



**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE FARMACIA**

DETERMINACIÓN DE CICLAMATO EN BEBIDAS NO ALCOHOLICAS POR HPLC

JOSÉ ENRIQUE GONZÁLEZ CAMPOS

Trabajo de Investigación de Internado en Sector Salud presentado en la
Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción para optar al título
profesional de Bioquímico

Profesional guía:

Dra. Q.F. Carmen Niedmann Dellinger
Jefe de Laboratorio de Salud Ambiental Concepción
SEREMI de Salud Región del Biobío

Ing. Carolina Sepúlveda Medina
SEREMI de Salud Región del Biobío

Profesor patrocinante:

Dra. Gisela Ríos Gajardo
Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos
Facultad de Farmacia
Universidad de Concepción

Abril, 2022

Concepción Chile

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

© 2022, José Enrique González Campos

INDICE

1.- RESUMEN.....	1
2.- INTRODUCCION	2
3.- OBJETIVOS	
3.1.- Problema y pregunta de Investigación	12
3.2.- Hipótesis y Objetivos	13
3.3.- Objetivos Específicos	14
4.- METODOLOGÍA.....	15
4.1.- Reactivos.....	15
4.2.- Equipos.....	16
4.3.- Materiales.....	16
4.4.- Preparación de reactivos y soluciones.....	17
4.4.1.- Preparación de muestras.....	17
4.4.2.- Solución de carbonato de sodio al 5%.....	17
4.4.3.- Solución de hipoclorito de sodio al 1,7% de cloro activo.....	18
4.4.4.- Solución de ácido sulfúrico al 50%.....	18
4.4.5.- Solución madre de ciclamato de sodio y curva de calibrado.....	18
4.4.6.- Preparación de solución patrón de ciclamato de sodio 1000 mg/L.....	19
4.5.- Derivatización.....	19
4.6.- Curva de calibración.....	20
4.7.- Fase Móvil.....	22
4.8.- Condiciones cromatográficas.....	22
5.- OPTIMIZACIÓN DEL PROCEDIMIENTO ANALÍTICO.....	24
5.1.- Solvente.....	24
5.2.- Composición de la fase móvil.....	25
5.3.- Preparación de soluciones patrón de ciclamato de sodio.....	25

6.- PARAMETROS DE EVALUACIÓN.....	27
6.1.- Limites y linealidad.....	27
6.1.1.- Limite instrumental.....	27
6.1.2.- Limite del método (LOD y LOQ).....	27
6.1.3.- Linealidad.....	29
6.1.4.- Test de Mandel.....	30
6.2.- Precisión.....	30
6.2.1.- Repetibilidad.....	31
6.2.2.- Precisión intermedia.....	31
6.3.- Veracidad.....	32
6.3.1.- Recuperación.....	32
7.- RESULTADOS.....	34
7.1.- Solventes.....	34
7.2.- Cambio de fase móvil.....	34
7.3.- Preparación curva de trabajo siguiendo método del estándar EN 12857.....	37
7.4.- Concentración de cloro activo en solución de hipoclorito de sodio comercial.....	38
7.5.- Validación de la metodología analítica.....	38
7.5.1.- Limites y linealidad (Límite instrumental).....	38
7.5.2.- Limite Instrumental del Método (LDM).....	39
7.5.3.- Linealidad.....	42
7.5.3.1.- Test de Mandel.....	45
7.5.4.- Precisión.....	46
7.5.4.1.- Repetibilidad.....	46
7.5.4.2.- Precisión intermedia.....	48
7.5.5.- Veracidad.....	49
7.5.5.1.- Recuperación.....	49

7.5.5.2.- Recuperación con fortificado de 50 mg/L y matriz con analito.....	50
7.5.5.3.- Recuperación con fortificado de 150 mg/L y matriz blanco.....	52
7.5.5.4.- Recuperación con fortificado de 280 mg/L y matriz blanco.....	54
8.- DISCUSIÓN.....	56
8.1.- Solvente.....	56
8.2.- Composición de la fase móvil.....	57
8.3.- Preparación de soluciones patrón de ciclamato de sodio siguiendo Norma EN 12857.....	58
8.4.- Preparación de soluciones patrón de ciclamato de sodio siguiendo el método optimizado.....	58
8.5.- Concentración de hipoclorito de sodio.....	60
8.6.- Linealidad.....	61
8.7.- Precisión del método.....	62
8.7.1.- Repetibilidad.....	63
8.7.2.- Precisión intermedia.....	63
8.8.- Veracidad.....	64
8.1.1.- Recuperación.....	64
9.- CONCLUSION Y PROYECCIONES.....	67
10.- ANEXOS.....	69
Anexo A: Determinación de cloro activo en hipoclorito de sodio.....	69
Anexo B: Criterios de aceptación.....	71
Anexo C: Comparación curvas de trabajo.....	73

TABLAS

<u>Tabla N°1:</u> Valores individuales de IDA en edulcorantes permitidos.....	09
<u>Tabla N°2:</u> Curva de calibración.....	21
<u>Tabla N°3:</u> Condiciones cromatográficas.....	23
<u>Tabla N°4:</u> Propiedades de solventes.....	24
<u>Tabla N°5:</u> Propiedades de solventes en fase móvil.....	25
<u>Tabla N°6:</u> Comparación de resultados en el uso de distintos solventes.....	34
<u>Tabla N°7:</u> Condiciones cromatográficas utilizadas.....	35
<u>Tabla N°8:</u> Propiedades de picos cromatográficos usando distintas fases Móviles.....	37
<u>Tabla N°9:</u> Curva de trabajo según norma EN 12857	37
<u>Tabla N°10:</u> Propiedades cromatograma de Figura N°4.....	39
<u>Tabla N°11:</u> Limite de detección (LOD) fortificado de 25 mg/L.....	40
<u>Tabla N°12:</u> Límite de cuantificación (LOQ) fortificado de 50 mg/L.....	40
<u>Tabla N°13:</u> Curvas de calibración realizadas.....	42
<u>Tabla N°14:</u> Valores obtenidos en cada curva y áreas promedio.....	43
<u>Tabla N°15:</u> Valores de analito declarado obtenidos en matriz.....	46
<u>Tabla N°16:</u> Ensayos realizados en matriz fortificada en días distintos.....	48
<u>Tabla N°17:</u> Bebida con analito + fortificado 50 mg/L.....	50
<u>Tabla N°18:</u> Bebida matriz blanco sin analito + fortificado 150 mg/L.....	52
<u>Tabla N°19:</u> Bebida matriz blanco sin analito + fortificado 280 mg/L.....	54
<u>Tabla N°20:</u> Inyección de matriz con analito usando distintas concentraciones de hipoclorito de sodio.....	61

ESQUEMAS Y FIGURAS

<u>Esquema N°1</u> : Síntesis de ciclamato de sodio.....	05
<u>Esquema N°2</u> : Protocolo de tratamiento para muestras de bebidas y estándares preparados previa inyección al HPLC.....	22
<u>Figura N°1</u> : N, N – Diclorociclohexilamina.....	11
<u>Figura N°2</u> : Cromatograma de una solución estándar de 100 mg/L utilizando MeOH y Agua (80/20).....	36
<u>Figura N°3</u> : Cromatograma de una solución estándar de 100 mg/L utilizando MeCN y Agua (70/30).....	36
<u>Figura N°4</u> : Cromatograma del estándar de 200 mg/L.....	39

GRÁFICOS

<u>Gráfico N°1</u> : Curvas de calibración realizadas.....	43
<u>Gráfico N°2</u> : Curva de calibración realizada con valores promedios.....	44

REFERENCIAS	75
--------------------------	----

ABREVIATURAS

μL: microlitro

A.O.A.C.: Association of Official Analytical Chemists.

ADN: Ácido desoxirribonucleico

bar: unidad de presión

CCA: Comisión Codex Alimentario

cm: centímetro

CEN: Comité Europeo de Normalización

CV%: Coeficiente de Variación

CV_h%: Coeficiente de Variación Horwitz

DAD: Diode Array Detector

DS: Desviación Estándar

EFSA: European Food Safety Authority

EUFIC: European Food Information Council

FAO: Food and Agriculture Organization

FDA: Food and Drugs Administration

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia

INTA: Instituto de Nutrición y Tecnología de Alimentos

IDA: Ingesta Diaria Admisible

ISO: Organización Internacional de Normalización.

kg: kilogramo

L: Litro

LDM: Limite del Método

LOD: Limit of Detection

LOQ: Limit of Quantification

MeCN: Acetonitrilo

MeCH: Metanol

mg: miligramo

min: minuto

mL: mililitro

mm: milímetro

mM: milimolar

MS: Espectrometría de Masas

ng: nanogramo

nm: nanómetro

ENS: Encuesta Nacional de Salud

OMS: Organización Mundial de la Salud

PTFE: Politetrafluoroetileno

RP-C18: Columna de fase reversa C18

RSA: Reglamento Sanitario de los Alimentos

UI: Unidad Internacional

UV: Ultravioleta

1. - RESUMEN

El ciclamato de sodio es un edulcorante de uso variado en alimentos, autorizado en la Reglamentación Sanitaria en Chile (RSA). Sin embargo, existe un posible riesgo en la salud humana ante el consumo excesivo de bebidas no alcohólicas del tipo refresco en nuestro país.

El presente trabajo tiene como objetivo implementar y validar un método analítico de ciclamato de sodio por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), en bebidas no alcohólicas, en el Laboratorio de Salud Ambiental Concepción perteneciente a la Seremi de Salud Biobío.

El método a determinar está basado en la Norma Europea EN 12857:2001 modificada, que incluye una etapa de derivatización para transformar el ciclamato de sodio en N, N -diclorociclohexilamina.

El producto derivatizado se analizará y cuantificará mediante el uso de una columna de fase inversa, una fase móvil compuesta de agua/acetonitrilo y detección por espectrofotometría ultravioleta a una longitud de onda de 314 nm.

El método fue lineal en el rango de 50 a 300 mg/L y presentó bajos valores de coeficiente de variación para la precisión, junto a una recuperación aceptable, cumpliendo así con las especificaciones indicadas en las guías internas del Laboratorio de Salud Ambiental Bio-Bio validadas por el ISP.

El método aplicado es un procedimiento rápido y sensible para el análisis de rutina de muestras de bebidas no alcohólicas, aplicado a la cuantificación de ciclamato de sodio en ellas.

2 - INTRODUCCIÓN

Hoy en día existe una amplia gama de diferentes productos alimenticios que contienen edulcorantes no calóricos de alta intensidad, los cuales constituyen una alternativa atractiva al consumo de azúcar para el consumidor. Entre los productos más demandados que contienen edulcorantes se encuentran las bebidas de fantasía no alcohólicas, así como también los endulzantes no calóricos para preparaciones como alternativa a la azúcar de mesa (Zygler et al. 2011).

Los edulcorantes de alta intensidad o edulcorantes no nutritivos se han utilizado durante más de un siglo (EUFIC 2012). Se pueden producir sintéticamente a partir de compuestos químicos (por ejemplo, ciclamato) o de sustancias naturales (por ejemplo, glucósidos de esteviol).

El poder edulcorante de estos endulzantes artificiales y naturales es varias veces mayor que la sacarosa, se pueden usar en concentraciones muy bajas en alimentos y bebidas, lo que permite una reducción significativa en los costos de producción y una contribución prácticamente nula de calorías al producto alimenticio final. Por lo tanto, incluso si tienen algún contenido calórico, se vuelve irrelevante para el producto final debido a las bajas cantidades agregadas (Szmrecsányi & Alvarez 1998; ISO 2012).

Además, el uso de edulcorantes no calóricos ofrece una serie de ventajas para la salud del consumidor final como, por ejemplo, el control de caries dentales, ya que estos productos no son fermentados por las bacterias cariogénicas; además, permiten al consumidor poder controlar su peso corporal, al permitir elegir entre un mismo producto una versión no calórica o reducido en calorías y hacen posible la ingesta de productos dulces a personas que sufren de afecciones metabólicas como la diabetes, sin afectar sus niveles de glucosa en sangre (Hendriksen, M.A., Tijhuis, M.J., Fransen, H.P. *et al* 2011).

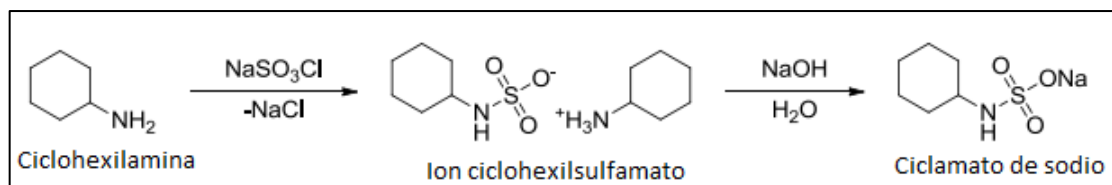
En Chile el 74,2% de la población tiene algún grado de sobrepeso u obesidad (Encuesta Nacional de Salud – Minsal 2018). La obesidad se relaciona directamente con la inactividad física, los estilos de vida sedentarios y una dieta poco saludable, siendo la ingesta de azúcares refinados, a través de bebidas y líquidos azucarados, uno de los principales factores que contribuyen al sobrepeso.

Es a partir de la implementación de la Ley de los Etiquetados de los Alimentos, promulgada el año 2016 y un aumento en el impuesto a los productos azucarados, lo que motivó a la industria alimentaria de Chile a modificar las fórmulas de alimentos y bebidas no alcohólicas, haciendo más frecuente el uso de edulcorantes no nutritivos en estos productos (INTA – Universidad de Chile – 2019).

Este cambio en la composición de los alimentos y el aumento del consumo de productos que contienen edulcorantes no nutritivos, ha motivado la preocupación de expertos e investigadores, quienes han estado estudiando sus efectos en la salud a corto y largo plazo, no sólo en términos de su toxicidad relacionada a límites de ingesta diaria admisible, sino también a posibles efectos metabólicos y a su relación con el hábito por lo dulce. La seguridad de estos productos ha sido extensamente estudiada y sigue siendo evaluada. Recientemente organismos internacionales como la FDA (EE.UU) y EFSA (Europa) han publicado revisiones al respecto (Archibald AJ, Dolinsky VW, Azad MB – 2018).

El ciclamato (en sus distintas sales de sodio o potasio) o ácido ciclámico (código alimentario E952) fue descubierto en 1937, con un dulzor 30 veces superior a la sacarosa. Su pronta aprobación y comercialización en los Estados Unidos, y más tarde en la Unión Europea por los entes reguladores pertinentes, impulsó el segmento de productos 'light', haciéndolo atractivo no solo para el consumidor normal, sino también para personas con patologías particulares como la diabetes (De La Peña, 2010).

La síntesis de ciclamato de sodio se realiza a través de la reacción de sulfonación de la molécula de ciclohexilamina, la cual es resumida en la siguiente reacción (Esquema N°1).



Esquema N°1: Síntesis de ciclamato de sodio

Se han publicado diversos estudios relacionados con la toxicidad crónica del Ciclamato. En 1969 la FDA determinó que el ciclamato asociado con la sacarina en una proporción de 10:1 sería un inductor de cáncer de vejiga en ratas (Price *et al.*, 1970). Debido a este estudio, su uso fue prohibido en los Estados Unidos. A pesar de esto, la Organización Mundial de la Salud aprobó el uso de ciclamato de sodio en 1977 como edulcorante para alimentos y bebidas en más de 40 países (Ahmed y Thomas, 1992), siendo el edulcorante de alta intensidad con el mayor volumen de producción en todo el mundo (Kishi *et al.* 2010). Según la Organización Mundial de la Salud, el ciclamato es un edulcorante sin perjuicios para la salud y catalogado en el Grupo 3 de sustancias no cancerígenas (FAO/OMS – 2009).

En humanos y animales, la mayor parte del ciclamato se elimina normalmente en las heces, pero una cantidad variable se convierte en ciclohexilamina por los microorganismos que habitan en el colon y el ciego (Wills *et al.*, 1981). La ciclohexilamina es rápidamente absorbida y excretada por los riñones. La elevada excreción urinaria de ciclamato y ciclohexilamina permite deducir una baja concentración residual de ciclohexilamina en los tejidos o fluidos corporales

después de la administración prolongada de dosis altas (Renwick y Williams, 1972). Por otra parte, tanto el ciclamato como la ciclohexilamina pueden ser transportados a través de la barrera placentaria y, por lo tanto, expuestos al feto (Pitkin *et al.*, 1969).

Se han realizado diversos estudios en animales de laboratorio que buscan verificar la toxicidad del ciclamato de sodio (Kroes y col., 1977). Estudiando la toxicidad a largo plazo del ciclamato, sacarina y ciclohexilamina en 2400 ratas, se determinó que sólo la ciclohexilamina era embriotóxica, cuando se administraba a una concentración del 0,5% (Takayama y col. 2000). También, se ha investigado la toxicidad a largo plazo y la carcinogenicidad en monos alimentados con ciclamato a 100 mg/kg y 500 mg/kg, cinco veces por semana durante 24 años, encontrándose espermatogénesis irregular y casos esporádicos de diversos tumores malignos (Sasaki y col. 2002). Al evaluar la toxicidad del ciclamato de sodio en los riñones de las ratas, se observó que luego de 3 a 24 horas después de una dosis oral única de 2000 mg/kg de ciclamato de sodio, se indujo un daño significativo al ADN en las células del estómago, el colon, riñones y de la vejiga.

Los estudios en humanos tuvieron como objetivo conocer mejor algunos aspectos del metabolismo, se enfocaron en conocer la capacidad máxima que tiene el cuerpo humano para convertir ciclamato en ciclohexilamina y la

variabilidad de conversión entre diferentes individuos sujetos a diferentes dosis y en diferentes períodos de tiempo, habiendo llegado a las siguientes conclusiones:

- Sólo el ciclamato no absorbido está disponible para ser metabolizado por la microflora intestinal.
- La mayoría de las personas (alrededor del 80% de la población) no convierten el ciclamato en ciclohexilamina, incluso con una dosis diaria.
- El 20% restante de la población tiene una capacidad de metabolismo variable con dosis repetidas, con un pequeño porcentaje de la población (3 a 4%) capaz de metabolizar una gran proporción (20% o más) del ciclamato ingerido diariamente.
- La tasa de conversión máxima de ciclamato no absorbido que se registró fue superior al 50%, aunque fue un caso aislado.
- Es necesario administrar varias dosis de este edulcorante para inducir su metabolismo, incluso en individuos “convertidores”.
- La interrupción o no asistencia de la ingestión de este edulcorante provoca una pérdida de capacidad metabólica;
- Existen grandes variaciones en la tasa de conversión del ciclamato entre diferentes individuos “convertidores”, en el mismo individuo a lo largo del tiempo, y también entre individuos que tienen una capacidad metabólica muy alta.

(Renwick, Thompson, O’sShaughnessy, Walter - 2004)

Sin embargo, las verdaderas consecuencias de la ingesta de ciclohexilamina y ciclamato en la salud humana continúan siendo un foco de investigación por parte de la comunidad científica y las autoridades reguladoras competentes (Hunt., Bopp., Price. 2012).

En el año 1985, el gobierno de los Estados Unidos, preocupado por los efectos del ciclamato y sus sales en humanos, encargó un comité (a través de la FDA) dedicado al estudio del ciclamato y sus sales como posibles carcinógenos (National Academy of Sciences: Evaluation of Cyclamate for Carcinogenicity - 1985), el cual llegó a la conclusión que no son cancerígenas para el ser humano; sin embargo, sí se demostró en experimentos in vitro e in vivo hechos en animales que tiene actividad carcinogénica. Desde entonces, su uso en los Estados Unidos fue prohibido hasta el día de hoy.

De acuerdo con las políticas internacionales y por su adscripción al CODEX Alimentarius, Chile ha incluido en su Reglamento Sanitario de los Alimentos (RSA) los siguientes edulcorantes: acesulfamo de potasio (AK), aspartamo (ASP), sacarina (SAC) (y sus sales de potasio, sodio y calcio), ciclamatos de sodio, potasio y calcio (CICL), sucralosa (SUC), alitamo, neotamo y glicósidos de esteviol (STV), estableciendo valores individuales de IDA indicados en la Tabla N°1.

Tabla N°1: Valores individuales de IDA en edulcorantes permitidos

Edulcorante	IDA (mg/kg/día)
Acesulfamo de potasio (AK)	0 - 15
Aspartamo (ASP)	0 - 40
Sacarina (SAC)	0 - 5
Ciclamatos (CICL)	0 - 7
Alitamo, neotamo	0 - 15
Glucósidos de steviol (STV)	0 - 4

Además, limita su uso sólo para la elaboración de alimentos con fines dieto-terapéuticos. El ciclamato y sales presentes en bebidas no alcohólicas, tales como refrescos líquidos o en polvo, podrán contener hasta un máximo de 250 mg/L de ciclamato (Reglamento Sanitario de Alimentos DTO 997/96 – MINSAL 2021).

El uso y consumo generalizado de sales de ciclamato y los supuestos efectos adversos para la salud obligan al desarrollo y la validación de métodos analíticos eficientes para su determinación precisa (Huang *et al.* 2006). De todos los métodos analíticos desarrollados durante décadas para el análisis de este

edulcorante en diferentes matrices de alimentos, los métodos cromatográficos han sido los más populares, particularmente el uso de HPLC (Kokotou 2013).

Se han desarrollado varios métodos analíticos basados en HPLC con diferentes detectores y pretratamiento de muestras para la determinación de ciclamato, ya sea individualmente o junto con otros edulcorantes (Shah *et al.* 2014, 2015; Sakai *et al.* 2015), detección por espectrofotometría indirecta (Herrmann *et al.* 1983), absorción en el rango visible con la adición de colorantes (Choi *et al.* 2000), absorción en el rango ultravioleta (UV), fluorescencia antes de la derivatización de la muestra (Hauck & Köbler 1990; Choi *et al.* 2000), MS (Zygler *et al.* 2011), un detector evaporativo de dispersión de luz (Wasik *et al.* 2007) y electroforesis de la zona capilar (Vistuba *et al.* 2015).

En la Unión Europea existen dos procedimientos analíticos oficiales basados en técnicas analíticas por HPLC con detección UV publicados por el Comité Europeo de Normalización (CEN): EN 12857, que requiere un pretratamiento (derivatización) de las muestras, y EN 1379, que es específico para el análisis de preparaciones líquidas de endulzantes de mesa (EN 1379:1996, EN 12857:2001). EN 12857 utiliza una reacción con cloro activo para convertir el ciclamato en N, N-diclorociclohexilamina, que absorbe los rayos UV (EN 12857:2001).

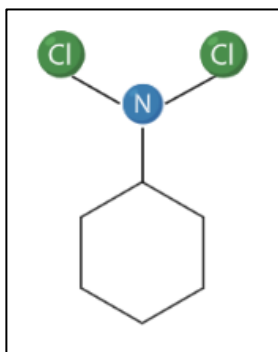


Figura N°1: N. N - Diclorociclohexilamina

El método analítico HPLC-UV utilizado en el presente trabajo para el análisis de ciclamato se basa en el procedimiento EN 12857. El método es muy específico para este edulcorante, ya que puede aplicarse en distinta variedad de matrices alimentarias (EN 12857:2001) y es de bajo costo en comparación a métodos por HPLC-MS.

El objetivo de este trabajo es optimizar y validar el método analítico de determinación de Ciclamato de sodio por HPLC-UV propuesto, para su aplicación en el Laboratorio Salud Ambiental Concepción como método de ensayo de control de calidad en alimentos.

Con este trabajo será posible determinar cómo varían los niveles de ciclamato en diferentes marcas y variedades de bebidas y verificar si se cumplen las cantidades de ciclamato de sodio declarados por el fabricante.

3. - OBJETIVOS

3.1. – PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

Problema de Investigación

No existe un método basado en HPLC validado para la determinación de ciclamato de sodio en bebidas y refrescos no alcohólicos en el Laboratorio de Salud Ambiental perteneciente a la SEREMI de Salud Biobío.

Pregunta de investigación

¿Es posible implementar y validar un método por HPLC para la determinación de ciclamato de sodio en bebidas no alcohólicas en el Laboratorio de Salud Ambiental de la Seremi Bío-Bío?

3.2. - HIPOTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

El ciclamato de sodio es un edulcorante no calórico usado en alimentos y bebidas no alcohólicas y no existe un método implementado y validado en el Laboratorio de Salud Ambiental para su determinación.

Objetivo General

Implementar y validar un método de detección y cuantificación de ciclamato de sodio en bebidas no alcohólicas, para la verificación del correcto etiquetado y contenido declarado en estos productos, en el Laboratorio de Salud Ambiental Concepción.

3.3.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i. Establecer parámetros adecuados de detección cromatográfica basados en la norma EN 12857 según los instrumentos y reactivos disponibles en el Laboratorio de Salud Ambiental Concepción.
- ii. Elaborar el procedimiento de análisis y cuantificación de ciclamato de sodio de acuerdo las normas internas del Laboratorio de Salud Ambiental Concepción.
- iii. Realizar la optimización y validación de un método analítico con separación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección en la región ultravioleta (UV), de acuerdo al procedimiento de la norma EN 12857.
- iv. Identificar la presencia de ciclamato de sodio y verificar la concentración declarada en el etiquetado de bebidas no alcohólicas elaboradas en la región del Bío-Bío.

4. - METODOLOGÍA

El procedimiento planeado para la determinación de ciclamato en bebidas no alcohólicas se basa en el Estándar Europeo EN 12857¹, que define un método por HPLC-UV para la determinación de este edulcorante en diferentes tipos de productos alimenticios. Como se mencionó anteriormente, la tecnología HPLC es la más utilizada para la determinación de ciclamato.

El compuesto N, N-diclorociclohexilamina obtenido de la derivatización del Ciclamato, permite la detección por HPLC con detector UV, debido a la sensibilidad de la amina obtenida a la radiación ultravioleta. El producto derivatizado se separó posteriormente en una columna cromatográfica de fase inversa y se detectó a una longitud de onda de 314 nm. La identificación del ciclamato en las muestras se realizó por comparación con los tiempos de retención de las soluciones estándar. La cuantificación se realizó mediante estandarización externa basada en una curva de calibración.

4.1.- Reactivos:

- i. Acetonitrilo grado HPLC Merck
- ii. n-Hexano grado HPLC Merck
- iii. Ácido sulfúrico >95% p.a Merck

¹ Estándar Europeo protegido por derechos de autor, su reproducción parcial o total de su contenido en éste trabajo está prohibido.

- iv. Carbonato de sodio p.a. Merck
- v. Hipoclorito de sodio p.a. (4 – 5% cloro activo). Sigma-Aldrich
- vi. Sulfato de sodio anhidro p.a Merck
- vii. Estándar analítico de ciclamato de sodio pureza $\geq 98\%$. Supelco. Lote #LC25932V

4.2.- Equipos

- i. Sistema cromatográfico de alta resolución HPLC, marca Dionex© Termo Scientific©, modelo Ultimate 3000, equipado con bomba cuaternaria, horno-columna, inyector automático y detector de diodos UV-Vis DAD de la marca Dionex© Termo Scientific© modelo 3000. Se utilizó el software Chromoleon® como sistema de adquisición y procesamiento de datos.
- ii. Columna cromatográfica RP C18 Inertsil ODS-4 5 μm . Con dimensiones de 4,6 x 150 mm. Marca GL Sciences Inc.
- iii. Baño ultrasonido DELMA D-770
- iv. Sistema de ultra purificación de agua Direct-Q UV
- v. Refrigerador (0 – 8 °C)
- vi. Balanza Analítica calibrada, $\pm 1\text{mg}$ RADWAG
- vii. Micropipetas capacidad 20-200 μL , 100-1000 μL
- viii. Macropipetas capacidad 1-10 mL

4.3.- Materiales:

- i. Embudos de decantación de 150 o 250 mL
- ii. Matraces aforados de 500, 25, 10 y 5 mL
- iii. Tubos cónicos de 15 mL de vidrio
- iv. Vasos de precipitado de 25, 50 y 100 mL

- v. Soporte universal
- vi. Viales de 2 mL
- vii. Papel filtro cuantitativo grado N° 388, marca Sartorius
- viii. Jeringas desechables de 1 ó 5 mL
- ix. Filtros de separación de fases PTFE para solventes no polares de 0,45 μm
- x. Embudos de vidrio 50 mm.

4.4.- PREPARACIÓN DE REACTIVOS Y SOLUCIONES

4.4.1.- Preparación de las muestras

Se analizaron bebidas no alcohólicas de una misma marca con contenido declarado de ciclamato de sodio en la etiqueta.

Se tomó un volumen aproximado de 100 mL de muestra en un vaso de precipitado. Las muestras fueron sonicadas y homogenizadas por 10 minutos. Según el estándar EN 12857 las muestras líquidas no requieren un tratamiento previo.

4.4.2.- Solución de carbonato de sodio al 5%

Se pesó $25,0 \pm 0,1$ g de carbonato de sodio en un vaso de precipitado de 25 mL, para luego ser traspasados cuidadosamente a un matraz aforado de 500 mL usando agua ultrapura para aforar.

4.4.3.- Solución de hipoclorito de sodio al 1,7% de cloro activo

En un matraz aforado de 10 mL se procedió a diluir el hipoclorito de sodio comercial (el cual contiene entre 4 – 5% de cloro activo según proveedor) con agua ultrapura hasta obtener una fracción molar de 1,7% de cloro activo. Para verificar el contenido de cloro activo de la solución comercial de hipoclorito de sodio de un nuevo lote se siguieron los pasos del Anexo A.

4.4.4.- Solución de ácido sulfúrico al 50%

En un tubo cónico de 15 mL se agregó 4,9 mL de agua ultrapura y luego cuidadosamente 5,1 mL de ácido sulfúrico (96%) (bajo campana) por las paredes del tubo.

4.4.5.- Solución madre de ciclamato de sodio y curva de calibrado

Se pesó aproximadamente $0,1140 \text{ g} \pm 0,0001$ del estándar puro de ciclamato de sodio y luego se diluyó con agua ultrapura en un matraz aforado de 25 mL (4000 mg/L).

El Factor de Conversión desde ciclamato de sodio a ácido ciclohexilsulfámico es de 0,8909 y 1,1091 de manera recíproca. Esto debido a la disolución en agua de la sal de ciclamato de sodio, separándose de la molécula de sodio que no participa en la reacción de derivatización.

4.4.6.- Preparación de solución patrón de ciclamato de sodio de 1000 mg/L

Se tomó 6,25 mL de la solución madre y llevaron a un matraz aforado de 25,0 mL, aforando con agua ultrapura.

4.5 - Derivatización

El proceso de derivatización de las muestras en estudio y de las soluciones patrón de ciclamato se realizaron bajo campana de extracción, utilizando los implementos de seguridad necesarios debido a que en la reacción se libera gas cloro (Cl_2) tóxico.

Se pipetearon 20 mL de la muestra preparada (4.4.1) o 20 mL de las soluciones estándar de cada nivel (4.4.5) en embudo de decantación, se adicionó 1 mL de solución de ácido sulfúrico (4.4.4), 10 mL de n-hexano y 2,50 mL de hipoclorito de sodio al 1,7% (4.4.3). Se cerró rápido y firmemente el embudo con tapón adecuado, se agitó por 1 minuto exacto con ambas manos y sosteniendo firmemente el tapón, dejando escapar el gas cloro a presión acumulado de la reacción en el interior del embudo de decantación a través de la llave de salida del embudo. Después de agitar, se dejó en reposo hasta que las fases se separaron por completo descartando la fase acuosa inferior. A continuación, se lavó la fase de n-Hexano agregando 25 mL de la solución de carbonato de sodio

(4.4.2) agitando por 30 segundos, descartando la fase inferior acuosa. Finalmente se procedió a filtrar la fase orgánica a través de papel filtro junto a una cantidad $1,0 \pm 0,1$ g de sulfato de sodio anhidro, para eliminar la humedad residual.

Del proceso anterior, se obtuvieron aproximadamente 7 mL del extracto orgánico, los cuales se dispusieron en un tubo cónico de 15 mL o tubo de ensayo.

El producto derivatizado tiene una estabilidad de 24 horas refrigerado a 4 °C según EN 12857.

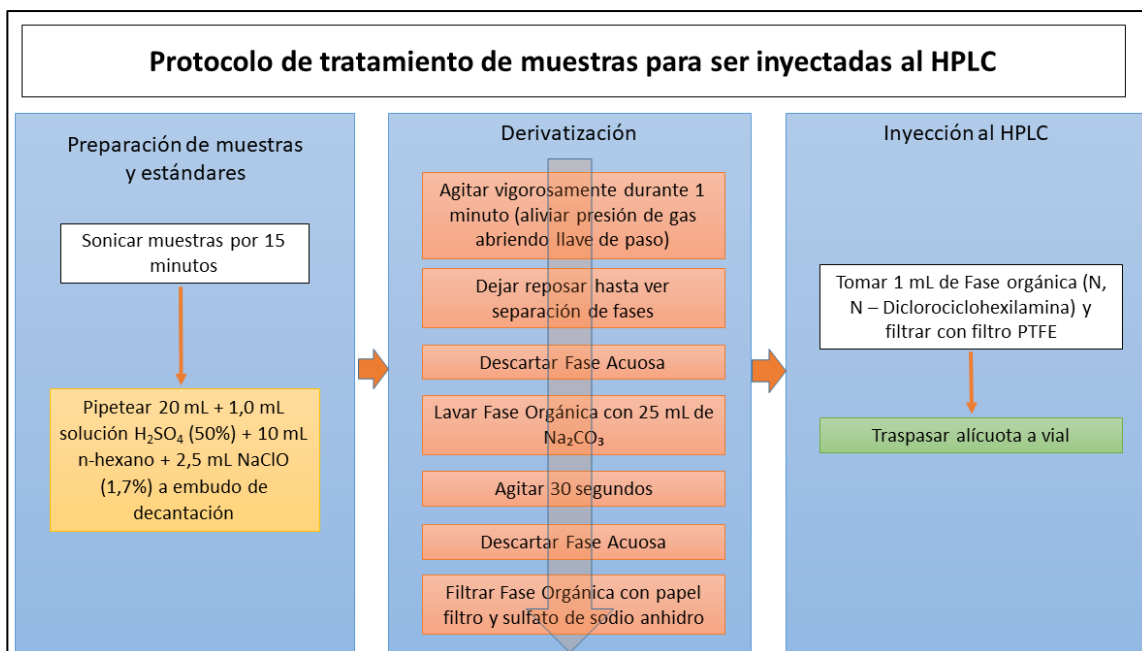
4.6.- Curva de calibración

Se preparó una curva de calibración de 5 niveles de concentraciones de 50 mg/L, 100 mg/L, 150 mg/L, 200 mg/L y 300 mg/L a partir del extracto de 7 mL obtenido en la derivatización (4.5) de la solución patrón de ciclamato de sodio (4.4.6). Se toma la cantidad de muestra derivatizada en Tabla N°2 para luego aforar en matraces aforados de 5 mL con n-Hexano.

Tabla N°2: Curva de calibración

Concentración (mg/L)	Cantidad de muestra derivatizada (µL)	Volumen final aforado (mL)
50	250	5
100	500	5
150	700	5
200	1000	5
300	1500	5

Una vez aforado con n-Hexano, se homogenizó; luego utilizando una jeringa desechable de 1 mL acoplado a un filtro PTFE se filtró y se dispuso en el vial, para la determinación cromatográfico.



Esquema N°2: Protocolo de tratamiento para muestras de bebidas y estándares preparados previa inyección al HPLC

4.7.- Fase móvil

La fase móvil consistió en acetonitrilo grado HPLC y agua ultrapura grado HPLC. Cada una se dispuso en frascos volumétricos de 1000 mL por 15 min para su desgasificación por sonicación. Luego los frascos fueron llevados a la bomba cuaternaria que corrió la fase móvil en la proporción 70/30 MeCN/Agua respectivamente.

4.8. – Condiciones cromatográficas

Los resultados de optimización del procedimiento analítico realizados se presentan en la **Tabla N°3**:

Tabla N°3: Condiciones cromatográficas

Parámetros	Condiciones
Modo de separación	Fase reversa
Fase móvil	Acetonitrilo (70%) y Agua (30%) en modo isocrático
Flujo	1 mL/min
Volumen de inyección (µL)	20
Detección (longitud de onda)	314 nm
Temperatura horno columna (°C)	40
Temperatura muestras (°C)	5
Tiempo de corrida (min.)	12

5.- OPTIMIZACIÓN DEL PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

Con el fin de optimizar el procedimiento descrito en la norma EN 12857, se probaron algunos cambios y se llevó a cabo un análisis crítico en cuanto a la preparación de las soluciones estándar, algunos reactivos y las condiciones cromatográficas recomendadas.

5.1.- Solvente

La norma EN 12857 exige el uso de n-Heptano, sin embargo, la cantidad de n-Heptano presente en el laboratorio era limitada, de calidad p.a. y, por tanto, requería de un proceso extra de filtración para descartar impurezas.

Si había una buena cantidad de n-Hexano en el laboratorio y de calidad HPLC. Por tanto, se eligió éste como solvente.

En la Tabla N°4 podemos ver las principales diferencias entre ambos solventes y su viscosidad expresado en centipoise (cps).

Tabla N°4: Propiedades de solventes (Quattrochi et al., 1992)

Solvente	Corte UV (nm)	Índice de Refracción (25 °C)	Punto de ebullición (°C)	Viscosidad (cps) a 25 °C
n-Heptano	195	1,385	98	0,40
n-Hexano	190	1,372	69	0,30

La diferencia en el uso de estos solventes se verá en resultados.

5.2.- Composición de la fase móvil

La composición de la fase móvil utilizada en este trabajo y su proporción se basó en un método distinto al procedimiento descrito en la norma EN 12857, el cual consiste, según ésta última, en 80% metanol y 20% Agua. Dependiendo de la columna utilizada, la proporción puede verse ligeramente modificada si existen mejores resultados experimentales. En general, el cambio a una fase móvil de metanol a acetonitrilo con mayor polaridad y menor viscosidad da como resultado una elución más lenta y tiempo de retenciones mayores del analito, pero una mayor sensibilidad respecto a metanol como se verá en los resultados. Estas propiedades fisicoquímicas entre ambos solventes pueden verse en la tabla N°5:

Tabla N°5: Propiedades de solventes en fase móvil (Quattrochi et al., 1992)

Solvente	Corte UV (nm)	Índice de Refracción (25 °C)	Punto de ebullición (°C)	Viscosidad (cps) a 25 °C	Momento dipolar
Metanol	205	1,326	65	0,54	0,30
Acetonitrilo	190	1,341	82	0,34	0,41

5.3.- Preparación de soluciones patrón de ciclamato de sodio

Debido a la cantidad contenida de ciclamato presente en las bebidas no alcohólicas, sería deseable la definición de un rango de trabajo en un área de

concentraciones adecuadas al valor declarado en las etiquetas del producto, evitando así la necesidad de realizar diluciones adicionales.

De esta manera, se probó un procedimiento alternativo para la preparación de soluciones estándar en un intento de validar una curva de calibración del método. Este procedimiento consistió en una derivatización directa de un volumen dado de la solución patrón stock (indicado ya en Materiales y Métodos), y la posterior realización de las diluciones apropiadas a los puntos de la curva de calibración a partir de la solución derivatizada. La realización de la curva de trabajo indicada por el método EN 12857 sigue los mismos pasos indicados en materias y métodos, solo que originalmente se debe derivatizar cada punto o concentración de la curva de trabajo, además de utilizar un rango alto de concentración (800 mg/L).

6.- PARAMETROS DE EVALUACIÓN

La validación de un método analítico es el proceso por el cual se establece, por medio de estudios previos en el laboratorio, que un método es apropiado para el uso propuesto. En el transcurso de este trabajo se analizaron y validaron los parámetros referidos y descritos en la guía interna de validación de laboratorio de Salud Ambiental de la Seremi Biobío, así como los documentos de control de calidad de los métodos cromatográficos.

6.1. - Límites y linealidad

6.1.1.- Límite instrumental: Para evaluar la respuesta instrumental se preparó un estándar a una alta concentración (200 mg/L), se evaluó el tiempo de retención, área y relación señal /ruido. A través de esta relación se estableció el límite de detección estimado. Posteriormente se preparon estándares a concentraciones diluidas para corroborar la relación y definir las concentraciones de trabajo.

6.1.2.- Límite del método (LOD y LOQ): El Límite de detección (LOD) corresponde a la concentración mínima de un compuesto que puede ser

detectada en una matriz, la cual es tratada siguiendo todas las etapas del método completo, incluyendo separaciones y pretratamientos.

EL Límite de Cuantificación (LOQ) corresponde a la concentración mínima de un compuesto que puede ser cuantificada en una matriz, la cual es tratada siguiendo todas las etapas del método completo, incluyendo separaciones y pretratamientos. Esta mínima concentración produce una señal cuantificable a un nivel de confianza definido. Se determinó la media aritmética, desviación estándar, coeficiente de variación CV.

Se calcula según formula los límites:

$$LOD = 3,29 \times DS \quad (\text{ecuación N}^{\circ}1)$$

$$LOQ = 10 \times DS$$

La concentración de LOQ debe ser precisa, por lo que al evaluar los fortificados, se acepta si el coeficiente de variación obtenido es menor al coeficiente de variación de Horwitz para condiciones de reproducibilidad intralaboratorio.

La ecuación del coeficiente de variación está dada por:

$$CV = \frac{DS}{\bar{x}} \quad (\text{ecuación N}^{\circ}2)$$

Donde:

DS: Desviación estándar de las lecturas

$\bar{x}$: Promedio de la totalidad de las lecturas

La ecuación de Horwitz está definida como:

$$CV_h = 2^{(1-0.5 \cdot \log C)} \text{ (ecuación N°3)}$$

Donde:

CV_h: Coeficiente de variación de Horwitz

C: Concentración del analito expresado en potencia de 10 (ver tabla N°3 Anexo B)

Para evaluar la concentración utilizada en los fortificados se utilizó la prueba de conformidad R según criterio AOAC.

$$R = \frac{\bar{x}}{LDM_{Calculado}} = \frac{\bar{x}}{3s} \text{ (ecuación N°4)}$$

Prueba de conformidad: Si $4 < R < 10$, la concentración utilizada es la adecuada.

6.1.3.- Linealidad: Representación gráfica bidimensional, que muestra la variación de la señal analítica con la concentración del analito.

Se realizó una evaluación de la curva de calibración global (construida con valores promedio de 3 curvas) con una evaluación estadística usando la prueba t-student con la siguiente formula de correlación lineal significativa:

$$t_r = \frac{|r|\sqrt{(n-2)}}{\sqrt{(1-r^2)}} \text{ (ecuación N°5)}$$

Dónde:

t_r : valor estimado de t-Student obtenido para el coeficiente de correlación

$|r|$ = Valor absoluto del coeficiente de correlación

$n - 2$ = Numero de grados de libertad

r^2 = Valor del coeficiente de determinación

6.1.4.- Test de Mandel: Está basada en la comparación entre el modelo de calibración lineal y un modelo alternativo (modelo cuadrático).

El test de Mandel se realizó en Excel y se evaluó el resultado de probabilidad.

Usando el modelo estadístico de las desviaciones estándar residuales de los dos tipos de funciones y las diferencias entre sus varianzas se calculan con la siguiente ecuación:

$$DS^2 = (N - 2)S_{Y1}^2 - (N - 3)S_{Y2}^2 \text{ (ecuación N°6)}$$

Donde:

DS^2 = Varianza

N = Numero de curvas de calibración

S_{Y1}^2 = Desviación estándar residual de la ecuación lineal

S_{Y2}^2 = Desviación estándar residual de la ecuación polinomial.

6.2. – Precisión

La precisión podrá establecerse en términos de repetibilidad y precisión intermedia. El grado de precisión se expresa habitualmente en términos de imprecisión se calcula como desviación estándar de los resultados (Manual Codex Alimentarius 18°Ed).

6.2.1.- Repetibilidad: Es la precisión bajo las condiciones de repetibilidad, es decir, condiciones donde los resultados de análisis independientes se obtienen con el mismo método en ítems de análisis idénticos en el mismo laboratorio por el mismo operador utilizando el mismo equipamiento dentro de intervalos cortos de tiempo (Guía técnica validación de métodos – ISP 2010).

6.2.2.- Precisión intermedia: expresa la variación dentro de un mismo laboratorio. Al menos una de las siguientes condiciones es diferente: analista, instrumento, día, con la misma muestra homogénea. (Guía técnica validación de métodos – ISP 2010).

El criterio de aceptabilidad para la evaluación de la precisión se realizó de acuerdo a la evaluación del coeficiente de variación de Horwitz (Ver ecuación nº3).

En donde para repetibilidad se cumple si $CV < \frac{1}{2} CV_h$

Para precisión intermedia se cumple si $CV < \frac{2}{3} CV_h$

6.3.- Veracidad

6.3.1.- Recuperación: La exactitud se expresó como el porcentaje de recuperación en la valoración de una cantidad conocida de analito, la que se añadió sobre la muestra de agua.

El porcentaje de recuperación se calcula de acuerdo a lo siguiente:

$$\%R = \left[\frac{(Cm - C0)}{Ca} \right] * 100 \quad (\text{ecuación N}^\circ 7)$$

Donde:

$\%R$ = porcentaje de recuperación de cada muestra.

Cm = es la concentración medida del analito en la muestra fortificada.

$C0$ = es la concentración presente en un blanco matriz.

Ca = es la concentración equivalente al valor teórico adicionado a la muestra.

Cada uno de los niveles de concentración analizados deberá cumplir con lo siguiente: $t_{calc} < t_{crit}$

$$t_{calc} = \frac{(100 - \%R)}{(S * \sqrt{n})} \quad (\text{ecuación N}^\circ 8)$$

Donde:

t_{calc} = t observado o calculado.

R = Recuperación.

S = Desviación estándar de las lecturas del porcentaje de recuperación.

n = N° de lecturas o valores observados.

7.- RESULTADOS

7.1.- Solventes

Como se describió en (5.1) se optó por usar n-Hexano en vez de n-Heptano. Para ver diferencias entre ambos solventes se usó una muestra de bebida con analito para la comparación usando los siguientes parámetros cromatográficos; una fase móvil con concentración de 80/20 metanol/agua, flujo 1,0 mL/min, una longitud de onda de 314 nm y columna a temperatura ambiente. A continuación, vemos los resultados obtenidos en la tabla N°6:

Tabla N°6: Comparación de resultados en el uso de distintos solventes

Analito	Área (mAU)	Tiempo de retención (min)
Ciclamato con n-Heptano	3766	5,4
Ciclamato con n-Hexano	3920	5,4

7.2.- Cambio de fase móvil

Se mencionó en (5.2) que se realizó un cambio respecto a la fase móvil que exige la norma (Metanol 80%/ Agua 20 %) a Acetonitrilo 70% / Agua 30%. Para aquello se compararon dos estándares de ciclamato con una concentración de 100 mg/L y se verificaron las propiedades de cada cromatograma obtenido. En la tabla N°7 podemos ver las distintas condiciones cromatográficas usadas para cada fase móvil.

Tabla N°7: Condiciones cromatográficas utilizadas.

Parámetros	Condiciones (método modificado)	Condiciones (según EN 12857)
Modo de separación	Fase reversa	Fase reversa
Fase móvil	Acetonitrilo (70%) y Agua (30%) en modo isocrático	Metanol (80) y Agua (30%) en modo isocrático
Flujo	1 mL/min	1 mL/min
Volumen de inyección (µL)	20	20
Detección (longitud de onda)	314 nm	314 nm
Temperatura horno columna (°C)	40	40
Temperatura muestras (°C)	5	5

En las Figuras N°2 y Figura N°3 podemos comparar las diferencias de los cromatogramas usando fases móviles distintas.

Figura N°2: Cromatograma de una solución estándar de 100 mg/L utilizando MeOH y Agua (80:20)

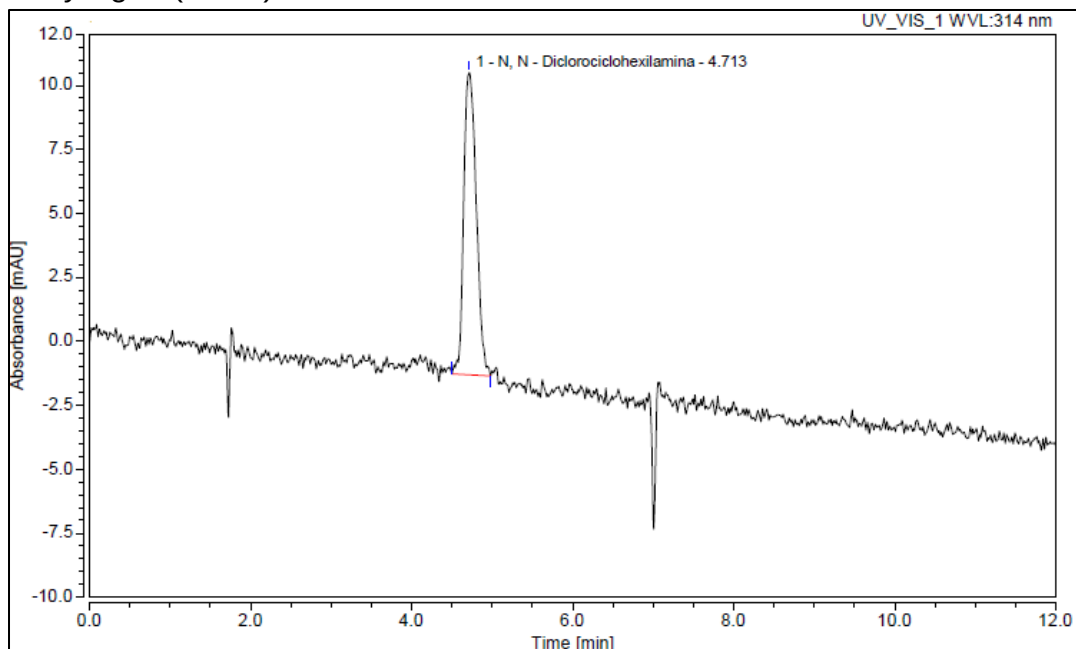
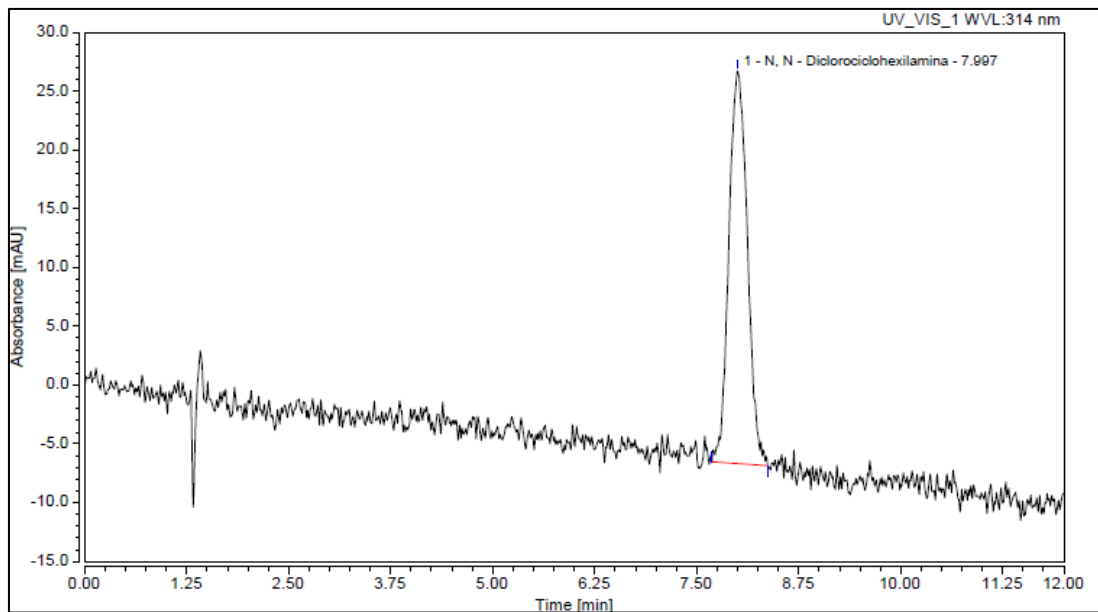


Figura N°3: Cromatograma usando un estándar de 100 mg/L en fase móvil de MeCN y agua (70:30)



En la tabla N°8 podemos ver las propiedades de cada pico cromatográfico obtenido con las distintas fases móviles usadas.

Tabla N°8: Propiedades de picos cromatográficos usando distintas fases móviles

Concentración (mg/mL)	Área (AU)	Altura (AU)	Tiempo de retención (min)
100 (MeHO/H ₂ O)	1015	11800	4,7
100 (MeCN/H ₂ O)	8769	33409	7,9

7.3.- Preparación curva de trabajo siguiendo método del estándar EN 12857

En 5.3 se describió un cambio en la preparación de la curva de trabajo, a continuación, se realizó una curva de trabajo siguiendo lo que dice la norma EN 12857, en donde cada punto de la curva de trabajo fue derivatizada por separado.

Se realizaron 3 repeticiones en distintos días como se verá en la tabla N°9:

Tabla N°9: Curva de trabajo según norma EN 12857.

Nivel	Concentración (mg/L)	Área 1 (mAU)	Área 2 (mAU)	Área 3 (mAU)	Área Promedio	DS	CV%
1	50	4021	3868	4073	3987	107	2,7
2	100	7676	8220	8303	8066	341	4,2
3	150	12225	12414	12979	12539	392	3,1
4	200	16676	16840	16449	16655	196	1,8
5	300	25645	25769	24549	25321	671	2,7

Las comparaciones entre los distintos métodos usados se verán en el Anexo C.

7.4.- Concentración de cloro activo en solución de hipoclorito de sodio comercial

Para esto se siguió el protocolo presente en Anexo A:

$$\% \text{Cl}_2 \text{ activo} = \frac{Vt * N(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) * \text{mEq Cl}_2}{8 \text{ mL} * Fd} * 100$$

Se utilizaron 25,6 mL total en la titulación, por tanto:

$$\% \text{Cl}_2 \text{ activo} = \frac{25,6 \text{ mL} * (0,0940 \text{ N}) * 0,0355}{8 \text{ mL} * 0,25} * 100$$

$$\% \text{Cl}_2 \text{ activo} = 4,3\%$$

Así se tiene que la solución comercial de hipoclorito de sodio tiene un 4,3% de cloro activo.

7.5.- Validación de la metodología analítica

7.5.1.- Límites y linealidad (Limite Instrumental)

Para evaluar la respuesta instrumental se preparó un estándar de concentración de 200 mg/L ácido ciclámico.

La figura N°4 nos muestra un pico definido con las siguientes propiedades resumidas en la tabla N°10.

Figura N°4: Cromatograma del estándar de 200 mg/L

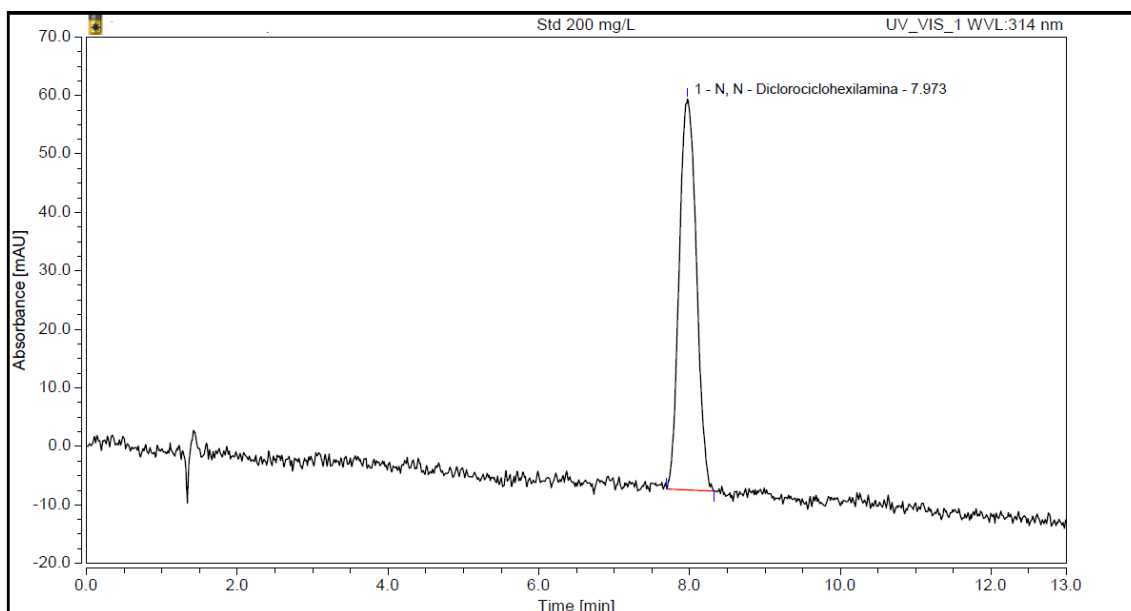


Tabla N°10 Propiedades cromatograma de Figura N°4

Analito	Tiempo de retención (min)	Área (mAU*min)	Altura (mAU)	Señal/ruido	Concentración (mg/L)
N, N - Diclociclohexilamina	7,9730	17,702	66,843	38,171	195,7

7.5.2.- Limite instrumental del método (LDM)

Para determinar el límite de detección (LOD) se midieron de forma independiente 10 muestras de bebida fortificada con concentración equivalente a la mitad de concentración del primer punto de la curva (25 mg/L) y para el límite de cuantificación (LOD) la concentración utilizada fue la equivalente al primer punto

de la curva (50 mg/L). En condiciones de reproducibilidad (en dos días distintos). Los valores obtenidos en cada ensayo fueron resumidos en la tabla N°11 para LOD y en la tabla N°12 para LOQ:

Tabla N°11 Limite de detección (LOD) fortificado de 25 mg/L

Ensayo	Señal /Ruido	Valor Obtenido
1	6,0	30,5
2	6,9	26,7
3	5,3	22,8
4	6,6	28,4
5	5,3	21,4
6	6,3	26,5
Media		26,0
SD (mg/L)		3,4
CV%		13,1
%Recup _{prom}		104

Tabla N°12 Límite de cuantificación (LOQ) fortificado de 50 mg/L

Ensayo	Señal /Ruido	Valor Obtenido
1	13,4	48,0
2	12,0	48,6
3	14,5	54,7
4	12,9	52,1
5	11,9	48,1
6	10,5	49,7
7	20,3	52,0
8	12,7	54,9
9	14,2	49,7
10	16,0	49,2

Media		50,7
DS (mg/L)		2,6
CV%		5,1
CV_h%		8,9

Así, a partir de las desviaciones estándar (DS) de las tablas anteriores y la ecuación N°1, tenemos que:

$$\text{Limite de detección} = 3,29 \times 3,4 = 11,2 \frac{\text{mg}}{\text{L}}$$

$$\text{Limite de cuantificación} = 10,0 \times 2,6 = 25,8 \frac{\text{mg}}{\text{L}}$$

La concentración de LOQ debe ser precisa, y como indica el parámetro de validación, se acepta si $CV\% < CV_h\%$. A partir de las ecuaciones N°2 y 3 tenemos que:

$$CV\% = \frac{2,6}{50,7} * 100 = 5,1$$

$$CV_h\% = 2^{(1-0.5*\log 0,000050)} = 8,9$$

$$C = 50 \text{ mg/L} \text{ ó } 50 \text{ ppm} = 5,0 \times 10^{-4}$$

Por tanto, se cumple que $CV < CV_h$

Además, para evaluar si la concentración de los fortificados en el límite de cuantificación es adecuada se utilizó la ecuación de la prueba de conformidad R descrita en la ecuación N°4:

$$R = \frac{50,7}{3,00 \times 2.6} = 6,6$$

En donde sí: $4 < R < 10$ se cumple que la concentración utilizada en LOQ es adecuada.

7.5.3.- Linealidad

Se prepararon curvas de calibración para evaluar la concentración de ciclamato de sodio en bebida no alcohólica (ver Tabla N°13). Cada curva se preparó con una serie de soluciones patrones o estándares acuosas de ácido ciclámico de 5 niveles y posterior derivatización, con concentraciones entre 50 - 300 mg/L.

Tabla N°13: Curvas de calibración realizadas

Curva de Calibración	Fecha	Pendiente	Coeficiente(r)
1	30-01-2020	0,0951	0,9992
2	05-02-2020	0,0942	0,9991
3	12-02-2020	0,0957	0,9994
4	19-02-2020	0,0913	0,9999

Tabla N°14: Valores obtenidos en cada curva y áreas promedio.

Nivel	Concentración (mg/L)	Área 1 (mAU)	Área 2 (mAU)	Área 3 (mAU)	Área 4 (mAU)	Área Promedio	DS	CV%
1	50	3381	4178	4480	4096	4034	465	12
2	100	8769	8686	9003	8720	8795	143	1,6
3	150	12901	13316	13747	13213	13294	350	2,6
4	200	17675	17702	18587	17747	17928	441	2,5
5	300	27557	27803	28710	26963	27758	726	2,6

En el gráfico N°1 podemos ver las 4 curvas superpuestas entre sí, mientras que en el gráfico N°2 podemos ver la linealidad promedio en base a los valores de abscisas y ordenadas promedio de las 4 curvas de la tabla N°14.

Gráfico N°1: Curvas de calibración realizadas

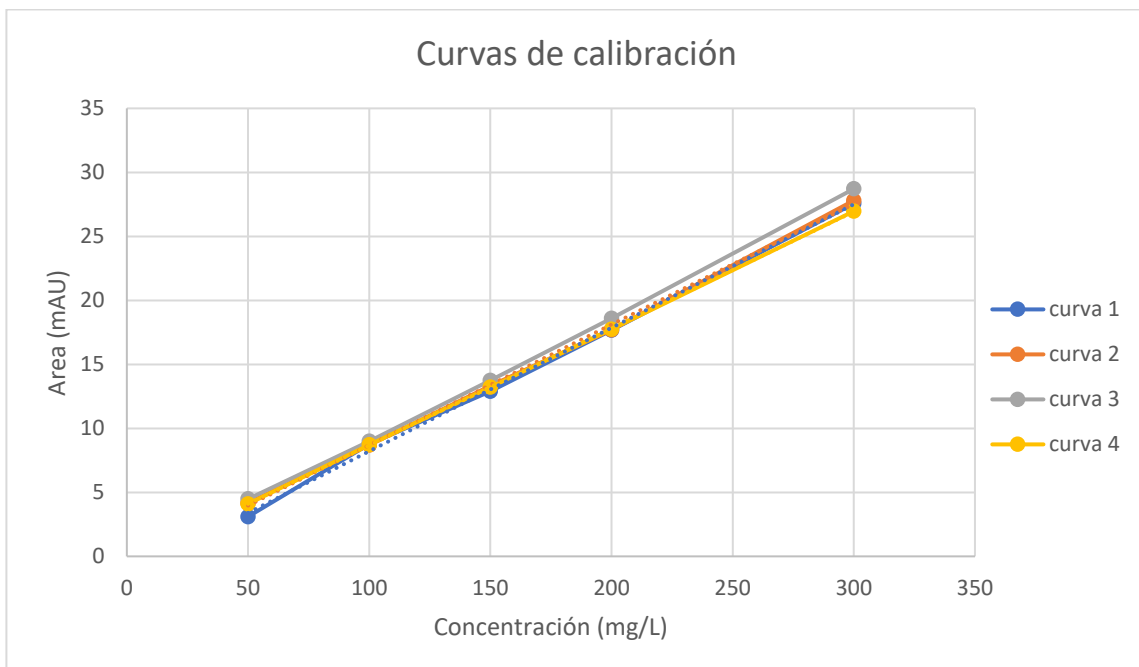
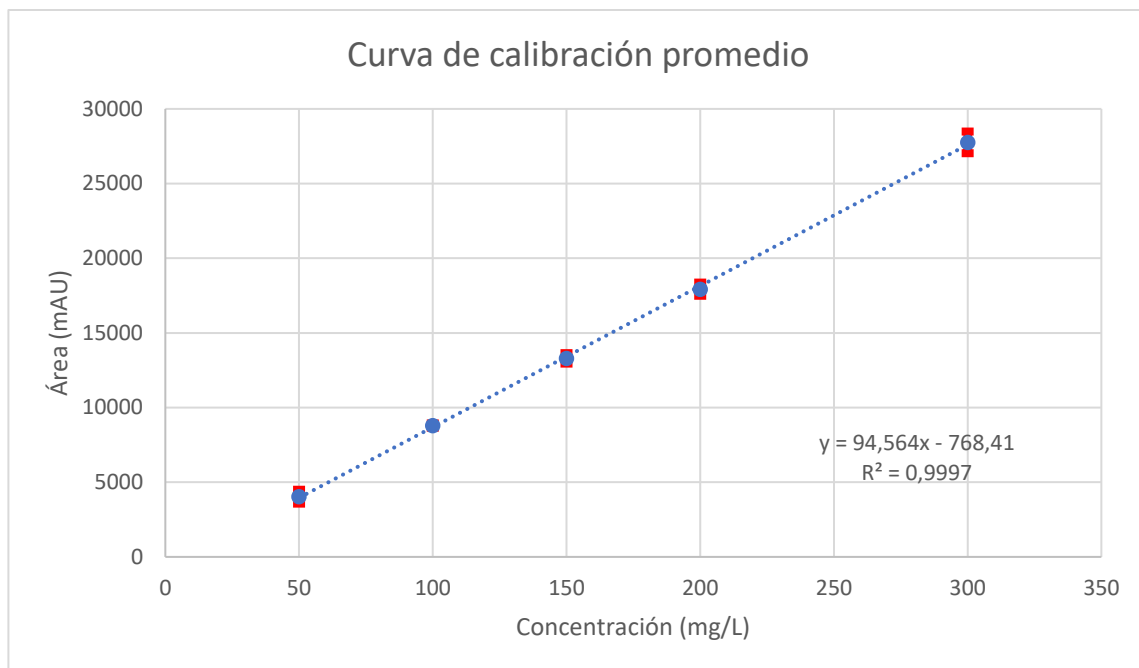


Gráfico N°2: Curva de calibración realizada con valores promedios



A partir de los valores obtenidos de la curva (Gráfico N°2 y N°1) se realizó una evaluación estadística usando la prueba t-Student como indicador de modelo lineal a partir de la ecuación N°3:

Coeficiente de relación (r) = 0,9998

Coeficiente de determinación (r^2) = 0,9997

Número de niveles = 5

Grado de libertad = 4

$$t_r = \frac{|0,9998|\sqrt{(3)}}{\sqrt{(1 - 0,9997)}} = 99,980$$

$$t_{cri} (a=0,05;n=1) = DIST.t.INV = 3,182$$

Así:

Hipótesis nula H_0 : No existe correlación entre X e Y

Hipótesis alternativa H_1 : existe correlación entre X e Y

Como $t_r > t_{cri}$ se rechaza hipótesis nula siendo la correlación lineal significativa con la probabilidad calculada.

7.5.3.1.- Test de Mandel

El test de Mandel se determinó usando un modelo estadístico de las desviaciones estándar residuales. La base del modelo es comparar entre un modelo lineal y un modelo alternativo (modelo cuadrático).

Los cálculos y resultados a partir de la ecuación N°4 se realizan en una planilla Excel de control interno del laboratorio, en donde se evalúa el resultado de probabilidad donde:

Hipótesis nula H_0 : El modelo lineal es adecuado para describir los datos de calibración.

Hipótesis alternativa H_1 : El modelo lineal no es adecuado para describir los datos de calibración.

La probabilidad (p) dada a partir de la ecuación N°4 debe ser $> 0,05$ para que H_0 sea verdadero, entonces el valor de p calculado es:

$$p = 0,27 > 0,050$$

No se rechaza hipótesis nula H_0

Se concluye entonces que el modelo lineal es razonable o adecuado.

7.5.4.- Precisión

7.5.4.1.- Repetibilidad

Para determinar la repetibilidad se midieron de forma independiente 10 muestras de bebida no alcohólica con ciclamato de sodio como ingrediente declarado, cuya concentración se encuentra dentro del rango de linealidad (180 mg/L) expresados en la tabla N°15:

Tabla N°15: Valores del analito declarado obtenidos en la matriz.

Ensayo	Fecha	Valor obtenido (mg/L)
1	30-01-2020	188,5
2	30-01-2020	183,4
3	30-01-2020	175,9
4	30-01-2020	181,3
5	30-01-2020	175,4
6	30-01-2020	179,2
7	30-01-2020	180,2

8	30-01-2020	177,8
9	30-01-2020	190,4
10	30-01-2020	180,9

A partir de los datos anteriores se evaluaron los siguientes parámetros:

Promedio: 181,3 mg/L

DS: 5,0

n: 10

Para CV% y CV_h% aplicando las ecuaciones N°2 y 3 tenemos que:

$$C = 1,8 \times 10^{-4}$$

$$CV\% = \frac{5,0}{181,3} * 100 = 2,7$$

$$CV_h\% = 2^{(1-0,5*\log 0,0000180)} = 7,3$$

$$\frac{CV_h\%}{2} = 3,7$$

Para la repetibilidad del método se acepta, ya que **CV_r% < ½ CV_h%**, para condiciones de repetibilidad intralaboratorio en la concentración analizada.

7.5.4.2.- Precisión intermedia

Para determinar la precisión intermedia se midieron de forma independiente 12 muestras fortificadas de bebida con concentración dentro del rango de linealidad (150 mg/L), realizadas en dos días como se describe en la tabla N°16:

Tabla N°16: Ensayos realizados en matriz fortificada en días distintos

Ensayo	Fecha	Valor obtenido (mg/L)
1	05-02-2020	144,9
2	05-02-2020	154,2
3	05-02-2020	141,2
4	05-02-2020	155,6
5	05-02-2020	135,7
6	05-02-2020	145,5
7	18-02-2020	157,0
8	18-02-2020	151,3
9	18-02-2020	147,3
10	18-02-2020	147,1
11	18-02-2020	145,5
12	18-02-2020	145,2

A partir de los datos anteriores se evaluaron los siguientes parámetros:

Promedio: 147,6

DS: 6,1

n: 12

Para CV% y CV_h% aplicando las ecuaciones N°2 y 3 tenemos que:

$$C = 1,5 \times 10^{-4}$$

$$CV\% = \frac{6,1}{147,6} * 100 = 4,2$$

$$CV_h\% = 2^{(1-0,5*\log 0,0000150)} = 7,5$$

$$2 * \frac{CV_h\%}{3} = 5,0$$

Para la precisión se acepta el método, ya que $CV < \frac{2}{3} CV_h$ para las condiciones de reproducibilidad intralaboratorio, en la concentración analizada.

7.5.5.- Veracidad

7.5.5.1.- Recuperación

Para determinar el porcentaje de recuperación se midieron de forma independiente 6 muestras fortificadas a nivel bajo (50 mg/L) en una muestra de

bebida que contenía el analito de interés en dos días distintos. Se evaluaron 12 muestras fortificadas en bebida sin analito a una concentración media (150 mg/L). Además, se evaluó la recuperación a un nivel alto (280 mg/L), donde se midieron de forma independiente 5 muestras de bebida fortificada sin el analito.

7.5.5.2.- Recuperación con fortificado de 50 mg/L y matriz con el analito

En la tabla N°17 se resumen los ensayos realizados y el porcentaje de recuperación:

Tabla N°17: Bebida con analito + fortificado 50 mg/L

Ensayo	Fecha	Conc. Adicionada muestra (mg/L)	Conc. Muestra blanco (mg/L)	Concentración final muestra (mg/L)	Recuperación %
1	20-02-2020	50,0	180,0	236,1	112,1
2	20-02-2020	50,0	180,0	230,7	101,5
3	20-02-2020	50,0	180,0	228,3	96,7
4	24-02-2020	50,0	180,0	232,8	105,6
5	24-02-2020	50,0	180,0	235,0	110,0
6	24-02-2020	50,0	180,0	221,8	83,6

%R Promedio: 101,6

n: 6

DS: 5,2

$\sqrt{n} = 2,5$

En el caso de la recuperación este debe estar en el rango establecido por la AOAC (Anexo B, Tabla N°1), para la concentración de 50, 150 y 250 mg/L.

A partir de la ecuación N°7 tomando solo los ensayos 1, 2 y 3 como ejemplos de cálculo:

$$R_1 = \left[\frac{(236,1 - 180,0)}{50} \right] * 100 = 112,1\%$$

$$R_2 = \left[\frac{(230,7 - 180,0)}{50} \right] * 100 = 101,5\%$$

$$R_3 = \left[\frac{(228,3 - 180,0)}{50} \right] * 100 = 96,7\%$$

Según la tabla de referencia de la AOAC para una concentración de 100 ppm (Anexo B, Tabla N°1).

Por tanto, se cumple lo establecido por la AOAC.

Cada uno de los niveles de concentración analizados debe cumplir con lo siguiente $t_{calc} < t_{crit}$

A partir de la ecuación N°8 procedemos a averiguar t_{calc}

$$t_{calc} = \frac{(100 - 101,6)}{(5,2 * \sqrt{6})} = 0,7$$

Para obtener t_{crit} se consideran los grados de libertad (v) y el porcentaje de seguridad deseado ($1 - \alpha$) para un error α de 0,05, es decir con un 95% de confianza. Para ello se utilizó la función $DIST.t.INV$ en Excel.

$$t_{crit} (\alpha=0,05;n-1) = DIST.t.INV = 2,57$$

Por tanto, a partir de los valores anteriores se tiene que $t_{calc} < t_{crit}$. Se acepta los resultados obtenidos en los intervalos de recuperación.

7.5.5.3.- Recuperación con fortificado de 150 mg/L y matriz blanco

En la tabla N°18 se resumen los ensayos realizados junto a los porcentajes de recuperación obtenidos.

Tabla N°18 Bebida matriz blanco sin analito + fortificado 150 mg/L

Ensayo	Fecha	Conc. Adicionada muestra (mg/L)	Conc. Muestra blanco (mg/L)	Concentración final muestra (mg/L)	Recuperación %
1	05-02-2020	150	N/D	144,9	96,6
2	05-02-2020	150	N/D	154,2	102,8
3	05-02-2020	150	N/D	141,2	94,1
4	05-02-2020	150	N/D	155,6	103,7
5	05-02-2020	150	N/D	135,7	90,5

6	05-02-2020	150	N/D	145,5	97,0
7	18-02-2020	150	N/D	157,0	104,7
8	18-02-2020	150	N/D	151,3	100,9
9	18-02-2020	150	N/D	147,3	98,2
10	18-02-2020	150	N/D	147,1	98,0
11	18-02-2020	150	N/D	145,5	97,0
12	18-02-2020	150	N/D	145,2	96,8

%R Promedio: 98,4

n: 12

DS: 6,1

$$\sqrt{n} = 3,5$$

Así como en 7.5.8.1 se aplica la ecuación N°7 en todos los ensayos dando los % Recuperación correspondientes a cada uno.

A partir de la ecuación N°8 procedemos a averiguar t_{calc}

$$t_{calc} = \frac{(100 - 98,4)}{(6,1 * \sqrt{12})} = 0,9$$

Para t_{crit} siguiendo lo detallado en 6.4.1.1:

$$t_{crit} (\alpha=0,05;n-1) = DIST. t. INV = 2,20$$

Se cumple lo establecido según el criterio de la AOAC (Anexo B, Tabla N°2)

Por tanto, a partir de los valores anteriores se tiene que $t_{\text{calc}} < t_{\text{crit}}$. Se acepta los resultados obtenidos en los intervalos de recuperación.

7.5.5.4.- Recuperación con fortificado de 280 mg/L y matriz blanco

Se realizó 5 ensayos a la concentración mencionada y con sus porcentajes de recuperación correspondiente, lo anterior resumido en la tabla N°19.

Tabla N°19: Bebida matriz blanco sin analito + fortificado 280 mg/L

Ensayo	Fecha	Conc. Adicionada muestra (mg/L)	Conc. Muestra blanco (mg/L)	Concentración final muestra (mg/L)	Recuperación %
1	19-02-2020	280	N/D	270,4	96,6
2	19-02-2020	280	N/D	265,2	94,7
3	19-02-2020	280	N/D	272,9	97,5
4	19-02-2020	280	N/D	267,1	95,4
5	19-02-2020	280	N/D	259,4	92,7

%R Promedio: 95,4

n: 5

DS: 5,2

$\sqrt{n} = 2,2$

Así como en 7.5.8.2 se aplica la ecuación N°7 en todos los ensayos dando los % Recuperación correspondientes a cada uno expresado en la tabla.

A partir de la ecuación N°6 procedemos a averiguar t_{calc}

$$t_{calc} = \frac{(100 - 95,4)}{(5,1 * \sqrt{5})} = 2,0$$

Para t_{crit} siguiendo lo detallado en 5.4.1.1:

$$t_{crit} (\alpha=0,05;n-1) = DIST. t. INV = 2,78$$

Se cumple lo establecido según el criterio de la AOAC (Anexo B, Tabla N°1)

Por tanto, a partir de los valores anteriores se tiene que $t_{calc} < t_{crit}$. Se acepta los resultados obtenidos en los intervalos de recuperación.

8.- DISCUSIÓN

El presente trabajo tuvo como objetivo la optimización y validación de un método HPLC-UV para la determinación de ciclamato en bebidas no alcohólicas, habiéndose adoptado un procedimiento basado en la norma EN 12857.

La decisión de utilizar este método se basó fundamentalmente por ser una técnica de fácil aplicación y la disponibilidad del equipo HPLC en el Laboratorio Salud Ambiental de la Seremi de Salud del Bío-Bío.

Si bien en el presente trabajo el método fue validado en una matriz de bebida, el procedimiento de derivatización del ciclamato es un procedimiento “universal” que se puede aplicar a cualquier tipo de matriz o muestra homogeneizada.

Así, la norma EN:12857 es aplicable a productos alimenticios más complejos, por ejemplo, chocolates, gelatinas, entre otros.

8.1.- Solvente

El laboratorio de la Seremi de Salud Bio-Bío sí contaba con n-Hexano de calidad HPLC y en mucha mayor cantidad, por lo cual, elegimos este solvente en la cuantificación del analito, al no tener mayores diferencias fisicoquímicas respecto al n-Heptano, a excepción importante de la viscosidad.

No se observó una diferencia significativa en las muestras de prueba ni tampoco en los tiempos de retención (ver resultados en Tabla N°6), pero si se observó una ligera mejora en la definición de los picos y áreas obtenidos al usar n-Hexano por sobre n-Heptano. Por tanto, el uso de n-Hexano es adecuado para la cuantificación de ciclamato de sodio.

8.2.- Composición de la fase móvil

El uso de Acetonitrilo, en vez de Metanol como recomiendo la norma EN 12857, se debe a que se obtuvieron picos más definidos y con menos ruido base como se vio en los cromatogramas obtenidos que corresponden a la figura N°2 y N°3.

Otras publicaciones se refieren al uso de acetonitrilo en lugar de metanol (Dong F., Li Z., Zhou G., Jiang J – 2010) y (Zheng L., Li L., Yyuan A., Li Y – 2006). Sin embargo, se ha informado que no existen diferencias apreciables en el uso de uno u otro solvente orgánico. Acá encontramos diferencias en una mayor absorbancia del analito el cual es más definido con mayor área y altura como se resume en la Tabla N°8 en resultados, pero con un tiempo de retención mayor debido a la naturaleza del acetonitrilo (más apolar) y menor viscosidad. El tiempo de retención mayor se puede deber a que el MeCN tiene un mayor pH respecto al MeOH, el cual interactúa también con un analito con un pH de similares características. Sin embargo, la ganancia en sensibilidad usando Acetonitrilo es notoria.

8.3.- Preparación de soluciones patrón de ciclamato de sodio siguiendo Norma EN 12857

Este procedimiento se realizó según lo indica la norma EN 12857, en donde a partir de la solución madre (4.4.5) se prepararon disoluciones a las concentraciones de los distintos niveles de la curva de calibrado (50, 100, 150, 200 y 300 mg/L). A continuación, se derivatizó cada una de las disoluciones preparadas correspondiente a la curva de calibración siguiendo el proceso de derivatización en (4.5). Este procedimiento se realizó por triplicado.

Luego éstas fueron cuantificadas en el HPLC siguiendo las condiciones cromatográficas modificadas ya establecidas para este trabajo.

Los resultados obtenidos en (7.3) muestran una variación aceptable menor al 5% en los triplicados de cada punto de la curva. El cual, luego es comparado con la curva optimizada utilizada en la cuantificación (7.5.3). Ambas curvas son comparadas más detalladamente en el Anexo C.

8.4.- Preparación de soluciones patrón de ciclamato de sodio siguiendo el método optimizado

Este procedimiento consistió en una derivatización directa de un volumen dado de la solución patrón stock (indicado ya en Materiales y Métodos), y la posterior realización de las diluciones apropiadas a los puntos de la curva de calibración a partir de la solución derivatizada. Este cambio permitió reducir los tiempos de

ejecución de manera empírica asociado a la derivatización de cada una de las cinco soluciones recomendada por la norma, ya que resultó en la realización de una única derivatización.

Este procedimiento fue adoptado solo después de que sus resultados fueran comparados con los determinados por el procedimiento indicado en la norma. Para ello, se llevaron a cabo tres ensayos de acuerdo con los dos procedimientos para un rango de trabajo dado, utilizando la misma solución del estándar madre.

Los resultados obtenidos en (7.4.3) permitieron concluir que la realización del nuevo proceso es equivalente (Ver Anexo C). Este hallazgo se justificó por el hecho de que hubo un solapamiento de las curvas de calibración obtenidas, y por qué los valores obtenidos de la curva optimizada del nuevo procedimiento se encuentran dentro de los límites de las desviaciones estándar de la curva del procedimiento descrito en la norma.

La adopción de este nuevo procedimiento para la preparación de soluciones estándar ha permitido no solo validar un rango de trabajo y su curva de calibración, sino también ahorrar tiempo de ejecución, reactivos de forma significativa y reducir el error asociado a la realización de derivatizaciones continuas en cada uno de los puntos de la curva (error relativo de volumen en distintos matraces, micropipetas, etc.).

8.5.- Concentración de hipoclorito de sodio

Se evaluó la cantidad de cloro activo presente en la solución de hipoclorito comercial por yodometría, la cual, luego de realizar los procedimientos del Anexo A, tenemos que el cloro activo presente corresponde a 4.3% (ver 7.4). Este resultado está dentro del rango declarado por el fabricante (4 – 5%).

Se evaluó verificar si existía alguna diferencia notoria respecto al uso de hipoclorito de sodio distinta a la concentración inicial de 1,7% de cloro activo como indica la norma EN 12857.

Se prepararon soluciones de hipoclorito de sodio (siguiendo los pasos en 4.4.3) a concentraciones de 1,7%, 3,5% y 4,3% de cloro activo. Este último valor de concentración corresponde al calculado que viene en la solución comercial sin diluir y, luego, usados en matriz de bebida con analito posterior a la derivatización de cada una de las concentraciones de cloro activo mencionadas.

A continuación, las soluciones preparadas fueron inyectados al HPLC siguiendo las mismas condiciones cromatográficas de la tabla N°3, a excepción de la fase móvil que fue MeOH/Agua en proporción 80/20.

Tabla N°20: Inyección de matriz con analito usando distintas concentraciones de hipoclorito de sodio

Analito + % cloro activo	Tiempo retención (min)	Área (mAU*min)	Altura (mAU)
Ciclamato 1,7%	5,360	4547	20517
Ciclamato 3,5%	5,373	4321	18922
Ciclamato 4,3%	5,380	4091	18106

Podemos concluir de la tabla N°20 que no existe diferencia significativa en el tiempo de retención, pero si una mayor altura y definición del pico usando una concentración de 1,7% como sugiere el estándar EN 12857.

8.6.- Linealidad

La elaboración de la curva de calibración consistió en 5 niveles de concentraciones, los que fluctuaron entre 50 y 300 mg/L para el ácido ciclohexilsulfámico. La cuantificación de este edulcorante no calórico fue realizada por medio de análisis de regresión del área del pico obtenido frente a la concentración del analito.

Los coeficientes de correlación r y r^2 fueron de 0,9998 y 0,9997 respectivamente. Autores anteriores plantean que para que el método se considere lineal, el coeficiente de correlación debe ser mayor a 0,999, por lo que se concluye que el

sistema cumple con los requisitos de linealidad dentro del rango de trabajo, esto quiere decir que existe proporcionalidad entre la concentración de analito y su respuesta (Díaz y Fernández, 2002).

Con el objetivo de verificar que el modelo lineal utilizado es el adecuado se realizó otra hipótesis nula H_0 en base al Test de Mandel, el cual es un modelo estadístico de desviaciones estándar residuales. Para la probabilidad (p) debe ser mayor a 0,05 para que se cumpla la hipótesis nula H_0 .

Con los resultados obtenidos en 7.5.3.1. se tiene que el valor de p calculado es 0,269. Por tanto, $p > 0,050$, por tanto, no se rechaza la hipótesis nula H_0 .

La metodología propuesta a partir de la Norma Europa EN 12857 presenta un factor de conversión de pesos moleculares de 1,1091 (ver 4.4.5), razón por la cual las áreas y concentraciones obtenidas en el cromatograma deben ser multiplicadas por 1,1091, pudiéndose determinar concentraciones de ciclamato de sodio entre un rango de 55,5 mg/L (LOQ) a 330,6 mg/L.

8.7.- Precisión del método

La precisión fue evaluada en términos de repetibilidad y precisión intermedia intralaboratorio.

8.7.1.- Repetibilidad

En el procedimiento de la determinación del parámetro de repetibilidad se evaluó el valor del coeficiente de variación CV% en 10 mediciones a una concentración de 180 mg/L de ácido ciclohexilsulfámico.

El valor de CV% promedio arrojó un resultado de 2,7%, valor que es aceptado por la AOAC (Anexo B Tabla N°1).

Además, el coeficiente de variación promedio de las muestras debe ser menor a $\frac{1}{2}$ del coeficiente de variación de Horwitz. Como vemos en resultados, esto se cumple ya que $\frac{1}{2} CV_h = 3,66$.

Por lo que se determina que el método es preciso y se acepta para condiciones de repetibilidad intralaboratorio en la concentración analizada.

8.7.2.- Precisión intermedia

Esta se realizó en dos días distintos, con 6 repeticiones cada día de muestras fortificadas de concentración 150 mg/L en una matriz blanco sin analito. El coeficiente de variación promedio (CV%) arrojó un resultado de 4,2%, por lo cual es aceptado por la AOAC (Anexo B tabla N°1).

Además, el coeficiente de variación promedio de las muestras debe ser menor a $\frac{2}{3}$ del coeficiente de variación de Horwitz. Como vemos en resultados, esto se cumple ya que $\frac{2}{3} CV_h = 5,017$.

Por lo que se determina que el método es preciso y se acepta para condiciones de repetibilidad intralaboratorio en la concentración analizada.

Durante los dos días, hubo pequeñas variaciones en la concentración determinada, estas ligeras diferencias pueden ser ocasionadas por errores en la manipulación de muestras estándares, principalmente el pipeteo y cantidad de muestra extraída en la derivatización, por lo que se recomienda precaución y rigurosidad por parte del analista.

8.8.- Veracidad

La veracidad fue determinada por recuperación, la cual determina el grado de coincidencia entre el valor medio obtenido en una serie de resultados y un valor de referencia aceptados (Guía técnica de validación de métodos – ISP 2010).

8.8.1.- Recuperación

La recuperación permite ver el rendimiento de un método analítico en cuanto al proceso de extracción y la cantidad de analito existente en la muestra original, por lo cual, la recuperación está intrínsecamente relacionada a las características de la matriz de la muestra.

Para determinar el porcentaje de recuperación, se midieron de forma independiente 6 muestras fortificadas a nivel bajo (50 mg/L) en una muestra de bebida que contenía el analito de interés. Se evaluó 12 muestras fortificadas de

bebida matriz blanco a una concentración media (150 mg/L). Además, se evaluó la recuperación a un nivel alto (280 mg/L), donde se midieron de forma independiente 5 muestras de bebida matriz blanco fortificada.

En estos procedimientos se evaluará la prueba t ($t_{cal} < t_{cri}$).

En (7.5.5.2) el $t_{calc} = 0,74$ y $t_{cri} = 2,57$

En (7.5.5.3) el $t_{calc} = 0,92$ y $t_{cri} = 2,20$

En (7.5.5.4) el $t_{calc} = 2,01$ y $t_{cri} = 2,78$

Por tanto, los 3 procedimientos para evaluar el método cumplen con la prueba t, siendo $t_{calc} < t_{cri}$, no hay diferencias estadísticamente significativas y por tanto no es necesaria ninguna corrección.

El criterio de aceptación utilizado es en base al valor obtenido en el porcentaje de recuperación en cada uno de los 3 procedimientos se basan en la AOAC la cual relaciona la concentración del analito con el porcentaje de recuperación. (Anexo B, tabla N°2).

Para el rango de concentración de 100 ppm la AOAC estableció porcentajes de recuperación de 90% - 107%, por lo que el método analítico desarrollado es exacto, ya que el promedio de porcentajes de recuperación en cada procedimiento fue de 103,4%, 98,36% y 95,36% para 7.5.5.2, 7.5.5.3 y 7.5.5.4 respectivamente.

Se observa que al aumentar la concentración de ácido ciclohexilsulfámico disminuye el porcentaje de recuperación, por tanto, tenemos que, a concentraciones elevadas sobre 300 mg/L, como establece el método, se tendría tendencia a presentar porcentajes de recuperación inferiores al promedio estimado.

9.- CONCLUSIÓN Y PROYECCIONES

Se desarrolló la metodología analítica para la identificación y cuantificación de ciclamato de sodio en bebidas no alcohólicas por medio de HPLC, siguiendo y optimizando el método desarrollado por la UE bajo la norma EN 12857, la cual describe como cuantificar ciclamato de sodio por HPLC en diferentes matrices alimentarias.

La metodología realizada cumple con los parámetros de linealidad, precisión (en base a repetibilidad y precisión intermedia) y veracidad (en base a recuperación) exigidos para ser implementado como un método analítico en el Laboratorio de Salud Ambiental perteneciente a la Seremi de Salud Bio-Bío. Obteniendo resultados confiables y reproducibles a lo largo del tiempo. Por lo que el método y técnica se pueden emplear para el análisis de muestras de bebidas no alcohólicas como matriz alimentaria.

Se concluye que, se implementó una nueva metodología para la determinación de ciclamato de sodio como edulcorante que no existía anteriormente en el Laboratorio de Salud Ambiental, siendo simple, específico y económico. Y que será útil en la vigilancia de la concentración de ciclamato de sodio de bebidas no alcohólicas vendidas en la región del Bio-Bío que cumplan con la cantidad máximas declaradas en el envase, además de cumplir la cantidad máxima permitida por el Reglamento Sanitario de Alimentos DTO 997/96 del MINSAL

actualizado al año 2021 que es de 250 mg/L, concentración que está dentro del rango de cuantificación utilizado.

Este nuevo método de detección de ciclamato implementado en el Laboratorio de la Seremi de salud Bío-Bío servirá como base para su utilización en otras matrices alimentarias que no sean bebidas no alcohólicas en donde la utilización de ciclamatos es común, como son gelatinas, productos lácteos, golosinas, entre otras. Permitiendo así tener un control del uso de este edulcorante en un mayor rango de alimentos y ver si se cumplen las concentraciones permitidas.

10.- ANEXOS

Anexo A: Determinación de cloro activo en hipoclorito de sodio

El método utilizado para la determinación de la concentración de cloro activo en muestras de hipoclorito de sodio comercial es una titulación de óxido-reducción indirecta: yodometría. En estas titulaciones se utiliza yoduro de potasio en exceso como reactivo intermediario, quien reacciona con el analito para producir una cantidad estequiométrica de yodo, el cual es titulado con una solución patrón secundaria de tiosulfato de sodio. La reacción cuantitativa del tiosulfato ($S_2O_3^{2-}$) con el yodo es única, obteniéndose como producto tetrionato ($S_4O_6^{2-}$) (Lide, David R., ed. - 2006).

Procedimiento:

- Se traspasan 8 mL de hipoclorito de sodio comercial (4 -5% cloro activo) a un matraz aforado de 100 mL. Aforar con agua ultrapura. A esta solución la llamaremos solución 1.
- Preparar 1 mL de disolución de almidón al 1%.
- En un matraz Erlenmeyer de 250 mL se añaden 2,0 g de $KI_{(s)}$ y 50 mL de agua ultrapura, a continuación se agita para disolver completamente el KI, luego se añaden 10 mL de ácido acético glacial y agitar. Finalmente, se añaden 25 mL de la solución B. La solución final en el matraz

Erlenmeyer se tornará de color marrón oscuro inmediatamente al añadir la solución 1. Así esta solución pasa a ser Solución 2.

- En una probeta de 25 mL agregar tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 0,1N y luego valorar la solución 2 hasta obtener color amarillo pato.
- Añadir 1 mL de la disolución de almidón al 1% a la solución titulada de color amarillo pato. Esta cambia inmediatamente a color azul oscuro.
- Seguir titulado con tiosulfato de sodio hasta que la solución sea incolora (transparente).
- Anotar el V_t de tiosulfato gastado

Cálculos:

$$\% \text{Cl}_2 \text{ activo} = \frac{V_t * N(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) * \text{meq Cl}_2}{8 \text{ mL} * F_d} \text{ (ecuación N°10)}$$

Teniendo que:

V_t : Volumen total utilizado de tiosulfato

N ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$): Normalidad tiosulfato = 0,0940

mEq Cl_2 = 0,0355

F_d : Factor de dilución = $25/100 = 0,25$

Anexo B: Criterios de aceptación

Tabla N°1: Criterio de aceptación de la AOAC para parámetro de veracidad, relacionando el porcentaje de recuperación en función de la concentración del analito.

Analito %	Radio analito	Unidad	Porcentaje de recuperación
100	1	100%	98-102
>=10	10-1	10%	98-102
>=1	10-2	1%	97-103
>=0.1	10-3	0.1%	95-105
0.01	10-4	100ppm	90-107
0.001	10-5	10ppm	80-110
0.0001	10-6	1ppm	80-110
0.00001	10-7	100ppb	80-110
0.000001	10-8	10ppb	60-115
0.0000001	10-9	1ppb	40-120

Tabla N°2: Criterios de aceptación de la AOAC para parámetro de precisión en función de la concentración del analito

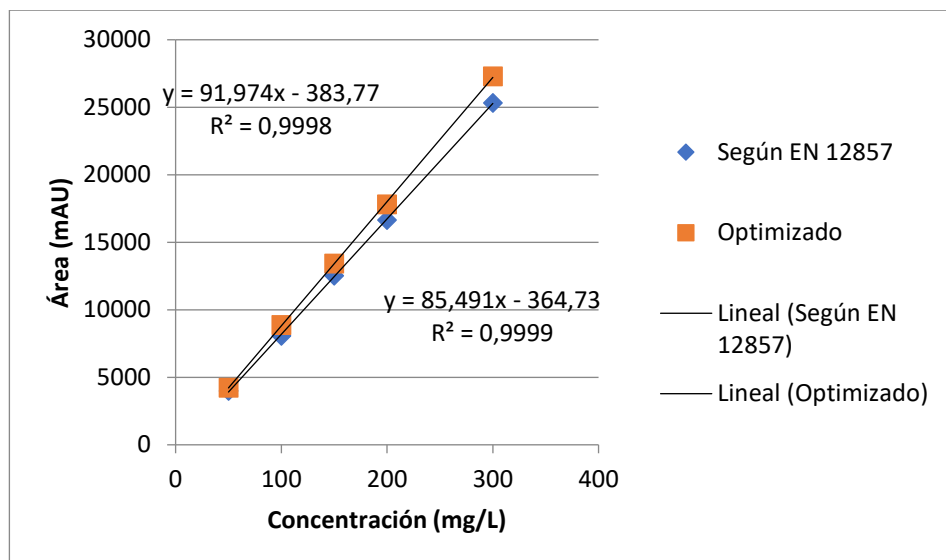
Analito %	Radio analito	Unidad	C.V. (%)
100	1	100%	1.3
10	10-1	10%	2.8
1	10-2	1%	2.7
0.1	10-3	0.1%	3.7
0.01	10-4	100 ppm	5.3
0.001	10-5	10 ppm	7.3
0.0001	10-6	1 ppm	11
0.00001	10-7	100 ppb	15
0.000001	10-8	10 ppb	21
0.0000001	10-9	1 ppb	30

Tabla N°3: Tabla de Horwitz

CONCENTRACIÓN			REPETIBILIDAD CV%r	REPRODUCIBILIDAD INTERNA CV%R
1 ppt	1 / 10 ¹²	1,00E-12	64,0	85,3
10 ppt	10 / 10 ¹²	1,00E-11	45,3	60,3
100 ppt	100 / 10 ¹²	1,00E-10	32,0	42,7
1 ppb	1 / 10 ⁹	1,00E-09	22,6	30,2
10 ppb	10 / 10 ⁹	1,00E-08	16,0	21,3
100 ppb	100 / 10 ⁹	1,00E-07	11,3	15,1
1 ppm	1 / 10 ⁶	1,00E-06	8,00	10,7
10 ppm	10 / 10 ⁶	1,00E-05	5,66	7,54
100 ppm	100 / 10 ⁶	1,00E-04	4,00	5,33
1000 ppm	1000 / 10 ⁶	1,00E-03	2,83	3,77
1%	1 / 10 ²	1,00E-02	2,00	2,67
10%	10 / 10 ²	1,00E-01	1,41	1,89

ANEXO C: Comparación de curvas de trabajo

Gráfico N°1: Comparación de curvas de trabajo con áreas promedio



Curva EN 12857: $y = 85,491x - 364,73$

Curva Optimizada: $y = 91,974x - 383,77$

Tabla N°1: Curva según EN 12857 por triplicado

Concen. (mg/L)	Área 1	Área 2	Área 3	Área Prom	DS	CV%
50	4021	3868	4073	3987	107	2,7
100	7676	8220	8303	8066	341	4,2
150	12225	12414	12979	12539	392	3,1
200	16676	16840	16449	16655	196	1,8
300	25645	25769	24549	25321	671	2,7

Tabla N°2: Curva método optimizado por triplicado

Concen. (mg/L)	Área 1	Área 2	Área 3	Área Prom	DS	CV%
50	4178	4480	4096	4251	202	4,8
100	8686	9003	8720	8803	174	2,0
150	13316	13747	13213	13425	283	2,1
200	17702	18578	17747	18009	493	2,7
300	27803	28710	26963	27825	874	3,1

REFERENCIAS

Archibald AJ, Dolinsky VW, Azad MB (2018). *Early-Life Exposure to Non-Nutritive Sweeteners and the Developmental Origins of Childhood Obesity: Global Evidence from Human and Rodent Studies*. *Nutrients*. 2018;10(2):194. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29439389>

Choi MMF, Hsu MY, Wong SL. (2000). *Determination of cyclamate in low-calorie foods by high-performance liquid chromatography with indirect visible photometry*. *Analyst*.125:217–220.

De La Peña C. (2010). *Diet men. The food-pharma origins of artificially sweetened products*. In: De La Peña C, editor. *Empty pleasures: the story of artificial sweeteners from saccharin to splenda*. Chapel Hill (NC): The University of North Carolina Press; p. 65–104.

EN. 12857:2001. *Determination of cyclamate in foodstuffs by method by high performance liquid chromatography*. Brussels: European Committee for Standardization.

Encuesta Nacional de Salud – (2018). Ministerio de Salud, Chile, Disponible en: https://www.minsal.cl/wp-content/uploads/2017/11/ENS-2016-17_PRIMEROS-RESULTADOS.pdf

EUFIC. 2012. *European Food Information Council. Benefits and safety of low calorie sweeteners, EUFIC review*. Available from: http://www.eufic.org/article/en/page/RARCHIVE/expid/Benefits_Safety_Low_Calorie_Sweeteners/

F. Hunt, B. A. Bopp, P. Price, L. O. (2012) 4th ed. *Cyclamate*. In *Nabors - Alternative Sweeteners*

Hauck M, Köbler H. (1990). *Determination of cyclamate in complex matrix using HPLC after column derivatization with 4-fluoro-7-nitrobenzofurazan*. Eur Food Res Technol. 191:322–324.

Hendriksen, M.A., Tijhuis, M.J., Fransen, H.P. et al. (2011) *Impact of substituting added sugar in carbonated soft drinks by intense sweeteners in young adults in the Netherlands: example of a benefit–risk approach*. Eur J Nutr 50, 41–51 .
<https://doi.org/10.1007/s00394-010-0113-z>

Herrmann A, Damawandi E, WagmannM. (1983). *Determination of cyclamate by high-performance liquid chromatography with indirect photometry*. J Chromatogr. 280:85–90.

Huang Z, Ma J, Chen B, Zhang Y, Yao S. (2006). *Determination of cyclamate in foods by high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry*. J Anal Chim Acta. 555:233–237

Instituto de Nutricion y Tecnologia de Alimentos, Universidad de Chile – (2019). Available from: <https://inta.cl/a-tres-anos-de-ley-etiquetado-cambio-en-la-composicion-de-productos-y-en-los-habitos-de-compra/>

Kishi A, Bizzari S, Janshekar H. (2010). *High-intensity sweeteners*. In: *Chemical economics handbook*. Available from: <https://www.ihs.com/products/high-intensity-sweetenerschemical-economics-handbook.html>

Kroes, R.; Peters, P. W. J.; Berkvens, J. M.; Verschuuren, H. G.; De Vries, T. H. & Van Esch, G. H. (1997) *Long-term toxicity and reproduction study (including a teratogenicity study) with cyclamate, saccharin and cyclohexylamine*. Toxicology, 8:285-300,

Kokotou MG, Asimakopoulos AG, Thomaidis N. (2013). *Sweeteners*. In: Nollet LML, Toldrá F, editors. *Food analysis by HPLC*. 3rd ed. Boca Raton (FL): CRC Press; p. 493–514.

Lide, David R., ed (2006). CRC Handbook of Chemistry and Physics (87th ed.).

Pitkin, R. M.; Reynolds, W. A. & Filer, L. J. (1969) Cyclamate and cyclohexylamine: transfer across the hemochorial placenta. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 132:993-5

Price, J. M.; Biava, C. G.; Oser, B. L.; Steinfeld, J. & Ley, H. L. (1970) Bladder tumors in rats fed cyclohexylamine or high doses of a mixture of cyclamate and saccharin. *Science*, 167:1131-2

Renwick, A. G. & Williams, R. T. (1972) *The fate of cyclamate in man and other species. Biochem. J.*, 129:869-79.

Sakai H, Yamashita A, Tamura M, Uyama A, Mochizuki N. (2015). *Simultaneous determination of sweeteners in beverages by LC-MS/MS. Food Addit Contam Part. 32*:808–816

Sasaki, Y. F.; Kawaguchi, S.; Kamaya, A.; Ohshita, M.; Kabasawa, K.; Iwama, K.; Taniguchi, K. & Tsuda, S. (2002) *The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. Mutat. Res.*, 519:103-19

Shah R, Jager LSD, Begley TH. (2014). *Development and single-laboratory validation of an improved method for the determination of cyclamate in foods using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. J AOAC Int.* 97:1651–1655.

Szmrecsányi T, Alvarez VMP. (1998). *The search for a perfect substitute: technological and economic trajectories of synthetic sweeteners, from Saccharin to Aspartame (c.1880- 1980)*. Available from: <http://portal.ige.unicamp.br/pt-br/biblioteca/acervo-cdpct/search-perfect-substitute-technological-and-economic-trajectories-synthetic>

Takayama, S.; Renwick, A. G.; Johansson, S. L.; Thorgeirsson, U. P.; Tsutsumi, M.; Dalgard, D. W. & Sieber, S. M. (2000) Long-term toxicity and carcinogenicity study of cyclamate in nonhuman primates. *Toxicol. Sci.*, 53:33-9

Vistuba JP, Dolzana MD, Vitali L, Oliveira MAL, Micke GA. (2015). Sub-minute method for simultaneous determination of aspartame, cyclamate, acesulfame-K and saccharin in food and pharmaceutical samples by capillary zone electrophoresis. *J Chromatogr A*. 1396:148–152.

Wasik A, McCourt J, Buchgraber M. (2007). *Simultaneous determination of nine intense sweeteners in foodstuffs by high performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection – development and singlelaboratory validation.* *J Chromatogr A*. 1157:187–196

Wills, J. H.; Serrone, D. M. & Coulston, (1981) F. A 7-month study of ingestion of sodium cyclamate by human volunteers. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 1:163

Zygler A, Wasik A, Kot-Was A, Ameśn J. (2011). *Determination of nine high-intensity sweeteners in various foods by high-performance liquid chromatography with mass spectrometric detection.* *J Anal Bioanal Chem*. 400:2159–2172