

# **Informe de la determinación de azúcares y compuestos amargos en de las 25 muestras del proyecto VALUEPAM**

**Responsable: Dra. María Pilar Almajano**

**Técnica responsable de laboratorio: Lovepreet Kaur**

***Universitat Politècnica de Catalunya***

**27 de febrero del 2018**

## Determinación de azúcares mediante HPLC-IR

### Tratamiento de muestra:

1. Revisión de las muestras: limpieza y codificación
2. Selección de una fracción representativa ( $\approx 5$  g) de cada muestra recibida.
3. Trituración, previa congelación con nitrógeno líquido.

### Extracción de azúcares:

1. Se pesa 0,5 gramos de cada muestra, con una precisión de 0,1 mg.
2. Se añade 3 mL de agua caliente (a 70°C) a la muestra pesada. Se cierra para evitar pérdidas.
3. Se agita en el baño de ultrasonidos (a 25 °C) durante 10 minutos.
4. Se centrifuga a 2500 rpm durante 10 minutos y se recupera el sobrenadante. Se lava 2 veces con un volumen total añadido de 10 mL. Se conserva en refrigeración a 4°C.
5. **Cada muestra se fue extraída por duplicado y analizada por duplicado.** Si había coincidencia en los 4 resultados se seguía adelante. Si no se repetía.

**Método HPLC:** Antes de inyectar, la muestra se filtró a través de un filtro hidrofílico de 0,25  $\mu$ m.

### Condiciones de detección HPLC

Columna	Aminex HPX-87C (300 x 7.8 mm) + Aminex HPX-87P (300 x 7.8 mm), BioRad.
Temperatura de columna	85°C
Bomba	Waters 600 Controller
Inyector	Waters 717 Autosampler
Volumen de inyección	100 $\mu$ L
Fase móvil	Agua ultrapura
Flujo	0,6 mL/min
Modo	Isocrático
Tiempo	35 min
Detector	Índice de refracción, Waters 2414 (35°C, Sensibilidad=128).

**Azúcares determinados:** Gentianosa, gentiobionosa, sacarosa, glucosa y fructosa. Todos ellos determinados mediante recta de calibrado de 5 puntos por duplicado con una  $R^2 > 0,99$ .

Todas las muestras fueron diluidas para que su concentración estuviera dentro del rango de concentración lineal de la recta. Todos los resultados se expresan como mg del azúcar respectivo por gramos de muestra seca (mg azúcar/g muestra seca).

A continuación se presentan los resultados de cada uno de los organismos en tablas diferentes:

Tabla 1: Azúcares determinados en las muestras del *Conservatoire botanique national des Pyrénées et de Midi-Pyrénées*

Tabla 2: Azúcares determinados en las muestras del *CPPARM (Comité des plantes à parfum, aromatiques et médicinales)*

Tabla 3: Azúcares determinados en las muestras del *Parc Naturel Régional des Pyrénées Catalanes*

Tabla 4: Azúcares determinados en las muestras del *Centre Tecnològic Forestal de Catalunya (CTFC)*

Tabla 1: Azúcares determinados en las muestras del *Conservatoire botanique national des Pyrénées et de Midi-Pyrénées*

Muestra	Gentianosa (mg/g muestra)	Gentiobiosa (mg/g muestra)	Sacarosa (mg/g muestra)	Glucosa (mg/g muestra)	Fructosa (mg/g muestra)	Total (mg/g muestra)
C	107 ± 3	5,2 ± 0,4	202 ± 4	61 ± 3	8,1 ± 0,2	383 ± 10
f	153 ± 0	5,1 ± 0,1	204,4 ± 0,4	46 ± 2	5,1 ± 0,2	413 ± 3
D	137 ± 3	5,9 ± 0,1	210 ± 6	67,6 ± 0,1	2,6 ± 0,0	424 ± 9
d	249 ± 15	15 ± 1	148 ± 9	46,9 ± 0,3	4,9 ± 0,5	464 ± 26

Tabla 2: Azúcares determinados en las muestras del *CPPARM (Comité des plantes à parfum, aromatiques et médicinales)*

Muestra	Gentianosa (mg/g muestra)	Gentiobiosa (mg/g muestra)	Sacarosa (mg/g muestra)	Glucosa (mg/g muestra)	Fructosa (mg/g muestra)	Total (mg/g muestra)
PLANT D	127 ± 1	35 ± 1	79 ± 5	67 ± 1	16,1 ± 0,5	324 ± 9
TOUFFE C	144,0 ± 0,2	41,2 ± 0,1	54 ± 3	47,8 ± 0,4	22,2 ± 0,3	309 ± 3
TOUFFE D	161 ± 4	57,4 ± 0,2	35 ± 3	66 ± 4	47 ± 2	367 ± 14
TOUFFE F	230 ± 1	46,9 ± 1,9	59,8 ± 0,8	42,1 ± 0,2	27 ± 1	407 ± 5

Tabla 3: Azúcares determinados en las muestras del *Parc Naturel Régional des Pyrénées Catalanes*

Muestra	Gentianosa (mg/g muestra)	Gentiobiosa (mg/g muestra)	Sacarosa (mg/g muestra)	Glucosa (mg/g muestra)	Fructosa (mg/g muestra)	Total (mg/g muestra)
1. Mosset Cortal Gravas Gros (F ou D)	203,9 ± 0,2	31 ± 2	89 ± 3	68 ± 2	27 ± 2	419 ± 8
2. Mosset Cortal Gravas Moyen (C ou d)	202 ± 2	32 ± 1	82 ± 4	80 ± 3	42 ± 1	437 ± 12
3. Mosset Cortal Gravas Petit (B ou c)	175 ± 8	15 ± 1	106 ± 3	57 ± 3	10 ± 0	362 ± 14
4. Porté Castell Gros (F ou D)	142 ± 7	11,6 ± 0,3	119 ± 4	34 ± 1	13,02 ± 0,03	319 ± 13
5. Porté Castell Moyen (C ou d)	163 ± 3	8,3 ± 0,1	171 ± 2	47 ± 1	4,6 ± 0,3	393 ± 6
6. Porté Castell Petit (B ou c ou b)	147,7 ± 0,0	18 ± 1	180 ± 10	60 ± 3	3,8 ± 0,2	410 ± 14

Tabla 4: Azúcares determinados en las muestras del *Centre Tecnològic Forestal de Catalunya (CTFC)*

Muestra	Gentianosa (mg/g muestra)	Gentiobiosa (mg/g muestra)	Sacarosa (mg/g muestra)	Glucosa (mg/g muestra)	Fructosa (mg/g muestra)	Total (mg/g muestra)
GER 1	113 ± 4	11 ± 1	150 ± 7	66 ± 4	22 ± 2	362 ± 17
GER 2	113 ± 2	10,5 ± 0,8	155 ± 6	49 ± 2	12,8 ± 0,4	341 ± 11
GER 3	134 ± 3	4,9 ± 0,2	203 ± 6	23 ± 2	7,3 ± 0,2	372 ± 11
SET 1	130 ± 5	6,9 ± 0,4	227 ± 2	35,1 ± 0,3	5,4 ± 0,0	404 ± 7
SET 2	149,4 ± 0,3	13,4 ± 0,0	181 ± 2	52,6 ± 0,3	10 ± 1	407 ± 3
SET 3	152 ± 5	7,6 ± 0,1	183 ± 6	46 ± 2	6 ± 1	394 ± 14
VALD 1	105 ± 2	3,4 ± 0,1	167 ± 7	46 ± 5	2,8 ± 0,2	324 ± 15
VALD 2	114 ± 2	18,2 ± 0,9	195 ± 8	66 ± 5	25 ± 1	419 ± 18
MONT 1	154 ± 6	6,3 ± 0,4	163 ± 11	26 ± 1	6 ± 0	355 ± 19
MONT 2	101 ± 8	4,4 ± 0,3	203 ± 8	45 ± 2	9 ± 1	363 ± 19
MONT 3	92,4 ± 0,1	3,5 ± 0,1	154,5 ± 1,1	48,6 ± 0,5	14,8 ± 0,2	314 ± 2

# Determinación de compuestos amargos mediante HPLC-PDA

## Tratamiento de muestra:

1. Revisión de las muestras: limpieza y codificación
2. Selección de una fracción representativa ( $\approx 5$  g) de cada muestra recibida.
3. Trituración, previa congelación con nitrógeno líquido.

## Extracción de azúcares:

1. Se pesa 0,5 gramos de cada muestra, con una precisión de 0,1 mg.
2. Se añade 4 mL de metanol 80% a la muestra pesada. Se cierra herméticamente para evitar pérdidas.
3. Se agita en el baño de ultrasonidos (a 25 °C) durante 15 minutos.
4. Se centrifuga a 2500 rpm durante 10 minutos y se recupera el sobrenadante. Se lava 2 veces con un volumen final añadido de 10 mL. Se conserva en refrigeración a 4°C hasta su determinación.
5. **Cada muestra se fue extraída y analizada por duplicado (como mínimo) en cada uno de los dos métodos.**

## Método HPLC-MS

Instrumento: Varian 500-MS IT *Mass Spectrometer*, Varian 212-LC *pump*, Varian Model 410 *autosampler*.

### **Condiciones de detección HPLC**

<i>Columna</i>	Synergi Hydro-RP (150 X4,6 mm) Phenomenex
<i>Temperatura de columna</i>	Temperatura ambiente
<i>Método de adquisición</i>	Electrospray negative ionisation
<i>Tipo de escaneado</i>	MS/MS (Standard)
<i>Volumen de inyección</i>	15 $\mu$ L
<i>Fase móvil</i>	A: H <sub>2</sub> O acidificada (0,1% ácido fórmico) B: Acetonitrilo
<i>Flujo</i>	0,6 mL/min
<i>Modo</i>	En gradiente 0-8 minutos $\rightarrow$ 95% de A, 5% de B 8-22 minutos $\rightarrow$ 10 % de A, 90% de B 22-35 minutos $\rightarrow$ 95% de A, 5% de B
<i>Temperatura nebulizador</i>	380°C
<i>Rango de m/z</i>	100-1000
<i>Gas secador</i>	Nitrogeno (35 psi)
<i>Voltaje</i>	-4000V
<i>Tiempo</i>	35 min

Este método, descrito en la bibliografía como el mejor, (Mustafa, 2015) tuvo dificultades tanto de cuantificación como de separación ya que los compuestos gentipocroside y sweroside tienen tiempos de retención muy cercanos (por una estructura similar) y presentan dificultades para

separarse. Por ello se buscó un método alternativo con detector PDA y variación de la polaridad de los disolventes (Azman, 2014).

### **Método HPLC-PDA**

Instrumento de HPLC utilizado: *Waters 2695 separations module (Meadows Instrumentation Inc., Bristol, USA)* con un detector de fotodiodo *Waters 996 (Meadows Instrumentation Inc., Bristol, USA)*.

#### **Condiciones de detección HPLC**

<i>Columna</i>	Kinetex C18 100A, (100 × 4.6 mm, Phenomenex, Torrence, CA, USA)
<i>Temperatura de columna</i>	Temperatura ambiente
<i>Volumen de inyección</i>	10 µL
<i>Fase móvil</i>	A: 0,1% ácido acético en agua ultrapura B: 0,1% ácido acético en metanol
<i>Flujo</i>	0,6 mL/min
<i>Modo</i>	En gradiente 0-10 minutos → 75% de A, 25% de B 10-28 minutos → 10% de A, 90% de B 28-30 minutos → 75% de A, 25% de B
<i>Detector</i>	Photodiode Array
<i>Longitud de onda</i>	230 nm
<i>Tiempo</i>	32 min

**Compuestos determinados:** Gentiopicroside, Ácido logánico, Sweroside, Amarogentina

Recta de calibrado: 5 puntos por duplicado, con un  $R^2 > 0,99$ . Las muestras se pincharon a dos concentraciones diferentes para determinar los compuestos y conseguir que las áreas estuvieran dentro del rango de linealidad de la recta.

Se presentan las tablas de los diferentes organismos:

Tabla 5: Compuestos amargos de las muestras del *Conservatoire botanique national des Pyrénées et de Midi-Pyrénées*

Tabla 6: Compuestos amargos de las muestras del *CPPARM (Comité des plantes à parfum, aromatiques et médicinales)*

Tabla 7: Compuestos amargos de las muestras del *Parc Naturel Régional des Pyrénées Catalanes*

Tabla 8: Compuestos amargos de las muestras del *Centre Tecnològic Forestal de Catalunya (CTFC)*

Tabla 5: Compuestos amargos de las muestras del *Conservatoire botanique national des Pyrénées et de Midi-Pyrénées*

Muestra	Gentiopicroside (mg/g muestra)			Ácido logánico (mg/g muestra)			Sweroside (mg/g muestra)			Amarogentina (mg/g muestra)		
<b>C</b>	83	±	3	4,1	±	0,1	1,06	±	0,09	0,388	±	0,004
<b>f</b>	81	±	1	6,76	±	0,02	1,37	±	0,05	0,253	±	0,007
<b>D</b>	87	±	5	10,9	±	0,8	2,8	±	0,2	0,25	±	0,01
<b>d</b>	84	±	3	5,2	±	0,2	0,907	±	0,003	0,37	±	0,01

Tabla 6: Compuestos amargos de las muestras del *CPPARM (Comité des plantes à parfum, aromatiques et médicinales)*

Muestra	Gentiopicroside (mg/g muestra)			Ácido logánico (mg/g muestra)			Sweroside (mg/g muestra)			Amarogentina (mg/g muestra)		
<b>PLANT D</b>	35	±	1	11,7	±	0,5	2,58	±	0,09	0,298	±	0,001
<b>TOUFFE C</b>	31	±	1	4,30	±	0,07	3,2	±	0,1	0,179	±	0,006
<b>TOUFFE D</b>	22,9	±	0,2	12,22	±	0,02	4,50	±	0,07	0,363	±	0,008
<b>TOUFFE F</b>	17,0	±	0,4	3,0	±	0,1	2,68	±	0,00	0,294	±	0,003



Tabla 7: Compuestos amargos de las muestras del *Parc Naturel Régional des Pyrénées Catalanes*

Muestra	Gentiopicroside (mg/g muestra)			Ácido logánico (mg/g muestra)			Sweroside (mg/g muestra)			Amarogentina (mg/g muestra)		
1. Mosset Cortal Gravas Gros (F ou D)	70	±	2	5,04	±	0,13	2,64	±	0,02	0,177	±	0,006
2. Mosset Cortal Gravas Moyen (C ou d)	63,9	±	0,4	7,6	±	0,4	1,25	±	0,05	0,161	±	0,005
3. Mosset Cortal Gravas Petit (B ou c)	92,7	±	0,3	10,4	±	0,4	1,31	±	0,08	0,507	±	0,001
4. Porté Castell Gros (F ou D)	96	±	3	4,80	±	0,08	2,1	±	0,1	0,37	±	0,02
5. Porté Castell Moyen (C ou d)	91	±	2	10,5	±	0,3	1,7	±	0,1	0,239	±	0,007
6. Porté Castell Petit (B ou c ou b)	86	±	1	11,2	±	0,1	2,73	±	0,01	0,402	±	0,008

Tabla 8: Compuestos amargos de las muestras del *Centre Tecnològic Forestal de Catalunya (CTFC)*

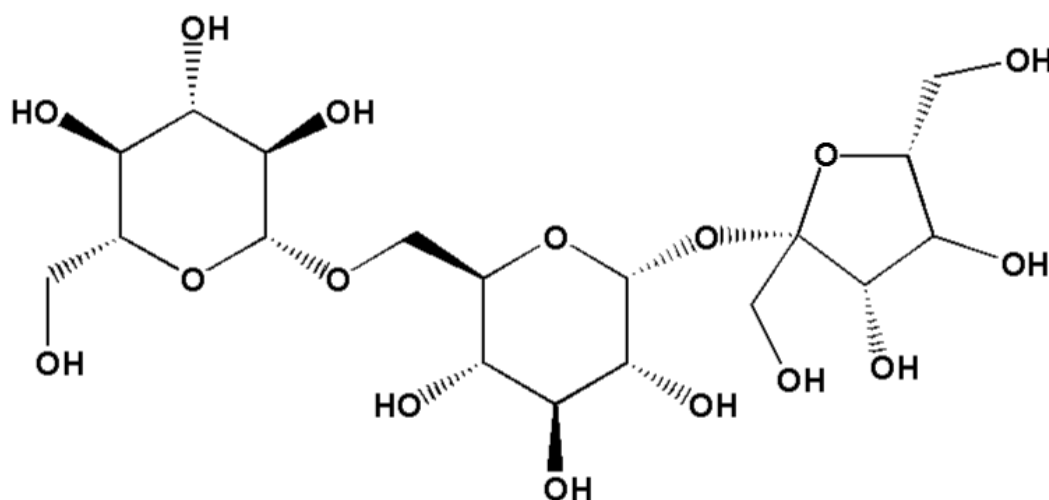
Muestra	Gentiopicroside (mg/g muestra)			Ácido logánico (mg/g muestra)			Sweroside (mg/g muestra)			Amarogentina (mg/g muestra)		
GER 1	82	±	1	9,2	±	0,1	1,83	±	0,02	0,444	±	0,005
GER 2	91,4	±	0,4	7,9	±	0,1	1,62	±	0,03	0,469	±	0,005
GER 3	69	±	2	8,2	±	0,3	1,59	±	0,03	0,32	±	0,01
SET 1	57	±	1	9,6	±	0,2	0,88	±	0,03	0,323	±	0,007
SET 2	62,8	±	0,4	12,0	±	0,1	1,23	±	0,02	0,813	±	0,009
SET 3	52	±	2	4,03	±	0,03	< 0,43	±	0,01	0,310	±	0,001
VALD 1	64,6	±	0,3	6,76	±	0,03	1,8	±	0,1	0,200	±	0,001
VALD 2	71,8	±	0,2	7,4	±	0,1	1,46	±	0,04	0,32	±	0,01
MONT 1	64,4	±	0,4	5,10	±	0,06	1,91	±	0,02	0,231	±	0,009
MONT 2	58,7	±	0,1	10,0	±	0,1	0,73	±	0,04	0,288	±	0,005
MONT 3	88	±	2	3,71	±	0,04	1,64	±	0,09	0,31	±	0,01

**Tabla 9: Información adicional °Brix (por triplicado) de cada una de las muestras de extracción de azúcares.**

Muestra	°Brix		
Mosset Cortal Gravas Gros (F ou D)	3,8	±	0,1
Mosset Cortal Gravas Moyen (C ou d)	3,8	±	0,1
Mosset Cortal Gravas Petit (B ou c)	3,5	±	0,1
Porté Castell Gros (F ou D)	3,4	±	0,0
Porté Castell Moyen (C ou d)	3,7	±	0,1
Porté Castell petit (B ou c ou b)	3,7	±	0,1
C	3,3	±	0,1
f	3,7	±	0,1
D	3,6	±	0,1
d	3,6	±	0,1
GER 1	3,4	±	0,1
GER 2	3,4	±	0,1
GER 3	3,4	±	0,1
SET 1	3,4	±	0,2
SET 2	3,2	±	0,2
SET 3	3,1	±	0,1
VALD 1	3,0	±	0,1
VALD 2	3,6	±	0,1
MONT 1	3,2	±	0,2
MONT 2	3,2	±	0,2
MONT 3	3,2	±	0,0
PLANT D	3,1	±	0,1
TOUFFE C	2,7	±	0,2
TOUFFE D	3,5	±	0,1
TOUFFE F	3,6	±	0,1

**ANEXO: Información sobre la estructura de azúcares:**

Estructura de Gentianosa: Es un trisacárido, compuesto por dos unidades de Glc y una de fructosa. La primera descomposición puede dar una Gentiobiosa (que a su vez tiene dos unidades de Glc) y una fructosa. Pequeñas variabilidades de éste (proceso propio de la planta) pueden influir significativamente en las concentraciones de Glc y Fructosa, los monómeros determinados.



<b>Glucosa</b>	<b>Glucosa</b>	<b>Fructosa</b>
<b>Gentiobiosa</b>		<b>Fructosa</b>
<b>Gentianosa</b>		

Gentiobiosa: es un disacárido compuesto por dos unidades de D-glucosa unidas a través de un enlace glicosídico  $\beta(1\rightarrow6)$ . Es un azúcar reductor.

Gentianosa: es un trisacárido compuesto por dos unidades de D-glucosa y fructosa unidas a través de un enlace glicosídico  $\beta(1\rightarrow6)$  y  $\alpha(1\rightarrow2)$ . No es un azúcar reductor.

**Bibliografía:**

Mustafa, A. M., Caprioli, G., Ricciutelli, M., Maggi, F., Marín, R., Vittori, S., & Sagratini, G. (2015). *Comparative HPLC/ESI-MS and HPLC/DAD study of different populations of cultivated, wild and commercial Gentiana lutea L.* Food chemistry, 174, 426-433.

Azman, N. A. M., Segovia, F., Martínez-Farré, X., Gil, E., & Almajano, M. P. (2014). *Screening of antioxidant activity of Gentian lutea root and its application in oil-in-water emulsions.* Antioxidants, 3(2), 455-471.