

Desarrollo y validación de una metodología analítica por cromatografía gaseosa para la determinación de alcoholes totales en cera de abejas

Maytee Deroux Wang, Víctor Luis González Canavaciolo y Juan Magraner Hernández.

Departamento de Química Farmacéutica, Centro de Productos Naturales, Calle 198 s/n entre 19 y 21, Siboney, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 10 de agosto de 1999. Aceptado: 5 de octubre de 1999.

Palabras clave: cera de abejas, alcoholes de elevado peso molecular, cromatografía gaseosa, validación.
Key words: beeswax, higher aliphatic alcohols, gas chromatography, validation.

RESUMEN. Se desarrolla y valida un método de análisis por Cromatografía Gaseosa (CG) con columna de relleno y argón como gas portador para la determinación del contenido total de alcoholes de elevado peso molecular en la cera de abejas saponificada. El método se basa en la extracción del material insaponificable presente con 1,2-dicloroetano, a una temperatura de 85 °C. En esta metodología, el producto extraído es analizado por CG, utilizando 1-eicosanol como patrón interno y *N*-metil,*N*-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA) como reactivo derivatizante. En el intervalo de 80 a 120 % de la masa nominal el método demostró ser lineal, según el coeficiente de correlación (0,992 3) y el de variación de los factores de respuesta (1,43 %) y no presentó sesgo al no ser significativo el intercepto para $p = 0,05$. La precisión estuvo dada por una repetibilidad y una reproducibilidad de 1,46 y 2,07 % respectivamente. La exactitud del método estuvo dada por un recobrado ($R = 100,4$ %), que no fue significativamente diferente del 100 %, según la prueba *t* de Student para $p = 0,05$. El estudio de robustez permitió determinar la influencia de pequeñas variaciones en los valores óptimos de los parámetros operacionales, sobre la determinación cuantitativa de los alcoholes totales, la resolución entre los alcoholes C_{28} y C_{30} y la retención relativa del C_{30} ; se observó que solamente la variación de la temperatura final del horno afectaba la resolución entre los alcoholes C_{28} y C_{30} , los demás parámetros pueden ser variados en los intervalos estudiados sin que se afecten los resultados. La metodología cumple con los requisitos de validación establecidos internacionalmente, por lo que puede ser empleada en la determinación del contenido total de alcoholes en cera de abejas.

ABSTRACT. A gas-chromatographic analytical method using filled column and argon as carrier gas, was developed and validated for determining the total aliphatic alcohols content from beeswax. The method was based on the extraction with 1,2-dichloroethane of the insaponified material from beeswax, at a temperature of 85 °C. The product obtained was analysed by gas chromatography, using 1-eicosanol as internal standard and *N*-methyl,*N*-trimethylsilyltrifluoroacetamide (MSTFA) as derivatizing reagent. A good linearity was found over a range from 80 to 120 % of nominal mass, according to the values of the correlation coefficient (0.992 3), the relative standard deviation of the response factors (1.43 %), and the *Y* intercept for $p = 0.05$. The repeatability and reproducibility values, 1.46 and 2.07 % respectively, gave the precision. The accuracy of the method (as recovery) $R = 100.4$ %, was checked to 100 % value with the Student *t* test. In the ruggedness study were evaluated the influence of small operational changes on: the quantitative determination, the resolution between C_{28} and C_{30} , and the relative retention time of C_{30} . It was shown that the resolution between C_{28} and C_{30} alcohols was affected when the final temperature of the oven was changed. The method can be used as a suitable procedure for routine measurements of the total alcohol content in beeswax.

INTRODUCCION

El D-002 es un nuevo producto de origen natural, que se obtiene a partir de la cera de abejas (*Apis mellifera* L.) saponificada. Este producto está compuesto fundamentalmente por una mezcla de alcoholes alifáticos lineales homólogos, los que presentan entre veinticuatro y treinticuatro átomos de carbono. En su proceso de producción se realiza una extracción selectiva de los alcoholes con disolvente orgánico y posteriormente, se purifica por recristalización con disolventes orgánicos.

En el análisis de las ceras, la determinación de alcoholes generalmente se ha limitado a la identificación de estos y a la determinación porcentual de las mezclas aisladas.¹⁻⁸ Sin embargo, en los últimos años, se han desarrollado métodos analíticos con éxito, como para el caso del policosanol y se han estudiado los aspectos cuantitativos de la determinación,⁹⁻¹¹ pero para la mezcla de productos insaponificables después de la hidrólisis alcalina de la cera de abejas, no hay publicado ningún otro método capaz de posibilitar la determinación cuantitativa de los alcoholes en presencia del resto de los componentes.

En el seguimiento farmacológico realizado con el D-002, se comprobó que efectivamente presenta una moderada acción antiinflamatoria,¹² y que a diferencia de otras drogas no esteroideas, no induce la aparición

de lesiones ulcerogénicas en la mucosa estomacal. Estudios más recientes han permitido conocer que esta droga presenta una promisoría actividad como agente antiulceroso, ya que actúa como citoprotector de la mucosa gástrica,¹³ además de poseer actividad antioxidante.¹⁴

Teniendo en cuenta las perspectivas del empleo del D-002 en el tratamiento de úlceras pépticas y duodenales en el hombre, este trabajo se propuso desarrollar y validar un método por cromatografía gas-líquido, suficientemente exacto y preciso, para la determinación cualitativa y cuantitativa del contenido total de alcoholes, presentes en el producto saponificado de la cera de abejas, que sirva como procedimiento analítico para el control de la calidad en la producción del D-002 materia prima.

MATERIALES Y METODOS

Equipos

Cromatógrafo de gases con detector de ionización por llama, modelo GC-14A (SHIMADZU, Japón) acoplado a computadora modelo C-R4A (SHIMADZU, Japón). Condiciones cromatográficas: Columna de vidrio silanizada (3,1 m X 3 mm d.i.) empaçada con OV-101 al 3 % sobre Cromosorb W AW-DMCS (80-100 mallas). Programación de la temperatura del horno: De 230-320 °C a 10 °C/min y 20 min isotérmico a la temperatura final. El flujo del gas portador (argón) fue de 30 mL/min, el de hidrógeno 40 mL/min y el de aire de 400 mL/min. El detector y el inyector se calentaron a 320 °C. El volumen de inyección fue de 2 µL.

Termostato seco, MULTI-BLOCK, modelo 2050 (LABLINE INSTRUMENTS, Melrose Park, USA).

Termostato HAAKE S3 902767.

Reactivos

Todos los reactivos empleados fueron de grado analítico. 1-eicosanol, 1-tetracosanol, 1-hexacosanol, 1-octacosanol, 1-triacontanol (Fluka Biochemica, Suiza); N-metil, N-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA). Cloroformo (Fluka Biochemica, Suiza); 1,2-dicloroetano (Janssen Chimica, Bélgica). D-002, Patrón de trabajo, (lote A0010594), producto saponificado de cera de abejas (triturado en un mortero y tamizado por un tamiz de 1,6 mm según DIN 4188) (Dirección de Producción, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ciudad de La Habana).

Disoluciones

Patrón interno (DPI): 1-eicosanol (0,40 mg/mL) en 1,2-dicloroetano.

Referencia de alcoholes (DRA): 1-tetracosanol (0,121 0 mg/mL), 1-hexacosanol (0,124 0 mg/mL), 1-octacosanol (0,123 0 mg/mL), 1-triacontanol (0,202 0 mg/mL) en cloroformo.

Matriz de referencia (DMR): Se añadieron 500 µL de la DRA en un vial de 2 mL, se llevó a sequedad en corriente de aire con calentamiento a 60 °C, se añadieron 150 µL de la DPI y 50 µL de MSTFA y se calentó a 60 °C durante 15 min.

Patrón de trabajo (DPT): D-002 (0,653 0 mg/mL) en cloroformo.

Preparación de la muestra

En un tubo de ensayos de 15 mL se pesaron, con exactitud de 0,1 mg, aproximadamente 35 mg de producto saponificado de la cera de abejas y se le añadieron 5 mL de la DPI y 3 mL de 1,2-dicloroetano. Se calentó durante 15 min a 85 °C, con agitación ocasional y se filtró en caliente. Se tomó una alícuota de 150 µL a la cual se le añadieron 50 µL de MSTFA y se calentó durante 15 min a 60 °C. Esta muestra se preparó por triplicado. La determinación cuantitativa se realizó mediante el Método del Patrón Interno, previo cálculo de los factores másicos de respuesta, según fue descrito por González y col.²²

Validación del método

El estudio del intervalo lineal del sistema se llevó a cabo con disoluciones patrones, preparadas a partir de 8,0; 12,0; 14,0; 16,0 y 20,0 mg de D-002 disueltos en 5 mL de la DPI (n = 5). Estas se calentaron a 85 °C con agitación ocasional hasta disolución total y se tomaron alícuotas de 150 µL a las que se le añadió respectivamente 0,1 mL de MSTFA. Se calentaron a 60 °C por 15 min y se analizaron por CG.

Para estudiar la linealidad del método, se prepararon muestras en un intervalo entre 80 y 120 % de la masa que se analiza normalmente, a las que se les aplicó la metodología analítica. En cada caso, se realizaron cinco réplicas y se determinaron las correspondientes ecuaciones de regresión ($y = b x + a$), por el método de los mínimos cuadrados. Como criterios de linealidad, se consideraron el coeficiente de correlación ($r > 0,99$, el coeficiente de variación (CV) de los factores de respuesta ($f = y/x$) $< 5 %$ y que el intercepto con el eje Y no fuese significativo para $p = 0,05$.¹⁵

La precisión del método se obtuvo a partir de los cálculos de los coeficientes de variación del estudio de repetibilidad (CVre) y de reproducibilidad (CVRe) según procedimiento establecido,¹⁵ y ambos casos, a tres

concentraciones diferentes. Se determinaron los intervalos de confianza (IC) del contenido total de alcoholes de elevado peso molecular (CTA) en el estudio de repetibilidad, calculado según:

$$IC = CTA \pm t DE$$

donde:

t valor tabulado para $p = 0,05$.

El nivel de significación utilizado en todas las pruebas fue de $p = 0,05$.

La exactitud del método se determinó por el recobrado (R) de acuerdo con la expresión:

$$R = \frac{\text{masa encontrada}}{\text{masa añadida}} \cdot 100 (\%)$$

donde la masa encontrada es igual a la diferencia entre el valor promedio encontrado al analizar seis muestras contaminadas con la DPT (3 mL) y tres muestras "blanco". Calculado R, se consideró como criterio de exactitud la prueba t según:

$$t_{exp} = /100 - R / \pm \frac{\sqrt{n}}{CV}$$

por comparación con el valor crítico tabulado para $p = 0,05$.¹⁵

Mediante el estudio de robustez, se investigó la influencia de pequeños cambios en los valores óptimos de los parámetros operacionales. Se estudiaron siete variables en ocho experimentos independientes ($n = 3$)¹⁵ (Tabla 1). Los resultados observados fueron: el CTA (%), la resolución entre los alcoholes C_{28} y C_{30} ($R_{C_{28}-C_{30}}$) y la retención relativa del C_{30} ($r_{1,p}$).

RESULTADOS Y DISCUSION

Se pudo observar que no se presentan interferencias entre los picos cromatográficos de los productos insaponificables de una muestra de cera de abejas saponificada y de los patrones de trabajo e interno (Fig. 1), lo que indica que el método es selectivo en las condiciones seleccionadas. La identificación se realizó mediante la comparación de los tiempos de retención relativos con los de una muestra de D-002 previamente identificada por CG acoplada a espectrometría de masas.

Linealidad

A partir de las relaciones de áreas cromatográficas encontradas (Ra), en función de las relaciones de masas presentes en las muestras inyectadas (Rm) (Tabla 2), se obtuvo la ecuación de regresión correspondiente a la linealidad del sistema: $y = (0,936 3 \pm 0,020 1) x - (0,103 6 \pm 0,125 3)$. El coeficiente de correlación ($r = 0,998 7$), así como el CV de los

Tabla 1. Factores y cambios operacionales del estudio de robustez.

Factores	Cambios operacionales
A) Temperatura del inyector	310 °C
B) Temperatura del detector	310 °C
C) Flujo del gas portador	35 mL/min
D) Velocidad del aumento de la temperatura	12 °C/min
E) Temperatura inicial del horno	220 °C
F) Volumen de inyección	3 µL
G) Temperatura final del horno	310 °C

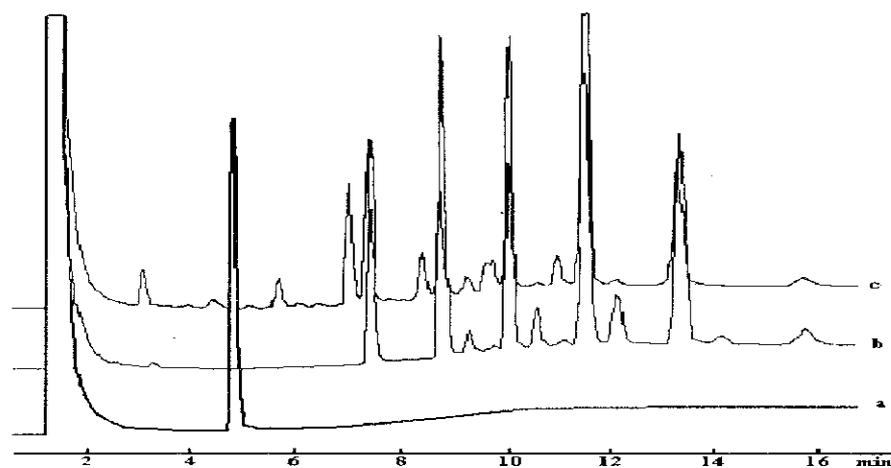

Fig. 1. Cromatogramas gaseosos de los derivados trimetilsililéteres de a) 1-icosanol, b) patrón de trabajo y c) muestra de cera de abejas saponificada.

Tabla 2. Linealidad del sistema.

Mezcla (n = 5)	Rm	Ra	f	CV _r (%)
1	3,422 6	3,108 0	0,908 1	2,49
2	5,133 9	4,679 6	0,911 5	1,51
3	5,989 5	5,540 6	0,925 0	1,01
4	6,645 2	6,278 2	0,917 2	1,66
5	8,556 5	7,916 2	0,925 2	1,35
Global	—	—	0,917 4	1,71

Tabla 3. Linealidad del método.

Mezcla (n = 5)	x (mg)	y (mg)	f	CV _r (%)
1	30,0	9,320 5	0,310 7	0,79
2	35,0	10,817 9	0,309 1	1,55
3	40,0	12,297 3	0,307 4	1,67
Global	-	-	0,309 1	1,43

factores de respuesta (1,71 %) fueron los indicadores de la linealidad. El cero se encontró incluido dentro del intervalo de confianza del intercepto ($IC = -0,103 6 \pm 0,125 3$), por lo que se concluyó que el sistema, además de ser

lineal en todo el intervalo de masas analizado, no presenta sesgo.

En el caso de la linealidad del método (Tabla 3), la ecuación de regresión se calculó a partir del contenido total de alcoholes en función de

las masas analizadas de cera de abejas saponificada: $y = (0,297 7 \pm 0,022 2)x + (-0,392 9 \pm 0,781 9)$. La prueba de linealidad demostró que tanto el coeficiente de correlación ($r = 0,992 3$) como el CV de los factores de respuesta (1,43 %), eran menores que los límites establecidos, de modo que se pudo considerar que el método era lineal en todo el intervalo de masas estudiado. La inclusión del cero dentro de los límites de confianza del intercepto ($IC = 0,392 9 \pm 0,781 9$) se tomó como criterio de proporcionalidad, lo que demostró que el método no presenta sesgo.

Precisión

La repetibilidad (Tabla 4) y reproducibilidad (Tabla 5) que presenta el método aseguran una determinación precisa de los alcoholes totales en la cera de abejas saponificada. Al realizar el análisis estadístico, se encontró que los CV obtenidos en todo el estudio de precisión (1,3 - 2,2 %), eran inferiores a los límites indicados por Horwitz, para concentraciones de analito en la muestra de 50 y 10 % respectivamente (2,2 y 2,8 %).¹⁵ Además, resultó que los CV_{re} eran mayores que los CV_r y que en ambos casos, la concentración al 100 % presentó los CV más bajos.

Exactitud

El contenido medio obtenido de alcoholes totales (Tabla 6) representó un recobrado del 100,4 %. Este elevado porcentaje de recuperación se explica por la adición del patrón interno al inicio de la extracción. Se confirmó que el $t_{exp.}$ (0,80) era menor que el valor crítico tabulado (2,57) para una $p = 0,05$; de modo que no existen diferencias significativas entre la recuperación media hallada (100,4 %) y la considerada verdadera (100 %), por lo que el método es exacto.

Robustez

Para determinar la influencia de los cambios operacionales, se calcularon las medias de los resultados de cada experimento (Tabla 7). Los efectos sobre los resultados observados y sus valores límites ($\sqrt{2}DE$) (Tabla 8) evidenciaron que la resolución de los alcoholes C_{28} y el C_{30} fue afectada significativamente por la variación de la temperatura final de la columna. No se observó ningún otro efecto significativo sobre los resultados.

CONCLUSIONES

Se desarrolló y validó un método de análisis por Cromatografía

Gaseosa con columna de relleno para la determinación del contenido total de alcoholes de elevado peso molecular en la cera de abejas saponificada. El método presenta buena linealidad, precisión, exactitud y robustez según los requisitos de validación establecidos internacionalmente por lo que puede ser empleado para la determinación del conte-

nido total de alcoholes en cera de abejas .

BIBLIOGRAFIA

1. Ramos R. y Valov PI. Determinación cuantitativa de alcoholes grasos, **Revista CENIC Ciencias Químicas**, 4, 71, 1973.
2. Stránsky K., Streibl M., Kubelka V. **Czechoslov. Chem. Commun.**, 36, 2267 y 2281, 1971.

3. Tulloch A.P. y Hoffman L.L. **Phytochemistry**, 13, 2535, 1974.
4. Garcían J. y Cota J. **Grasas y Aceites**, 35, 358, 1984.
5. Tulloch A.P. **Phytochemistry**, 21, 2251, 1982.
6. Bronz I., Greibrokk T. **J. Natural Products**, 46, 940, 1987.
7. Grob K., Lanfranchi M. y Mariani C. **JOCS**, 67, 626, 1990.
8. Kranz Z.H. *et al.* **Australian J. Chem.**, 13, 498, 1960.
9. González V.L., Magraner J., Cabrera L. y Rivero B. **Revista CENIC Ciencias Químicas**, 29, 27, 1998.
10. González V.L., Magraner J., Laguna A., Velázquez C. y Lorenzo M. **Revista CENIC Ciencias Químicas**, 29, 123, 1998.
11. Magraner J., González V.L., Laguna A., Lorenzo M., Cabrera L. y Urribarri E. **Revista CENIC Ciencias Químicas**, 29, 127, 1998.
12. Carbajal D., Molina V., Valdés S., Arruzabala M.L., Más R. y Magraner J. **Prostaglandins, Leucotrienes and Essential Fatty Acids**, 59, 4, 235, 1998.
13. Carbajal D., Molina V. and Valdés S. **J. Pharm. Pharmacol.**, 48, 858, 1996.
14. Menéndez R., Amor A.M., González R.M., Jiménez S., Más R. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 1999 (en prensa).
15. Castro M., Gascón S., Pujol M., Sans J.M. y Vicente L. **Validación de Métodos Analíticos**, A.E.F.I. Catalán Sec., España, 1989.

Tabla 4. Determinación de la repetibilidad.

Concentración (%)	CTA (%)	DE	CV (%)	n	IC del CTA
85,7	29,9	0,52	1,74	6	28,6 - 31,2
100,0	30,2	0,38	1,27	6	29,2 - 31,2
114,3	30,2	0,41	1,37	6	29,1 - 31,2
Global	30,1	0,44	1,46	18	29,2 - 31,0

Tabla 5. Determinación de la reproducibilidad.

Concentración (%)	CTA (%)			n	y ± tDE	CV (%)	n
	1	2	3				
85,7	29,8	30,6	31,1	3	30,5 ± 1,6	2,22	9
100,0	30,2	29,6	30,5	3	30,1 ± 1,3	1,82	9
114,3	30,6	29,4	30,6	3	30,1 ± 1,5	2,11	9
Global	—	—	—	—	30,2 ± 1,3	2,07	27

Tabla 6. Determinación de la exactitud.

Muestra (mg)	n	CT (%)	DE	CV (%)
Blanco	3	10,18	0,14	1,38
Muestra + DPT	6	12,15	0,154	1,16

$R = (12,15 - 10,18) / 1,96 \cdot 100 = 100,38 \%$

Tabla 7. Medias de los resultados en el estudio de la robustez.

Resultado	Experimento							
	y1	y2	y3	y4	y5	y6	y7	y8
CTA(mg)	10,61	10,33	10,33	10,44	10,44	10,22	10,36	10,36
R _{C₂₈-C₃₀}	4,52	4,69	4,96	4,80	4,78	4,61	4,86	5,01
r _{LP}	2,20	2,28	2,37	2,36	2,28	2,12	2,29	2,29

Tabla 8. Efecto de los cambios operacionales sobre los resultados, en el estudio de la robustez.

Factor	Efecto sobre la CTA	Factor	Efecto sobre el r _{LP}	Factor	Efecto sobre la R C ₂₈ -C ₃₀
F	0,14	B	0,11	B	0,26
C	0,10	G	0,06	G	0,16
A	0,09	A	0,06	A	0,07
D	0,05	E	0,06	F	0,02
G	0,04	C	0,02	D	0,02
B	0,02	F	0,02	E	0,008
E	0,005	D	0,02	C	0,002
√2 DE	0,16	√2 DE	0,12	√2 DE	0,24