Determinación cuantitativa de alcoholes grasos

R. Ramos y P. I. Valov

Laboratorio Cera de Caña, CNIC, Habana

Recibido en: Enero de 1973

ABSTRACT. A method was developed for the quantitative determination of long-chain alcohols in complex mixtures. The long-chain alcohols are transformed to their 3,5-Dinitroderivatives and then separated from the other components by thin-layer chromatography. The spots so obtained are extracted and submited to an alkaline solution of methanol-acetone, and the intensity of the resulting color determined at the 546 nm. It was confirmed that the method is useful for the quantification of a pure alcohol and for the total quantification of long-chain alcohols in a complex mixture as well. Using this method the total quantity of alcohols in refined sugar cane wax was 21.8% calculated on Ceryl alcohol.

RESUMEN. Se desarrolla un método de determinación cuantitativa de alcoholes de cadena larga en mezclas complejas. Los alcoholes de cadena larga son transformados en sus 3,5-Dinitroderivados y éstos separados del resto de los compuestos por cromatografía en capa delgada. Las manchas obtenidas se extraen y hacen reaccionar con una solución alcalina de metanol-acetona y la intensidad del color es evaluada a los 546 nm. Se comprueba que el método es válido para la determinación individual de un alcohol, así como la cantidad total de alcoholes de cadena larga en una mezcla compleja. Por este método se determinó la cantidad total de alcoholes libres presentes en la cera de caña refinada, que resultó igual al 21,8% calculada en base del alcohol cerílico.

INTRODUCCION

Existen diferentes métodos para la determinación de alcoholes de bajo y alto peso molecular.[1] Sin embargo cuando se trata de mezclas complejas donde junto con los alcoholes subsisten otros compuestos orgánicos, el número de métodos para la evaluación cualitativa y cuantitativa directa se reduce. Los ésteres del ácido 3,5-Dinitrobenzoico son frecuentemente utilizados para establecer la composición cualitativa de una mezcla de alcoholes, debido a la especificidad de la reacción del cloruro del ácido. Diferentes métodos cromatográficos han sido empleados en la separación e identificación cualitativa de los ésteres del ácido 3,5-Dinitrobenzoico.[2,5] Los 3,5-Dinitrobenzoatos (3,5-DNB) derivados de los cuatro primeros alcoholes de la serie homóloga de los alcoholes alifáticos primarios, fueron separados y determinados cuantitativamente mediante la cromatografía de papel por G. E. Zaikov.[6]

El objetivo de nuestro trabajo consiste en desarrollar un método de análisis cuantitativo de alcoholes de cadena larga en presencia de otros compuestos químicos, con el fin de conocer la cantidad de alcoholes libres presentes en la cera de caña refinada y además para ser utilizado en la determinación cuantitativa del alcohol Cetílico durante el proceso de su oxidación.[7] La comprobación del método se llevó a cabo sintetizando los 3,5-DNB derivados de los alcoholes de número par de átomos de carbono (C_{12}–C_{22}). Estos derivados se separaron del ácido 3,5-Dinitrobenzoico en exceso por cromatografía en capa delgada. Los 3,5-DNB eluídos se determinaron cuantitativamente por un método colorimétrico, basado en la coloración violeta que se obtiene haciendo reaccionar estos derivados con una solución de metanol-acetona. La presencia en la solución de otros compuestos que no contengan los grupos m-dinitro no dan esta coloración, por lo que la determinación se puede realizar en el rango visible del espectro sin la interferencia de compuestos incoloros.

MATERIALES Y METODOS

Obtención del 3,5-Dinitrobenzoato de n-Hexadecan-1-ol

En un erlenmeyer de 50 mls de boca esmerilada se pesan 0,2 g de n-Hexadecan-1-ol (Cetyl alcohol, RDH, Specially pure) y se le agregan 2 mls de Piridina seca, 4 mls de Benceno y 0,5 g de cloruro del ácido 3,5-Dinitrobenzoico. La mezcla reaccionante es reflujada a 80°C en un baño de María durante 30 minutos, aislando de la humedad atmosférica con un tubo de $CaCl_2$. Una vez efectuada la reacción, la mezcla reaccionante se vierte en un frasco aforado de 25 mls, lavando el erlenmeyer y completando el volumen del frasco con benceno. De esta forma se obtiene una solución del 3,5-DNB de Cetilo de una concentración conocida.

Separación del 3,5-DNB de Cetilo de los demás componentes por cromatografía en capa delgada y su evaluación cuantitativa

En un frasco de iodo de 500 mls se pesan 2 5g de Kieselgel HF_{254} (MERCK) y se le agregan 60 mls de agua destilada. La suspensión se agita durante un minuto y se vierte en un aplicador "CAMAG" sobre placas de 20 × 20 cms que fueron previamente lavadas con una solución diluida de ácido fluorhídrico. La capa se hizo con un espesor de 0.3 mm. Las placas se mantienen durante 12 horas al aire y más tarde son activadas en la estufa a 100°C durante 2 horas. Las placas activadas y todavía calientes se colocan en una desecadora sobre Silica gel azul.

La solución de la mezcla reaccionante es aplicada en la capa con una jeringuilla graduada Hamilton de 0-250 µl. El volumen de la misma se fijó en 30 µl aplicán-

dose esta cantidad cuatro veces en cuatro puntos. En cada placa de 20 × 20 cms se pueden analizar dos muestras diferentes, aplicando cuatro veces 30 µl para cada una.

El cromatograma es revelado utilizando benceno como solvente y transcurre en un tiempo de alrededor de 30 minutos. Para localizar el lugar donde se encuentran las manchas de 3,5-DNB de Cetilo, la placa se observa a la luz ultravioleta, resultando las mismas como manchas oscuras sobre un fondo claro. El Kieselgel de las cuatro manchas juntas es coleccionado utilizando vacío, con un aparato descrito por R. Rangone y C. Ambrosio.[8] La sustancia es extraída con metanol, pasando el extracto a una probeta de 10 mls. Para trabajar con concentraciones adecuadas se toman 2 mls de la solución y se diluye con 6 mls de metanol.

Para la determinación cuantitativa del 3,5-DNB de Cetilo se toman 5 mls de la solución diluida y se le agregan 5 mls de una solución alcalina de metanol-acetona (4 g NaOH + 200 mls CH_3OH + 400 mls $(CH_3)_2$ CO).

La mezcla se agita y a los 3 minutos de haber mezclado las soluciones se le mide la intensidad de su absorbancia. Como referencia se utiliza una solución de 5 mls de metanol y 5 mls de la solución alcalina de metanol-acetona. Las mediciones se realizaron con un espectrofotómetro SP-800 ultravioleta-visible, en cubetas de 1 cm de ancho.

La curva de calibración se construyó con soluciones patrón preparadas con el 3,5-DNB de Cetilo disuelto en metanol.

Determinación de la suma total de alcoholes grasos de una mezcla

En erlenmeyer de 100 mls se pesaron 0.2 g de cada uno de los alcoholes siguientes: n-Dodecanol (BDH), Hexadecan-l-ol (BDH), n-Octadecanol BDH, l-Eicosanol (Schuchart München) y l-Docosanol (Schuchart München). A esta mezcla de alcoholes se le agregan 10 mls de Piridina seca, 20 mls de Benceno absoluto y 2 g del cloruro del ácido 3,5-Dinitrobenzoico. La mezcla se reflujó en un baño de María a 80°C durante 30 minutos, aislando de la humedad con un tubo de $CaCl_2$. Una vez enfriada la mezcla reaccionante se diluyó hasta 100 mls en un frasco aforado.

La mezcla se aplicó en la capa delgada y se realizó la determinación cuantitativa tal como se describe para el alcohol Cetílico.

Determinación de la suma total de los alcoholes libres de la cera de caña refinada

La metodología de análisis empleada en la determinación de los alcoholes se utilizó para la evaluación cuantitativa del total de los alcoholes libres presentes en la cera de caña refinada.

La cera cruda de caña (de Cuba) fue separada en fracciones por medio de solventes orgánicos según el método utilizado por Schubert et al.[9] La fracción de cera refinada fue extraída 2 veces más con acetona para disminuir el contenido de aceite.

RESULTADOS Y DISCUSION

Separación por cromatografía en capa delgada del 3,5-DNB de Cetilo de los demás componentes

La determinación directa con la metodología utilizada del 3,5-DNB de Cetilo en la mezcla reaccionante en presencia del resto del cloruro y del ácido 3 5-Dinitrobenzoico que no reaccionaron, presenta dificultades, ya que estos dos últimos compuestos interfieren en la valoración colorimétrica.

La aplicación de la cromatografía en capa delgada permite obviar esta interferencia ya que al realizar la separación de los compuestos de la mezcla, el ácido 3,5-Dinitrobenzoico queda en el punto de partida y el 3,5-DNB de Cetilo se encuentra cerca del frente del solvente. (Rf=0,91).

Determinación cuantitativa del 3,5-DNB de Cetilo

Para evaluar cuantitativamente la cantidad de sustancia extraída de la capa se utilizó el método de Espectroscopía UV-VIS.

El 3,5-DNB de Cetilo posee una amplia banda de absorción en el rango de los 200-280 nm pero la evaluación directa de su concentración es difícil, debido a que al extraer el Kieselgel con metanol, algunos de sus componentes orgánicos e inorgánicos utilizados en su confección se disuelven,[10] absorbiendo también éstos en el rango de los 200-280 nm. Para evitar la interferencia de estos componentes en la determinación del 3,5-DNB de Cetilo, el extracto de la capa delgada se hace reaccionar con una solución alcalina de metanol-acetona y se obtiene una coloración violeta. Esta reacción de color ha sido utilizada en el análisis cuantitativo de dinitroderivados aromáticos[11,12] obteniéndose buenos resultados.

Se prefirió agregar la solución alcalina de metanol-acetona al extracto del 3,5-DNB de Cetilo en metanol en vez de revelar directamente la mancha en la placa y después extraer, debido a que el compuesto puede ser localizado en la placa bajo la luz ultravioleta y el compuesto coloreado que se obtiene se descompone en un intervalo relativamente corto de tiempo. Para evitar esta dificultad todas las mediciones se efectuaron a los 3 minutos de haber agregado la solución alcalina de metanol-acetona.

El espectro del producto coloreado del 3,5-DNB de Cetilo mezclado con la solución alcalina de metanol-acetona presenta dos máximos de absorción fundamentales en 402 nm ($\varepsilon = 12900$) y los 546 nm ($\varepsilon = 9900$) y un hombro en 605 nm ($\varepsilon = 8200$) (gráfico 1). Las determinaciones cuantitativas se realizaron tomando como base la

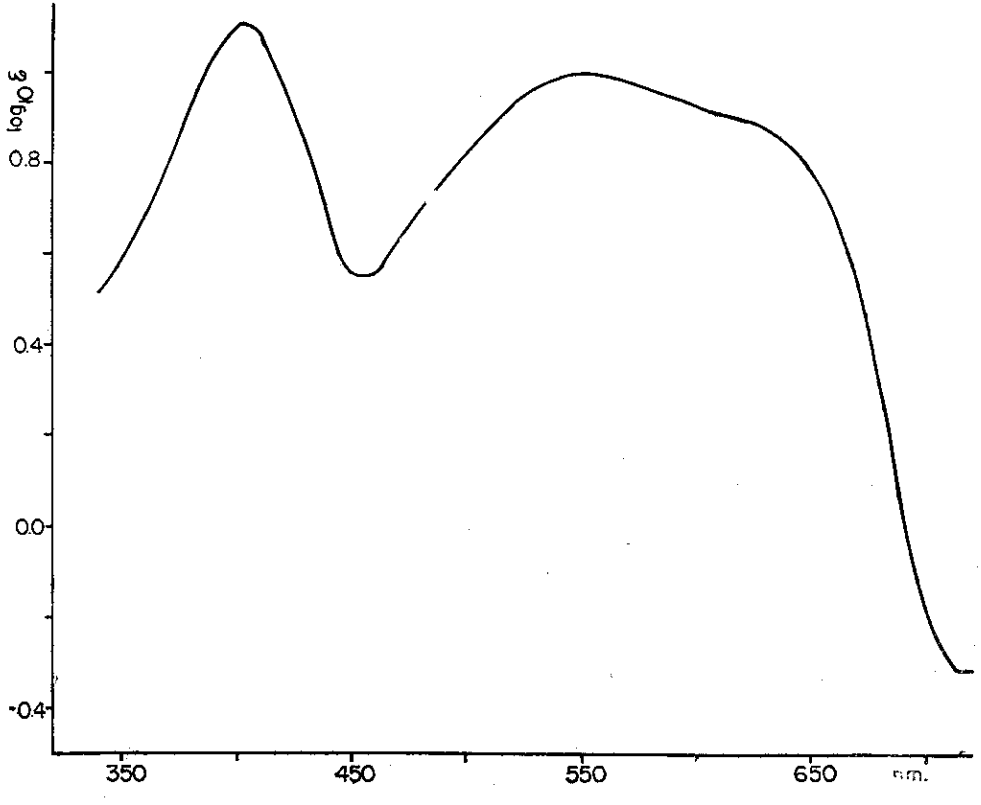


Gráfico 1. Espectro de la sustancia coloreada del 3, 5-DNB de Cetilo y la solución alcalina de metanol-acetona.

absorbancia de la solución coloreada en los 546 nm para lo cual se construyó una curva de calibración de la absorbancia, contra la concentración del alcohol en la solución inicial, preparando soluciones patrones del 3,5-DNB de Cetilo (gráfico 2).

Se observa que a bajas concentraciones se cumple la ley de Lambert-Beer.

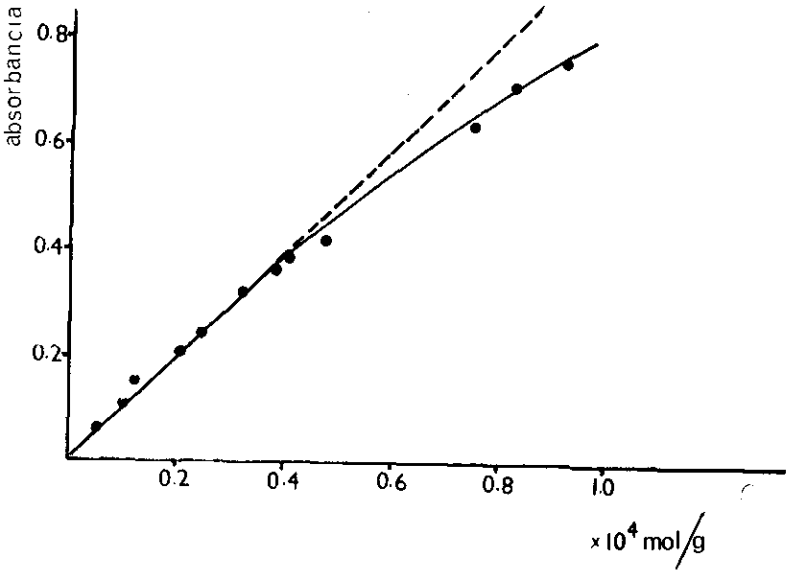


Gráfico 2. Curva de calibración que expresa la absorbancia de la sustancia coloreada con respecto a la cantidad de moles de alcohol por gramo de muestra analizada.

Para comprobar la exactitud del método se prepararon muestras de 3,5-DNB de Cetilo procediendo a su determinación según la metodología anterior. Los resultados de esta comprobación (Tabla I) indican que el método es aceptable para la evaluación cuantitativa de este alcohol.

Determinación de la suma total de alcoholes grasos de una mezcla

La curva de calibración construida se utilizó en la determinación de la cantidad de moles de n-Dodecanol en una muestra dada. El espectro del 3,5-DNB de n-Dodecanol es similar al espectro del 3,5-DNB de Cetilo, por lo que la evaluación cuantitativa se realizó también a 546 nm. De esta forma se comprobó que la curva de calibración del alcohol Cetílico puede ser empleada para el n-Dodecanol.

Con el fin de establecer la suma total de moles de alcohol de distinto peso molecular en una muestra, se compusieron mezclas de n-Dodecanol, n-Hexadecanol, n-Octadecanol, n-Eicosanol y n-Docosanol. A partir de estas mezclas se obtuvieron los 3,5-DNB de los alcoholes correspondientes y se determinó la suma total de los mismos.

Los resultados de etas evaluaciones (Tabla II) demuestran que el método puede ser utilizado en la determinación cuantitativa de la suma total de alcoholes grasos en base a la curva de calibración del n-Hexadecanol.

TABLA I

Compuesto determinado	*Peso de la muestra/g*	$\times 10^4$ *moles de alcohol/g*	
		Teór.	*Práct.*
n-Hexadecan-1-ol	0.2063	8.52	8.40
	0.2176	8.97	8.40
	0.1464	6.05	6.79
	0.2026	8.38	8.39
	0.1853	7.66	7.13
	0.1538	6.36	6.05

TABLA II

Compuesto determinado	$\times 10^4$ *moles de alcohol/g*	
	Teórico	*Práctico*
Mezcla de alcoholes	30.8	30.6
	22.6	23.9
	27.7	27.4
	25.3	23.9
	31.6	30.7
	22.0	19.9

Determinación de la suma total de alcoholes libres de la cera de caña refinada

La cantidad de alcoholes libres en la cera de caña refinada ha sido reportada por distintos autores. De acuerdo con McLoud[13] una cera dura de caña contiene 5 por ciento de alcoholes libres. J. A. Lamberton y A. H. Redcliffe[14] después de separar en una columna cromatográfica la fracción de cera dura, de una cera de caña refinada con solventes, determinaron en la cera dura un contenido de alcoholes libres de 8 por ciento.

El contenido de alcoholes libres en la cera cuticular destilada es aun mayor que en la cera refinada con solventes. J. A. Lamberton y A. H. Redcliffe[15] determinaron la cantidad de alcoholes libres de la cera cuticular separando primeramente los aldehídos como semicarbazonas y los otros constituyentes no-aldehídicos de los alcoholes por cromatografía en alumina. Estos autores reportan un contenido de 27 por ciento. En un trabajo siguiente[16] los aldehídos fueron separados por oxidación y los alcoholes por cromatografía. El contenido en este caso fue del 25 por ciento.

TABLA III

Compuesto determniado	*Peso de la muestra/g*	*Alcohol Cerílico* (C_{28})	
		$\times 10^4 mol/g$	%
Alcoholes libres en la	0.2030	1.1	22.2
cera refinada	0.2064	1.1	21.9
	0.2121	1.1	21.3

Los valores aquí representados corresponden a no menos de 8 determinaciones en la misma muestra.

Los valores obtenidos por el método de síntesis de los 3,5-DNB de los alcoholes libres de la cera de caña refinada se representan en la Tabla III. El por ciento en peso del total de alcoholes con respecto a la cera de caña refinada se calculó en base del peso molecular del alcohol Cerílico (C_{28}) que es el constituyente más abundante de la mezcla.[17] Se puede observar de los resultados que, según este método, la cantidad total de alcoholes libres de la cera refinada es semejante a la cantidad establecida para la cera cuticular en los trabajos anteriormente citados.

REFERENCIAS

1) *Mitchell J. Jr., Kolthoff I. M., Proskauer E. E. and Weissberger A.* Organic Analysis, Interscience Publishers. Inc, New York, *Interscience Publishers* Ltd. London, **vol. I**, 1, 1961.

2) *Sundt E. and Winter M.* Paper Chromatography of 3, 5-Dinitrobenzoates of Alcohols, *Anal. Chem.*, **29**, 851, 1957.

3) *Borecky J., Gasparic J. and Vecera M.* Identification and separation of aliphatic C_1-C_{18} alcohols by paper chromatography, *Chem. Listy*, **52**, 1283, 1958.

4) *Severin M.* Chromatographic sur couche mince des 3, 5-Dinitrobenzoates. Separation des alcools aliphatiques de C_1 a C_{14} par Chromatographie bidimensionnelle, *J. Chromatog.*, **26**, 101, 1967.

5) *Jozsef V., Brantner A., Szasz G. and Vegh A.* Thin-layer Chromatography of alcohols. I. Detection of metanol impurities in ethanol, *Acta Pham. Hung.*, **38**, 372, 1968.

6) *Zaikov G. E.* Separation of low aliphatic alcohols by paper Chromatography and quantitative determination, *Zh. Anal. Khim.*, **15**, 104, 1960.

7) *Ramos R. y Valov P. I.* Oxidación de alcoholes grasos saturados con oxígeno molecular I: Leyes cinéticas de la oxidación del alcohol cetílico. *Revista CNIC*, **2**, 121, 1970.

8) *Rangone R. and Ambrosio C.* Identification and Quantitative analysis of p-hydroxybenzoic acid and its esters using reversed-phase thin-layer Chromatography. *J. Chromatog.*, **50**, 436, 1970.

9) *Schubert A., Onken D. Barnikol Oettler K., Heller K., Meublein D., Stachowiax A. and Zepter R.* Analysis and significance of sugarcane wax for preparation of steroid Hormones, *Pharmazie*, **23**, 454, 1968.

10) *Amos R.* Improved Procedures for handling thin-layer chromatographic Spots, J. Chromatog., **48**, 343, 1970.

11) *English F. L.* Colorimetric determination of certain dinitroaromatics in the presence of the corresponding mononitro compounds, *Anal. Chem.*, **20**, 745, 1948.

12) *Korenman I. M. and Fisher A. M.* Spectrophotometric determination of m-dinitrobenzene and trinitrotoluene, Zavodskaya Lab., **14**, 1058, 1948.

13) *Mc Loud E. S.* Paper presented to Chemical Speciality Manufacturers Association Meeting, June 2, 1950.

14) *Lamberton J. A. and Redcliffe A. H.* Sugar-Cane Wax III. Composition of solvent refined wax from sugar-cane mud, Aust. J. Appl. Sci., **11**, 473, 1950.

15) *Lamberton J. A. and Redcliffe A. H.* The Chemistry of Sugar-Cane Wax I. The nature of sugar-cane wax, *Aust. J. Chem*, **13**, 261, 1960.

16) *Kramz Z. H., Lamberton J. A, Murray K. E. and Redeliffe A.* A. Sugar-Cane Wax II. An examination of the constituents of sugar-cane cuticle wax by gas chromatography, *Aust J. Chem.* **13**, 498, 1960.

17) *Miltenberger K. H.* Gas-chromatographische Untersuchung von Naturwachsen, Fette-Seifen. *Anstrichmittel*, **70**, 10, 1968.