www.saber.ula.ve/avancesenquimica
Avances en Química, 21(2), 25-34 (2026)
Artículo científico

Desarrollo y aplicación de un método HPLC para la cuantificación de ácido shikímico en frutos de *Cotoneaster pannosus*: una fuente alternativa de precursores farmacéuticos

María José Güiza Luna, Danna Sofía Sánchez Camacho, 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: 27/01/2026 **Revisado**: 03/03/2026 **Aceptado**: 19/08/2026

Resumen

El ácido shikímico (AS) es el precursor biosintético fundamental para la producción del fármaco antiviral oseltamivir, debido a la necesidad de diversificar sus fuentes naturales, se evaluó el fruto de *Cotoneaster pannosus* como una alternativa de suministro. Se desarrolló y aplicó un método por HPLC-UV para su cuantificación, empleando una columna ReproSil–Pur Basic-C8, la fase móvil compuesta por agua (HCOOH 1%, pH 2,67) y acetonitrilo en elución por gradiente. La extracción se optimizó mediante ultrasonido a 50 °C, logrando una recuperación eficiente del analito. El método demostró ser lineal (R^2: 0,998), exacto (100,1% ± 3,6%) y preciso (CV < 3%), con límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) de 1,24 ppm y 3,76 ppm, respectivamente. Se determinó una concentración de 50,4 ppm de AS en la muestra fresca. Aunque este contenido es menor al de fuentes tradicionales, la amplia disponibilidad geográfica y la baja complejidad de extracción lo pueden considerar como una fuente natural complementaria de interés para la industria farmacéutica.

Palabras clave: ácido shikímico; Holly liso; *Cotoneaster pannosus*; cuantificación; cromatografía líquida de alta resolución

Abstract

Development and application of an HPLC method for the quantification of shikimic acid in *Cotoneaster pannosus* fruit: an alternative source of pharmaceutical precursors. Shikimic acid (SA) is the fundamental biosynthetic precursor to produce the antiviral drug oseltamivir, due to the need to diversify its natural sources, the fruit of *Cotoneaster pannosus* was evaluated as an alternative supply. An HPLC-UV method was developed and applied by for its quantification, using a ReproSil–Pur Basic-C8 column and a mobile phase consisting of water (1% HCOOH, pH 2,67) and acetonitrile in gradient elution. Extraction was optimized via ultrasound at 50 °C, achieving an efficient recovery of the analyte. The method proved to be linear (R^2: 0,998), accurate (100,1% ± 3,6%), and precise (CV< 3%), with limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) of 1,24 ppm and 3.76 ppm, respectively. A concentration of 50,4 ppm of SA was determined in the fruit fresh sample. Although this content is lower than that of traditional sources, its wide geographical availability and low extraction complexity make it a valuable complementary natural source of interest to the pharmaceutical industry.

Keywords: Shikimic acid; Holly liso; *Cotoneaster pannosus*; Quantification; High Performance Liquid Chromatography

Introducción

La influenza es una infección respiratoria viral aguda que afecta a todos los grupos de edad y se asocia con una alta mortalidad durante pandemias, epidemias y brotes esporádicos, que afecta a casi el 10% de la población mundial anualmente, causando alrededor de medio millón de muertes cada año (Saxena et al., 2014; Borah, 2015; Les et al., 2017)[1-3]. Actualmente, la industria farmacéutica cuenta con 4 principios activos aprobados por las agencias regulatorias para el uso en la quimioprofilaxis y el tratamiento de la influenza; el oseltamivir, zanamivir, peramivir y baloxavil marboxil (Javanian et al., 2021)[4]. Particularmente, desde hace algunos años se ha evidenciado que la demanda del oseltamivir ha aumentado de manera considerable y la industria farmacéutica requiere más fuentes de obtención de AS (figura 1).

En la actualidad, este compuesto se obtiene del anís estrellado

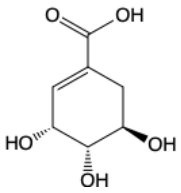


Fig. 1: Estructura química del ácido shikímico.

chino *(Illicium verum)*, sin embargo al revisar la literatura, se identificó que una de las posibles alternativas para la extracción de AS a partir de fuentes naturales se encuentra en el fruto del arbusto *Cotoneaster pannosus*, el cual, según diferentes estudios, presenta un alto contenido en polifenoles y demás metabolitos secundarios, entre los cuales se encuentran el ácido shikímico, ácido gálico, catequina, epicatequina, ácido 3-o-cafeoilquínico, ácido 5-o-cafeoilquínico, rutina, hiperósido, ácido cinámico y naringina (ICH, 2023)[5].

Por tal motivo, en el presente trabajo se realiza el desarrollo y aplicación de un método analítico para la separación y cuantificación de AS por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), empleando el fruto del *Cotoneaster pannosus* obtenido en la ciudad de Bogotá, Colombia, con el objetivo de presentar una posible fuente alternativa de obtención de AS, para la síntesis de oseltamivir.

Parte experimental

Materiales

Equipos: el análisis se realizó en un cromatógrafo líquido Shimadzu® i-Series Advanced LC-2030C, equipado con un detector UV/vis, una bomba de elución en gradiente con dispositivo de desgasificación, un inyector automático de enfriamiento y un horno de columna. La separación cromatográfica se logró utilizando la columna ReproSil–Pur Basic-C8 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm) y los datos se adquirieron a través del software Manuals Lab Solution 20A 2030. Adicionalmente, para el proceso de extracción se utilizó una balanza analítica Ohaus, un baño ultrasónico Branson ultrasonics, una plancha de calentamiento Ohaus, un sonicador digital Qsonica, un espectrofotómetro UV-VIS Thermo Genesys y un pHmetro STARTER 3100M Ohaus.

Estándares y reactivos: estándar de ácido shikímico ≥99% (SIGMA-ALDRICH LOTE: SLCJ2778; N° CAS: 138-59-0), ácido fórmico (Merck), Ácido Fosfórico (Merck), acetonitrilo (Merck), nitrato de amonio (Merck) y agua grado HPLC.

Material vegetal: se recolectaron las muestras del fruto del arbusto *Cotoneaster pannosus* presente en zonas aledañas a la Universidad El Bosque de Bogotá, Colombia, el día 31 de Julio del 2023. Las coordenadas de la zona urbana donde se realizó la recolección fueron -74,03165 longitud (O) y 4,71195 latitud (N). La temperatura en esta zona el día de la recolección osciló entre los 11-15°C, con una humedad relativa del 82%. Posterior a la recolección, el Departamento de Biología de la Universidad El Bosque llevó a cabo la caracterización botánica del material vegetal y proporcionó el certificado de identificación taxonómica. La extracción del ácido shikímico del fruto del arbusto *Cotoneaster pannosus* se realizó sobre la totalidad del fruto, utilizando el material vegetal fresco para evitar la pérdida del analito de interés, considerando su alta solubilidad en agua y la posible concentración de este en el fruto. Esta decisión se fundamentó en la observación de los distintos estados de maduración del fruto, el cual exhibe un color verde durante su fase de crecimiento y un llamativo tono rojo-anaranjado brillante cuando está fresco, el cual se vuelve opaco a medida que madura.

Métodos

Método de extracción: la extracción del AS del fruto del *Cotoneaster pannosus* se basó en un diseño de estudio ortogonal L16 (45) realizado por Cai et al. (2014)[6]. En este estudio, se investigaron los efectos de diversas variables, como la potencia aplicada, la proporción de disolvente a material y el tiempo de extracción, sobre el rendimiento de dos tecnologías diferentes. Adicionalmente, se evaluaron diferentes solventes orgánicos para llevar a cabo la extracción. De esta manera, inicialmente se tomó una muestra de 25 gramos del fruto, la cual se maceró en un mortero con la adición de 250 mL de agua, metanol y acetona para obtener tres extractos diferentes. Posteriormente, estos extractos se sometieron a ultrasonido utilizando dos equipos diferentes: uno a través de un baño ultrasónico durante una hora, y el otro mediante una sonda ultrasónica a 50 Hz durante 10 minutos, con intervalos de 2 minutos. Finalmente, se dejaron en reposo durante 24 horas, se filtraron y se almacenaron en frascos ámbar.

Pre-tratamiento de las muestras: una vez realizada la extracción por ultrasonido, se realizó un pretratamiento de la muestra mediante una extracción líquido-líquido con éter de petróleo para eliminar algunos compuestos apolares de la matriz, esta fracción fue eliminada del extracto de interés. Posteriormente se filtraron utilizando un filtro jeringa hidrofílico de politetrafluoroetileno con un diámetro de 25 mm y un tamaño de poro de 0,45 µm. Finalmente, se desgasifican utilizando un baño ultrasónico, donde cada muestra se deja en el equipo durante 3 minutos antes de ser inyectada en el equipo de cromatografía liquida de alta eficiencia.

Condiciones cromatográficas: el AS fue separado y cuantificado mediante un sistema de HPLC de fase reversa con detección UV, empleando una columna ReproSil–Pur Basic-C8 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm) a una temperatura de 20°C, una mezcla de ácido fórmico al 1,0% en agua (pH 2,67) y acetonitrilo como fase móvil con un sistema de elución en gradiente (tabla 1), un caudal de 0,4 mL/min durante 0-4,5 min y de 0,8 mL/min durante 4,5-15 min, un volumen de inyección de 5µL y detección UV a 230-250 nm. Donde se evidenció que a mayor concentración de acetonitrilo mayor el tiempo de retención.

Método de validación: se establecieron los parámetros de validación siguiendo las directrices recomendadas por la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) 43, categoría I. De esta manera, el método fue evaluado en términos de linealidad, exactitud, precisión, límite de detección, el límite de cuantificación y la robustez del método (Reed et al., 2002)[7].

Preparación de la solución stock: se trabajo con una solución madre de 3000 ppm, la cual se empleó para el desarrollo de la validación parcial enfocada en los parámetros críticos de desempeño analítico necesarios para garantizar la confiabilidad de la cuantificación.

Resultados y discusión

A continuación, se presentan los resultados obtenidos de la implementación de la metodología de extracción, las condiciones de análisis cromatográfico y la determinación de las características analíticas de desempeño del método utilizado para separar y cuantificar el AS contenido en el fruto del *Cotoneaster pannosus*.

Desarrollo de las condiciones del método de extracción

Inicialmente se replicó las condiciones cromatográficas descri-

tas por Les et al. en su investigación del arbusto *Cotoneaster pannosus.* Sin embargo, no se contaba con una columna de la misma longitud y además este estudio no se limitaba a la separación únicamente del AS. De modo que, se plantearon de manera secuencial y lógica nuevas condiciones cromatográficas encontradas en la literatura.

Selección del solvente de extracción

Para la selección del solvente de extracción, se evaluó el perfil cromatográfico del ácido shikímico (AS) empleando agua, metanol y acetona. El agua fue seleccionada como el solvente óptimo, ya que proporcionó un pico sensible y simétrico con alta resolución en un tiempo de retención apropiado, como se muestra en la figura 2. En contraste, el metanol mostró baja sensibilidad y pobre resolución, mientras que con la acetona el analito no fue detectable, descartando ambos solventes para el proceso de extracción. De igual forma, el agua es considerada una excelente alternativa en el marco de la química verde. Su uso como disolvente universal disminuye el impacto ambiental y los costos operativos asociados a la gestión de residuos peligrosos.

Selección del método de extracción

Con el fin de optimizar la eficiencia de la extracción del ácido shikímico (AS), se compararon dos técnicas asistidas por ultrasonido utilizando agua como solvente (figura 3): baño ultrasónico (A) y sonda ultrasónica (B) permiten la recuperación del analito.

Para estas primeras corridas cromatográficas en específico, se emplearon las condiciones descritas en las referencias bibliográficas, en donde se utilizó una fase móvil compuesta por Agua (H-COOH 0,1%): Metanol 95:5, un flujo de 0,7 mL/min, un volumen de inyección de 5 µL y una temperatura de 30 °C. Como resultado de la inyección de los tres extractos del *Cotoneaster pannosus* mencionados anteriormente, se evidenció que el pico correspondiente al AS tenía una intensidad significativamente mayor en el extracto acuoso en comparación con los demás solventes, lo cual puede atribuirse a la alta solubilidad del AS en agua (National Library of Medicine, 2024)[8], que alcanza los 150 mg/mL a 21 °C. Por tal motivo, se seleccionó el agua como solvente de la extracción.

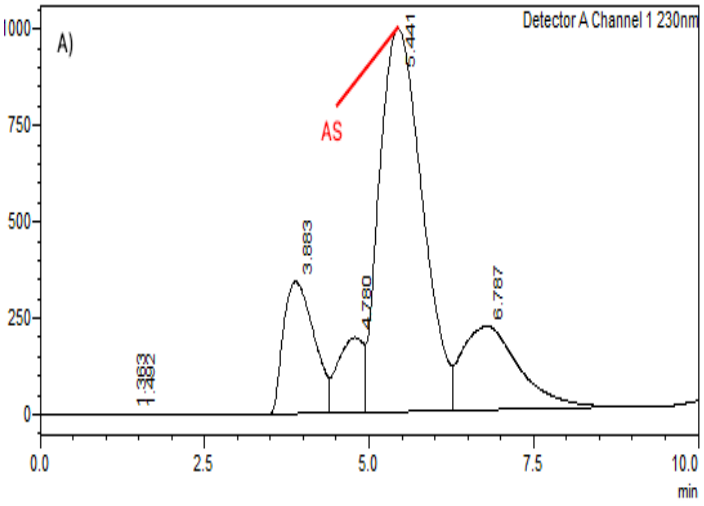


Fig. 2: Cromatograma del extracto de AS obtenido utilizando Agua para la extracción

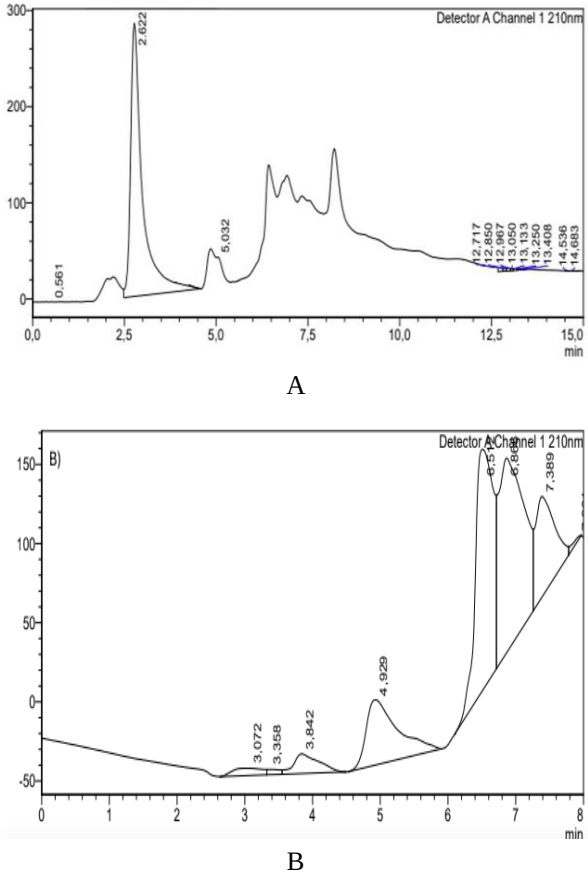


Fig. 3: Cromatogramas del extracto de AS obtenido mediante baño ultrasónico (A) y sonda ultrasónica (B) usando agua como disolvente.

No obstante, a pesar de la alta solubilidad del AS en agua, se evidenció que este solvente por sí solo era insuficiente para la extracción selectiva de este compuesto, lo cual estaba asociado directamente a la complejidad de la matriz del flujo, pues el AS se encuentra asociado a otras moléculas como terpenos, clorofila, lípidos y compuestos inorgánicos. Por lo tanto, se analizaron dos métodos de extracción complementarios asistidos por ultrasonido, uno mediante el uso de una sonda ultrasónica y el otro a través de un baño de ultrasonido. Como se observa en la figura 3, se obtuvieron mejores resultados al utilizar el baño ultrasónico, ya que se evidencia un pico de área cuantificable con una mayor resolución y simetría. Esto podría explicarse debido a que, aunque ambos equipos operan mediante los efectos destructivos de las ondas ultrasónicas para intensificar la transferencia de masa, el segundo aplica una intensidad ultrasónica más alta. En este caso, las ondas generan ciclos fluctuantes de alta presión en los líquidos, lo que genera la formación de burbujas de vapor. Estas burbujas aumentan de tamaño hasta alcanzar un volumen en el que ya no pueden absorber más energía, resultando en su colapso violento durante la implosión.

Este proceso produce temperaturas y presiones extremadamente elevadas que podrían ocasionar la ruptura de enlaces químicos del AS (Trapalis et al., 2004)[9]. Por esta razón, no se observa el pico característico del analito en el cromatograma cuando se emplea la sonda para la extracción (figura 3B).

Para la selección de los otros parámetros de extracción del AS, este trabajo se basó en un estudio ortogonal realizado por *Cai et al.*, en donde se investigaron los efectos de diversas variables, como la potencia aplicada, la proporción de disolvente y el tiempo de extracción, sobre el rendimiento de dos extracciones diferentes empleando ultrasonido. De acuerdo con esto, se observó que, a temperaturas elevadas, por debajo del punto de ebullición del AS, se incrementaba la solubilidad, la difusividad y la presión, lo que facilitaba la penetración de las ondas en el tejido del fruto, por lo cual se evidenció una mayor recuperación del extracto a una temperatura de 50°C. Asimismo, se evidenció que un aumento en el volumen de disolvente resultaba en un incremento lineal del rendimiento. Esto se debe a que un mayor volumen de disolvente acelera la velocidad de difusión del AS desde el interior del fruto hacia el exterior, ya que las moléculas tienen más espacio para moverse en el solvente, lo que facilita su migración desde regiones de mayor concentración (dentro del fruto) hacia regiones de menor concentración (en el disolvente): por lo que se optó por emplear un volumen de 250 mL.

Desarrollo de las condiciones del método cromatográfico

Inicialmente, se realizaron diferentes pruebas preliminares para seleccionar los solventes que formarán parte de la fase móvil, partiendo con una mezcla de agua: metanol. Sin embargo, a pesar de modificar las proporciones de estos solventes para tratar de mejorar la retención del analito, se observaron picos poco resueltos y mal definidos tanto en el patrón como en los extractos, esto puede atribuirse a la interacción del AS con la columna. En consecuencia, se optó por explorar una nueva combinación de fase móvil que incluyera un disolvente menos polar, como el acetonitrilo, con el objetivo de lograr una mayor retención del analito en la fase estacionaria y, de esa manera, obtener picos más separados. Aunque este ajuste mejoró la separación de los picos, se evidenció un aumento en el número de picos detectados en el extracto, lo cual sugiere una selectividad reducida de la mezcla para el analito de interés o una posible degradación de este. A partir de la suposición de la posible degradación de analito, se ajustó el pH de la fase móvil, pues se identificó la importancia de mantener un entorno ácido que estuviese por debajo del pKa del AS, ya que de esta manera se protonan los grupos ácidos del analito de interés, transformándolos en sus formas no ionizadas. Como resultado, la forma protonada se vuelve más hidrofóbica y, por ende, interactúa de manera más efectiva con la fase estacionaria apolar, facilitando su retención en la columna cromatográfica y permitiendo una mejor separación de otros compuestos en la muestra. Tras considerar estos factores y obtener mejores resultados, se determinó que la mezcla más adecuada consistía en agua acidificada con ácido fórmico al 1% (pH 2,67) y acetonitrilo.

Tabla 1. Condiciones de gradientes de flujo y fase móvil establecidos (Fuente: Elaboración propia).

	Ensayo sin gradiente C8	**Ensayo con gradientes C8**
Fase Móvil	Agua H-COOH (1%): Acetonitrilo	
Gradiente de fase móvil	No aplica	0 - 2,9 min: 100 : 0 2,9 - 3.7 min: 90 : 10 3,7 - 15 min: 80 : 20
Gradiente de flujo	No aplica	0 - 4,5 min: 0,4 mL/min 4,5 - 15 min: 0,8 mL/min
Tiempo de retención A.S	3,648	2,622
Tiempo de retención C.D	4,614	5,032
Factor de selectividad (*a*)	1,32	2,18

C.D = compuesto desconocido.

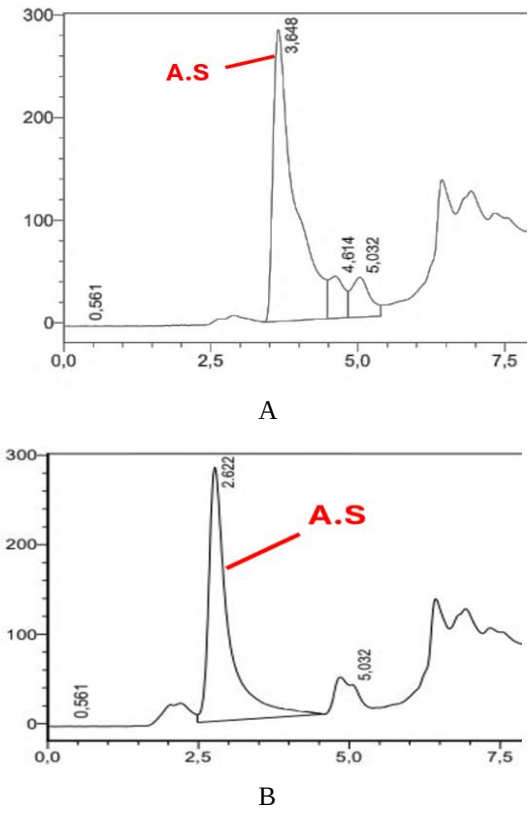


Fig. 4: A) Cromatograma con la columna C8 sin gradiente y B) Cromatograma con la columna C8 con gradiente.

Para la selección de la columna, los ensayos preliminares se realizaron utilizando una fase móvil de agua:ACN (80:20) en ambas columnas. Para la columna C8, se obtuvo un tiempo de retención de 3,648 min para el AS y de 4,614 min para el compuesto desconocido 1(figura 4), con un factor de selectividad de 1,32 y 1258 platos teóricos (tabla 1).

Selección de la modalidad de gradiente de flujo y fase móvil

La selección de la columna cromatográfica se basó en las propiedades fisicoquímicas del AS, principalmente en su solubilidad en agua y polaridad que es bastante alta, teniendo un log p de -1,7. De tal forma, teniendo en cuenta las propiedades del AS, se determinó que una columna C18 como opción para rea-

lizar el desarrollo del método debido a que poseen una combinación de propiedades fisicoquímicas favorables, como una larga cadena alquilo C18 que las hace altamente hidrofóbicas, grupos metilo terminales que les otorgan estabilidad química y una superficie de sílice modificada que las vuelve compatibles con solventes apolares, lo que permite retener compuestos de baja polaridad en la columna y lograr una mejor separación frente a los compuestos polares (Rubinson, 2000)[10]. Sin embargo, al comenzar a realizar las pruebas preliminares con el extracto del fruto del *Cotoneaster pannosus*, se presentó una gran dificultad al separar los picos presentados en el mismo tiempo de retención que el AS. Por lo tanto, a pesar de realizar pruebas con diferentes proporciones de fase móvil, flujos y temperaturas, se optó por realizar un cambio en la polaridad de la columna hacia una columna C8.

La determinación de trabajar con una columna C8 se debe a que en la literatura se describe que el extracto acuoso del fruto del *Cotoneaster pannosus* contiene una gran cantidad de polifenoles y compuestos polares, con estructuras y propiedades muy similares a las del AS. Por ende, al aumentar la polaridad de la columna, el coeficiente de partición que se genera entre el analito disuelto en la fase móvil y la fase estacionaria es mayor, lo que permite una mejor y más adecuada separación de compuestos polares que son muy similares (Quattrocchi et al., 1992)[11].

Sin embargo, a pesar de haber mejorado la resolución del pico del AS al realizar el cambio de columna, este se seguía encontrando solapado por los picos de otros compuestos con tiempos de retención similares. Por tal motivo, se optó por realizar una rampa de gradientes de fase móvil y de flujo con el objetivo de optimizar al máximo la separación del AS de los demás compuestos que se encontraban en la matriz compleja del *Cotoneaster pannosus*. Estas variaciones de la fase móvil y el flujo conforme se desarrollaba la corrida cromatográfica permitieron que durante los 0 minutos y 2,9 minutos, donde se utilizó una composición de fase móvil de 100% de agua acidificada, salieran los compuestos más polares de la matriz, entre ellos el AS. Posteriormente, se fue disminuyendo la fuerza del solvente, al aumentar la proporción del modificador orgánico acetonitrilo en la fase móvil, permitiendo así que los demás compuestos de polaridad intermedia y baja presenten tiempos de retención diferentes al tiempo de retención del AS. Por esta razón la fase móvil consistió en agua (HCOOH 1%, pH 2,67) y acetonitrilo (ACN) en elución por gradiente (0 –2,9 min, 100:0; 2,9–3,7 min, 90:10; 3,7–15 min, 80:20), como se demuestra en la tabla 1. El flujo se ajustó de forma programada: 0,4 mL/min durante los primeros 4,5 min y 0,8 mL/min hasta completar 15 min de corrida. Bajo estas condiciones, el tiempo de retención del ácido shikímico (AS) fue de 2,622 min.

A partir de este cambio, fue posible evidenciar una mayor separación del pico del AS frente al de otros compuestos, logrando así obtener una separación eficiente. Adicionalmente, al comparar los valores del factor de selectividad (a), se evidencia que este valor aumentó de 1,32 a 2,18 al implementar los gradientes en el método cromatográfico, cumpliendo así con el objetivo de optimizar al máximo la separación del AS bajo las condiciones descritas anteriormente. Para confirmar la especificidad bajo estas condiciones, se realizó un estudio de adición de estándar a la matriz del extracto, como se observa en la figura 5. Se observó que el área del pico correspondiente al AS aumentó proporcionalmente a la cantidad de estándar adicionado, mejorando y manteniendo la simetría, sin presentar hombros ni picos adicionales. Esto permitió verificar la ausencia de co-elución con otros metabolitos y asegurar la identificación inequívoca del analito en la muestra compleja.

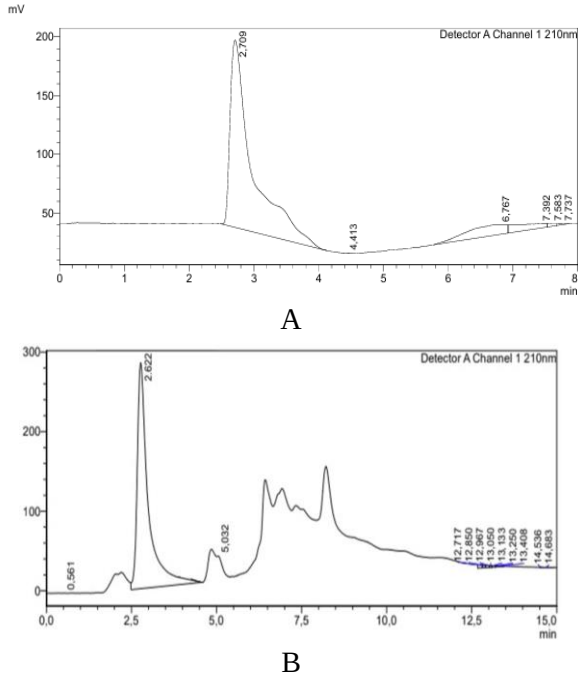


Fig. 5: Cromatogramas resultantes del uso de gradiente y adición patrón.

Evaluación del desempeño analítico del método

Linealidad: se realizó una curva de calibración por el método de estándar externo, para lo cual se prepararon ocho soluciones estándar de AS con concentraciones correspondientes a 0; 200; 400; 600; 800; 1200; 1500 y 1800 ppm a partir de la solución stock. Con los resultados arrojados se realizó el análisis de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados, como se muestra en la figura 6.

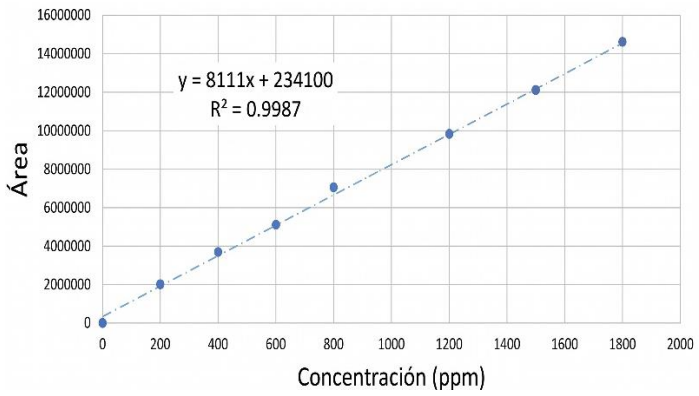


Fig. 6: Curva de calibración para la evaluación de la linealidad.

Se evaluó la linealidad del método mediante la curva de calibración, se observa una tendencia lineal entre las variables, en el intervalo de concentración comprendido entre 0 ppm y 1800 ppm (Ahumada et al., 2023)[12]. A partir de la gráfica se detecta un punto atípico en la regresión; no obstante, mediante la prueba de descarte de datos de Dixon se confirma que este valor no debe ser eliminado (tabla 2).

Tabla 2. Test de Dixon para el rechazo de puntos anómalos.

Recorrido	Divergencia	Q calculada	Q crítica[1]	Resultado
12608844	1942700	0,154	0,634	No se rechaza

[1] 99% de confianza

Dado que algunos autores consideran que el coeficiente de correlación no es el parámetro más apropiado para la determinación de linealidad, se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA), el cual permite validar que el modelo de regresión lineal se ajusta de manera significativa a los datos. Tras el análisis de los resultados (tabla 3), se observa que el valor p obtenido en la prueba fue inferior a 0,05; por lo que se rechaza Ho y se confirma una diferencia estadísticamente significativa entre el área y la concentración del patrón de AS, con un nivel de confianza del 95% (Sahu et al., 2028)[13].

Una vez demostrado que el modelo seleccionado es significativo y no hay desviaciones en la linealidad, se evaluó la significancia de la pendiente de la ecuación de la recta. Para tal fin, se usa una prueba t (tabla 4), mediante la cual se rechaza la hipótesis nula (Ho: 1 = 0), lo cual establece que la pendiente es significativamente diferente de cero, dado que t calculada > t crítica.

Tabla 3. Análisis de varianza (ANOVA).

Fuente de error	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	$F_{calculado}$	$F_{crítico}$	Valor p
Entre las muestras	1,86E+14	1	1,86E+14	14,4	4,60	0,002
Dentro de las muestras	1,80E+14	14	1,29E+13			
Total	3,66E+14	15	-	-	-	-

Tabla 4. Prueba t de student de la pendiente.

Variable	*t* calculada	*t* crítica
Pendiente β_1	74,5	1,89

Exactitud

Se determinó el porcentaje de recuperación en tres niveles de concentración de 80%, 100% y 120% a partir de una solución estándar de 25 ppm (tabla 5).

La homogeneidad de varianzas se verificó mediante el test de Cochran, obteniendo un valor G calculado de 0,826, el cual es inferior al G crítico (0,871) para un nivel de confianza del 99%.

La recuperación hace referencia a la relación entre la cantidad medida de analito y la cantidad añadida de muestra, expresada como porcentaje. En otras palabras, la recuperación proporciona una estimación del error sistemático y puede tener valores superiores al 100% (errores positivos) o inferiores al 100% (errores negativos) (Sujata-Umakant et al., 2023)[14]. En este caso, el porcentaje de recuperación para el AS fue de 100,1% ± 3,6, con un valor de %RSD de 1,0% (tabla 5), el cual es significativamente inferior al criterio establecido (% RSD < 2). Este valor permite confirmar que el método analítico cumple con el parámetro de exactitud, ya que el porcentaje de recuperación se encuentra dentro del rango de especificación del 95,0% al 105,0%, establecido por la ICH Q2 (Raheem, 1998)[15]. Mediante el test de Cochran, se rechaza la hipótesis alternativa (Ha: $\sigma 12 \neq \sigma 22 \neq \sigma 32$) ya que G calculado < G crítico. Con esta evidencia estadística, se concluye que los niveles de concentración del 80%, 100%, y 120% no inciden en el porcentaje de recuperación del AS, manteniendo una variabilidad homogénea en el rango de concentraciones, evaluado con un nivel de confianza del 95% (Sabir et al., 2013)[16]. Estos resultados confirman que no existen diferencias significativas entre las varianzas de las muestras analizadas, cumpliendo así con el supuesto de homocedasticidad necesario para el análisis de regresión.

Tabla 5. Determinación del porcentaje de recuperación para 25 ppm.

Concentración (%)	% Recuperación			Media	SD	%RSD
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3			
80	105,7	102,0	103,1	103,6	1,9	1,8
100	93,5	94,8	94,4	94,2	0,7	0,7
120	102,0	102,2	103,0	102,4	0,5	0,5

Precisión

La precisión fue calculada con el coeficiente de variación a partir de la repetibilidad y la precisión intermedia.

Repetibilidad

Se preparó una solución estándar de AS de 75 ppm a partir de la solución stock y se inyectó en el cromatógrafo en el mismo día y por el mismo analista. A partir de los cromatogramas, se determinó el tiempo de retención y área, con el fin de calcular la media aritmética ($\bar{x}$), la desviación estándar (s) y el coeficiente de variación (CV) experimental. La repetibilidad del método se evaluó mediante cinco inyecciones consecutivas (n=5), obteniendo un tiempo de retención promedio de 2,622 min y un área promedio de 6,18 x 10^7 unidades de área con una precisión instrumental excelente, reflejada en un % CV de 0,22 %.

Precisión intermedia

Se preparó una solución estándar de 75 ppm a partir de la solución stock por dos analistas diferentes en dos días diferentes.

La precisión se expresa en términos de dispersión, generalmente por desviación estándar y desviación estándar relativa, y depende de las condiciones de repetibilidad y precisión intermedia en las que se ejecute el estudio (Dagron, 2014)[17].

Tabla 6. Datos primarios para determinar la precisión intermedia (Fuente: Elaboración propia).

Repetición	tR (min) (Analista 1)	Área (Analista 1)	tR (min) (Analista 2)	Área (Analista 2)
1	2,709	3713072	2,683	4101227
2	2,705	3779918	2,697	4137307
3	2,702	3773037	2,690	4081131
Promedio ($\bar{x}$)	2,705	3755342	2,690	4106555
Desviación (s)	0,004	36769	0,007	28464
% CV	0,130	0,979	0,260	0,693

La precisión en términos de repetibilidad hace referencia a la variación del método en condiciones donde los resultados de medición son obtenidos sobre muestras de ensayo idénticas. En este contexto, este parámetro fue evaluado el mismo día, en el mismo laboratorio, por el mismo analista y utilizando el mismo cromatógrafo.

De acuerdo con la guía ICH Q2, el CV no debe exceder el 3%, por lo que, al comparar los CV obtenidos con los valores reportados en la literatura, para los tiempos de retención y las áreas, es posible afirmar que, si bien el método es repetible en términos de áreas, no lo es en términos de tiempos de retención, debido a la presencia de un dato anómalo. En consecuencia, fue necesario efectuar el test de Dixon para el análisis de datos anómalos, con el cual se concluyó que el dato anómalo debía ser eliminado al ser Q calculada > Q crítica (tabla 7). Posterior a esta corrección, se obtuvieron resultados de CV para los tiempos de retención y las áreas de 0,212% y 0,224% respectivamente, cumpliendo así con los requerimientos dispuestos en la literatura, lo cual permite afirmar que el método cumple con los estándares de aceptabilidad normativos y es repetible en términos de áreas y tiempos de retención.

Tabla 7. Test de Dixon para el rechazo de puntos anómalos.

Parámetro	Recorrido	Divergencia	$Q_{calculada}$	$Q_{crítica}$[1]	Resultado
T. ret	1,07	1,06	0,9907	0,6980	Se rechaza
Área	1772251	12716	0,0072	0,6980	Se rechaza

[1]99% de confianza (Reed et al., 2002)[7]

Ahora bien, la precisión en condiciones intermedias evalúa la dispersión de los resultados utilizando el mismo método aplicado a la misma muestra, en el mismo laboratorio, pero bajo diferentes condiciones como distintos operadores, diferente equipamiento o distintos días (Torralvo, 2017)[18]. Por lo tanto, este parámetro hace referencia al grado de variación de los resultados dentro del mismo laboratorio, pero en días distintos y con analistas y equipos diferentes. En este contexto, este parámetro fue evaluado el mismo día, en el mismo laboratorio, utilizando el mismo cromatógrafo, pero por dos analistas diferentes.

Al igual que con la repetibilidad, se compararon los coeficientes de variación (CV) obtenidos por cada analista (tabla 6), los cuales fueron del 0,130% y 0,260%, demostrando ser ambos inferiores al límite establecido. Con el fin de verificar si existen diferencias significativas entre las medias de cada analista se empleó la prueba de Levene (tabla 8) al ser muestras independientes, con la cual se demostró que no existían diferencias entre las varianzas ya que F calculada < F crítico, por lo que no se rechaza la hipótesis nula (Ho: $\sigma 12 = \sigma 22$). Esto evidencia que, aunque pueden ocurrir pequeñas variaciones en las condiciones del método analítico, se puede lograr una cuantificación precisa.

Límite de detección (LD) y cuantificación (LQ)

Se realizó una curva de calibración por el método de estándar

Tabla 8. Prueba de Levene para análisis de varianzas.

Analista	Varianza	F calculada	*F* crítica
1	0,000009	0,015	7,71
2	0,00004		

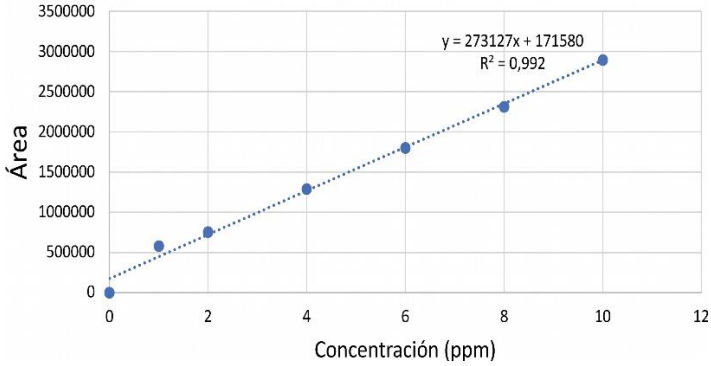


Fig. 7: Curva de calibración del límite de detección y cuantificación (Fuente: Elaboración propia).

externo, para lo cual se prepararon siete soluciones estándar de AS con concentraciones correspondientes a 0; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 y 10,0 ppm a partir de la solución stock. Con los resultados arrojados se realizó el análisis de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados (figura 7).

Para la determinación de los limites se usó el error típico determinado con un valor de 102946,72

Eq.(1) límite de detección:

$$LD = \frac{3{,}3 \times \boldsymbol{Error\ típico}}{m} = \frac{3{,}3 \times 102946{,}72}{273127} = 1{,}24\ ppm \quad (1)$$

Eq. (2) límite de cuantificación:

$$LQ = \frac{10 \times \boldsymbol{Error\ típico}}{m} = \frac{10 \times 102946{,}72}{273127} = 3{,}76\ ppm \quad (2)$$

En un método que emplea detectores UV, garantizar la precisión en la detección de compuestos a concentraciones bajas supone un desafío debido a la disminución gradual de sensibilidad de las lámparas del detector con el tiempo, así como a las variaciones en el nivel de ruido según el fabricante del detector. Por tanto, es crucial establecer límites de detección y cuantificación que se puedan alcanzar con el método de prueba en todo momento (United States Pharmacopeial Convention (USP), 2020)[19].

Según la USP 43, el LOD se define como la menor concentración de una sustancia que puede ser detectada con certeza, pero

no necesariamente cuantificada bajo las condiciones del método. Por otro lado, el LOQ representa la mínima cantidad de analito que puede ser determinada cuantitativamente con precisión y exactitud. Ambos parámetros se calcularon teóricamente teniendo en cuenta la pendiente, el intercepto y la desviación estándar residual obtenida en la regresión lineal de primer orden de la linealidad del sistema con un nivel de confianza del 95%, mediante las ecuaciones descritas en la sección anterior. De acuerdo con estos cálculos, se determinó que la concentración mínima detectable era de 1,24 ppm, indicando que el método no puede detectar el AS con precisión y exactitud por debajo de esta concentración. Por otro lado, la concentración mínima cuantificable fue de 3,76 ppm, que representa el valor mínimo que el método puede cuantificar de manera inequívoca. Estos valores LOD y LOQ junto con la pendiente de la curva de calibración, indican una notable sensibilidad del método analítico (figura 7). En consecuencia, se puede afirmar que es posible analizar el AS de forma exacta y precisa en muestras con concentraciones de este analito dentro del rango de linealidad establecido anteriormente (Ávila y Guevara-Pulido, 2020)[20].

Robustez

Se prepararon dos soluciones estándar de AS de 100 ppm a partir de la solución stock, y se inyectaron por triplicado al cromatógrafo en condiciones extremas, una con una fase móvil de nitrato de amonio 0,1 M a un pH de 8,74 y otra con una fase móvil de ácido fosfórico a un pH de 4,34; manteniendo constantes las demás condiciones cromatográficas definidas para el método (tabla 9).

Tabla 9. Datos primarios para determinar la robustez del método. (Fuente: Elaboración propia).

Ensayo	pH 4,34		pH 8,74	
	tR (min)	Área	tR (min)	Área
1	2,19	2003060	2,25	83538726
2	2,27	1994566	-	-
3	3,44	73204138	-	-

La robustez del método indica su capacidad para permanecer inalterado ante pequeñas pero deliberadas variaciones en ciertos parámetros, proporcionando una idea de la estabilidad del método. De tal modo, este parámetro indica qué tanto deben ser controlados los parámetros del método y permite detectar los factores que pueden conllevar a un método más reproducible.

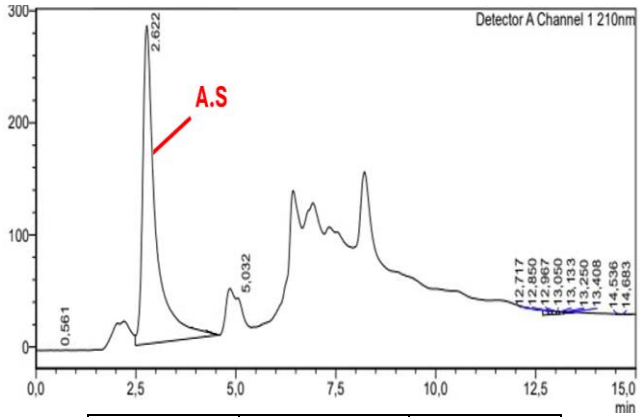
De acuerdo con lo anterior, se seleccionó el pH de la fase móvil como factor de ensayo para evaluar la robustez del método, debido a su capacidad para influir significativamente en la respuesta del sistema. Como se mencionó anteriormente, el pH de la fase móvil debe mantenerse por debajo del pka del AS (4,1) para garantizar la protonación de los grupos ácidos del compuesto, transformándolos en sus formas no ionizadas. Esto se debe a que la forma protonada (-COOH) los hace más hidrofóbicos, lo que facilita una interacción más efectiva con la fase estacionaria no polar. En este contexto, el método fue sometido a condiciones extremas en medios ácidos y básicos, con el fin de observar posibles interferencias del AS con los productos de degradación generados.

En medio ácido el pico del AS exhibe un tiempo de retención ligeramente prolongado (3,44 min) y una asimetría más notable. A pesar de tratarse de un medio ácido, el pH es mayor que el pKa del compuesto, lo que indica que el AS se encuentra parcialmente desprotonado y por lo tanto es más polar y propenso a interactuar con la fase estacionaria. Por otro lado, en medio básico se observa un incremento significativo en el tiempo de retención del AS (4,9 min) y un aumento en el ancho de base del pico. Esto se debe a que el AS es un ácido débil con grupos carboxílicos el cual puede ionizarse en un medio básico, adoptando una forma ionizada (-COO-). Además, este cambio puede alterar la solubilidad del analito en la fase móvil, resultando en una distribución desigual entre esta y la fase estacionaria, lo que afecta la forma del pico cromatográfico. Asimismo, puede generar interacciones adicionales con la columna, como la formación de puentes de hidrógeno o interacciones ión-dipolo, las cuales pueden modificar aún más la retención del analito y, en consecuencia, la forma del pico cromatográfico.

Se hace evidente que el pH no ejerce la misma influencia al aumentar o disminuir con respecto al valor nominal del método. Se observa que los parámetros cromatográficos se ven significativamente alterados en medio básico, lo que no permite determinar una separación y cuantificación del analito, como se observa en la tabla 9 donde no pudo cuantificarse de forma factible.

Cuantificación de AS en frutos de Cotoneaster pannosus por el método de estándar externo

La concentración de AS en el extracto del fruto se determinó analizando el área bajo la curva del pico en el cromatograma, como se muestra en la figura 8. Este análisis se basó en la ecuación de regresión lineal (Y = 7948,8X + 356956), derivada de la curva de calibración establecida durante la evaluación de la linealidad del método. Extrapolando el valor de la concentración de AS y resolviendo para x en la ecuación, se obtuvo una concentración de 50,4 ppm de AS.



tR (min)	Área	Altura
2,62	757956	43267

Fig. 8: Separación del AS presente en la matriz del fruto *Cotoneaster pannosus* (Fuente: Elaboración propia).

Aunque el pico del AS presentó un factor de asimetría cercano a 1.5 (figura 8), se garantizó la exactitud de la cuantificación mediante una integración uniforme de la línea base en todos los cromatogramas. El software LabSolutions® fue configurado con parámetros de detección de picos optimizados para asegurar que el área integrada fuera representativa y reproducible tanto en los patrones como en las muestras de *C. pannosus*, obteniendo así coeficientes de variación (CV) menores al 3%.

Al contrastar los niveles de ácido shikímico (AS) hallados en este estudio (50,4 ppm en el extracto) con la fuente convencional por excelencia, *Illicium verum* (anís estrellado), se evidencian marcadas diferencias cuantitativas. Autores como Cai *et al.* (2014) reportaron que el rendimiento de AS en *I. verum* mediante extracción asistida por ultrasonido oscila entre 70.000 ppm y 130.000 ppm en masa seca de fruto, valores sustancialmente superiores a los obtenidos en los frutos de *Cotoneaster pannosus*. Esta comparación directa confirma que *C. pannosus* presenta una concentración minoritaria del analito fitoquímico. No obstante, la consideración de esta especie como un recurso de interés para la demanda farmacéutica radica en su elevada disponibilidad geográfica, su carácter de especie abundante y la baja complejidad de su matriz de extracción. A diferencia de las fuentes convencionales, cuya compleja matriz de aceites esenciales y polifenoles suele requerir etapas de purificación exhaustivas, el extracto de *C. pannosus* presentó un perfil cromatográfico con baja interferencia de otros metabolitos. Esta característica, sumada a la optimización de una extracción asistida por ultrasonido a 50 °C, simplifica el rendimiento global del proceso analítico y de aislamiento. Por lo tanto, esta especie se puede considerar como una posible fuente alternativa viable, no por su densidad de analito, sino por la facilidad de su procesamiento y su amplia disponibilidad como recurso subutilizado.

Parámetros cromatográficos

Tiempo de retención y tiempo de retención corregido (tr′): el tiempo de retención corregido es el tiempo máximo que transcurre entre la inyección contemplada como el tiempo muerto, hasta la señal máxima o analizada dentro del cromatograma (Harris y Berenguer-Navarro, 2003)[21]. Se realizó la corrección del tiempo de retención del AS empleando como tiempo muerto el pico correspondiente al frente del solvente (figura 9), mediante la siguiente fórmula:

$$\boldsymbol{tr' = tr - tm}$$

$$\boldsymbol{tr' = 2,62\,min - 0,561\,min = 2,06\,min}$$

Factor de retención (k´): El factor de retención es una medida del tiempo de retención en unidades del tiempo muerto, que es el tiempo que precisa la fase móvil o un soluto no retenido para atravesar la columna. Se determinó el factor de capacidad por medio del cociente entre el tiempo de retención corregido y el frente del solvente, de la siguiente forma:

$$k' = \frac{tr'}{tm}$$

$$k' = \frac{2,06\,min}{0,561\,min} = 3,67$$

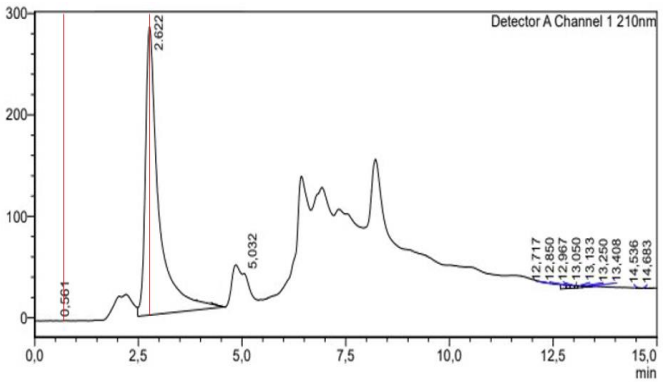


Fig. 9: Estimación del tiempo de retención corregido para el pico del extracto de AS.

Selectividad (α): el factor de selectividad es una medida del tiempo o el grado de separación entre los compuestos que tienen un tiempo de retención cercano al del analito (Ahuja y Dong, 2005)[22]. Este parámetro se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\alpha = \frac{tr'2}{tr'1} = \frac{5,030\,min - 0,561\,min}{2,622\,min - 0,561\,min} = 2,18$$

Número de platos teóricos (N): el número de platos teóricos e una medida cuantitativa de la eficiencia de la columna y está dado por la relación inversa entre el tiempo de retención del analito y la desviación estándar del ancho a la altura media del pico del analito (W0.5), como se ilustra en la figura 10. Este parámetro se determinó de la siguiente manera:

$$W0.5 = 0,14\,cm\ \frac{2,50\,min}{2,41\,cm} = 0,145\,min$$

$$N = 5,55 \times \left(\frac{t_R}{W0,5}\right)^2 = 5,55 \times \left(\frac{2,622\,min}{0,145\,min}\right)^2 = 1814,8$$

Resolución (R): teniendo presente que la resolución es el grado de separación de los componentes de una mezcla en un sistema cromatográfico[21]. Este parámetro se determinó de la siguiente manera:

$$R = \frac{1}{4} \times \sqrt{N} \times \left(\frac{(\alpha-1)}{\alpha} \times \frac{k'}{(k'+1)}\right)$$

$$R = \frac{1}{4} \times \sqrt{1814,8} \times \left(\frac{(2,17-1)}{2,17} \times \frac{3,67}{(3,67+1)}\right) = 4,51$$

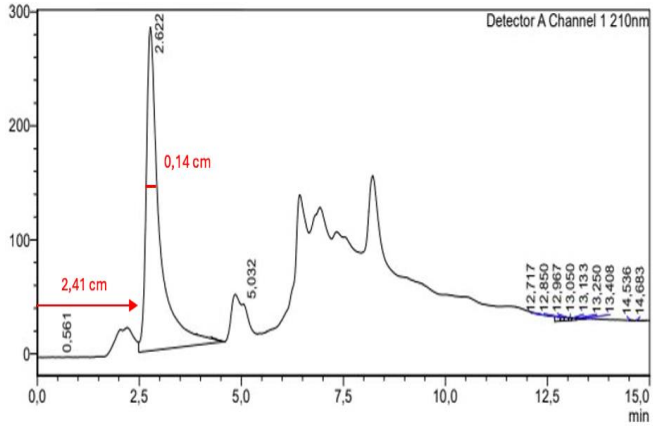


Fig. 10: Determinación del número de platos teóricos (Fuente: Elaboración propia)

Conclusiones

Se desarrolló y aplicó un método lineal, exacto, preciso y sensible para la detección y cuantificación de ácido shikímico presente en el extracto del fruto del arbusto *Cotoneaster pannosus* mediante cromatografía líquida de alta resolución, conforme a las directrices establecidas. Durante el proceso, se determinó que el agua es el solvente más eficaz para la extracción del ácido shikímico del fruto mediante el uso de ultrasonido, evidenciado por la gran intensidad del pico obtenido en el cromatograma del AS. Además, se establecieron las condiciones cromatográficas óptimas para separar eficientemente el ácido shikímico de la matriz vegetal compleja del fruto, superando algunos desafíos como la superposición de picos y la presencia del efecto de cola. Así mismo, se logró cuantificar el ácido shikímico en el fruto mediante el método de estándar externo, obteniendo una concentración de 50,4 ppm, lo que destaca el potencial del fruto como una fuente prometedora de dicho compuesto. Finalmente, debido a su selectividad, retención y alta resolución cromatográfica, este método se presenta como una alternativa eficiente y adecuada para futuros estudios de análisis del ácido shikímico en el fruto del *Cotoneaster pannosus*.

Agradecimientos

Se agradece al laboratorio de la Universidad El Bosque, Bogotá-Colombia por facilitar el equipamiento y los recursos técnicos necesarios para el análisis cromatográfico.

Referencias

Ahuja, S., & Dong, M. W. (2005). *Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC* (Vol. 6). Elsevier. https://doi.org/10.1016/S1571-5582(05)80050-9

Ahumada, D., Paredes, C., Abella, J., & González, I. (2023). *Validación de Métodos en Análisis Químico Cuantitativo* (Vol. 1). Colombia.

Ávila, E. L., & Guevara-Pulido, J. (2020). Development of a RP-HPLC Method for Separating and Quantifying Muscimol in *Amanita muscaria*. *Journal of Chemistry*, 2020, Artículo 8859998. https://doi.org/10.1155/2020/8859998

Borah, J. C. (2015). Shikimic acid: A highly prospective molecule in pharmaceutical industry. *Current Science*, 109(9), 1672–1679. https://doi.org/10.18520/v109/i9/1672-1679

Cai, M., Luo, Y., Chen, J., Liang, H., & Sun, P. (2014). Optimization and comparison of ultrasound-assisted extraction and microwave-assisted extraction of shikimic acid from Chinese star anise. *Separation and Purification Technology*, 133, 375–379. https://doi.org/10.1016/j.seppur.2014.06.064

Dagron, S. (2014). Die International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). En *Handbuch Ethik und Recht der Forschung am Menschen* (pp. 541–545). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-35099-3_86

Harris, D. C., & Berenguer Navarro, V. (2003). *Análisis químico cuantitativo*. Reverté.

International Council for Harmonisation (ICH). (2023). *ICH Q2(R2) Guideline on validation of analytical procedures*. European Medicines Agency. https://www.ema.europa.eu/en/ich-q2r2-validation-analytical-procedures

Javanian, M., Barary, M., Ghebrehewet, S., Koppolu, V., Vasigala, V. K. R., & Ebrahimpour, S. (2021). A brief review of influenza virus infection. *Journal of Medical Virology*, 93(8), 4638–4646. https://doi.org/10.1002/jmv.26990

Les, F., Cásedas, G., Moliner, C., Valero, M. S., & López, V. (2017). Chemical constituents, radical scavenging activity and enzyme inhibitory capacity of fruits from *Cotoneaster pannosus* Franch. *Food & Function*, 8(5), 1775–1784. https://doi.org/10.1039/C7FO00330G

National Library of Medicine. (2024). *Shikimic acid | C7H10O5 | CID 8742 - PubChem*. PubChem. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Shikimic-acid

Quattrocchi, O., Abelaira, S., & Laba, R. F. (1992). *Introducción a la HPLC*. Artes Gráficas Farro.

Raheem, Z. (1998). Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry. *Choice Reviews Online*, 35(06), 35-3308. https://doi.org/10.5860/choice.35-3308

Reed, G. F., Lynn, F., & Meade, B. D. (2002). Use of coefficient of variation in assessing variability of quantitative assays. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 9(6), 1235–1239. https://doi.org/10.1128/CDLI.9.6.1235-1239.2002

Rubinson, K. A. (2000). *Análisis instrumental*. Alhambra.

Sabir, A. M., Moloy, M., & Bhasin, P. S. (2013). HPLC Method Development and Validation: a Review. *International Research Journal of Pharmacy*, 4(4), 39–46. https://doi.org/10.7897/2230-8407.04407

Sahu, P. K., Ramisetti, N. R., Cecchi, T., Swain, S., Patro, C. S., & Panda, J. (2018). An overview of experimental designs in HPLC method development and validation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 147, 590–611. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.05.006

Saxena, R. K., Tripathi, P., & Rawat, G. (2012). Pandemism of swine flu and its prospective drug therapy. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 31(12), 3265–3279. https://doi.org/10.1007/s10096-012-1716-5

Sujata Umakant, M. V., & Darwin, R. (2023). QbD Approach to Analytical RP-HPLC Method Development and Validation of Erlotinib in Pharmaceutical Dosage Form. *Journal of Propulsion Technology*, 44(5), 5012–5020.

Torralvo, J. J. (2017). *Validación de un método químico analítico de HPLC en R* [Tesis de grado, Universidad de Sevilla].

Trapalis, C. C., Keivanidis, P., & Kordas, G. (2004). *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology* (Vol. 5). Wiley. https://doi.org/10.1002/0471238961

United States Pharmacopeial Convention. (2020). *United States Pharmacopoeia, USP 43-NF 38*. Rockville.