

## COMUNICACIÓN CORTA

# Desarrollo de un método analítico por CG con columna capilar para la determinación de alcoholes de alto peso molecular en extractos de cera de caña

David Marrero Delange, Luis González Bravo y Víctor Luis González Canavaciolo.

Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Calle 198 entre 19 y 21, Siboney, Playa, Ciudad de La Habana, Apartado Postal 6414, Cuba. [Correo electrónico: cpn@cnic.edu.cu](mailto:cpn@cnic.edu.cu)

Recibido: 23 de mayo de 2006. Aceptado: 7 de septiembre de 2004.

Palabras clave: alcoholes de alto peso molecular, cera de caña de azúcar, cromatografía gaseosa con columna capilar *widebore*, método analítico.  
Key words: long chain fatty alcohols, sugar cane wax, gas chromatography with widebore capillary column, analytical method.

En los últimos años, se ha incrementado la utilización de alcoholes alifáticos de alto peso molecular, extraídos de determinadas ceras vegetales y animales, como suplementos nutricionales o medicamentos.<sup>1-3</sup> Diversas metodologías analíticas por cromatografía gaseosa (CG) con columnas de relleno se han validado para la determinación de estos alcoholes, tanto en el material insaponificable de las ceras como en sus extractos purificados.<sup>4-8</sup> Sin embargo, a pesar de los buenos resultados logrados con esas columnas, en el mundo actual se ha impuesto el empleo de las capilares, lo cual se ha debido a que presentan varias ventajas, entre las que se pueden citar: mayor resolución, inercia, estabilidad química y térmica, flexibilidad y facilidad de instalación. También se ha encontrado que tienen una vida más prolongada, mayor reproducibilidad lote a lote y mayor sensibilidad en el análisis de compuestos minoritarios en mezclas complejas.<sup>9,10</sup> Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, el objetivo del presente trabajo fue desarrollar un método confiable para la determinación de alcoholes grasos en extractos de cera de caña, mediante la CG con columna capilar "*widebore*" e inyección rápida con la técnica de "*solvent-flush*".

Los reactivos empleados fueron de pureza analítica: Patrones de alcoholes > 99 % CG (Fluka, Suiza). MSTFA (Sigma, USA),

tolueno y acetona (Merck, Alemania).

Se prepararon las disoluciones siguientes: patrón interno (DPI): C<sub>20</sub> (1,0 mg/mL) en tolueno. Referencia de alcoholes (DRA): C<sub>24</sub>, C<sub>26</sub>, C<sub>27</sub>, C<sub>28</sub> y C<sub>30</sub> (todos aproximadamente a 0,6 mg/mL) en tolueno. Matriz de referencia (DMR): se añadieron 1 mL de la DRA y 0,5 mL de la DPI a un vial de 2 mL, se llevó a sequedad a 80 °C con corriente suave de nitrógeno, se adicionaron 100 µL de MSTFA y se cerró herméticamente. Luego, se calentó a 80 °C durante 30 min en un termostato seco. Pasado este tiempo, se dejó enfriar para su análisis por CG. Referencia de trabajo (RT): se pesaron alrededor de 60 mg (± 0,01 mg) del extracto purificado de cera de caña y se disolvieron con tolueno en un matraz de 10 mL.

**Preparación de las muestras.** Se pesaron 5 mg del extracto purificado en un vial de 2,0 mL con exactitud de 0,1 mg y se adicionó 1 mL de DPI. Posteriormente, se llevó a sequedad y se siguió con los demás pasos descritos en la preparación de la DMR.

Los análisis se realizaron en un cromatógrafo de gases (GC-14A) con detector de ionización por llama, acoplado a una computadora C-R4A (Shimadzu, Japón). Se utilizó una columna capilar de sílice fundida (25 m X 0,53 mm d.i.) con diámetro de película de 1,0 µm de fase inmobi-

zada BPX-5 (SGE, Australia). La columna se acopló, por medio de un adaptador, al inyector de la columna de relleno, donde se colocó un vaporizador de vidrio con una porción de lana de vidrio, ambos silanizados. Los flujos del gas portador (argón) y de los gases auxiliares: hidrógeno y aire, fueron 4,5; 30 y 300 mL/min, respectivamente. El horno se programó de 100 a 320 °C a razón de 10 °C/min y la temperatura del inyector y el detector fue 320 °C.

La identificación de los alcoholes se realizó por comparación de las retenciones relativas con las de una muestra previamente analizada por CG-EM según procedimiento anteriormente descrito.<sup>4</sup> La cuantificación se llevó a cabo por el método del patrón interno, previo cálculo de los factores másicos de respuestas,<sup>5</sup> lo que estuvieron entre 0,98 y 1,08, hecho que demuestra una buena eficiencia en la ionización y baja discriminación. Estos resultados garantizan una adecuada cuantificación, y coinciden con lo descrito por otros trabajos.<sup>6</sup>

La aplicabilidad del sistema se midió por la resolución (R) entre los alcoholes C<sub>28</sub>-C<sub>29</sub> y C<sub>29</sub>-C<sub>30</sub> (n = 3) y por la repetibilidad de la inyección (n = 6). Los resultados de estos ensayos (R > 2,5 y CV = 0,46 %, respectivamente) garantizaron una buena separación entre las señales y una buena precisión del sistema cromatográfico.<sup>11</sup> Se comprobó que el método es específico al no encontrarse inter-

ferencia entre la señal correspondiente al patrón interno ( $C_{20}$ ) y las obtenidas para el extracto de cera. La pureza de las señales fue corroborada mediante CG-EM como se describió en trabajos previos.<sup>4</sup>

Para el ensayo de linealidad, se prepararon cinco puntos a partir de las disoluciones RT y DPI. Por dilución con tolueno se obtuvieron las concentraciones siguientes: 4,0; 4,6; 5,0; 5,45 y 6,0 mg/mL, las que representaron un 80, 92, 100, 109 y 120 % de la masa nominal. Fueron evaluadas tres réplicas por punto. Las muestras fueron derivatizadas como se describió anteriormente. Al graficar las masas encontradas en función de las masas teóricas, se obtuvo la ecuación de regresión siguiente:

$$y = (0,868 \pm 0,026)x + (0,032 \pm 0,135)$$

con un coeficiente de correlación de 0,999 8. El coeficiente de variación de los factores de respuesta fue de 0,76 %, y los límites de confianza del intercepto incluyeron al cero, por lo que la recta no presenta sesgo. También se determinó que la  $t_{exp}$  de la pendiente (32,385) fue mayor que la tabulada (2,160), lo que indica una probabilidad superior al 99 % de que esta sea diferente de cero. Los parámetros evaluados cumplieron con los criterios de aceptación exigidos,<sup>11</sup> y confirman la linealidad del método cromatográfico. La exactitud fue buena al ser el recobrado promedio de 99,2 % el punto central del estudio de linealidad.

La precisión se evaluó mediante ensayos de repetibilidad (un mismo técnico realizó ocho réplicas de análisis de la misma muestra) y de precisión intermedia (dos técnicos

analizaron dos extractos con purezas distintas en dos días diferentes,  $n = 5$  para cada uno). Se obtuvo que el CV de la repetibilidad (0,91 %) y los CV de la precisión intermedia (1,36 y 1,10 %, respectivamente) fueron inferiores al límite establecido para los métodos cromatográficos (2 %),<sup>11</sup> por lo que se puede considerar que el método es preciso. También se constató mediante la prueba Anova ( $p = 0,232$ ) que no hubo diferencias significativas entre los analistas y los días en cuanto a la determinación del contenido de alcoholes totales, lo cual confirma la buena precisión del método.

## CONCLUSIONES

Se desarrolló un nuevo método analítico por CG con columna capilar *widebore* para la determinación de los alcoholes grasos presentes en los extractos purificados de cera de caña, el cual cumple con los requisitos de especificidad, linealidad, exactitud y precisión, exigidos por las entidades reguladoras internacionales y puede ser aplicado en el control de la calidad de los extractos purificados de cera de caña.

## BIBLIOGRAFIA

1. Fernández S. *et al.*, A pharmacological surveillance of policosanol tolerability in the elderly. **Am. J. Geriatr. Pharmacother**, **2**, 219-29, 2004.
2. Reyes R. *et al.* El vasoactol sobre el rendimiento físico en ancianos. **Revista CENIC Ciencias Biológicas**, **31**, 135-139, 2000.
3. Illnait J., Terry H., Más R., Fernández L., Carbajal D. Effects of D-002, a product isolated from beeswax, on gastric symptoms of patients with

osteoarthritis treated with piroxicam: a pilot study. **J. Med. Food**, **8**, 63-8, 2005.

4. González V., Magraner J., Otero T. y García E., Validación y estudio interlaboratorios de una nueva metodología analítica por CG para la determinación de policosanol en la materia prima. **Revista CENIC Ciencias Químicas**, **30**, 148-152, 1999.
5. González V.L., Magraner J. Validation of a gas chromatographic method for the determining fatty alcohols that compose policosanol in 5 mg film-coated tablets. **J. AOAC Int.**, **82**, 834-839, 1999.
6. González V.L. y Magraner J. Metodología analítica por CG para la determinación de los alcoholes alifáticos que componen el policosanol. **Revista CENIC Ciencias Químicas**, **29**, 123-126, 1998.
7. Deroux M., González V.L. y Magraner J. Desarrollo y validación de una metodología por cromatografía gaseosa para la determinación de alcoholes totales en cera de abejas. **Revista CENIC Ciencias Químicas**, **31**, 23-26, 2000.
8. Sierra R., González V., Magraner J. y Cuéllar A. Desarrollo y validación de un método por cromatografía gaseosa para la determinación de D002 en tabletas. **Revista CENIC Ciencias Químicas**, **35**, 127-130, 2004.
9. Wiedemer R.T., Mckinley S.L. and Rendl T.W. Advantages of wide-bore capillary columns, **American Laboratory**, **1**, 1-6, 1986.
10. Supelco Inc., GC Bulletin 814B. High Efficiency and large sample capacity in packed column or capillary column gas chromatographs, 1-10, 1988.
11. Castro M., Gascon S., Pujol M., Sans J.M. y Vicente L. Validación de métodos analíticos, A.E.F.I., Sec. Catalana, España, 1989.