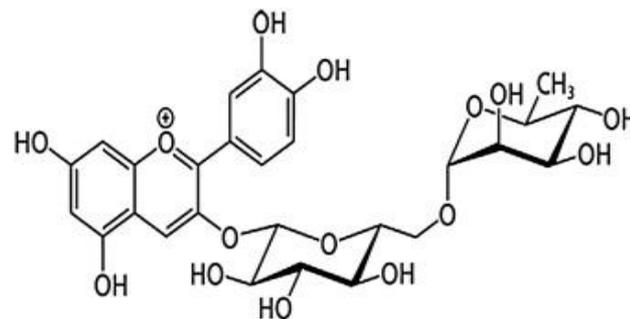




LXIX Convención anual de la AsoVAC

Estudio del perfil de antocianinas en frambuesa negra (*Rubus niveus*) utilizando la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Definición (HPLC) y Espectrofotometría UV-VIS (pH diferencial).

[Study of the profile of anthocyanins in black raspberry (*Rubus niveus*) using the technique of High Definition Liquid Chromatography (HPLC) and UV-VIS Spectrophotometry (pH Differential)]

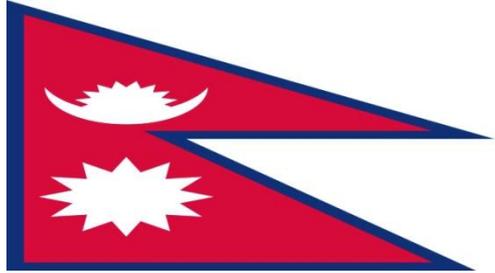


Miguel León¹, Beatriz Soledad²

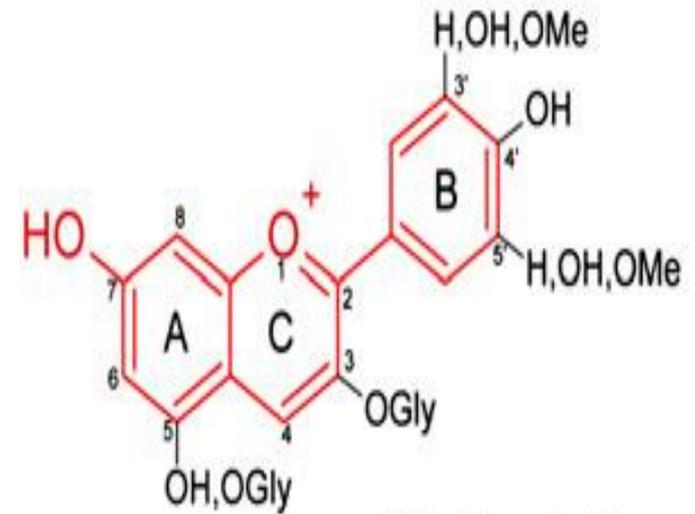
¹Universidad Católica Andrés Bello, Departamento de Biología y Química.

²Universidad Católica Andrés Bello, Centro de Investigación y Desarrollo de Ingeniería.

Rubus niveus



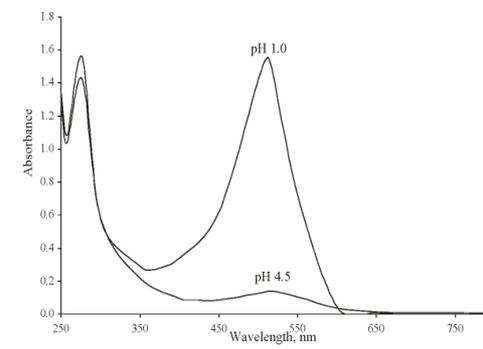
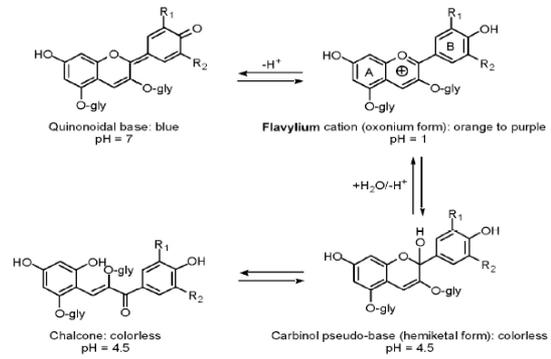
Antocianinas



Gly = Glycosyl residues

1. Pigmentos naturales presentes en los vegetales que poseen diversas funciones y beneficios en plantas y animales.

2. Estructuras químicas mixtas y glicosidadas pertenecientes al grupo de los flavonoides.



$$\Delta ABS = (ABS_{\lambda_{\max}=508nm} - ABS_{700nm})_{pH1.0} - (ABS_{\lambda_{\max}=508nm} - ABS_{700nm})_{pH4.5}$$

(2) Antocianinas totales (mg/Lt) = $\Delta ABS \times PM \times FD \times 1000 / \epsilon \times l$

(3) Antocianinas totales (mg/100 gr) = $\Delta ABS \times PM \times Ve \times FD \times 1000 / \epsilon \times l \times Pm$



Metodología

1. Recolección, traslado y refrigeración de la muestra.

Extraer las antocianinas del fruto de la especie *Rubus niveus* Thunb con metanol al 95% acidificado a pH 3.0 con ácido cítrico 1 M.

Tomar 3-4 gramos de muestra se sumergen en 9-12 ml de metanol acidificado y triturar con un mortero.

Dejar reposar el macerado en el refrigerador por 48 horas.

Filtrar el metanol al vacío a través de un papel de filtro, embudo Buchner, un Kitasato y una bomba de vacío.

Obtener el extracto puro de antocianinas, reajustar el pH y diluir con agua destilada para medir la $\lambda_{\text{máx}}$ del extracto.

2. Cuantificación de antocianinas totales mediante la técnica espectrofotométrica del pH diferencial.

Determinar el factor de dilución de la muestra.

Preparar un tampón de KCl ajustado a pH 1.0 con HCl y un tampón de CH_3COONa ajustado pH 4.5 con CH_3COOH .

Calcular la absorbancia diferencial entre ambas soluciones tamponadas.

3. Identificación de antocianinas mediante Cromatografía Líquida de Alta Definición (HPLC)

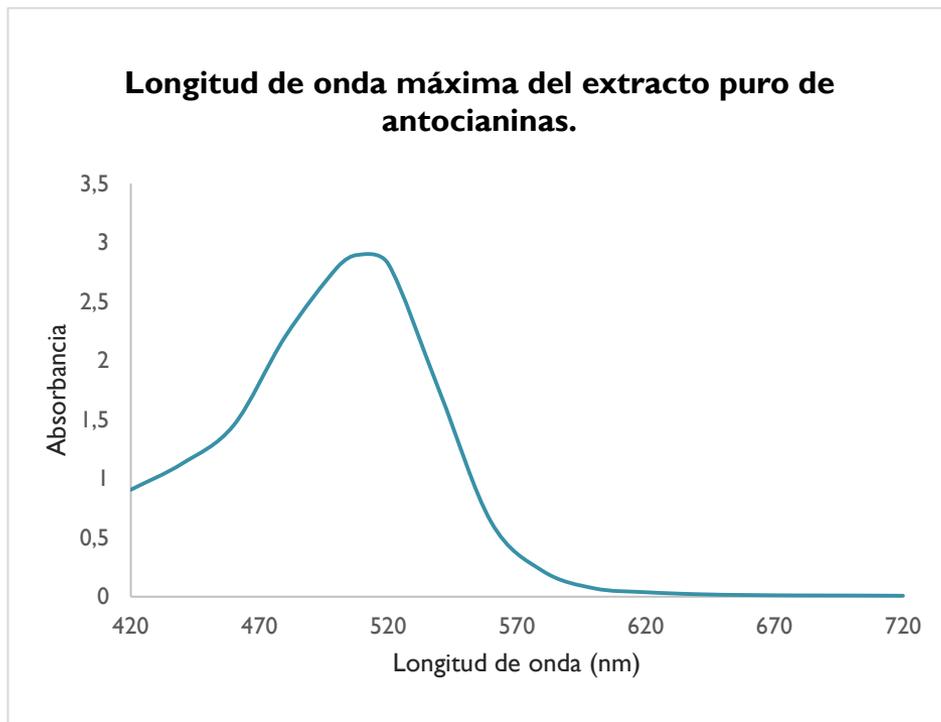
Definir el sistema de solventes a utilizar mediante Cromatografía en Capa Fina (CCF).

Eluir la muestra a través de un Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución a 520 nm.

Registrar los cromatogramas y compararlos con otros que se hayan obtenido en condiciones similares.

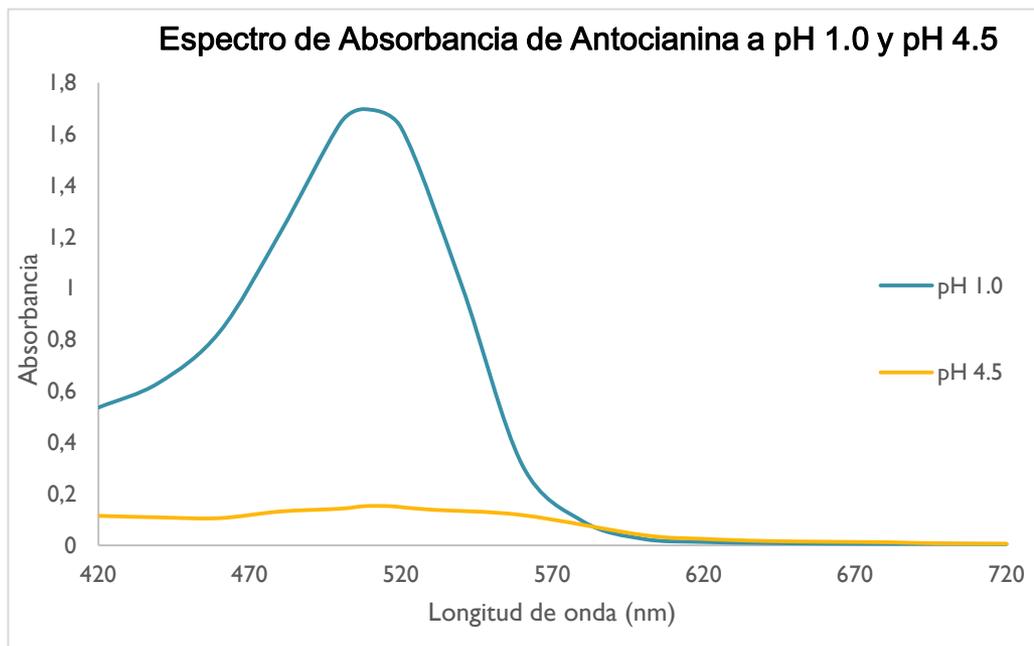
Resultados pH diferencial

Para identificar el espectro característico de las antocianinas ($\lambda_{\text{máx}}$ de 500-550nm), se realizó un espectro de absorbancia máxima para determina la longitud de onda del extracto puro.



La $\lambda_{\text{máx}}$ determinada en el espectro de absorción máxima fue de 508 nm. El valor de la absorbancia en esta longitud de onda se utilizó posteriormente para el método del pH diferencial.

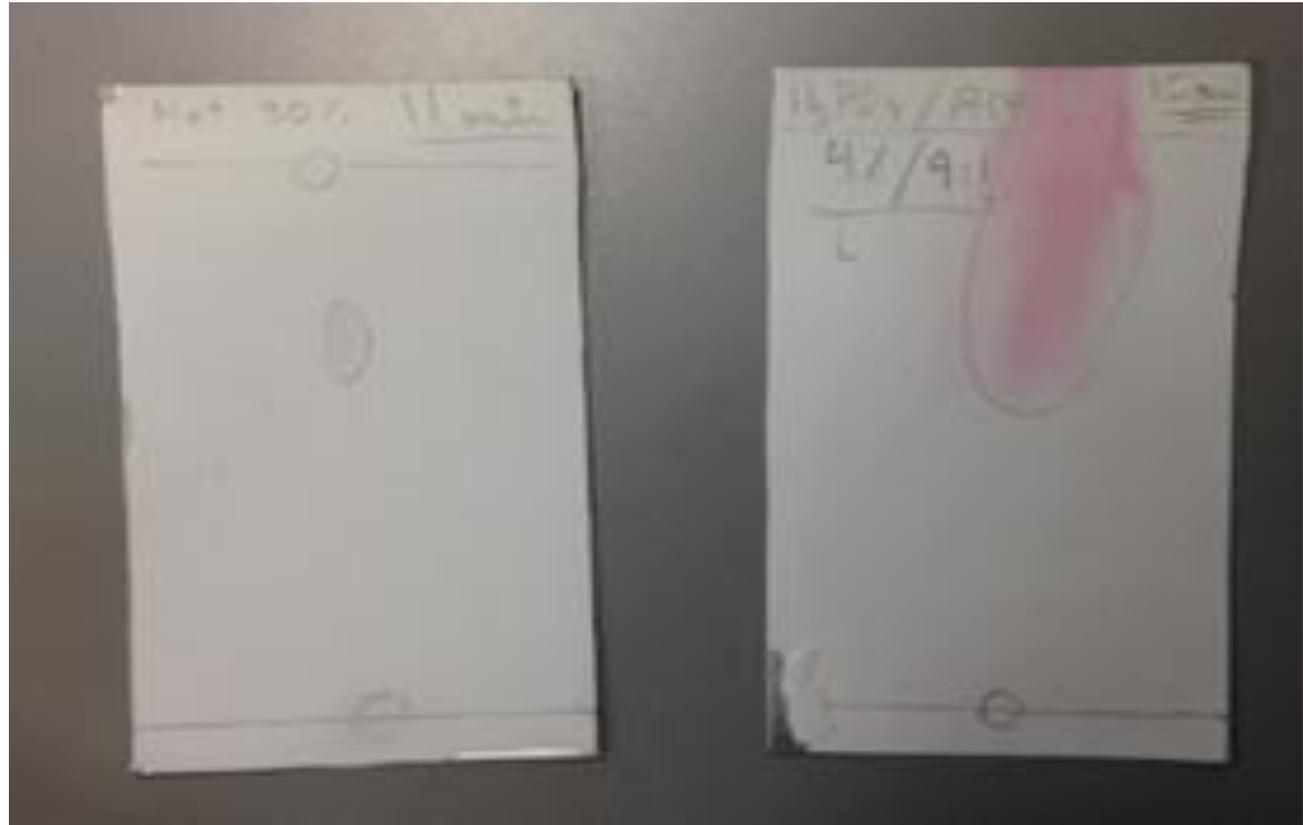
Resultados pH diferencial



ABS _{508nm} ; pH1.0	ABS _{700nm} ; pH1.0	ABS _{pH1.0}	ABS _{508nm} ; Ph4.5	ABS _{700nm} ; Ph4.5	ABS _{pH4.5}	ΔABS	Antocianinas Totales(mg/l)	Antocianinas Totales (mg/100 gr)
1,688	0,004	1,684	0,156	0,008	0,148	1,536	769,48	17,04
1,703	0,007	1,696	0,157	0,006	0,151	1,545	773,99	17,15
1,697	0,006	1,691	0,160	0,007	0,153	1,538	770,48	17,07
Promedio							771,32	17,09

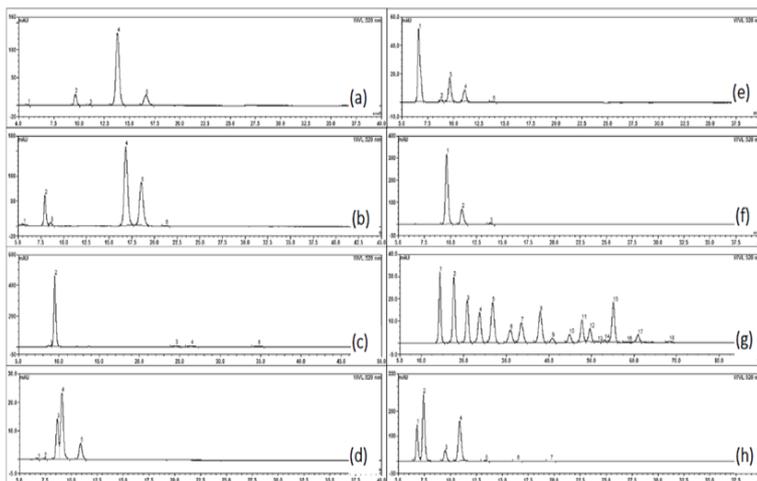
Resultados HPLC

En primer lugar, se llevó a cabo una cromatografía en capa fina (CCF) con dos solventes (eluyentes) disponibles: metanol al 30% (MeOH 30%) y 4% ácido fosfórico/acetonitrilo (9:1 v/v) [4% H_3PO_4 /CH₃CN (9:1 v/v)].



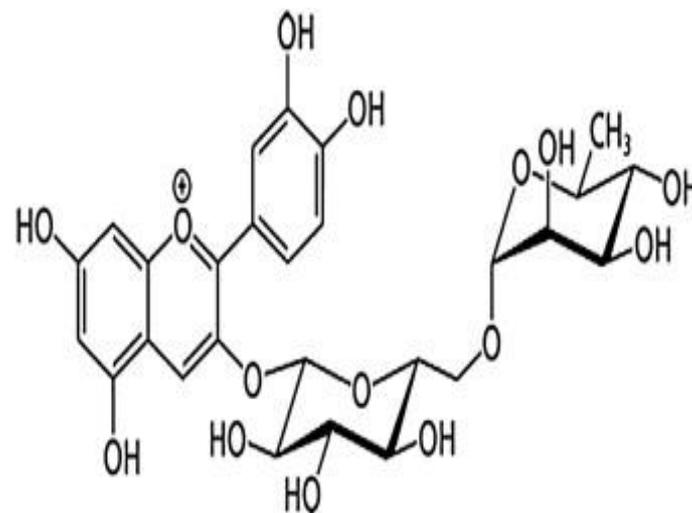
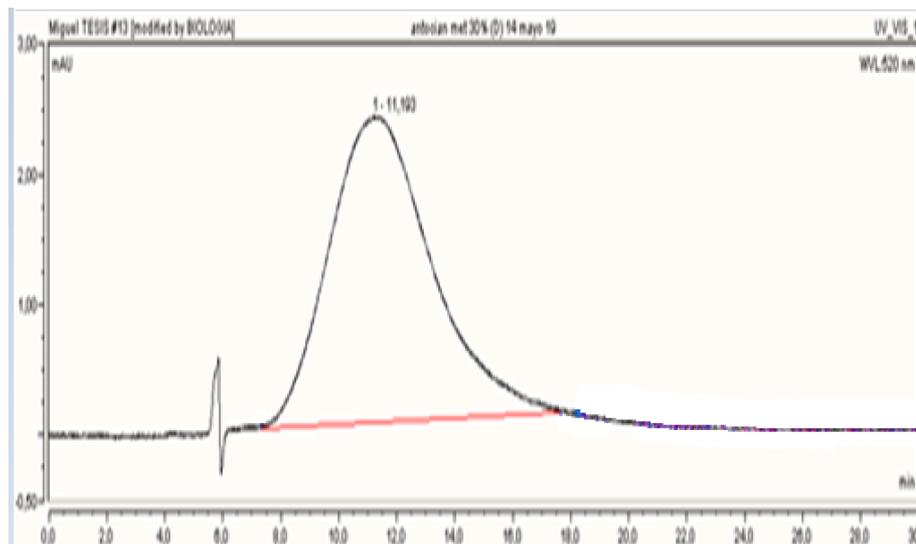
Se escogió el metanol al 30% como solvente (eluyente) para el HPLC, debido a que la separación en CCF se observó con mayor claridad.

Resultados HPLC



Peak no.	Retention time / min	Tentative peak assignment	Total anthocyanins ^(h) / %	Molecular ion [M] ⁺ (m/z)	Fragment ion (m/z)
Strawberry					
1	4.9	Not identified	0.4	-	-
2	9.6	Cyanidin-3-glucoside	8.7	449	287
3	11.1	Cyanidin-3-rutinoside	0.4	595	449, 287
4	13.8	Pelargonidin-3-glucoside	77.1	433	271
5	16.6	Pelargonidin-3-rutinoside	13.4	579	433, 271

Perfiles cromatográficos y sus tiempos de retención (reportados por Căta y otros, 2016).
Link: <https://hrcak.srce.hr/file/229706>



Perfil cromatográfico de la antocianina identificada en *Rubus niveus* (Tr: 11,1 minutos) que corresponde a **Cianidina-3-rutinósido**.

Gracias

