

Establecimiento de una Plataforma basada en Cromatografía de Líquidos-Espectrometría de Masas para la Determinación de Compuestos Polifenólicos en Extractos de Uva.

E. Estrada Velázquez¹, M. Garza Tapia², A. Chávez Montes¹, O. Nuñez Burcio³, N. Waksman de Torres, Noemí², y R. Castro Ríos²

1 Departamento de Química, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León. **2** Departamento de Química Analítica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León. **3** Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Barcelona. rocio.castrors@uanl.edu.mx

RESUMEN:

El empleo de productos vegetales como fuente de compuestos bioactivos presenta algunos inconvenientes que pueden poner en riesgo la salud del consumidor. La información respaldada científicamente sobre su actividad biológica es escasa y es difícil asegurar la identidad de las plantas y detectar adulteraciones. La principal limitante en el control es la falta de métodos analíticos adecuados. Este trabajo presenta el desarrollo de una plataforma analítica basada en LC-MS para determinar compuestos polifenólicos en extractos de cáscara y semillas de uva. Se estudiaron extractos acuosos de semilla y cáscara de uva. Se optimizaron la separación cromatográfica y la detección, evaluando métodos de análisis dirigido y no dirigido, combinando el barrido completo, con la fragmentación utilizando análisis dependiente e independiente de datos. Para la identificación de los compuestos, los datos se analizaron con ayuda de una base de datos de espectros de masas y datos de la literatura. El uso de análisis dependiente de datos con y sin energía escalonada produce cromatogramas y espectros similares; ya que el uso de energía escalonada puede abarcar distintas energías de fragmentación fue el modo de trabajo seleccionado. Los compuestos identificados coinciden con los reportados por otros autores para el mismo tipo de muestras.

Palabras clave: polifenoles, cromatografía de líquidos-espectrometría de masas, extractos de uvas.

ABSTRACT:

The use of plant-derived products as source of bioactive compounds has some drawbacks that may endanger consumer's health. Scientific evidence on plant's biological activity is scarce and there are difficulties for identification and detection of adulterants. Since the lack of adequate analytical methods is one of the main problems for product control, the objective of this work is to present the development of an analytical platform based on LC-MS to determine polyphenolic compounds in aqueous extracts from grape skin and seeds. Chromatographic separation and detection were optimized, with target and non-target analysis combining the use of full scan and fragmentation with data dependent and independent analysis. Identification of extract components was carried out using a lab-made mass spectra database and literature data. Data dependent analysis with and without stepped-energy produced similar chromatograms and spectra, but as stepped-energy experiments include several fragmentation energies, it was the selected working mode. The compounds found in the analyzed extract coincide with those reported by other authors for the same type of samples

Keywords: polyphenols, liquid chromatography-mass spectrometry couplings, grape extract.

INTRODUCCIÓN

Desde la antigüedad, el hombre ha empleado las plantas no solo como alimento sino también para tratar diversos padecimientos. México posee una gran diversidad en recursos vegetales y cuenta con una amplia tradición en el uso de la medicina herbolaria. Este legado de las culturas prehispánicas fue registrado en documentos como el Códice Badiano y transmitido oralmente de generación en generación.

Aunque la medicina tradicional fue desplazada por la llamada “medicina alopática”, en México una proporción importante de la población depende todavía de la medicina tradicional a base de plantas. Además, el alto costo de los medicamentos y la preocupación sobre los efectos secundarios que estos pueden generar, han contribuido al resurgimiento en los últimos años del interés general en la herbolaria. Aunado a esto, recientemente ha tomado fuerza una corriente que impulsa el uso de productos vegetales como suplementos alimenticios (o nutraceuticos) con fines preventivos.

Sin embargo, en nuestro país el uso de productos vegetales presenta algunos inconvenientes que pueden poner en riesgo la salud de quien los consume. Por un lado, la información respaldada científicamente sobre su actividad biológica es escasa y en ocasiones, algunas plantas se presentan como una panacea capaz de eliminar cualquier padecimiento. Por otra parte, es difícil asegurar la identidad de las plantas empleadas y detectar adulteraciones. Así mismo, no existe control de la calidad de los productos, no se conoce la concentración de los componentes activos ni si están presentes contaminantes como metales pesados o plaguicidas, entre otros. Por ello, organismos como la Organización Mundial de la Salud o la Secretaría de Salud, así como diversos grupos de investigación, realizan esfuerzos para generar información que permita garantizar la seguridad en el uso de estos productos.

Considerando que una de las grandes limitantes en el estudio y control de los productos naturales es la falta de herramientas analíticas adecuadas, el presente proyecto pretende establecer una plataforma analítica basada en el uso de la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas que permita obtener el máximo de información sobre los componentes en matrices derivadas las plantas.

Durante muchos años, el enfoque en el análisis de productos naturales se basó en la búsqueda de uno o unos pocos componentes, sin embargo los avances tecnológicos en la instrumentación analítica han llevado al desarrollo de la metabolómica, un conjunto de estrategias holísticas que buscan conocer todos los compuestos presentes en una matriz. Ya que la presencia o ausencia de metabolitos así como los cambios en sus niveles son un reflejo del estado funcional de un sistema biológico, la visión global proporcionada por los estudios metabolómicos es de gran utilidad cuando se aplica a las plantas. Aunque el análisis metabolómico normalmente involucra técnicas como la resonancia magnética nuclear, la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas es la técnica de primera elección por su sensibilidad y selectividad. Debido a la complejidad del análisis, es necesario establecer una plataforma analítica, es decir, un conjunto de metodologías analíticas y de procesos integrados para la generación e interpretación datos que permitan obtener la información metabolómica del sistema biológico en estudio. La plataforma analítica empleada para un análisis metabolómico debe ser capaz de determinar un gran número de analitos, generar señales proporcionales a la concentración de los compuestos y ser precisa y robusta. El objetivo de este trabajo fue establecer una plataforma analítica basada en el uso de la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas (LC-MS) con analizador másico de trampa de iones, que por sus características pueden generar suficiente información con la sensibilidad adecuada que permita determinar los compuestos polifenólicos presentes en extractos de cáscara y semilla de uva. Se optimizaron la separación cromatográfica y la detección, evaluando métodos de análisis dirigido y no dirigido, combinando el barrido completo, con la fragmentación utilizando análisis dependiente e independiente de datos. Para la identificación de los compuestos, los datos se analizaron con ayuda de una base de datos de espectros de masas y datos de la literatura. El uso de análisis dependiente de datos con y sin energía escalonada produce cromatogramas y espectros similares; ya que el uso de energía escalonada puede abarcar distintas energías de fragmentación fue el modo de trabajo seleccionado. Los compuestos identificados coinciden con los reportados por otros autores para el mismo tipo de muestras.

Materiales y métodos. En este estudio se incluyeron extractos acuosos de semilla y cáscara de uva, obtenidos por agitación, y que fueron proporcionados por la empresa vitivinícola La Bordalesa, ubicada en Aguascalientes, México.

Para el análisis se empleó un cromatógrafo de líquidos de ultra-alta resolución Ultimate 3000 (Dionex) equipado con desgasificador en línea, bomba cuaternaria, automuestreador, horno de columna y detector UV-Vis acoplado a un Espectrómetro de Masas LCQ Fleet (Thermo) equipado con analizador de trampa de iones y fuente de electrospray y ionización química a presión atmosférica (APCI). El agua, metanol y acetonitrilo utilizados fueron grado HPLC-MS (JT Baker). El ácido acético (> 99.9 %), el ácido fórmico (> 98 %) y el hidróxido de amonio (30-32 %) fueron comprados en Sigma Aldrich México.

La estrategia para el establecimiento de la plataforma analítica incluyó como primera etapa el desarrollo de un método por LC-MS. Posteriormente, se seleccionó el modo de adquisición de datos en espectrometría de masas y finalmente se estableció un protocolo para la identificación de los compuestos.

Para establecer las condiciones de separación, se evaluó el desempeño de columnas cromatográficas con fases estacionarias de distinta naturaleza: Atlantis dC18 (2,1 x 150 mm, 3 μ m; Waters), Atlantis HILIC Silica (2,1 x 150 mm, 5 μ m; Waters), Kromasil C8, (2,1 x 150 mm, 5 μ m; Phenomex), Columna Luna Ciano (2,0 x 150 mm, 3 μ m; Phenomenex), Kinetexpentafluorofenilo (50 x 2.1 mm, 3.5 μ m; Phenomenex). Las fases móviles estuvieron constituidas por mezclas de metanol o acetonitrilo con soluciones acuosas de amortiguadoras a distintos valores de pH. Las condiciones para la detección se establecieron utilizando una solución estándar de quercetina utilizando la fuente de ionización de electrospray, en polaridades negativa y positiva, realizando la adquisición en modo de barrido completo.

Se establecieron métodos de análisis dirigido y no dirigido. Para el dirigido se combinaron el barrido completo, con la fragmentación (MS/MS) utilizando las funciones de análisis dependiente de datos y análisis independiente de datos en diferentes modalidades. Para la identificación de los compuestos se construyó una biblioteca con datos espectrales utilizando datos reportados en la literatura y generados experimentalmente a partir del análisis de estándares de compuestos polifenólicos con el método establecido y se utilizaron además de otras bibliotecas de espectros (m/zCloud, Mass Bank, NIST Data Gateway, etc.) así como el análisis de las fragmentaciones.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El desempeño en la separación de los compuestos fue evaluado para distintas columnas cromatográficas. El criterio de selección fue el número de picos obtenidos, la resolución y la forma de los mismos. Los mejores resultados se obtuvieron usando la columna Kinetexpentafluorofenilo y como fase móvil se utilizó una mezcla de metanol y una solución acuosa de ácido acético (2 % v/v) a un flujo de 0.5 mL/min. La separación se desarrolló en modo gradiente empezando con 0 % de metanol y subiendo a 32 % en 12.5 min, esta proporción se mantuvo por 9 min más, regresando a las condiciones iniciales en 2 min. La temperatura de la columna se fijó a 50 °C y el volumen de inyección fue de 1 μ L. El empleo de la fuente de electrospray en polaridad negativa dio mejores respuestas y las condiciones seleccionadas fueron: temperatura del capilar de transferencia de 320 °C, voltaje de la fuente de -2.5 kV, flujo de gas de nebulización (sheath gas) y auxiliar de 60 unidades.

Como se mencionó anteriormente, se evaluó el uso de métodos de adquisición con análisis dirigido y no dirigido; este paso resulta de suma importancia debido a que determina la calidad y cantidad de información generada así como la dificultad para el posterior procesamiento. En el análisis dirigido se determinan compuestos conocidos de antemano y perfectamente caracterizados, este tipo de experimentos tiene muy alta sensibilidad pero los resultados se limitan a los compuestos previamente definidos y no se obtienen información de compuestos nuevos. En los estudios no dirigidos, el objetivo es determinar todos los compuestos presentes para obtener una visión global del problema de interés. En este caso no se parte de ninguna información previa sobre qué compuestos pueden estar presentes, y esto cual implica que para obtener la información necesaria se debe proceder de manera completamente diferente a los estudios dirigidos. Al realizar la determinación de un gran número de compuestos, este tipo de experimentos resultan menos sensibles que los dirigidos pero ya que colectan toda la información, permiten hacer análisis retrospectivos. El volumen de información generada en este tipo de estudios requiere de la ayuda de herramientas informáticas para el análisis es decir, métodos que registren solo para compuestos previamente definidos o registrando la información de todos los iones generados. Los modos de adquisición incluidos en este trabajo fueron no dirigidos: fragmentación de todos los iones (*all ion fragmentation*, AIF), análisis dependiente de datos (*data dependent analysis*, DDA) y análisis dependiente de datos con energía de colisión escalonada (*data dependent analysis-stepped collision energy*, DDA-S) adquiriendo de barridos completos de iones. Se analizaron estándares individuales de compuestos polifenólicos y mezclas de ellos y se comparó la

Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos

facilidad para la identificación en cada modo de trabajo. La tabla I presenta un comparativo de la certeza en la identificación con cada uno de los modos de trabajo. Como puede verse, aunque el análisis utilizando la fragmentación de todos los iones producidos tiene la ventaja de generar una gran cantidad de información, se encontraron dificultades para obtener espectros de MS/MS limpios, la velocidad de barrido fue baja, la respuesta observada fue más baja, lo que en conjunto hizo que el procesamiento de los datos fuera muy lento. Por su parte, los experimentos con análisis dependiente de datos con energía de colisión escalonada y no escalonada produjeron espectros y cromatogramas similares, con respuesta de los analitos en el mismo orden de magnitud aunque debido a que los experimentos con energía de fragmentación escalonada permitieron abarcar distintas energías de fragmentación y por lo tanto obtener mayor información para los compuestos. En la Figura 1 se muestran como ejemplo los espectros de masas obtenidos para un estándar de arbutina en los tres modos de trabajo mencionados.

Tabla I. Facilidad de identificación de compuestos en soluciones de estándares individuales utilizando distintos modos de adquisición de datos: fragmentación de todos los iones (AIF), análisis dependiente de datos (DDA) y análisis dependiente de datos con energía de colisión escalonada (DDA-S).			
	DDA	DDA-S	AIF
Arbutina	++++	+++++	++++
Ac. Caféico	++++	++++	+++
(+)-catequina	++++	++++	-
Ac. Clorogénico	++++	++++	+++
Ac. Cinámico	-	-	-
Ac. Cryptoclorogénico	++++	++++	+
Ac- p-Cumárico	++++	++++	+++
Ac. Ferúlico	++	++	+
Fisetina	+++	+++	++
Galato de Etilo	+++++	++++	+++
Ac. Gálico	+++++	+++++	++++
3,4-dihidroxibenzaldehído	+++	++	-
Ac. 4-dihidroxibenzoico	+++++	++++	++
Ac. 2,5-dihidroxibenzoico	++++	++++	+++
Vanillina	+	+++	-

Estas observaciones se confirmaron cuando se realizó el análisis de de mezclas de estándares de los compuestos polifenólicos. Considerando estos resultados, la plataforma analítica utilizada para las muestras de cáscara y semilla de uva incluyó el método por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas utilizando análisis dependiente de datos con energía de fragmentación escalonada. El procesamiento de datos se realizó con ayuda del software ExactFinder v2.0 (Thermo), usando tanto la relación masa/carga como el patrón isotópico y considerando, el área y la forma del pico así como la fragmentación obtenida por experimentos de MS/MS. La identificación de compuestos conocidos se realizó por comparación con base de datos y la de desconocidos con el listado de iones.

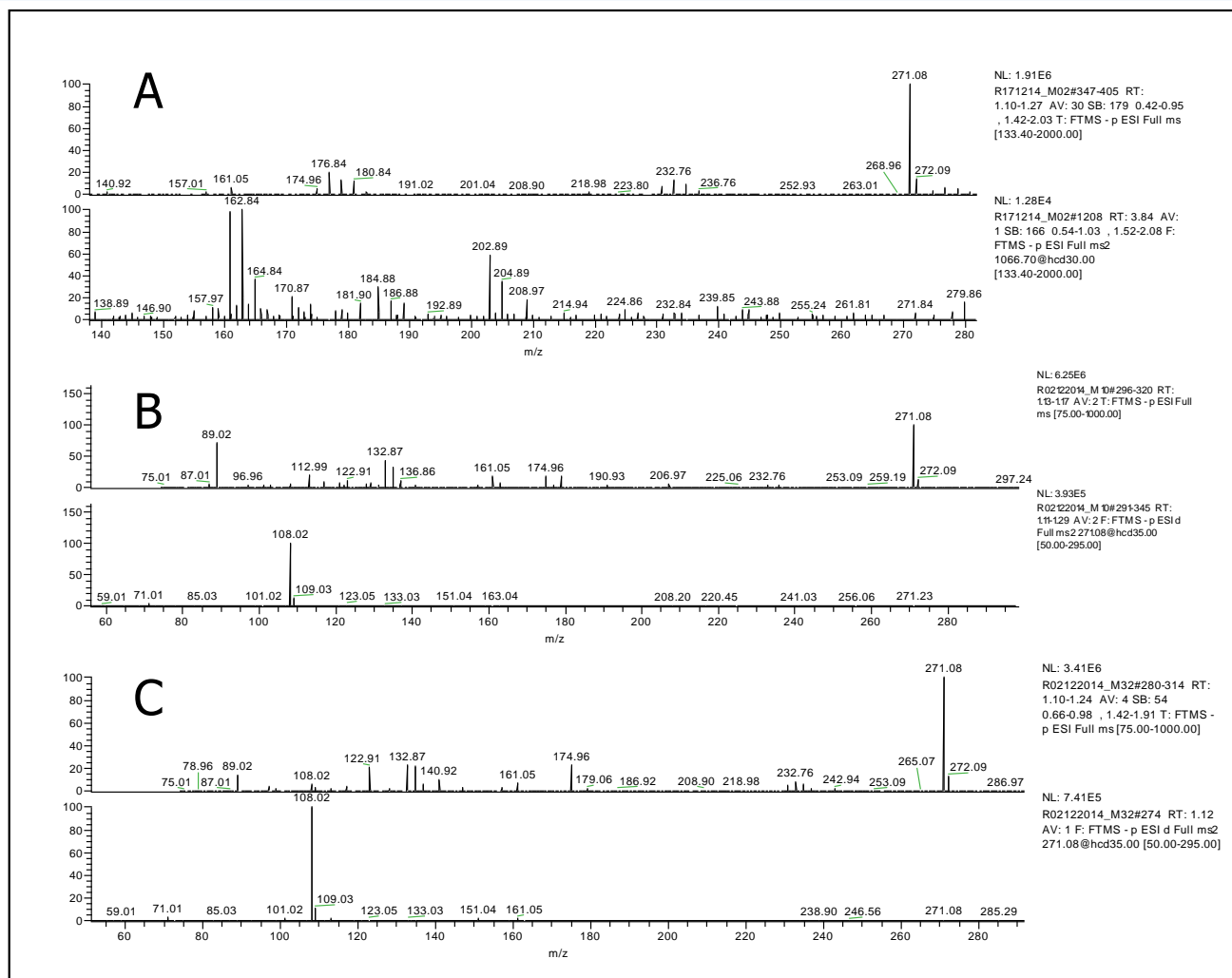


Figura 1. Espectros de masas obtenidos con el método propuesto para una solución estándar de arbutina (750 µg L⁻¹; metanol-agua 50:50).

Para demostrar la aplicabilidad de la plataforma desarrollada, extractos acuosos de cáscara y semilla de uva fueron analizados. La Figura 2 muestra como ejemplo el cromatograma obtenido para una muestra de cáscara de semilla. Entre los compuestos polifenólicos identificados se encuentran el 3,4-dihidroxibenzaldehído, el ácido 4-hidroxibenzoico, ácido siríngico, ácido 2,5-dihidroxibenzoico, ácido cumárico, ácido gálico, ácido homogénitísico, ácido homovainillínico, ácido sináptico, ácido succínico, catequina, ácido clorogénico, ácido criptoclorogénico, cianidina, epicatequina, etil galato, fisetina, hidroxitirosol, kaempferol, luteolina, ácido protocatecuico, quercetina-3-B-glucosido, quercitrina, resveratrol, siringaldehído, taxifolina y umbeliferona,

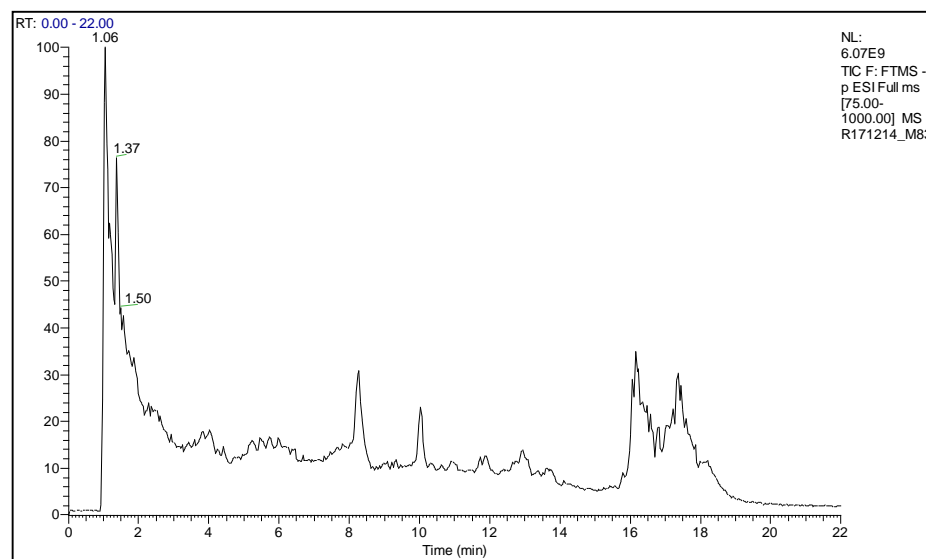


Figura 2. Cromatograma obtenido para un extracto de semilla de uva aplicando la plataforma analítica propuesta.

BIBLIOGRAFÍA

- Allwood, J. W.; Goodacre, R., An Introduction to Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Instrumentation Applied in Plant Metabolomic Analyses. *Phytochemical Analysis* 2010, 21 (1), 33-47.
- Ernst, M.; Silva, D. B.; Silva, R. R.; Vencio, R. Z. N.; Lopes, N. P., Mass spectrometry in plant metabolomics strategies: from analytical platforms to data acquisition and processing. *Natural Product Reports* 2014, 31 (6), 784-806.
- Kalim, S.; Clish, C. B.; Deferio, J. J.; Ortiz, G.; Moffet, A. S.; Gerszten, R. E.; Thadhani, R.; Rhee, E. P., Cross-sectional examination of metabolites and metabolic phenotypes in uremia. *BmcNephrology* 2015, 16.
- Monagas M; Gómez-Cordovés C; Bartolomé B; Laureano O; Ricardo da Silva JM., Monomeric, oligomeric, and polymeric flavan-3-ol composition of wines and grapes from *Vitis vinifera* L. Cv. Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon. *J Agric Food Chem.* 2003 51(22):6475-6481
- Patti, G. J.; Yanes, O.; Siuzdak, G., Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2012, 13 (4), 263-269.
- Rochfort, S., Metabolomics reviewed: a new "omics" platform technology for systems biology and implications for natural products research. *J NatProd* 2005, 68 (12), 1813-20.
- Seger, C.; Sturm, S.; Stuppner, H., Mass spectrometry and NMR spectroscopy: modern high-end detectors for high resolution separation techniques - state of the art in natural product HPLC-MS, HPLC-NMR, and CE-MS hyphenations. *Natural Product Reports* 2013, 30 (7), 970-987.
- Steinmann, D.; Ganzera, M., Recent advances on HPLC/MS in medicinal plant analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2011, 55 (4), 744-757.
- Sumner, L. W., Current Status and Forward Looking Thoughts on LC/MS Metabolomics. In *Plant Metabolomics*, Saito, K.; Dixon, R.; Willmitzer, L., Eds. Springer Berlin Heidelberg: 2006; Vol. 57, pp 21-32.
- Sumner, L. W.; Lei, Z.; Nikolau, B. J.; Saito, K., Modern plant metabolomics: advanced natural product gene discoveries, improved technologies, and future prospects. *Natural Product Reports* 2015, 32 (2), 212-229.
- Urban, J.; Vanek, J.; Stys, D., Current State of HPLC-MS Data Processing and Analysis in Proteomics and Metabolomics. *Current Proteomics* 2012, 9 (2), 80-93.
- Yilmaz Y; Toledo RT., Major flavonoids in grape seeds and skins: antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid. *J Agric Food Chem.* 2004 52(2), 255-260.