

DETERMINACION ESPECTROFOTOMETRICA DE  
ACIDO OLEANOLICO Y SAPONINAS DE QUINUA  
(*Chenopodium quinoa* Willd, variedad Kancolla)<sup>1</sup>

Carlos C. Elías Peñafiel<sup>2</sup> y Luis Díaz Villar<sup>2</sup>

Instituto Nacional de Desarrollo Agroindustrial (INDDA)  
Lima, Perú

RESUMEN

Las saponinas de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd., variedad Kancolla) fueron extraídas por reflujo con una mezcla de metanol-agua (4:1). Una vez evaporado el metanol, el residuo remanente fue tratado siguiendo el método de Honerlagen y Tretter con sólo pequeñas modificaciones. Luego, el extracto se sometió a hidrólisis con ácido sulfúrico 12N en un sistema dioxano-agua (1:1) a 110°C por 1.5 horas. Las saponinas se extrajeron con cloroformo, concentradas, y algunos microlitros (equivalente a 121 mg de quinua) se sembraron contra un estándar de ácido oleanólico sobre placas de silicagel, siendo desarrollado con una mezcla de cloroformo-acetona-benceno (80:20:10; v/v).

Las manchas se localizaron con vapores de yodo, y la banda cuyo Rf fue similar a la del ácido oleanólico, se separó e introdujo en una columna de vidrio; eluida con cloroformo, secada y disuelta en 1 ml de ácido acético glacial, fue tratada con 4 ml de una mezcla de ácido sulfúrico—ácido acético glacial (1:1;v/v), calentada en baño maría a 60°C por 25 minutos, enfriada y llevada al espectrofotómetro donde se leyó a 527 mm contra un blanco. Bajo las mismas condiciones, el ácido oleanólico empleado como estándar mostró una linealidad en el rango de 60 a 480 microgramos.

El porcentaje de ácido oleanólico ha sido determinado en quinua (0.269 ± 0.25) y su contenido de saponinas fue estimado usando un factor de conversión establecido por cromatografía de gas y expresado en la siguiente relación:

$$\% \text{ Saponinas} = (8.5204) \times (\% \text{ Acido oleanólico})$$

Las saponinas extraídas —analizadas por este método— acusaron un error de 10.7% en relación a su determinación por cromatografía de gas.

---

Manuscrito modificado recibido: 2-11-87.

<sup>1</sup> Este trabajo se llevó a cabo dentro del marco de los Proyectos Andinos de Desarrollo Tecnológico PADTs-Alimentos, Junta del Acuerdo de Cartagena.

<sup>2</sup> Miembros del Laboratorio de Toxicología, División Científica, Instituto Nacional de Desarrollo Agroindustrial (INDDA), Ave. La Universidad 595, La Molina, Apartado 11294, Lima 14, Perú.

## INTRODUCCION

La quinua (*Chenopodium quinoa* Willd ), es un producto andino promisorio para la alimentación humana, ya que hoy día se sabe que la composición de nutrientes de esta dicotiledónea (1) está en ventaja frente a los cereales comunes, tales como el trigo, maíz, avena y arroz (2).

El factor que se aduce como obstáculo para la industrialización de la quinua es su contenido de saponinas. Químicamente, estas últimas son glicósidos por la hidrólisis, y liberan: (A) una o más unidades de azúcar y (B) aglicones libres de azúcares, que son derivados de sistemas de anillos policíclicos, y comúnmente referidos como sapogeninas (3).

Siendo las saponinas las responsables del sabor amargo del grano (4), se están haciendo esfuerzos para su eliminación, tanto a nivel genético como industrial. El presente trabajo intenta contribuir a la evaluación de tales esfuerzos, mediante la aplicación de un método espectrofotométrico.

Las saponinas de estructura química triterpénica, semejante a las saponinas de quinua, han sido extraídas con metanol:agua, eliminando el metanol, y extraídas del medio acuoso con cloroformo:butanol (5). Asimismo, la extracción de saponinas de medios acuosos ácidos se ha realizado con una mezcla de cloroformo:butanol (6). Estos tratamientos no permiten la eliminación completa de coextractivos y, desde el momento que los reactivos para la formación del color no son específicos, se hace necesaria una purificación suplementaria. Es así que, haciendo uso de la cromatografía en capa fina, se obtiene no sólo la eliminación de coextractivos, sino también la separación individual de saponinas (7,8).

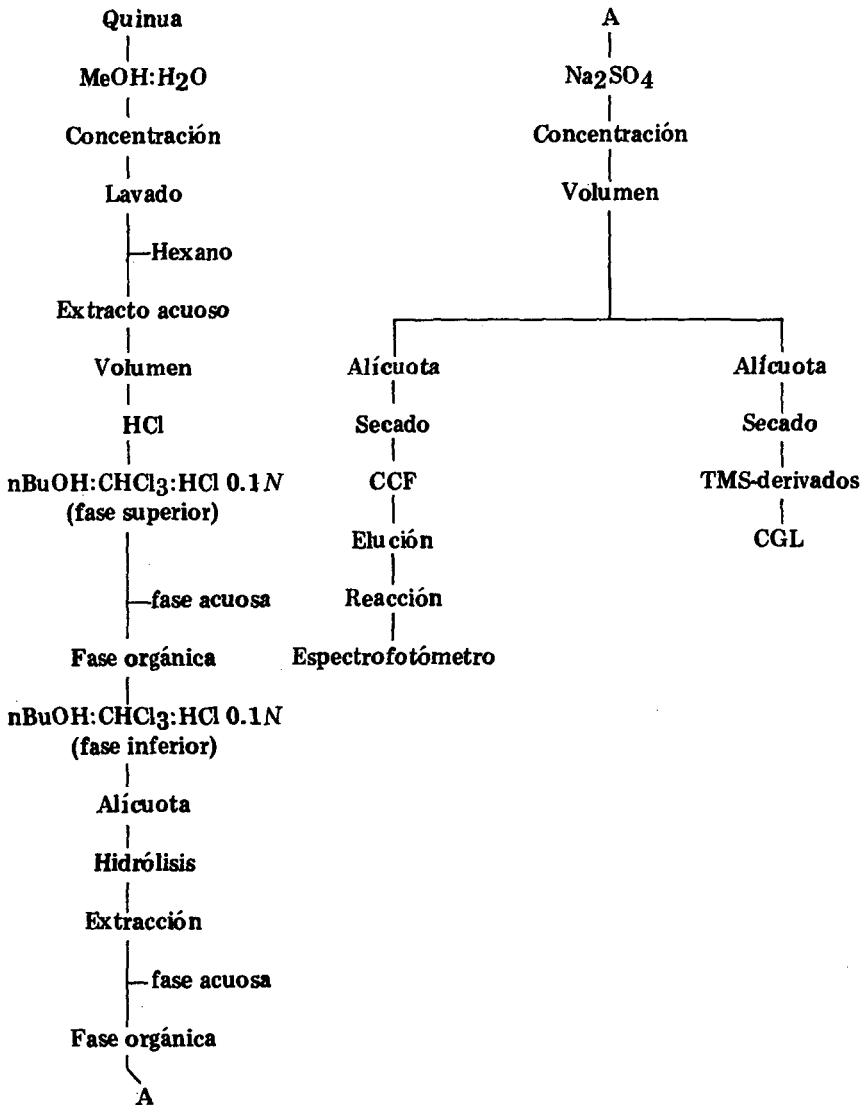
El hecho de no haberse elucidado la estructura química de alguna saponina de quinua que pudiese servir como estándar, hizo que dirigiéramos nuestra atención a la cuantificación de ácido oleanólico, principal sapogenina de la quinua (9,10). Su identidad —junto con la de otra sapogenina: hederagenin— ha sido confirmada por espectrofotometría de masa (11), estando presentes no sólo en las semillas (granos), sino también en las raíces de esta planta (12).

Por otro lado, existe un método (Diagrama 1) para cuantificar ácido oleanólico por cromatografía de gas —previa formación de su trimetil silil TMS derivado— para inferir posteriormente el tenor de saponinas mediante un factor, el mismo que se obtuvo a partir de saponinas semipurificadas (9). La dificultad radica en obtener una mezcla de saponinas de elevada pureza, las que permitan inferir con mayor exactitud el tenor real de saponinas.

Se llevó a cabo otro análisis cuantitativo por cromatografía de gas (CG), mediante la volatilización de ácido oleanólico por formación de su metil éster derivado (13); también se han analizado sapogeninas de quinua (ácido oleanolénico y hederagenin), sin necesidad de derivatización, por cromatografía líquida de elevada resolución ("performance") (HPLC) (10). Además de los métodos mencionados, existe un procedimiento volumétrico de requerimientos sencillos en cuanto a reactivos y equipos, que titula con hidróxido de sodio los extractos liposolubles de sapogeninas disueltas en alcohol de 96<sup>o</sup>/o (14). La dificultad de este último método radica en que el viraje del indicador de fenoltaleína es poco notorio, ya que está encubierto por los pigmentos presentes, y en que

## DIAGRAMA 1

Flujo seguido para la determinación de ácido oleanólico  
y su evaluación por cromatografía de gas

*Nomenclatura:*

MeOH = Metanol

H<sub>2</sub>O = Agua

nBuOH = n-Butanol

CHCl<sub>3</sub> = Cloroformo

HCl = Acido clorhídrico

Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = Sulfato de sodioCCF = Cromatografía  
en capa fina

TMS = Trimetil sili

CGL = Cromatografía  
gas líquida

la soda no sólo valoraría el ácido oleanólico, sino también otras saponinas de carácter ácido, la hederagenín (3) —por ejemplo— así como de posibles coextractivos que también presenten carácter ácido.

En términos comparativos, entre el método volumétrico y el gas cromatográfico, este último presenta ventajas, no sólo por los inconvenientes mencionados en el caso del primer método, sino porque el método gas cromatográfico permite la separación individual de saponinas para la identificación del ácido oleanólico y su posterior cuantificación. Por este motivo, fue el elegido para evaluar la exactitud del presente método espectrofotométrico.

En análisis cuantitativos de saponinas triterpénicas, el medio usado para la hidrólisis ha sido dioxano:agua (13, 15), el que —según algunos investigadores (15,16)— proporciona las mejores condiciones. Este mismo medio ha sido usado por Augusto Ruiz (9) en el caso de la hidrólisis de saponinas de quinua, las cuales fueron tratadas con 12*N* de ácido sulfúrico en un sistema dioxano-agua (1:1) por 1.5 horas, para ser extraídas posteriormente con cloroformo.

Asimismo, se han obtenido saponinas triterpénicas semipurificadas, previo a su fraccionamiento por cromatografía en columna (17). Adicionalmente, en el trabajo aquí descrito, se pretende obtener saponinas semipurificadas, que permitan deducir —a partir de la determinación de su tenor de ácido oleanólico— un tenor real de saponinas, mediante un factor de transformación.

## MATERIAL Y METODOS

### A. *Obtención de Extracto Saponósido de Quinua*

Se extrajeron a reflujo por una hora, tres veces, muestras de quinua Kancolla (15 g) con mezcla de metanol-agua (4:1; 90 ml), obteniéndose un extracto que después de filtrado se concentró con presión reducida a  $60 \pm 1^\circ\text{C}$ , hasta aproximadamente 30 ml. Se observó un sobrenadante de apariencia liposoluble, por lo que el concentrado se lavó dos veces con porciones de 10 ml de hexano. Para determinar si el hexano extraía algún compuesto liposoluble contaminante, esta fase orgánica fue llevada a sequedad y el residuo fue pesado, determinándose un peso de 13.9 mg. El residuo acuoso se volvió a concentrar hasta 10 ml.

### B. *Separación de las Saponinas*

Con la finalidad de disminuir la solubilidad de las saponinas en el residuo acuoso anterior, se adicionó HCl 0.2*N* de tal manera que el extracto final fue aproximadamente 0.1*N*, observándose la aparición de un notorio precipitado blanquecino. Este se transfirió a un embudo de separación, lavando el recipiente contenedor dos veces con porciones de 5 ml de HCl 0.1*N*. Luego se agitó tres veces el contenido del embudo con la fase orgánica de una mezcla de n-butanol:cloroformo:HCl 0.1*N* (6:1:3; 70 ml), desapareciendo el precipitado blanquecino (el mismo que se solubilizó en la fase orgánica). Después de cada agitación se dejó en reposo por lo menos 15 minutos.

Se unieron las fases orgánicas y se agitó dos veces con porciones de 30 ml de la fase inorgánica de la mezcla n-butanol:cloroformo:HCl 0.1N dejándose en reposo por 15 minutos. Se obtuvo así dos fases: una inorgánica (a) y otra orgánica (b).

Para determinar la presencia de azúcares contaminantes en la fase inorgánica (a), ésta fue sometida a una prueba de detección de carbohidratos, la que dio resultados positivos.

La fase orgánica (b) se llevó a volumen conocido, y en una alícuota desecada se desarrolló el color, para luego obtener su espectro de absorción, el mismo que —con fines comparativos en cuanto a estructura y pureza— fue confrontado con los espectros de absorción, tanto de la saponina blanca Merck obtenida en el comercio, como de las saponinas de quinua semipurificadas en nuestro laboratorio, cuya obtención se describe posteriormente. Luego, una alícuota de la fase orgánica (b) se hidrolizó, y otra de volumen conocido se desecó y pesó con la finalidad de evaluar el factor que transforma el ácido oleánico en saponinas. El peso de este extracto saponosido no debería ser sobrepasado por el tenor de saponinas estimado mediante este factor.

*Detección de carbohidratos* — Una alícuota de aproximadamente 50 ml de la fase inorgánica (a), mencionada anteriormente, se neutralizó con Na(OH) 6N y posteriormente fue concentrada en baño de maría a 70°C hasta un quinto de su volumen original, enfriándose y clarificándose como sigue: a 10 ml de solución acuosa se le adicionaron 3 ml de solución saturada de acetato de plomo (10<sup>0</sup>/o) y 0.2 g de oxalato de sodio; se dejó reposar por 10 minutos, y luego se filtró en papel Whatman. Una alícuota del filtrado se sometió al test de Molish y el resto del filtrado se dejó reposar toda la noche. Al día siguiente aparecieron algunos cristales pequeños en el fondo del recipiente del resto del filtrado, los que no fueron analizados por no haberse contemplado dentro de nuestros objetivos.

*Test de Molish* — A 2 ml del filtrado se le adicionaron 0.2 ml del reactivo (20<sup>0</sup>/o de 1-naftol en etanol) y, escurriendo por las paredes del tubo, se agregaron 2 ml de ácido sulfúrico. Inmediatamente se observó la aparición de un anillo, en la interfase, de color marrón oscuro, que desapareció aproximadamente al minuto de reacción, quedando anillos verdes que lentamente colorearon la fase superior. (Asimismo, y en forma paralela, se efectuó la misma prueba con glucosa anhidra, comportándose del mismo modo que la muestra).

### C. Hidrólisis

Se tomó una alícuota de la fase orgánica (b) conteniendo el equivalente a 4 g de quinua y se llevó a sequedad en el rotavapor a 70°C. El residuo fue disuelto en una mezcla de 1,4 dioxano-agua (1:1;20 ml), al que se le adicionó 20 ml de ácido sulfúrico 12N, efectuándose la hidrólisis en un baño de arena a 110°C por 1.5 horas.

### D. Extracción de Sapogeninas Totales

Después de enfriar a temperatura ambiente el hidrolizado obtenido en la etapa anterior, se transfirió a un embudo de separación y se lavó

tres veces con porciones de 50 ml de cloroformo. La fase orgánica cloroformica fue vertida sobre una columna de sulfato de sodio anhidro, la que se lavó dos veces con porciones de 20 ml de cloroformo. Posteriormente se concentró hasta volumen determinado. Del extracto de sapogeninas así obtenido, se tomaron tres alícuotas.

— La primera alícuota se llevó a sequedad, se desarrolló el color, y se obtuvo su espectro de absorción, el que con fines comparativos fue confrontado con los espectros de absorción, tanto del estándar de ácido oleanólico, como del eluato de la banda cortada, el cual se obtuvo por cromatografía en capa fina, según se describe más adelante.

- La segunda alícuota fue sembrada en cromatoplasas, para después proseguir con el análisis espectrofotométrico cuantitativo, tal como se describe en párrafos posteriores.

— Para evaluar el tenor de ácido oleanólico obtenido por espectrofotometría, la tercera alícuota (equivalente a un gramo de muestra) se sometió a análisis cuantitativo por cromatografía de gas. Apoyándonos básicamente en el trabajo de Augusto Ruíz (9), se procedió —bajo condiciones estrictamente anhidras— como sigue: un volumen conocido del extracto de sapogeninas fue secado con flujo de nitrógeno puro; luego se volatilizó por adición de 0.2 ml de reactivo sililante (N,O-bis (Trimetilsilil) trifluoroacetamida BSTFA de la Pierce Chemical Co., USA), para posteriormente adicionar 0.2 ml de piridina (destilada con perlas de hidróxido de potasio) como solvente. La mezcla se reflujo —en presencia de  $\text{CaCl}_2$  como desecante en el extremo del refrigerante— en baño de maría a  $60^\circ\text{C}$  por 15 minutos, con agitación, y se enfrió con baño de hielo para llevarla rápidamente a temperatura ambiente.

Los TMS-derivados fueron inyectados (1 mg de quinua aproximadamente) en un cromatógrafo de gas Perkin Elmer 3920 cuyas condiciones de operación se muestran en la Tabla 1. La curva estándar del TMS-derivado del ácido oleanólico fue elaborada bajo las mismas condiciones descritas para la muestra. Asimismo, en el cromatograma de la Figura 1 se determinó el porcentaje de sapogeninas totales por normalización interna; es decir, asumiendo que cantidades iguales, tanto de ácido oleanólico como las otras posibles sapogeninas, tienen igual respuesta bajo las mismas condiciones de operación. La confirmación de la identidad del pico de mayor magnitud se realizó por adición del estándar de ácido oleanólico a los extractos de sapogeninas; el ácido oleanólico se superpuso al pico principal, una vez que los TMS-derivados fueron inyectados al cromatógrafo.

Por otro lado, el peso de los eluatos de sapogeninas de volumen conocido fue registrado con la finalidad de evaluar el factor —obtenido por normalización interna— que transforma ácido oleanólico a sapogenina. El peso de este extracto de sapogeninas no debería ser sobrepasado por el tenor de sapogeninas estimado mediante este factor.

#### *E. Purificación por Cromatografía en Capa Fina*

Algunos microlitros del extracto de sapogeninas totales —equivalentes a 121 mg de quinua— se aplicaron en bandas de 5 cm, contra un estándar

TABLA 1

CONDICIONES GAS-CROMATOGRAFICAS SEGUIDAS PARA LA DETERMINACION DE LOS TMS-DERIVADOS DE SAPOGENINAS, USANDO UNA COLUMNA DE VIDRIO 30% SE - 30 EN CHROM. W AW DMCS 80/100 6' x 1/4"

	Condiciones
Temperatura de la columna	285°C
Temperatura del inyector	330°C
Temperatura del detector (FID)	315°C
Gas de arrastre, nitrógeno	65 ml/min
Atenuación	x 16
Rango	x 100

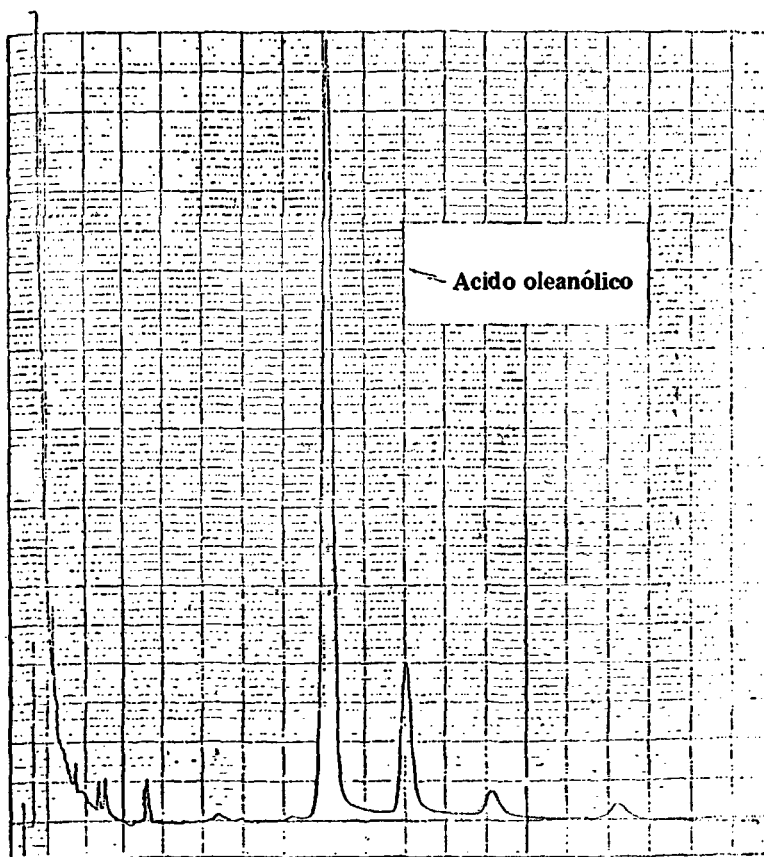


FIGURA 1

TMS-derivados de sapogeninas de quinua, analizados por cromatografía de gas

de ácido oleanólico, empleando un aplicador CAMAG LINOMAT III, sobre placas cubiertas con sílica gel G Merck, de 0.5 mm de espesor. Se ensayó un sistema de desarrollo de cloroformo:acetona:benzol (80:20:10; v/v), y el revelado se realizó por exposición de vapores de yodo durante algunos segundos.

Localizadas las manchas (Figura 2) y eliminado el yodo remanente con corriente de aire forzado, se cortó la banda con Rf similar al del ácido oleanólico y se eluyó con 15 ml de cloroformo sobre una columna de 1.2 cm de diámetro interno.

Solvente: Cloroformo-acetona-benzol (80:20:10)  
 Adsorbente: Sílica gel G (Tipo 60), 0.5 mm  
 Revelador: Vapores de yodo

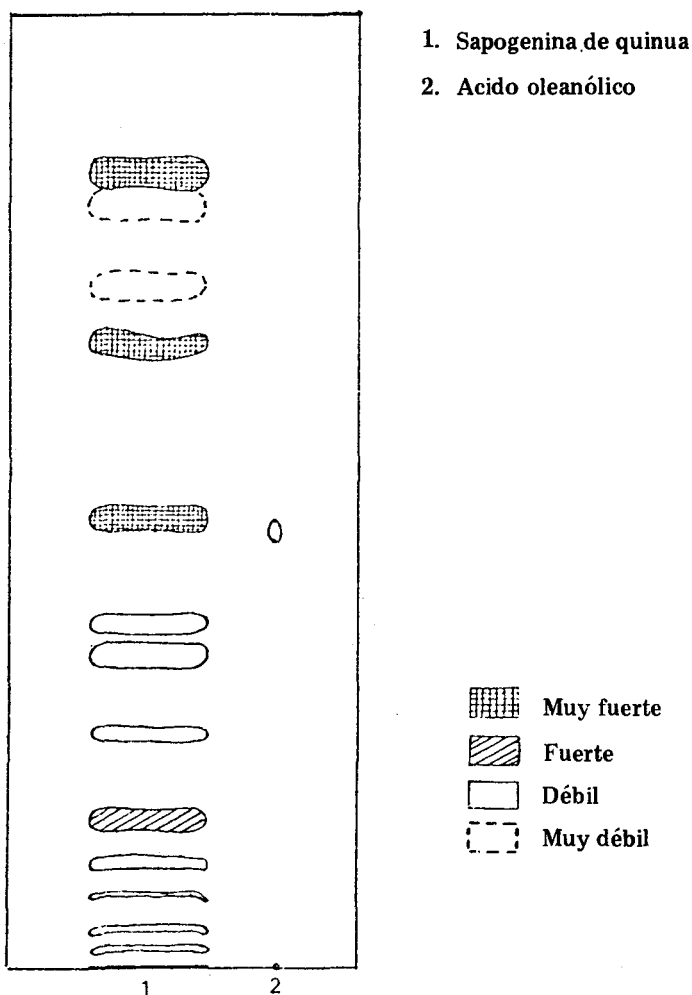


FIGURA 2

Cromatografía en capa fina de sapogeninas de quinua

### F. *Determinación Espectrofotométrica*

1. *Reactivo del color* — Se diluyen cuidadosamente 50 ml de ácido acético glacial, por lo menos de 96% de pureza, en 50 ml de ácido sulfúrico, al menos de 96% de pureza, con agitación suave y bajo corriente de agua. Después de la mezcla, el reactivo se agita energicamente y después de dos horas de reposo está listo para ser usado.

2. *Solución estándar de ácido oleanólico* — Se disuelven 2 mg de ácido oleanólico (punto de fusión 298-301°C), en 1 ml de ácido acético glacial de pureza no menor de 96%.

3. *Reacción de color* — Una alícuota de la solución estándar se diluye a 1 ml con ácido acético glacial y se le adiciona 4 ml del reactivo de color; se mezcla bien y se calienta por 25 minutos a  $60 \pm 1^\circ\text{C}$ . Como blanco se utiliza una mezcla tratada en forma igual, compuesta de 1 ml de ácido acético glacial y 4 ml del reactivo de color.

En la muestra, el eluato de la banda cortada se lleva a sequedad, y el residuo se disuelve en 1 ml de ácido acético, prosiguiéndose como en el caso del estándar. Al adicionar el reactivo de color se observa una coloración amarilla tenue, que lentamente va convirtiéndose en púrpura.

Enfriadas las muestras a temperatura ambiente, la medida del color púrpura desarrollado, se hizo en un espectrofotómetro Varian DMS-90 UV-Visible, programable, con cambio automático de longitud de onda y registrador. Se obtuvieron espectros de absorción de 351 a 750 nm, tanto del ácido oleanólico como de la muestra, siendo los espectros idénticos.

### G. *Análisis Espectrofotométrico*

Se procedió a la determinación de los espectros de absorción de la saponina blanca Merck, extracto saponósido de quinua, y de las saponinas semipurificadas en nuestro laboratorio, según se muestra en la Figura 3. Aguilar, Guevara y Alvarez (18) utilizaron la saponina blanca Merck como estándar en el desarrollo de un método hemo-lítico, cuantitativo, para el análisis de saponinas de quinua. No obstante, se desconoce su estructura y procedencia, por lo que su espectro de absorción fue comparado con el de las saponinas semipurificadas de quinua, lo que nos permitiría tener elementos de juicio en cuanto a la semejanza de ambas estructuras. Así, espectros diferentes revelarían estructuras también diferentes; no obstante, espectros coincidentes no revelarían estructuras iguales.

La comparación de los espectros de absorción entre el extracto saponósido y las saponinas semipurificadas se realizó con criterios de pureza. Con el mismo criterio, se compararon los espectros de absorción entre el ácido oleanólico, saponinas totales y el eluato correspondiente a la banda cortada, procedente de la cromatografía en capa fina (Figura 4).

Con la finalidad de observar cuál de los dos máximos de absorción tiene mayor estabilidad en el tiempo, se disolvió en cloroformo el estándar de ácido oleanólico, a una concentración de 5 mg/ml y, en una alícuota se determinó su espectro de absorción a los 55 minutos y 24 horas después de haberse llevado a cabo la reacción de color (Figura 5). Así,

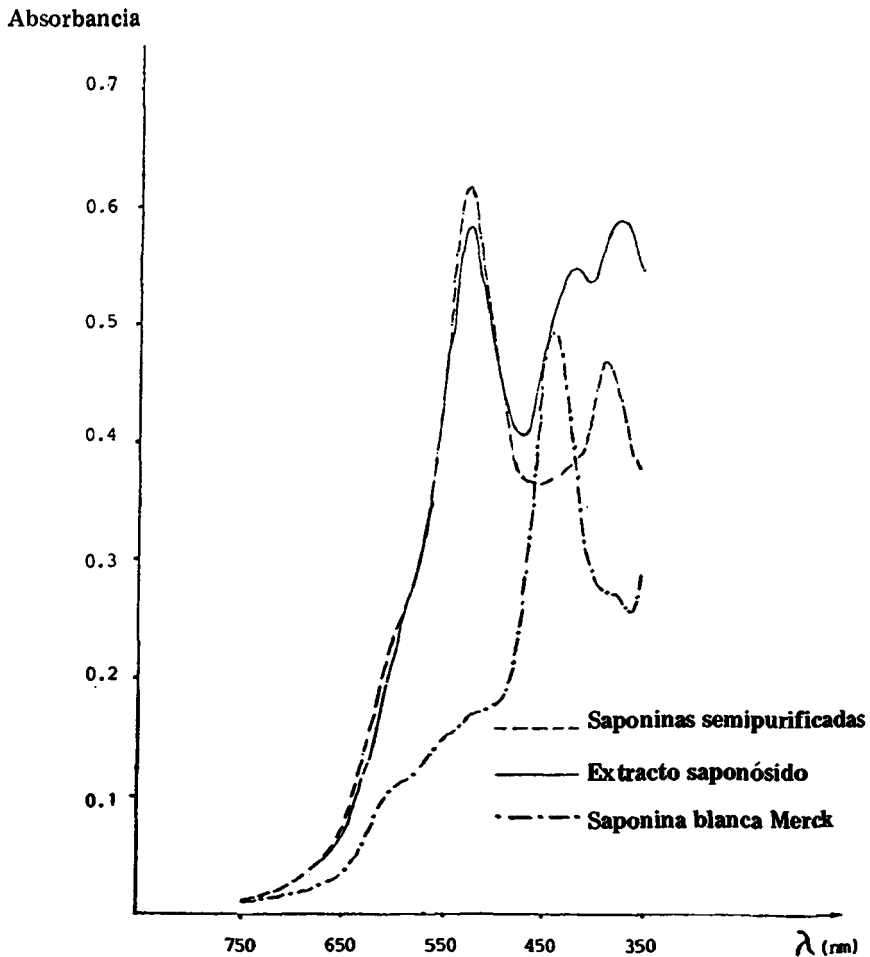


FIGURA 3

**Espectros de absorción de saponinas semipurificadas, extracto saponósido y saponina blanca Merck, después de la reacción de color**

como lo ilustra la Tabla 2, una vez definido el pico de mayor estabilidad (lambda máximo de 527), se procedió a estudiar su estabilidad en un rango de 40 y 150 minutos.

Por otra parte, con la finalidad de analizar cómo es influenciada la precisión del método cuando las sapogeninas son purificadas y fraccionadas en cromatografía en capa fina, se procedió a sembrar extractos

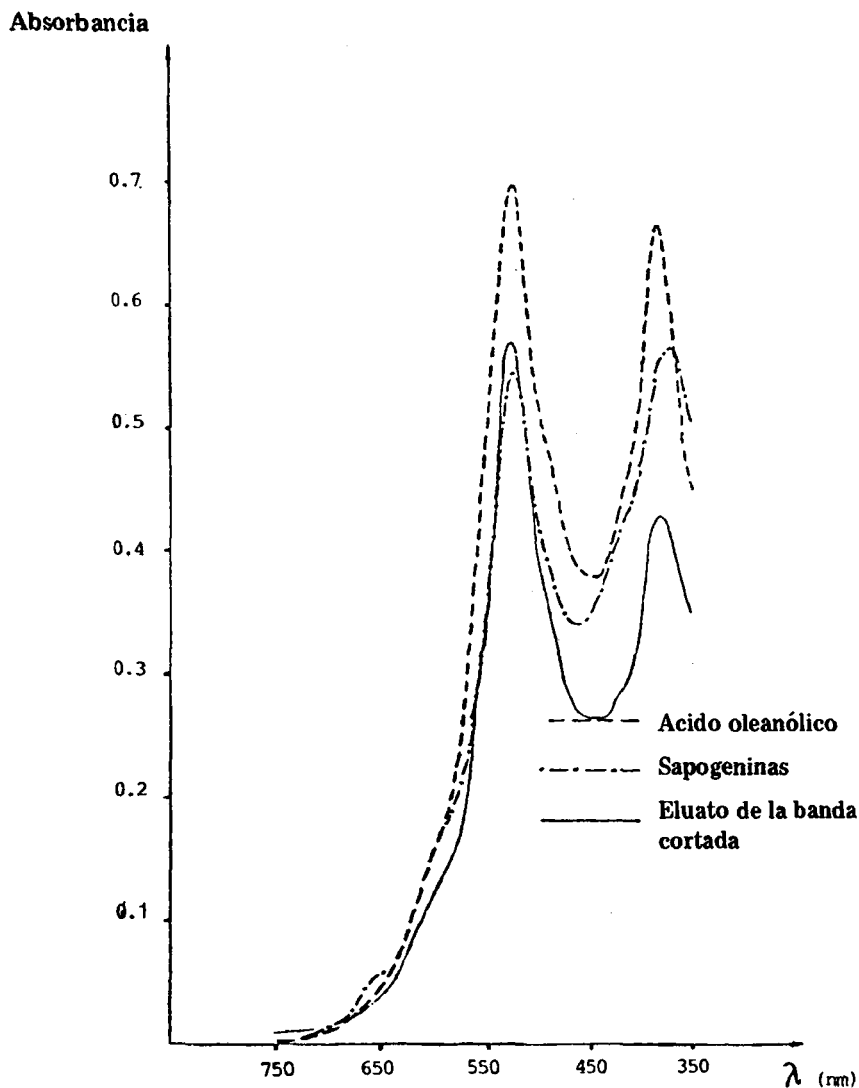


FIGURA 4

Espectros de absorción del ácido oleanólico, sapogeninas y del eluato de la banda cortada, después de la reacción de color

de sapogeninas en cromatoplacas, para luego llevar al espectrofotómetro la fracción correspondiente al ácido oleanólico (Tabla 3).

Para obtener una curva de calibración de ácido oleanólico, se tomaron alícuotas de la solución estándar, las correspondientes a las cantidades de 60 y 650 microgramos. Las absorbancias correspondientes se muestran tanto en la Tabla 4 como en la Figura 6.

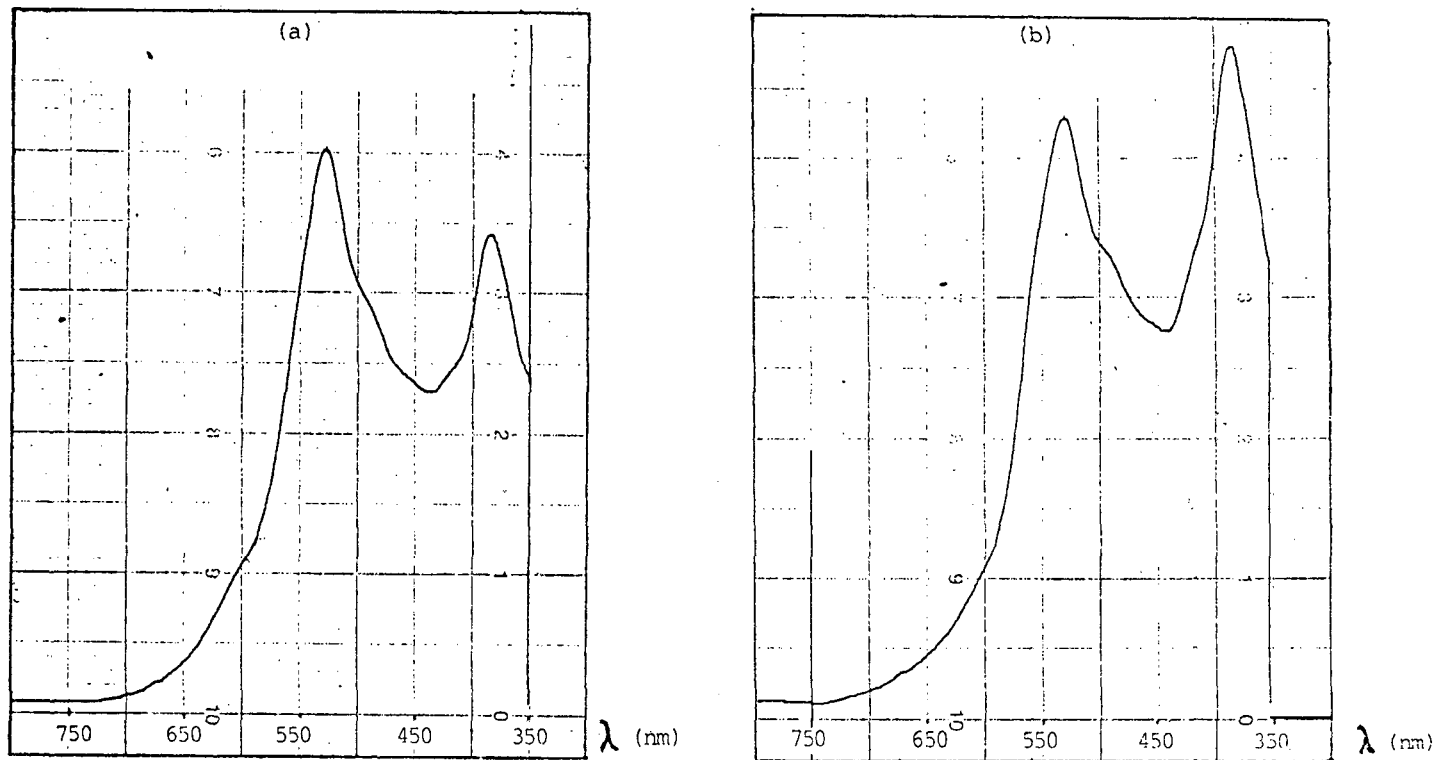


FIGURA 5

Espectros de absorción del ácido oleanólico a los 55 minutos (a) y a las 24 horas (b), después de la reacción de color

TABLA 2

VARIACION DE LA ABSORBANCIA EN FUNCIÓN DEL TIEMPO,  
DETERMINADA A 257 nm. MUESTRA: 339.5 MICROGRAMOS DE  
ACIDO OLEANOLICO

Tiempo (minutos)*	Absorbancia
40	0.460
60	0.460
75	0.461
90	0.461
105	0.461
120	0.461
150	0.466

\* El tiempo se cuenta desde el momento en que se realiza la reacción, e incluye los 25 minutos de calentamiento a  $60 \pm 1^\circ\text{C}$ , así como el tiempo de enfriamiento a temperatura ambiente.

TABLA 3

MEDIA ( $\bar{x}$ ) DESVIACION ESTANDAR (DE) Y COEFICIENTE DE  
VARIABILIDAD (c.v.) DEL CONTENIDO DE ACIDO OLEANOLICO,  
DETERMINADO EN LAS REPLICAS DE EXTRACTOS DE SAPOGENINAS

	Repeticiones	Acido oleanólico (o/o)
	1	0.244
	2	0.243
	3	0.293
	4	0.271
	5	0.294
-----		
Media ( $\bar{x}$ )		0.269
Desviación estándar (DE)		0.025
Coeficiente de variabilidad (c.v.) o/o		9.29

#### H. Obtención de Saponinas Semipurificadas

El flujo de Ghosal *et al.* (17) —previo al fraccionamiento en columna cromatográfica— fue seguido para la obtención de saponinas semipurificadas, con el propósito de hallar un factor que transforme su tenor de ácido oleanólico (determinado por cromatografía de gas) en saponinas. Así, las saponinas ubicadas en las coberturas externas del grano se separaron de éstos por escarificación en licuadora durante tres segundos; el

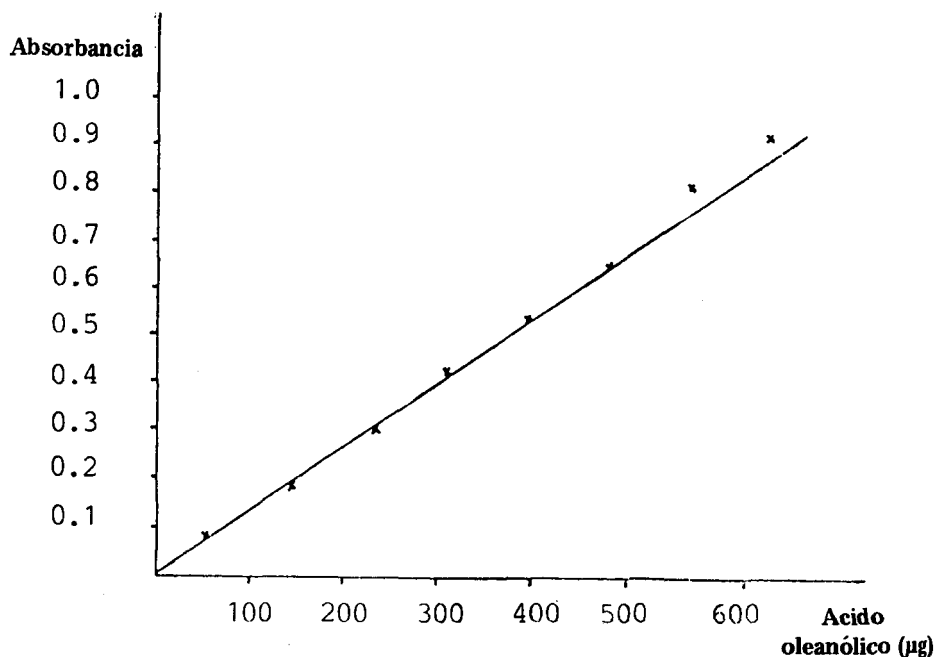


FIGURA 6

Curva estándar de ácido oleanólico, determinada por espectrofotometría

escarificado fue extractado al soxhlet con éter de petróleo (40-60°C) por 50 hr y luego con etanol absoluto (50 hr).

El extracto etéreo presentó algunos cristales bastante notorios al cabo de cierto tiempo, los que fueron hidrolizados, sililados y analizados por cromatografía de gas, no habiéndose presentado ningún pico definido en el cromatograma respectivo. No se procedió a posteriores análisis, por no estar esto comprendido dentro de nuestros objetivos.

El extracto etanólico fue evaporado a pequeño volumen, enfriado, centrifugado y desecado. El precipitado obtenido —después de pesado— se hidrolizó, y su tenor de ácido oleanólico fue determinado por cromatografía de gas. Así, se estableció un factor que transforma ácido oleanólico en saponinas.

## RESULTADOS

El resultado de ácido oleanólico (A.O.) en quinua, se determinó con la siguiente fórmula:

$$\frac{A_2 \times C_1 \times 100}{A_1 \times C_2}$$

- donde:  $A_1$  = Valor promedio de tres absorbancias del estándar de A.O.  
 $A_2$  = Valor promedio de tres absorbancias de la muestra analizada.  
 $C_1$  = Concentración del estándar en  $\mu\text{g/ml}$ .  
 $C_2$  = Concentración de la muestra en el extracto analizado, en  $\mu\text{g}$  quinua/ml.

La intensidad de color de la mezcla reaccionante con absorción máxima a 527 nm. fue estable, por lo menos dos horas, y se ha determinado buena correlación en la curva de calibración, cumpliéndose la ley de Lambert y Beer en un rango de 60 a 480 microgramos de ácido oleanólico. Asimismo, se estableció una absorción específica  $E_1^{1\% / 1\text{cm}}$  527 nm igual a 67.90 para el ácido oleanólico.

El porcentaje de ácido oleanólico, respecto a las sapogeninas totales, ha sido determinado por normalización interna en cromatografía de gas, siendo de 82.04%. Igualmente, el factor que transforma ácido oleanólico a saponinas de quinua se ha establecido:  $\% \text{ saponinas} = (8.5208) \times (\% \text{ ácido oleanólico})$ , a partir de saponinas semipurificadas.

#### DISCUSION

La extracción de saponinas con etanol:agua acusa coextractivos de carácter fenólico y azúcares libres (19). Se ha determinado la presencia y separación de estos últimos en el presente flujo, así como de compuestos liposolubles extraídos con hexano.

Por otro lado, el reactivo de Lieberman Burchard modificado al no presentar especificidad, podría reaccionar con los coextractivos presentes. No obstante, esta dificultad ha sido vencida con la introducción de una purificación adicional por cromatografía en capa fina CCF, de extractos de sapogeninas.

La falta de especificidad del reactivo de color se puede observar por comparación del tenor de sapogeninas determinado por pesada directa (1.99%), frente al tenor que arroja la determinación de sapogeninas (sin previa purificación por CCF) cuando se cuantifican frente a una curva de calibración de ácido oleanólico (2.01%). Por lo tanto, toda la materia pesada se estaría notificando como sapogenina. En cambio, al purificar el ácido oleanólico con CCF, sólo un 0.328% de éstas fueron determinadas en este mismo extracto crudo (Tabla 4).

Es inapropiado el uso como estándar de la saponina blanca Merck obtenida en el comercio, ya que su espectro de absorción es diferente al que presentan las saponinas semipurificadas de quinua. Asimismo, el espectro de absorción del extracto saponosido presenta un pico adicional al de saponinas semipurificadas, lo que indicaría la mayor pureza de estas últimas.

En la Figura 4 se puede observar el espectro de absorción del estándar de ácido oleanólico, muy similar al eluato correspondiente a la banda cortada, por lo que éste, así como los fortificados en CCF y cromatografía de gas, estarían confirmando que se trata de ácido oleanólico la mancha de  $R_f$  similar al estándar que arroja la CCF.

TABLA 4

**CONTENIDO DE ACIDO OLEANOLICO (A.O.) DETERMINADO POR ESPECTROFOTOMETRIA Y CROMATOGRAFIA DE GAS, Y -A PARTIR DE ESTE- LA DEDUCCION DE SAPOGENINA Y SAPONINAS**

	Espectrofotometría	Cromatografía de gas
o/o A.O.	0.269	0.243
o/o saponinas	0.328 <sup>1</sup>	0.296 <sup>1</sup>
o/o saponinas	2.292 <sup>2</sup>	2.07 <sup>2</sup>

- 1 Determinado por normalización interna, siendo el A.O. el 82.04% de las saponinas totales.
- 2 o/o de saponinas = (8.5208) x (o/o A.O.), siendo 8.5208, el factor obtenido por cromatografía de gas, a partir de saponinas semipurificadas.

El peso de los extractos brutos de saponinas arrojó un 3.22% respecto a la muestra original y, los extractos brutos de saponinas, 1.99%. Una valoración espectrofotométrica de estos últimos, sin previa cromatografía en capa fina, arrojó un tenor de saponinas de 2.01% frente a una curva de calibración de ácido oleanólico.

Siendo la obtención del estándar uno de los inconvenientes para la cuantificación de ácido oleanólico, es una ventaja contar con una absorción específica conocida  $E_{1\text{ cm}}^{1\text{ o/o}}$  527 nm = 67.90, la que nos permite la cuantificación, sin necesidad de estándar.

Dado que el peso del extracto saponósido no debería ser sobrepasado por el tenor de saponinas —estimado mediante el factor que transforma ácido oleanólico a saponinas— se evaluó la magnitud de este factor. De esta forma, un tenor de ácido oleanólico de 0.269%, arroja un 2.29% de saponina mediante el factor obtenido: 8.5204; en cambio, por el factor de 42.4405, obtenido por Augusto Ruiz (9), el tenor estimado de saponinas sería de 11.42%. Si estos resultados se comparan con el peso del extracto saponósido, 3.22%, encontraríamos que el primer factor es el más próximo al real. Lo anterior estaría indicando que las saponinas semipurificadas en el presente trabajo se encuentran con una menor cantidad de coextractivos (Tabla 5).

La utilización de la CCF para la purificación del ácido oleanólico sería la causa de una precisión relativamente baja, estimada mediante el coeficiente de variabilidad: 9.29% (Tabla 3). Esta precisión podría incrementarse siguiendo el procedimiento de Huayuan *et al.* (8). Este consiste en hacer reaccionar la mancha de  $R_f$  semejante al ácido oleanólico, con el reactivo de color en presencia de sílica gel (sin necesidad de una elución previa), y realizar el análisis espectrofotométrico previa sedimentación del sílica gel mediante una centrifuga de suficientes revoluciones para evitar interferencias.

El sistema de solventes sometido a ensayo para el desarrollo de las saponinas sembradas en CCF, presenta una buena separación de las manchas. Este hecho no solamente ha servido para nuestros fines, sino también permitiría una evaluación por densitometría así como para el aislamiento y purificación de otras saponinas.

TABLA 5

CURVA DE CALIBRACION DEL ESTANDAR DE ACIDO OLEANOLICO,  
UNA VEZ EFECTUADA LA REACCION DE COLOR.  
LEIDAS A 527 nm

	Volumen ( $\mu$ l)	Cantidad <sup>1</sup> ( $\mu$ g)	Absorbancia	Absorbancia corregida <sup>2</sup>
1	12	60	0.083	0.083
2	29	145	0.197	0.198
3	47	235	0.317	0.319
4	62	310	0.424	0.421
5	79	395	0.537	0.535
6	96	480	0.648	0.650
7	113	565	0.814	0.765
8	130	650	0.919	0.880

- 1 Esta cantidad proviene de tomar los volúmenes respectivos de una solución del estándar de ácido oleanólico (5 mg/ml de cloroformo), en la que se desarrolló el color con ácido sulfúrico:ácido acético glacial, siendo el volumen final de 5 ml.
- 2 Considerando sólo las cantidades de 60 a 480 microgramos, donde el coeficiente de correlación es mayor ( $r = 0.9999$ ). Cuando se considera de 60 a 650 microgramos, el coeficiente de correlación baja a  $r = 0.9988$ .

En el presente estudio se ha evaluado por cromatografía de gas la exactitud del método, a partir del extracto de saponinas. Para la evaluación desde el inicio del flujo, habría sido necesario contar con un estándar de saponinas, ya que al fortificar directamente con el estándar de ácido oleanólico, el carácter liposoluble de éste nos habría producido considerables pérdidas.

#### SUMMARY

#### SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF OLEANOLIC ACID AND SAPONINS FROM QUINOA (*Chenopodium quinoa* Willd, Kancolla variety)

Saponins were extracted from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd, Kancolla variety) by refluxing with a methanol-water (4:1) mixture. Once the methanol was evaporated, the remaining residue was treated following Honerlagen and Tretter's method with only slight modifications. The extract was then hydrolyzed with 12N sulfuric acid in a 1:1 dioxane-water system at 110°C for 1.5 hr. The saponinins were extracted with chloroform, concentrated and some microliters (equivalent to 121 mg of quinoa) were spotted, against an oleanolic acid standard, on a silicagel g plate and developed with a chloroform-acetone-benzene (80:20:10; v/v) mixture.

The spots were located by iodine vapor, and the band whose Rf was similar to that of the oleanolic acid, was scraped into a glass column, eluted with chloroform, dried out, dissolved in 1 ml of glacial acetic acid, treated with 4 ml of (1:1; v/v) sulfuric acid:glacial acetic acid mixture, heated in a water bath at 60°C for 25 minutes,

cooled and taken to the spectrophotometer where it was read at a wave length of 527 nm against a reagent blank. Under the same conditions, the oleanolic acid employed as a standard showed a linearity in the range of 60 to 480 micrograms.

The oleanolic acid percentage has been determined ( $0.269 \pm 0.025$ ) in quinoa, and the content of saponins estimated using a conversion factor found by gas chromatography and expressed in the following relationship:

$$\% \text{ Saponin} = (8.5204) \times (\% \text{ oleanolic acid})$$

The saponin extract obtained — analyzed by this method — showed an error of 10.7% in relation to its gas chromatography determination.

### AGRADECIMIENTO

Los autores expresan su sincero agradecimiento al Dr. Jack Kernan de Saskatchewan Research Council, Saskatchewan, Canadá, el habernos proporcionado el estándar de ácido oleanólico.

### BIBLIOGRAFIA

1. Cornejo, G. Estructura Anatómica de la Quinoa. II. Con. Int. Queen., Potosí, Bolivia, IICA, 1976.
2. de Bruin, A. Investigation of the food value of quinoa and cañihua seed. *J. Food Sci.*, **29**: 872-876, 1964.
3. Basu, N. & R. Rastogi. Triterpenoid saponins and saponinins. *Phytoch.*, **6**(9): 1249, 1967.
4. Gonzales, R. Investigation of *Ch. quinoa*. *Chem. Abstr.*, **13**: 1083, 1917.
5. Gromova, A. S., et al. Triterpenoid saponin from *Thalictrum minus* L. *Chem. Abstr.*, **95**: 183889a, 1981.
6. Honerlagen, V. H. & N. Tretter. Zur routinemäßigen quantitativen gesamt-saponinbestimmung in Radix Ginseng Panax und extrakten. *Deutsche Apotheker Zeitung*, **119**(38): 1483-1486, 1979.
7. Pasich, V. B. Absorptiometrische bestimmungsmethoden des saponingehalts in pflanzen material. *Planta Med.*, **11**: 16-22, 1963.
8. Huayuan, Yang, et al. Quantitative determination (of ginseng saponins) in shengmai injection. *Chem. Abstr.*, **95**: 192465 m., 1981.
9. Augusto Ruíz, W. Estudio Cromatografico de Saponinas da Quinoa (*Chenopodium quinoa*, Willd; variedade Kancolla). These Mestrado, FFAA-UNICAMP, Campinas, S. P. Brasil, 1979.
10. Burnouf-Radosevitch, M. & N. Delfel. High-performance liquid chromatography of oleanane type triterpenes. *J. Chromatography*, **292**: 403-409, 1984.
11. Meyer, B. N., P. F. Heinstein, M. Burnouf-Radosevitch, N. E. Delfel & J. L. McLaughlin. *J. Agric. Food Chem.*, 1983 submitted for publication. (Citado en *Journal of Chromatography*, **292**: 403-409, 1984).
12. Burnouf-Radosevitch, M. & C. Paupardin. Elaboration de saponines triterpéniques par des tissus de *Chenopodium quinoa* Willd, *C. R. Acad. Sci. Paris*, **296**: 429-432, 1983.

13. Kernan, J., E. Coxworth & S. Fleming. Microdetermination of triperpene saponin content of *Kochia scoparia* seed using gas-liquid chromatography. *J. Agr. Food Chem.*, **21**(2): 232, 1973.
14. Zavaleta, R., C. Vera, M. Tellería & H. Salazar. Desarrollo de un método analítico de determinación cuantitativa de saponinas de quinua en grano y en productos y subproductos de tratamiento de la misma. En: **Estudio de Tecnología de Desamargado de Quinua y Análisis de Saponinas**. La Paz, Bolivia, Proyectos de desarrollo tecnológico en el área de alimentos. Ministerio de Planeamiento y Coordinación y Junta del Acuerdo de Cartagena, 1982, p. 9-29.
15. Larry, D., M. Fuller & P. Harril. Quantitation of ammonium glycyrrhizinate by gas-liquid chromatography of the silyl ether ester derivative of the aglicone. *JAOAC*, **53**(4): 698, 1970.
16. Cundif, R. Spectrophotometric determination of Glycyrrhizic acid in Licorice extract. *Anal. Chem.*, **36**(9): 1871, 1964.
17. Ghosal, S., A. K. Srivastava, R. S. Srivastava, S. Chattopadhyay & M. Maitra. Justisaponin-I, a new triterpenoid saponin from *Justicia simplex*. *J. Med. Plant Research*, **42**: 279-283, 1981.
18. Aguilar, R., L. Guevara & J. Alvarez. Un nuevo método para la determinación cuantitativa de saponinas y su aplicación a diversas variedades de quinua peruana. *Acta. Cient. Venezolana*, **30**: 167-171, 1979.
19. Kochetkov, N., A. Khorlin, V. Vasikovsky & V. E. Zhvirblis. Saponinas triterpénicas de las raíces de *Aralia manschuria*. *Zhur Obsheei Khim. Moscow*, **31**: 658-665, 1961. (Ruso).