

Desarrollo y validación de un método de HPLC para la separación y cuantificación de ácido gálico en extracto de frutos de *Cotoneaster pannosus* provenientes de Bogotá-Colombia

Emerson Eliecer León Ávila*, Laura Stephania Ballén Díaz, Oscar Alfonso Vargas Bautista

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

(* leonemerson@unbosque.edu.co)

Recibido: 06/02/2024

Revisado: 15/03/2024

Aceptado: 29/04/2024

Resumen

La planta Holly (*Cotoneaster pannosus*) originaria de China y presente actualmente en Bogotá-Colombia poseen en su fruto variedad de metabolitos secundarios, entre ellos se puede encontrar el ácido gálico, sustancia que según estudios posee propiedades hepatoprotectoras. Por ello, en el presente trabajo se propone el desarrollo de un método de separación y cuantificación validado para ácido gálico que puede estar presente en un extracto hidroalcohólico obtenido del tratamiento de los frutos de *Cotoneaster pannosus* por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia con detección UV, con el objetivo de establecer las mejores condiciones de separación que permitan resultados precisos y robustos.

Palabras claves: ácido gálico; *Cotoneaster pannosus*; cromatografía líquida de alta eficiencia; estandarización; validación

Abstract

Development of a validated high-efficiency liquid chromatography (HPLC) method for the separation and quantification of gallic acid in an extract of *Cotoneaster pannosus* fruits from Bogotá-Colombia. The Holly plant (*Cotoneaster pannosus*) native to China and currently present in Bogota, Colombia, has a variety of secondary metabolites in its fruit, including gallic acid, a substance that according to studies has hepatoprotective properties. That is why in the present work the standardization and validation of a method of separation and quantification of gallic acid that may be present in a hydroalcoholic extract obtained from the treatment of the fruits of *Cotoneaster pannosus* by means of high-efficiency liquid chromatography with UV detection is carried out, with the aim of establishing the best separation conditions that allow precise and robust results.

Keywords: Gallic acid; *Cotoneaster pannosus*; High Performance Liquid Chromatography; Standardization; Validation

Introducción

El uso indiscriminado de antiinflamatorios no esteroideos (AINES) y antibióticos ha generado una de las reacciones adversas a medicamentos (RAM) más frecuentes, como lo es la hepatotoxicidad. Uno de los retos en el área de la salud es prevenir este tipo de RAM debido a que su diagnóstico es difícil por la falta de marcadores fiables para su uso en la práctica clínica¹, y el tratamiento para este tipo de afecciones está basado en la suspensión de consumo de los medicamentos o en el peor de los casos el trasplante hepático².

Una de las alternativas promisorias para la prevención de estas reacciones es el uso de plantas con variedad de compuestos bioactivos, que permitan reducir el riesgo de sufrir estas afecciones, entre estas se encuentran los frutos de *Cotoneaster pannosus* conocido también como Holly liso, el cual posee diversos metabolitos secundarios entre los que se destaca el ácido gálico (AG), al que se le atribuye una actividad antioxidante que le permite actuar como agente preventivo por sus propiedades hepatoprotectoras³.

Según literatura existen diferentes fuentes de ácido gálico, sin

embargo, *Cotoneaster pannosus* es una alternativa asequible, debido a la facilidad de cultivo y su amplia proliferación; adicional a ello, en la actualidad se encuentra incluida en el catálogo de plantas invasoras de los humedales de Bogotá-Colombia⁴, promoviendo la recolecta de sus frutos sin un impacto ambiental significativo, debido a que no es una planta endémica de Colombia y su uso se limita exclusivamente a propósitos ornamentales. En este contexto, *Cotoneaster pannosus* es una opción viable para la extracción de ácido gálico.

Por otro lado, la cromatografía líquida de alta eficiencia es una técnica analítica usada para separar determinados compuestos en diferentes matrices, fundamentada en la naturaleza y las propiedades fisicoquímicas del analito⁵. Del mismo modo, dicha técnica usa alta presión para dirigir la fase móvil (líquida) a través de columnas cerradas, las cuales contienen la fase estacionaria (generalmente sílice o sílice modificado) que da lugar a la separación de diferentes compuestos⁵. Adicionalmente, presenta ventajas tales como, reproducibilidad entre ensayos, sensibilidad para trazas e impurezas y capacidad de separación de compuestos no volátiles o semi volátiles y costos considerablemente bajos⁶.

Con base en lo anterior y la previa revisión bibliográfica, se propone obtener un extracto hidroalcohólico proveniente de los frutos de la planta Holly liso como posible fuente de ácido gálico para futuros usos medicinales, soportado mediante el desarrollo y validación de un método de separación y cuantificación por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, por sus siglas en inglés) bajo los parámetros de precisión, linealidad, exactitud, robustez, reproducibilidad y estableciendo límites de cuantificación (LOQ) y detección (LOD).

Materiales y métodos

Obtención del extracto de los frutos de Holly liso

La recolección de los frutos se realizó en el mes de junio del año 2022 en la ciudad de Bogotá-Colombia, específicamente en la localidad de Usaquén, en el parque Lisboa con coordenadas 4°42'53"N 74°01'58"W. Se realizó la recolección de 0,4539 kg de frutos por medio de la metodología de recolección de muestras en cuadrante, en la cual se establece o se enmarca una determinada zona para realizar el muestreo⁷.

Para la elección de la metodología de extracción se realizaron 3 ensayos: extracción con ácido fórmico, extracción por calentamiento y extracción asistida por baño ultrasónico; estos ensayos se realizaron teniendo en cuenta una previa revisión bibliográfica⁸⁻¹¹. Las inyecciones iniciales permitieron observar la posible presencia del analito y determinar que el método de extracción más eficiente fue la asistida por baño ultrasónico.

Para la extracción se realizó un tratamiento previo, el cual consistió en macerar los frutos de *Cotoneaster pannosus* con 0,02 L de una solución etanol (75%): agua en proporción 40:60 respectivamente. Posterior a esto, se llevó a baño ultrasónico durante 50 min a una temperatura de 323,15 K. Se dejó en reposo durante 24 h protegido de la luz y se filtró al vacío para eliminar compuestos no disueltos. Finalmente, el extracto hidroalcohólico se dispuso en filtros para jeringa de 0,45 µm para eliminar impurezas.

Separación del ácido gálico (AG) de la matriz

La separación del AG se realizó por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia, estableciendo como condiciones iniciales las basadas en la revisión bibliográfica¹². A partir de estas condiciones, se realizó la optimización del método mediante múltiples ensayos, asegurando las variaciones de las condiciones cromatográficas, donde se procedió a identificar el posible pico del analito de interés frente al pico de un patrón de AG, realizando la comparación en cuanto al tiempo de retención de los mismos.

Cuantificación del ácido gálico (AG)

Para poder trabajar con un patrón de referencia que permita soportar el estudio, se adquirió con Sigma Aldrich lote SLCL2739; N° CAS: 149-91-7 el estándar de ácido gálico (CAS 149-91-7) marca TRC Canadá, con una pureza de $\geq 97,50\%$.

Para la cuantificación se realizó una curva de calibración, como se muestra en la figura 2, por medio de HPLC UV-VIS utilizando el método de adición estándar. Se prepararon viales de capacidad 1,5 mL con la adición inicial de 400 µL extracto y una cantidad creciente patrón de AG, obteniendo 11 puntos con concentración conocida, donde el primer punto de la curva (punto cero o punto sin adición de patrón) corresponde al extracto puro obtenido.

Validación del método de separación

Para garantizar la reproducibilidad y confiabilidad de un método analítico se lleva a cabo el proceso de validación. El cual, según la FDA, es el proceso por el cual se establece mediante estudios de laboratorio, que las condiciones de funcionamiento del procedimiento cumplen los requisitos de las aplicaciones analíticas previstas¹³. Debido a esto, para el presente trabajo se evalúan los siguientes parámetros de validación:

Linealidad. Para la determinación de la linealidad se realizó una curva de calibración por el método de adición estándar. Se prepararon viales de capacidad 1,5 mL con la adición de un volumen de 400 µL extracto y una cantidad creciente de patrón de AG, para elaborar la curva de calibración y obtener la ecuación de la recta mediante regresión lineal y a su vez el coeficiente de determinación¹⁴.

Exactitud. Se determinó por medio del porcentaje de recuperación inyectando una muestra de 5,66 ppm de estándar de AG. Finalmente se calculó el porcentaje de recuperación entre el dato teórico y el resultado obtenido mediante la regresión lineal¹⁵.

Precisión. Se trabajó con un patrón de 270 ppm, el cual se corrió 5 veces en el equipo de cromatografía líquida de alta eficiencia, obteniendo 5 tiempos y 5 áreas. Finalmente se calculó la desviación estándar y el coeficiente de variación.

Robustez. Para la determinación de la robustez se realizó la corrida cromatográfica de un patrón de concentración conocida a condiciones diferentes de pH. En el primer ensayo se corrió por triplicado el patrón con una fase móvil de agua: acetonitrilo, con el gradiente de concentración estipulado. Del mismo modo, el segundo ensayo se corrió por triplicado con agua acidificada con ácido fórmico al 0,5% v/v. Para la evaluación de este parámetro se compararon los promedios de los tiempos de retención y las áreas bajo la curva obtenidas en cada ensayo¹³.

Límite de detección y cuantificación. Se realizó una curva de calibración con patrones de AG a una concentración bajas comprendida entre 1,0 a 7,0 ppm. Posteriormente, se realizó un análisis de datos de la regresión, donde se calcula el error típico de la curva de calibración de todo el conjunto de datos, y la pendiente de la curva de calibración¹⁶.

Resultados y discusión

*Separación y cuantificación de AG presente en frutos de *Cotoneaster pannosus* por HPLC*

Para definir las condiciones de separación y cuantificación del

AG, se tuvieron en cuenta sus propiedades fisicoquímicas tales como: solubilidad en agua (0,01 kg/ L), valor de Log P (0,70) y sus grupos funcionales con el fin de determinar la afinidad por las diferentes fases. Según bibliografía¹⁷, la columna más usada para la separación del AG mediante cromatografía líquida de alta eficiencia corresponde a la C18 debido a su baja polaridad.

Del mismo modo, teniendo presente que el AG es un ácido débil, se define que el tipo de cromatografía en fase reversa a usar corresponde a la supresión iónica. Para el desarrollo de este tipo de cromatografía, se debe tener presente que el pKa del AG es igual a 4,4; en donde dicho valor corresponderá al punto de equilibrio entre la especie ionizada y la no ionizada. De tal modo, la fase móvil debe manejar un valor de pH menor a 4,4 para obtener una mayor cantidad de especie no ionizada, mejorando la retención del analito y su cuantificación; en la literatura se evidencia el uso de ácido fórmico para desplazar el equilibrio hacia la especie no ionizada¹². Se debe tener una adecuada concentración del ácido usado o un valor de pH óptimo, para no permitir un aumento en el ancho del pico. En otras palabras, las moléculas no ionizadas, se difunden más lento que las moléculas ionizadas, generando falta de equilibrio entre la fase móvil y la fase estacionaria. Esta falta de equilibrio promueve que las moléculas ionizadas pasen por el detector en un tiempo menor que el de las molecular sin ionizar. De manera que, las moléculas con mayor retención harán que el ancho de base se extienda hasta que todas las moléculas retenidas salgan¹⁸.

Finalmente, se optimizó las demás condiciones cromatográficas de forma experimental, secuencial y lógica; luego de múltiples ensayos donde se modificó el flujo, concentraciones de la composición de la fase móvil y tipos de columnas, se encontró que las mejores condiciones frente a selectividad, resolución, platos teóricos y precisión corresponden a las mencionadas en la tabla 1. En la figura 1 se evidencia al pico de AG con un tiempo de retención (T_R) de 11,54 min, dicho pico es el producto de una adición estándar. De modo que, se realiza una comparación entre el área bajo la curva del patrón y el área del extracto resultante con una adición de patrón de AG en el posible tiempo de retención específico. La resta corresponde a un valor positivo, confirmando la presencia de AG en los frutos de Holly liso recolectado en Bogotá-Colombia. Como resultado se

Tabla 1. Condiciones de separación para el AG en los frutos de *Cotoneaster pannosus*.

| Condición | Valor o característica |
|---------------------------|---|
| Columna cromatográfica | Phenomenex Gemini 5 μ m C18, 110 Å, (150 mm x 4,6 mm) |
| Composición de fase móvil | Agua acidificada con ácido fórmico al 0,5% v/v y acetonitrilo grado HPLC. |
| Velocidad de flujo | 0,550 mL/min |
| Tipo de flujo | Gradiente tipo escalonado o step |
| Temperatura | 303,15 K |
| Volumen de inyección | 20,00 μ L |
| Longitud de onda | 272 nm |

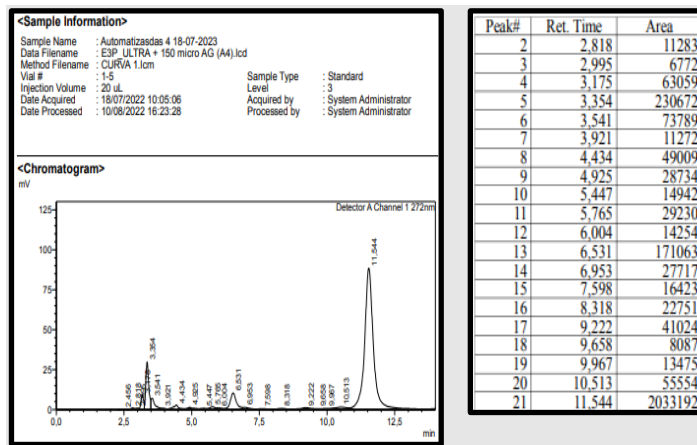


Fig. 1: Cromatograma obtenido del extracto de frutos de *Cotoneaster pannosus* más 150 μ L de estándar de AG con las condiciones finales de separación.

determinó que la concentración de AG es de 1,54 ppm en 0,4569 kg de frutos de Holly liso tratados.

Validación del método

Con el objetivo de que el método proporcione resultados reproducibles y confiables, se realiza la validación del método de separación y cuantificación teniendo en cuenta los siguientes parámetros:

Linealidad. Para la cuantificación se realizó una curva de calibración, como se muestra en la figura 2, por medio de HPLC UV-VIS utilizando el método de adición estándar. Se prepararon viales de capacidad 1,5 mL con 400 μ L de extracto hidroalcohólico resultante y cantidad creciente de AG, obteniendo 11 puntos con concentración conocida del patrón de ácido gálico (AG) de 0 ppm; 5,66 ppm; 11,30 ppm; 17,00 ppm; 22,60 ppm; 28,30 ppm; 34,00 ppm; 39,60 ppm; 45,30 ppm; 51,00 ppm y 56,60 ppm. Finalmente, se realizó la corrida cromatográfica por triplicado para obtener los resultados de área y elaborar la curva de calibración y la ecuación de la recta mediante la regresión lineal.

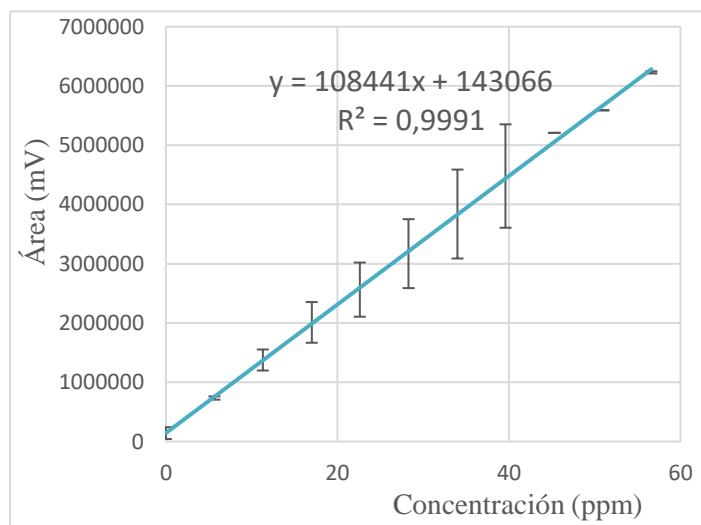


Fig. 2. Curva de calibración con adición de patrón de ácido gálico.

Una vez obtenida la curva de calibración del promedio del triplicado del ensayo de linealidad, tal y como indica la ICH Q2¹⁴, se llevó a cabo un análisis del gráfico con el fin de determinar los puntos que presentaban una mayor desviación de la línea de tendencia para hacer su respectivo descarte, sin embargo, no se evidenciaron puntos con desviación significativa, por tanto, se evaluó este parámetro con todos los puntos.

Según la guía de validación de métodos cromatográficos de la FDA (1994), para que un método se considere lineal, su R² debe ser mayor o igual a 0,999¹³; como se observa en la figura 1, el R² obtenido para el método fue de 0,9991; dato que cumple con el requisito, razón por la cual se considera un método lineal en el rango de trabajado.

Límite de detección y cuantificación (LDD-LDC). Para la determinación del LDD y del LDC se tuvo en cuenta el enfoque basado en la desviación estándar (σ) de la respuesta y la pendiente. En primer lugar, la estimación de la pendiente (m) se puede realizar mediante la construcción de una curva de calibración (figura 3). Por otro lado, la desviación estándar (σ) se puede estimar mediante el análisis de un blanco, el cual de acuerdo con el método utilizado corresponde al extracto etanólico obtenido, mediante la desviación estándar residual de la regresión lineal¹⁶. El programa Microsoft Excel puede realizar un análisis de datos, específicamente una estadística de la regresión, donde se calcula datos claves relacionados con la regresión lineal, entre ellos se destaca el error típico. El error típico arrojado fue de 13546,5; el cual corresponde a la desviación estándar (σ) sobre la curva de calibración o regresión lineal de todo el conjunto de datos. Con tal valor, y el valor de la pendiente (figura 3), se determina el LDD y LDC de la siguiente manera¹⁶:

$$\text{LDD} = \frac{3,3 * \text{Error típico}}{m} = \frac{3,3 * 13546,4561}{91789} = 0,4870 \text{ ppm}$$

$$\text{LDC} = \frac{10 * \text{Error típico}}{m} = \frac{10 * 13546,4561}{91789} = 1,48 \text{ ppm}$$

Según indican los cálculos de LDD y LDC, se determina que el presente método no puede garantizar resultados reproducibles

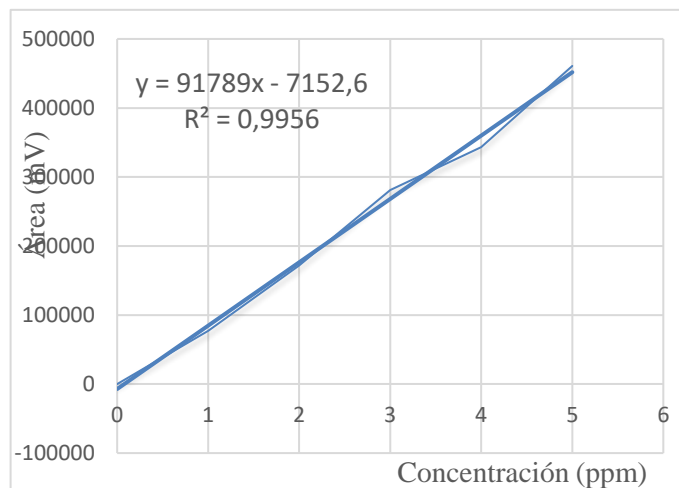


Fig. 3: Curva de calibración para la determinación del límite de cuantificación y el límite de detección.

a concentraciones menores a 1,48 ppm. Por otra parte, este método puede arrojar valores poco diferenciables con la señal de ruido del equipo por debajo de concentraciones de 0,487 ppm, que se considera como el límite de detección.

Para la determinación de LDD y LDC mediante detectores UV-VIS, se considera difícil asegurar la detección de compuestos a bajas concentraciones debido a pérdidas graduales del compuesto, pérdidas en la sensibilidad de la lámpara UV-VIS y aumento en el ruido por parte de este¹³. Asimismo, una fluctuación en la línea base, se puede dar por el uso de una columna que ya no sea apta o la variación de las proporciones de la fase móvil, las cuales afectarán la detección y cuantificación del analito¹⁹.

Precisión. Para la evaluación de la precisión del método, se determinó la dispersión de los datos obtenidos al realizar 5 réplicas del mismo analito, este parámetro se expresó estadísticamente a través de la desviación estándar (σ) y el coeficiente de variación, como se muestra en la tabla 2. El valor de aceptación para este parámetro según la guía de validación de métodos cromatográficos de la FDA¹³ debe ser menor a 1. De este modo, se puede observar que si bien, los valores del tiempo de retención tienen un coeficiente de variación que garantiza la precisión del método (0,46%), se puede decir que el método es preciso en términos del tiempo de retención.

Tabla 2. Resultados de precisión para el patrón de ácido gálico.

| Ensayo | Tiempo de retención (minutos) |
|----------|-------------------------------|
| 1 | 11,52 |
| 2 | 11,49 |
| 3 | 11,53 |
| 4 | 11,62 |
| 5 | 11,59 |
| Promedio | 11,55 |
| s | 0,05412 |
| CV % | 0,4684 |

<Sample Information>

Sample Name : PATRÓN AG 270 ppm (Precisión 1.2)
 Data Filename : PATRÓN AG 270 ppm (Precisión 1.2).lcl
 Method Filename : Metodo Acido Galico 30 DE JUNIO.lcm
 Vial # : 1-26 Sample Type : Unknown
 Injection Volume : 20 uL
 Date Acquired : 15/07/2022 9:54:55 Acquired by : System Administrator
 Date Processed : 15/07/2022 10:19:56 Processed by : System Administrator

<Chromatogram>

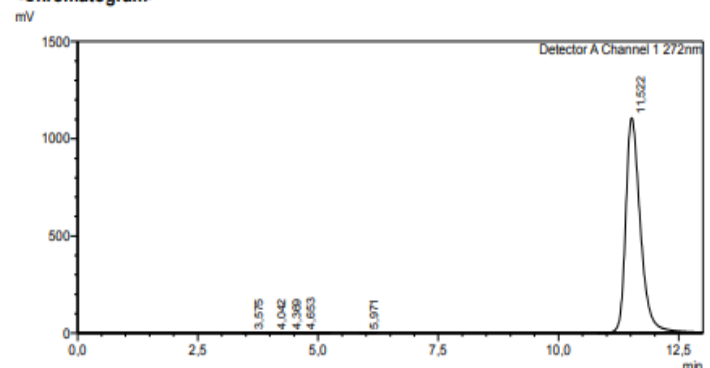


Fig. 4. Cromatograma de precisión para el patrón de ácido gálico.

Reproducibilidad. Por medio de este parámetro se evaluaron las variaciones en la respuesta del método como consecuencia al cambio de experimentador. Durante la evaluación de la repetibilidad cada uno de los experimentadores realizó 10 corridas correspondientes a una curva de calibración, de ello se comparó estadísticamente la variabilidad de la respuesta del método por medio del coeficiente de variación, de allí se obtuvo resultados menores a la unidad, con una diferencia de 0,012 entre cada uno de los ensayos. Así mismo, se evidencia que el experimentador B posee tres datos alejados al promedio: 11,60 min; 11,61 min y 11,62 min. De modo que, se realizó una prueba Q para el dato 11,60 min y saber si es necesario realizar el descarte de dichos datos. A continuación, se evidencia la prueba Q realizada¹⁶.

$$Q_{Exp} = \frac{|\text{resultado dudoso} - \text{Resultado más próximo}|}{\text{Resultado más alto} - \text{Resultado más bajo}}$$

$$Q_{Exp} = \frac{|11,60 - 11,58|}{11,62 - 11,52} = 0,2 \quad Q_{Crit} \text{ (de 10 datos al 95\% de confianza)} \\ = 0,466$$

Se obtiene que $Q_{Exp} < Q_{Crit}$, por lo que no se realiza ningún descarte en los datos. Teniendo en cuenta lo anterior, y que la diferencia entre el CV de cada ensayo es de 0,012; se puede interpretar que es un método reproducible.

Exactitud. El porcentaje de recuperación se evaluó a partir de la curva realizada para la determinación de los límites de cuantificación y detección (figura 3), con el fin de realizar la cuantificación por medio de estándar externo. Se realizó la inyección de un patrón de 5,66 ppm y por medio de la ecuación de la recta presentada a continuación²⁰, se realizó el despeje con el área obtenida del patrón para comparar el valor teórico con el experimental, obteniendo un porcentaje de recuperación del 103,2%.

$$Y = 91789 X - 7152,6 = 529032 \text{ mV}$$

$$X = \frac{529032 + 7152,6}{91789} = 5,84 \text{ ppm}$$

$$\frac{5,84}{5,66} * 100 = 103,2\%$$

Este valor puede estar influenciado por errores sistemáticos y por contaminación o impurezas, razones por las que pudo provocarse el aumento del valor estimado. No obstante, se obtuvo un valor de porcentaje de recuperación aceptado²¹, por lo tanto, se considera que este método es exacto.

Robustez. En la determinación de la robustez, se determinó que el pH era una de las especificaciones idóneas para el sistema, donde se decidió realizar inyecciones con agua sin ácido fórmico para evaluar la robustez del método. Al realizar la inyección sin el ácido fórmico se evidenció un aumento en el tiempo de retención a 19 minutos. Los drásticos cambios en la separación eran de esperarse, ya que el pH ejerce una gran influencia en la retención del AG, sin embargo, la forma en que cambiaron los resultados no eran los esperados, ya que, al no tener un pH ácido en la fase móvil, se tendrá al AG ionizado, el cual será más a fin a la fase estacionaria, generando una disminución en el tiempo de retención. Para la explicación de este resultado, se estudian el comportamiento del AG a distintos rangos de pH, realizando un análisis según el pKa en donde se ve afectada la geometría de la molécula, las propiedades eléctricas y el estado de ionización²². De allí, se concluye que el AG se puede presentar de 3 formas distintas según la variación del pH. En la figura 5 se evidencia que el AG puede formar enlaces de hidrógeno de forma intramolecular. Lo anterior se explica debido a una segunda ionización en el hidroxilo de la posición “para” respecto al ácido carboxílico, además de la redistribución de cargas negativas que se sitúan predominantemente en las moléculas de oxígeno, esto a su vez, provoca una disminución en la distancia entre los OH aumentando la posibilidad de la formación de puentes de hidrógeno intramoleculares para su estabilización (figura 5). De modo que, el AG no podrá hacer los puentes de hidrógeno con la fase móvil, obteniendo un predominio en las interacciones con el grupo aromático y la fase apolar, aumentando el tiempo de retención.

Teniendo en cuenta lo anterior, se puede observar que el valor de pH es crítico para la separación del AG en cromatografía líquida de alta eficiencia. Además, para considerar un posible rango de pH, o un rango en que el método es robusto, se debe tener en cuenta el pKa del AG, el cual tiene un valor de 4,4. Según lo anterior, y teniendo en cuenta que se pretende dirigir el equilibrio hacia el compuesto no ionizado, se podría inferir que el rango de pH a utilizar es entre 1,0 y 4,0.

Cuantificación del AG en los frutos de *Cotoneaster pannosus*

Para realizar la cuantificación de AG en los frutos de *Cotoneaster pannosus*, se llevó a cabo un análisis de regresión lineal obtenido a través del método de adición estándar de modo que, la adición de patrón a la muestra problema genera un incremento

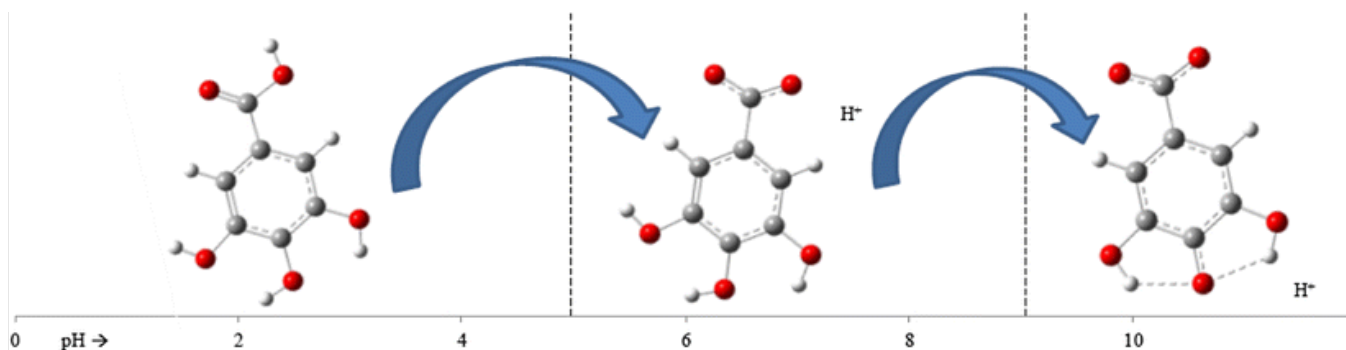


Fig. 5: Ionización del AG al aumentar el pH (Badhani y Kakkar, 2017).

en la posible señal del analito de interés (AG) superando la señal causada por los interferentes y permitiendo la identificación del posible pico de interés²³.

Tomando como base la curva de calibración obtenida en el análisis de linealidad del método, se toma la ecuación de la recta obtenida y se extrapola al valor de concentración obtenido en los frutos de Holly liso de Bogotá Colombia. Teniendo en cuenta lo anterior, se obtuvo una concentración de 1,536 ppm de AG en 0,4539 kg de frutos de *Cotoneaster pannosus*. Según bibliografía, se ha reportado la separación y cuantificación de AG en diferentes especies vegetales, donde se destacan aquellas obtenidas mediante HPLC, reportando concentraciones de 14,64 ppm para el té verde, 127, ppm para las avellanas y 2,72 ppm para la calabaza blanca^{22,24}. Según bibliografía, se ha reportado la separación y cuantificación de AG en diferentes especies vegetales, donde se destacan aquellas obtenidas mediante HPLC, reportando concentraciones de 14,6 ppm para el té verde, 127 ppm para las avellanas y 2,72 ppm para la calabaza blanca^{22,24}. Se debe tener en cuenta que la concentración de AG depende en gran medida del método de extracción, por lo que se pudo tener bajos rendimientos debido a este. Teniendo en cuenta características del Holly liso, como lo son, la fácil proliferación, su alta tasa de crecimiento, el fácil acceso y el bajo impacto ambiental que representa la recolecta de sus frutos, se considera que los frutos de Holly liso son una posible fuente natural promisoría de AG.

Parámetros cromatográficos

Los parámetros cromatográficos permiten saber la calidad de la separación del analito, donde entre mayor sea la diferencia entre los tiempos de elución, se hablará de una mejor separación²⁵. Para la determinación de dichos parámetros, se deben considerar algunos datos que se infieren de la figura 6. De dicha figura se describe el tiempo muerto (t_m^{**}) = 2,46 min, el tiempo de retención del AG = 11,54 min y el tiempo de retención del compuesto más cercano al AG = 10,51 min.

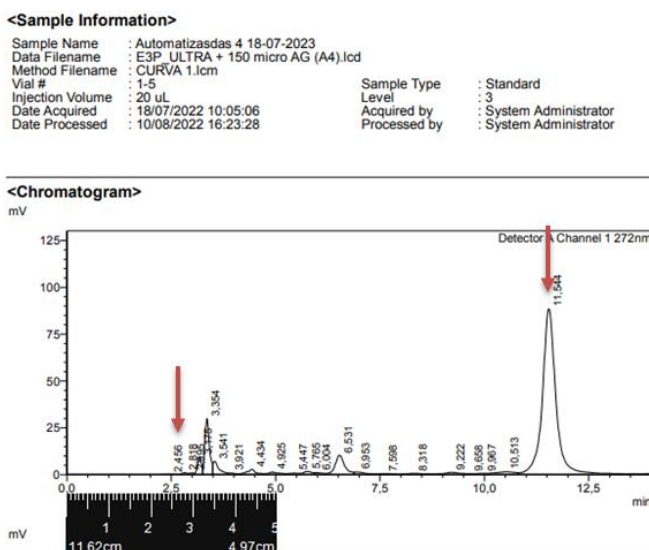


Fig. 6: Cromatograma del extracto más patrón de AG a 17 ppm para la determinación de los parámetros cromatográficos.

Tiempo de retención y tiempo de retención corregido (t_r')²⁶

$$t_r' = t_r - t_m = 11,54 \text{ min} - 2,45 \text{ min} = 9,08 \text{ min}$$

donde: t_r' = tiempo de retención corregido

t_r = tiempo de retención

t_m = tiempo muerto

Para entender el tiempo de retención obtenido se debe tener en cuenta los grupos hidroxilos que otorgan a la molécula cierta afinidad hacia los solventes acuosos, no obstante, el Log P nos indica un comportamiento apolar. El uso de una matriz compleja requiere que cada uno de los compuestos presentes posean diferencial de migración a través de la columna para lograr la separación, por ello se incrementó la proporción de agua en el inicio del gradiente con el fin de eluir las otras moléculas (más afines al solvente de mayor polaridad) presentes en el extracto. Una vez separadas las otras moléculas, se generó una rampa de concentración aumentando la proporción de acetonitrilo, de modo que la fase móvil presentara mayor afinidad hacia el AG, permitiendo de esta forma ajustar el tiempo de retención del AG justo después de salida de los otros componentes.

Factor de capacidad (k')²⁶

$$k' = \frac{t_r'}{t_m} = \frac{9,080 \text{ min}}{2,450 \text{ min}} = 3,700$$

donde: t_r' = tiempo de retención corregido

t_m = tiempo muerto

Según Ahuja y Dong, “el factor de capacidad (k') mide el número de veces en que el analito es retenido en relación con un componente no retenido”²⁵. Se debe tener en cuenta que quienes tienen valores muy altos de (k') poseen tiempos largos de ensayo y un posible ensanchamiento de los picos en la columna. Por otro lado, para obtener una retención adecuada, la mayoría de los analitos en los ensayos eluyen con valores de (k') entre 1 y 20. El resultado corresponde a 3,700, siendo un valor acertado para determinar que el AG tiene una adecuada interacción con la fase estacionaria y la fase móvil para lograr su separación.

Resolución (R)²⁶

$$\begin{aligned} R &= \frac{1}{4} * \sqrt{N} * \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} * \frac{k'}{(k' + 1)} \right) \\ &= \frac{1}{4} * \sqrt{5955} * \left(\frac{(1,130 - 1)}{1,130} * \frac{3,700}{(3,700 + 1)} \right) \\ &= 1,720 \end{aligned}$$

donde: N = número de platos teóricos

α = selectividad

k' = factor de capacidad

Se considera de suma importancia determinar la resolución, ya que, según su valor, se podrá determinar si hay una separación y una cuantificación sólida de cada uno de los picos evaluados. Para este caso, se determinó la resolución entre el pico de AG, con t_r de 11,54 minutos y el pico adyacente a este, con t_r de

10,51 minutos. Ahora bien, de acuerdo con el *Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC* el valor de resolución objetivo es $> 2^{25}$, sin embargo, entre otras guías como Agilent Technologies, menciona que valores $> 1,7$ son los deseables para los métodos robustos²⁷. Además, considera que el valor de 1 es el mínimo para que se produzca una separación medible y que permita una separación adecuada²⁸. De modo que, al observar la resolución calculada (1,720) se observa una separación entre los picos mencionados.

*Número de platos teóricos (N) y altura del plato (H)*²⁶

Número de platos teóricos

$$0,3500 \text{ cm} * \frac{5 \text{ min}}{4,970 \text{ cm}} = 0,3521 \text{ min}$$

$$N = 5,550 * \frac{t_r^2}{W_{0,5}^2} = 5,550 * \frac{(11,54 \text{ min})^2}{(0,3521 \text{ min})^2} = 5955 \text{ platos teóricos}$$

donde $W_{0,5}$ = ancho a media altura

Altura del plato²⁶

$$H = \frac{L}{N} = \frac{150000 \mu\text{m}}{5955} = 25,18 \mu\text{m}$$

donde: H= Altura del plato

L= Longitud de la columna

N= Número de platos teóricos

El número de platos teóricos es una medida de la eficiencia de la columna, la cual está relacionada con el tiempo de retención del analito y el ancho del pico²⁵. Este modelo de platos teóricos permite determinar la eficiencia de la separación por medio de la relación inversamente proporcional con el ancho del pico. En este caso se realizó la determinación de los platos teóricos por medio del ancho a media altura del pico de AG, donde se obtuvo un valor de 5955 platos teóricos, valor que permite determinar que el método es eficiente según los lineamientos de la FDA en su guía de validación para métodos cromatográficos donde el valor de aceptación es > 2000 platos teóricos¹³. La variación en este resultado puede verse influenciada por los mecanismos de ensanchamiento de banda tales como: camino múltiple o difusión turbulenta, transferencia de masa y difusión longitudinal. Donde el principal mecanismo presente en este parámetro corresponde al de camino múltiple, ya que este hace referencia a las diferentes trayectorias que puede tomar la sustancia para finalmente eluir, siendo unas distancias mayores que otras, afectando de este modo el ancho del pico y por lo tanto influenciando negativamente el número de platos teóricos¹⁷.

Conclusiones

En el presente trabajo de investigación se validó la metodología de separación de ácido gálico (AG) en *Cotoneaster pannosus* de Bogotá-Colombia, por medio de la determinación de las condiciones cromatográficas que permitieron resultados reproducibles. Para la cuantificación y la validación del ácido gálico,

se eligió como el mejor método de extracción el asistido por baño ultrasónico, esto en comparación a la extracción con ácido fórmico y extracción por calentamiento, la cual se considera importante por su bajo impacto ambiental, facilidad de uso y su innovación al pertenecer a una técnica no convencional. Por otro lado, la determinación de las óptimas condiciones de separación se llevó a cabo a partir de un análisis secuencial, experimental y lógico. El análisis se evidenció mediante los cromatogramas obtenidos con las siguientes condiciones de separación: columna Phenomenex Gemini 5 μm C18 (150 mm x 4,6 mm), temperatura de 30°C, flujo de 0,550 mL/ min en gradiente, volumen de inyección de 20,00 μL , longitud de onda de 272 nm y una fase móvil compuesta por agua acidificada con ácido fórmico al 0,5% v/v y acetonitrilo grado HPLC. Gracias a dichas condiciones de separación se determinó que la cantidad de ácido gálico presente en el fruto de la planta de *Cotoneaster pannosus* es 1,536 ppm, lo cual corresponde a una cantidad promisoriosa teniendo en cuenta sus características. Finalmente, la validación de la metodología de separación obtuvo resultados lineales, reproducibles (CV1 = 0,3630 % y CV2= 0,3510%), exactos (% de recuperación = 103,2%) y con LDD y LDC de 0,487 ppm y 1,48 ppm respectivamente. Asimismo, se considera que el método no es robusto en términos de pH, debido a la alta influencia que tiene el mismo en la retención del analito.

Referencias

1. RJ Andrade, M Robles, A Fernández, S López, C López, MI Lucena. Assessment of drug-induced hepatotoxicity in clinical practice: A challenge for gastroenterologists. **World Journal of Gastroenterology**, **13(3)**, 329-340 (2007).
2. A Cano, LM Cifuentes, PJ Amariles. Toxicidad hepática causada por medicamentos: revisión estructurada. **Revista Colombiana de Gastroenterología**, **32(4)**, 337-348 (2017).
3. U Latief, H Husain, D Mukherjee, R Ahmad. Hepatoprotective efficacy of gallic acid during Nitrosodiethylamine-induced liver inflammation in Wistar rats. **Journal of Basic & Applied Zoology**, **76**, 31-41 (2016).
4. AM Díaz, JE Díaz, O Vargas. Catálogo de plantas invasoras de los humedales de Bogotá. Grupo de Restauración Ecológica de la Universidad Nacional de Colombia y Secretaría Distrital de Ambiente (2012). Disponible en: https://oab.ambientebogota.gov.co/?post_type=dlm_download&p=3692
5. O Mikeš. High-Performance Liquid Chromatography of Biopolymers and Bio oligomers. Separation of Individual Compound Classes. **Journal of Chromatography library**, **41(B)**, B377-B467 (1988).
6. MW Dong. The Essence of Modern HPLC: Advantages, Limitations, Fundamentals, and Opportunities. **LCGC North America**, **31(6)**, 472-476 (2013).
7. JE Weaver. The quadrat method in teaching ecology. **The Plant World**, **21(11)**, 267-283 (1918).
8. J Leblanc, A Akbarzadeh, J Andrews, H Lu, P Golding. Heat extraction methods from salinity-gradient solar ponds and introduction of a novel system of heat extraction for improved efficiency.

- Solar Energy**, **85(12)**, 3103–3142 (2011).
9. F Zakaria. Quantitative HPLC Analysis of Gallic Acid in *Benincasa hispida* Prepared with Different Extraction Techniques. **Sains Malaysiana**, **43(8)**, 1181–1187 (2014).
 10. PR Das, JB Eun. A comparative study of ultra-sonication and agitation extraction techniques on bioactive metabolites of green tea extract. **Food Chemistry**, **253**, 22–29 (2018).
 11. CD Xuan, HN Xuan, DH Dong, TM Thuy, X Chinh. Tannins: Extraction from Plants. En *Tannins - Structural Properties, Biological Properties and Current Knowledge*. IntechOpen (2020).
 12. F Les, V López, G Caprioli, R Iannarelli, D Fiorini, M Innocenti, M Bellumori, F Maggi. Chemical constituents, radical scavenging activity and enzyme inhibitory capacity of fruits from *Cotoneaster pannosus* Franch. **Food & Function**, **8(5)**, 1775–1784. (2017).
 13. FDA Food and Drug Administration. Reviewer Guidance' Validation of Chromatographic Methods (1994). Disponible en: <https://www.fda.gov/media/75643/download>
 14. ICH Q2 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* (1996).
 15. CC Sabido, CR Rosado, JG Castellanos, AF Betancur, LA Guerrero, PO Acereto. Adaptación de un micrométodo espectrofotométrico para determinación de fósforo en hueso. **Revista Latinoamericana de Química**, **38(2)**, 113–122 (2010).
 16. B Castillo, R González. Protocolo de validación de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos. **Revista Cubana de Farmacia**, **30(1)**, 1-7 (1996).
 17. FH Alencar, HR Nunes. Gallic acid: Review of the methods of determination and quantification. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, **46(3)**, 257–265 (2016).
 18. EE Leon, J Guevara. Development of a RP-HPLC Method for Separating and Quantifying Muscimol in Different Developmental Stages of the Fungus *Amanita muscaria*. **Journal Chemistry**, **2020**, 1-4 (2020).
 19. OA Quattrocchi, RF Laba, SA Andrizzi. *Introducción a la HPLC: aplicación y práctica*. Artes Gráficas Farro. Buenos Aires (1992).
 20. W Horwitz, JW Latimer. Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemists. Official Method 931-01. Phosphorus in plants. Cap 3, pp. 21 Arlington VA, USA(2005).
 21. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis: Phosphorus in plants. Association of Official Analytical Chemists, Estados Unidos (1990).
 22. B Badhani, R Kakkar. DFT study of structural and electronic properties of gallic acid and its anions in gas phase and in aqueous solution. **Structural Chemistry**, **28(6)**, 1789–1802 (2017).
 23. MT Stauffer. Introductory chapter: The many faces of calibration and validation in analytical methodology in the present day. En: *Calibration and Validation of Analytical Methods - A Sampling of Current Approaches*. IntechOpen (2018).
 24. PB Collins, MA Thompson. Handbook on Gallic Acid: Natural Occurrences, Antioxidant Properties and Health Implications. Nova Publishers. USA (2013).
 25. S Ahuja, MW Dong. Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC. **Separation Science and Technology**, **(6)**, 1-658 (2005).
 26. P Ravisanka, S Anusha, K Supriya, UA Kumar. Fundamental Chromatographic Parameters. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, **55(2)**, 46-50 (2019).
 27. P. Carr, R. Majors. *The LC Handbook: Guide to LC Columns and Method Development*. Agilent Technologies, USA (2015)
 28. EE León. 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*). **Avances en Química**, **18(2)**, 55-59 (2023).
 29. DC Harris. *Quantitative Chemical Analysis*. Editorial W. H. Freeman and Company. New York (2010).