

Validación de una metodología por HPLC para cuantificar quercetina total en extractos de *Calendula officinalis*

Validation of an HPLC method for quantification of total quercetin in *Calendula officinalis* extracts

MSc. John Alexander Muñoz Muñoz,^I MSc. Jorge Enrique Morgan Machado,^I
Dr. C. Mary Trujillo González^{II}

^I Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, D. C., Colombia.

^{II} Grupo Aseguramiento de Calidad, Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, D. C., Colombia.

RESUMEN

Introducción: los extractos de *Calendula officinalis* se utilizan como materia prima natural en diversidad de preparaciones farmacéuticas y cosméticas, sin embargo, no existen métodos oficiales para el control de calidad de dichos extractos.

Objetivo: se validó una metodología analítica por HPLC para la cuantificación de quercetina total en extractos glicólicos e hidroalcohólicos de *Calendula officinalis*.

Métodos: para cuantificar el contenido de quercetina total en las matrices, fue necesario hidrolizar los flavonoides glicósidos en condiciones óptimas. La separación cromatográfica se realizó en una columna *SiliaChrom C-18* 5 µm 4.6x150 mm, adaptada a una precolumna *SiliaChrom C-18* 5 µm 4.6x10 mm, con un sistema de detección UV a 370 nm. El sistema de elución fue en gradiente, donde la fase móvil se compuso de Metanol (MeOH) y ácido fosfórico (H₃PO₄) (0.08 % p/v), la cuantificación se efectuó con el método de estándar externo y comparación con un estándar de quercetina de referencia.

Resultados: la selectividad de la metodología frente los componentes del extracto y a los productos de degradación en condiciones de hidrólisis ácida - básica, oxidación y exposición a la luz, mostró que no hay señales que interfieran con la cuantificación de la quercetina. Se comprobó estadísticamente que el método es lineal entre 1,0 y 5,0 µg / mL. La precisión intermedia expresada como coeficiente de variación fue de 1,8 y 1,74 % y el porcentaje de recuperación fue de 102.15 y 101.32 %, para los extractos glicólico e hidroalcohólico, respectivamente.

Conclusiones: la metodología propuesta cumple con los parámetros de calidad requeridos para la cuantificación de quercetina total, lo cual la convierte en una herramienta útil para el control de calidad de extractos glicólicos e hidroalcohólicos de *C. officinalis*.

Palabras clave: validación, HPLC, quercetina, flavonoides glicósidos, *Calendula officinalis*, control de calidad.

ABSTRACT

Introduction: calendula officinalis extracts are used as natural raw material in a wide range of pharmaceutical and cosmetic preparations; however, there are no official methods for quality control of these extracts.

Objective: to validate an HPLC-based analytical method for quantification total quercetin in glycolic and hydroalcoholic extracts of *Calendula officinalis*.

Methods: to quantify total quercetin content in the matrices, it was necessary to hydrolyze flavonoid glycosides under optimal conditions. The chromatographic separation was performed on a C-18 SiliaChrom 4.6x150 mm 5 µm column, adapted to a SiliaChrom 5 µm C-18 4.6x10 mm precolumn, with UV detection at 370 nm. The gradient elution was performed with a mobile phase consisting of methanol (MeOH) and phosphoric acid (H₃PO₄) (0.08 % w/v). The quantification was performed through the external standard method and comparison with quercetin reference standard.

Results: the studied method selectivity against extract components and degradation products under acid/basic hydrolysis, oxidation and light exposure conditions showed no signals that interfere with the quercetin quantification. It was statistically proved that the method is linear from 1.0 to 5.0 mg/mL. Intermediate precision expressed as a variation coefficient was 1.8 and 1.74 % and the recovery percentage was 102.15 and 101.32 %, for glycolic and hydroalcoholic extracts, respectively.

Conclusions: the suggested methodology meets the quality parameters required for quantifying total quercetin, which makes it a useful tool for quality control of *C. officinalis* extracts

Keywords: validation, HPLC, quercetin, flavonoid glycoside, *Calendula officinalis*, quality control.

INTRODUCCIÓN

La *Caléndula officinalis* es una planta perteneciente a la familia Asteraceae, utilizada desde hace siglos con fines terapéuticos, dada las diversas propiedades como antimicrobiana,¹⁻² anti-inflamatoria,³ inmunomoduladora,¹ cicatrizante,⁴ y antioxidante.⁵ Sus propiedades se relacionan principalmente con la presencia de compuestos como los ésteres de faradiol y flavonoides glicósidos. Estos últimos se encuentran conformados por las agliconas quercetina e isorhamnetina enlazadas a diversos glicósidos, los cuales se liberan por hidrólisis ácida.

La actividad y seguridad de esta planta se encuentra respaldada tanto por el uso tradicional como por diversos estudios científicos, lo cual la ha llevado a ser una de las plantas con mayor volumen de comercialización en los últimos años⁶ y también el material vegetal con mayor número de registros sanitarios vigentes y de gran diversidad en preparaciones farmacéuticas y cosméticas,⁷ convirtiéndola en materia prima con alta demanda en el mercado. Como tal, se encuentra disponible como extracto hidroalcohólico y glicólico, en donde el primero se utiliza en productos con fines terapéuticos (jarabes, soluciones orales, preparaciones de uso tópico), mientras que el segundo se utiliza para inclusión en preparaciones con fines cosméticos.

Por lo anterior, es necesario desarrollar metodologías analíticas para complementar el control y el seguimiento de la calidad de la materia prima comercializada, pues de ella depende el efecto del producto determinado. Dado que la quercetina es la base de los flavonoides glicósidos principalmente relacionados con actividad anti-inflamatoria y cicatrizante, en este trabajo, se validó una metodología para su cuantificación en extractos glicólicos e hidroalcohólicos de *Caléndula officinalis*.

METODOS

EQUIPOS Y REACTIVOS

Los análisis se realizaron en un cromatógrafo *Elite LaChrom* con detector UV-VIS y DAD, que utiliza una columna cromatográfica *SiliaChrom C18* de 150 × 4,6 mm y un tamaño de partícula de 5 µm, adaptado a un guarda columna C18 de 4,6x10mm y 5 µm.

Los reactivos empleados fueron, metanol HPLC (*Honeywell*), éter etílico (*Honeywell*), ácido fosfórico (H₃PO₄) 85 % (*Panreac*), ácido clorhídrico fumante (HCl) (*Merck*), estándar de quercetina (USP). Los extractos glicólico e hidroalcohólico utilizados como matriz blanco fueron proporcionados por *Phitother Laboratorios*.

ESTANDARIZACIÓN DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO

Por la falta de un sistema oficial para la cuantificación de agliconas a partir de *Caléndula officinalis*, el desarrollo del sistema cromatográfico se basó en datos colectados de la literatura, en los cuales se describen sistemas constituidos por una fase orgánica (metanol, Acetonitrilo o mezcla de ambos) y una fase acuosa con ácido trifluoroacético (TFA) ó ácido fosfórico (H₃PO₄).⁸⁻¹² Se realizaron modificaciones en porcentaje de la fase orgánica, concentración de ácido fosfórico del pico que se corresponde a la quercetina se efectuó por comparación con una solución estándar de quercetina USP. El sistema cromatográfico ideal para la elución de quercetina total a partir de extractos de *C. officinalis* se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Sistema cromatográfico para la cuantificación de quercetina en extracto glicólico e hidroalcohólico de *Caléndula officinalis*

Solventes F.M.		Gradiente	Fase estacionaria	Flujo (mL/min)	Temp (°C)	Vol. Inyec. (µL)	λ _{opt} (nm)
A	B						
H ₃ PO ₄ 0.08% (p/v)	MeOH	0.0-1.5min; 35%B	Precolumna C-18 5µm 4.6x10mm	1.0	35	20	370
		1.5-4.0min;35-50%B					
		4.0-12.0min55%B					
		12.0-13.0min;50-100%B	ColumnaC-18 5µm 4.6x150mm				
		13.0-20.0min; 100%B					
20.0-21.0min; 100%-35%B							
21.0-30.0min; 35%B							

TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

La muestra se sometió a una hidrólisis ácida a una temperatura óptima de 80°C, para obtener la quercetina a partir de los flavonoides glicósidos presentes en el material de partida. Las condiciones que se determinaron para la hidrólisis del extracto glicólico fueron HCl 2,0 M por 1 hora y una relación 1:3:3 de volúmenes de extracto:HCl:H₂O y para el extracto hidroalcohólico fueron HCl 3,5 M por 1 hora y una relación 1:1:1 de volúmenes de extracto:HCl:H₂O. Al culminar el tiempo de reacción, la muestra se colocó en un baño de hielo y se extrajo con 1 volumen equivalente de éter etílico, hasta juntar dos volúmenes. El éter etílico con las agliconas formadas, se lavó con agua destilada para remover el ácido remanente y se evaporó. El residuo se llevó a un volumen adecuado con una mezcla 80:20 de MeOH:H₂O y filtrado a través de membrana de 0,45 µm.

VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA

La validación se realizó siguiendo los lineamientos de la AOAC¹³ (*Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals*) y la FDA¹⁴ (*Guidelines for the Validation of Chemical Methods for the FDA Foods Program*); se evalúan los siguientes parámetros:

SELECTIVIDAD

La evaluación de la selectividad se realizó, en primer lugar, frente a productos de degradación exclusivos de quercetina, por lo cual se partió de quercetina estándar

de la cual se tomó un volumen para control y otro para la evaluación de degradación frente a hidrólisis ácida (HCl 0,1N) y básica (NaOH 0,1N), oxidación (H₂O₂ 3 %) y luz a 254 y 366 nm. De igual manera, se realizó la evaluación de selectividad frente a los productos de degradación de los componentes del extracto luego de su hidrólisis para la formación de las agliconas (quercetina, kaempferol e isorhamnetina).

Para la evaluación de la selectividad frente a excipientes, se analizaron individual y en mezcla a concentraciones usuales de trabajo en un extracto comercial como son propilenglicol, ácido ascórbico, benzoato de sodio, metilparabeno y propilparabeno, los cuales fueron evaluados de manera directa y tras someterse al proceso de hidrólisis aplicado para la formación de las agliconas.

LINEALIDAD DEL SISTEMA

Se analizó el comportamiento de soluciones de quercetina estándar a cinco niveles de concentración y tres réplicas (1,0, 2,0, 3,0, 4,0 y 5,0 µg/mL). Se realizó el análisis estadístico para determinar la ecuación de la recta, el coeficiente de correlación lineal (*r*), coeficiente de variación de los factores de respuesta, la significación estadística de la pendiente, el test de proporcionalidad (*t student* para $\alpha=0,05$ y $n-2= 13$), la prueba F de Fisher y ANOVA para la linealidad del sistema.

Para la linealidad del método se prepararon soluciones de igual concentración a las utilizadas en la linealidad del método, a partir de los extractos glicólicos e hidroalcohólicos enriquecidos con quercetina. La extracción se obtuvo con éter etílico tal como especifica el tratamiento de la muestra. Para la evaluación del blanco, se realizó la extracción de la misma cantidad de matriz, sin enriquecimiento previo.

PRECISIÓN

Para la repetibilidad del sistema se realizaron seis inyecciones consecutivas de soluciones estándar correspondientes al punto central de la curva de calibración y se determina la desviación estándar y el coeficiente de variación para el área. La precisión intermedia se evalúa por dos analistas en dos días diferentes en el mismo laboratorio y equipo con las condiciones de hidrólisis óptimas para cada matriz utilizada. Se evaluaron muestras por triplicado a un nivel de concentración, se determina el coeficiente de variación y el análisis de varianza para la precisión intermedia.

EXACTITUD

Se analizaron por triplicado soluciones preparadas a partir de los extractos glicólico e hidroalcohólico, enriquecidas con quercetina estándar. El porcentaje de recuperación se evaluó a tres niveles de concentración (1,0, 3,0 y 5,0 µg/mL). Los valores obtenidos se compararon con los esperados por interpolación en la gráfica de linealidad del sistema, obteniendo el valor de recuperación medio, y se evalúan los resultados por medio del test de Cochran para confirmar la homogeneidad entre las varianzas para los tres niveles de concentración trabajados.

RESULTADOS

APTITUD DEL SISTEMA

La evaluación de la aptitud del sistema realizada sobre seis inyecciones de una solución estándar de quercetina de 3 µg/mL, permitió determinar que el factor de capacidad (k') es 3,82, el número de platos teóricos (N) es 22 284 y el factor de asimetría (As) 1,22 con valores de coeficiente de variación (% C.V.) menores al 2 %.

SELECTIVIDAD

Al realizar la degradación de las soluciones estándar de quercetina se observó disminución en el área de la quercetina con los tratamientos de luz a 254 nm; hidrólisis ácido-básica y oxidación. Al parecer el tratamiento con luz a 366 nm no afecta la estabilidad de la quercetina. En la figura 1 se muestran los cromatogramas correspondientes a los tratamientos de degradación para el extracto glicólico de *C. officinalis*, donde se observa que no existen señales de productos de degradación que interfieran con la determinación de la quercetina. Esto se corrobora con los respectivos espectros UV para la señal de quercetina, que permiten establecer una pureza de pico del 99,9 % en todos los casos.

LINEALIDAD DEL SISTEMA Y DEL MÉTODO

Los resultados para la linealidad del sistema y del método para los extractos, se presentan en la tabla 2. De igual manera, los gráficos correspondientes se pueden observar en la figura 2.

PRECISIÓN

Los valores de concentración de quercetina presente en los diferentes extractos y determinadas por dos analistas en dos días diferentes y el resultados ANOVA para la precisión intermedia se muestran en la tabla 3.

EXACTITUD

Los porcentajes de recuperación promedio de quercetina, obtenidos a partir de los extractos evaluados y a tres niveles de concentración, son de 102,15 para el extracto glicólico y 101,32 para el hidroalcohólico, con coeficientes de variación de 2,4 y 0,4 % respectivamente. La varianza de cada grupo de datos se usó para evaluar su variabilidad a través del test de Cochran, comparando el $G_{\text{critico}} (k=3, n=3)$ que fue 0,87, con el $G_{\text{calculado}}$, que fue de 0,53 y 0,37 para el extracto glicólico e hidroalcohólico respectivamente.

Tabla 2. Resumen estadístico para la linealidad del sistema y del método para los extractos glicólico e hidroalcohólico

		Linealidad del sistema	LINEALIDAD DEL METODO	
			Extracto glicólico	Extracto hidroalcohólico
Regresión ($Y = a + bX$)	a	-22161.5	2558.3	-8294.0
	b	290975.1	283858.5	286111.9
	R ²	0.9981	0.9998	0.9984
Proporcionalidad de factores de respuesta	x/y prom	281802.5	285203.9	282293.9
	S _f	4472.95	1783.38	3427.71
	% CV _f	1.59	0.63	1.21
	Conclusión	No hay evidencia de falta de linealidad (%C.V. < 2%)		
t-student para la pendiente	t _b	83.72	245.03	90.40
	t _{crit} (0.05; 13)	2.16	2.16	2.16
	Conclusión	La pendiente es significativamente diferente de cero (t _b > t _{crit})		
t-student para el intercepto (Proporcionalidad)	t _a	1.94	0.67	0.80
	t _{crit} (0.05; 13)	2.16	2.16	2.16
	Conclusión	El intercepto no difiere significativamente de cero (t _a < t _{crit})		

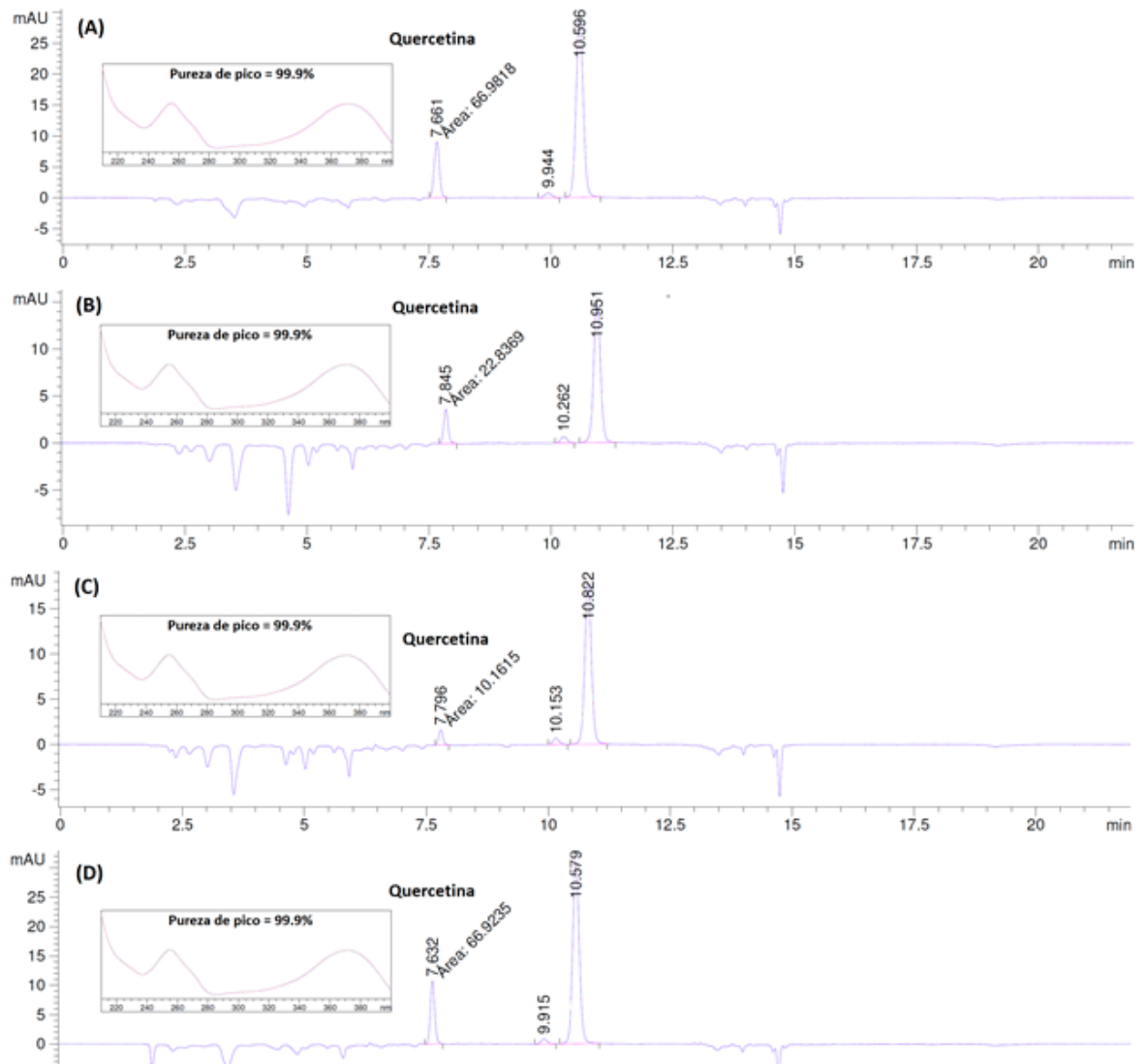


Fig. 1. Cromatogramas para la selectividad del extracto glicólico de *C. officinalis*. (A) Extracto control; (B) Hidrólisis ácida (HCl 0.1N) (C) Hidrólisis básica (NaOH 0.1N). (D) Oxidación (H₂O₂ 3%).

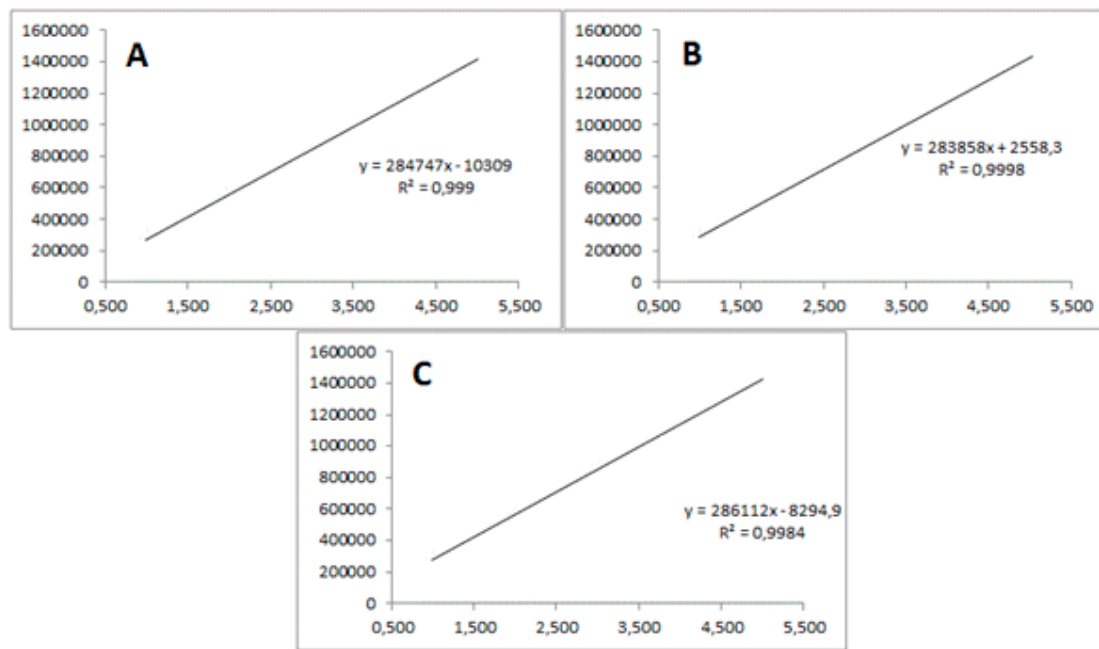


Fig. 2. Linealidad evaluada en el rango de 1.0 a 5.0 ppm para (A) Quercetina estándar (B) Extracto glicólico (C) Extractos hidroalcohólico.

Tabla 3. Resultados para la precisión intermedia evaluada en extracto glicólico e hidroalcohólico

		Extracto glicólico		Extracto hidroalcohólico	
		Analista		Analista	
		A	B	A	B
DÍA 1	Quercetina (µg/mL)	3,168	3,215	2,637	2,631
	Quercetina (µg/g producto)	85,812	86,166	72,351	72,351
	S	1,534	1,070	0,328	0,328
	%CV	1,787	1,242	0,453	0,453
DÍA 2	Quercetina (µg/mL)	3,253	3,308	2,586	2,568
	Quercetina (µg/g producto)	87,506	88,858	70,688	70,214
	S	0,828	0,784	0,963	0,694
	%CV	0,947	0,882	1,362	0,989
TOTAL	Quercetina (µg/g producto)	87,09		71,42	
	S	1,57		1,24	
	%CV	1,80		1,74	
F CALCULADO	ANALISTA	1.96×10^{-5}		3.07×10^{-6}	
	DIA	1.30×10^{-4}		1.51×10^{-4}	
	F CRITICO	5.12		87,09	

DISCUSIÓN

Los resultados de los coeficientes de variación para el factor de capacidad, número de platos teóricos y asimetría no superan el 2 %, lo cual demuestra que el sistema cromatográfico es idóneo para la validación. Las condiciones cromatográficas empleadas en el método propuesto, permitieron detectar la quercetina a un tiempo de retención aproximado de 7,7 minutos y los compuestos kaempferol e isorhamnetina a 10,0 y 11,0 minutos respectivamente. La elución de distintos componentes de ambos extractos a tiempos mayores a los de estos, hizo necesario el aumento del gradiente hasta un 100 % de MeOH para garantizar la limpieza de la columna y así evitar sustancias interferentes.

Los ensayos de selectividad, muestran que la quercetina se degrada entre un 5 y un 27 %, en las condiciones descritas para la hidrólisis ácida-básica, oxidación y exposición a la luz. Los resultados muestran que la exposición a luz la 370 nm, no genera degradación de la quercetina. Es importante notar que la pureza de pico para la señal correspondiente a quercetina en todos los casos se mantuvo en un 99,9 %, lo cual indica que no hay productos de degradación que puedan interferir en el análisis. De igual manera los resultados de los ensayos de degradación del

activo que se realizó a los extractos previamente hidrolizados y a la matriz compuesta de posibles interferentes en un extracto comercial, corroboran la selectividad de la metodología propuesta.

Tanto para la linealidad del sistema como la de los métodos se confirmó la significancia estadística de la pendiente y se demostró que no hay diferencia significativa entre el intercepto de las linealidades trabajadas y el cero; por lo tanto el método propuesto es lineal en el rango de concentración de 1,0 a 5,0 µg/mL de quercetina.

Los resultados correspondientes a la precisión intermedia permiten establecer que el coeficiente de variación CV, para la determinación de quercetina en extractos glicólicos e hidroalcohólicos es de 1,80 y 1,74 % respectivamente. De acuerdo a las guías de la AOAC¹³ y de la FDA¹⁴ para validación de métodos analíticos, el coeficiente de variación aceptable para concentraciones cercanas a 100 µg/mL, es del 4 %, y para concentraciones cercanas a 10 µg/mL, hasta del 6 %. Por lo tanto, los coeficientes de variación hallados para la cuantificación en ambos extractos se encuentran dentro de los rangos permitidos para la precisión intermedia. Por su parte, el ANOVA de la precisión intermedia muestra que no hay diferencia significativa entre realizar el análisis en días diferentes y por analistas diferentes.

Los porcentajes de recuperación para los extractos evaluados 102,15 y 101,32 %, para extractos glicólicos e hidroalcohólicos respectivamente, se encuentran dentro de los rangos establecidos por la AOAC y la FDA para muestras con concentraciones entre 10 y 100 µg/mL, los cuales se establecen entre 85 y 110 %. Además, de acuerdo al test de *Cochran*, los valores de Gcalculados fueron menores al valor crítico, por lo cual no hay evidencia del efecto de la concentración en la variabilidad de los resultados.

De acuerdo con los resultados para los diferentes parámetros de validación evaluados, el método desarrollado es selectivo, exacto y preciso para la cuantificación de quercetina total en extractos glicólicos e hidroalcohólicos de *Caléndula officinalis*. Este método, por lo tanto, es una herramienta útil para el control de calidad de los extractos que se utilizan como materia prima en la fabricación de productos fitoterapéuticos y cosméticos, además de servir en estudios de estabilidad de los extractos, con la utilización de la quercetina como marcador.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Attard A, Cuschieri A. *In vitro* immunomodulatory activity of various extracts of Maltese plants from the Asteraceae family. J. Med. Plant. Res. 2009;3(6):457-461.
2. Radioza SA, Iurchak LD. Antimicrobial activity of Calendula L. plants. Mikrobiol. Z. 2009; 69:21-25.
3. Chandran PK, Kuttan G, Kuttan R. Anti-inflammatory activity of flower extract of *C. officinalis* Linn. and its possible mechanism of action. Ind.J.Exp.Biol. 2009;47:113-120.
4. Leach MJ. *C. officinalis* and wound healing: A systematic review. Wounds 2008; 20(8):236-243.

5. Ćetković GS, Djilas SM, Ćanadanović-Brunet JM, Tumbas VT. Antioxidant properties of marigold extracts. *Food Res.Int.* 2004;37:643-650.
6. Guevara HA, Luengas PE, Garavito G. Revisión documental de los productos naturales legalmente autorizados para su mercadeo en Colombia. *Colombia Médica.* 2010;41(2):129-140.
7. INVIMA. Datos de Productos, Fitoterapéutico, Caléndula. [Citado el 13 de marzo de 2014] Disponible en: <https://www.invima.gov.co>
8. Olszewska M. Quantitative HPLC analysis of flavonoids and chlorogenic acid in the leaves and inflorescences of *Prunus serotina* Ehrh. *Acta Chromatographica.* 2007;19:253-269.
9. D'Mello PM, Joshi UJ, Shetgiri PP, Dasgupta TK, Darji AK. A Simple HPLC Method for Quantitation of Quercetin in Herbal Extracts. *Journal of AOAC International.* 2011;94(1):100-105.
10. Rajalakshmi PV, Senthil KK. Direct HPLC analysis of quercetin in exudates of *abutilon indicum* (Linn) Malvaceae. *J.of Pharm.Sci. and Tech.* 2009;1(2):80-83.
11. Menghinello P, Cucchiarini L, Palma F., Agostini D, Dachà M, Stocchi V. Simultaneous analysis of flavonoid aglycones in natural products using an RP-HPLC method. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* 1999;22(19):3007-3018.
12. The United States Pharmacopoeial Convention. The United States Pharmacopeia. 35 Edit.. Baltimore, 2012;1457-1460.
13. AOAC. Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals. 2012;22. [Citado el 13 de marzo de 2014] . Disponible en: http://www.eoma.aoc.org/app_k.pdf
14. FDA. Guidelines for the Validation of Chemical Methods for the FDA Foods Program. Version 1.0, 2012;26. [Citado el 13 de marzo de 2014]. Disponible en: <http://www.fda.gov/downloads/ScienceResearch/FieldScience/UCM298730.pdf>

Recibido: 16 de diciembre de 2013

Aprobado: 22 de abril de 2014

John Alexander Muñoz Muñoz. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, D. C., Colombia. Correo electrónico: joamunozmu@unal.edu.co