

Desarrollo de un método de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) para la separación y cuantificación de diosgenina en un extracto del fruto iguaraya de la planta cardón guajiro (*Stenocereus griseus*)

Emerson Eliecer León Ávila

Facultad de Ciencias, Programa de química farmacéutica, Universidad El Bosque.
Grupo de Investigación en Química Aplicada (INQA) Bogotá, Colombia.

leonemerson@unbosque.edu.co

Recibido: 01/02/2023

Revisado: 24/03/2023

Aceptado: 31/07/2023

Resumen

La comunidad indígena Wayuú (La Guajira, Colombia), ha tratado enfermedades con recursos naturales de su entorno. Uno de los recursos más utilizados en esta región para el tratamiento de enfermedades de tipo gastrointestinal, son las infusiones de la iguaraya, un fruto de la planta cardón guajiro. Teniendo en cuenta que un buen número de saponinas poseen propiedades antiinflamatorias, el presente trabajo estudia la diosgenina, una saponina que puede estar presente en un extracto metanólico de la pulpa del fruto, desarrollando un método de separación y cuantificación del analito por medio de cromatografía líquida de alta resolución con un detector UV-VIS y posteriormente validando el procedimiento para garantizar la exactitud, precisión, linealidad, selectividad, reproducibilidad y robustez de los resultados.

Palabras claves: cromatografía líquida; diosgenina; iguaraya; validación

Abstract

Development of a high efficiency liquid chromatography (HPLC) method for the separation and quantification of diosgenin in an extract of the iguaraya fruit of the Cardón Guajiro plant (*Stenocereus griseus*). The native community Wayuú (Guajira, Colombia) has treated several body illnesses using natural resources from their surroundings. One of these resources, used mainly for gastrointestinal matters, is the infusion of the Iguaraya, fruit from a local Tree called "Cardon guajiro". Considering that a significant group of Saponins has anti-inflammatory properties, this research focuses on the study of the Diosgenin, saponin which might be present on the extract of the mentioned fruit. This project intends to develop a method in order to separate and quantity through high resolution liquid chromatography with a detector UV-VIS and subsequently, assessing the procedure in order to quarante the accuracy, linearity, selectivity, reproducibility and the robustness of the final results.

Keywords: Liquid chromatography; Diosgenin; Iguaraya; Validation

Introducción

Stenocereus griseus conocido como cardón guajiro, es una planta que pertenece a la familia *Cactaceae*, especie endémica de Colombia, encontrado en el departamento de La Guajira, el fruto de esta planta es conocido como la iguaraya, consumido frecuentemente por los indígenas de la Península de la Guajira (pueblo Wayuú) en infusiones con agua, como tratamiento tradicional, debido a los conocimientos ancestrales pertenecientes a esta etnia¹, para el tratamiento de enfermedades de tipo gastrointestinal, en donde se destacan propiedades curativas para el dolor estomacal como antiespasmódico y en personas con colitis como antiinflamatorio. Sin embargo, las propiedades que se le han atribuido a la iguaraya corresponden al conocimiento empírico generado por la comunidad Wayuú y no se cuenta con una base científica sólida que verifique la composición de la iguaraya y la relación de dichos componentes con los posibles usos farmacéuticos para el tratamiento medicinal alternativo.

Las saponinas (glucósidos triterpenoides) han demostrado una importante actividad antiinflamatoria² mediada por la inhibición de la síntesis y liberación de sustancias proinflamatorias tales como las citocinas, las cuales son proteínas reguladoras de las respuestas inmunitaria e inflamatoria; así como también inhiben la producción de mediadores inflamatorios, la iguaraya es un fruto que puede contener saponinas, analito de interés para cuantificar por las propiedades anteriormente mencionadas³.

Con base en lo anterior, este proyecto busca desarrollar y validar un método para separar y cuantificar por cromatografía líquida de alta eficiencia con detector UV/VIS, la diosgenina, una saponina que posiblemente puede estar presente en la iguaraya, validando el método de separación por medio de parámetros como la exactitud, precisión, selectividad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, y robustez, siguiendo las directrices de la guía ICH Q2, validación de procesos analíticos⁴, a través de curvas de calibración que permitan encontrar la concentración de este analito.

Parte experimental

*Obtención del extracto de la pulpa y semillas de *Stenocereus griseus**

Para el tratamiento de la materia prima, recolectada en la rancharía Laachon del corregimiento de Mayapo, perteneciente al municipio de Manaure, La Guajira-Colombia se decidió realizar una extracción por maceración dinámica, ya que es uno de los métodos convencionales más usados para este fin y lograr obtener el extracto que puede contener diosgenina (saponina). Las saponinas poseen en su estructura química una parte polar (azúcar) y una apolar, sapogenina⁵, sin embargo, se ha demostrado experimentalmente que se pueden obtener extractos con buen porcentaje de recuperación, empleando únicamente solventes polares. Se procedió a realizar la extracción con metanol, etanol, acetona y diclorometano.

Para preparar la muestra se tomó la fruta madura de iguaraya, eliminando la cáscara y obteniendo únicamente como fuente de trabajo la pulpa. Posteriormente, se disminuyó el tamaño de partícula. El producto resultante fue congelado y liofilizado, en un equipo BUCHI Lyovapor TM L-200, a 0,100 mbar y -58,6 °C. Se pesaron 26,2433 g de la pulpa y se adicionó el disolvente polar correspondiente. El extracto se obtuvo mediante maceración dinámica a 200 rpm por 24 horas. Finalmente, los extractos fueron filtrados al vacío para eliminar impurezas y componentes no disueltos.

Para poder trabajar con un patrón de referencia que permita soportar el estudio, se adquirió por Sigma Aldrich el estándar diosgenina (CAS 512-04-9) marca TRC Canadá, con una pureza de $\geq 95\%$. Para la curva de calibración se preparó una solución madre con diosgenina de 1000 ppm; la solución fue sometida a tratamiento con ultrasonido por 5 minutos. Se hicieron diluciones en rango de 5 ppm a 800 ppm.

Resultados y discusión de resultados

Separación de diosgenina de la matriz

La diosgenina es una molécula con carácter ligeramente polar que exhibe alta solubilidad en agua; por lo tanto, la técnica más adecuada para trabajar fue la cromatografía de fase inversa⁶ (RP-HPLC). Inicialmente, se hicieron pruebas paralelas, tanto de la solución madre como de los extractos de la iguaraya para poder reconocer el comportamiento de estos, frente a diferentes condiciones cromatográficas. Se hicieron variaciones controladas de componentes y las proporciones de la fase móvil, del flujo y longitudes de onda, entre otras. Se analizaron los tiempos de retención, la simetría de los picos, la selectividad, la repetibilidad y la reproducibilidad para comprender la complejidad de la matriz⁷.

Dado que la polaridad de los grupos funcionales presentes en el analito determina el orden de elución de los compuestos y reconociendo la presencia de grupos funcionales orgánicos en la diosgenina, se esperaba que los tiempos de retención sean me-

nores a los 15 minutos. El tiempo de retención puede verse alterado cambiando la polaridad de la fase móvil, se ajustó la proporción de acetonitrilo:agua, para reconocer la composición de fase móvil adecuada para lograr obtener el pico característico tanto para el patrón como para el analito dentro de la matriz de los extractos obtenidos, sea selectivo y con una distribución normal superior del 95,45% de los valores en el intervalo que presenta la forma de la campana gaussiana, que permita evaluar estadísticamente el área bajo la curva y pueda cuantificar la concentración de la sustancia de estudio con una confianza y reproducibilidad⁸.

Selección de las condiciones cromatográficas

Con una solución de concentración conocida del estándar, se efectúa un barrido en el espectrofotómetro Genesys® 10S UV-VIS marca Thermo Scientific para determinar la longitud de máxima absorción, la cual es de 194 nm. Posterior se realizaron corridas de patrón y los diferentes extractos con disolventes polares (metanol, etanol, acetona y diclorometano) del fruto de iguaraya, aplicando un algoritmo para controlar las variables según los resultados obtenidos. Después de realizar múltiples ensayos y buscando la mejor resolución del pico de diosgenina, separado de los demás picos correspondientes a los componentes de los extractos obtenidos, se encontró que las condiciones que permiten una separación y cuantificación con alto grado de repetibilidad, selectividad y robustez se presentan en la tabla 1.

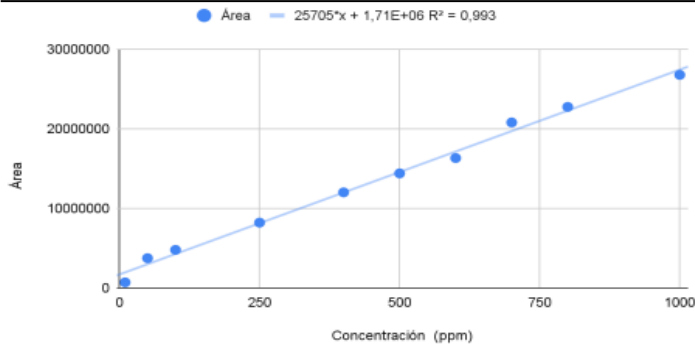
Tabla 1. Condiciones establecidas en el desarrollo del método cromatográfico.

Flujo	1 mL/min
Volumen de inyección	10 μ L
Fase móvil	90:10 ACN:Agua
Fase estacionaria	Columna Ultra AQ C18
Tiempo de análisis	10 min
Detector	UV- VIS a 194 nm
Temperatura	35 °C

Para este caso de la extracción de diosgenina en la pulpa de la iguaraya, dada la señal arrojada por el equipo de cromatografía líquida de alta eficiencia y la comparación de los resultados con el estándar, la mayor intensidad obtenida fue dada por el extracto tratado con metanol, soportando esto en que la intensidad de la señal, en ese tiempo de retención específico, está relacionado directamente con la concentración del analito^{7,9}.

Curva de calibración

A partir de las diferentes concentraciones evaluadas por triplicado se obtuvo una curva con un $R^2 > 0,99$, como se puede observar en la gráfica 1. Con base en lo anterior, se puede inferir que la curva de calibración presenta buena relación de área bajo de curva del pico con respecto a la concentración de patrón diosgenina¹⁰, lo que permite resultados confiables para cuantificar el analito en la pulpa del fruto iguaraya con base en las áreas obtenidas.



Grafica 1. Curva de calibración empleando el estándar diosgenina.

Separación y cuantificación de diosgenina presente en *Stenocereus griseus* por HPLC:

En cuanto a la separación y cuantificación de diosgenina por cromatografía líquida de alta eficiencia, se determinó que en fase reversa y con las condiciones adecuadas se puede lograr obtener resultados con sensibilidad, exactitud, precisión y robustez.

En el cromatograma de la figura 1, se puede apreciar el pico característico en un tiempo de retención (t_R) 7,16 minutos, el cual es el mismo tiempo de retención obtenido para el estándar de diosgenina ($\approx t_R = 7,20$ min), posterior a esto se realizó una adición de patrón al extracto y se evidenció un incremento en la intensidad del pico en ese tiempo de retención, lo que posiblemente permite considerar que se está encontrando una señal característica de la diosgenina. Para este estudio se trabajó con el método de estándar externo y el área bajo la curva del pico obtenido fue de 2.642.171, determinando que la concentración de diosgenina (saponina) presente en el extracto metanólico del fruto iguarraya fue de 36,36 ppm.

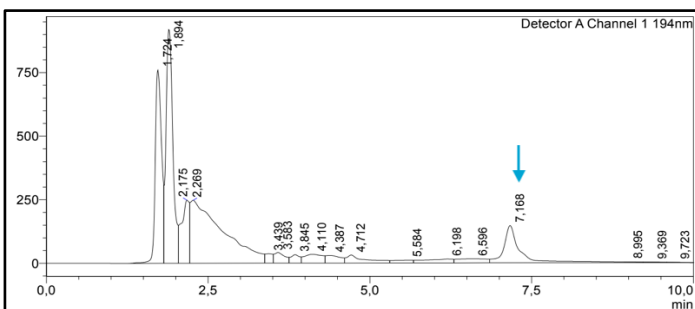


Fig. 1: Cromatograma obtenido del extracto de iguarraya bajo condiciones del método desarrollado a 194 nm.

Validación del método

Se siguieron las guías para la validación de métodos analíticos descritos⁹. A partir de estas pautas, se hizo la evaluación de los siguientes parámetros:

I. Linealidad. Se determinó por medio de la curva de calibración, para la cual se prepararon diluciones en concentraciones en un rango entre 5 ppm y 1000 ppm del estándar y se inyectaron por triplicado. Se obtuvo la curva y la respectiva ecuación de regresión. Los coeficientes de correlación, y determinación fueron calculados. Adicionalmente, se hizo un test estadístico de student.

Se utilizó la ecuación 1 para calcular el valor del coeficiente de regresión lineal (r), el cual es un valor determinante para la linealidad.

$$r = \frac{\Sigma X*Y - (\Sigma X*\Sigma Y/n)}{\sqrt{[\Sigma X^2 - ((\Sigma X)^2/n)][\Sigma Y^2 - ((\Sigma Y)^2/n)]}} \quad (\text{ecuación 1})$$

El resultado fue para $r = 0,996$, y para $r^2 = 0,993$. En este caso, se observó que el modelo lineal se considera aceptable, de acuerdo con lo establecido por la guía ICH Q2.

Adicionalmente, se procedió a hacer un test estadístico con los valores de la tabla t de student, donde se compara un valor de t calculado y con un valor de t tabulado, este test estadístico, verifica la relación lineal directa estadísticamente significativa entre las variables. Para hallar el t calculado se empleó la ecuación 2, donde se obtuvo un valor de 33,24. Al comparar ambos valores, se observa que $33,24 > 2,31$; demostrando que existe correlación significativa entre la concentración y la señal arrojada por el equipo, que en este caso es el área.

$$t_{calculada} = \frac{r * \sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}} \quad (\text{ecuación 2})$$

II. Precisión. La precisión se evaluó por medio de dos parámetros: la repetibilidad, y la reproducibilidad. Se hallaron la desviación estándar (S), la desviación estándar relativa (RSD), y finalmente se halló el intervalo de confianza de la medida.

En el caso de la repetibilidad, se evaluaron 6 inyecciones, se hallaron la desviación estándar (S) y la desviación estándar relativa (RSD), las cuales se pueden observar en la tabla 2.

Tabla 2. Valores obtenidos para muestra de concentración conocida (1000 ppm) para evaluación de la repetibilidad.

Muestra	Concentración (ppm)
Promedio	968,96
S	7,48
RSD	0,77

De acuerdo con lo establecido por la guía ICH Q2, RSD menor al 2% se considera aceptable, indicando que hay una buena repetibilidad. Para el presente estudio, se encontró un RSD de 0,77%, por lo que se puede deducir que el método tiene una buena repetibilidad.

Por otra parte, se midió la reproducibilidad o precisión interlaboratorios, para lo cual se varió el analista y el día. En este caso, la RSD fue de 0,92 % para el analista 1, y 0,57 % para el analista 2, ambos RSD son menores a 2% por lo que se consideran aceptables. Los resultados de concentración no evidencian diferencias significativas estadísticamente.

III. Exactitud. Se determinó por medio del porcentaje de recuperación con una muestra de concentración conocida que es inyectada en el equipo, y por medio de la curva de calibración de determina la concentración para realizar la comparación pertinente.

La determinación de la exactitud se llevó a cabo con muestras a tres niveles diferentes de concentración dentro del rango establecido (80, 120 y 200 ppm). Las inyecciones de dichas muestras se hicieron por triplicado, para un total de 9 muestras, 3 de cada concentración. Para cada muestra, se calculó el porcentaje de recuperación. Se halló el valor promedio del porcentaje de recuperación para las tres concentraciones, la desviación estándar, y la desviación estándar relativa.

A partir de estos datos fue posible calcular la t_{exp} , usando la ecuación 3, como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Resultados estadísticos para verificación de exactitud.

Promedio	98,39
S	2,45
RSD	2,49
t_{exp}	1,94

$$t_{exp} = \frac{(100 - \% \text{ recuperación}) * \sqrt{9}}{RSD} \quad (\text{ecuación 3})$$

El valor calculado para $t_{exp}=1,94$, fue comparado con t_{tab} , de acuerdo con las tablas de t de student para $n-1= 8$ grados de libertad, con el 95% de confianza. En este caso, el valor de $t_{tab}= 2,31$. Con ambos valores, se hace una comparación donde t_{exp} debe ser menor a t_{tab} para que no exista una diferencia significativa, y se considere que el método tiene una exactitud aceptable. Para este caso, efectivamente $t_{exp}=1,94 < t_{tab}= 2,31$, por lo que se puede inferir que el método es exacto para dicho nivel de confianza.

IV. Robustez. En este caso, se inyectaron muestras de concentración conocida del analito, y se hicieron algunos cambios en las condiciones cromatográficas, se sometió las muestras a ensayos de degradación forzada, tales como hidrólisis alcalina (a), hidrólisis ácida (b), y oxidación (c). Con el fin de analizar los resultados y reconocer interferencias en la señal del analito. Se tomó una solución madre de 40 ppm, y se tomaron alícuotas y fueron transferidas para llevar a siguientes condiciones: (a) reflujo a 80°C con NaOH por 1 hora; (b) reflujo a 80°C con HCl por 1 hora; y (c) calentamiento en baño maría con H₂O₂ por 1 hora. Pasado este tiempo, se transfirieron las soluciones a viales y se analizaron por cromatografía líquida a las mismas condiciones, obteniéndose los siguientes cromatogramas.

En las figuras 2 y 3, correspondientes a los cromatogramas de las muestras sometidas a hidrólisis básica, y ácida, respectivamente, se observa el posible pico característico de la diosgenina, en un tiempo de retención (t_R) 7,17 minutos; los otros picos pueden corresponder a algún producto de degradación, tales como subproductos de esterificaciones en el C3 y C27, de igual forma la ruptura de uno de los anillos de la estructura y la oxidación de la misma puede llegar a general productos como la diosona; productos que pueden permitir la aparición de picos adicionales dentro del cromatograma. En la hidrolisis básica se evidencia una alteración en el pico de interés de nuestro analito, pues se observa asimetría (tailing) en el pico y se evidencia un

ensanchamiento de banda del pico, como se observa en la figura 2, por lo que se sugiere mantener el extracto fuera del contacto con sustancias básicas que generen subproductos no deseados, tal como se muestra en el cromatograma donde aparecen dos picos con intensidades superiores a 30 mv en los tiempos de retención de 3,64 min y 4,60 min. Por último, no se evidencia solapamiento de otros picos con el pico del analito de estudio, sin embargo, para estudios posteriores sobre dicho analito se sugiere realizar extracciones y uso de fase móvil con pH cercanos a 7, para no generar asimetrías y garantizar resultados reproducibles que permitan una cuantificación por medio del área bajo la curva.

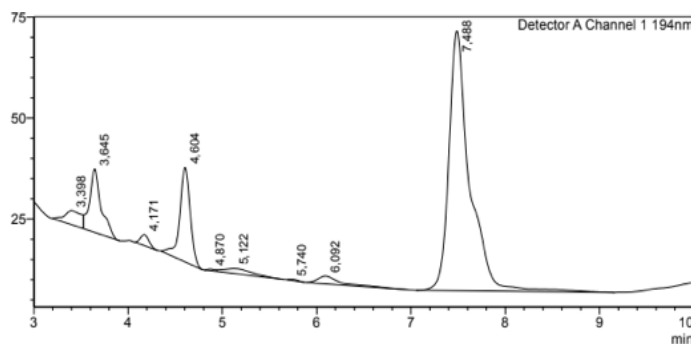


Fig. 2: Cromatograma obtenido al someter la muestra a hidrólisis básica con NaOH en reflujo por 1h a 80 °C.

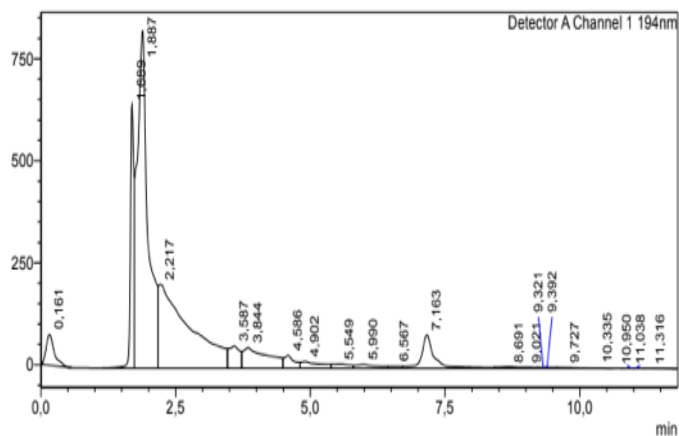


Fig. 3. Cromatograma obtenido al someter la muestra a hidrólisis ácida con HCl en reflujo por 1h a 80 °C.

Por otra parte, a condiciones de oxidación, se observan diversos picos que no coinciden al compararlo con los cromatogramas resultantes de la corrida del extracto sin tratamiento externo. Adicionalmente, el pico de la diosgenina se puede observar con un ensanchamiento anómalo. Por esta razón, en caso de utilizar el presente método es recomendable proteger las muestras de condiciones que puedan llevarlo a la oxidación.

De igual forma, se variaron condiciones de manera controlada, condiciones como el flujo, y la fase móvil se observa variación notable en los tiempos de retención. El volumen de inyección y el flujo modificaron el área drásticamente. Se concluyó entonces que, el método no es robusto frente a dichas variaciones, por lo que se recomienda mantener y controlar las condiciones cromatográficas determinadas.

Teniendo en cuenta que las saponinas poseen una importante actividad antiinflamatoria mediada por la inhibición de la síntesis y liberación de sustancias proinflamatorias y con base en los resultados obtenidos por la cromatografía líquida de alta eficiencia con el detector UV/VIS, se puede decir que la extracción de la pulpa del fruto iguaraya de la planta cardón guajiro evidencia la posible presencia de diosgenina, sustancia con aporte farmacológico de tipo antiinflamatorio¹¹⁻¹³.

II. Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ). Se usaron soluciones con concentraciones mínimas del analito (1,5 ppm, 3,5 ppm, 6 ppm, 8 ppm y 10 ppm) las cuales se inyectaron cada una por triplicado y se elaboró una curva de calibración con dichas concentraciones versus las áreas promedio encontradas.

Se realizó mediante la preparación de cinco diluciones en un rango de concentraciones de 1,5 a 10 ppm, para determinar el área bajo la curva al tiempo de retención específico, para cada muestra y de esta manera poder realizar la curva de calibración, analizando el coeficiente de correlación, coeficiente de determinación, error típico y R^2 . Los resultados se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Concentraciones para curva de calibración vs. área promedio para determinar LOD y LOQ.

Concentración (ppm)	Área promedio
1,50 esta	96,11
3,50	231,58
6	409,09
9	557,44
10	671,98

Por medio de la ecuación de la recta para curva y el error típico, se obtiene un LOD de 0,66 ppm y un LOQ de 2,44 ppm.

Conclusiones

En cuanto a la separación y cuantificación de diosgenina por cromatografía líquida de alta eficiencia se determinó que en fase reversa y con las condiciones adecuadas se puede lograr obtener resultados con sensibilidad, exactitud, precisión, robustez y resolución. Se encontró que el extracto con metanol de la pulpa de la iguaraya contiene una concentración de diosgenina de 36,36 ppm.

La validación del método de extracción presentó una precisión con un RSD menor a 2% y una exactitud con un porcentaje de recuperación promedio de 98%; se obtuvo un límite de detección de 0,65 ppm y un límite de cuantificación de 2,40 ppm. Adicionalmente, el modelo de regresión lineal obtenido en la curva de calibración presentó un coeficiente de correlación de 0,99; lo cual permite garantizar confiabilidad del método para la determinación de la concentración de este analito. Sin embargo, cabe

aclearar que es necesario adelantar estudios de elucidación estructural del analito aislado para verificar su presencia.

Referencias

1. S Hurtado Alba. Análisis composicional del fruto desértico Iguaraya (*Opuntia Stricta*, *Stenocereus*, *Griseus*) para la evaluación de diferentes alternativas de diseño de productos de interés. Trabajo de grado de pregrado. Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia (2019).
2. HS Hassan, IM Sule, MA Musa, YK Musa SM Abubakar, SA Hassan. Anti-inflammatory activity of crude saponin extracts from five Nigerian medicinal plants. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines** 9(2), 250–255 (2012).
3. H Wang, J Gao, J Kou, D Zhu, B Yu. Anti-inflammatory activities of triterpenoid saponins from *Polygala japonica*. **Phytomedicine** 15(5), 321–326 (2008).
4. R Hernández, EC Lugo, L Díaz, S. Villanueva. Extracción y cuantificación indirecta de las saponinas de agave lechuguilla Torrey extraction and indirect quantification of saponins from the agave lechuguilla Torrey. **e-Gnosis** (3), 1-9 (2005).
5. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of analytical procedures: text and methodology q2(r1). En: *International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use*. 1994: 1–17.
6. CY Cheok, HAK Salman, R Sulaiman. Extraction and quantification of saponins: A review. **Food Research International**, 59, 16–40 (2014).
7. SX Angulo Alvarez, LP Jaimes García. Desarrollo de un método de análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC-DAD) para la caracterización de especies de la familia Asteraceae. Trabajo de grado de pregrado. Universidad de Ciencia Aplicadas y Ambientales, Bogotá, Colombia (2019).
8. DA Skoog, FJ Holler, SR Crouch. Principios de análisis instrumental. Editorial Cengage Learning Editores (2008).
9. EL Ávila, J Guevara-Pulido. Development of a RP-HPLC Method for Separating and Quantifying Muscimol in Different Developmental Stages of the Fungus *Amanita muscaria*. **Journal Chemistry** 2020, (2020).
10. O Quattrocchi, S Abelaira de Andrizzi, R Laba. Introducción al HPLC. Aplicación y Práctica - Quattrocchi; Andrizzi; Laba. Editorial Artes gráficas Farro SA (1992).
11. L Rojas, C Jaramillo, M Lemus. Métodos analíticos para la determinación de metabolitos secundarios de plantas. Universidad Técnica Machala, Ecuador (2015).
12. L Qi, QT Yu, P Li, SL Li, YX Wang, LH Sheng et al. Quality evaluation of Radix Astragali through a simultaneous determination of six major active isoflavonoids and four main saponins by high-performance liquid chromatography coupled with diode array and evaporative light scattering detectors. **Journal of Chromatography A**, 1134(1-2), 162–169 (2006).
13. ZY Qu, HC Wang, YP Jin, YL Li, YP Wang. Isolation, identification, and quantification of triterpene saponins in the fresh fruits of *Panax notoginseng*. **Natural Product Research**, 36 (20), 5319–5329 (2022).