

# DETERMINACIÓ DE POLIFENOLS PER CROMATOGRÀFIA DE LÍQUIDS D'ULTRA ELEVADA EFICÀCIA ACOBLADA A L'ESPECTROMETRIA DE MASSES EN TÀNDEM (UHPLC-ESI-MS/MS) PER A LA CLASSIFICACIÓ DE PEBRES VERMELLS



UNIVERSITAT DE BARCELONA

G. Campmajó<sup>(1)</sup>, S. Barbosa<sup>(1)</sup>, O. Núñez<sup>(1,2,3)</sup>, J. Saurina<sup>(1,2)</sup>

(1) Departament d'Enginyeria Química i Química Analítica, Universitat de Barcelona, Barcelona, Espanya

(2) Institut de Recerca en Nutrició i Seguretat Alimentària, Universitat de Barcelona, Santa Coloma de Gramanet, Espanya

(3) Professor Serra Hunter, Generalitat de Catalunya, Barcelona, Espanya

Correu electrònic: gcampmga8@alumnes.ub.edu



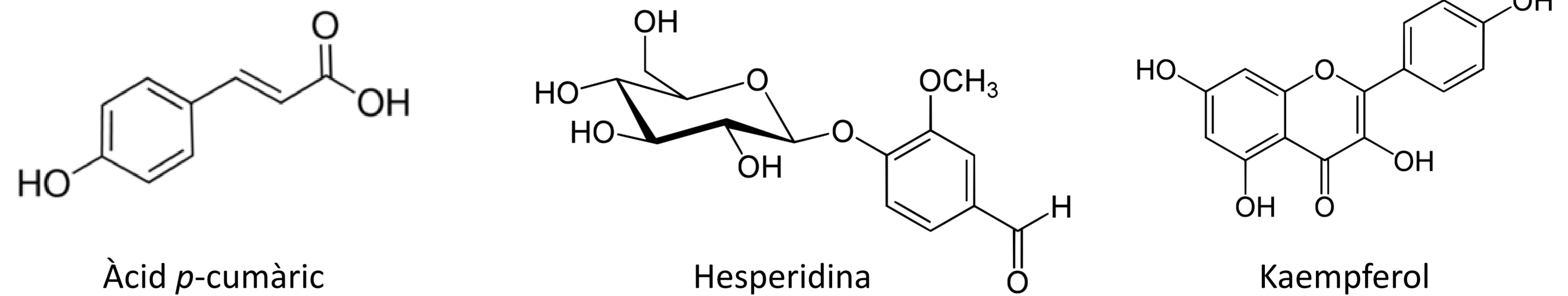
## 1. INTRODUCCIÓ

En els darrers anys, ha augmentat l'interès per productes alimentaris que contenen compostos bioactius. Els polifenols són metabòlits aromàtics secundaris que comprenen un elevat nombre de substàncies amb una àmplia diversitat estructural [1]. Aquests compostos es troben majoritàriament en aliments d'origen vegetal com el pebre vermell, que és una espècie seca i molta obtinguda del pebrot vermell. Les seves propietats organolèptiques varien en funció del tipus de pebre vermell i de certes condicions externes (clima, tècnica de cultiu, mètode d'obtenció, etc). Així, pot ser dolç, agredolç o picant. A Espanya, només les varietats de La Vera (Extremadura) i Múrcia estan distingides amb denominació d'origen protegida (DOP).

L'objectiu d'aquest treball és el desenvolupament d'un mètode UHPLC-ESI-MS/MS per a la determinació de 37 polifenols en mostres de pebre vermell i l'estudi del contingut polifenòlic com a font de potencials descriptors químics per aconseguir la seva caracterització i classificació mitjançant mètodes quimiomètrics.

## 2. POLIFENOLS

Àcid asiàtic, àcid betulínic, àcid cafeic, àcid clorogènic, àcid ferúlic, àcid gàl·lic, àcid homogentísic, àcid homovanil·lic, àcid *p*-cumàric, àcid quínic, àcid rosmarínic, àcid sinàpic, àcid siríngic, àcid veràtric, àcid 2,5-dihidroxibenzoic, àcid 4-hidroxibenzoic, arbutina, (+)-catequina, (-)-epicatequina, fisetina, gal·lat de (-)-epigal·locatequina, gal·lat d'etil, hesperidina, homoplantaginina, kaempferol, polidatina, glucòsid 7-nepetí, morí, procianidina A2, procianidina C1, quercetina, resveratrol, rutina, siringaldehid, umbel·liferona, vanil·lina, 3,4-dihidroxibenzaldehid.



## 3. INSTRUMENTACIÓ

### CROMATOGRÀFIA DE LÍQUIDS

- **Equip:** Accela AS (Thermo Fisher Scientific)
- **Columna:** Ascentis Express C18 (10 cm x 2,1 mm, 2,7 µm)
- **Dissolvent A:** Aigua amb 0,1% d'àcid fòrmic
- **Dissolvent B:** Acetonitril

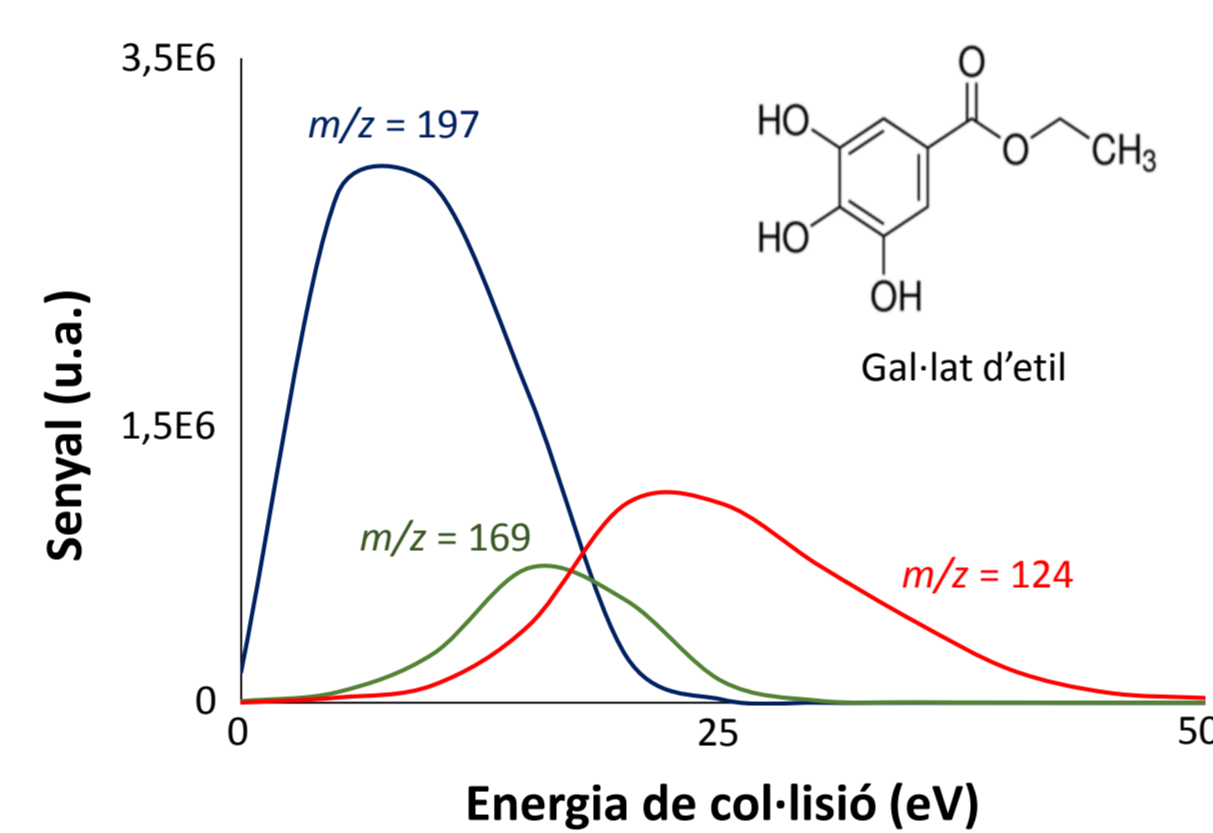
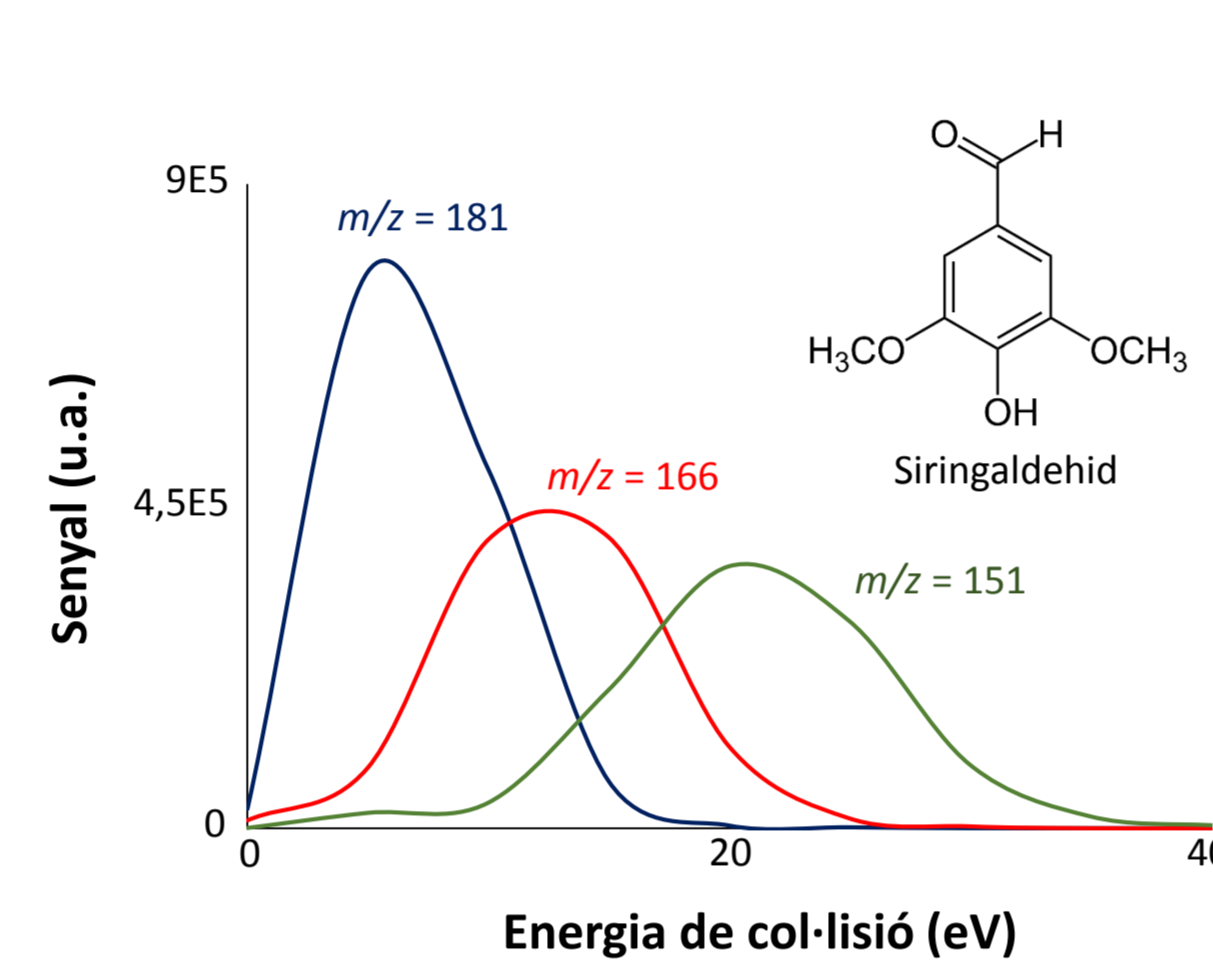
### ESPECTROMETRIA DE MASSES

- **Equip:** TSQ Quantum Ultra AM (Thermo Fisher Scientific)
- **Analitzador:** Triple quadrupol (QqQ)
- **Font de ionització:** Electrospai (ESI) en mode negatiu
- **Mode d'adquisició:** Monitorització de Reaccions Múltiples (MRM)

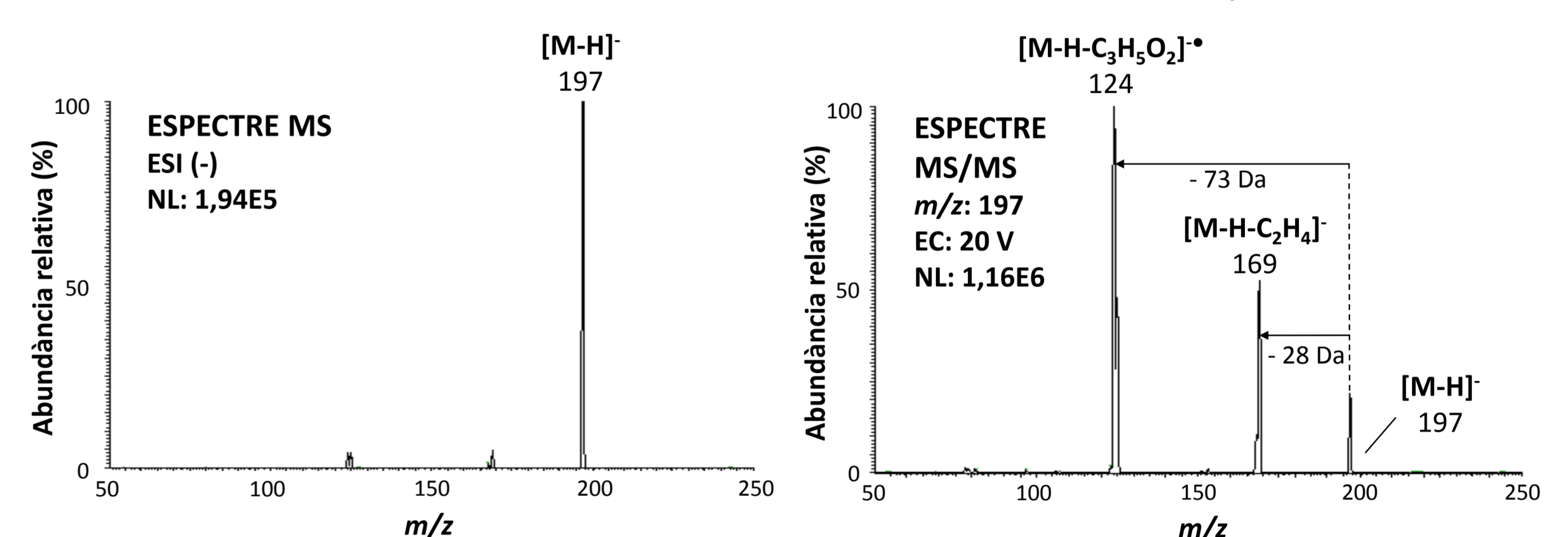
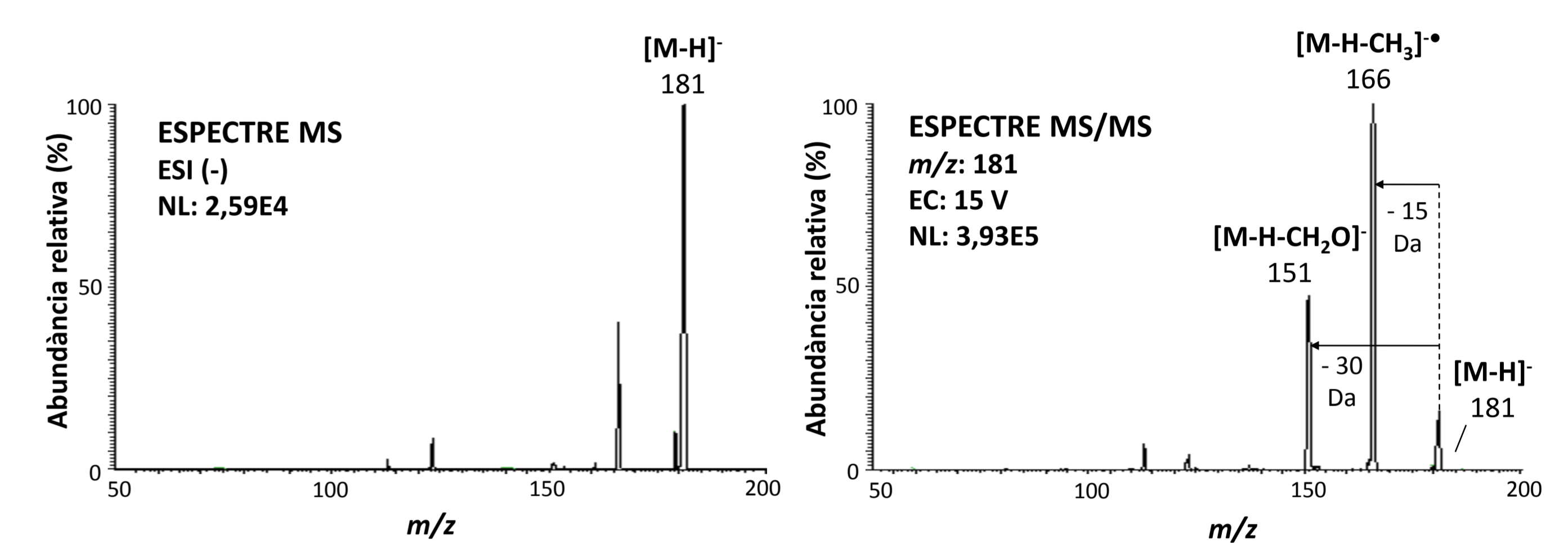
Paràmetres optimitzats de la font ESI	
Cabal del gas nebulitzador (u. a.)	60
Cabal del gas auxiliar (u. a.)	20
Voltatge de l'esprai (kV)	-2,5
Temperatura de vaporització (°C)	350
Temperatura del tub de transferència d'ions (°C)	350

## 4. OPTIMITZACIÓ DE L'ESPECTROMETRIA DE MASSES EN TÀNDEM

### CORBES SENYAL vs. ENERGIA DE COL·LISIÓ



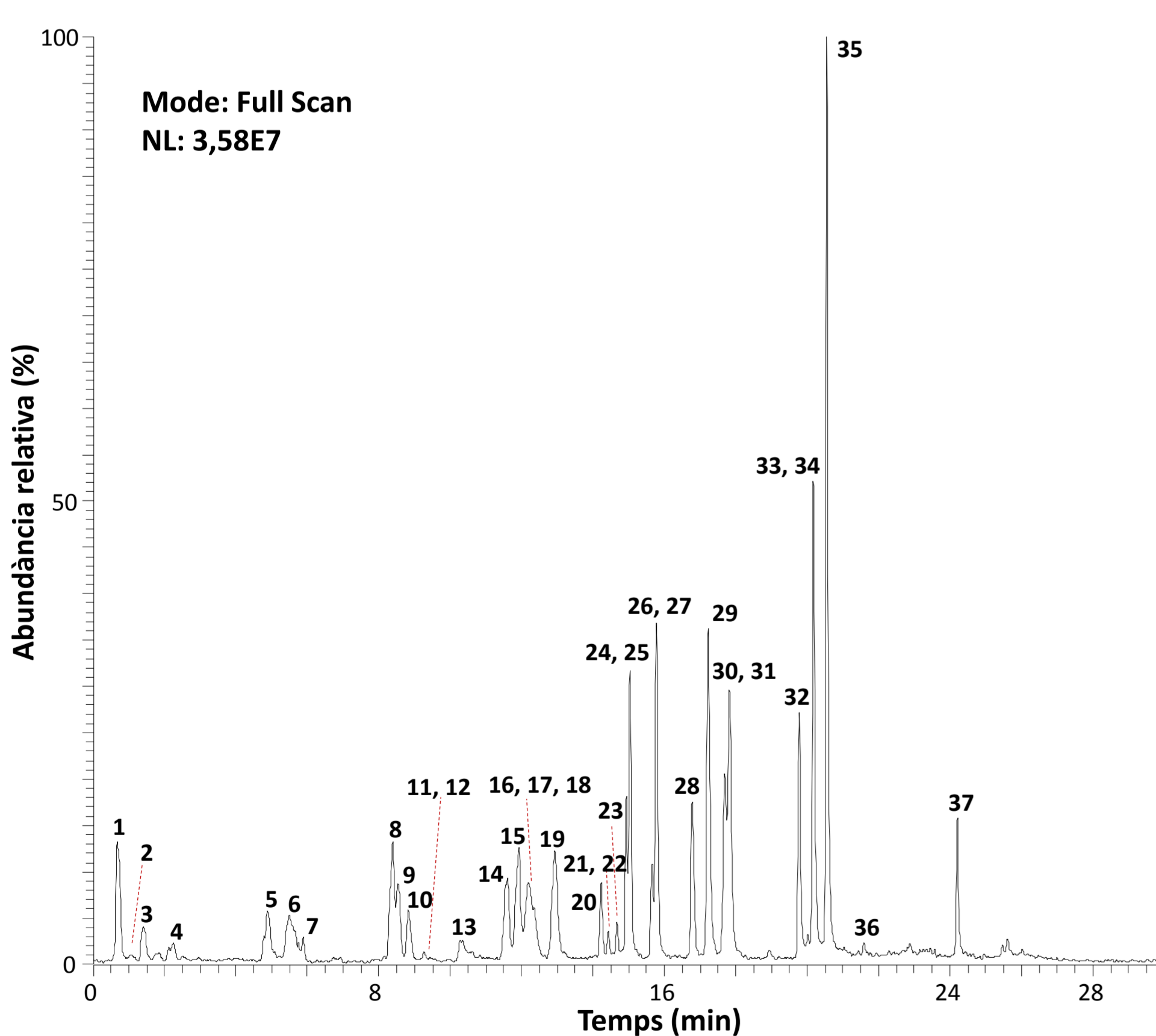
### ESPECTRES DE MASSES



- Les corbes Senyal vs. Energia de col·lisió (EC) han permès avaluar la fragmentació dels polifenols estudiats.
- Per cadascun dels compostos, per tal de poder treballar en el mode MRM, s'ha escollit una transició de quantificació i una altra de confirmació.

## 5. UHPLC-ESI-MS/MS

Separació cromatogràfica dels 37 polifenols



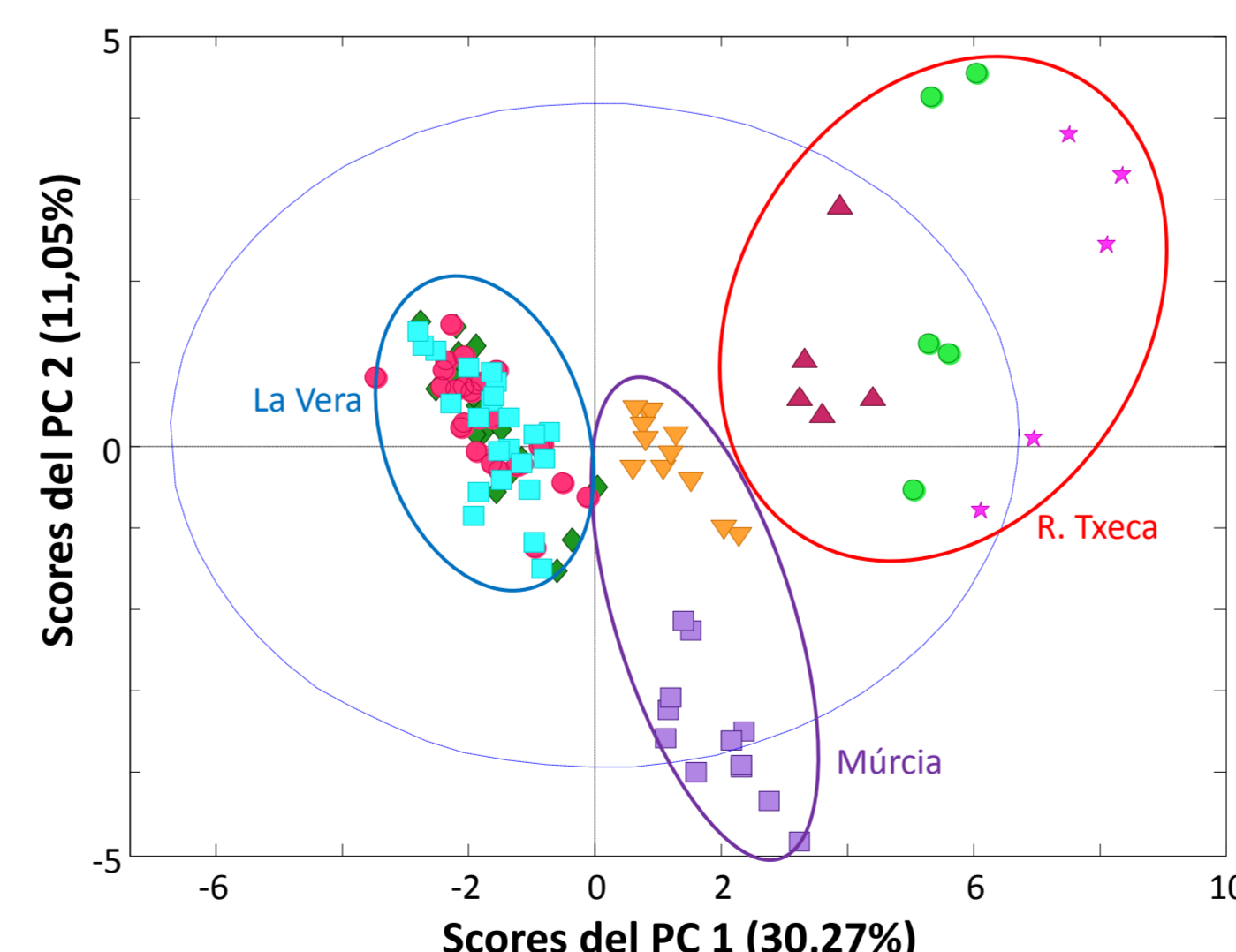
**Identificació de pics:** 1 Àcid quínic; 2 Arbutina; 3 Àcid gàl·lic; 4 Àcid homogentísic; 5 3,4-dihidroxibenzaldehid; 6 Àcid 4-hidroxibenzoic; 7 Àcid 2,5-dihidroxibenzoic; 8 Àcid clorogènic; 9 (+)-catequina; 10 Àcid cafeic; 11 Àcid homovanil·lic; 12 Àcid siríngic; 13 Vanil·lina; 14 Epicatequina; 15 Gal·lat d'etil; 16 *p*-cumàric; 17 Gal·lat de (-)-epigal·locatequina; 18 Siringaldehid; 19 Umbel·liferona; 20 Procianidina C1; 21 Àcid veràtric; 22 Àcid ferúlic; 23 Àcid sinàpic; 24 Polidatina; 25 Rutina; 26 Procianidina A2; 27 Glucòsid 7-nepetí; 28 Hesperidina; 29 Homoplantaginina; 30 Fisetina; 31 Àcid rosmarínic; 32 Morí; 33 Quercetina; 34 Resveratrol; 35 Kaempferol; 36 Àcid asiàtic; 37 Àcid betulínic.

## 6. TRACTAMENT QUIMIOMÈTRIC DEL PERFIL POLIFENÒLIC

- Un total de 111 mostres de pebre vermell de diferents DOP (La Vera, Múrcia i la República Txeca) i diferents varietats (picant, agredolç i dolç) han estat analitzades.
- 0,3 g de mostra han estat extrets amb 3 mL de H<sub>2</sub>O:ACN (20:80) i, després de centrifugar, el sobrenadant obtingut ha estat filtrat.
- Els perfils polifenòlics obtinguts han estat tractats per Anàlisi de Components Principals (PCA) i Anàlisi Discriminant amb regressió de Mínims Quadrats Parcial (PLS-DA).

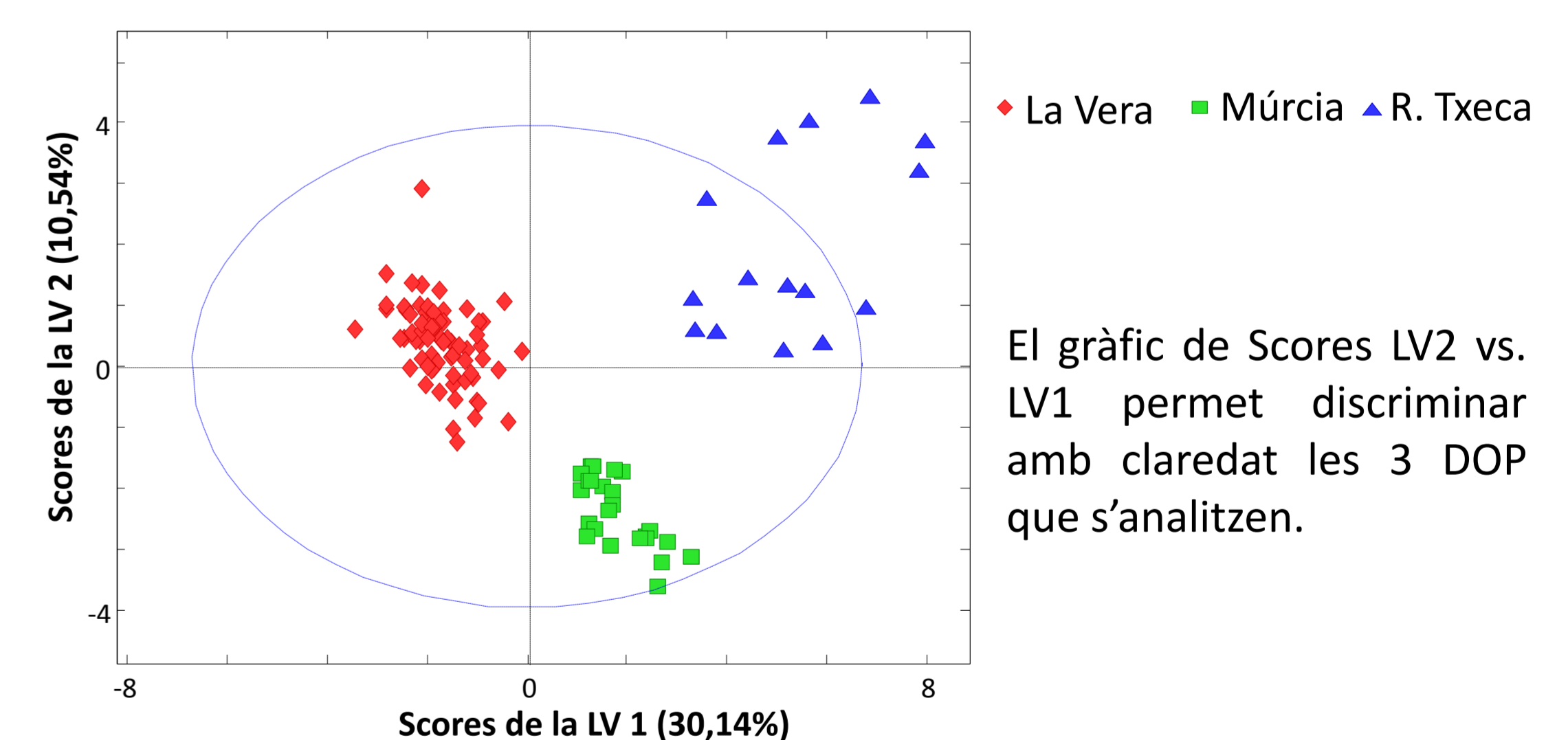
### ANÀLISI DE COMPONENTS PRINCIPALS

El gràfic de Scores PC2 vs. PC1 mostra una bona separació entre les diferents DOP, així com entre les diferents varietats de Múrcia i de la República Txeca.

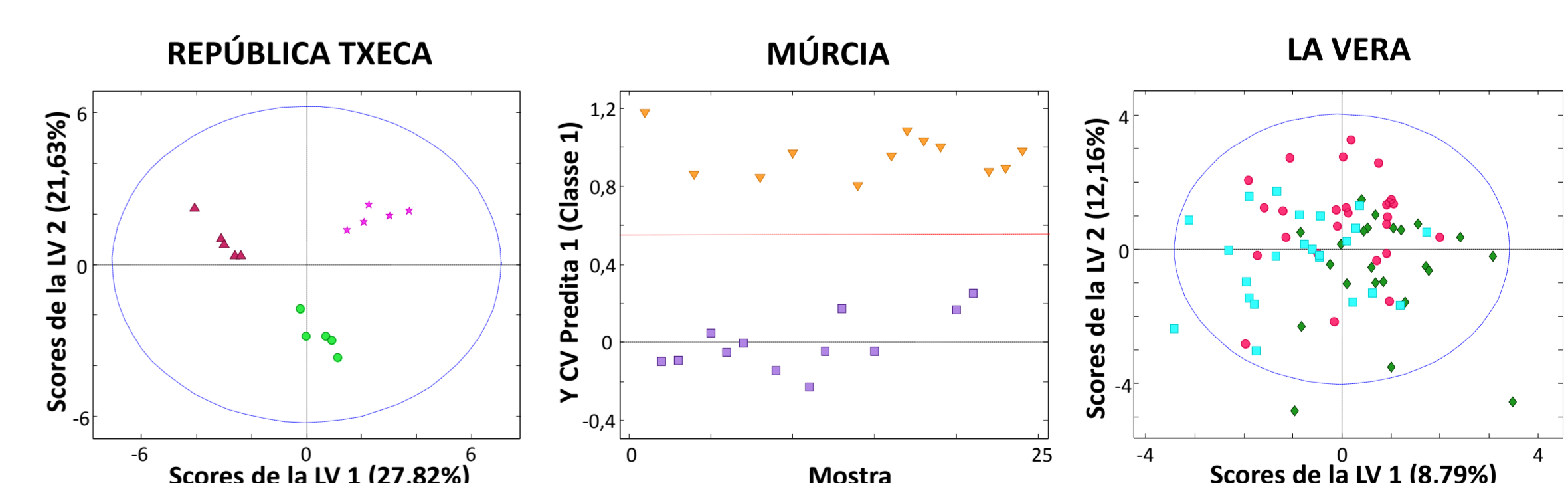


- La Vera picant ■ La Vera dolç ■ La Vera agredolç ▼ Múrcia picant
- Múrcia dolç ■ R. Txeca picant ▲ R. Txeca picant fumat ● R. Txeca dolç

### ANÀLISI DISCRIMINANT AMB REGRESSIÓ DE MÍNIMS QUADRATS PARCIALS



El gràfic de Scores LV2 vs. LV1 permet discriminar amb claredat les 3 DOP que s'analitzen.



Els gràfics de Scores obtinguts per la regió de la República Txeca i de Múrcia permeten diferenciar clarament entre les seves respectives varietats. En canvi, les varietats de La Vera no es poden discriminar ni classificar.

## 7. CONCLUSIONS

- S'ha desenvolupat un mètode UHPLC-ESI-MS/MS senzill i fiable per a la determinació de 37 polifenols en mostres de pebre vermell.
- El mètode proposat permet caracteritzar i classificar perfectament les mostres de pebre vermell en funció de la seva DOP, utilitzant el contingut polifenòlic com a descriptor químic mitjançant PCA i PLS-DA. En el cas de les mostres de Múrcia i de la República Txeca, també ha estat possible discriminar les varietats (dolç o picant) del pebre vermell utilitzat.
- Aquest mètode es pot proposar per garantir l'autenticació i la prevenció de frau dels pebres vermells amb DOP.

## 8. REFERÈNCIES

[1] Lucci P, Saurina J, Núñez O, TrAC Trends Anal. Chem., 88, 1 (2017).

## 9. AGRAÏMENTS

Els autors agraeixen el suport financer rebut del Ministeri Espanyol d'Economia i Competitivitat (projecte CTQ2015-63968-C2-1-P) i de l'Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca de la Generalitat de Catalunya (projectes 2017SGR-171 i 2017SGR-310)