

COMUNICACIÓN CORTA

Determinación de esteroides en el ingrediente activo D-004 por CG-EM

Determination of sterols in D-004 active ingredient by GC-MS.

David Marrero Delange, Eduardo A. Rodríguez Leyes, Víctor González Canavaciolo, Yuliamny Adames Fajardo, Roxana Vicente Murillo.

David Marrero Delange, Víctor L. González Canavaciolo and Roxana Vicente Murillo
Centro de Productos Naturales, Calle 198 entre 19 y 21, Atabey, Playa, Ciudad Habana, Cuba. Correo electrónico: david.marrero@cnic.edu.cu

RESUMEN. El D-004, es un nuevo extracto lipídico obtenido de los frutos de la palma real cubana (*Roystonea regia*), que ha mostrado ser efectivo en modelos experimentales de hiperplasia prostática. Teniendo en cuenta que las fracciones de esteroides usualmente acompañan a los extractos lipídicos en las Fuentes naturales, el objetivo de este trabajo fue estudiar los compuestos esteroides que están presentes como impurezas en el D00-4 ingrediente activo (IA) por CG-EM. Nueve lotes fueron sometidos a saponificación con una disolución de KOH/EtOH y las fracciones insaponificables fueron extraídas con n-hexano. Las muestras fueron analizadas como derivados TMS utilizando MSTFA como reactivo silanizante. La identificación de los esteroides se llevó a cabo por CG-EM. Se encontró que el contenido de esteroides en el D-004 se encontraba entre 0,14 y 1,75 %. Esta fracción está principalmente compuesta por β -sitosterol (58,40 %), estigmasterol (9,52 %) y campesterol (9,23 %). Otras contribuciones importantes fueron las del Δ 5-avenasterol (7,29 %), ciclolaudenol (5,57 %) y cicloartenol (4,09 %). Además, otros esteroides minoritarios fueron detectados, tales como el cicloartanol y el 24-metilen-cicloartanol así como otros compuestos con núcleos esteroides los cuales no pudieron ser identificados debido a sus bajas concentraciones. Los análisis por CG-EM de la fracción insaponificable de D-004 permitieron conocer el contenido total de esteroides (< 1,75 %) y los esteroides principales (β -sitosterol, estigmasterol y campesterol) presentes en este IA.

ABSTRACT. D-004, a new lipid extract obtained from the Cuban royal palm (*Roystonea regia*) fruits, has been shown to be effective in experimental models of prostate hyperplasia. Taking into account that sterols fraction usually accompany the lipid extracts from natural sources, the aim of this work was the study of the sterol compounds that are present as impurities in the D004 active ingredient (AI) by GC-MS. **Material and Methods:** Nine D004 AI batches were submitted to saponification with KOH/EtOH solution and the unsaponifiable fractions were extracted with n-hexane. Samples were analyzed as TMS derivatives using MSTFA as silylating reagent. Identification of sterols was carried out by GC-MS. **Results and Discussion:** It was found that the D004 sterol content ranged from 0.14 to 1.75 %. This fraction is mainly composed of β -sitosterol (58.40 %), stigmasterol (9.52 %) and campesterol (9.23 %). Other important contributions were those of Δ 5-avenasterol (7.29 %), cyclolaudenol (5.57 %) and cycloartenol (4.09 %). Furthermore, other minority sterols were detected, such as cycloartanol and 24-methylene-cycloartanol as well as other compounds with steroid nucleus which could not be accurately identified because of their low concentrations. **Conclusion:** The analyses by GC-MS of the unsaponifiable fraction of D004 allowed knowing the total sterol content (< 1.75 %) and the main sterols (β -sitosterol, stigmasterol and campesterol) present in this AI.

Keywords: D-004; sterols; unsaponifiables, GC-MS, solvent extraction.

Palabras clave: D-004; esteroides; insaponificables, CG-EM, extracción con disolvente.

Los esteroides, compuestos que aparecen en pequeñas proporciones tanto en forma libre como esterificada en las fracciones lipídicas de diversas especies animales y vegetales, han sido ampliamente estudiados por su importancia nutricional y farmacéutica.¹⁻⁴ Los métodos convencionales para el análisis de éstos involucran una etapa de saponificación seguida por una extracción con disolventes orgánicos de la fracción insaponificable, así como otros métodos de separación y purificación por cromatografía en placa delgada y en columna abierta, incluida la extracción en fase sólida.¹⁻⁵

Entre los extractos lipídicos de fuentes vegetales actualmente comercializados que contienen esteroides se encuentra el de *Serenoa repens*, el cual ha mostrado ser efectivo sobre la hiperplasia prostática benigna (HPB).^{2,6,7} El D-004 es una nueva sustancia activa con características lipídicas, obtenida de los frutos de la palma real cubana (*Roystonea regia*), el cual también ha mostrado ser efectivo en modelos experimentales de hiperplasia prostática.^{8,9} Teniendo en cuenta lo señalado anteriormente, el objetivo del presente trabajo fue el estudio de la posible presencia de esteroides en la fracción insaponificable (FI) del D004 por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).

Se utilizaron nueve lotes de D004 IA obtenidos a escala piloto: 190106, 180406, 061206, 111206, 060607, 061207, 020907, 230508 y 300109 (Planta Piloto, Dirección de Biotecnología, CNIC, Cuba). Se emplearon patrones de colesterol > 99 % CG (Fluka, Suiza), campesterol > 98 % CG y estigmasterol > 95 % CG (Sigma, EUA), β -sitosterol > 95 % CG (Koch-Light Lab., Inglaterra). También se utilizaron hexano comercial destilado, cloroformo (CHCl_3), piridina y metanol puros para análisis (Merck, Alemania). Disolución acuosa de NaOH 2 mol/L. Disolución de patrón interno (DPI): colesterol (5,16 mg/mL) en CHCl_3 . Disolución de referencia de esteroides (todos a 1 mg/mL) en CHCl_3 . Disolución de KOH en metanol 2 mol/L, y como reactivo silanzante MSTFA (Sigma, EUA).

Se utilizó un cromatógrafo de gases 6890N acoplado a un detector de masas 5975 B inert (Agilent, EUA) con un sistema de cómputo y una columna capilar HP-5 Ms (30 m x 0,25 mm d.i. y 0,25 μm de espesor de película, Agilent, EUA). El horno se programó desde 100 hasta 220 °C a 30 °C/min, y desde 220 hasta 320 °C (20 min isotérmico) a 8 °C/min. El flujo del gas portador (Helio) fue de 1 mL/min. El inyector, en modo *splitless*, se mantuvo a 320 °C. Las temperaturas de la interfase, la fuente de ionización y el cuadrupolo fueron 300, 230 y 150 °C, respectivamente. La energía de ionización fue de 70 eV. La adquisición se realizó desde 40 hasta 800 m/z. Se inyectó 1 μL por la técnica de *solvent-flush*. Fueron realizados diferentes blancos entre los análisis para descartar posibles contaminaciones del sistema.

Para obtener las FI de D004, se aplicó una variante de la metodología del *Institute for Nutraceutical Advancement* (INA, EUA).⁴ Para ello, se pesaron 5,0 g de D004 en un balón de 250 mL, se adicionó 50 mL de KOH en EtOH (0,5 mol/L) y se mantuvo a reflujo en baño de agua durante 1 h. Se enfrió a 25 °C y se transfirió el contenido a un embudo separador de 250 mL. Se lavó el balón con dos porciones de 25 mL de agua destilada y se transfirieron al embudo separador. Se extrajo con tres porciones de 60 mL de hexano. Se desechó la fase acuosa, se reunieron las fases hexánicas en otro embudo separador de 250 mL y se lavaron con tres porciones de 40 mL de agua destilada. Se aplicó un cuarto lavado con 40 mL de disolución acuosa de KOH al 3 % y posteriormente se lavó con dos porciones de 40 mL de agua destilada. Se adicionó Na_2SO_4 anhidro a la fase hexánica, se agitó y se dejó reposar durante 15 min. Se filtró a través de un papel de filtro. El filtrado se transfirió a un balón previamente tarado y se evaporó el disolvente a 60 °C con vacío en un evaporador rotatorio. El residuo se analizó por CG-EM, para ello se pesaron aproximadamente 5 mg de la FI en un tubo de ensayos, se añadieron 0,5 mL de la DPI, 140 μL de MSTFA y se calentó a 80 °C durante 1 h.

La identificación de los componentes se llevó a cabo por CG-EM. Para ello se compararon los espectros de cada componente con los de las bibliotecas de espectros (NIST y Wiley) y con los de patrones comerciales disponibles de campesterol, estigmasterol y β -sitosterol. Igualmente se determinaron sus retenciones relativas con respecto al colesterol, utilizado como patrón interno (PI), y se compararon además con las de los patrones comerciales. La determinación del porcentaje relativo de los esteroides se basó en el método del PI, previo cálculo de los factores másicos de respuesta relativa ($n = 3$).^{2-4,10} El PI fue escogido debido a su disponibilidad en el laboratorio y muy baja concentración o ausencia dentro del perfil cromatográfico, ya que se comprobó que en diversos lotes este no se puede detectar o aparece como traza. Igualmente, en diversos trabajos con la palma aceitera (*Elaeis guineensis*) y el Saw palmetto (*Serenoa repens*) se reporta la presencia de este compuesto como traza o no es detectado, lo que ha permitido su utilización como patrón interno.^{2,4,11-13}

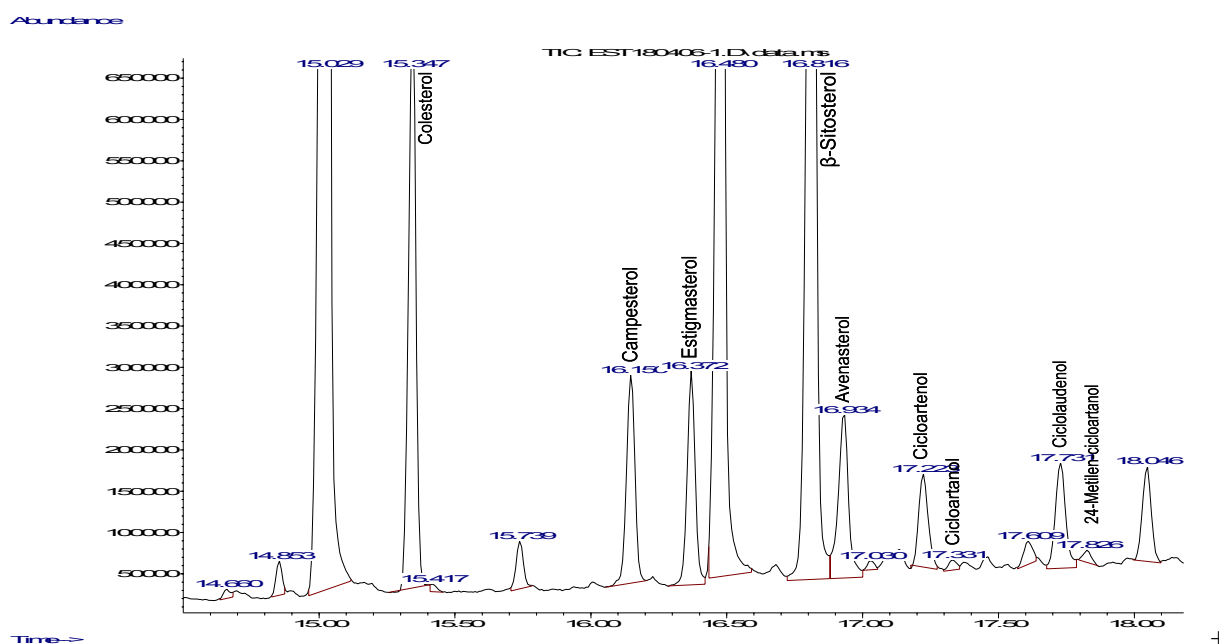
El recobrado de extracción de los esteroides a partir del D004 se determinó por el método de adición de patrón empleando el colesterol, mediante la diferencia entre las áreas y masas obtenidas de las muestras contaminadas y las muestras sin contaminar. El recobrado promedio obtenido (76,2 % con un CV = 2,9 %) coincide con los descritos en la literatura en similares condiciones de extracción líquido-líquido, donde el reparto se ve afectado por la competencia de las diferentes familias de compuestos con características químico físicas similares en su afinidad por el disolvente de extracción.

Teniendo en cuenta los resultados de los nueve lotes analizados y el recobrado de la extracción, se encontró que la fracción de esteroides constituía como promedio el 0,65 % en el D004 IA. Se detectaron once compuestos con estructuras correspondientes a esteroides (Tabla 1 y Fig. 1). De ellos, los tres predominantes fueron el β -sitosterol (58,40 %), el estigmasterol (9,52 %) y el campesterol (9,23 %), cuyas estructuras se identificaron por la similitud de sus espectros con los de la biblioteca de espectros del equipo. Como ejemplo se muestra el espectro del β -sitosterol, por ser el componente mayoritario (Fig. 2).

Tabla 1. Contenido de esteroides en la fracción insaponificable del D004 IA. Datos normalizados (%).

Esteroides	tr (min)	Lotes									Media (%) ± DE
		190106	20907	61206	60607	111206	230508	180406	61207	300109	
Campesterol	16,2	9,2	7,9	10,1	9,1	7,9	9,6	9,8	9,5	10,0	9,2 ± 0,82
Estigmasterol	16,4	9,2	8,0	10,6	9,7	13,3	10,1	9,7	5,5	9,7	9,5 ± 2,07
β-Sitosterol	16,8	59,6	50,3	62,5	60,6	60,5	60,7	60,4	52,3	58,7	58,4 ± 4,18
Δ5-Avenasterol	16,9	5,7	7,6	7,1	8,7	3,0	9,0	7,5	9,5	7,4	7,3 ± 1,96
Esterol (NI)	17,0	2,2	0,0	0,2	0,1	0,6	0,2	0,4	0,95	0,3	0,5 ± 0,67
Esterol (NI)	17,1	0,7	0,0	0,2	0,5	0,8	0,6	1,2	2,4	0,8	0,8 ± 0,71
Cicloartenol	17,2	4,2	5,4	1,9	4,0	4,4	3,0	4,3	5,6	3,9	4,1 ± 1,14
Cicloartanol	17,3	1,4	2,8	0,9	0,6	1,6	0,6	0,3	1,8	1,0	1,2 ± 0,77
Esterol (NI)	17,6	0,7	4,8	1,1	0,8	2,2	1,2	1,4	2,6	1,6	1,8 ± 1,27
Ciclaudenol	17,7	5,7	9,7	3,4	5,2	3,9	4,0	4,4	8,3	5,4	5,6 ± 2,13
24-metilen-cicloartanol	17,8	1,4	3,6	2,0	0,7	1,9	1,0	0,6	1,4	1,3	1,5 ± 0,89

NI: No identificado

**Fig. 1.** Perfil cromatográfico parcial por CG-EM de la fracción insaponificable del lote 180406 de D004 IA donde eluyen los esteroides y el colesterol como PI.

De igual manera, estos compuestos fueron identificados por las similitudes de sus retenciones relativas con las de los patrones. Otras contribuciones importantes fueron la del Δ5-avenasterol (7,29 %), el ciclaudenol (5,57 %) y el cicloartenol (4,09 %), que junto a esteroides minoritarios como el cicloartanol, el 24-metilen-cicloartanol y otros compuestos con núcleos esteroides, fueron detectados sin que sus estructuras fueran totalmente corroboradas, ya que no se contaba con sus patrones comerciales y sus bajas concentraciones dificultaron la interpretación de los espectros. La composición y el contenido de la fracción de esteroides encontrada coincide en gran medida con varios reportes realizados sobre la presencia de estos compuestos en los aceites y extractos lipídicos de otras palmáceas,¹¹⁻¹⁵ incluida la *S. repens*, aunque en la mayoría de los trabajos publicados solamente se identifican y cuantifican los esteroides mayoritarios: β-sitosterol, campesterol y estigmasterol.

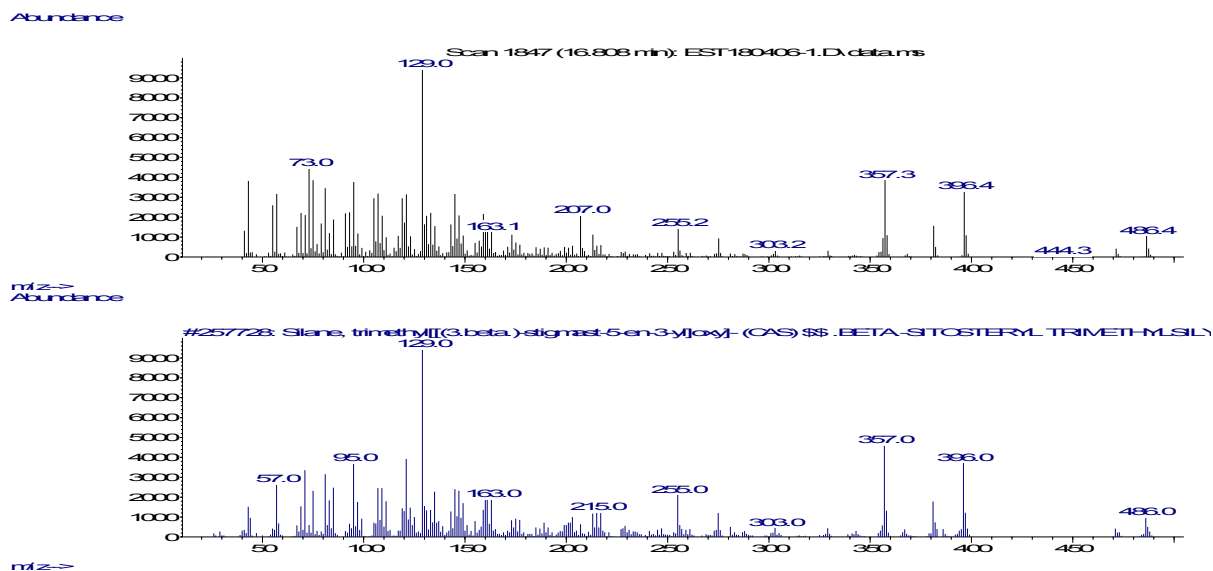


Fig. 2. Comparación del espectro de masas correspondiente al β -sistosterol presente en la fracción insaponificable del lote180406 de D004 IA (tr-16,81 min) con el de la biblioteca Wiley del CG-EM.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Piironen V, Lindsay DG, Miettinen TA, Toivo J, Lampi AM. Plant Sterols: Biosynthesis, Biological Function and Their Importance to Human Nutrition. *J Sci Food Agric.* 2000;80:939-66.
- USP, United States Pharmacopoeia [monograph on CD-ROM]. Saw Palmetto extract. The United States Pharmacopoeial Convention, Inc. 27th ed. USA: 2004.
- Consejo Oleícola Internacional (CE 183/93). Determinación de la composición y del contenido de esteroides mediante cromatografía de gases con columna capilar:1993.
- INA methods 109.001. Sterols content in Saw palmetto by gas chromatography: 2003.
- Ito T, Tamura T, Matsumoto T. Sterol composition of 19 vegetales oils. *J AOCS.* 1973;50:122-5.
- WHO. *Fructus Serenoae Repentis*. World Health Organization Monographs on Selected Medicinal Plants, vol.2. Geneva: World Health Organization: 2002: p. 285-99.
- Bruneton J, Farmacognosia, Fitoquímica, Plantas Medicinales, 3ra Ed. Zaragoza, España: Arencibia: 2001: p.163-4.
- Laguna A, *et al.* Extracto obtenido a partir de frutos de *Roystonea regia* utilizado contra la hiperplasia prostática y la prostatitis. Patente CU 23256, 2007.
- Carbajal D, Arruzazabala ML, Mas R, *et al.* Effects of D-004, a Lipid Extract from Cuban Royal Palm Fruit, on Inhibiting Prostatic Hyperplasia Induced with Testosterone or Dihydrotestosterone in a Rat Model: A Randomized, Controlled Study. *Curr Ther Res.* 2004; 65:505-14.
- Pérez C, Falero A, Luu H, Balcinde Y. A very efficient bioconversion of sorben phytosterols mixtures to androstanes by mycobacteria. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2006;148:719-23.
- Verleyen T, Forcadesa M, Verhea R, Dewettinckb K, Huyghebaertb A, De Greytc W. Analysis of Free and Esterified Sterols in Vegetable Oils. *JAOCS.* 2002;79:117-122.
- Dutta PC y Appelqvist L-A, Saturated sterols (stanols) in unhydrogenated and hydrogenated edible vegetable oils and in cereal lipids. *J Sci Food Agric.* 1996;71:383-391.
- Bombardelli E, Morazoni P. *Serenoa repens* (Bartram) JK Small. *Fitoterapia.* 1997;LXVIII(2):99-113.
- Harrison LNL, Chiew WP, Yuen MC, Ah NM, Cheng HC. Simultaneous quantification of free fatty acids, free sterols, squalene, and acylglycerol molecular species in palm oil by high-temperature gas chromatography-flame ionization detection. *Lipids.* 2005;40:523-8.
- Codex Committee on Fats and Oils, 10th Session, Document CX/FO 78/9. 1978.