

Diseño y validación de un método analítico para la cuantificación de quercetina glucosilada en cápsulas que poseen extractos de *ginkgo biloba* L. Como principio activo

Karla Michel Li Gan

Departamento de Química Farmacéutica, Facultad de Ciencias y Humanidades, Universidad del Valle de Guatemala

RESUMEN: En el presente trabajo de investigación, se desarrolló y se validó un método analítico para la cuantificación de quercetina glucosilada en cápsulas de ginkgo por medio de cromatografía HPLC-DAD. La muestra fue tratada mediante una extracción con metanol y ultrasonido, seguido por una hidrólisis utilizando HCl. Se obtuvieron los parámetros de especificidad, linealidad, exactitud, repetitividad, precisión intermedia, límite de detección y cuantificación para el método, que cumplen con los criterios que establecen las guías de la ICH y AOAC. Por otro lado, se determinó el porcentaje de quercetina glucosilada en dos marcas comerciales de cápsulas de ginkgo de venta en Guatemala. Se sospecha que una de las muestras analizadas ha sido fortificada con quercetina libre, ya que la proporción de aglicona/quercetina total mostró ser demasiada alta para un extracto natural de ginkgo. Se sugiere valorar el método propuesto por la USP, ya que no permite distinguir entre un producto natural de ginkgo o adulterado. También se recomienda cuantificar la concentración de kaempferol y la isorhamnetina, ya que es parte de los requerimientos que establece la monografía del ginkgo.

PALABRAS CLAVE: *Ginkgo biloba* L., validación, quercetina glucosilada, adulteración, control de calidad.

Design and validation of an analytical method for the quantification of glycosylated quercetin in capsules containing *Ginkgo biloba* L. extracts as active ingredient

ABSTRACT: In the present research study, an analytical method was developed and validated for the quantification of glycosylated quercetin in ginkgo capsules by HPLC-DAD chromatography. The sample was treated by extraction with methanol and ultrasound, followed by hydrolysis using HCl. The parameters of specificity, linearity, accuracy, repeatability, intermediate precision, limit of detection and quantification were obtained for the method, which meet the criteria established by the ICH and AOAC guidelines. On the other hand, the percentage of glycosylated quercetin was determined in two commercial brands of ginkgo capsules sold in Guatemala. It is suspected that one of the samples analyzed has been fortified with free quercetin, since the ratio of aglycone/total quercetin was shown to be too high for a natural ginkgo extract. It is suggested to evaluate the method proposed by the USP, since it does not allow us to distinguish between a natural ginkgo product or an adulterated one. It is also recommended to quantify the concentration of kaempferol and isorhamnetin, since it is part of the requirements established by the ginkgo monograph.

KEY WORDS: *Ginkgo biloba* L., validation, glycosylated quercetin, adulteration, quality control.

Introducción

El *Ginkgo biloba* L. ha sido utilizado para el tratamiento de varias enfermedades, especialmente las que son relacionadas con la edad. Debido a su composición química, principalmente de flavonoides y terpenoides, los extractos de ginkgo actúan como antioxidantes y al mismo tiempo como antiinflamatorios (Hashiguchi et al., 2015). La industria farmacéutica ha desarrollado diversos preparados que tienen de base el extracto EGb 761, que es el extracto estandarizado de ginkgo desde 1965, y está constituido por 24% de flavonoides glucosilados y 6% de terpenoides (Luo & Cao, 2009).

Para el control de calidad de los flavonoides glucosilados de estos productos naturales, las farmacopeas oficiales, como la USP, recomiendan cuantificarlos a partir de las agliconas del glucósido realizando una hidrólisis ácida y multiplicando el resultado por un factor de conversión (USP, 2019). Sin embargo, varios autores han sospechado que este método puede opacar la adulteración de estos productos. En los análisis realizados por Demirezer et al. (2014), Dubber & Kanfer (2004), Sloley et al. (2003) y Wohlmuth et al., (2014), en donde inyectaron la muestra de ginkgo en medio neutro y ácido, han encontrado que la señal del equipo es relativamente alta cuando solamente se trata la muestra con metanol. Por lo que se cree que los fabricantes, o proveedores de ginkgo, añaden la forma libre de los flavonoides para aumentar la señal del equipo.

Al ser un producto botánico de alto valor, los extractos de ginkgo pueden ser objeto de adulteración por motivos económicos. La finalidad de esta investigación consiste en desarrollar y validar un método analítico para la cuantificación de quercetina glucosilada en cápsulas que contienen extractos de ginkgo como principio activo, por medio de HPLC-DAD. Por otro lado, se cuantificó la concentración de quercetina glucosilada en dos marcas comerciales de cápsulas de ginkgo, utilizando dos métodos distintos reportados en la literatura para verificar el contenido de este principio activo en los productos comercializados en el mercado de Guatemala.

Materiales y métodos

Recolección de la muestra. Se escogió al azar dos muestras de cápsulas de *Ginkgo biloba* L. de venta libre en las farmacias locales de Guatemala.

Preparación de la muestra. Para el extracto metanólico (neutro), se vació el contenido de 20 cápsulas de ginkgo en una caja Petri y se mezcló homogéneamente. Se pesó cuantitativamente 1 gramo de muestra y se trasladó a un balón aforado de 100.0 mL. Se añadió 50 mL de metanol grado HPLC y se colocó en un baño ultrasónico por 10 minutos. Al culminar el tiempo, fue aforado a 100.0 mL con metanol y se agitó mecánicamente. Por último, el extracto fue colocado en una centrifuga hasta separar ambas fases. El sobrenadante se filtró por una membrana de poro 0.45 μm y se colocó en un vial para HPLC.

Para el extracto hidrolizado (ácido), se pesó cuantitativamente 1 gramo de muestra y se trasladó a un balón aforado de 100.0 mL. Se añadió 50 mL de metanol grado HPLC y se colocó en un baño ultrasónico por 10 minutos. Al culminar el tiempo, se agregó 40 mL de HCl 1.5 N y nuevamente fue colocado en el baño ultrasónico por 10 minutos. Se prosiguió a aforar a 100.0 mL con metanol y se agitó mecánicamente. El extracto fue colocado en una centrifuga hasta separar ambas fases, y el sobrenadante se calentó a baño maría a 100 °C por 15 minutos. Al finalizar el tiempo, se dejó enfriar en un baño de hielo. Por último, el extracto se filtró por una membrana de poro 0.45 μm y se colocó en un vial para HPLC.

Se realizó el mismo procedimiento para ambas muestras comerciales de cápsulas de ginkgo analizadas.

Determinación de los parámetros cromatográficos óptimos. Se eligió al azar una de las muestras de cápsulas de ginkgo para determinar la fase móvil óptima. Se prosiguió a filtrar el extracto metanólico e hidrolizado de dicha muestra, y se preparó un estándar de quercetina a 6 ppm (aforado con metanol). Se inyectó al equipo de cromatografía con los siguientes parámetros:

- **Cromatógrafo HPLC** Perkin Elmer modelo LC300 con detector de arreglo de diodos.
- **Fase móvil:** como se muestran en la tabla no.1.
- **Columna** Waters XTerra RP18, 5 μm tamaño de partícula, 4.6 x 150mm.
- **Velocidad de flujo:** 0.8 ml/min como inicio, y se estará variando hasta obtener el flujo ideal.
- **Volumen de inyección:** 20 μL .
- **Longitud de onda de detección:** según la longitud de onda con mayor absorbancia obtenido a partir del mapa del detector de diodos.
- **Tiempo de corrida:** 60 minutos para iniciar, y se estará acortando, dependiendo de los resultados.

Se comparó los cromatogramas de las tres corridas, y se escogió las condiciones del cromatógrafo con un menor tiempo de retención del analito y manteniendo una buena separación de los picos ($R_s \geq 1.5$). A partir de estos resultados, se llevó a cabo la validación y la cuantificación de quercetina en las muestras comerciales de cápsulas de ginkgo utilizando estos parámetros.

Validación del método analítico. La validación del método fue realizada utilizando la guía de la ICH Topic Q 2 (R1) *Validation of Analytical Procedures*.

Especificidad: se comparó el tiempo de retención entre el estándar de quercetina con el de las muestras comerciales de ginkgo. También se calculó la resolución de la columna entre el pico correspondiente al tiempo de retención de la quercetina con el pico más cercano en el cromatograma de las muestras cápsula de ginkgo.

Tabla 1. Parámetros de fase móvil evaluados para determinar el flujo óptimo del método.

Corrida	Solvente fase móvil		Gradiente	Composición
	Solvente A	Solvente B		
1	Metanol	H ₃ PO ₄ 0.08%	Isocrático	Metanol y H ₃ PO ₄ 0.08% (80:20)
2			Gradiente	De 0 a 15 min: 100% A De 16 a 40 min: 100% - 80% A (0 a 20% B) De 41 a 60 min: 80% - 60% A (20 a 40% B)
3			Gradiente	De 0 a 15 min: 60% - 80% A (40 a 20% B) De 16 a 40 min: 80% - 100% A (20% a 0% B) De 41 a 60 min: 100% A

Linealidad: se efectuó una regresión lineal utilizando un estándar de quercetina dihidrato a cinco concentraciones diferentes, aforados con metanol. Cada solución se filtró usando una membrana de 0.45 µm para HPLC y se inyectó seis veces cada disolución en el equipo HPLC. Se obtuvo el modelo de regresión lineal utilizando el método de mínimos cuadrados, y se calculó su respectivo coeficiente de determinación (R²).

Exactitud: se preparó tres disoluciones de un estándar de quercetina a una concentración conocida, y se inyectó al equipo de HPLC. Se evaluó la exactitud calculando el porcentaje de recuperación a partir de la concentración teórica de quercetina y el dato obtenido a partir de la regresión lineal.

Precisión: para evaluar la repetitividad del método, las disoluciones de quercetina utilizadas en el apartado de linealidad y exactitud fueron inyectadas seis veces en el mismo día. Se prosiguió a calcular el coeficiente de variación (%CV) del área bajo la curva (AUC) de cada solución hija.

Para evaluar la precisión intermedia, todas las disoluciones de estándar de quercetina (linealidad y exactitud) fueron inyectadas por seis veces en dos días diferentes, siendo el día 1 donde se prepararon las disoluciones hijas. Estas soluciones fueron guardadas en un balón transparente y con su respectivo tapón, se cubrieron con parafilm y se almacenaron en condiciones normales de refrigeración (aproximadamente 13 °C) por 4 días. Al culminar el tiempo, estos fueron analizados nuevamente y los resultados se reportaron como día 2. Se evaluó el %CV de los datos de ambos días y el R² de la regresión lineal.

Límite de detección (LOD): se inyectó 10 veces un blanco de metanol al equipo, y a partir de los datos obtenidos del modelo de regresión lineal y del promedio del área bajo la curva del blanco, se utilizó la siguiente ecuación para determinar el límite de detección del método.

$$LOD = \frac{3.3 \sigma}{S}$$

Donde: σ es la desviación estándar de la señal obtenida a partir de la medición de un blanco, y S es la pendiente de la curva de calibración (ICH, 1995).

Límite de cuantificación (LOQ): a partir de los datos obtenidos del modelo de regresión lineal y del promedio del área bajo la curva del blanco, se utilizó la siguiente ecuación para determinar el límite de cuantificación del método.

$$LOQ = \frac{10 \sigma}{S}$$

Donde: σ es la desviación estándar de la señal obtenida a partir de la medición de un blanco, y S es la pendiente de la curva de calibración (ICH, 1995).

Robustez del método: se evaluó la estabilidad de las soluciones estándar de quercetina. Las soluciones hijas y madre fueron almacenadas en condiciones de refrigeración normal por 4 días, utilizando balones transparentes con su respectivo tapón y cubiertos con parafilm. Al transcurrir el tiempo, estas fueron filtradas e inyectadas nuevamente para evaluar el área bajo la curva del pico correspondiente a quercetina.

Cuantificación de quercetina glucosilada en las muestras comerciales de cápsulas de ginkgo. Se llevó a cabo la extracción de la muestra siguiendo el procedimiento del apartado de *Preparación de la muestra*, y se inyectó al equipo en cuadruplicado. La concentración de quercetina en ambos extractos se calculó utilizando la regresión lineal.

Los datos obtenidos a partir del extracto metanólico (neutro) representan la porción de quercetina libre, mientras que el extracto hidrolizado (ácido) determina la cantidad de quercetina total (glucosilada + aglicona). Para calcular el porcentaje de quercetina glucosilada se utilizó dos métodos: 1) el uso del factor de conversión, que se reporta en los estudios realizados por Demirezer et al., (2014), Gray et al., (2005), Sloley et al.,

(2003) y del método de la USP (2019), y 2) realizando una resta entre la concentración de quercetina total y de la aglicona, y luego multiplicarlo por el factor de conversión, así como se muestra a continuación:

$$\%QQ = (\%Q_T - \%Q_A) * 2.51$$

Donde: %QQ es el porcentaje de quercetina glucosilada, por unidad posológica; %Q_T es el porcentaje de quercetina total, y %Q_A es el porcentaje de quercetina libre (aglicona).

Resultados y discusión

Determinación de los parámetros cromatográficos óptimos. En la tabla no. 2 se muestra los resultados del tiempo de retención y la resolución de la columna de las fases móviles evaluadas. Según los cromatogramas, se observó que los parámetros más adecuados correspondían al de la corrida número 1, que consiste en una elución isocrática de una mezcla de metanol y ácido fosfórico al 0.08% en proporción de 80:20 (ver figura no. 1). Con estos criterios, el tiempo de retención del analito fue de 3.330 minutos en promedio, con una resolución de la columna de 4.0427, indicando una buena separación.

Tabla 2. Tiempo de retención (*t_R*) y resolución de la columna (*R_s*) de las fases móviles evaluadas.

Corrida	Composición de la fase móvil	<i>t_R</i> del estándar (min)	<i>R_s</i> del cromatograma de la muestra
1	Isocrático, metanol y H3PO4 0.08% (80:20)	3.383	4.0427
2	Gradiente, desde 100% metanol a 60:40 metanol y H3PO4 0.08%	No se logró determinar	No se logró determinar
3	Gradiente, desde 60:40 metanol y H3PO4 0.08%, a 100% metanol	10.157	No se logró determinar

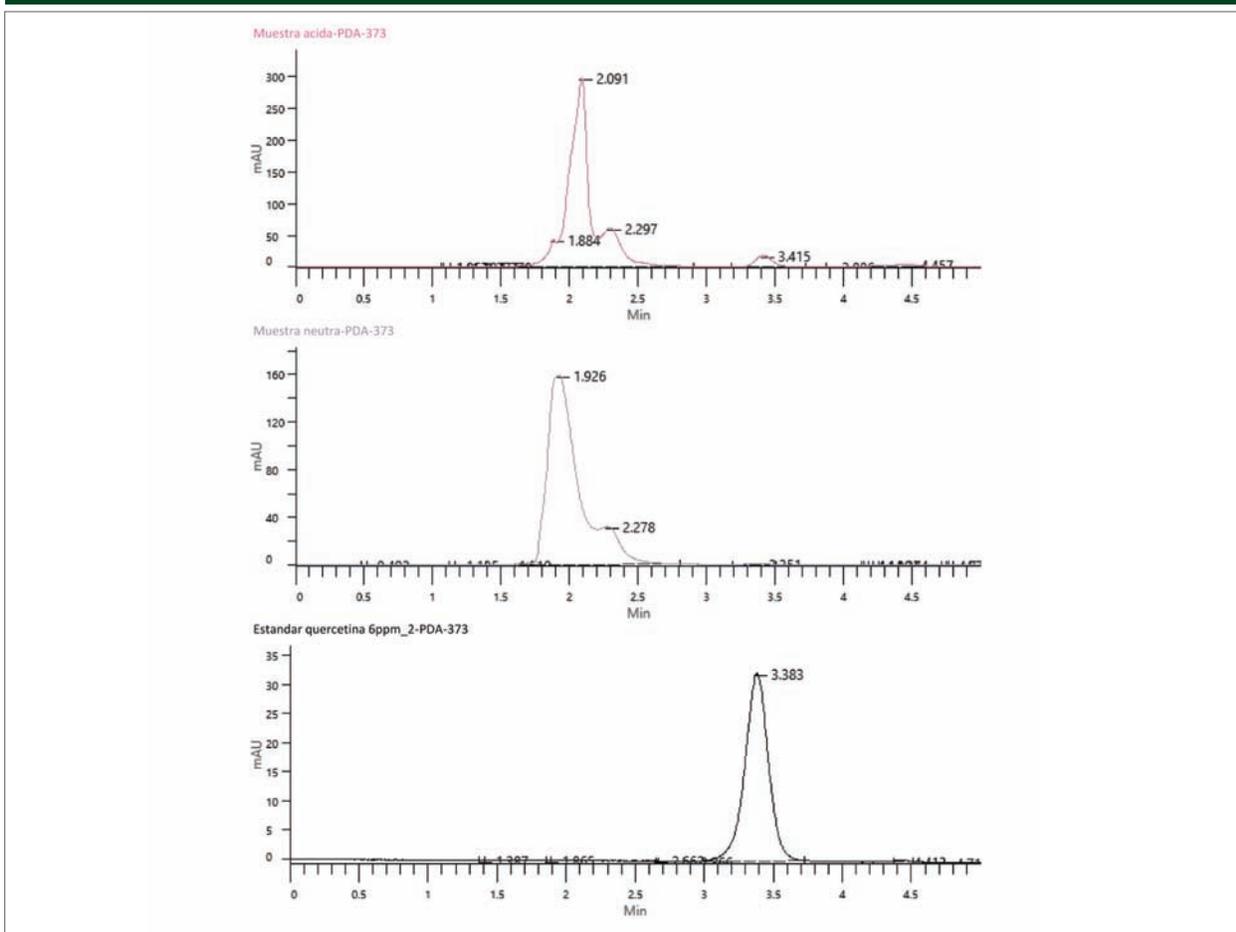


Figura 1. Cromatogramas de corrida no 1: isocrático, metanol y H₃PO₄ 0.08% (80:20). No se observó ningún pico después del minuto 5.

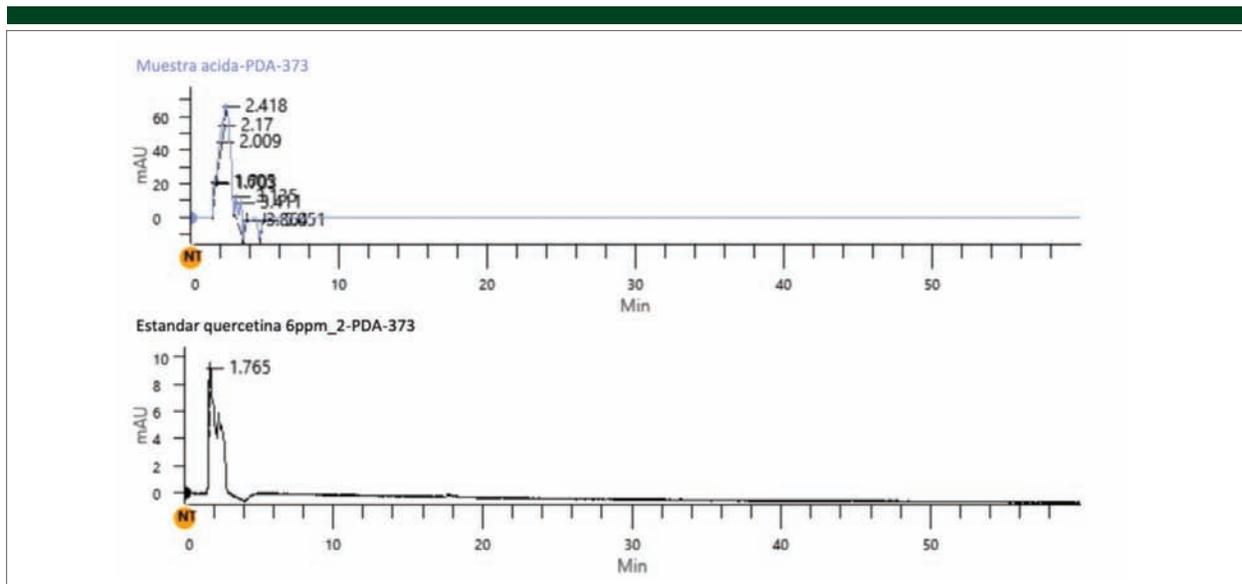


Figura 2. Cromatogramas de la corrida no 2: gradiente, metanol (A) y H_3PO_4 0.08% (B). De 0 a 15 min: 100% A; de 16 a 40 min: 100% - 80% A (0 a 20% B); de 41 a 60 min: 80% - 60% A (20 a 40% B).

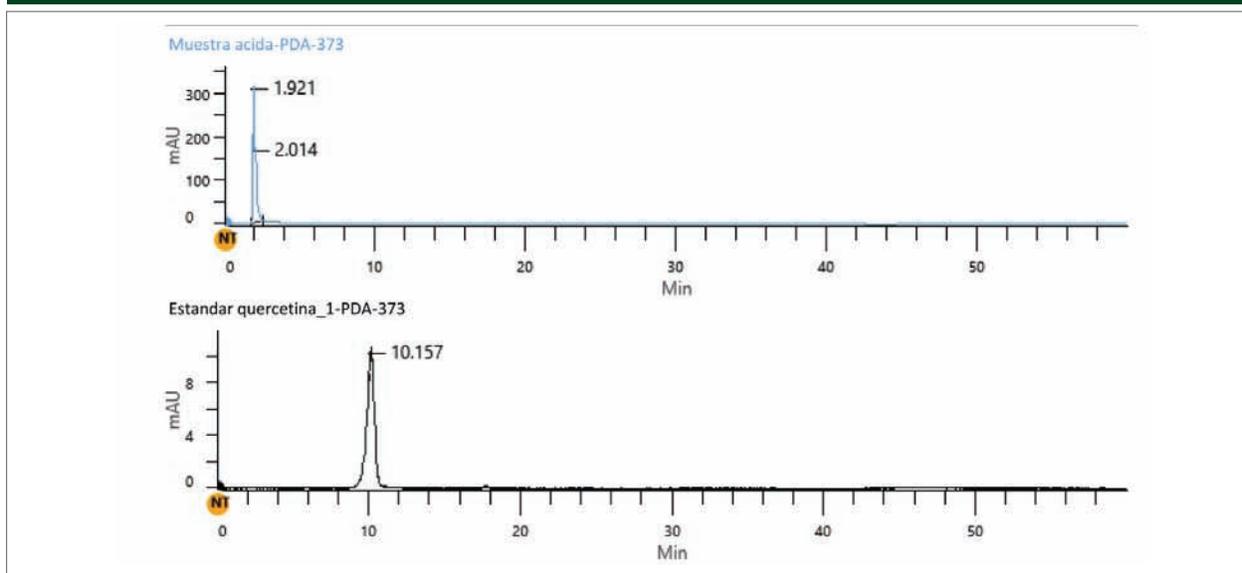


Figura 3. Cromatogramas de la corrida no 3: gradiente, metanol (A) y H_3PO_4 0.08% (B). De 0 a 15 min: 60% - 80% A (40 a 20% B); de 16 a 40 min: 80% - 100% A (20% a 0% B); de 41 a 60 min: 100% A.

Al utilizar los parámetros de la corrida número 2, se observa en el cromatograma de la muestra que todos los compuestos eluyeron al mismo tiempo, por lo que no hubo una buena separación de los analitos (ver figura no. 2). Además, el cromatograma del estándar no muestra un pico definido, haciendo que no se pudiera determinar el tiempo de retención de la quercetina. Por otro lado, en la corrida número 3, el estándar de quercetina eluía en el minuto 10.157, mientras que en el cromatograma de la muestra no se presentaba ningún pico en ese tiempo (ver figura no. 3). Derivado a estas razones, se escogió los parámetros de fase móvil de la corrida 1 para realizar la validación del método, y se acortó el tiempo de corrida a 5 minutos. Cabe mencionar que se utilizó la muestra acidificada para realizar las pruebas, debido a que se ha

encontrado en la literatura que la concentración de quercetina libre en el ginkgo es relativamente bajo o casi indetectable (Wohlmuth et al, 2014).

En otros métodos encontrados en la literatura, como el de Ding et al., (2006), la quercetina eluyó después de los 30 minutos; en el de Dubber & Kanfer (2004), el analito eluía en el minuto 19.879; y en el método de Gray et al., (2005) a los 11 minutos, lo cual muestra que el método diseñado y validado posee una mejor eficiencia. Por otro lado, la longitud de onda para la cuantificación fue de 373 nm, lo cual concuerda con el valor reportado en varios estudios encontrados en la literatura y también con el que recomienda la USP ($\lambda = 370$ nm) (Demirezer et al., 2014; Ding et al., 2006; Dubber & Kanfer, 2004; Gray et al.,

Validación del método analítico

Especificidad: para determinar la especificidad, se comparó el tiempo de retención en el cromatograma del estándar con el de la muestra, al igual que se calculó la resolución de la columna para ambas muestras. El tiempo de retención promedio para el estándar fue de 3.330 minutos, lo cual es un valor similar para la muestra A (3.358 minutos) y para la muestra B (3.350 minutos), por lo que se logró identificar el analito de interés (ver tabla no. 3).

La resolución de la columna permite evaluar la separación del analito de los otros compuestos en la matriz (Skoog et al., 2015). Según la AOAC se suele buscar una resolución de al menos 1.5, aunque se puede utilizar un valor de 1.0 para una separación

mínima utilizable; mientras que la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) sugiere una resolución de al menos 2. Según los resultados de la tabla no. 6, la resolución promedio fue de 1.544 y 1.996 para la muestra A y B, respectivamente. Por lo que el método consiguió separar la quercetina de los otros compuestos en la matriz en ambas muestras.

Linealidad: en la figura no. 4 y 5 se muestra el modelo de regresión utilizando los datos del día 1 y 2, respectivamente. La AOAC recomienda que el R^2 sea mayor de 0.99 (>0.99) (AOAC, 2002). Según los resultados, tanto las ecuaciones del día 1 y 2 cumplen con este criterio. Sin embargo, se puede observar que el valor de R^2 es más alto en el día 1.

Tabla 3. Resultados de la especificidad del método analítico para la cuantificación de quercetina en cápsulas de ginkgo.

	Tiempo de retención ¹		Resolución de la columna ²	
	Promedio (min)	%CV	Promedio	%CV
Estándar	3.330	0.228	No aplica	No aplica
Muestra A	3.358	0.578	2.6172	13.20
Muestra B	3.350	0.200	3.3829	3.587

¹ Se obtuvo el promedio del tiempo de retención de todas las soluciones hijas usadas para obtener la regresión lineal del primer día, y de los extractos neutros y ácidos de la muestra A y B, respectivamente.

² La Rs se calculó utilizando el cromatograma del extracto ácido, ya que el pico correspondiente a quercetina era mayor.

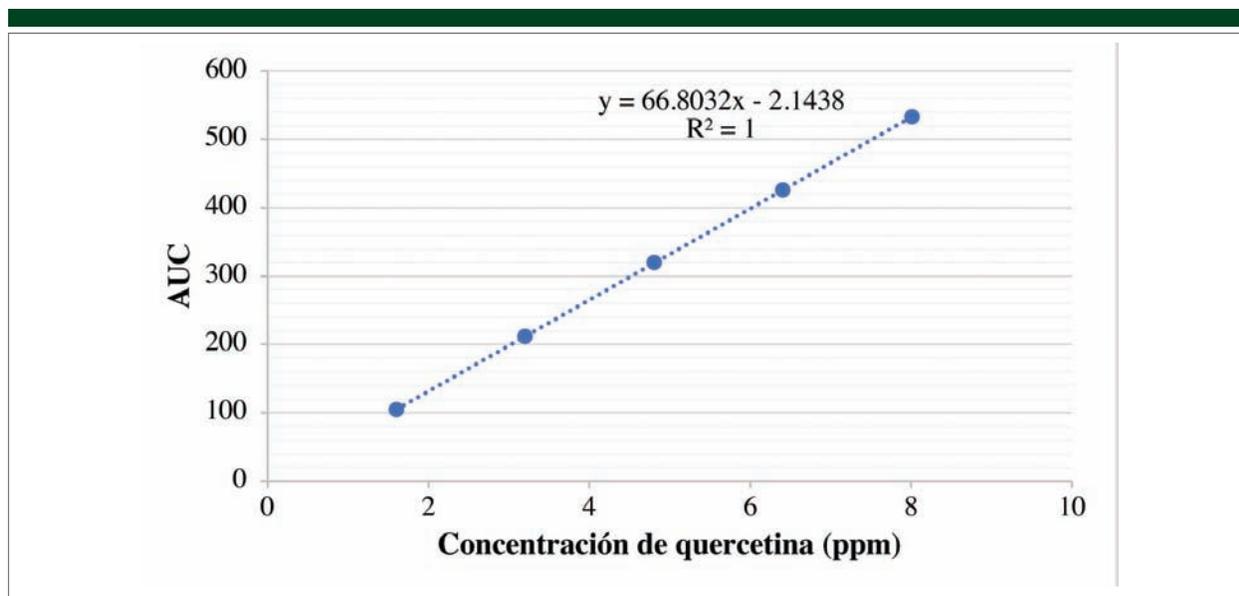


Figura 4. Regresión lineal del área bajo la curva (AUC) respecto a la concentración de un estándar de quercetina, día 1.

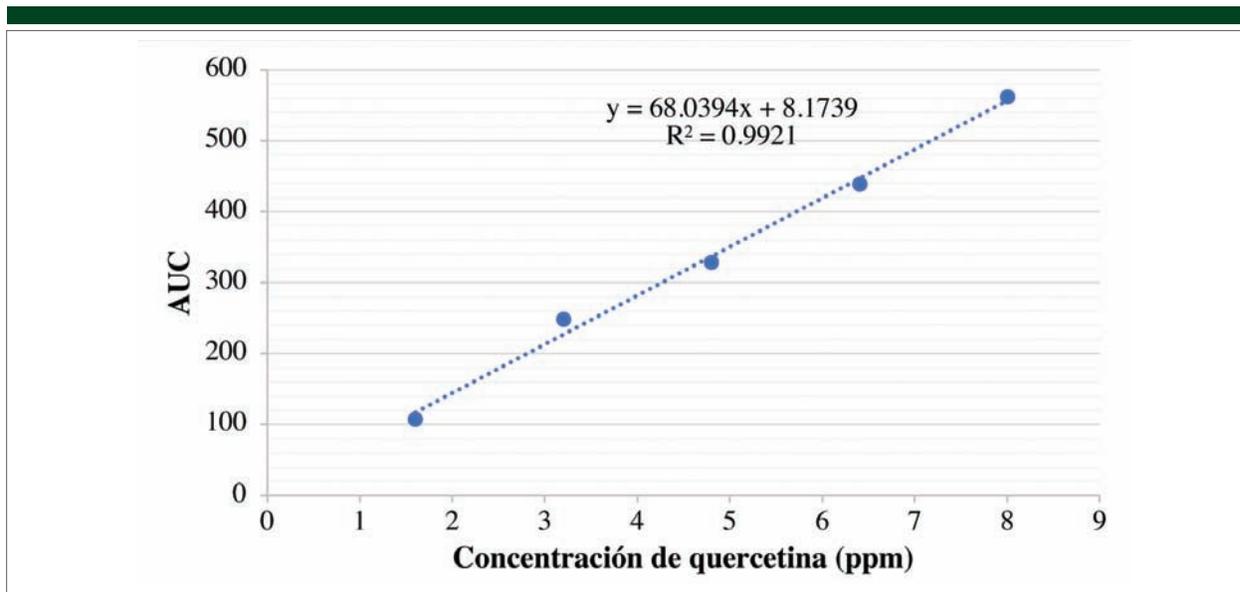


Figura 5. Regresión lineal del área bajo la curva (AUC) respecto a la concentración de un estándar de quercetina, día 2.

Tabla 4. Resultados de la exactitud y precisión del método cromatográfico para la cuantificación de quercetina en cápsulas de ginkgo.

	Concentración teórica (ppm)	Concentración experimental (ppm)		Porcentaje de recuperación (%)
		Promedio	%CV	
Día 1	2.403	2.485	0.210	103.4
	4.00419	4.0416	0.239	100.9
	5.606	5.685	0.452	101.4
Día 2	2.403	2.323	1.42	96.68
	4.00419	3.926	0.533	98.043
	5.606	5.615	0.499	100.2

Exactitud: se calculó el porcentaje de recuperación del analito utilizando tres estándares de quercetina a una concentración conocida. Las mismas disoluciones fueron inyectadas en dos días diferentes, de la misma forma en que se llevó a cabo para la linealidad. Según los resultados que se muestran en la tabla no. 4, se obtuvo una recuperación arriba del 100% para el día 1, por lo que se considera que el método tiene una exactitud aceptable. Sin embargo, luego de almacenar los estándares por cuatro días en condiciones de refrigeración normal (día 2), el porcentaje de recuperación disminuyó.

Los flavonoides son caracterizados por ser antioxidantes, ya que tienen la capacidad de captar los radicales libres (Dewick, 2002). Debido a que los estándares se almacenaron en balones aforados

transparentes, la luz pudo haber afectado la estabilidad de la molécula, provocando la disminución en el porcentaje de recuperación. Se recomienda utilizar balones ámbar para proteger los estándares de la luz, y así poder determinar si es un factor que afecta la robustez del método.

Precisión: para evaluar la repetitividad, se obtuvo el %CV del área bajo la curva de las disoluciones estándar de quercetina utilizadas para la linealidad y la exactitud. Como se puede observar en la tabla no. 4 y 5, respectivamente, el %CV del AUC de las soluciones hijas de quercetina que se utilizó para calcular la regresión lineal y los resultados de exactitud muestran un valor menor al 1%. Por lo que hay repetitividad en los datos y el valor de la media sí es representativo para la muestra. Esto

Tabla 5. Estadística descriptiva del tiempo de retención (t_R) y área bajo la curva (AUC) de las soluciones hijas de quercetina utilizadas para la linealidad.

Concentración de quercetina (ppm)	Día 1				Día 2			
	t_R (min)		AUC		t_R (min)		AUC	
	Promedio	%CV	Promedio	%CV	Promedio	%CV	Promedio	%CV
1.602	3.337	0.110	104.8585	0.231	3.337	0.110	107.4591	2.103
3.203	3.337	0.067	211.3210	0.340	3.337	0.067	248.2841	1.529
4.805	3.330	0.057	319.5597	0.515	3.332	1.441	328.9296	0.806
6.407	3.327	0.067	426.0209	0.473	3.327	0.067	438.7536	1.240
8.008	3.327	0.341	532.4687	0.407	3.327	0.341	562.0896	0.489

Tabla 6. Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) del método cromatográfico para la cuantificación de quercetina en cápsulas de ginkgo.

	LOD (ppm)	LOQ (ppm)
Día 1	0.00169	0.00513
Día 2	0.00174	0.00528

Tabla 7. Promedio de la concentración de quercetina total, aglicona y su respectiva proporción en las muestras analizadas.

Muestra	Quercetina total ¹ (% p/p)	Aglicona ² (% p/p)
A	0.02761 ± 0.00015	0.000104 ± 0.00019
B	0.4764 ± 0.0019	0.4152 ± 0.0027

¹ Resultado obtenido a partir del extracto hidrolizado

² Resultado obtenido a partir del extracto metanólico

Tabla 8. Porcentaje de quercetina glucosilada en las muestras comerciales de cápsulas de ginkgo.

	Porcentaje de quercetina glucosilada (%p/p) Quercetina total ¹ x 2.51	Porcentaje de quercetina glucosilada (%p/p) (Quercetina total ¹ - aglicona ²) x 2.51
A	0.0693 ± 0.0004	0.0690 ± 0.0001
B	1.196 ± 0.005	0.154 ± 0.002

último también le da mayor validez al modelo de regresión, ya que se calculó utilizando la media del AUC de las disoluciones hijas de quercetina.

Para determinar la precisión intermedia del método, se determinó el %CV del AUC y del tiempo de retención de las disoluciones hijas, y el R^2 de la regresión lineal en dos días diferentes. Con respecto a la linealidad del día 2, el R^2 de la regresión lineal mostró tener una disminución en su valor, aunque todavía cumple con el criterio de aceptación que establece la AOAC ($R^2 > 0.99$). La significancia del modelo de regresión siguió siendo significativa, aunque el valor-p aumentó. Por último, %CV del AUC y del tiempo de retención de las disoluciones hijas mostraron ser mayores a comparación del día 1 (ver tabla no. 5). Derivado al aumento de la variabilidad de los datos obtenidos del equipo, y la disminución de la bondad de ajuste, se recomienda realizar el análisis el mismo día en que fueron preparadas las disoluciones.

LOD y LOQ: el LOD y LOQ para el método y se muestran en la tabla no. 6. A pesar de que el RTCA establece que el LOD y LOQ solamente es necesario para los ensayos de impurezas, en esta investigación se decidió tomarlo en cuenta ya que en un producto herbolario la concentración del principio activo puede variar. Por lo que el LOD y LOQ se puede tomar como una referencia en caso de que el porcentaje del analito se encuentre debajo de este valor.

Concentración de quercetina glucosilada en dos marcas comerciales de cápsulas de ginkgo. La concentración de quercetina glucosilada se calculó de dos formas: 1) multiplicar por 2.51 la concentración de quercetina total (extracto hidrolizado) y 2) realizando una resta entre la quercetina total (extracto hidrolizado) y la porción de aglicona (extracto neutro), por el factor de conversión. Los resultados se muestran en la tabla no. 7 y 8.

En la muestra A, se calculó que la concentración de quercetina glucosilada promedio es de $0.0693\% \pm 0.0004\%$ al utilizar el factor de conversión. Al utilizar el segundo método (% de quercetina total menos % de aglicona, por 2.51), se puede observar que no hay mucha diferencia entre ambos valores. En los cromatogramas del extracto hidrolizado y metanólico (figura no. 6 y 7), se observa que las gráficas se asimilan mucho al de

un extracto de ginkgo natural, según lo reportado por Wohlmuth et al. (2014) (ver la figura no. 8). Según la literatura, la cantidad de flavonoides libres en el ginkgo es bajo e incluso indetectable (Demirezer et al., 2014; Dubber & Kanfer, 2004; Sloley et al., 2003; Wohlmuth et al., 2014). Sin embargo, en esta muestra todavía se logró cuantificar la aglicona, ya que la concentración todavía estaba arriba del LOQ del método.

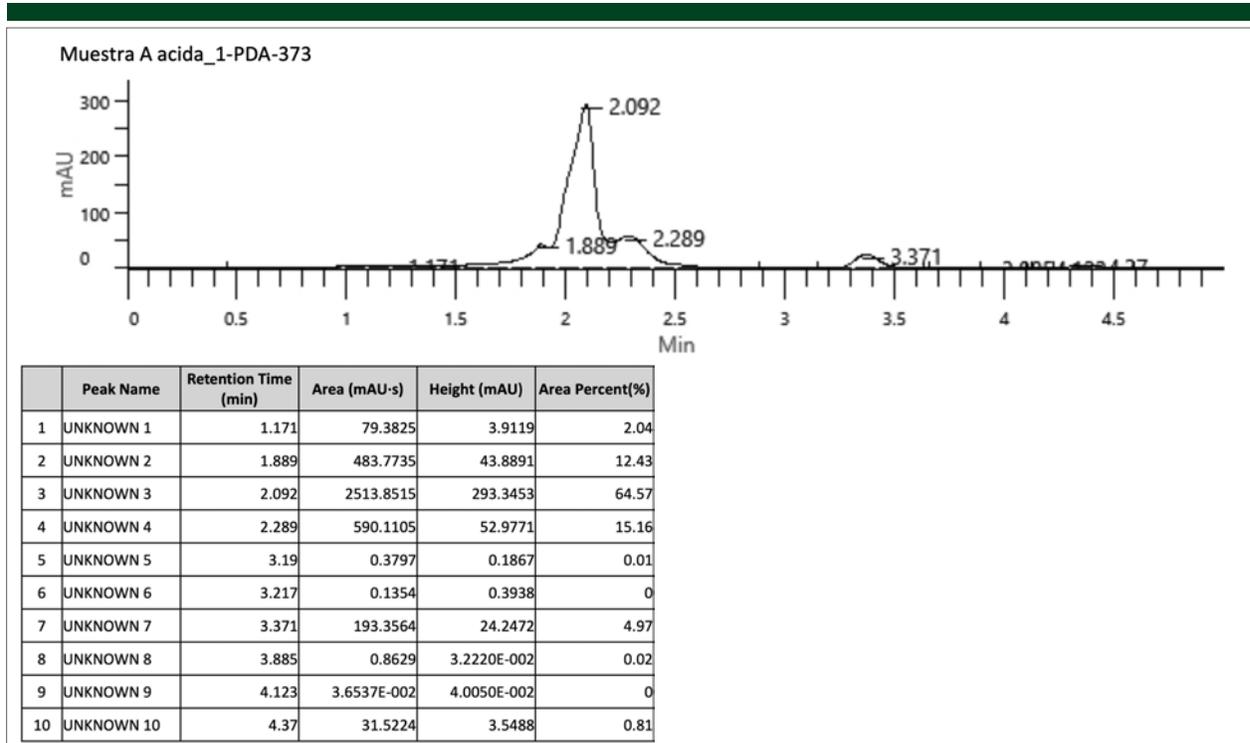


Figura 6. Cromatograma del extracto hidrolizado de la muestra A. t_R promedio del estándar de quercetina = 3.330 minutos.

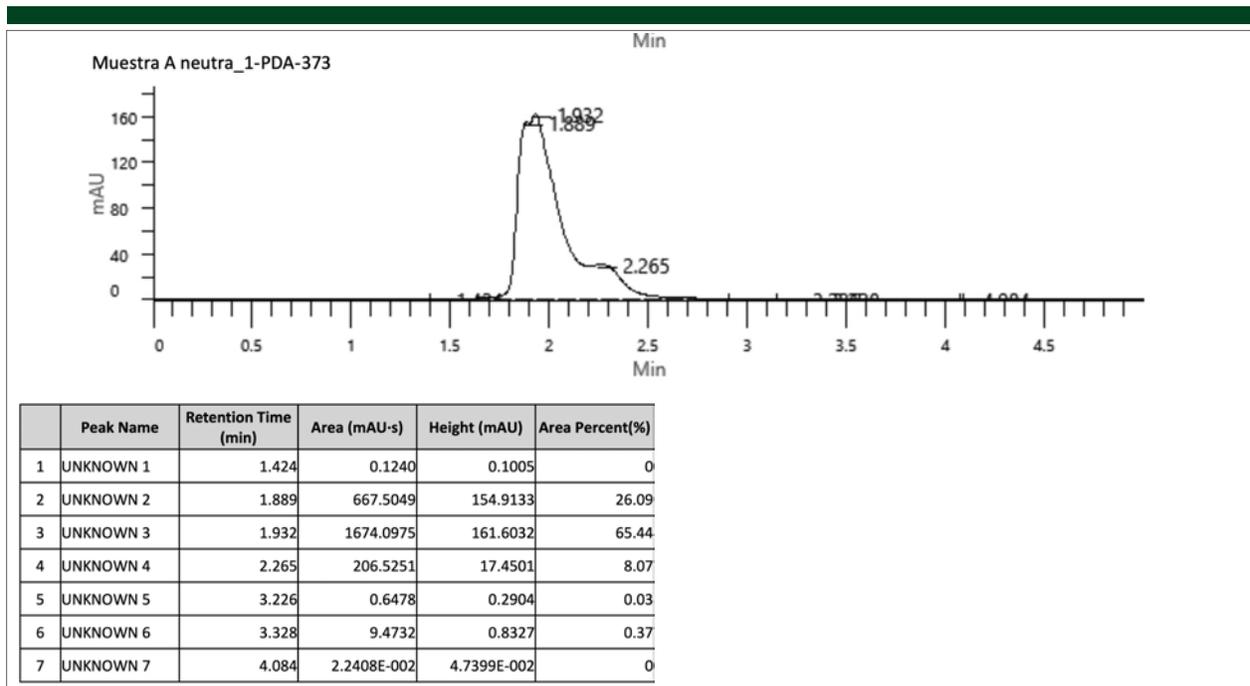


Figura 7. Cromatograma del extracto metanólico de la muestra A. t_R promedio del estándar de quercetina = 3.330 minutos.

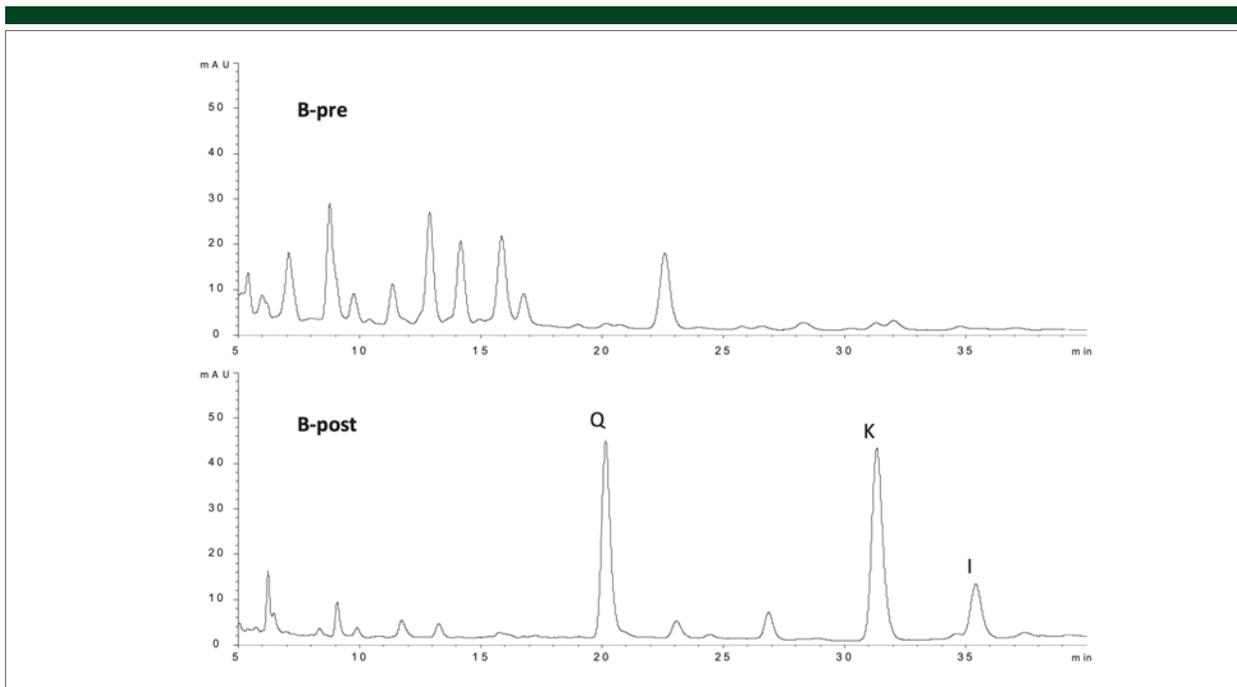


Figura 8. Cromatograma de un extracto de hojas naturales de *Ginkgo biloba* L., antes de hidrolizar (B-pre) y después de hidrolizar (B-post) (Wohlmuth et al., 2014).

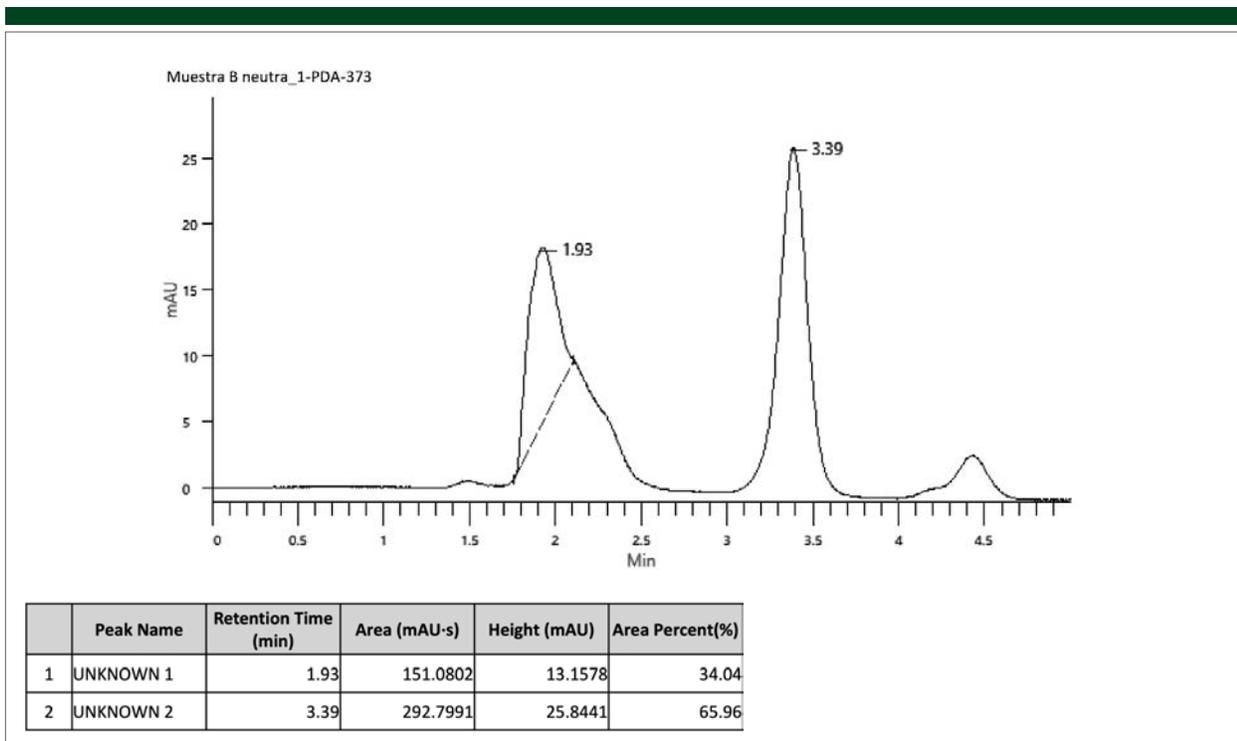


Figura 9. Cromatograma del extracto metanólico de la muestra B (extracto neutro), detectado a 373 nm. t_R promedio del estándar de quercetina = 3.330 minutos.

Caso contrario con la muestra B, hay una gran diferencia en el valor de la concentración de quercetina glucosilada obtenido entre los dos métodos utilizados. Como se puede observar en la tabla no. 8, al multiplicar por el factor de conversión la cantidad de quercetina obtenida a partir del extracto hidrolizado, se reporta que el porcentaje de quercetina glucosilada es de $1.196\% \pm 0.005\%$. Al utilizar el segundo método, el valor

disminuye a $0.154\% \pm 0.002\%$, debido a que la cantidad de quercetina detectado en el extracto metanólico e hidrolizado es muy similar: $0.4152\% \pm 0.0027\%$ y $0.4764\% \pm 0.0019\%$, respectivamente. Estos valores se pueden evidenciar en los cromatogramas de la muestra B, donde el área bajo la curva correspondiente al pico de la quercetina es muy similar entre ambos extractos (ver figura no. 9 y 10).

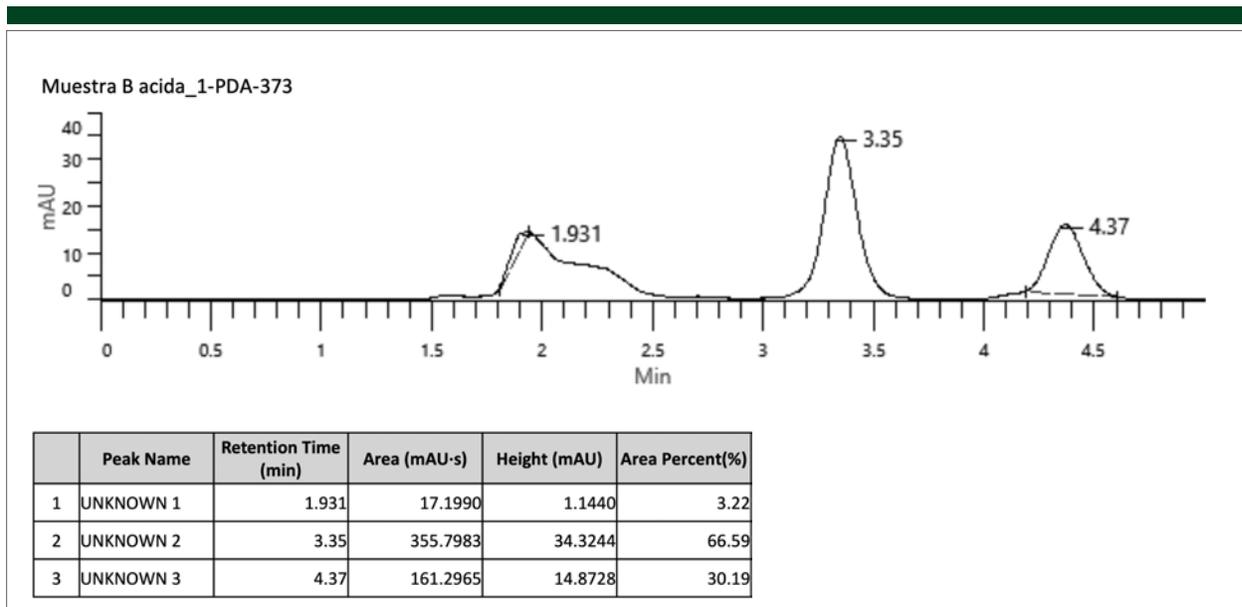


Figura 10. Cromatograma de la muestra B luego de la hidrólisis ácida, detectado a 373 nm, t_R promedio del estándar de quercetina = 3.330 minutos.

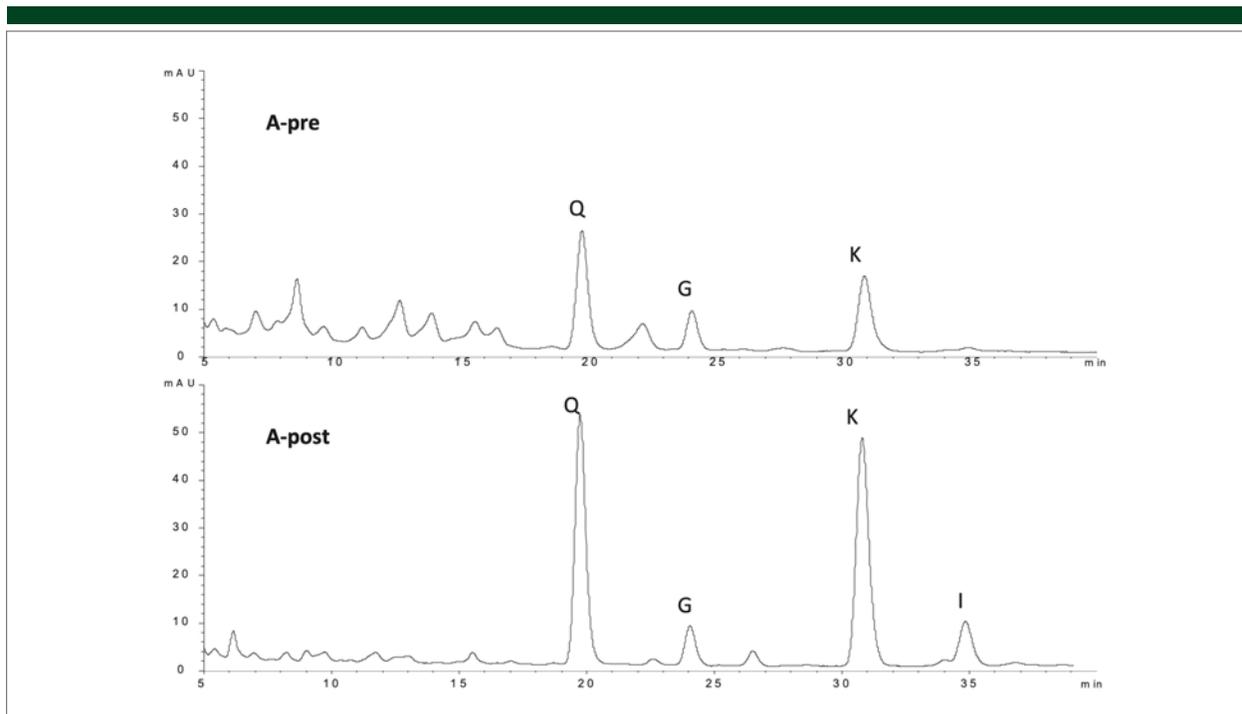


Figura 11. Cromatograma de un producto comercial de ginkgo adulterado, antes de hidrolizar (A-pre) y después de hidrolizar (A-post) (Wohlmuth et al., 2014).

Según Wohlmuth et al. (2014), los productos de ginkgo que han sido adulterados muestran un perfil cromatográfico en donde se puede observar un pico notorio en el extracto que no ha sido hidrolizado, por lo que se puede deducir que el producto ha sido fortificado con la intención de aumentar la señal del equipo, luego de que haya sido tratado en medio ácido, tal como se observa en la figura no. 11. Debido a que los métodos

oficiales, como el de la USP, solamente se inyecta al equipo cromatográfico la muestra hidrolizada, las aglicona que se le añade intencionalmente al producto resultan ser opacados.

Entre las principales limitantes de este estudio es que solamente se contaba con un estándar de los tres flavonoides que debe tener los productos de ginkgo, al igual que no se consideró las

concentraciones de los ginkgólidos debido a la falta de recursos. Para poder determinar si las muestras analizadas cumplen con los criterios de un extracto de ginkgo en su monografía, este debe contener más de >24% de flavonoides glucosilados de kaempferol, quercetina e isorhamnetina, y >6% de ginkgólidos.

Se recomienda evaluar si el método propuesto también permite separar, identificar y cuantificar el kaempferol y la isorhamnetina con una buena resolución y en el menor tiempo de corrida. Por otro lado, para los futuros análisis de calidad de los productos de ginkgo, se propone efectuar el tratamiento de la muestra tanto en medio ácido como neutro, con la finalidad de distinguir entre un producto natural o adulterado con la aglicona del flavonoide. Para calcular la concentración real de quercetina glucosilada, se sugiere multiplicar por el factor de conversión (2.51) luego de efectuar la resta entre el flavonoide total y la aglicona.

Conclusiones

Se diseñó y se validó un método analítico para cuantificar quercetina en cápsulas comerciales de ginkgo con una buena resolución de columna y con un tiempo de corrida menor que los otros métodos encontrados en la literatura, al igual que se logró determinar la especificidad, linealidad, exactitud, precisión, LOD y LOQ del método, que cumplen con los criterios que establecen las guías de la ICH y AOAC para la validación de métodos analíticos.

Se cuantificó la concentración de quercetina glucosilada en las muestras comerciales de cápsulas de ginkgo de venta libre en Guatemala. Se sospecha que la muestra B puede estar adulterado con quercetina libre, ya que la concentración de aglicona mostró ser demasiado alta para un extracto de ginkgo natural. Para los futuros análisis de calidad de los productos de ginkgo, se propone efectuar el tratamiento de la muestra tanto en medio ácido como neutro, con la finalidad de distinguir entre un producto natural o adulterado con la aglicona del flavonoide.

Bibliografía

- Anderson, D., Sweeney, D., Williams, T., Camm, J., & Cochran, J. (2016). *Estadística para negocios y economía* (12th ed.). Cengage Learning.
- AOAC. (2002). Guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals. *AOAC International*, 1-38.
- Demirezer, L. Ö., Büyükkaya, A., Uçaktürk, E., Kuruüzüm-Uz, A., Güvenalp, Z., & Palaska, E. (2014). Adulteration determining of pharmaceutical forms of Ginkgo biloba extracts from different international manufacturers. *Records of Natural Products*, 8(4), 394-400.
- Dewick, P. (2002). *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach* (2nd ed.). John Wiley & Sons Ltd.
- Ding, S., Dudley, E., Plummer, S., Tang, J., Newton, R. P., & Brenton, A. G. (2006). Quantitative determination of major active components in Ginkgo biloba dietary supplements by liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom*, 24, 1457-1466. <https://doi.org/10.1002/rcm>
- Dubber, M.-J., & Kanfer, I. (2004). High-performance liquid chromatographic determination of selected flavonols in Ginkgo biloba solid oral dosage forms. *J Pharm Pharmaceut Sci*, 7(3). [https://sites.ualberta.ca/~csp/JPPS7\(3\)/I.Kanfer/ginkgo.htm](https://sites.ualberta.ca/~csp/JPPS7(3)/I.Kanfer/ginkgo.htm)
- Gray, D., Levanseler, K., & Pan, M. (2005). Determination of Flavonol Aglycones in Ginkgo biloba Dietary Supplement Crude Materials and Finished Products by High-Performance Liquid Chromatography: Single Laboratory Validation. *Journal of AOAC International*, 88(3), 692. <https://doi.org/10.1093/jaoac/88.3.692>
- Hashiguchi, M., Ohta, Y., Shimizu, M., Maruyama, J., & Mochizuki, M. (2015). Meta-analysis of the efficacy and safety of Ginkgo biloba extract for the treatment of dementia. *Journal of Pharmaceutical Health Care and Sciences*, 1(1). <https://doi.org/10.1186/S40780-015-0014-7>
- ICH. (1995). *ICH Topic Q 2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5_en.pdf
- Luo, Y., & Cao, Z. (2009). Ginkgo biloba Extract in Prevention of Age-Associated Diseases in Elderly Population. In *Complementary and Alternative Therapies in the Aging Population* (1st ed.). Elsevier.
- Skoog, D., West, D., Holler, F., & Crouch, S. (2015). *Principios de análisis instrumental* (6th ed.). Cengage Learning.
- Sloley, B. D., Tawfik, S. R., Scherban, K. A., & Tam, Y. K. (2003). Quality control analyses for Ginkgo extracts require analysis of intact flavonol glycosides. *Journal of Food and Drug Analysis*, 11(2), 102-107. <https://doi.org/10.38212/2224-6614.2718>
- USP. (2019). *Farmacopea de Estados Unidos* (42nd ed.). The United States Pharmacopeial Convention.
- Wohlmut, H., Savage, K., Dowell, A., & Mouatt, P. (2014). Adulteration of Ginkgo biloba products and a simple method to improve its detection. *Phytomedicine*, 21(6), 912-918. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2014.01.010>

Agradecimientos

Se extiende un agradecimiento especial a la Licda. Ana Luisa Mendizábal, Licda. María José Bran y al Doctor Éfego Rolando López, por el apoyo y la asesoría brindada para poder llevar a cabo este estudio de investigación. Al igual que se agradece a la Universidad del Valle de Guatemala por brindar el espacio y los recursos necesario para realizar la investigación.