

CARACTERIZACIÓN DE ESTEROLES EN LA FRACCIÓN LIPÍDICA DE LA MACA (*Lepidium meyenii* Walp.) MEDIANTE TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

José E. Gutiérrez Parvina¹, Katyusca Montaña Fuentes¹, Julio C. Bracho Pérez^{2*}
Carmen Rodríguez Best², Artemio Chang Canales¹

RESUMEN

Los resultados de este trabajo de investigación han demostrado que la utilización conjunta de varias técnicas cromatográficas como: cromatografía en capa fina, cromatografía en columna, cromatografía en capa fina preparativa y cromatografía líquida de alta resolución, permiten simplificar la complejidad química de los diversos componentes presentes en muestras de maca; lográndose la detección de esteroides en la fracción lipídica de la maca, así como la identificación y cuantificación del β -sitosterol. Las cantidades de muestra apropiadas para la extracción de esteroides han sido 5g de harina de maca seca (HMS) y 8g de tableta de maca (TM), obteniéndose 0,18 mg y 0,22 mg de β -sitosterol por gramo de muestra, respectivamente. La detección fue rápida y precisa a un tiempo de retención de 6,90 min.

Palabras clave: Maca, *Lepidium meyenii* Walp, esteroides, HPLC.

CHARACTERIZATION OF STEROLS IN LIPIDIC FRACTION OF MACA (*Lepidium meyenii* Walp.) THROUGH CHROMATOGRAPHIC TECHNIQUES

ABSTRACT

The results of this investigation work have demonstrated that the combined use of several chromatographic techniques like: thin-layer chromatography, column chromatography, preparative thin-layer chromatography and liquid chromatography of high resolution, allows to simplify the chemical complexity of the diverse components present in maca samples; being achieved the detection of sterols in the lipidic fraction of maca, as well as the identification and quantification of the β -sitosterol. The appropriate quantities of sample for the sterols extraction have been 5g of dry flour of maca (HMS) and 8g of pill of maca (TM), obtaining 0,18 mg and 0,22 mg of β -sitosterol by gram of sample, respectively. The detection was quick and precise at the same time of retention of 6,90 min.

Key words: Maca, *Lepidium meyenii* Walp, sterols, HPLC.

INTRODUCCIÓN

La maca, (*Lepidium meyenii* Walp.), es una de las especies altoandinas más promisorias del Perú que por sus propiedades nutricionales y farmacológicas es reconocida en diversas partes del mundo. Sin embargo, la caracterización de sus metabolitos secundarios, así como el establecimiento de su marcador químico, continúan siendo en la actualidad una necesidad para su identidad, control de calidad y estandarización tanto en forma de materia prima como en sus formas farmacéuticas terminadas.

¹ Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional San Luis Gonzaga.

² Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Agraria La Molina.

* Autor para la correspondencia, Email: jbracho@lamolina.edu.pe

La determinación de glucosinolatos y alcaloides bencílicos para la caracterización química de la maca se perfilaban como posibles marcadores químicos de este producto natural. No obstante, la elevada variabilidad del contenido de glucosinolatos y el bajo contenido de alcaloides limitan su empleo para tal fin^{1,2}.

Por otra parte, el empleo tradicional de la maca para potenciar las funciones reproductivas y sexuales podría estar relacionado con la presencia de esteroides y ácidos grasos en su fracción lipídica. Estos metabolitos secundarios previamente aislados de fuentes vegetales han demostrado una importante actividad biológica^{3,4,5,6,7}.

Entonces, la búsqueda de posibles marcadores químicos en la fracción lipídica de la maca podría constituir una alternativa a tener en cuenta. En este sentido, el primer estudio de la fracción lipídica de la maca desarrollado por Dini y colaboradores, permitió identificar en la fracción de esteroides un total de cinco constituyentes: brasicasterol (9,1 %), ergosterol (13,6 %), campesterol (27,3 %), $\Delta^{7,2}$ -ergostadienol (45 %), siendo este último esteroide el componente mayoritario⁸. Por todo lo antes mencionado, se realiza este trabajo con el objetivo de aplicar técnicas cromatográficas que permitan caracterizar los esteroides de la fracción lipídica de la maca.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiales

Muestras

La maca seca (**MS**) procedente de la provincia de Carhuamayo se molió hasta alcanzar la textura de harina (**HMS**) en la molinera Inkanature S.R.L. Posteriormente, se obtuvo una muestra representativa mediante la técnica de cuarteo. Las tabletas de maca (**TM**) de 500 mg fueron suministradas por el Laboratorio Hersil S.A.

Insumos

Los estándares utilizados fueron β -sitosterol 95% (Sigma S1270, LOT 090k3852) y β -sitosterol 40% (Aldrich S3402 01308BI MO, 50,6 % β -Sitosterol, 21% campesterol, 13% deshidrobrasicasterol y estigmasterol). Los disolventes orgánicos utilizados en este estudio fueron de calidad analítica: hexano, CH_2Cl_2 , AcOEt y MeOH. Además, acetonitrilo y metanol de grado HPLC.

Materiales y equipos

- Sílicagel 60 (50 – 200 μm) (Carlo Erba).
- Membrana Millipore de 0,22 μm
- Membrana Millipore de 0,45 μm .
- Cromatoplasmas de sílicagel preparativa 60 F₂₅₄ 0,25 mm (Merck).
- Cromatoplasmas de sílicagel 60 F₂₅₄ 0,1 mm (Merck).
- Jeringas de vidrio (20 mL).
- Jeringas graduadas de 10 y 50 μL .
- Cromatógrafo HPLC LaChrom con bomba cuaternaria L-7100, módulo de interfase D-7000, horno L-7300, autosampler L-7200, detector L-7450 con arreglo de diodo y Software D-2000.
- Ultrasonido BRANSON 8510.
- Balanza Analítica Metler Toledo AB 204.
- Rotoevaporador Büchi B-461.

Metodología

Preparación del extracto

La muestra de HMS (1kg) fue sometida a extracción con los disolventes: CH_2Cl_2 , AcOEt y disolución acuosa de metanol al 70% en forma sucesiva, utilizando ultrasonido. En un frasco ámbar (4L) fue adicionado el CH_2Cl_2 (1200 mL), luego se agitó y decantó. Posteriormente, se introdujo el frasco en un baño de ultrasonido a una temperatura de $40 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 16 h. El extracto obtenido fue filtrado al vacío con embudo Büchner y papel filtro Watman N° 40. Luego fue llevado a sequedad con el empleo de un rotoevaporador a $35-45^\circ\text{C}$. Los procesos de extracción y concentración fueron realizados por triplicado.

Identificación de esteroides por CCF

Placas cromatográficas

Las cromatoplasmas fueron activadas a temperatura de 120°C durante 30 min y la cámara cromatográfica fue saturada durante media hora.

Estándar y muestra

El estándar de β -sitosterol en diclorometano fue preparado a una concentración de 0,58 mg/mL. Los residuos sólidos obtenidos de las muestras al finalizar las extracciones fueron redisoluertos en sus respectivos disolventes de extracción considerando la relación masa de residuo sólido (g):volumen de disolvente (mL) igual a 1:5. Finalmente, 1 mL de cada extracto fue diluido a 10 mL.

Análisis cromatográfico

50 μL de cada una de las muestras y 20 μL del estándar fueron sembrados y luego eluidos con CH_2Cl_2 -MeOH (9:1), CH_2Cl_2 -AcOEt (8:1), CH_2Cl_2 -AcOEt (9:1), hexano-AcOEt (4:1) y hexano- CH_2Cl_2 (3:2).

Las cromatoplasmas desarrolladas fueron rociadas con 10 mL de los reveladores químicos: vainillina- H_2SO_4 (A), anisaldehído- H_2SO_4 (B) y el reactivo de Lieberman-Bouchard y sometidas a calentamiento a una temperatura de 110°C durante 10 min, después de lo cual fueron calculados los valores de R_f para el estándar y las manchas presentes en la muestra que adquirieron una coloración violeta-morado propia de esteroides.

Aislamiento de esteroides

Separación por cromatografía en columna

- Columna cromatográfica

La columna fue preparada utilizando una relación muestra (g) – fase estacionaria (mL) 1:8; para lo cual la silicagel fue mezclada con hexano y la columna empacada haciendo pasar pequeños volúmenes de hexano. Posteriormente, 8g de extracto (obtenido con CH_2Cl_2 a partir de HMS por ultrasonido) fueron colocados en la columna y conectados herméticamente a un balón de aire con manómetro incorporado, quedando listo el sistema cromatográfico para el proceso de separación.

- Fase móvil

Hexano(160 mL), 50% CH_2Cl_2 en hexano(120 mL), CH_2Cl_2 (260), 10% AcOEt en CH_2Cl_2 (120 mL), 20% AcOEt en CH_2Cl_2 (100 mL), 30% AcOEt en CH_2Cl_2 (120 mL), 40% AcOEt en CH_2Cl_2 (100 mL), 50 a 90% con incremento en 10% de AcOEt en CH_2Cl_2 (5x200 mL), AcOEt(600 mL), 10 a 40% con incremento de 10 % de MeOH en AcOEt (4x300 mL) y MeOH (100 mL).

- Separación cromatográfica

La elución del extracto fue realizada aplicando las diferentes fases móviles en orden creciente de polaridad, a una presión de aire de 2,5 bar, recolectándose fracciones de 40 – 60 mL a una velocidad de flujo de 1-2 mL/min.

Purificación por CCF

Las fracciones recolectadas en la cromatografía en columna fueron agrupadas de acuerdo al análisis por CCF, concentradas en el rotoevaporador y pesadas, obteniéndose 7 fracciones. El proceso de purificación mediante CCF a escala preparativa (CCF-P) sólo fue aplicado a las fracciones con mayor presencia de esteroides. Las cromatoplasmas fueron raspadas y los sólidos resultantes fueron extraídos con 30 mL de CH_2Cl_2 , luego los extractos fueron filtrados con membrana Millipore, llevados a sequedad en el rotoevaporador y colocados en el desecador durante 48 h. Los esteroides purificados fueron identificados por HPLC.

Determinación de esteroides por HPLC

Condiciones cromatográficas

La separación fue desarrollada a una temperatura de 50 °C con una columna Lichrocart RP-8 250 x 4 mm, d.i. 5 μm , volumen de muestra inyectada 10 μL y lectura a 205 nm. La fase móvil utilizada consistió en el eluyente A: acetonitrilo-metanol (99:1) y el eluyente B: H_2O , los que fueron filtrados con membrana Millipore 0,22 μm con un flujo de 1,0 mL/min. El programa de gradiente empleado fue: 0,0 min 100% A, 10 min 99% A y 1% B, 15 min 90% A y 10% B, 16 min 100% A y 20 min 100% A¹⁰.

Determinación de la linealidad y sensibilidad

Los estándares de β - sitosterol 95% y β - sitosterol 40% fueron empleados para realizar tres curvas de calibración, luego fueron diluidos y filtrados con membrana Millipore 0,45 μm . El límite de detección fue determinado a la máxima sensibilidad.

- 1ª Curva de calibración con estándar β - sitosterol 95 %

A partir de una disolución stock de 0,26 mg/mL del estándar fueron preparadas siete diluciones en diclorometano, obteniéndose concentraciones en el rango de 0,5 a 30 $\mu\text{g/mL}$.

- 2ª Curva de calibración con estándar β - sitosterol 95 %

A partir de una disolución stock de 0,244 mg/mL fueron preparadas cinco diluciones en eluyente A, obteniéndose una concentración en el rango de 2 a 232 $\mu\text{g/mL}$.

- 3ª Curva de calibración con estándar β - sitosterol 40 %

A partir del estándar fueron preparadas tres diluciones en eluyente A, obteniéndose concentraciones en el rango de 130 a 200 $\mu\text{g/mL}$.

Preparación de la muestras de HMS y TM

Procedimiento general

Tres pesos de HMS (2g, 5g y 8g) fueron utilizados para seleccionar el peso equivalente adecuado para las muestras de TM. En ambas muestras la fracción lipídica que contiene los esteroides fue extraída con diclorometano por ultrasonido, purificados en microcolumnas con sílicagel, filtradas con membrana Millipore 0,45 μm y colocadas en viales de 2 mL para su análisis por HPLC.

- Extracción con diclorometano

La cantidad de muestra correspondiente fue extraída con diclorometano y colocada en un baño de ultrasonido a una temperatura de 40 ± 1 °C durante 50 min. Los extractos fueron vertidos en tubos de 50 mL y llevados a centrifugación durante 15 min a 3000 rpm. El líquido sobrenadante fue separado y el residuo sólido fue extraído dos veces bajo las mismas condiciones. Los extractos obtenidos fueron mezclados y purificados mediante microcolumnas de sílicagel.

- Purificación en microcolumna de sílicagel

Las microcolumnas de sílicagel fueron preparadas en jeringas de vidrio de 20 mL de capacidad, donde fueron compactados 3 g de sílicagel y acondicionados haciendo pasar 10 mL de diclorometano 2 veces. Posteriormente, alícuotas de 10 mL de los extractos fueron transferidos para ser eluidos (a presión de émbolo) y recolectados

Muestra HMS

La extracción fue realizada dos veces, empleando 15 mL de diclorometano para cada uno de los 2g de muestra pesados por triplicado. Los extractos fueron mezclados y enrasados con diclorometano a 100 mL. La muestra fue inyectada en el equipo HPLC y analizada empleando la primera curva de calibración, después fueron pesadas una muestra de 5g y tres de 8g extrayéndose en 30 mL de diclorometano, dos veces la muestra de 5g y tres veces la de 8g. Los extractos fueron mezclados y purificados con sílicagel de acuerdo al procedimiento anterior. Finalmente, todos los extractos fueron concentrados en corriente de aire y llevados a un volumen final de 10 mL con eluyente A. Las muestras de 5g y 8g fueron inyectadas en el HPLC y analizadas con la segunda y tercera curvas de calibración, respectivamente.

Muestra TM

Para obtener un polvo fino, 20 tabletas de maca fueron pulverizadas. Después, 8g de este polvo fueron pesados y mezclados con 30 mL de diclorometano para la extracción por dos veces. Los extractos fueron mezclados y purificados en forma similar a la muestra de HMS de 5g. El extracto purificado fue concentrado en corriente de aire, redisoluto a 10 mL con eluyente A y analizado por HPLC utilizando la 2^{da} y 3^{ra} curva de calibración.

Análisis de datos

Los valores de desviación estándar relativa (DSR) y los coeficientes de correlación lineal (r^2) fueron calculados empleo del software del equipo HPLC.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Preparación del extracto

Las extracciones realizadas a la muestra de HMS aplicando disolventes en gradiente creciente de polaridad y secado posterior, ha permitido obtener los siguientes porcentajes de extracto seco: 2,18 % con CH_2Cl_2 , 0,58 % con AcOEt y 11,59 % con MeOH 70 %. Tales resultados muestran que el mayor porcentaje de extracción fue obtenido con metanol al 70 %, es decir que la HMS posee una mayor proporción de componentes polares, mientras que los componentes de baja polaridad están presentes en el extracto de diclorometano y acetato de etilo. Dini y colaboradores reportaron 2,2 % de extracto CH_2Cl_2 que según sus estudios corresponden a la fracción lipídica donde se encuentran los esteroides⁸.

Identificación de esteroides por CCF

La identificación de los esteroides fue realizada en el cromatograma comparando las manchas de color morado-violáceo obtenidas después del revelado tanto en el estándar β -Sitosterol 40%, como en los extractos de diclorometano y de acetato de etilo de la muestra. La aplicación de los cuatro sistemas de eluyentes para el desarrollo de la CCF, permitió establecer el perfil cromatográfico característico utilizado posteriormente como criterio cualitativo para la identificación de los esteroides (figura 1).

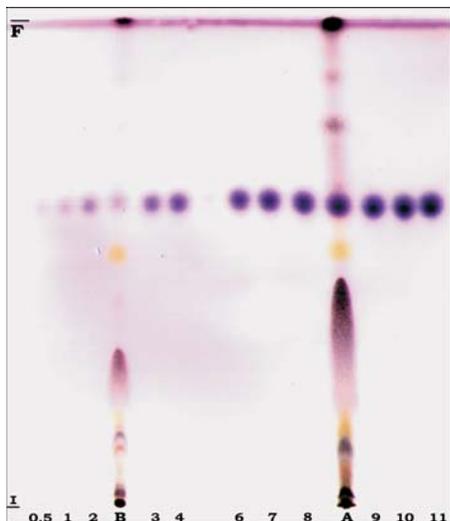


Figura 1. Detección de esteroides mediante CCF en extractos de diclorometano (A) y acetato de etilo (B), en presencia de estándar de β -sitosterol 40%.

Los valores R_f del estándar de β -sitosterol calculados para diferentes concentraciones (0,50-11 μ L) y los extractos de diclorometano y acetato de etilo de HMS fueron iguales, obteniéndose el valor de $R_f = 0,61$. Esta semejanza cualitativa ha permitido identificar la presencia de esteroides en la fracción lipídica de diclorometano y acetato de etilo. Debido al color característico e intensidad del color de las manchas correspondientes los esteroides ha sido posible discriminar los esteroides de otros componentes e inclusive esteroides procedentes de diferentes extractos.

Aislamiento de esteroides

Cromatografía en columna

Para simplificar la complejidad de la fracción lipídica de la muestra HMS fue desarrollada la cromatografía de columna rápida de acuerdo a la metodología establecida por Still y colaboradores¹¹. El desarrollo cromatográfico ha permitido eluir 53 fracciones que fueron analizadas mediante la metodología de CCF establecida con anterioridad en la identificación de esteroides y mezclas de acuerdo a su comportamiento cualitativo frente al revelador químico. Esto es, la presencia de manchas de color violeta-morado intenso y las coincidencias de los R_f con los del estándar β -sitosterol 40 %.

El procesamiento de la muestra permitió simplificar el número de fracciones hasta un total de 7: F 8-13 (N° 1), F 14-15 (N° 2), F 16-18 (N° 3), F 19-29 (N° 4), F 30-39 (N° 5), F 43-49 (N° 6), F 51-73 (N° 7). El análisis cualitativo de las 7 fracciones mediante CCF ha permitido establecer que las más importantes son 3 de ellas: N° 2, N° 5 y N° 6. Las demás no presentaron la coloración propia de los esteroides o como en el caso de la fracción N° 3, donde las manchas correspondientes a esteroides eran débiles.

Purificación por CCFP

Considerando los resultados de la CCF, el proceso de purificación fue aplicado a las fracciones N° 2, N° 5 y N° 6. Este proceso fue realizado dos veces, sembrando cada una de las fracciones en CCF-P y desarrollando la CCF de igual forma que para el proceso de identificación. No

obstante, que la identificación de las tres fracciones fue realizada, la fracción N° 5 presentó una nueva mancha de color violeta-morado, cuyo valor de R_f no coincidió con el del estándar, mientras que las fracciones N° 2 y N° 6 presentaron valores de R_f coincidentes con los del estándar.

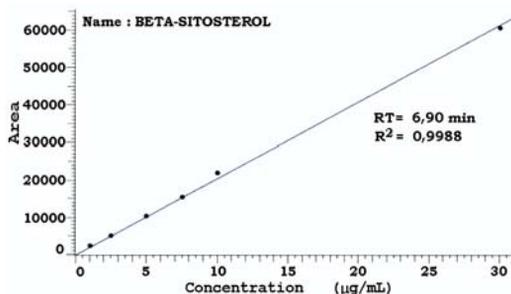
Una vez desarrollada la CCF-P de las tres fracciones y ubicadas las zonas correspondientes a las manchas de esteroides de acuerdo a los valores de R_f se obtuvieron 3 sólidos de color blanco con pesos de: 110 mg (N° 2), 85 mg (N° 5) y 72 mg (N° 6) que contenían los esteroides. Los sólidos correspondientes a las fracciones N° 2 y N° 6 fueron analizados por HPLC y el de la fracción N° 5 fue colocado en un frasco de color ámbar, herméticamente cerrado y a temperatura de refrigeración para su análisis posterior mediante cromatografía gaseosa-espectrómetro de masas (CG-EM).

Determinación de esteroides por HPLC

La metodología descrita en el presente trabajo está basada en el método desarrollado por Dini y cols. que permite el análisis directo del β -sitosterol en los extractos de muestras de maca. Para la adecuación de la metodología se determinaron la linealidad y sensibilidad.

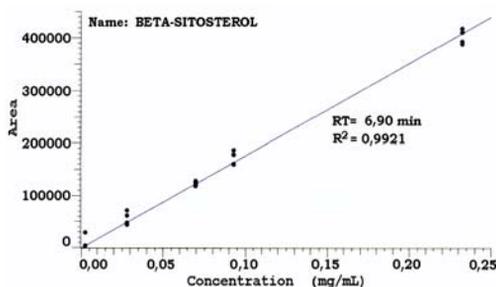
Determinación de linealidad y sensibilidad

Se prepararon disoluciones de los estándares de β -sitosterol 95 % y β -sitosterol 40 % a diferentes rangos de concentración, se inyectaron en el HPLC y se correlacionaron las áreas determinadas contra las concentraciones empleadas. Las dos curvas de calibración del estándar de β -sitosterol 95 % presentan un comportamiento lineal en el rango de concentraciones de 1.0 – 231.8 $\mu\text{g/mL}$ con DSR menores de 3,6 %, valores de r^2 igual a 0,9988 y 0,9921 para la 1^{ra} y 2^{da} curva de calibración, respectivamente (figuras 2 y 3).



Puntos	($\mu\text{g/mL}$)	Área	Puntos	($\mu\text{g/mL}$)	Área
1	0,494	No detectado	5	7410	15567
2	0,988	2489	6	9880	21972
3	2,470	5161	7	29640	60774
4	4,940	10441			
r^2 (6 puntos)				0,9988	
TR				6,90 min (0,0 % RSD)	

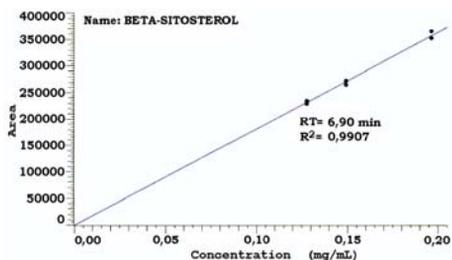
Figura 2. Curva de calibración con estándar de β -sitosterol 95% (0,5 a 30 $\mu\text{g/mL}$).



Puntos	(µg/mL)	Primera Medición			Segunda Medición		
		Nº	Promedio Área	% RSD	Nº	Promedio Área	% RSD
1	002.318	2	4572.0	8,011	1	30014	-
2	027.816	2	46675.0	4,917	2	67074	10,88
3	069.540	2	120056.5	2,161	2	126920	1,13
4	092.720	2	159417.5	0,168	2	182021	3,54
5	231.800	2	390998.0	0,910	2	414588	1,33
r ² (19 puntos)					0.9921		
TR					6.90 min (0.15 % RSD)		

Figura 3. Curva de calibración con estándar de β-sitosterol 95% (2 a 232 µg/mL)

La 3^{ra} curva de calibración con el empleo del estándar de β-sitosterol 40% también presentó un comportamiento lineal con un valor de $r^2 = 0,9907$ en el rango de concentración de 130 a 200 µg/mL y un valor de DSR igual a 0,18%.



Puntos	(µg/mL)	Medición		
		Nº mediciones	Promedio Área	% DSR
1	131,56	2	231780	1.452
2	153,82	2	268570	2.069
3	200,24	2	358170	2.681
r ²		0.9907		
TR		6.91 min (0.18 % DSR)		

Figura 4. Curva de calibración con estándar de β-sitosterol 40% (130 a 200 µg/mL).

Los resultados obtenidos muestran que la linealidad del método es adecuada para los rangos de concentración evaluados, siendo la segunda curva de calibración para el β -sitosterol 95 % la de mayor precisión al presentar el valor de DSR más bajo (0,15 %). El pico correspondiente al β -sitosterol fue detectado a un tiempo de retención TR = 6.90 min para todas las corridas en el desarrollo de la segunda curva de calibración. En la figura 5 se muestra el tiempo de retención y la forma del pico del estándar de β -Sitosterol en todos los perfiles cromatográficos. Se hace evidente, que bajo las condiciones experimentales empleadas se obtiene una buena resolución cromatográfica en un tiempo razonablemente corto.

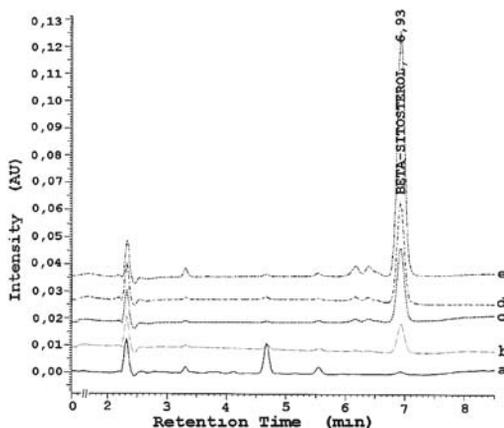


Figura 5. Perfiles cromatográficos para el estándar de β -sitosterol 95 % (2 a 232 $\mu\text{g/mL}$).

La IUPAC define la sensibilidad de un método analítico como su capacidad de diferenciar dos cantidades o dos concentraciones de analito muy parecidas. Algunas veces se asocia la sensibilidad de un método a su capacidad de medir concentraciones muy bajas y se recurre al límite de detección como una estimación de la misma. De lo expuesto resulta que cuanto mayor sea la sensibilidad de un método menor será su límite de detección. En este sentido, el límite de detección obtenido fue de 1 $\mu\text{g/mL}$ ^{12,13}.

Cuantificación de esteroides en muestras de maca

Durante la extracción de esteroides en las muestras, la sílicagel actúa reteniendo los componentes más polares (pigmentos oscuros) del extracto y los menos polares como los esteroides son débilmente retenidos, por tal razón son eluidos con facilidad al emplear el diclorometano.

La evaluación de la precisión del método de extracción para las 3 cantidades de muestras (2 g, 5 g, 8 g), como se observa en la tabla 1 muestra que tomando 2 g de muestra la extracción se realiza con precisión (< 6% DSR), pero el sistema cromatográfico responde con valores mayores a 2% DSR área. Para 5 g tanto la extracción como el sistema cromatográfico responden con precisión < 2% DSR. Sin embargo, para 8 g la extracción se hace menos precisa por lo que se necesita realizar un mayor número de extracciones (triplicado). El sistema cromatográfico responde con mayor precisión < 2% DSR de área. Finalmente, se establece que con 5 g de muestra se obtienen mejor rendimiento en la extracción y exactitud en el proceso de cuantificación mediante HPLC.

Tabla 1. Resultado de la determinación del β -sitosterol en 2g, 5g y 8g de HMS.

PARÁMETROS	PROCESADO			PROCESADO				PROCESADO			
	1 ^{ra} curva Estándar 95 %			2 ^{da} curva Estándar 95 %				3 ^{ra} curva Estándar 40%			
Cantidad Muestra	2 g			5 g		8 g		5 g		8 g	
N° extracciones	(2)			(2)	(2)	(3)	(3)	(2)	(2)	(3)	(3)
N° de muestra M	M - I	M - II	M - III	M - I	M - I	M - I	M - II	M - I	M - I	M - I	M - II
N° de medidas	3	3	3	3	2	3	3	3	2	3	3
Promedio Área	7459	7192	7095	158878	182931	250944	219532	158227	182310	250453	219140
% DSR Área	8,051	2,305	7,505	0,315	0,942	1,695	1,082	0,506	0,939	0,656	1,248
mg β -sitosterol/100gM	17,49 (2,599% DSR)			17,99	12,88	16,55 (9,73%DSR)		17,93	12,85	16,54 (9,72%DSR)	
TR	6,89 min (0,220 % DSR)			6,91 min	(0,09 % DSR)			6,91 min (0,09 % DSR)			
Criterio de Aceptación del método Extracción	< 6% DSR para productos naturales										

También se aprecia que los resultados utilizando los dos estándares no muestran diferencias significativas respecto a la recuperación del β -sitosterol por lo que el estándar al 40 % se puede emplear con la ventaja de cuantificar simultáneamente β -sitosterol, campesterol y dehidrobrasicasterol. Para la muestra TM el empleo de 8 g permite alcanzar una precisión en la extracción de 5,7 % DSR con un criterio máximo de aceptación < 6 %, mientras que el sistema cromatográfico alcanza un % DSR área < 2, lo que corresponde a una aceptable reproducibilidad (tabla 2).

Tabla 2. Resultado de la determinación del β -sitosterol en tabletas de maca de 500 mg utilizando estándar 95 % y 40 %.

8g de maca tabletas (promedio por tableta. 0,84903 g)				
PARÁMETROS	PROCESADO		PROCESADO	
	2 ^{da} curva Estándar 95 %		3 ^{ra} curva St.49%	
N° muestra M	M-1	M-2	M-1	M-2
N° de medidas	03	03	03	03
Promedio área	192257	177837	191427	176987
% DSR Área	0,44	1,02	0,450	1,04
Resultado mg	0,1111		0,1108	
β -Sitosterol /tableta	(5,707 % DSR)		(5,740 % DSR)	
TR	6,91 min (0,087 % RSD)			
Aceptación DSR área	< 2% (USP 25 ¹³)			
Aceptación extracción	< 6% DSR para productos naturales			

Finalmente, la determinación de esteroides en muestras de HMS y TM permitió identificar y cuantificar la presencia de β -sitosterol. Los resultados obtenidos fueron 0,18 mg/g de HM y 0,22 mg/g de TM, utilizando el estándar de β -sitosterol 40 % (figura 6).

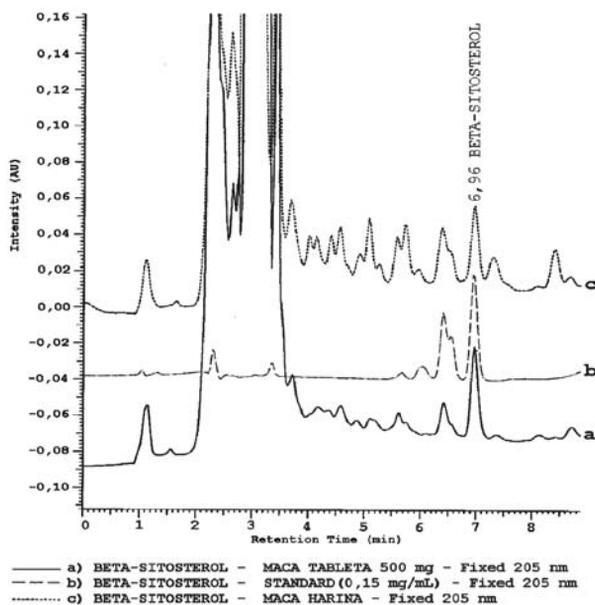


Figura 6. Perfiles cromatográficos de HPLC de la muestra HM (a), TM (c) y estándar β -sitosterol 40 % (b). TR = 6,96 min y detector UV a $\lambda = 205$ nm.

CONCLUSIONES

- El análisis del extracto de diclorometano mediante CCF, el empleo del estándar de β -sitosterol y el revelado químico con vainillina- H_2SO_4 (A), anisaldehído- H_2SO_4 (B) y el reactivo de Lieberman-Bouchard; constituyen un método rápido, sensible y barato para detectar la presencia de esteroides en maca.
- La utilización conjunta de las técnicas de CC y CCF en las condiciones descritas en este trabajo, simplifica la complejidad química de metabolitos secundarios de la maca, permitiendo caracterizar algunos esteroides y facilitando la aplicación de HPLC.
- El método de HPLC empleado para cuantificar β -sitosterol en los extractos de maca es lineal y sensible para los rangos de concentración evaluados (1,0-231,8 $\mu\text{g/mL}$) con un valor adecuado de RSD = 0,15 % y un límite de detección de 1,0 $\mu\text{g/mL}$.
- La cantidad de muestra necesaria para obtener el mejor rendimiento en la extracción de esteroides y exactitud en la determinación de β -sitosterol fue de 5 g.
- La detección de β -sitosterol fue rápida y precisa a un tiempo de retención TR = 6,90 min.
- El contenido de β -sitosterol en HMS y TM fue: 0,18 mg/g y 0,22 mg/g, respectivamente.
- La caracterización estructural de la fracción N° 6 requeriría por su naturaleza la aplicación de una técnica como CG-EM.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo e interés por el desarrollo de este trabajo de investigación a Laboratorios Hersil S.A. y las facilidades de información, asesoría y procesamiento de datos por parte de la ONG “Desarrollo Integral” del Perú.

REFERENCIAS

- 1 Li G., Ammermann U., Quiros C. F. Glucosinolate contents in maca (*Lepidium peruvianum* Chacon) seeds, sprouts, mature plants and several derived commercial products. *Economic Botany* 2001; 55 (2): 255-262.
- 2 Dini I., Tenore G. C., Dini A., Glucosinolates from maca (*Lepidium meyenii*). *Biochemical Systematics and Ecology* 2002; 30: 1087-1090.
- 3 Bouic P. J. D. y cols. Beta-sitosterol and beta-sitosterol glucoside stimulate human peripheral blood lymphocyte proliferation: Implications for their use as immunomodulatory vitamin combination. *Int. J. Immunopharmac.* 1996; 18: 693-700.
- 4 Zheng B. L., He K., Hyungchan C. y cols. Effect of a lipidic extract from *Lepidium meyenii* on sexual behavior in mice and rats. *Urology* 2000; 55 (4): 598-602.
- 5 Cicero F. G., Bandieri E., Arletti R. *Lepidium meyenii* Walp. improves sexual behavior in male rats independently from its action on spontaneous locomotor activity. *J. of Ethnopharmacol.* 2001, 75: 225-229.
- 6 Cicero F. G. y cols. Hexanic Maca extract improves rat sexual performance more effectively than methanolic and chloroformic Maca extracts. *Andrology* 2002; 34: 177-179.
- 7 Marín M., Arroyo J., Bonilla P. Efecto de fracciones lipídicas de *Lepidium meyenii* Walpers «maca», en el aparato reproductor de ratones. *Ciencia e Investigación* 2003; 6 (1): 9-18.
- 8 Dini A., Migliuolo G., Rastrelli L., Saturnino P., Schettino O. Chemical composition of *Lepidium meyenii*. *Food Chem.* 1994; 49: 347-349.
- 9 Wagner H. Bladt S. Plant Drug Analysis a Thin Layer Chromatography Atlas. Appendix A: Spray Reagents. Ed. Springer Verlag Berlin Heidelberg (2^{da} edición), 1996.
- 10 Rodríguez R. J. et al. Application of High-Performance Liquid Chromatographic separation of free sterols to the screening of yeast sterol mutants. *Analytical Biochem.* 1989; 119: 200-204.
- 11 Still, W. C.; Kahn, M.; Mitra, A. Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. *J. Org. Chem.* 1978; 43: 2923-2925
- 12 IUPAC. Compendium of analytical nomenclature, definitive rules 1987. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1997.
- 13 Compañó B. R., Ríos C. A. Garantía de la calidad en los laboratorios analíticos. Editorial Síntesis S. A. Barcelona, pp. 237-240. 2002.
- 14 USP 25. The United States Pharmacopeia USA. Editor United States Pharmacopeia convention 25. 17 ed. Rockville Mack Printing, 2002.