

MÉTODO DE ANÁLISIS DE SAPONINAS TOTALES EN ALTRAMUZ

Extracción y análisis basados en el método de Navarro del Hierro, J., *et al.* (2018). "Ultrasound-assisted extraction and bioaccessibility of saponins from edible seeds: quinoa, lentil, fenugreek, soybean and lupin." *Food Research International* 109: 440 – 447.

1. Materiales y reactivos

- Botellas de 25 ml
- Tubos de ensayo de 10 ml (preferiblemente de base redondeada)
- Tubos de centrifuga de 20 ml
- Matraces aforados 50 ml, 10 ml y 5 ml
- Baño de ultrasonidos
- Agitador vórtex
- Agitador magnético
- Centrifuga
- Baño termostático
- Espectrofotómetro
- Cubetas resistentes a solventes y ácido (p.ej. Brand 759150)
- Vanilina (CAS 121-33-5, Sigma-Aldrich Co. LLC.)
- Ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) 
- Ácido oleanólico (CAS 508-02-1, TCI)
- Etanol (CH_3CH_2OH)  
- Metanol (CH_3OH)   

2. Protocolo

2.1 Preparación de reactivos

- Reactivo A: Vanilina 10% v/v en etanol (0,5 mL enrasados en matraz aforado de 5 ml).
- Reactivo B: Ácido sulfúrico 72 % v/v en agua (añadir lentamente 36 ml de ácido sobre aprox. 10 ml de agua, se calienta mucho, se deja enfriar, se mezcla con más agua y se enrasa en matraz aforado de 50 ml a temperatura ambiente).

2.2 Extracción

- Se pesa 1 g de harina de altramuz en una botella (25 ml) y se añaden 10 ml de metanol¹. Se sonica 15 min (se calentará un poco, debe mantenerse por debajo de 75 °C) y se deja en agitación (agitador magnético) durante 15 min a temperatura ambiente.
- Se pasa a tubo de centrifuga de 20 ml. La mezcla se centrifuga a 3400 xg durante 10 min.
- El contenido se guarda en tubos de ensayo en el congelador.

2.3 Recta de calibrado

- Se prepara una solución de ácido oleanólico 2000 mg/l: Disolver 50 mg de patrón de ácido oleanólico en 25 mL de etanol enrasado en un matraz aforado. Agitar bien hasta que se disuelva completamente. Separar en tubos tipo Eppendorf y conservar a -20°C.
- Preparar diferentes diluciones de ácido oleanólico 2000 mg/l y etanol, en tubos de 10 ml de cristal transparente. Las diluciones se muestran en la Tabla 1.

¹ Es importante incorporar los 10 ml con precisión, ya que este valor se utilizará a posteriori para calcular el contenido de saponina expresada como porcentaje de ácido oleanólico.

Tabla 1. Preparación de muestras para calibración.

Patrón	Volumen solución ácido oleanólico 2000 mg/l (μ l)	Volumen etanol (μ l)	Conc. Ácido oleanólico (mg/ml)
1	5	95	0.1
2	10	90	0.2
3	15	85	0.3
4	20	80	0.4
5	25	75	0,5
6	30	70	0.6

2.4 Análisis

- En tubos de cristal transparentes de 10 ml se pipetea 25 μ l del extracto (muestra).
- Los 25 μ l del extracto deben ser llevados a sequedad completa para evitar la reacción de esterificación del metanol con el sulfúrico. Se proponen dos procedimientos homólogos para evaporar el extracto: [1] evaporar con corriente de nitrógeno a temperatura ambiente o [2] poner los tubos 2-3 minutos a una estufa a 100°C. El contenido se disuelve con 100 μ l de etanol.
- En relación con la recta patrón, se pipetea 100 μ l de solución de distintas concentraciones (Tabla 1) dentro de los tubos de ensayo.
- En las muestras y patrones se añaden 100 μ l de reactivo A.
- En las muestras y patrones se añade 1ml de reactivo B.
- Los tubos se dejan 10 minutos en un baño en agitación a 60°C y a continuación se dejan enfriar durante 5 minutos en un baño de agua fría. Pasado este tiempo, y antes de proceder a la lectura, se agitan los tubos. Se recomienda preparar la recta de calibrado juntamente con las muestras, cada vez que se pretenda cuantificar.
- Leer absorbancia a 540 nm. Usar cubetas que no sean de PS, deben resistir ácidos y solventes.

2.5 Cálculos

- Cuantificación según recta de calibración (Tabla 1).

Se sustrae el valor del blanco a las muestras y a los patrones. Se representa Abs_{540} vs. Concentración de ácido oleanólico y se calcula la recta de regresión en su parte lineal.

$$\text{Ácido oleanólico (\%)} = [(Abs_{540} - n) / m] \cdot F / (P) \cdot [100/1000]$$

Abs_{540} : es la absorbancia de cada muestra/patrón menos la del blanco a 540 nm.

n: ordenada al origen de la recta de regresión

m: pendiente de la recta de regresión

F: Factor de dilución del extracto. F = 40

P: masa de la muestra en g

100/1000: conversión de (mg/g) a % (g/100 g)