

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 425 946**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/14** (2006.01)

**G01N 30/88** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.06.2006** **E 06780775 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2013** **EP 1896844**

54 Título: **Método para el análisis de procianidina**

30 Prioridad:

**30.06.2005 JP 2005191665**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**18.10.2013**

73 Titular/es:

**SUNTORY HOLDINGS LIMITED**  
**1-40, DOJIMAHAMA 2-CHOME, KITA-KU**  
**OSAKA-SHI, OSAKA 530-8203, JP**

72 Inventor/es:

**FUKUI, YUKO**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 425 946 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Método para el análisis de procianidina

**5 Campo de la invención**

La presente invención se relaciona con un método para cuantificar procianidina y flavan-3-oles contenidos en un producto de té, alimentos y/o bebidas.

**10 Antecedentes de la invención**

En términos de eficacia, se considera que la proantocianidina (OPC) está entre los principios activos relacionados con la "Paradoja Francesa", ya que la OPC está también contenida en los vinos (1995, Clin. Chim. Acta., 235, 207-219). Se sabe que la OPC tiene diversas acciones y efectos, tales como una acción antioxidante, una acción mejoradora de la circulación periférica, un efecto mejorador del flujo sanguíneo y un efecto mejorador de la función hepática (2004, Japan Food Science, 403, edición de Enero, 40-45), así como un efecto inhibidor de la agregación plaquetaria (JP 2003-527418 A).

Las técnicas previamente conocidas para el análisis de la proantocianidina incluyen la HPLC de fase invertida utilizando un cromatógrafo líquido de alto rendimiento-espectrómetro de masas (LC-MS) (2003, Biosci. Biotechnol. Biochem., 67(5), 1140-1142) y la HPLC en fase normal por LC-MS utilizando una elución en gradiente (2003, J. Agric. Food Chem., 51, 7513-7521). También se conocen técnicas para el análisis de la procianidina utilizando una columna de pretratamiento antes de efectuar la HPLC de fase invertida (2004, Analyt. Chim. Acta, 522(1), 105-112; 1999, J. Chromatogr. A, 830(2), 301-309). Sin embargo, en cualquiera de estas técnicas de análisis, la procianidina en forma de mezcla con otros ingredientes de té, alimentos o suplementos ha sido difícil de separar de dichos picos contaminantes; así, estas técnicas no pueden conseguir una cuantificación precisa. Más aún, existe un número muy grande de estereoisómeros para la proantocianidina debido al estereoisomerismo de sus constituyentes, los flavan-3-oles, por lo que ha habido una limitación en cuanto a compuestos disponibles como patrones. Por esta razón, ha sido imposible el análisis cuantitativo, excepto para algunos compuestos conocidos.

**30 Resumen de la invención**

Existe una fuerte demanda en cuanto al desarrollo de un nuevo método de análisis que permita la cuantificación precisa de procianidina (un nombre genérico para una mezcla de n-meros de catequina;  $n \geq 1$ ) y flavan-3-oles en productos de té, alimentos y/o bebidas, que contienen procianidina y flavan-3-oles, sin recibir interferencia alguna por parte de contaminantes. De este modo, la presente invención proporciona un nuevo método para cuantificar procianidina y flavan-3-oles contenidos en productos de té, alimentos y/o bebidas.

**40 Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 muestra las fórmulas estructurales de la procianidina B1 y de la procianidina B3.

La Figura 2 muestra un cromatograma de HPLC de la fracción eluida con EtOH al 70% en la etapa de pretratamiento. Las condiciones de análisis son las siguientes: sistema de HPLC: Shimadzu LC-2010HT (Shimadzu Corporation, Japón); columna: Capcellpak C-18 AQ (6 mm x 150 mm, Shiseido Co., Ltd., Japón); Fase móvil: eluyente A: TFA al 0,05%/agua, eluyente B: TFA al 0,05%/CH<sub>3</sub>CN al 90%/agua; velocidad de flujo: 1,2 ml/minuto; gradiente: 10% B → 10% B (10 minutos) y 10% B → 35% B (10 minutos); temperatura de la columna: 40°C; detección: A225 nm. En estas condiciones, la procianidina B1 eluyó a los 10,7 minutos, la procianidina B3 a los 12,6 minutos, la catequina a los 14,0 minutos, la epicatequina a los 17,6 minutos, la galocatequina a los 6,4 minutos, la epigalocatequina a los 11,1 minutos, el epigalocatequin-3-O-galato a los 18,2 minutos y el galocatequin-3-O-galato a los 19,1 minutos, respectivamente.

**Descripción detallada de la invención**

Como resultado de diversos estudios realizados para alcanzar el objetivo anterior, los inventores de la presente invención han visto que la procianidina y los flavan-3-oles contenidos en productos de té y/o alimentos y bebidas pueden ser cuantificados sin resultar afectados por contaminantes cuando (a) se pretrata una muestra de ensayo con una resina basada en dextrano o basada en polímero vinílico para eliminar los contaminantes (v.g., cafeína) que no pueden ser separados usando resinas adsorbentes hidrofóbicas o similares, y (b) se efectúa una cromatografía líquida de alto rendimiento para separar y cuantificar la procianidina y los flavan-3-oles fraccionados.

Así, la presente invención proporciona un método para cuantificar procianidina y flavan-3-oles contenidos en un producto de té, alimentos y/o bebidas según la reivindicación 1.

Substancias que se han de cuantificar mediante el método de la presente invención

La sustancia que se ha de cuantificar mediante el método de la presente invención puede ser cualquiera entre procianidina (un nombre genérico para una mezcla de n-meros de catequina;  $n \geq 1$ ) y flavan-3-oles. Entre los flavan-3-oles que se han de cuantificar mediante el método de la presente invención, se incluyen, aunque sin limitación, catequina, epicatequina, galocatequina, epigalocatequina, catequin-3-O-galato, epicatequin-3-O-galato, galocatequin-3-O-galato y epigalocatequin-3-O-galato. La procianidina que se ha de cuantificar mediante el método de la presente invención incluye, aunque sin limitación, las procianidinas B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7 y B8. La sustancia que se ha de cuantificar mediante el método de la presente invención puede ser preferiblemente la procianidina B1 (PB1) y/o la procianidina B3 (PB3), y más preferiblemente la PB1.

Muestras de ensayo

La muestra de ensayo que se ha de analizar mediante el método de la presente invención puede ser cualquier muestra que se espere que contenga procianidina y/o flavan-3-oles seleccionada entre el grupo consistente en un producto de té, alimentos y/o bebidas (v.g., pepitas de uva, tamarindo, manzana, corteza, hojas de té, cacao y/o productos tratados (v.g., extractos) de los mismos). Una muestra de ensayo preferida que se ha de analizar mediante el método de la presente invención es una bebida de té que contiene procianidina, y más preferiblemente una bebida de té que contiene un extracto de corteza de pino.

Etapas de pretratamiento

En el análisis de la procianidina y de los flavan-3-oles en una muestra de ensayo utilizando cromatografía líquida de alto rendimiento, como contaminantes que alteran el análisis se incluyen metilxantinas (v.g., cafeína, teobromina), fenilpropanoides (v.g., ácido cafeico, ácido cumárico, ácido ferúlico), flavonas, flavonoles y compuestos glicosilados de los mismos.

Cuando se usa un soporte de fase invertida (v.g., C8 o C18) en un intento de separar la procianidina y los flavan-3-oles de estos contaminantes, estas sustancias se adsorben todas sobre la resina y por ello se eluyen al mismo tiempo. Por esta razón es imposible separarlas entre sí o, incluso cuando es posible, requieren un período muy largo de tiempo para su análisis. Después de una serie de estudios sobre las condiciones que permiten la separación de la procianidina y de los flavan-3-oles de estos contaminantes, los inventores de la presente invención han logrado separar la procianidina y los flavan-3-oles de estos contaminantes en una columna de filtración por gel con un eluyente que contiene un solvente orgánico polar. Así, en el método de la presente invención, la separación en columna permite la fraccionación de procianidina y flavan-3-oles con respecto a los contaminantes anteriores cuando se usa como pretratamiento.

Como resinas para columnas disponibles para uso en el pretratamiento, se incluyen resinas basadas en dextrano (v.g., Sephadex LH-20 (Amersham Biosciences)) y resinas de filtración por gel basadas en polímeros vinílicos hidrofílicos (v.g., TOYOPEARL HW40 (Tosoh Corporation, Japón) y TOYOPEARL HW-50 (Tosoh Corporation, Japón)). Estas resinas permiten la fraccionación entre contaminantes y procianidina/flavan-3-oles.

En la etapa de pretratamiento, se eluyen los contaminantes con agua y/o etanol del 0% al 40%, y luego se recogen la procianidina y los flavan-3-oles con etanol al 60% o más. Por ejemplo, después de cargar una muestra de ensayo en una columna, se puede eluir la cafeína como contaminante con etanol del 0% al 20%, mientras que se pueden eluir los fenilpropanoides, las flavonas y los flavonoles con etanol del 20% al 40%, seguido finalmente por la elución de la procianidina y de los flavan-3-oles con etanol del 60% al 80%, para obtener la procianidina y los flavan-3-oles deseados sin que contengan contaminante alguno.

Etapas de separación y cuantificación por cromatografía líquida de alto rendimiento

A continuación, se analiza la solución tratada para eliminar los contaminantes en la etapa de pretratamiento por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) para cuantificar la procianidina y los flavan-3-oles contenidos en ella. La columna usada para el análisis es una columna de fase invertida. Como ejemplos se incluyen, aunque sin limitación, columnas de fase invertida empaquetadas con un material de empaquetamiento de un soporte de gel de sílice que tiene grupos octadecilo químicamente unidos al mismo (ODS), un soporte de gel de sílice que tiene grupos butilo químicamente unidos al mismo (C4), un soporte de gel de sílice que tiene grupos octilo químicamente unidos al mismo (C8), un soporte de gel de sílice que tiene grupos fenilo químicamente unidos al mismo (Ph), un soporte de gel de sílice que tiene cadenas de alquilo C<sub>30</sub> químicamente unidas al mismo (C30), un soporte de polímero sintético que tiene grupos octadecilo unidos al mismo (ODP), un soporte de polímero sintético de fase invertida (v.g., Shodex Rspak serie DE (Showa Denko KK, Japón)) y un soporte de fase invertida funcionalizado con amida (v.g., Ascentis RP-Amide (Sigma-Aldrich Japan KK, Japón)).

La fase móvil usada para el análisis por HPLC puede ser agua y un solvente polar hidrosoluble. Es posible usar etanol, metanol, acetonitrilo, acetona o similares en una razón de mezcla del 0% al 100% con agua. La fase móvil es preferiblemente acidificada para la estabilización de los ingredientes que se han de separar y analizar, y se puede mezclar con un ácido, tal como el ácido trifluoroacético (TFA), el ácido fórmico, el ácido acético, el ácido tricloroacético (TCA) o el ácido perclórico, en una cantidad del 0,001% al 5%, preferiblemente en mezcla con de un 0,05% a un 0,1% de TFA.

Más específicamente, se usa una columna ODS (Capcellpak C-18 AQ (6 mm × 150 mm), Shiseido Co., Ltd., Japón), y se realiza la elución en gradiente a una temperatura de la columna de 40°C utilizando TFA al 0,05%/agua (Eluyente A) y TFA al 0,05%/acetonitrilo al 90%/agua (Eluyente B) a una velocidad de flujo de 1,2 ml/minuto, con un gradiente de 10% B → 10% B (10 minutos) y luego 10% B → 35% B (10 minutos). Se puede realizar la detección midiendo la absorbancia a 225 nm (A225 nm), de tal forma que se pueden cuantificar la procianidina y los flavan-3-oles a partir de las áreas de los picos de estas sustancias individuales. Se pueden usar procianidina B1 (PB1) (Funakoshi Co., Ltd., Japón) y procianidina B3 (PB3; sintetizada según el Ejemplo 4 que se describirá más adelante) como patrones de procianidina. En la Figura 1 se muestran las fórmulas estructurales de la PB1 y de la PB3. En las condiciones antes descritas, PB1 eluye a los 10,7 minutos y PB3 a los 12,6 minutos. Los flavan-3-oles, es decir, la (-)-epicatequina, el 3-O-galato de (-)-epicatequina, la (-)-epigallocatequina, el 3-O-galato de (-)-epigallocatequina, la (+)-catequina, el 3-O-galato de (-)-catequina, la (+)-galocatequina y el 3-O-galato de (-)-galocatequina, fueron comprados a Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japón. La (-)-epicatequina eluyó a los 17,6 minutos, la (-)-epigallocatequina a los 11,1 minutos, el 3-O-galato de (-)-epigallocatequina a los 18,2 minutos, la (+)-catequina a los 14,0 minutos, la (+)-galocatequina a los 6,4 minutos y el 3-O-galato de (-)-galocatequina a los 19,1 minutos. Sin embargo, las condiciones de análisis no se limitan a las antes descritas y es posible usar cualesquiera condiciones que permitan la cuantificación.

En otra realización, el método de la presente invención puede incluir además el análisis por espectrómetro de masas tras la separación por cromatografía líquida de alto rendimiento. A saber, la muestra pretratada puede ser también cuantificada por LC-MS. Se pueden llevar a cabo la separación y la cuantificación por LC-MS usando, por ejemplo, aunque sin limitación, las condiciones mostradas en el Ejemplo 6 que se da más adelante. En ciertos casos, tales como cuando sólo hay que cuantificar dímeros de procianidina por LC-MS, dichos dímeros pueden ser cuantificados a partir de un cromatograma obtenido para el ión a  $m/z$  579 ( $[M+H]^+$ ) por monitorización del ión seleccionado (SIM). Cuando la cantidad de procianidina contenida en una muestra es muy pequeña (1 ppm o menos), la cuantificación por LC-MS será un medio de análisis efectivo.

El método de la presente invención permite la separación de la procianidina y de los flavan-3-oles de los otros contaminantes contenidos en productos de té, alimentos y/o bebidas que contienen procianidina, consiguiendo así la separación y la cuantificación de la procianidina y de los flavan-3-oles contenidos en dichos productos de té y similares. De este modo, el método de la presente invención es adecuado como método de análisis de procianidina y flavan-3-oles en productos de té, alimentos y/o bebidas, sin provocar su descomposición.

Se describirá ahora la presente invención con más detalle por medio de los siguientes ejemplos, con los que no se pretende limitar el alcance de la invención.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

Estudio de las condiciones de pretratamiento

Se cargó una columna que contenía Sephadex LH-20 (peso seco: 0,25 g; Amersham Biosciences) hinchado con agua con 5 ml de una solución acuosa que contenía proantocianidina B1 (PB1) y cafeína (20 ppm de cada), se lavó con 2 ml de agua y se eluyó después secuencialmente con EtOH al 20%, 40%, 60% y 80% (2 ml de cada). Después de concentrar a presión reducida, se introdujo cada fracción eluida en un matraz medidor de 2 ml y se sometió a HPLC (véase el Ejemplo 3 para las condiciones de análisis) para cuantificar la cafeína y la PB1.

Tabla 1

Eluyente	% Recuperación de cafeína	% Recuperación de PB1
H <sub>2</sub> O (no adsorbida)	74%	0%
H <sub>2</sub> O (lavada)	23%	0%
EtOH al 20%	2,5%	0%
EtOH al 40%	0%	0%
EtOH al 60%	0%	49%
EtOH al 80%	0%	27%

Este resultado indicaba que la cafeína eluía substancialmente con el H<sub>2</sub>O, mientras que la PB1 eluía con EtOH al 60% o más. Esto significa que la cafeína y la PB1 pueden separarse una de otra.

### Ejemplo 2

5

Pretratamiento de producto de té en Sephadex LH-20

10

Se cargó una columna que contenía Sephadex LH-20 (peso seco: 0,25 g; Amersham Biosciences) hinchado con agua con 5 ml de un producto de té que contenía flavangenol (procianidina derivada de corteza de pino), se lavó con 2 ml de agua y se eluyó luego secuencialmente con EtOH al 35% (2 ml) y EtOH al 70% (4 ml). Se concentró la fracción eluida con EtOH al 70% a presión reducida y se introdujo después en un matraz medidor de 2 ml. Se sometió cada fracción eluida a HPLC (véase el Ejemplo 3 para las condiciones de análisis) para cuantificar la cafeína y la PB1. Se calculó la concentración en base al volumen inicial (5 ml).

15

Tabla 2

Eluyente	Concentración de cafeína	Concentración de PB1
H <sub>2</sub> O (no adsorbida)	100 ppm	0 ppm
H <sub>2</sub> O (lavada)	9 ppm	0 ppm
EtOH al 35%	0,2 ppm	0,08 ppm
EtOH al 70%	0 ppm	2,7 ppm

20

Se eluyó la cafeína casi por completo por lavado con agua. A continuación, se eluyeron los fenilpropanoides y los flavonoles con EtOH al 35% y se eluyeron la procianidina y el flavan-3-ol deseados con EtOH al 70%.

Habría que hacer notar que es también posible usar un producto de té que haya sido recogido en un volumen de 5 ml, liofilizado y luego reconstituido con 5 ml de agua antes de su uso.

### Ejemplo 3

25

Separación por HPLC de procianidina y flavan-3-oles

30

Se analizó la fracción tratada en Sephadex LH-20 y eluida con agua, EtOH al 35% o EtOH al 70%, así como la solución de muestra pretratada para eliminar contaminantes tales como la cafeína por HPLC en las siguientes condiciones.

35

Condiciones de análisis: Se usó Capcellpak C-18 AQ (6 mm × 150 mm, Shiseido Co., Ltd., Japón) como columna y se realizó una elución en gradiente utilizando TFA al 0,05%/agua (Eluyente A) y TFA al 0,05%/CH<sub>3</sub>CN al 90%/agua (Eluyente B) a una velocidad de flujo de 1,2 ml/minuto con un gradiente de 10% B → 10% B (10 minutos) y luego 10% B → 35% B (10 minutos). Se fijó la temperatura de la columna a 40°C y la detección y la cuantificación se basaron en mediciones de A225 nm y su área de pico. La HPLC utilizada fue Shimadzu LC-2010HT (Shimadzu Corporation, Japón).

40

En estas condiciones, la procianidina B1 eluyó a los 10,7 minutos, la procianidina B3 a los 12,6 minutos, la catequina a los 14,0 minutos, la epicatequina a los 17,6 minutos, la galocatequina a los 6,4 minutos, la epigalocatequina a los 11,1 minutos, el 3-O-galato de epigalocatequina a los 18,2 minutos y el 3-O-galato de galocatequina a los 19,1 minutos. Este resultado mostraba una buena separación de estas sustancias (Figura 2).

### Ejemplo 4

45

Síntesis de procianidina B3

50

Se sintetizó procianidina B3 como sigue, según el artículo (J. C. S. Perkin I, 1981, Jacobus J. Botha *et al.*, 1235-1245).

Se disolvió (+)-taxifolina (500 mg) en etanol (50 ml), seguido de adición de NaBH<sub>4</sub> (200 mg). Después de añadir y de disolver (+)-catequina (1 g), se mezcló la mezcla resultante con HCl y se agitó durante 1 hora. Se purificó el producto de reacción por HPLC de fase invertida, para obtener procianidina B3 (200 mg).

**Ejemplo 5**

Estudio de resinas para uso en pretratamiento

- 5 Se cargó una columna que contenía TOYOPEARL HW-40 (1 ml, Tosoh Corporation, Japón) equilibrada con agua con 2 ml de una solución acuosa que contenía procianidina B1 (PB1) y cafeína (20 ppm de cada), se lavó con 2 ml de agua y se eluyó después secuencialmente con EtOH al 35% (2 ml) y EtOH al 70% (4 ml). Se sometió cada fracción eluida a HPLC para cuantificar la cafeína y la PB1.

10 Tabla 3

Eluyente	% Recuperación de cafeína	% Recuperación de PB1
H <sub>2</sub> O (no adsorbida y lavada)	97,3%	0%
EtOH al 35%	2,5%	1,3%
EtOH al 70%	0%	77%

- 15 Este resultado indicaba que la cafeína eluía substancialmente con H<sub>2</sub>O, mientras que la PB1 eluía con EtOH al 70%, como en el caso del Sephadex LH-20. Esto significa que la cafeína y la PB1 pueden separarse la una de la otra. Se consideró, por lo tanto, este método de pretratamiento como un método efectivo con resinas de filtración por gel basadas en dextrano o resinas basadas en polímeros vinílicos hidrofílicos.

**Ejemplo 6**

20 Cuantificación con espectrómetro de masas

Se cuantificó la muestra pretratada por LC-MS en las siguientes condiciones.

- 25 El espectrómetro de masas utilizado era Quattro micro (Micromass, Manchester, UK) y se realizó la medición en modo ESI positivo en las siguientes condiciones:

	Voltaje del cono	35 V
	Energía de colisión	2 eV
30	Voltaje capilar	4.000 V
	Temp. del bloque de suministro	80°C
	Temp. de desolvatación	350°C.

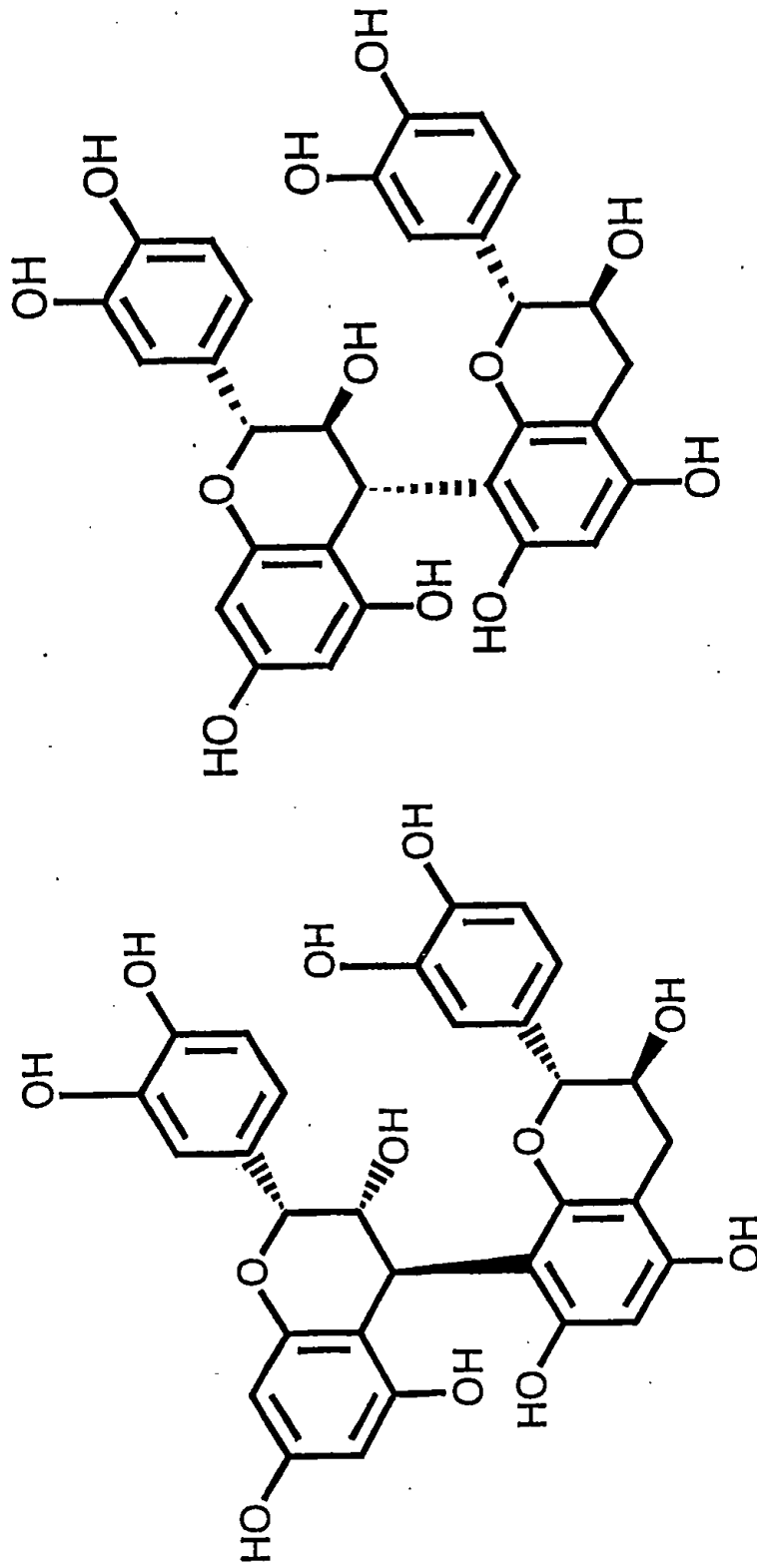
- 35 La HPLC utilizada era Alliance 2795 (Nihon Waters KK, Japón). Las condiciones de HPLC fueron como se muestra a continuación.

35 Columna: Capcell pak C-18 AQ (3 mm  $\phi$   $\times$  15 cm, Shiseido Co., Ltd., Japón)  
 Fase móvil: Eluyente A: HCOOH al 0,1%/agua, Eluyente B: CH<sub>3</sub>CN al 90%/HCOOH al 0,1%/agua, velocidad de flujo 0,2 ml/minuto  
 40 Gradiente: 10% B  $\rightarrow$  35% B (7 minutos)  $\rightarrow$  70% B (3 minutos)

- 45 En estas condiciones, la PB1 eluyó a los 7,3 minutos y la PB3 a los 7,8 minutos. Se llevó a cabo la cuantificación utilizando una curva de calibración preparada para el área cromatográfica a m/z 579 ([M+H]<sup>+</sup>) en monitorización del ión seleccionado (SIM). Cuando la cantidad de procianidina contenida en una muestra es muy pequeña (1 ppm o menos), la cuantificación por LC-MS será un medio de análisis efectivo.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para cuantificar procianidina (un nombre genérico para una mezcla de n-meros de catequina:  $n \geq 1$ ) y flavan-3-oles contenidos en un producto de té, alimentos y/o bebidas, que consiste en las siguientes etapas:
- 10 a) pretratar el producto de té, los alimentos y/o las bebidas usando una columna de una resina basada en dextrano o basada en polímero vinílico para eliminar contaminantes que afectan al análisis de la procianidina y de los flavan-3-oles, donde dichos contaminantes son seleccionados entre metilxantinas, fenilpropanoides, flavonas, flavonoles y compuestos glicosilados de los mismos, y donde la etapa de pretratamiento consiste en equilibrar la columna con agua, cargar la muestra en la columna, eluir los contaminantes con agua y/o etanol del 0% al 40% y recoger luego la procianidina y los flavan-3-oles con etanol al 60% o más; y
- 15 b) efectuar una cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) con una columna de fase invertida para separar y cuantificar la procianidina y los flavan-3-oles en la solución tratada para eliminar los contaminantes durante la etapa de pretratamiento a).
- 20 2. El método según la reivindicación 1, donde los contaminantes son una o más sustancias seleccionadas entre el grupo consistente en cafeína, teobromina, fenilpropanoides, flavonoles y compuestos glicosilados de fenilpropanoides y flavonoles.
3. El método según la reivindicación 1 ó 2, donde el producto de té es una bebida de té que contiene procianidina.
4. El método según la reivindicación 1 ó 2, donde el producto de té es una bebida de té que contiene un extracto de corteza de pino.
- 25 5. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la columna usada en la etapa de pretratamiento es una columna de una resina basada en dextrano.
- 30 6. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la columna de fase invertida es una columna empaquetada con un material de empaquetamiento seleccionado entre el grupo consistente en un soporte de gel de sílice que tiene grupos octadecilo químicamente unidos al mismo (ODS), un soporte de gel de sílice que tiene grupos butilo químicamente unidos al mismo (C4), un soporte de gel de sílice que tiene grupos octilo químicamente unidos al mismo (C8), un soporte de gel de sílice que tiene grupos fenilo químicamente unidos al mismo (Ph), un soporte de gel de sílice que tiene cadenas de alquilo C<sub>30</sub> químicamente unidas al mismo (C30), un soporte de polímero sintético que tiene grupos octadecilo unidos al mismo (ODP), un soporte de polímero sintético de fase invertida y un soporte de fase invertida funcionalizado con amida.
- 35 7. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la fase móvil usada en la etapa b) para la separación por cromatografía líquida de alto rendimiento es acetonitrilo y/o agua, cada uno de los cuales puede contener o no TFA (ácido trifluoroacético).
- 40 8. El método según la reivindicación 7, donde la fase móvil es un gradiente de acetonitrilo y agua, cada uno de los cuales puede contener o no TFA (ácido trifluoroacético).
- 45 9. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la fase móvil usada en la etapa b) para la separación por cromatografía líquida de alto rendimiento consiste en un solvente seleccionado entre el grupo consistente en metanol, etanol, acetonitrilo, acetona y un solvente mixto de éstos.
- 50 10. El método según la reivindicación 9, donde la fase móvil utilizada en la etapa b) para la separación por cromatografía líquida de alto rendimiento incluye además TFA (ácido trifluoroacético), ácido fórmico, ácido acético, TCA (ácido tricloroacético) o ácido perclórico.
- 55 11. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde la procianidina que se ha de cuantificar es procianidina B1 (PB1).
12. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que se combina además con un espectrómetro de masas con objeto de cuantificar sólo dímeros de procianidina.



procianidina B3  
(PB3)

procianidina B1  
(PB1)

Figura 1



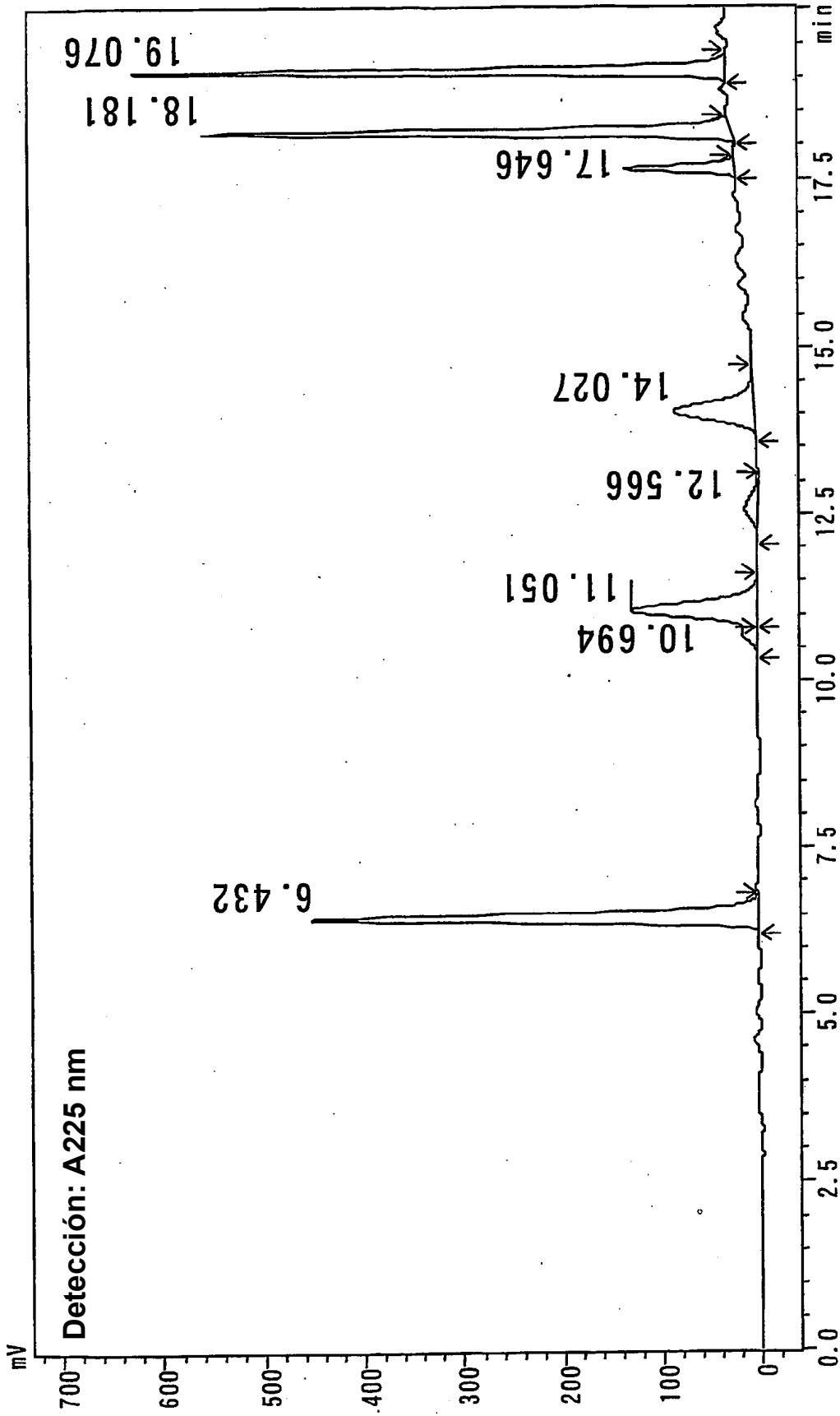


Figura 2