Clara,

CA) operando en modo negativo y con los siguientes parámetros: voltaje del capilar, 4000 V; gas de secado, 9 L•min⁻¹; temperatura del gas, 325 °C; presión del nebulizador, 40 psig; voltaje de fragmentación, 170 V. El espectro de masas recogidas en el LC-TOF MS trabajaba en el rango de masas de 100-1000 m/z. La medida de la masa exacta de cada pico del cromatograma total se hizo calibrando con una disolución patrón que contenía masas internas de purina (C₅H₄N₄ de m/z 121.050873 9) y HP-921 ([hexakis-(1H, 1H, 3H-tetrafluoropentoxo)-phosphazene] (C₁₈H₁₈O₆N₃P₃F₂₄) de m/z 922.009 798). En la siguiente imagen se muestra una fotografía del equipo de LC-TOF-MS disponible en el laboratorio de investigación y con el cual se ha trabajado.

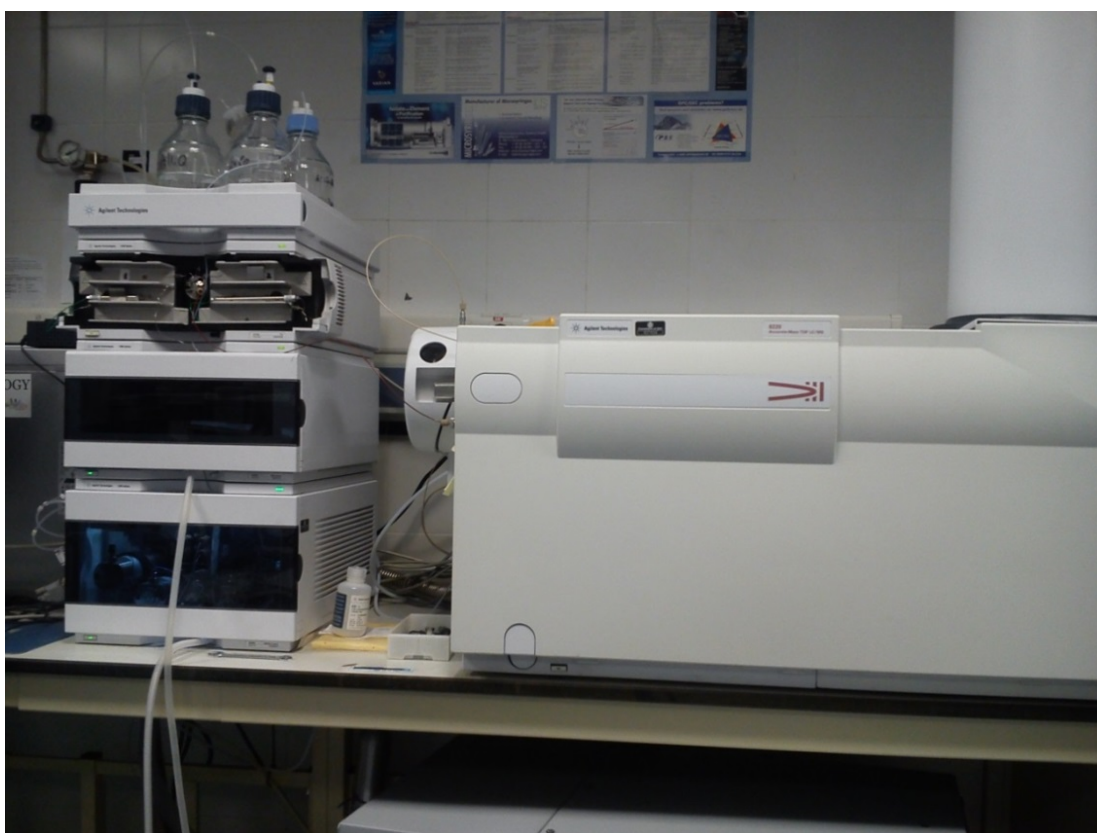


Figura 6. Equipo de Cromatografía de Líquidos/espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo.

En este estudio se emplea una fuente de ionización electrospray (ESI). Existen dos modos de ionización: positivo y negativo. En este trabajo, debido a su mayor selectividad, se trabajó en modo de ionización negativo, formándose principalmente iones deprotonados ([M-H]⁻).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Método para la determinación de sucralosa en orina

Se empleó un método (“método corto”) con las condiciones cromatográficas que se han descrito en el apartado 2.5 con una duración de 12 min. En la **Figura 7** podemos ver el cromatograma iónico total (TIC) de un patrón en disolvente de concentración 5 mg/L. También se muestran el cromatograma extraído (EIC) y el espectro de masas.

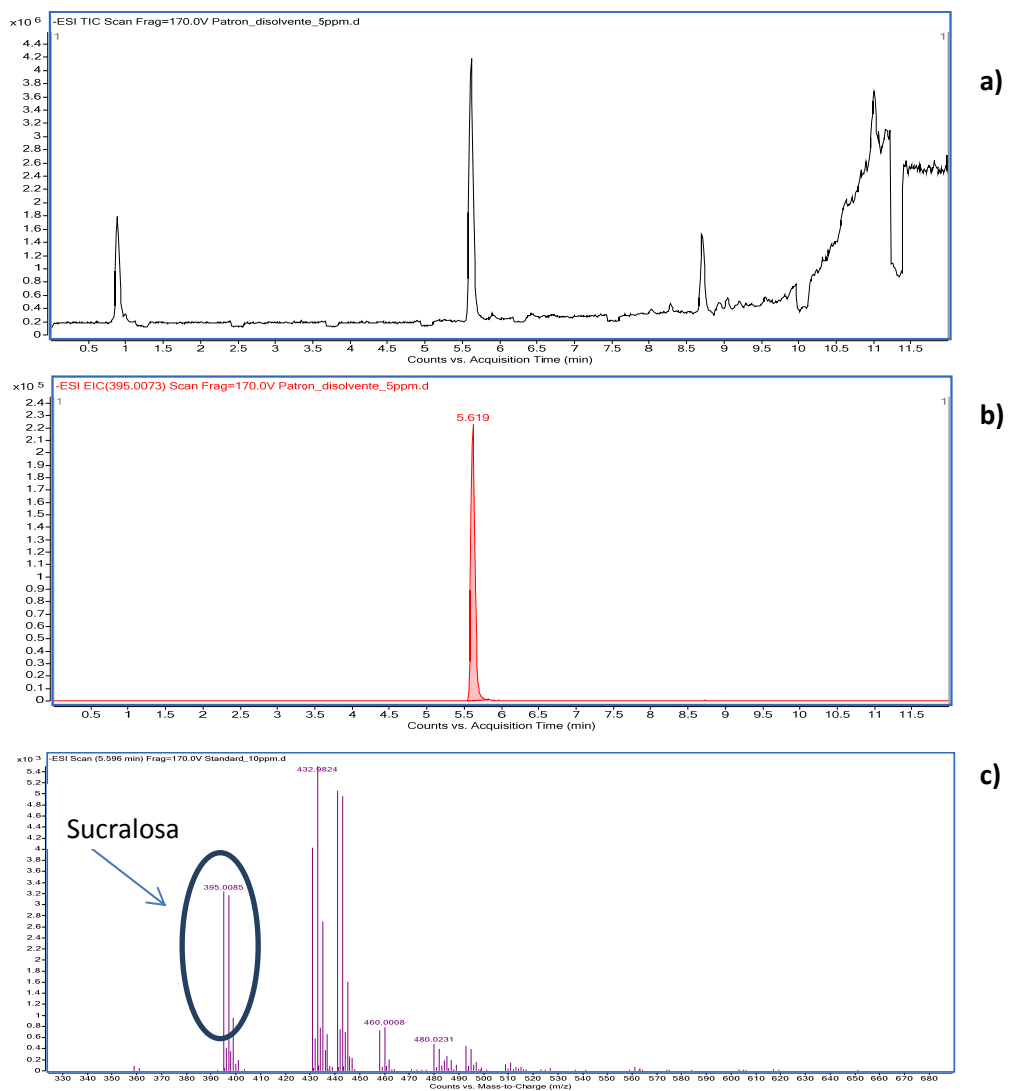


Figura 7. a) Cromatograma total de iones, b) Cromatograma extraído y c) Espectro de masa exacta (LC-TOFMS) en disolvente.

El primer compuesto que pudimos identificar fue la sucralosa, mediante el empleo de un patrón primario para caracterizar el tiempo de retención (t_R) y los valores de masa/carga (m/z) característicos de la sucralosa al extraer el EIC.

Como podemos observar en la **Figura 7** hemos confirmado la señal de la sucralosa utilizando uno de los patrones puros (5 mg/L). El TIC nos muestra la señal de todos los iones detectados del espectro de la sucralosa. Los principales son la molécula deprotonada ($[M-H]^-$), con m/z experimental 395,0085 y el aducto con Cloro ($[M+Cl]^-$), con m/z experimental 432,9824). En todos los iones detectados se puede apreciar un perfil característico de señales duplicadas con una intensidad similar. Esto se debe a la presencia de tres átomos de cloro en la molécula de sucralosa, y a sus dos isótopos estables ^{35}Cl y ^{37}Cl .

A continuación, en las **Tabla 5** se detallan el compuesto estudiado junto con los parámetros empleados para su confirmación e identificación.

Tabla 5. Parámetros para la identificación de sucralosa mediante LC/TOF-MS

Compuesto	t_R (min)	m/z teórica	Composición elemental	Ion detectado
Sucralosa	5,62	395,0073	$C_{12}H_{19}Cl_3O_8$	$[M-H]^-$

Tras haber inyectado los patrones en disolvente en el LC-MS llevamos a cabo el mismo procedimiento pero esta vez en matriz. En la **Figura 8** podemos ver el cromatograma iónico total (TIC) de un patrón en matriz. También se muestran el cromatograma extraído (EIC) y el espectro de masas.

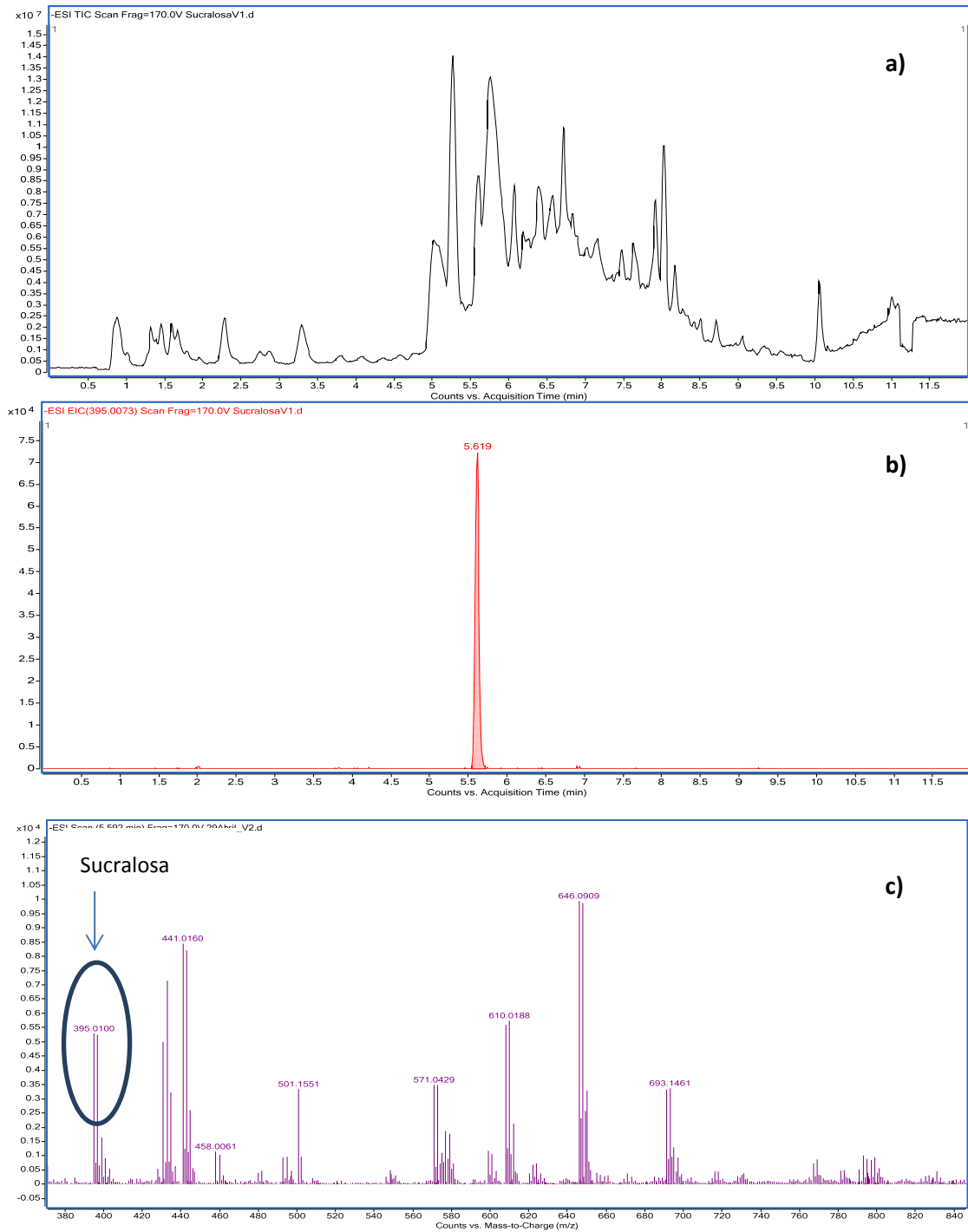


Figura 8. a) Cromatograma total de iones, **b)** Cromatograma extraído y **c)** Espectro de masa exacta (LC-TOFMS) en extracto de orina.

3.1.1. Parámetros analíticos del método

A continuación se obtuvieron los parámetros analíticos del método: linealidad (R^2), el límite de detección (LOD) y cuantificación (LQ) y el efecto matriz. Para el estudio de la linealidad del método se prepararon curvas de calibrado con patrones en matriz y en disolvente, en un rango de 0,1-5 mg/L. En disolvente, se obtuvo la siguiente ecuación de la recta: $y = 160737x + 28595$, $R^2 = 0,99674$). A continuación preparamos la recta de calibrado en matriz. El intervalo de concentración será entre 0,05-5 mg/L y obtendremos los valores del área de pico tras inyectarla en el LC-MS. Representamos la concentración de sucralosa frente al área de pico y obtenemos la ecuación de la recta en matriz: $y = 2864 x + 1359$.

El límite de detección se define como la mínima concentración de analito que proporciona una señal que puede distinguirse del ruido de fondo, pero sin especificar la precisión. El límite de cuantificación es la menor concentración de analito que se puede determinar con la precisión requerida. Para su determinación se sigue el criterio de 10σ para el LQ y 3σ para el LOD. Los límites de detección y cuantificación de nuestro compuesto se estimaron tomando el valor de la recta de calibrado en matriz que presentaba el área de pico más alto, es decir, el patrón 5 mg/L y con una relación señal/ruido (S/N) de 21,7. El efecto matriz es el cociente entre el valor de las pendientes de las dos rectas de calibrado, en disolvente y en matriz.

Tabla 6. Parámetros analíticos del método

Compuesto	LOD(mg/L)	LQ(mg/L)	Rango Calibrado(mg/L)	Efecto matriz (%)
Sucralosa	0,7	2,3	0,1 – 5	98

3.2 Estudio del metabolismo

El estudio de la eliminación de la sucralosa se ha realizado por una parte a partir del cálculo de la concentración de sucralosa y por otra mediante el cálculo de la cantidad de sucralosa excretada, todo ello para cada muestra recogida a diferentes tiempos tras ingerir de 1,2 mL del producto comercial de sucralosa.

El consumo diario admisible (ADI) de sucralosa aceptable es 5 mg/kg al día según lo establecido por la FDA. Por tanto, en nuestro caso, la cantidad máxima de sucralosa que podemos ingerir diariamente es de 275 mg. Debido a que el producto comercial no indicaba su equivalencia en mg, en primer lugar se calculó la concentración de sucralosa en el mismo para así poder calcular con exactitud la masa de sucralosa administrada.

Con la recta de calibrado de sucralosa en disolvente ($y = 160737x + 28595$, $R^2 = 0,99674$) se calcula la cantidad de sucralosa ingerida. Sustituimos el valor de la muestra en la recta de calibrado y obtenemos los mg/L de sucralosa que contiene la muestra. Debemos tener en cuenta la dilución 1:10,000 por lo que el valor final hay que multiplicarlo por 10,000. La concentración de sucralosa de la muestra al final es de 64,4 g/L. Si multiplicamos este valor por el volumen de sucralosa inicial del producto comercial (1,2 mL) obtenemos 77,3 mg de sucralosa ingeridos.

A continuación, se procedió a calcular la cantidad de sucralosa excretada en las muestras de orina. Sólo se detectó sucralosa en las primeras cuatro alícuotas tomadas tal y como se muestra en la **Tabla 7**. La concentración de sucralosa de cada volumen se obtuvo con la ecuación de la recta en matriz y se multiplicó por 1/3 para aplicar la preconcentración. Estos valores se multiplican respectivamente por el volumen de orina (L) correspondiente y se obtiene la masa de sucralosa excretada cuya suma da 15,2 mg que son los mg totales de sucralosa excretada. Si este valor se divide por los mg de sucralosa ingeridos (77,3 mg) que se obtuvo anteriormente, se consigue el porcentaje de sucralosa excretada en orina (19,66%). Los diferentes cálculos de los volúmenes de orina que más señal de área de pico proporcionaron quedan recogidos en la siguiente tabla:

Tabla 7. Cálculo de sucralosa excretada

	Volumen orina (mL)	Tiempo (h)	Área pico	Ratio Área/Volumen orina	[Sucralosa, mg/L]	[Sucralosa] *1/3	Volumen orina (L)	Masa sucralosa excretada (mg)
1	450	4	253279	0,00177	87,96	29,3	0,45	13,2
2	335	12	41338	0,00811	13,96	4,65	0,335	1,56
3	150	16	24102	0,00622	7,94	2,65	0,15	0,40
4	50	19	9671	0,00517	2,90	0,97	0,05	0,048
								Total 15,2 mg

En la **Figuras 9 y 10** se expone la representación de la evolución de la concentración de la sucralosa de cada muestra frente al tiempo en las que se tomaron e igualmente para los mg de sucralosa que fueron excretados. Como se puede apreciar en ambas curvas, los valores más altos residen en las 20 primeras horas de la excreción del producto, considerando un máximo bastante significativo en la primera muestra. A partir de las 20 horas de recogida de muestras, los valores tanto de concentración como de mg excretados de sucralosa son mínimos, por lo que se consideran valores nulo.

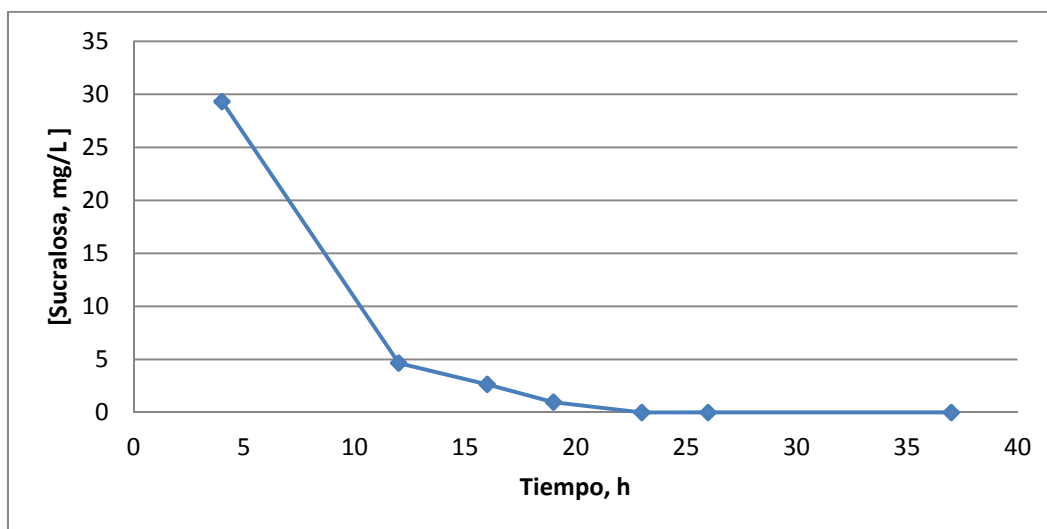


Figura 9. Representación de la evolución de la concentración de la sucralosa en el tiempo.

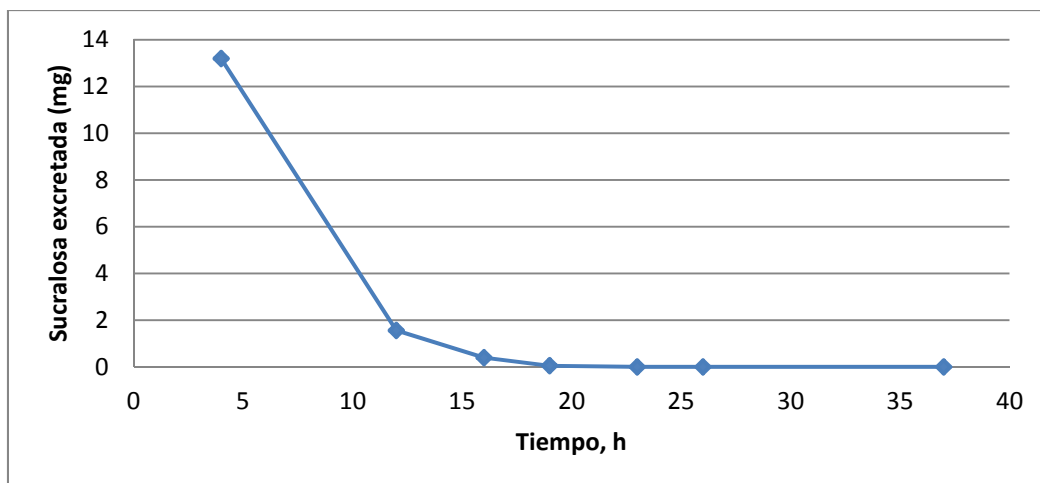


Figura 10. Representación de la evolución de los mg de sucralosa en el tiempo.

Estos resultados son consistentes con el porcentaje de sucralosa excretado en orina descrito por otros autores [38]. Además según la bibliografía sólo un pequeño porcentaje de esa sucralosa excretada (aprox. 1-2%) aparece formando conjugados glucurónidos [39]. En el siguiente apartado, se estudian la formación de metabolitos.

3.3 Identificación de metabolitos

El método que hemos empleado en el apartado 3.1 no permitía la separación e identificación de los conjugados glucurónidos, por lo que ampliamos la duración del mismo a 30 minutos para que en ese tiempo la separación fuera más eficaz (“método largo”). A continuación se muestra el resultado.

En la **Figura 11** aparece **a)** superpuesto el cromatograma extraído de la sucralosa y de sus conjugados glucurónidos tal y como se ha estudiado en la bibliografía disponible y **b)** solo el cromatograma de la sucralosa.

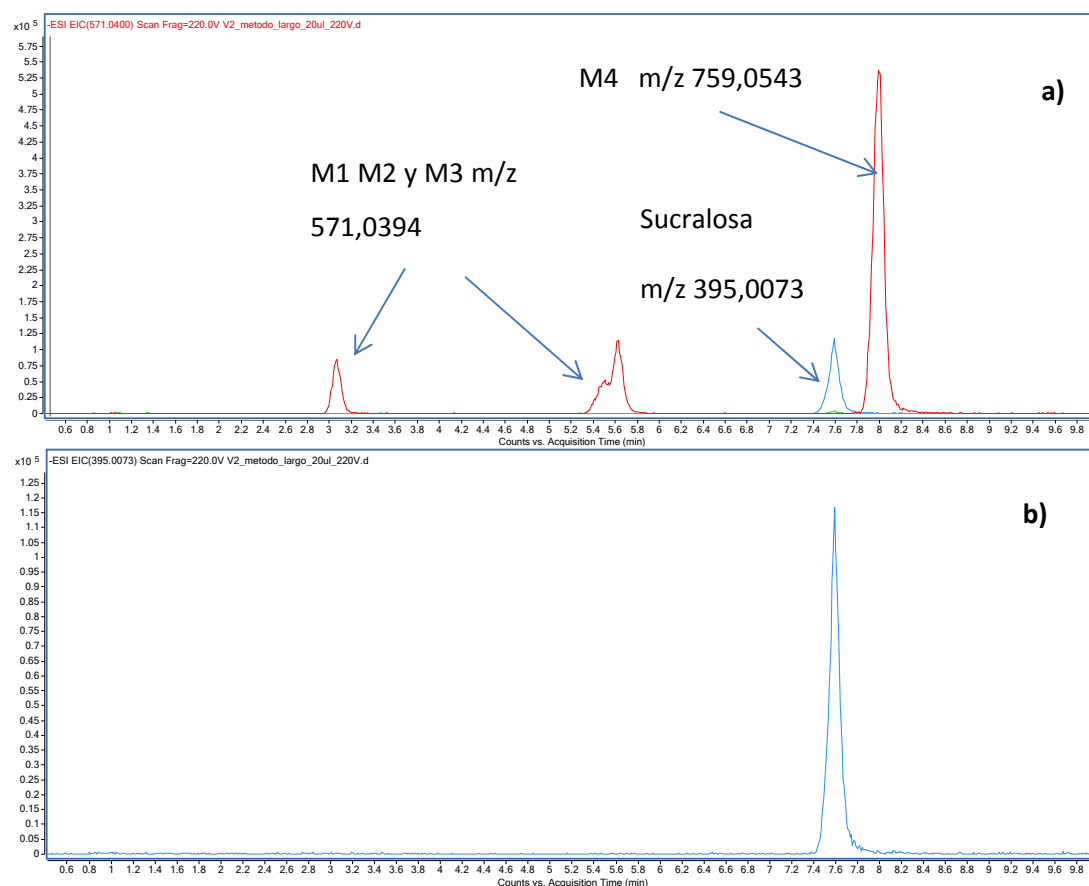


Figura 11. Cromatogramas extraídos superpuestos (a) de los iones m/z 395.0073 (azul) y 571.0402 (rojo) que correspondería al conjugado glucurónico de la sucralosa (b) Sólo del ion m/z 395.0073 (que a tiempo de retención 7.6 min corresponde a la sucralosa (m/z 395.0085 experimental (teórica 395.0073) Error: 3.0 ppm).

A continuación, en la siguiente **Tabla 8** se detallan los compuestos estudiados junto con los parámetros empleados para su confirmación e identificación.

Tabla 8. Identificación de los derivados glucurónicos en orina mediante LC/TOF-MS.

Compuesto		t _R (min)	m/z teórica	Composición elemental	Ion detectado
Derivados glucurónicos	M1	3,04	571,0394	C ₁₈ H ₂₉ Cl ₃ O ₁₄	[M-H] ⁻
	M2	5,48	571,0394	C ₁₈ H ₂₉ Cl ₃ O ₁₄	[M-H] ⁻
	M3	5,66	571,0394	C ₁₈ H ₂₉ Cl ₃ O ₁₄	[M-H] ⁻
	M4	8,0	759,0543	(*)	(*)

*Fórmula desconocida compuesta por sucralosa, un residuo de ácido glucurónico y otro residuo de Pm 188

En esta ocasión, además de la sucralosa, también identificamos a sus derivados glucurónidos. El fragmento que se une a la sucralosa formando uno de los derivados, lo hace a través de las posiciones de los OH, por lo que habiendo 5 grupos hidroxilo en la molécula de sucralosa, la formación de posibles isómeros y mezclas es probable. En el EIC podemos apreciar 3 picos (M1, M2 y M3) que pueden corresponder a al menos 3 isómeros de posición que probablemente corresponden a distintas posiciones de la formación del complejo glucurónido. Puesto que no tenemos constancia en la bibliografía de cuáles son las posiciones ocupadas, no podemos aportar datos más concretos sobre la estereoquímica de las moléculas.

Otro factor, además del tiempo de retención (t_R), que nos ayuda a identificar compuestos es el error relativo. Con él podemos determinar la fórmula de moléculas pequeñas, siendo inferior a 5 mg/L. Se define con la siguiente expresión:

$$\text{Error relativo de masa exacta} = \frac{(\text{masa teórica} - \text{masa experimental})}{\text{masa teórica}} \times 10^6$$

En la **Figura 12** se muestran los espectros de masas que pueden corresponder a los 3 posibles isómeros del conjugado glucurónido de la sucralosa.

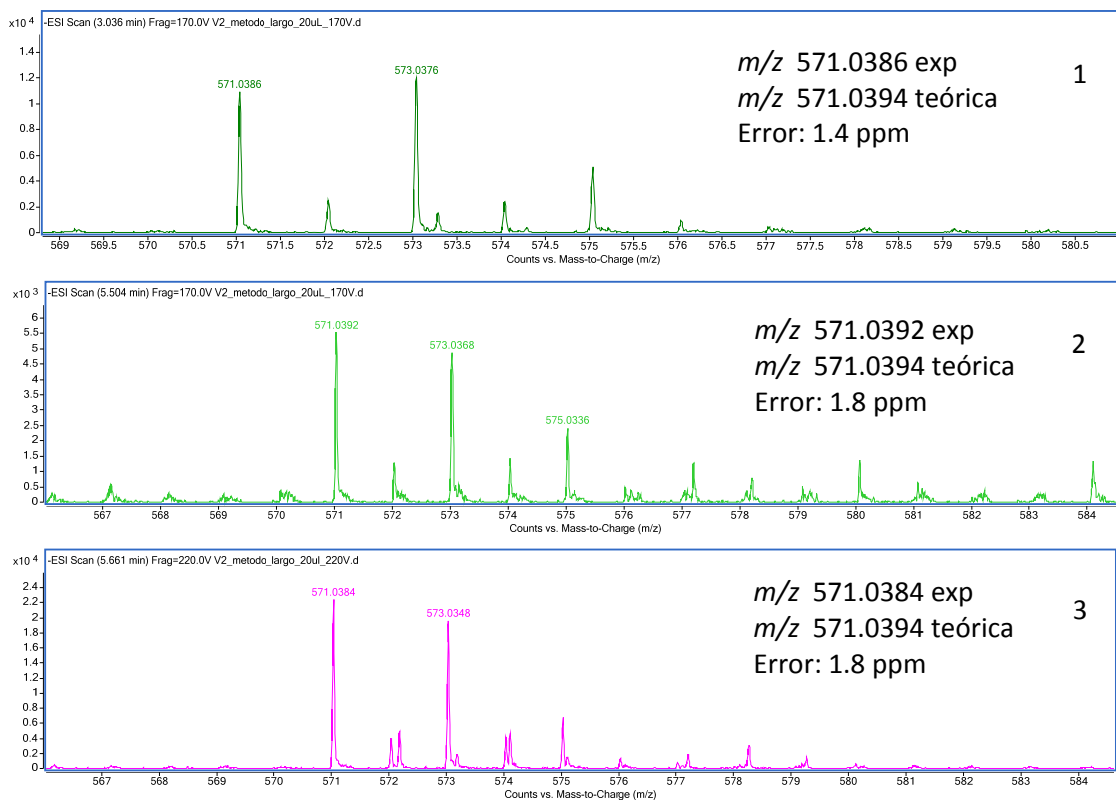


Figura 12. Espectro de masas correspondientes al 1) isómero M1, 2) isómero M2 e 3) isómero M3.

Por último, el espectro de masas del metabolito M4 se muestra en la **Figura 13**. En él se puede observar el metabolito de la sucralosa, que se trata de un conjugado con un grupo glucurónico y además otra molécula de masa 188. Esta pérdida de molécula es desconocida y se encuentra en exceso en la orina. Su identificación no ha sido posible debido a que necesitamos conocer algún elemento más en su composición, además de los elementales (C, H, O, Cl) para averiguar a qué corresponde.

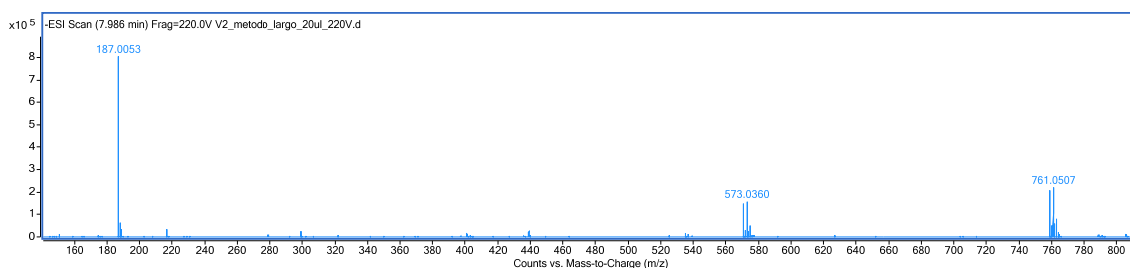


Figura 13. Espectro de masas del metabolito M4.

4. CONCLUSIONES

Se llevó a cabo este estudio para la cuantificación e identificación de la sucralosa y sus derivados glucurónidos en muestras de orina mediante LC/TOF-MS. La sucralosa fue identificada fácilmente en los dos métodos que se emplearon dado que se disponía de patrones para su cuantificación y reseñas de estudios anteriores. Sin embargo, los derivados glucurónidos aun habiendo sido detectados en la orina, se desconoce su identidad actualmente, hecho que se ha descrito en la escasa bibliografía y que podemos confirmar con este trabajo.

Por otro lado, mediante la preparación de rectas de calibrado, una en disolvente y otra en matriz, se obtuvo tanto los mg de sucralosa ingeridos (aprox. 80 mg sucralosa), cantidad inferior al consumo mínimo establecido por la FDA, como % sucralosa excretada en orina (aprox. 19%). Se ha podido comprobar que se trata de un edulcorante que se excreta en la orina con relativa rapidez puesto que en las 24h posteriores a la ingesta del producto, la mayoría de la sucralosa se degradó en las 20 primeras horas. Por ello, se confirmó el alto porcentaje de sucralosa que se excreta en la orina, tal y como se describe en la bibliografía disponible.

5. BIBLIOGRAFÍA

1. Ferrer, I., Thurman, E.M. 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.
2. Rodero, A.B., Rodero, L.S & Azoubel, R. Toxicity of sucralose in humans: a review. *Int. J. Morphol.*, 27(1): 239-244, 2009.
3. Tollefsen, K.E., Nizzetto, L., Huggett, D.B. Presence, fate and effects of the intense sweetener sucralose in the aquatic environment. *Science of the Total Environment* 438 (2012) 510-516.
4. Ferrer, I., Thurman, E.M. 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
5. Tollefsen, K.E., Nizzetto, L., Huggett, D.B. Presence, fate and effects of the intense sweetener sucralose in the aquatic environment. *Science of the Total Environment* 438 (2012) 510-516.
 6. Ferrer, I., Thurman, E.M. 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
 7. Tollefsen, K.E., Nizzetto, L., Huggett, D.B. Presence, fate and effects of the intense sweetener sucralose in the aquatic environment. *Science of the Total Environment* 438 (2012) 510-516.
 8. Website Valimex S.L (en línea). Enlaces de interés sobre la sucralosa disponibles en:
<http://www.valimex.es/Preguntas%20frecuentes%20sobre%20la%20Sucralosa1.pdf>
 9. Website Valimex S.L (en línea). Enlaces de interés sobre la sucralosa disponibles en:
<http://www.valimex.es/Preguntas%20frecuentes%20sobre%20la%20Sucralosa1.pdf>
 10. Tollefsen, K.E., Nizzetto, L., Huggett, D.B. Presence, fate and effects of the intense sweetener sucralose in the aquatic environment. *Science of the Total Environment* 438 (2012) 510-516.
 11. Gutierrez, P.M., Carro, J.R. *Instituto cubano de investigaciones azucareras (ICINAZ)*, Cuba (en línea). Disponible en:
<http://www.bibliociencias.cu/gsd/collect/eventos/index/assoc/HASH0102/229b52cc.dir/doc.pdf>
 12. Grotz, V.L., Munro, I.C. An overview of the safety of sucralose. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 55 (2009) 1-5.
 13. Campos Rosa, J.M., Camacho Quesada, M.E. *Capítulo 6: Estudio del metabolismo en Química farmacéutica I (pp 106-114)*. Editorial Universidad de Granada (2013), Granada.

14. Youssef, R.M., Korany, M.A., Khamis, E.F., Mahgoub, H., Kamal, M.F. *Drug Test. Anal.* 3 (4) (2011) 214-220.
15. Morlock, G.E., Schuele, L., Grashorn, S., *J.Chromatogr. A* 1218 (19) (2011) 2745-2753.
16. Joerg, S., Ivanka, D., Bernd, S. *J. AOAC Int.* 92 (4) (2009) 1153-1159.
17. Morlock, G.E., Vega-Herrera, M.A. *J. Planar Chromatogr.* 20 (6) (2007) 411-417.
18. Idris, M., Srivastava, S., Baggi, T.R., Shukla, S.K., Ganjoo, A.K. *E-J.Chem.* 7 (S1) (2010) S559-S565.
19. Spangenberg, B., Stroka, J., Arranz, I., Anklam, E. *J.Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 26 (16) (2003) 2729-2739.
20. Qiu, W., Wang, Z., Nie, W., Guo, Y., Huang, L. *Chromatographia* 66 (11/12) (2007) 935-939.
21. Ferrer, I., Thurman, E.M. *J.Chromatogr. A* 1217 (25) (2010) 4127-4134.
22. Shimatzu Application News, No. L 297.
23. Minten, J., Adolfsson-Erici, M., Björlenius, B., Alsberg, T. *Int.J. Environ. Anal. Chem.* 91 (4) (2011) 357-366.
24. Yang, D., Chen, B., Agric, J. *Food Chem.* 57 (8) (2009) 3022-3027.
25. Loops, R., Gawlik, B.M., Boettcher, K., Locoro, G., Contini, S., Bidoglio, G. *J.Chromatogr. A* 1220 (2012) 1-178.
26. Mawhinney, D.B., Young, R.B., Vanderford, B.J., Borch, T., Snyder, S.A. *Environ. Sci. Technol.* 45 (20) (2011) 8716-8722.
27. Wasik, A., McCourt, J., Buchgraber, M. *J. Chromatogr. A* 1157 (2007) 187-196.
28. Buchgraber, M., Wasik, A. *J.AOAC Int.* 92 (1) (2008) 208-222.
29. Kobayashi, C., Nakazato, M., Yamayima, Y., Ohno, I., Kawano, M., Yasuda, K. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 42 (2) (2001) 139-143.
30. Nojiri, S., Nakazato, M., Kasuya, Y., Takano, I., Oishi, M., Yasuda, K., Suzuki, K.S. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 43 (5) (2002) 289-294.
31. Hanko, V.P., Rohrer, J.S., Agric, J. *Food Chem.* 52 (14) (2004) 4375-4379.
32. Kishi, H., Kawana, K. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 42 (2) (2001) 133-138.

33. Stroka, J., Dossi, N., Anklam, E. *Food Addit. Contam.* 20 (6) (2003) 524-527.
34. McCourt, J., Stroka, J., Anklam, E. *Anal. Bioanal. Chem.* 382 (5) (2005) 1269-1278.
35. Zhao, R.R., Johnson, B.P. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 23 (12) (2000) 1851-1857.
36. Anderson, A.D.G., Poom, P., Greenway, G.M. *J. Macfie, Ann. Clin. Biochem.* 42 (2005) 224-226.
37. Skoog D.A., Holler F.J., Nieman T.A. *Capítulo 11: Espectrometría de masas atómica en Principios de Análisis Instrumental.* Editorial McGraw-Hill (2001), Madrid.
38. Rodero, A.B., Rodero, L.S & Azoubel, R. Toxicity of sucralose in humans: a review. *Int. J. Morphol.*, 27(1): 239-244, 2009.
39. British Nutrition Foundation Nutrition Bulletin, 28 (2003) 53-58.