

Validación de una metodología analítica para la cuantificación por HPLC de quercetina en una matriz vegetal

Carmen Andrea Moreno-Romero y Clara Eugenia Plazas-Bonilla*

Resumen

El presente documento expone el trabajo involucrado alrededor de la implementación de una metodología para la cuantificación del flavonoide quercetina en cebolla (*Allium cepa*). Contemplando el aporte de investigaciones previas, se optimizaron y estandarizaron las variables del método (tiempos de hidrólisis y extracción del material vegetal) y se realizó el proceso de validación. Esta última, resultó exitosa, y permite afirmar que en el material vegetal seco de cebolla blanca se encuentran 1960 mg de quercetina/ Kg y en cebolla roja 2701 mg de quercetina/ Kg.

Palabras clave: Quercetina - Validación - Cebolla (*Allium cepa*) - Flavonoides - Flavonoles.

Summary

Validation of an analytical methodology for the quantification by high performance liquid chromatography of quercetin in a vegetal matrix

This document presents the work involved around the implementation of a methodology for the quantification of the flavonoid quercetin in onion (*Allium cepa*). Considering contributions of previous related investigations, it was set the conditions for hydrolysis and extraction of vegetal material as well the development of the methodology validation was performed. This was a satisfactory process and let us to establish that 1906 mg of quercetin was enclosed per Kg of white dry onion and 2701 mg of quercetin in red onion per Kg.

Key words: Quercetin - Validation - Onion - Flavonoids – Flavonols.

Introducción

Los flavonoides son compuestos orgánicos casi universales en los vegetales (1). La quercetina es un flavonoide del tipo flavonol que se encuentra presente en diversos alimentos naturales, tales como: tomate, lechuga, cebolla, apio, repollo, brócoli, arvejas, espinacas, manzana, naranja, fresa, durazno, pera y uva; siendo las cebollas, uno de los vegetales más ricos en ella. (2-13).

Las cebollas son ricas en dos grupos químicos que han sido destacados como benéficos para la salud del hombre: los flavonoides y los alquil-cistein-sulfóxidos (ACSOs). Dentro de los flavonoides se encuentran dos subgrupos: las antocianidinas, las cuales imparten el color rojo/púrpura a algunas variedades y los flavonoles, como la quercetina (presente mayoritariamente en el bulbo), el kamferol (abundante en las hojas) y sus

Recibido para evaluación:

Aceptado para publicación:

mayo 20 de 2005

julio 22 de 2005

* Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C., A.A. 14490.
E-mail: ceplazasb@unal.edu.co.

derivados, responsables del color amarillo de otras variedades.

Existe un interés especial en los flavonoides debido a sus posibles efectos en la salud humana. Se sabe que al menos el 60% de los cánceres humanos se relacionan con factores extrínsecos identificables, los que pueden ser de carácter físico, químico o biológico (14). Aun cuando es difícil evaluar la contribución exacta de cada factor, se reconoce el papel preponderante que ocupa la dieta y en general la ingesta de ciertos compuestos en el control de la aparición y desarrollo del cáncer. Dentro de estos compuestos de interés, se encuentran los flavonoides, moléculas que poseen actividad anticarcinogénica, aunque estudios recientes parecen contradecir esta afirmación (15).

Se requiere por tanto, métodos de análisis validados que permitan la determinación del contenido de estas sustancias en alimentos y en fluidos biológicos para así estimar la relación de su consumo con la incidencia de alguna enfermedad o protección contra las mismas.

Metodología

Equipos: Cromatógrafo líquido de alta eficiencia (HPLC) Waters: Sistema controlador 600E, detector UV 486, módulo de datos 746; columna LiChroCART (Dorck, Darmstadt, Germany) 250 x 4 mm I.D., Purospher RP – 18 endcapped, 5 μ m, guarda columna LiChroCART (Merck, Darmstadt, Germany) 4 x 4 mm I.D., LiChrospher RP – 18, 5 μ m. Cromatógrafo HPLC Merck Hitachi LaChrom: Bomba L – 7100, detector de arreglo de diodos L – 7450, automuestreador L – 7200, interfase D – 7000, programa: Chromatography data station software D – 7000 Multi – HSM_H (este equipo fue exclusivamente usado en la evaluación de especificidad). Otros equipos: Espectrómetro UV/ Visible Unicam UV2-100,

balanza analítica Mettler Toledo AB 204, potenciómetro Beckman 50, bomba de vacío Millipore LR 37697, ultrasonido Trassonic 460/H, liofilizador Labconco.

Reactivos. Acetonitrilo y metanol (MeOH), grado HPLC, Omnisolv. Agua destilada filtrada. Ácido clorhídrico (HCl), R.A, Merck. Fosfato monobásico de potasio, KH_2PO_4 , R.A., Mallinckrodt. Butilhidroxitolueno (BHT), R.A., Mallinckrodt.

Estándar. Quercetina 98% de pureza, Sigma.

Material vegetal. Cebollas de la especie *Allium cepa* (16), familia Alliaceae; tipo cabezona dorada santandereana y cebolla cabezona roja común adquiridas entre agosto y diciembre del año 2004 en un supermercado de cadena de la ciudad de Bogotá (Colombia).

Análisis estadístico. Los datos del proceso de validación fueron analizados a través del programa estadístico S.A.S. versión 8. Los evaluadores estadísticos fueron: ANOVA, para evaluar la significancia estadística del modelo planteado y la influencia de las variables involucradas; comparaciones múltiples, para evaluar la agrupación de datos según las concentraciones trabajadas y el análisis de regresión, para evaluar la pendiente, el intercepto y la correlación del modelo.

Optimización y estandarización

Con base en la evaluación de los diferentes parámetros para verificar la idoneidad del sistema cromatográfico se establecieron las siguientes condiciones de trabajo: Fase móvil: Isocrática: 30% Acetonitrilo – 70% Buffer Fosfato (KH_2PO_4) 0.025 M, pH 2.4. Columna: LiChroCART C18. Velocidad de flujo: 0.9 mL/min. Temperatura: 25 °C. Longitud de onda de detección: 370 nm. El material vegetal debe ser sometido a reducción del tamaño de partícula y liofilización, previo proceso de extracción - hidrólisis. La evaluación de diversas metodologías

para la hidrólisis permitió verificar la coincidencia en el empleo de un procedimiento optimizado y estandarizado hacia principios de los años noventa en Holanda (7), basado en la extracción de todas las formas del flavonoide presentes en la matriz (aglicona y glicósidos) a través de un reflujo con solución metanólica e hidrólisis simultánea de los glicósidos mediante el efecto de una solución ácida. Hertog et al. (7) determinaron como idóneo el uso de HCl a una concentración 1.2 M. Se verificó el tiempo óptimo de tratamiento realizando refluxos completos variando únicamente el período de hidrólisis. (1 hora, 1.5 horas, 2 horas y 2.5 horas), evaluando los resultados por HPLC y espectroscopía UV. Dada la labilidad de la molécula frente a condiciones de luz y temperatura se empleó como antioxidante el BHT (4, 7, 8, 17-19).

Manejo de la muestra

Liofilización. Triturar el material vegetal en un molino, poner en recipientes de fondo plano, dejar en congelación por ocho horas y llevar al liofilizador por 24 horas. Finalmente, retirar el material vegetal seco, pesar la cantidad obtenida y envasar en recipientes herméticos.

Hidrólisis y extracción. Pesar 0.250 g. del material vegetal liofilizado, llevar a balón de fondo redondo, adicionar 12.5 mL de MeOH, 7.5 mL de agua, 40 mg de BHT y 5 mL de HCl 6N. Mezclar y cerrar el sistema. Dejar en reflujo durante 1.5 horas. Enfriar hasta temperatura ambiente protegido de la luz, llevar a un balón volumétrico de 50 mL y completar a volumen con metanol. Filtrar la solución y conservarla en frascos ámbar bajo refrigeración. Previo al análisis, llevar la solución a temperatura ambiente y filtrar a través de membrana de 0.45 μ m antes de inyectar en el cromatógrafo.

Validación del sistema

Especificidad. Se evaluaron los cromatogramas obtenidos al exponer la molécula de querctetina a diferentes condiciones de estrés, empleando 5 mg del estándar disueltos en 5 mL del medio de deterioro o solvente. Las condiciones fueron: Hidrólisis alcalina, reflujo durante dos horas hidróxido de sodio(NaOH) 1N; hidrólisis ácida, reflujo durante dos horas en ácido clorhídrico (HCl) 1N; oxidación, reflujo durante dos horas en peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 3%; termólisis, reflujo durante dos horas en MeOH; fotólisis, exposición a la luz ultravioleta durante 48 horas de una solución en MeOH. Para el caso del HCl, el NaOH y el (H₂O₂) se efectuaron diluciones 1: 10 en MeOH previa inyección.

Linealidad. El intervalo de análisis estuvo entre 2,5 y 25,0 μ g/mL. Se analizaron cinco concentraciones por triplicado: 2.5, 8.5, 14.5, 20.5 y 25.0 mcg/mL. Evaluadores estadísticos: ANOVA, comparaciones múltiples y el análisis de regresión.

Precisión

Repetibilidad. Se analizaron en un mismo día tres concentraciones por triplicado (2.5, 14.5, y 25.0 μ g/mL).

Precisión intermedia. Se analizaron en tres diferentes días, tres concentraciones por triplicado (2.5, 14.5, y 25.0 μ g/mL). Evaluadores estadísticos: Coeficiente de variación, ANOVA y las comparaciones múltiples.

Cantidad mínima cuantificable (CMC) y detectable (CMD): La CMC se evaluó a través de la aplicación de la fórmula $CMC = Ruido \times 6$. La CMD se evaluó a través de la aplicación de la fórmula: $CMD = Ruido \times 2$. El ruido fue determinado a través del análisis de 10 muestras de la solución del blanco (MeOH). Estos dos parámetros se verificaron experimentalmente.

Validación del método

Especificidad. Se analizaron los cromatogramas obtenidos de soluciones de quercetina estándar y las obtenidas del proceso de extracción-hidrólisis en cebolla usando el cromatógrafo que contaba con el acople al detector de arreglo de diodos, empleando tres fases móviles de diferente polaridad.

Linealidad. Se evaluó a través del manejo de cinco concentraciones logradas al someter diferentes cantidades de una muestra homogénea del material vegetal al proceso de extracción-hidrólisis, manteniendo la proporción de los demás componentes de la extracción constantes. Las concentraciones usadas fueron 4.9, 7.4, 9.8, 12.2 y 14.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Evaluadores estadísticos: ANOVA, comparaciones múltiples y el análisis de regresión.

Precisión

Repetibilidad. Evaluado a través del análisis en un mismo día, de seis muestras de una misma concentración (0.250 g del material vegetal homogéneo).

Precisión intermedia. Se analizaron en tres diferentes días, dos muestras de una misma concentración (0.250 g del material vegetal homogéneo). Evaluadores estadísticos: El coeficiente de variación, ANOVA y las comparaciones múltiples.

Exactitud. Se evaluaron las concentraciones obtenidas de soluciones procedentes de muestras del material vegetal sometidas al proceso de extracción-hidrólisis, enriquecidas con diferentes cantidades de estándar (100%, 50% y 25% de la cantidad de quercetina determinada en la matriz), una vez concluye el proceso de extracción-hidrólisis. Evaluadores estadísticos: ANOVA; comparaciones múltiples; prueba t , la cual evalúa la diferencia entre el porcentaje de recuperación y el 100 % y el Test de Cochram que evalúa la diferencia de varianzas según el porcentaje de adición.

Robustez. Se desarrolló a través de la aplicación del modelo Plackett-Burman (20), en donde se plantea la evaluación de la influencia que sobre la variabilidad de la respuesta tienen pequeños cambios efectuados a siete variables de estudio (Tabla 1).

Tabla 1. Diseño de la prueba de Robustez.

Variable/ Experimento	1	2	3	4	5	6	7	8
pH buffer	2.6	2.4	2.4	2.6	2.4	2.6	2.6	2.4
% acetonitrilo	40	40	30	30	40	30	40	30
Velocidad de flujo (mL/minuto)	0.7	0.7	0.7	0.9	0.9	0.7	0.9	0.9
Longitud de onda (nm)	370	372	372	372	370	370	372	370
Temperatura (°C)	30	25	30	30	30	25	25	25
Tiempo preparación de la muestra (días)	0	1	0	1	1	1	0	0
Experimentador	2	2	1	2	1	1	1	2

Resultados y discusión

Idoneidad cromatográfica. La evaluación de cinco parámetros cromatográficos (Tabla 2) del sistema de análisis usado, permitieron evidenciar el cumplimiento de estos con los requerimientos establecidos como valores sugeridos. El tiempo de retención obtenido para la solución del estándar fue de 9.5 minutos y para la solución producto de la extracción de quercetina de cebolla de 9.6 minutos.

Tiempo de hidrólisis. Los valores de área (HPLC) y de absorbancia (UV), obtenidos en los diferentes tiempos de tratamiento permitieron establecer 1.5 h. como tiempo óptimo (Tabla 3).

Evaluación de la estabilidad. Las soluciones del estándar de quercetina bajo condiciones de refrigeración y envase en frascos ámbar, permanecen estables 28 días después de su preparación.

Validación del sistema

Especificidad. *Hidrólisis alcalina:* La molécula de quercetina sufre una drástica modificación, resultado coherente con la bibliografía (1), pues se sabe que suceden una serie de transformaciones que van desde estructuras quinoides hasta la formación de polímeros coloreados. *Hidrólisis ácida:* No produce cambios marcados sobre la molécula, pero sí reduce la cantidad inicial de

Tabla 2. Parámetros cromatográficos evaluados en la estandarización.

Parámetro	Valores ideales (20,21)	Inicio de validación	Final de validación
Factor de Capacidad	> 2	4.22	4.27
Factor de Separación	> 1	5.22	5.14
No de Platos Teóricos	----	4027	4011
Resolución	> 2	3.74	3.40
Tailing	< 2	1.00	1.00

Tabla 3. Resultados optimización del período de reacción.

t hidrólisis (horas)	Respuesta HPLC (áreas)	Respuesta UV-VIS (absorbancia)
1.0	1356257	1.209
1.5	1996876	1.321
2.0	1701920	1.266
2.5	1587608	0.638

quercetina, confirmando ser uno de los flavonoides que exhibe mayor resistencia a la acción de ácidos (9). **Oxidación:** Se observa una reducción en el contenido de quercetina mayor al obtenido con ácido clorhídrico (22). **Termólisis:** Ejerce un marcado efecto de degradación de la molécula, razón de la necesidad de refrigerar las soluciones (22). **Fotólisis:** La quercetina exhibe grandes cambios en los cromatogramas obtenidos. (22)

Linealidad

ANOVA. La variable concentración es la única de las variables del modelo planteado que posee efecto estadísticamente significativo.

Comparaciones múltiples. En tres pruebas se observa la formación de cinco diferentes grupos, indicando que los valores de área varían con la concentración.

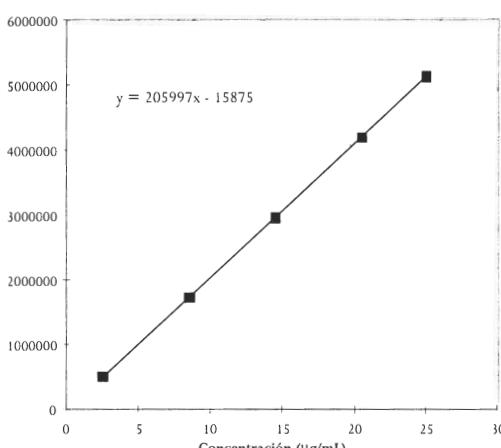


Figura 1. Curva de regresión. Sistema.

Ánálisis de regresión. El modelo lineal planteado para expresar la relación existente entre los valores de área y concentración es estadísticamente significativo. Con una confianza del 99% es válido afirmar que el valor del intercepto no es estadísticamente diferente de cero y que el valor de la pendiente es estadísticamente significativo (Figura 1).

Ánálisis de correlación. La asociación lineal entre los valores de área y concentración es estadísticamente significativa, por tanto es coherente utilizar un modelo de regresión lineal simple.

Precisión - Repetibilidad

Los resultados de los coeficientes de variación (CV) para cada una de las tres concentraciones son menores al 2% (Tabla 4).

ANOVA. El modelo planteado explica la respuesta instrumental en función de la variable concentración, mientras que el efecto réplica no afecta la respuesta

Comparaciones múltiples. En las tres pruebas se formaron tres diferentes grupos, uno por cada concentración, indicando que el área varía conforme cambia la concentración.

Precisión- Precisión intermedia

Los resultados de los coeficientes de variación (CV) para cada una de las tres concentraciones son menores al 2% (Tabla 5).

Tabla 4. Resultados del estudio de repetibilidad.

Concentración	2.5 μg/mL	14.5 μg/mL	25.0 μg/mL
CV	0.10	0.14	0.06

Tabla 5. Resultados estudio de precisión intermedia.

Día 1, 2 y 3	Réplica 1, 2 y 3	2.5 $\mu\text{g/mL}$	14.5 $\mu\text{g/mL}$	25.0 $\mu\text{g/mL}$
CV		0.34	0.26	0.27

ANOVA. El modelo planteado que explica la respuesta instrumental en función de la concentración y las réplicas es apropiado. La variable concentración es la única de las variables del modelo planteado que posee efecto estadísticamente significativo.

Cantidad mínima cuantificable (CMC)

Determinado experimentalmente fue 0.6 $\mu\text{g/mL}$. El valor determinado a través de la aplicación de la relación matemática fue de 1.57 $\mu\text{g/mL}$.

Cantidad mínima detectable (CMD)

Determinado experimentalmente fue 0.05 $\mu\text{g/mL}$. El valor determinado a través de la aplicación de la relación matemática fue de 0.57 $\mu\text{g/mL}$.

Se evidencia de esta manera el factor de seguridad que la aplicación de las relaciones matemáticas involucra.

Validación del método

Especificidad. Los análisis de la solución estándar de quercetina y la solución de cebolla producto del proceso de extracción-hidrólisis, en fases móviles de diferente polaridad y usando el cromatógrafo acoplado con el detector de arreglo de diodos, mostraron espectros idénticos y la relación de áreas muestra un bajo coeficiente de variación (Tabla 6), por tanto se considera que la metodología es apropiada para lograr una adecuada separación de la molécula en la matriz para su cuantificación (22).

Linealidad

ANOVA. El modelo planteado que explica la respuesta instrumental en función de la concentración y las réplicas es apropiado. La variable concentración es la única de las variables que posee efecto estadísticamente significativo.

Comparaciones múltiples. Se formaron cinco diferentes grupos, indicando que los valores de área varían conforme cambia la concentración.

Tabla 6. Relación de áreas. Quercetina estándar - Quercetina cebolla blanca.

Fase móvil	Relación áreas
30% Acetonitrilo - 70% Buffer Fosfato KH_2PO_4 0.025M, pH 2.4	0.6412
40% Acetonitrilo - 60% Buffer Fosfato KH_2PO_4 0.025M, pH 2.4	0.6201
25% Acetonitrilo - 75% Buffer Fosfato KH_2PO_4 0.025M, pH 2.4	0.6539
Coeficiente de variación	2,67

Análisis de regresión. El modelo lineal planteado es adecuado y es estadísticamente significativo. Con una confianza del 99% es válido afirmar que el valor del intercepto no es estadísticamente diferente de cero y que el valor de la pendiente es estadísticamente significativo. (Figura 2)

Análisis de correlación. Es coherente el utilizar un modelo de regresión lineal simple.

Precisión- Repetibilidad

El coeficiente de variación obtenido de los resultados en las seis replicas fue de 0.85 %, menor al 2% valor máximo permitido.

ANOVA. El modelo planteado que explica la respuesta instrumental en función de la réplica a una misma concentración, no es estadísticamente adecuado. La respuesta no se explica en función de la réplica.

Comparaciones múltiples. En las tres pruebas se observa la formación de un solo grupo, indicando que sin importar la concentración, los resultados son estadísticamente iguales.

Precisión- Precisión intermedia

El coeficiente de variación (CV) obtenido de los resultados en las dos replicas y en los tres días fue de 1.02%, menor al 2% permitido.

ANOVA. El modelo planteado que explica la respuesta instrumental en función de la réplica y los días a una misma concentración, no es estadísticamente adecuado. La respuesta no se explica en función de la réplica ni los días.

Comparaciones múltiples. En las tres pruebas se observa la formación de un solo grupo pues solo se trabajó una concentración.

Exactitud

ANOVA. Las medias entre porcentajes de adición son distintas. La variable porcentaje de adición es la única que posee efecto estadísticamente significativo, es decir, el valor del área se ve afectado por la cantidad de estándar adicionado; mientras que el efecto réplica no afecta la respuesta.

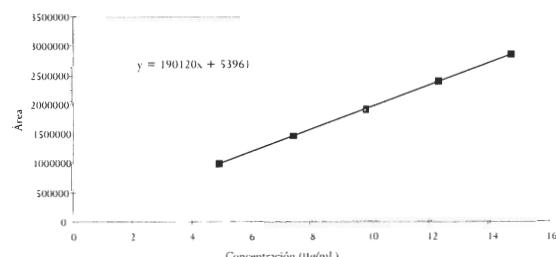


Figura 2. Curva de regresión. Cebolla blanca.

Tabla 7. Resultados estudio de exactitud

Réplica R1, R2 y R3	Porcentaje adicionado a la matriz vegetal		
	100%	50%	25%
Cantidad determinados (μg)	962	715	598
Cantidad esperados (μg)	980	735	612

Comparaciones múltiples. En las tres pruebas se observa la formación de tres diferentes grupos, uno por cada porcentaje de adición, indicando que los valores de área varían con la concentración.

Prueba t. No existe diferencia significativa con el 100% de recuperación

Test de Cochram. El factor de concentración no influye en la variabilidad de los resultados.

Robustez

Para determinar si un factor tiene influencia significativa sobre el resultado, se compara el efecto de la variable con el producto de la desviación estándar en el estudio de repetibilidad del método por la raíz de dos. Los valores por encima de este producto indican que son variables críticas, estableciéndose que dos variables no requieren control y cinco requieren ser controladas, ya que tienen influencia significativa en el resultado obtenido (Tabla 8).

Cuantificación de Quercetina en Cebolla Blanca y Roja

Basados en la ecuación de la recta obtenida en el estudio de linealidad para el sistema y en la respuesta promedio lograda a través del estudio de repetibilidad, se extrae la concentración, estableciéndose que hay 1960 mg de quercetina/ Kg de material vegetal seco de cebolla

blanca y 2701 mg de quercetina/ Kg de material vegetal seco de cebolla roja.

Conclusiones

Se logró la validación de la metodología propuesta para la determinación cuantitativa de quercetina en cebolla mediante la evaluación de los parámetros: especificidad, linealidad, precisión, exactitud, cantidad mínima cuantificable, cantidad mínima detectable y robustez. El uso de diferentes evaluadores estadísticos permite dar mayor confiabilidad en la determinación de cada uno de estos parámetros.

Recomendaciones

Es importante considerar, basados en la evidencia de estudios precedentes, que la metodología analítica validada puede ser aplicada a la detección de quercetina en matrices vegetales diferentes a la planteada. Para su correcta aplicación se requiere especial cuidado en la verificación del parámetro *especificidad* del método, pues se sabe que pueden producirse tiempos de retención muy cercanos entre quercetina y luteolina con el modificador orgánico empleado, sin embargo, ningún documento reporta la presencia conjunta de estos flavonoides en matrices vegetales. Es de gran importancia continuar con la realización de la implementación y validación de

Tabla 8. Resultados de la prueba de robustez.

Variable	Conclusión
pH Buffer, % Acetonitrilo, Velocidad de flujo(mL/min) Temperatura (°C), Tiempo de preparación muestra (días)	Variables críticas a controlar
Longitud de onda (nm) y Experimentador	Variables no críticas

la metodología para identificar y cuantificar quercetina en fluidos biológicos, lo cual permitirá correlacionar en estudios futuros la ingesta del flavonoide y los niveles alcanzados en el organismo, con efectos anticarcinogénicos o por el contrario genotóxicos.

Agradecimientos

A la División de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia (DIB), por el soporte financiero prestado al presente trabajo, al Instituto Cancerológico por facilitarnos el estándar empleado y al Instituto Nacional de Inmunología por brindarnos su ayuda y permitirnos el empleo del HPLC acoplado a detector de arreglo de diodos, usado en la evaluación de especificidad.

Bibliografía

1. J. Harborne, T. Mabry y H. Mabry, "The Flavonoids", Chapman and Hall, London, 1975.
2. A. Escarpa y M.C. Gonzalez, High-performance liquid chromatography with photo-diode array detection for the determination of phenolic compounds in peel and pulp from different apple varieties, *J. Chromatogr. A*, **823**, 331 (1998).
3. A. Escarpa, C. Perez y M. Gonzalez, Optimization and validation of a fast liquid gradient for determination of prominent flavan-3-ols and flavonols in fresh vegetables, *J. High Resol. Cromatogr.*, **23**, 637 (2000).
4. A. Crozier, M. Lean, M. Mc Donald y C. Black, Quantitative analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce and celery, *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 590 (1997).
5. M. Careri, L. Elviri, A. Mangia y M. Musci, Spectrophotometric and coulometric detection in the high-performance liquid chromatography of flavonoids and optimization of sample treatment for the determination of quercetin in orange juice, *J. Chromatogr. A*, **881**, 449 (2000).
6. M. Hertog, P. Hollman y M. Katan, Content of potentially anticarcinogenic flavonoides of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in The Netherlands, *J. Agric. Food Chem.*, **40**, 2379 (1992).
7. M. Hertog, P. Hollman y P. Venema, Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoides in vegetables and fruits, *J. Agric. Food Chem.*, **40**, 1591 (1992).
8. M. Nuutila, K. Kammiovirta y K. Oksman, Comparison of methods for the hydrolysis of flavonoids and phenolic acids from onion and spinach for HPLC analysis, *Food Chemistry*, **76**, 519 (2002).
9. O. Palomino, M.P. Gomez, K. Slowing, E. Carretero y A. Villar, Study of polyphenols in grapes berries by reverse-phase high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, **870**, 449 (2000).
10. P. Mattila, J. Astola y J. Kumpulainen, Determination of flavonoids in plant material by HPLC with diode-array and electro-array detections, *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 5834 (2000).
11. S. Häkkinen y S. Auriola, High-performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry and diode array ultraviolet detection in the identification of flavonol aglycones and glycosides in berries, *J. Chromatogr. A*, **829**, 91 (1998).
12. U. Justesen, P. Knuthsen y T. Let., Quantitative analysis of flavonols, flavones and flavanones in fruits, vegetables and beverages

by high performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection, *J. Chromatogr. A*, **799**, 101 (1998).

13. USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods. U.S. Department of Agriculture. Beltsville Human Nutrition Research Center, 2003.

14. R.H. Murillo, La prevención del cáncer más allá de las pruebas de tamizaje, *Rev. Col. Cancerología*, **7**, 23 (2003).

15. L. Galeano, "Localización y cuantificación del daño cromosómico inducido por inhibidores naturales de topoisomerasa II (bioflavonoides): apigenina, bacaleína, fisetina, genisteína, genistina, kaemferol, luteolina, miricetina y quercetina en linfocitos humanos", Tesis de Grado, Universidad de Los Andes, 2003.

16. Herbario Nacional Colombiano. Instituto de Ciencias Naturales, 2004

17. K. Price, J. Bacon y M. Rhodes, Effect of storage and domestic processing on the content and composition of flavonol glucosides in onion (*Allium cepa*), *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 938 (1997).

18. K. Price y M. Rhodes, Analysis of the major flavonol glycosides present in four varieties of onion (*Allium cepa*) and changes in composition resulting from autolysis, *J. Sci. Food Agric.*, **74**, 331 (1997).

19. B. Patil, L. Pike y K. Yoo, Variation in the Quercetin content in different colored onions (*Allium cepa L.*), *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **120**, 909 (1995).

20. O.H. Quattrocchi, S.I. Abelaira y R.F. Laba, "Introducción a la HPLC", Artes Gráficas Faro, Argentina, 1992. p 279–299, 302–327.

21. ICH Q2A. "Text on Validation of Analytical Procedures", ICH Harmonised Tripartite Guideline, 1994.

22. C.A. Moreno, "Implementación de una metodología analítica para la cuantificación por cromatografía líquida de alta eficiencia de quercetina en una matriz vegetal", Trabajo de Grado, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia, 2005.