

COMUNICACION CORTA

Metodología analítica para la determinación de los ácidos grasos que componen el D003 mediante Cromatografía Gaseosa con columna de relleno

David Marrero Delange, Ernesto Méndez Antolín y Víctor L. González Canavaciolo.

Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Calle 198 entre 19 y 21, Atabey, Playa, Apartado Postal 6414, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 9 de noviembre de 2004. Aceptado: 23 de noviembre de 2004.

Palabras clave: D003, ácidos grasos saturados de elevada masa molecular, CG con columna de relleno, método analítico.
Key words: D003, saturated very long-chain fatty acids, GC with packed column, analytical method.

El D003 es una sustancia con efectos reductores de colesterol y antiagregantes plaquetarios constituida por una mezcla de ácidos grasos (AG) entre $C_{24:0}$ y $C_{36:0}$, la cual ha sido aislada de la cera de la caña de azúcar.¹⁻⁴ El control de su calidad se realiza mediante una metodología analítica por cromatografía gaseosa (CG) con columna capilar *widebore* debidamente validada.⁵ Sin embargo, el empleo de la CG con columna de relleno puede constituir una alternativa para el control de calidad de rutina, pues pese a su menor poder de resolución respecto a la CG en columna capilar, con ella se han logrado resultados confiables y reproducibles en el control de la calidad y estudios de estabilidad de medicamentos y nutraceuticos.^{6,7}

Los reactivos empleados fueron de pureza analítica: patrones de AG ($C_{24:0}$ - $C_{31:0}$) y el $C_{19:0}$ (patrón interno); todos > 99 % CG, MSTFA (Sigma, MO, USA). Metanol (MeOH), hexano, cloroformo ($CHCl_3$), tolueno, HCl y H_2SO_4 (Merck, Alemania).

Se prepararon las disoluciones siguientes: patrón interno (DPI): $C_{19:0}$ (1,0 mg/mL) en $CHCl_3$. Referencia de ácidos (DRAc): $C_{24:0}$ (0,06 mg/mL), $C_{25:0}$ (0,07 mg/mL), $C_{26:0}$ (0,13 mg/mL), $C_{27:0}$ (0,13 mg/mL), $C_{28:0}$ (1,48 mg/mL), $C_{29:0}$ (0,10 mg/mL), $C_{30:0}$ (0,82 mg/mL) y $C_{31:0}$ (0,08 mg/mL) en $CHCl_3$. Matriz de referencia (DMR): se añadieron 0,25 mL de la DRAc y 0,25 mL de la DPI a un vial de 1,8 mL, se llevó a sequedad a 80 °C y con corrien-

te de nitrógeno, se añadió 1 mL de la disolución metilante [HCl-MeOH 5 % (v/v)],⁸ se cerró el vial y se calentó a 80 °C durante 90 min. Pasado el tiempo de reacción, se dejó enfriar y se evaporó a sequedad a 80 °C. La muestra seca se diluyó con 250 μ L de tolueno y se calentó a 80 °C durante 3 min.

Preparación de las muestras

Se pesaron, con exactitud de 0,1, 5 mg de D003 en viales de 1,8 mL, se adicionó 1 mL de DPI y se llevó a sequedad. Luego, se siguieron todos los pasos descritos en la preparación de la DMR, pero adicionando 1 mL de tolueno.

Las condiciones para los análisis cromatográficos, así como la identificación y cuantificación fueron realizadas según fue descrito en trabajos previos.^{5,8}

Se estudiaron cinco procedimientos de derivatización (Tabla 1).⁹ De ellos, se seleccionó el A [HCl-

MeOH 5 % (v/v)], por ofrecer el mejor resultado cuantitativo (80,4 %) y la mayor precisión (CV = 0,88 %). Este resultado concuerda con los de trabajos en otras matrices, en los que se han encontrado para los demás agentes derivatizantes algunos inconvenientes,⁹ entre ellos, que los trimetilsilil derivados presentan menor respuesta cromatográfica, efecto que se acentúa con el incremento de la cadena carbonada por fenómenos de hidrólisis en el inyector.¹⁰

Como en la mayoría de los trabajos publicados, la metilación de los AG de las ceras utilizando el HCl-MeOH 5 %, se realiza en tiempos de reacción muy elevados (entre 3 y 12 h),¹¹ se decidió estudiar si las 2 h empleadas en este trabajo eran un tiempo adecuado. Para ello, se estudió la influencia de varios tiempos de reacción (0,5; 1,0; 1,5, 2,0; 2,5 y 5 h) sobre los resultados analíticos, los cuales mostraron que la

Tabla 1. Agentes derivatizantes evaluados para el análisis cuantitativo de la mezcla de AG (n = 5).

Agente derivatizante	Contenido de AG (\pm DE)	CV
	(%)	
A [HCl-MeOH 5 % (v/v)]	80,4 \pm 0,71	0,88
B [H_2SO_4 -MeOH 5 % (v/v)], extracción con 1 mL hexano)	77,3 \pm 1,86	2,40
C [H_2SO_4 -MeOH 5 % (v/v)], extracción con 1 mL tolueno)	75,8 \pm 2,00	2,63
D (diazometano)	77,6 \pm 1,75	2,26
E (MSTFA 300 μ L, 30 min a 80 °C, en $CHCl_3$)	75,5 \pm 1,85	2,45

reacción se completaba a partir de los 90 min. Ello permitió fijar este tiempo para la metilación del D003.

La aplicabilidad del sistema se estudió mediante el análisis de la resolución (R) entre los ácidos $C_{28:0}$ - $C_{30:0}$ (n = 3) y a través de la repetibilidad de la inyección, al analizar una misma muestra (n = 6); los resultados (R > 2,5 y CV = 0,40 %, respectivamente) garantizaron una buena separación entre las señales y una buena precisión del sistema cromatográfico.¹²

Se comprobó que el método era específico al no encontrarse interferencia entre la señal correspondiente al patrón interno ($C_{19:0}$) y la de los AG del D003 e impurezas, luego de comparar sus cromatogramas independientes. La pureza de las señales fue corroborada mediante CG-EM como se describió en trabajos previos.⁵

Se diseñó un estudio de linealidad del sistema (A/A_{pi} en función de m/m_{pi}) con una mezcla de AG patrones que abarcó aproximadamente de un 30 a un 160 % de las relaciones de masas nominales a utilizarse en el método de análisis del D003. Para ello se tomaron 0,5; 1; 1,5; 2 y 2,5 mL de la DRAC (n = 3), en tubos de ensayos y se les añadió 1 mL de DPI. Al analizar las disoluciones se obtuvo que la ecuación de regresión fue:

$$y = (0,99 \pm 0,08)x - (0,05 \pm 0,11)$$

con un coeficiente de correlación de 0,999. El coeficiente de variación de los factores de respuesta fue de 1,80 %, y límites de confianza de la pendiente y del intercepto incluyeron al uno y al cero respectivamente por lo que estos parámetros cumplieron con los criterios de aceptación exigidos¹² y confirman la linealidad del sistema cromatográfico.

La exactitud se evaluó mediante estudios de recobrado, al calcular el porcentaje que representó la canti-

dad encontrada con respecto a la añadida y en un intervalo entre un 80 y un 120 % de la masa nominal de D003 (n = 3). Las muestras previamente analizadas se contaminaron con 0,2; 0,4 y 0,6 mL de la DRAC, se les añadió 1 mL de la DPI y se procedió según la preparación descrita anteriormente. El recobrado promedio de la cuantificación fue de 99,2 % con un CV = 1,08 %, lo que indica que el método fue exacto en todo el intervalo estudiado.¹²

La precisión se estudió mediante ensayos de repetibilidad (un mismo técnico realizó ocho réplicas del análisis de la misma muestra) y de precisión intermedia (dos técnicos analizaron dos lotes en dos días diferentes, n = 5 para cada lote). El CV de la repetibilidad y el CV promedio de la precisión intermedia (0,97 y 1,22 %, respectivamente) fueron inferiores al límite establecido para los métodos cromatográficos (2 %),¹² por lo que se puede considerar que el método es preciso. También se constató mediante las pruebas *F* de Fisher y *t* de Student ($\alpha = 0,05$) que no hubo diferencias entre las dispersiones y medias de los contenidos de ácidos totales determinados por ambos analistas, lo que corrobora la buena precisión del método.

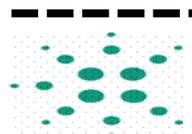
CONCLUSIONES

Se desarrolló un método por CG con columna de relleno que es específico, lineal, exacto y preciso, por lo que es apropiado para el control de la calidad del D003 materia prima.

BIBLIOGRAFIA

- González L., Marrero D., Laguna A., Más R., Arruzazabala M.L., Carbajal D., Cora M. and Menéndez R. (Laboratorios DALMER S.A.), Mixture of primary fatty acids obtained from sugar cane wax and pharmaceutical uses. Patentes: CU 22723, USA 6,486,205; EPO 98920719.6.

- Castaño G. *et al.* A new hypocholesterolemic and antiplatelet compound on lipid profile and lipid peroxidation in healthy volunteers, **Clin. Drug Inv.**, **23**, 193, 2003.
- Castaño G. *et al.* Effects of D-003 (5 – 40 mg/d) on lipid profile of patients with Type II hypercholesterolemia: a Phase II clinical study. **Clin. Drug Invest.**, **23**, 789, 2003.
- Rodríguez M.D. *et al.* Lack of developmental toxicity of D-003: a mixture of long-chain fatty acids in rats. **Food Chem. Toxicol.**, **41**, 89, 2003.
- Marrero D., Méndez E., González V.L., Tejada Y. and Laguna A. Determination of D003 by capillary gas chromatography, **Revista CENIC Ciencias Químicas**, **33**, 99, 2002.
- Sierra R., González V.L. and Magraner J. Validation of a gas chromatographic method for determination of fatty alcohols in 10 mg film-coated tablets of policosanol, **J. AOAC Int.**, **85**, 1, 2002.
- Ackman R.G. Fatty Acids in Foods and their Health Implications, Chapter III, 2nd Ed., Marcel Dekker, New York, 47, 2000.
- Marrero D., González L., González V.L., Laguna A. y González J. La técnica de inyección por *solvent-flush* en el análisis cuantitativo de ácidos grasos de muy elevada masa molecular por cromatografía gaseosa. **Revista CENIC Ciencias Químicas**, **33**, 51, 2002.
- Christie W.W., Gas chromatography and lipids-A practical Guide, (W.W. Christie Ed.). The Oily Press, Ayr, Scotland, 1989.
- Mol. H.G.J., Jansen H.G., Cramers C.A. and Brinkman U A. Th. Large volume sample introduction using temperature programmable injectors: Implications of liner diameter., **J. of High Resol. Chromatogr.**, **18**, 19, 1995.
- Stránský K., Streibl M. and Zajic J. Aldehyde, triglyceride, diglyceride und freie sterine des kubanischen zuckerrohrwachses. Seifen, Ole-Fette-Wachse- Nr.14,105, Jg. 411, 1979.
- Castro M., Gascón S., Pujol M., Sans J. and Vicente L. *Validation of analytical methods*, Spanish Association of the Industry Pharmacists, Catalan Section, Edited under HP license, 1989.



ACTIVIDADES CIENTIFICAS MINISTERIO DE EDUCACION SUPERIOR DE CUBA

7. SIMPOSIO INTERNACIONAL DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL

Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas.

Del 17 al 20 de abril de 2006.

Temáticas: ♣ Propagación masiva de plantas. ♣ Transformación genética. ♣ Biología molecular y bioinformática.
♣ Cultivo de células y tejidos. ♣ Metabolitos secundarios. ♣ Bioseguridad y percepción pública.

Comité Organizador: Dr. Daniel Agramonte Peñalver biotec2006@ibp.uclv.edu.cu biotvegetal2006@yahoo.es