

## Determinación de los compuestos cianogénicos amigdalina y prunasina en semillas de almendras (*Prunus dulcis* L.) mediante cromatografía líquida de alta resolución

### Resumen

Este trabajo presenta una metodología de análisis para determinar y cuantificar los compuestos cianogénicos amigdalina y prunasina presentes en la semilla de almendra madura (*Prunus dulcis*). Se evaluaron distintos sistemas extractantes (agua, metanol (100%), metanol:agua (80:20), metanol:agua (50:50), acetonitrilo:agua (20:80) y extracción Soxhlet con metanol al 100 %) para la extracción de los glucósidos cianogénicos amigdalina y prunasina de muestras liofilizadas previamente. Para detectar y cuantificar los analitos de interés se utilizó Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) en una columna Symmetry C18 con detector de arreglo de diodos a 218 nm y usando como fase móvil acetonitrilo:agua (20:80). Los resultados encontrados indican, por un lado, que el metanol al 100% es el sistema de extracción más eficiente, y por el otro, que las condiciones cromatográficas utilizadas permitieron la separación y la cuantificación de prunasina (tr: 5,7 min, 0,136 mg/100 g de muestra seca) y amigdalina (tr: 3,4 min, 0,387 mg/0,100 g de muestra seca) presentes en semillas maduras de *Prunus dulcis*.

**Palabras clave:** cianógenos, almendras dulces, amigdalina, prunasina.

## Determination of cyanogenic compound amygdalin and prunasin in almond kernels (*Prunus dulcis* L.) by using liquid chromatography

### Abstract

This work presents a methodology to detect and quantify the cyanogenic compounds amygdalin and prunasin in the seed of ripe almonds (*Prunus dulcis*). Different extraction systems were evaluated (water, methanol (100%), methanol:water (80:20), methanol:water (50:50), acetonitrile:water (20:80) and Soxhlet extraction with pure methanol) to extract the cyanogenic glycosides amygdalin and prunasin of previously lyophilized samples. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) in a C18 Symmetry column with diode array detection at 218 nm and with acetonitrile:water (80:20) as mobile phase was used to detect and quantify the analytes. The results indicate that 100% methanol is the most efficient extraction system and that the chromatographic conditions allowed the separation and quantification of prunasin (tr: 5.7 min, 0.136 mg/100 g of dried sample) and amygdalin (tr: 3.4 min, 0.387 mg/0,100 g of dried sample) present in the ripe seeds of *Prunus dulcis*.

**Keywords:** Cyanogens, sweet almond, amygdalin, prunasin.

## Determinação de os compostos cianogênicos amigdalina e prunasina em sementes e amêndoa (*Prunus dulcis* L.) de cromatografia líquida de alta resolução

### Resumo

Esta pesquisa apresenta uma metodologia de análise para determinar e quantificar os compostos cianogênicos amigdalina e prunasina presentes na semente madura da amendoeira (*Prunus dulcis*). Avaliaram-se distintos sistemas de extração (água, metanol (100%), metanol:água (80:20), metanol:água (50:50), acetonitrila:água (20:80) e extração Soxhlet com metanol ao 100%) para a extração dos glicosídeos cianogênicos amigdalina e prunasina de amostras liofilizadas previamente. Para detectar e quantificar os analitos de interesse se utilizou Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) numa coluna Symmetry C18 com detector de arreglo de diodos a 218 nm e usando como fase móvel acetonitrila:água (20:80). Os resultados encontrados indicam, de um lado, que o metanol ao 100% é o sistema de extração mais eficiente, e por outro lado, que as condições cromatográficas utilizadas permitiram a separação e a quantificação de prunasina (tr: 5,7 min, 0,136 mg/100 g de amostra seca) e amigdalina (tr: 3,4 min, 0,387 mg/0,100 g de amostra seca) presentes em sementes maduras de *Prunus dulcis*.

**Palavras-chave:** cianógenos, amêndoa doce, amigdalina, prunasina.

## Introducción

LOS GLUCÓSIDOS CIANOGENICOS SON el producto del metabolismo secundario en la síntesis de compuestos propios de las plantas que se componen de una aglicona tipo  $\alpha$ -hidroxinitrilo y de un azúcar, principalmente D-glucosa (1). La distribución de los glucósidos cianogénicos (GC) en el reino vegetal es relativamente amplia llegando a, por lo menos, 2500 cultivares, entre los que una gran cantidad pertenecen a las familias *Fabaceae*, *Rosaceae*, *Linaceae*, *Compositae* y otras.

Los glucósidos cianogénicos son un grupo conocido y se presentan en las especies del género *Prunus*, es decir, almendros, damascos, durazneros, nectarinos, cerezos, entre otros (2, 3). La característica de producir ácido cianhídrico por la hidrólisis de los compuestos cianogénicos de algunos vegetales, entre ellos los citados anteriormente, depende tanto de la biosíntesis de los glucósidos cianogénicos como de la existencia (o ausencia) de sus enzimas de degradación (2, 3). Los glucósidos cianogénicos pueden contener un monosacárido o un disacárido y un hidroxinitrilo aromático. Esto último es el caso de la amigdalina. Tal como ocurre en otras síntesis de compuestos como los glucosinolatos, inicialmente se forma una aldoxima a partir de un aminoácido que, a continuación, es transformada en un nitrilo, seguido de un hidroxinitrilo. Finalmente, se obtiene el glucósido cianogénico mediante diferentes etapas, muchas de ellas aún desconocidas (3, 4). La generación de ácido cianhídrico a partir de los compuestos cianogénicos es un proceso de dos etapas que implica una deglicosilación y una división de la molécula (regulada por  $\beta$ -glucosidasa y  $\alpha$ -hidroxinitrilasa). Teniendo en cuenta que la compartimentalización a nivel de los tejidos de los glucósidos cianogénicos y sus enzimas impide la hidrólisis a gran escala en el tejido vegetal intacto, los cultivares del género *Prunus* tienen la capacidad de acumular amigdalina, cianógeno que está relacionado con el amargor y producción de ácido cianhídrico (5-11). El compuesto inicialmente puede ser prunasina o amigdalina, pero una vez el tejido que contiene éste es degradado, empieza la acción de enzimas propias como es las  $\beta$ -glucosidasas con la liberación de glucosa, benzaldehído y ácido cianhídrico (2-12). Este sistema de dos componentes, cada uno de ellos químicamente inerte, proporciona a la planta una defensa química contra los herbívoros, insectos y patógenos, garantizando posiblemente la supervivencia de la especie y como reservas de energía (13). Para el caso de los almendros pueden presentarse almendras dulces, ligeramente amargas y amargas (4, 28).

La cianogénesis está muy extendida en las plantas, pero relativamente pocos compuestos cianogénicos se han aislado y caracterizado (14). Dos plantas tropicales ampliamente cultivadas, el maracuyá, *Passiflora edulis* Sims (*Passifloraceae*) y la papaya, *Carica papaya* L. (*Caricaceae*), han sido previamente examinadas en búsqueda de compuestos cianogénicos, pero siguen existiendo dudas sobre la presencia e identidad de estos compuestos. En la yuca (*Manihot esculenta*) se ha identificado el cianógeno por el método del picrato (27).

Algunos compuestos cianogénicos son aparentemente derivados o tienen como precursores los aminoácidos valina e isoleucina, como es el caso de los miembros de la familia *Passifloraceae* (15); otros parecen proceder de la fenilalanina (16, 17). Las familias *Lauraceae* y *Sapindaceae* generan los compuestos cianogénicos taxipilina y prunasina (18). Industrialmente muchas frutas tropicales, por ejemplo una especie *Passiflora edulis*, tienen una importancia económica considerable y se cultivan para aprovechar la fruta fresca y el zumo (19). No obstante, las hojas, tallos y frutos inmaduros de esta especie contienen compuestos cianogénicos, a veces en altas concentraciones.

Para el análisis y determinación de compuestos cianogénicos en vegetales, existen algunas técnicas instrumentales como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Sin embargo, en este análisis, las interferencias debidas a los compuestos en la matriz, tales como los pigmentos, flavonoides, taninos y otros, hacen que a estas técnicas deban adaptarse metodologías verificables y reproducibles, además de

la purificación de las muestras a analizar (2). Encontrar técnicas que sirvan para identificar estos compuestos es de gran importancia para la industria alimentaria como es el caso de almendras (amargor), y genéticamente, porque actúan como mecanismo de defensa ante insectos y como fuente de energía (2).

El objetivo de esta investigación fue implementar y desarrollar la técnica analítica de determinación y cuantificación de glucósidos cianogénicos (amigdalina y prunasina) en el fruto de la almendra (*Prunus dulcis*), mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

## Materiales y métodos

### Toma, acondicionamiento y conservación de la muestra

Las almendras analizadas fueron adquiridas de árboles cultivados en la finca experimental "Tres Caminos" del CEBAS-CSIC en Murcia, España. Se recolectaron del árbol en plena maduración cuando el mesocarpo se encontraba completamente abierto. Cada muestra está constituida por 100 unidades de almendras que se tomaron aleatoriamente. Las almendras fueron desprovistas del mesocarpo e introducidas en bolsas de malla debidamente etiquetadas. Posteriormente, las muestras se llevaron al laboratorio del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Alicante para su análisis. Una vez en el laboratorio, las almendras se descascararon manualmente con un martillo, teniendo especial cuidado de no dañar la semilla, y se prepararon para su conservación sin eliminación del tegumento, pues éste ayuda en su conservación.

Se estudió el efecto de la preparación de la muestra sobre la determinación analítica: eliminación o no de la grasa de la almendra, tamaño de partículas en la muestra, troceado antes o después de la liofilización, teniendo en cuenta que estas variables podrían influir en los resultados cromatográficos.

En el presente trabajo las muestras se conservaron liofilizadas, con el fin de garantizar que las características fisicoquímicas y organolépticas no se alteraran de forma significativa. Las muestras previamente colocadas en unos viales de vidrio se introdujeron en un liofilizador Telstar 2000, a una presión de  $4 \times 10^{-2}$  mbar y una temperatura entre  $-79$  °C y  $-82$  °C.

Con objeto de mejorar las condiciones de liofilización se controlaron diferentes parámetros: tamaño de partícula de la muestra, tipo de congelación previa y tiempo de liofilización. Respecto del tamaño de partícula se ensayaron tres tratamientos: muestras finamente trituradas (tamaño de grano menor a 1 mm), almendras partidas o troceadas en trozos irregulares de diferentes tamaños inferiores a 5 mm y almendras enteras. La trituración de las muestras se realizó en un molino Marca IKA® A 11 BASIC, con una velocidad de giro de 3500 rpm. El tiempo de trituración fue inferior a 30 s, con el fin de no calentar la muestra y evitar el apelmazamiento que podría producir su alto contenido de aceite. Para reducir el calentamiento de la muestra durante la trituración, las almendras se mantuvieron refrigeradas con anterioridad. Respecto al tipo de congelación, previa a la liofilización, se utilizaron dos procedimientos: congelación lenta en un congelador a  $-18$  °C por 24 h, congelación rápida con nitrógeno líquido a  $-178$  °C por 30 s. Finalmente se ensayaron diferentes tiempos de liofilización entre 2 y 40 h, utilizando muestras trituradas, troceadas y enteras, con congelación rápida o lenta.

### Preparación de la muestra para su análisis

Se tomaron 10 muestras de 100 mg cada una. Para la extracción de grasa de las almendras, se utilizó un Equipo Soxhlet Selecta FS-6 digital de

seis lugares, algodón, cartuchos de extracción de celulosa (Whatman) de 26 mm de diámetro x 60 mm de alto y éter de petróleo grado HPLC. Las muestras estuvieron en reflujo durante 30 min para después, utilizando un rotaevaporador, recuperar el aceite de la almendra y el éter utilizado por aparte (26).

### Extracción de los glucósidos cianogénicos

Se realizó el proceso de extracción de glucósidos cianogénicos de la semilla de almendra, estudiando los efectos de diferentes sistemas extractantes como son: agua, metanol (100%), metanol:agua (80:20), metanol:agua (50:50), acetonitrilo:agua (20:80) y extracción Soxhlet con metanol 100%, hasta 24 h y por triplicado. La extracción de los glucósidos cianogénicos se realizó con la muestra S3088, de sabor ligeramente amargo, que tenía un contenido de 9,8 mg de cianuro/100 g de muestra seca. La extracción de compuestos cianogénicos se realizó a una temperatura de 30 °C, en un baño con agitación (Memmert®) entre 30 min y 20 h, excepto en el caso de la extracción con Soxhlet que se llevó a cabo a 80 °C durante 2 h. La extracción con agua se efectuó de la siguiente manera: a la muestra se le añadieron 10 mL de agua a 40 °C y se dejó en un baño con agitación a 30 °C; con los extractos obtenidos se analizaron de forma más detallada los sistemas extractantes metanol 100% y metanol:agua (80:20), para evaluar también la influencia del tiempo de extracción en ambos casos. Las experiencias realizadas consistieron en someter a extracción con ambos disolventes, 5 mg de una misma muestra durante tiempos diferentes (2, 8, 16 y 24 h), con el objeto de determinar el tiempo de extracción y para determinar la concentración del cianógeno utilizando HPLC. Así mismo, se aprovechó la misma experiencia para comprobar la estabilidad en el tiempo de los extractos obtenidos con el sistema extractante, mantenidos a 4 °C. Todo lo anterior con el fin de garantizar la mejor extracción de los compuestos cianogénicos presentes, lo cual se comprueba mediante la determinación y cuantificación de los compuestos cianogénicos presentes en los extractos obtenidos utilizando HPLC.

### Procedimiento para la determinación de glucósidos cianogénicos por HPLC

Se pesaron de forma exacta 0,2 g de almendra si ésta era amarga, y 0,4 g si la almendra era dulce o ligeramente amarga. Se introdujo en un tubo de centrífuga junto con 5 mL de metanol de grado HPLC, se tapó y se dejó durante 12 y 30 horas en baño con agitación a 30 °C. Se centrifugó durante 5 minutos a 3000 rpm, se dejó reposar tratando de no mezclar nuevamente el sedimento formado. El sobrenadante se filtró utilizando una jeringa a través de un disco Millipore de Nylon de 0,45 µm. Cuando la muestra obtenida era de almendras dulces o ligeramente amargas se inyectó el extracto filtrado directamente, pero en el caso de las amargas dependiendo de la concentración del analito en la muestra se tuvo que diluir 1:5, 1:10 o incluso 1:20.

### Condiciones cromatográficas

Se utilizó un cromatógrafo líquido de alta eficiencia marca Waters Modelo 600 Controller, entrega de solventes con gradiente cuaternario modelo 600E, inyector manual Rheodine 7125, detector de arreglo de diodos Waters modelo 996, a 218 nm, columna (Symmetry C18, Waters, 250 x 4,6 mm, 5 µm), además una pre-columna C18 y el software Millennium 2008. Otras condiciones cromatográficas fueron: volumen de inyección 20 µL, flujo del eluyente 1,3 mL/min, composición del eluyente: acetonitrilo:agua (20:80) isocrática, tiempo de elución:

10 min. El sistema de detección elegido fue el fotométrico, ajustando la longitud de onda de absorción a 218 nm, longitud de onda que se encuentra cerca del máximo de absorción del compuesto analizado, con la ventaja de presentar menor absorción del eluyente. Respecto a la determinación cuantitativa, se prepararon patrones de amigdalina en el intervalo de concentración adecuado, obteniendo dos curvas de calibración. Una de ellas con concentración de amigdalina entre  $1 \times 10^{-6}$  y  $2 \times 10^{-4}$  M, se empleó para determinar la amigdalina en muestras dulces y ligeramente amargas. La otra, con valores de amigdalina entre  $1,2 \times 10^{-4}$  y  $1,3 \times 10^{-3}$  M, se utilizó para la determinación de amigdalina en muestras amargas. Además, se realizó una curva de calibrado similar para la prunasina con concentraciones entre  $1,5 \times 10^{-6}$  y  $2,1 \times 10^{-5}$  M. Las curvas de calibración se prepararon a partir de patrones de amigdalina y prunasina (Sigma®) disueltos en metanol. Se aplicó el método de calibración con patrones externos para la determinación cuantitativa y un detector *diode array* para la evaluación de la pureza de los picos cromatográficos; teniendo la recta de calibrado de ecuación  $y=bx+a$ , el LOD se calculó:

$$\text{Límite de detección, } X_{\text{LOD}} = 3S_{\text{a/b}}$$

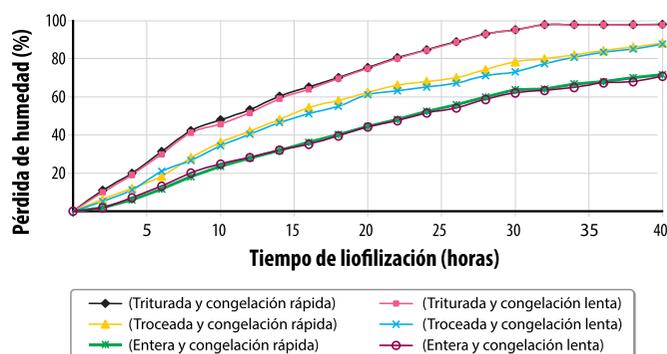
siendo  $S_{\text{a/b}}$  la desviación estándar de la ordenada. Para el límite de cuantificación:

$$X_{\text{LOQ}} = 10S_{\text{a/b}}$$

La reproducibilidad del método cromatográfico se estudió con dos niveles de concentración de cianuro (equivalente a amigdalina) utilizando diez muestras de la variedad Garrigues (ligeramente amarga) con 1,1 mg de cianuro/100g de muestra seca, y de la variedad Titán (dulce) con 0,03 mg de cianuro/100 g de muestra seca (4). La reproducibilidad del método pudo estimarse sobre la base de resultados obtenidos. Se utilizó la norma cubana de especificación técnica NC-TS 367:20003, basada en el procedimiento No. 5 del Comité Nórdico de Análisis de Alimentos (NMKL) (24).

## Resultados y discusión

Con el fin de conservar las propiedades fisicoquímicas y organolépticas, las muestras se liofilizaron, para lo cual se tuvo en cuenta el tamaño de partículas. En la Figura 1 se observa cómo el tamaño de partícula de la muestra influye en la extracción final de agua durante



**Figura 1.** Pérdida de humedad durante la liofilización de una muestra de almendra de Garrigues en función del tiempo de liofilizado, tipo de congelación previa y tamaño de partícula de la muestra.

el proceso de liofilización, obteniéndose el mayor rendimiento en las muestras trituradas. Con las muestras de almendras trituradas sometidas a congelación rápida, se obtuvo una pérdida del 88% de humedad en 32 h y, finalmente, con las almendras enteras y congelación rápida, 62% de pérdida de humedad. Dada la mayor rapidez y seguridad, la congelación con nitrógeno líquido se utilizó con el fin de evitar que las muestras ya congeladas aumentaran su temperatura al introducir las en el liofilizador. Hay que indicar que el procedimiento de liofilización que se acaba de exponer, con muestra triturada y congelada de forma rápida, es aplicable solamente en el caso de que se trabaje con almendra madura, ya que en otro estado de madurez el porcentaje de agua es muy alto.

En el análisis mediante HPLC, el aceite o la grasa, como componentes de las muestras, pueden interferir en los resultados afectando la resolución de los cromatogramas y presentándose picos irregulares, por lo que previamente se realizaron ensayos de muestras con grasa y sin grasa. Los promedios de los resultados obtenidos con muestra desengrasada se refieren a muestra entera, es decir, teniendo en cuenta el porcentaje de grasa extraído previamente (50%). De los resultados presentados en la Tabla 1, se observa que existen valores diferentes para el contenido de amigdalina así: 1,31 mg/100 g muestra seca para muestras con grasa y desengrasada 1,08 mg/100 g muestra seca, siendo los resultados obtenidos con muestras desengrasada alrededor de un 17% más bajos y mucho menos precisos.

De estos resultados se deduce que se debe producir una pérdida de amigdalina en el desengrasado. Por otro lado, tampoco se consigue una mejora sustancial del cromatograma en el caso de que se lleve a cabo el desengrasado a una muestra con contenido bajo en amigdalina, por lo que en este trabajo se optó por analizar las muestras sin desengrasar previamente (2).

En cuanto a la trituración o no de la muestra, el tamaño de partícula afecta de modo significativo el rendimiento y el tiempo de liofilización. Además, ensayos preliminares cualitativos mostraron que con la muestra triturada, se obtienen mejores resultados analíticos, resolución de cromatogramas y una mejor extracción de los glucósidos cianogénicos en metanol para su posterior determinación por cromatografía, así como también una mejor hidrólisis de amigdalina. Los resultados sobre el posible efecto de la trituración de las almendras antes de la lio-

filización en la determinación de los glucósidos cianogénicos por HPLC se presentan en la Tabla 2.

Teniendo en cuenta que la almendra tiene un alto grado de contenido graso, si no se conserva adecuadamente, tiende a oxidarse; hay dos tipos de enranciamiento, uno oxidativo, en cuyo caso se forman aldehídos o cetonas por la adición de oxígeno molecular, y otro hidrolítico, mediante el cual se forman ácidos grasos libres por la hidrólisis que presentan los glicéridos. Estas características se conservan mediante la liofilización, que es un procedimiento ampliamente utilizado para la conservación de muestras. Los promedios obtenidos indican que las concentraciones de amigdalina y cianuro obtenidas, fueron semejantes con independencia de haber triturado la muestra antes o después de la liofilización.

### Contenido de glucósidos cianogénicos determinados por HPLC

Los extractos obtenidos después de 12 h de tratamiento a  $30 \pm 2$  °C, con los distintos sistemas extractantes utilizados, se analizaron por HPLC obteniéndose resultados muy variados. Se observó que la extracción con agua no resultó efectiva, ya que proporcionó un rendimiento muy bajo independiente del tiempo de extracción. Así mismo, la extracción con acetónitrilo:agua (20:80) también fue deficiente y la extracción con Soxhlet produjo un pico cromatográfico deforme, lo que parece indicar que coeluyen otros componentes que también se extrajeron junto con la amigdalina. Merece especial atención el resultado obtenido con metanol:agua en diferentes proporciones (Tabla 3).

Entre los extractantes utilizados, el metanol 100% proporciona un pico cromatográfico a 3,5 min que corresponde a amigdalina, con una concentración de 98 mg/100 g de muestra seca, utilizando como eluyente acetónitrilo:agua (20:80). Además, aparece un pico a 5,9 min que corresponde al tiempo de retención de la prunasina, con una concentración de 8,8 mg/100 g muestra seca. Este es el mejor y resultado obtenido, teniendo en cuenta las características de los patrones utilizados, en cuanto características de los picos y tiempos de retención. Si la mezcla es metanol:agua (50:50), el pico correspondiente a amigdalina disminuyó 36 veces su concentración, no aparece ningún pico al tiempo de retención de la prunasina y, sin embargo, aparece un pico ensanchado y deforme a un tiempo de retención de 8,3 min. Todo ello indica que la

**Tabla 1.** Análisis de almendras variedad Garrigues trituradas y congeladas con nitrógeno líquido antes de su liofilización, con grasa o desengrasadas, previamente al análisis por HPLC. Contenido de amigdalina expresado como mg/100g de muestra seca.

Muestras	HPLC	
	Con grasa	Sin grasa
1	1,32	1,20
2	1,28	1,07
3	1,36	1,13
4	1,28	1,01
5	1,27	1,25
6	1,34	1,10
7	1,32	1,18
8	1,34	0,80
9	1,30	0,96
10	1,33	1,12
<b>Media</b>	<b>1,31</b>	<b>1,08</b>
<b>Desviación estándar</b>	<b>0,03</b>	<b>0,13</b>

**Tabla 2.** Contenido de cianuro (mg/100g de muestra seca) determinado mediante HPLC en almendras de la variedad Garrigues trituradas antes y después de la liofilización.

Muestra	HPLC	
	Triturada antes	Triturada después
1	1,32	1,30
2	1,28	1,33
3	1,36	1,29
4	1,28	1,26
5	1,27	1,36
6	1,34	1,23
7	1,32	1,34
8	1,34	1,29
9	1,30	1,31
10	1,33	1,25
<b>Media</b>	<b>1,31</b>	<b>1,30</b>
<b>Desviación estándar</b>	<b>0,03</b>	<b>0,04</b>

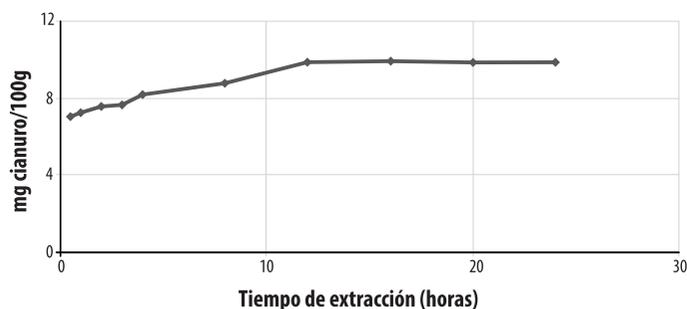
**Tabla 3.** Resultados de extracción con diferentes extractantes. Concentración de cianuro expresada en mg / 100 g de muestra seca.

Extractante	Tiempo de retención	Concentración
Metanol	Amigdalina: 3,5 min	9,8 mg cianuro/100 g
Agua	Amigdalina: 3,3 min No identificado: 8,2 min	$C_{\text{agua}} = C_{\text{metanol}} / 36$ Pico ancho y asimétrico
Metanol:Agua (80:20)	Amigdalina: 3,3 min Prunasina: 5,9 min	$C_{\text{metanol:agua (80:20)}} = C_{\text{metanol}} / C_{\text{metanol:agua (80:20)}} = 8,8 \text{ mg}/100 \text{ g}$
Metanol:Agua (50:50)	Amigdalina: 3,3 min No identificado: 8,3 min	$C_{\text{metanol:agua (50:50)}} = C_{\text{metanol}} / 36$ Pico ancho y asimétrico
Acetonitrilo: Agua (20:80)	Amigdalina: 3,3 min No identificado 8,3 min	$C_{\text{acetonitrilo:agua (20:80)}} = C_{\text{metanol}} / 36$ Pico ancho y asimétrico
Metanol (Soxhlet*)	Mezcla sin resolver: 3,3 min	Pico ancho y asimétrico

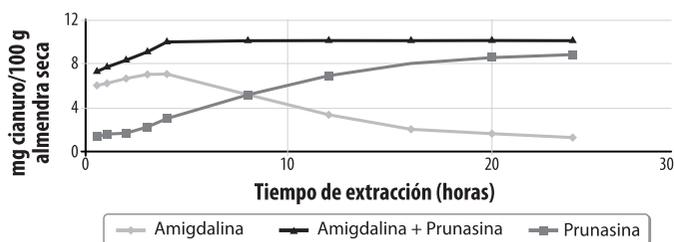
$C_{\text{agua}}$  = concentración usando agua como extractante.  
 $C_{\text{metanol}}$  = concentración usando metanol como extractante.  
 $C_{\text{metanol:agua (80:20)}}$  = concentración usando metanol:agua (80:20) como extractante.  
 $C_{\text{metanol:agua (50:50)}}$  = concentración usando metanol:agua (50:50) como extractante.  
 $C_{\text{acetonitrilo:agua (20:80)}}$  = concentración usando acetonitrilo:agua (20:80) como extractante.

presencia de agua en el extractante hace que la amigdalina extraída vaya degradándose paulatinamente a prunasina, y si la proporción de agua es suficientemente alta, la degradación continúa probablemente hasta cianhidrina o incluso benzaldehído. La suma de amigdalina y prunasina extraída con metanol:agua (80:20) coincide prácticamente con la concentración de amigdalina extraída con metanol 100% durante 16 h de extracción (Figuras 2 y 3) (10).

Por otra parte, se ha comprobado que la extracción con metanol 100% de muestras de almendras amargas, procedentes de los primeros meses de su desarrollo, extrae amigdalina y prunasina; por lo tanto el metanol 100% es capaz de extraer ambos glucósidos si estos están presentes en la muestra (2). En la Tabla 3 se relacionan los resultados



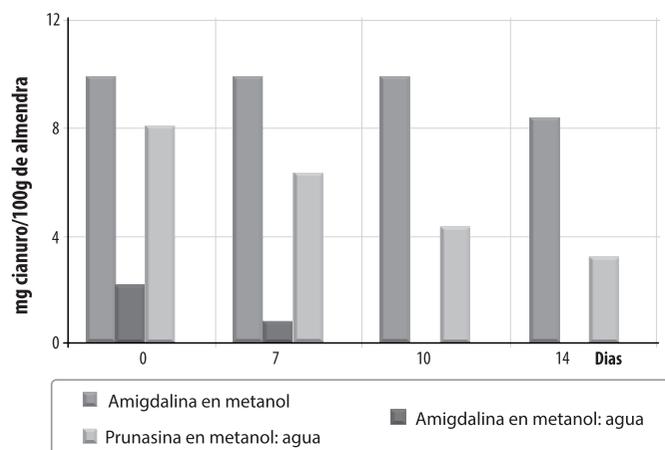
**Figura 2.** Variación de amigdalina expresada como mg de cianuro/100 g de muestra seca, extraída con metanol 100% en función del tiempo de extracción.



**Figura 3.** Variación de los contenidos de amigdalina, prunasina y cianuro total expresados como mg de cianuro/100 g de muestra seca, utilizando el sistema extractante metanol:agua (80:20) en función del tiempo de extracción.

obtenidos mediante los diferentes extractante utilizados. Por ello, se puede afirmar que en almendra madura el único glucósido cianogénico es la amigdalina, en contra de lo publicado previamente (20) que encontró prunasina. Probablemente, este resultado fue consecuencia de la degradación de la amigdalina a prunasina, debido al sistema de extracción utilizado en dicho trabajo (2). Ante los resultados obtenidos, lo mejor es utilizar metanol 100% como extractante de los glucósidos cianogénicos. Se observa que el extractante metanol puro proporcionó una concentración de amigdalina máxima a partir de un tiempo de extracción de 12 h (Figura 2). Con la mezcla metanol:agua (80:20) se obtuvo un rendimiento máximo de extracción a tan solo 4 h, si se considera la suma de amigdalina y prunasina (Figura 3). Por lo tanto, esta también podría ser una alternativa válida, pero con el inconveniente de que existe una transformación de amigdalina en prunasina, y por lo tanto, sólo sería aplicable si lo que interesa es el contenido total de cianuro, pero nunca para cuantificar amigdalina y prunasina por separado.

Actualmente se vienen realizando análisis para otros compuestos cianogénicos para la determinación cualitativa y cuantitativa, por ejemplo la linamarina (21). Igualmente, se presta especial atención a la determinación en matrices complejas, por ejemplo, en productos alimenticios procesados de *Manihot esculenta* Cranz. En papaya (*Carica papaya*), fruta tropical de mucho consumo en fresco (22), se determinaron compuestos cianogénicos en concentraciones de 300-500 mg/100 g muestra seca y glucosinolatos. Los resultados sobre la estabilidad del extracto obtenido con metanol 100% se presentan en la Figura 4. Se observa que el extracto obtenido en metanol puro es más estable, manteniéndose durante 10 días a 4 °C, mientras que el obtenido en la mezcla metanol:agua (80:20) se va degradando, prosiguiendo la transformación de amigdalina en prunasina e incluso llegando con el tiempo a la hidrólisis de la prunasina (11). Por todo lo anteriormente expuesto, se optó por trabajar con metanol 100% como agente extractante, dejando en contacto la muestra triturada, congelada con nitrógeno líquido, liofilizada y sin desengrasar durante 16 h con agitación y a una temperatura de 30±2 °C, con objeto de asegurar que el rendimiento de la extracción fuera elevado y reproducible. El extracto obtenido en estas condiciones es estable durante 14 días si es mantenido a 4 °C. En cuanto al rendimiento de la extracción, en la Tabla 4 puede observarse que la primera extracción proporcionó un porcentaje elevado y reproducible de extracción. Por ello, se optó por trabajar con el primer extracto, considerando una recuperación del 91,2 % en el proceso de extracción.



**Figura 4.** Estabilidad del extracto obtenido con metanol 100% y con metanol:agua (80:20) expresado en mg de cianuro/100g de muestra seca.

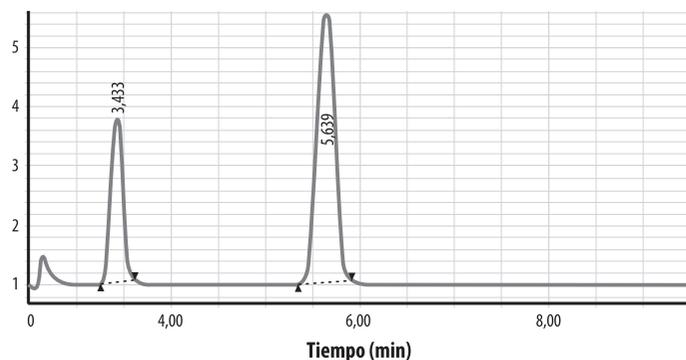
**Tabla 4.** Valores medios porcentuales de amigdalina y desviación estándar obtenidos para tres extractos sucesivos.

Extracto	Porcentaje de extracción	Desviación estándar
1°	91,2	1,6
2°	7,7	1,3
3°	1,1	0,5

### Condiciones cromatográficas

La columna Symmetry C18 utilizada en este estudio proporcionó resultados satisfactorios, tanto para los patrones como para las muestras reales, aportando resultados de mayor calidad, sobre todo para muestras con concentraciones altas de glucósidos cianogénicos y reproducibilidad. Para muestras dulces, con concentración de amigdalina cercana al límite de detección, se observa la aparición de interferencias debido a sustancias extraídas que eluyen a tiempos de retención cercanos. Con la columna Symmetry C18 el eluyente más adecuado fue el acetonitrilo:agua (20:80) que proporciona tiempos de retención de 3,4 min para amigdalina y 5,7 min para prunasina.

Para el análisis de almendras maduras, donde sólo hay amigdalina, la columna utilizada (Symmetry C18) permitió determinar la amigda-



**Figura 5.** Cromatograma de una mezcla patrón de amigdalina (3,4 min) y prunasina (5,7 min) obtenido utilizando una columna Symmetry C18.

lina en un tiempo más corto. Además, proporcionó una buena separación de los dos glucósidos (amigdalina y prunasina) presentes en la almendra durante su desarrollo en menos de 10 min, trabajando a una velocidad de flujo de 1,3 mL/min. Además, permitió que ambos componentes eluyeran puros, separados de otros componentes del extracto metanólico, pureza que ha sido contrastada mediante la utilización del detector fotométrico de arreglo de diodos. Tan sólo cuando la concentración de amigdalina está cercana al límite de detección, debido a la escala de trabajo, en el cromatograma se observa una impureza junto al pico correspondiente a amigdalina, que hace que haya que ajustar la integración según los parámetros de pureza de pico del detector. En la Figura 5 se muestra un cromatograma tipo obtenido a partir de una mezcla patrón de amigdalina y prunasina. Como se observa el tiempo de retención para la amigdalina y prunasina es de 3,4 y 5,7 min, respectivamente.

### Determinación cuantitativa

Las rectas de calibración ( $Y = ax + b$ ) obtenidas fueron las siguientes:

Muestras dulces y ligeramente amargas (amigdalina):

$$Y = 8,050 \times 10^9 + 5,513 \times 10^4 \quad [\text{Ec. 1}]$$

Muestras amargas (amigdalina):

$$Y = 6,573 \times 10^9 + 5,125 \times 10^4 \quad [\text{Ec. 2}]$$

Amargas y ligeramente amargas (prunasina):

$$Y = 8,751 \times 10^9 + 2,593 \times 10^4 \quad [\text{Ec. 3}]$$

A partir de estas rectas de calibración se calculó el límite de detección para amigdalina y prunasina:

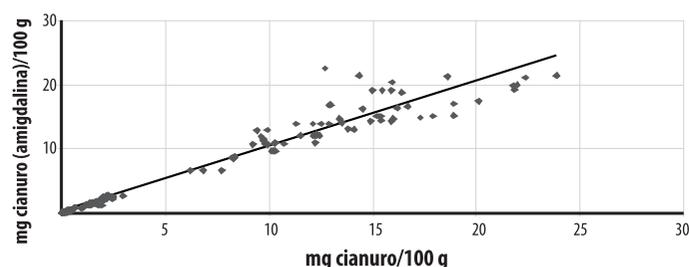
- Límite de detección de la amigdalina: 0,387 mg/100 g de muestra seca, cuando se trabaja con 0,4 g de muestra y se utiliza un volumen de extracción de 5 ml de metanol.
- Límite de detección de la prunasina: 0,136 mg/100 g muestra seca, con las mismas condiciones de extracción que para amigdalina.

De acuerdo con las definiciones de la ISO y la IUPAC, el Límite de Detección (LOD) es un parámetro del método analítico definido *a priori*, porque se fija antes de que se realice la medida. El LOD es esencialmente diferente a la decisión sobre si se detecta un analito o no, puesto que dicha decisión se toma una vez se conoce el resultado de la medida (25). La Tabla 5 presenta la reproducibilidad del método en los dos niveles de concentración estudiados, tomando 10 muestras (1 mg) y analizándolas inmediatamente. Se observa que el coeficiente de variación toma valores de 2,3% para la variedad Garrigues y de 22% para la Titán.

Desde el punto de vista práctico, el método de HPLC utilizado es más sencillo en cuanto a la preparación previa de la muestra y requiere menor destreza y tiempo de análisis (sobre todo si se dispone de un inyector automático). Además, presenta la ventaja adicional de permitir la identificación y cuantificación de los compuestos cianogénicos (amigdalina o prunasina) presentes en la muestra (Figura 6). Berenguer *et al.* (23) han realizado ensayos para determinar la presencia de compuestos cianogénicos utilizando otro tipo de columna diferente a Symmetry C18.

**Tabla 5.** Reproducibilidad del método cromatográfico en dos niveles de concentración de amigdalina. Contenido de cianuro mg/100g de muestra seca.

Muestras	Garrigues	Titán
1	1,32	0,028
2	1,28	0,020
3	1,36	0,034
4	1,28	0,029
5	1,27	0,026
6	1,34	0,031
7	1,32	0,033
8	1,34	0,027
9	1,30	0,021
10	1,33	0,016
<b>Media</b>	<b>1,31</b>	<b>0,027</b>
<b>Desviación estándar</b>	<b>0,03</b>	<b>0,006</b>
<b>Coefficiente de variación (%)</b>	<b>2,3</b>	<b>22,0</b>


**Figura 6.** Valores medios de contenido de cianuro en mg de cianuro/100g de muestra seca obtenidos a partir de la aplicación de HPLC.

## Conclusiones

El acondicionamiento y preparación de las muestras más adecuado para la determinación analítica de los compuestos cianogénicos se presentó en almendras con tegumento, sin desengrasar, trituradas, congeladas con nitrógeno líquido y liofilizadas durante 32 h. Para el análisis por HPLC, la extracción de los compuestos cianogénicos de la almendra debe realizarse con metanol 100% durante 16 h, a  $30 \pm 2$  °C y con agitación. El extracto obtenido con metanol es estable durante 7 días.

Las condiciones cromatográficas seleccionadas han sido: columna Symmetry C18, eluyente acetonitrilo:agua (20:80), caudal 1,3 mL/min y detector fotométrico a 218 nm. El coeficiente de variación obtenido en cromatografía, como medida de la reproducibilidad del método, fue del 2,3% a niveles de concentración 100 veces por encima del límite de detección y del 22% en niveles de concentración cercanos al límite de detección. El límite de detección para amigdalina es de 0,387 mg/100g y para prunasina de 0,136 mg/100g. La técnica cromatográfica HPLC permite identificar y cuantificar los glucósidos cianogénicos presentes en la muestra amigdalina y prunasina de forma independiente y con excelente resultados. El tiempo de retención para amigdalina y prunasina es de 3,4 y 5,7 min, respectivamente.

## Referencias

- Rimington C. The occurrence of cyanogenic glucoside in South African species of Acacia II. Determination of the chemical constitution of acaciapetalin and its isolation *Acacia stolonifera* Burch. Onderstepoort. *J. Vet Res.* 1935. 5: 445-456.
- Arrázola, G. Determinación de compuestos cianogénicos en semillas de almendras (*Prunus dulcis* L.). Incidencia en la mejora genética. Tesis Doctoral. Universidad de Alicante, España. 2002. p. 132
- János, Vetter. Plant cyanogenic glycosides. *Toxicon.* 2000. 38: 11-36.
- Arrázola, G.; Sánchez, R.; Dicenta, D.; Grané, N. Content of the cyanogenic glucoside amygdalin in almond seeds related to the bitterness genotype. *Agronomía Colombiana.* 2012. 30(2): 260-265.
- McCarty, C. D.; Leslie, J. W.; Frost, H. B. Bitterness of kernels of almond x peach hybrids and their parents. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 1995. 59: 254-258.
- Conn, E. E. Cyanogenic compounds. *Ann Rev Plant Physiology.* 1980. 31: 433-451.
- Frehner, M.; Scalet, M.; Conn, E. E. Pattern of the Cyanide-Potential in Developing Fruits. *Plant. Physiol.* 1990. 94: 28-34.
- Swain, E.; Poulton, J.E. Utilization of Amygdalin during Seedling Development of *Prunus serotina*. *Plant Physiology.* 1994. 106: 437-445.
- Poulton, J. E.; Li, C. P. Tissue level compartmentation of (R)-amigdalina and amygdalin hydrolase prevents large-scale cyanogenesis in undamaged *Prunus* seeds. *Plant Physiology* 1994. 104: 29-35.
- Dicenta, F.; Birger, L.; Møller, L.; Jørgensen, K. Prunasin Hydrolases during Fruit Development in Sweet and Bitter Almonds. *Plant Physiology.* 2012. 3: 111-119.
- Sánchez-Pérez, R.; Jørgensen, K.; Olsen, K.; Dicenta, F.; Møller, L. Bitterness in Almonds. *Plant Physiology.* 2008. 146: 1040-1052.
- Morant, A.V.; Jørgensen, K.; Jørgensen, C.; Paquette, S. M.; Sánchez-Pérez, R.; Møller, B. L.; Bak, S.  $\beta$ -Glucosidases as detonators of plant chemical defense. *Phytochemistry.* 2000. 69: 1795-1813.
- Jones, D. A. Why are so many food plants cyanogenic. *Phytochemistry.* 1998. 47: 115-162.
- Lechtenberg, M.; Nahrstedt, A. Cyanogenic glycosides. In: Ikan, R. (Ed.) *Naturally Occurring Glycosides.* Chichester (Eng): Wiley. pp. 147-191. 1999.
- Olafsdottir, E.; Cornett, C.; Jaroszewski, J. Cyclopentenoid cyanohydrin glycosides with unusual sugar residues. *Acta Chemica Scandinavica* 1989b. 43: 51-55.
- Spencer, K.; Seigler, D. Cyanogenesis of *Passiflora edulis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 1983. 31: 794-796.
- Chassagne, D.; Crouzet, J.; Bayonove, C.; Baumes, R. Identification and quantification of passion fruit cyanogenic glycosides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 1996. 44: 3817-3820.
- Miller, R.; Tuck, K. Reports on the distribution of aromatic cyanogenic glycosides in Australian tropical rainforest tree species of the Lauraceae and Sapindaceae. *Phytochemistry.* 2013. 92: 146-152.
- Rehm, S.; Espig, G. *Die Kulturpflanzen der Tropen und Subtropen.* Stuttgart (Germany): Eugen Ulmer Verlag. pp. 112-118. 1976.
- Usai, M.; D'hallewin, G. Cyanogenic glycosides contained in different organs of bitter and sweet almond. Agriculture. Rapport 14081 FR. Amélioration génétique de deux espèces de fruits secs méditerranéens: l'amandier et le pistachier, Proceedings of the VIII GREMPA Meeting, Nîmes (France) 1992. 26-27 June, pp. 233-236.
- Brimer, L.; Nout, M.J.R.; Tunçel, G.  $\beta$ -Glycosidase (amygdalase and linamarase) from *Endomyces fibuliger*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1998. 49: 182-188.
- Williams, D.; Pun, S.; Chaliha, M.; Scheelings, P.; O'Hare, T. An unusual combination in papaya (*Carica papaya*): The good (glucosinolates) and the bad (cyanogenic glycosides). *Journal of Food Composition and Analysis.* 2013. 29: 82-86.

23. Berenguer, V.; Giner R. M.; Grané, N.; Arrázola, G. Chromatographic determination of cyanoglycosides prunasin and amygdalin in plant extracts using a porous graphitic carbon column. *J. Agric Food Chem.* 2002. **20**: 50(24): 6960-6963.
24. Procedimiento No. 5. Versión en español 2005 del Comité Nórdico de Análisis de Alimentos (NMKL). Estimación y Expresión de la Incertidumbre de la Medición en Análisis Químico. 2003.
25. IUPAC. International Union of Pure and Applied Chemistry. 1995. **67**: 1699-1723. Extracciones con Soxhlet.
26. Núñez, C. E. Extracciones con Soxhlet. pp. 1-5. 2008. Disponible en: <http://www.cenunez.com.ar/archivos/39-traccinconequiposoxhlet.pdf>. [Consultado en marzo de 2013].
27. Rezaul Haque, M.; Howard Bradbury, J. Total cyanide determination of plants and foods using the picrate and acid hydrolysis methods. *Food Chemistry.* 2002. **77**: 107-114.
28. Arrázola, G.; Grane, N.; Dicenta, F. Importancia de los glucósidos cianogénicos en el sabor de frutos de almendros (*Prunus dulcis* Miller) y su incidencia en la agroindustria. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas.* 2014. **8**(1): 57-66.

**Article citation:**

Arrázola, G.; Grané, N.; Martin, M. L.; Dicenta, F. Determinación de los compuestos cianogénicos amigdalina y prunasina en semillas de almendras (*Prunus dulcis* L.) mediante cromatografía líquida de alta resolución. *Rev Colomb Quim.* 2013. **42**(3): 23-30.