

Determinación de alcoholes grasos en el ingrediente activo D004 por cromatografía de gases-espectrometría de masas

Determination of fatty alcohols in D-004 active ingredient by using gas chromatography-mass spectrometry

Dr. C. David Marrero Delange, MSc. Eduardo Antonio Rodríguez Leyes,
Dr. C. Víctor Luis González Canavaciolo, Téc. Yuliamny Adames Fajardo,
Téc. Roxana Vicente Murillo

Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC). La Habana, Cuba.

RESUMEN

Introducción: el D004, nuevo extracto lipídico purificado a partir de los frutos de la palma real cubana (*Roystonea regia* [Kunth] F. Cook), ha mostrado ser efectivo en modelos experimentales de hiperplasia prostática, y ha mostrado efectos antioxidantes y antiinflamatorios.

Objetivos: identificar los alcoholes que pudieran estar presentes en el ingrediente activo D004 utilizando la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masa.

Métodos: muestras de 9 lotes de D004 se sometieron a saponificación con una disolución de KOH/EtOH y las fracciones insaponificables fueron extraídas con n-hexano. Los alcoholes se analizaron como derivados trimetilsilil, obtenidos por reacción con N-metil, N-trimetilsilil trifluoroacetamida. La cuantificación se basó en el empleo de 1-eicosanol como patrón interno.

Resultados: el D004 presenta un contenido total de alcoholes entre 0,18 y 5,10 %. Esta fracción está compuesta principalmente por 1-octacosanol (52,94 %), 1-triacontanol (25,91 %) y 1-hexacosanol (14,40 %); y presenta como componentes minoritarios: 1-docosanol, 1-tricosanol, 1-tetracosanol, 1-pentacosanol, 1-heptacosanol, 1-nonacosanol, 1-dotriacontanol, 1-tetratriacontanol, 1-tetradecanol, 1-pentadecanol, 1-hexadecanol, 1-octadecanol y 1-eicosanol, los seis últimos en niveles de trazas.

Conclusiones: se identificaron y se cuantificaron mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masa los alcoholes grasos en el ingrediente activo D004. Los componentes mayoritarios fueron 1-octacosanol, 1-triacontanol y 1-hexacosanol.

Palabras clave: alcoholes grasos, D004, insaponificables, cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masa.

ABSTRACT

Introduction: D004, a new lipid extract purified from the Cuban royal palm (*Roystonea regia* [Kunth] F. Cook) fruits, has been shown to be effective in experimental models of prostate hyperplasia, and to exhibit antioxidant and anti-inflammatory effects.

Objectives: to identify the fatty alcohols that could be present in D004 active ingredient using gas chromatography-mass spectrometry.

Methods: samples of nine batches of D004 were submitted to saponification with KOH/EtOH solution and the unsaponifiable fractions were extracted with n-hexane. The alcohols were analyzed as trimethylsilyl derivatives, which were obtained by reaction with MSTFA. The quantification was carried out by the internal standard method using 1-eicosanol.

Results: the total content of alcohols in D004 ranged from 0.18 to 5.10 %. This fraction was mainly composed of 1-octacosanol (52.94 %), 1-triacontanol (25.91 %), and 1-hexacosanol (14.40 %); whereas the minority components were 1-docosanol, 1-tricosanol, 1-tetracosanol, 1-pentacosanol, 1-heptacosanol, 1-nonacosanol, 1-dotriacontanol 1-tetratriacontanol, 1-tetradecanol, 1-pentadecanol, 1-hexadecanol, 1-octadecanol and 1-eicosanol were minor components, being the last six alcohols present in trace levels.

Conclusions: fatty alcohols were identified and quantified in D004 active ingredient by gas chromatography-mass spectrometry. The major components were 1-octacosanol, 1-triacontanol and 1-hexacosanol.

Key words: fatty alcohols, D004, unsaponifiable, gas chromatography-mass spectrometry.

INTRODUCCIÓN

El D004 es un nuevo ingrediente activo (IA) de carácter lipídico, obtenido y purificado a partir de los frutos de la palma real cubana (*Roystonea regia* [Kunth] F. Cook),¹ compuesto mayoritariamente por una mezcla de ácidos grasos libres entre 8 y 18 átomos de carbono. Este IA ha demostrado reducir la hiperplasia prostática inducida por testosterona en modelos experimentales²⁻⁴ y presenta además propiedades antioxidantes y antiinflamatorias.⁵⁻⁷ Teniendo en cuenta que una fracción de alcoholes grasos acompaña usualmente a los extractos lipídicos de fuentes naturales, pudiendo citarse como ejemplo el extracto de la palmácea *Serenoa repens*;⁸ así como el hecho de que se han encontrado en el D004 contenidos de material no saponificable (MNS) entre 1,5-6,7 %, ⁹ se decidió determinar su contenido de alcoholes grasos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM). El presente estudio constituye una importante

contribución al desarrollo químico-farmacéutico de este nuevo IA, al permitir profundizar en el conocimiento de sus componentes minoritarios.

MÉTODOS

Se estudiaron 9 lotes de D004 IA obtenidos a escala piloto: 190106, 180406, 061206, 111206, 060607, 061207, 020907, 230508 y 300109 (Centro Nacional de Investigaciones Científicas, CNIC, Cuba). Se utilizaron hexano comercial destilado, cloroformo, piridina y metanol puros para análisis (Merck, Alemania); disolución acuosa de NaOH 2 mol/L; disolución de patrón interno (DPI): 1-eicosanol (5,07 mg/mL) en cloroformo; disolución de referencia de alcoholes (DRA): C24OH y C27OH (0,04 mg/mL), C26OH (0,07 mg/mL), C28OH (0,75 mg/mL) y C30OH (0,15 mg/mL), todos > 99 % (SIGMA, EUA) en cloroformo; disolución de KOH en metanol 2 mol/L, y como reactivo silanizante N-metil, N-trimetilsilil trifluoroacetamida (MSTFA, Sigma, EUA).

Se utilizó un cromatógrafo de gases 6890N acoplado a un detector de masas 5975 B inert (Agilent, EUA) con un sistema de cómputo y una columna capilar HP-5 Ms (30 m x 0,25 mm d.i. y 0,25 mm de espesor de película, Agilent, EUA). El horno se programó desde 100 hasta 220 °C a 30 °C/min, y desde 220 hasta 320 °C (20 min isotérmico) a 5 °C/min. El flujo del gas portador (Helio) fue de 1 mL/min. El inyector, en modo *splitless*, se mantuvo a 320 °C. Las temperaturas de la interfase, la fuente de ionización y el cuadrupolo resultaron 300, 230 y 150 °C, respectivamente. La energía de ionización fue de 70 eV. La adquisición se realizó desde 40 hasta 800 m/z. Se inyectó 1 µL por la técnica de *solvent-flush*.

Para obtener los MNS de D004, se aplicó una variante de la metodología del *Institute for Nutraceutical Advancement* (INA, EUA).¹⁰ Para ello, se pesaron 5,0 g de D004 en un balón de 250 mL, se adicionó 50 mL de KOH en etanol (0,5 mol/L) y se mantuvo a reflujo en baño de agua durante 1 h. Se enfrió a 25 °C y se transfirió el contenido a un embudo separador de 250 mL. Se lavó el balón con 2 porciones de 25 mL de agua destilada y se transfirieron al embudo separador. Se extrajo con 3 porciones de 60 mL de hexano. Se desechó la fase acuosa, se reunieron las fases hexánicas en otro embudo separador de 250 mL y se lavaron con 3 porciones de 40 mL de agua destilada. Se aplicó un cuarto lavado con 40 mL de disolución acuosa de KOH 3 % y posteriormente se lavó con 2 porciones de 40 mL de agua destilada. Se adicionó Na₂SO₄ anhidro a la fase hexánica, se agitó y se dejó reposar durante 15 min. Se filtró a través de un papel de filtro. El filtrado se transfirió a un balón tarado y se evaporó el disolvente a 60 °C con vacío en un evaporador rotatorio. Previo al análisis por CG-EM se pesaron alrededor de 5 mg del MNS en un tubo de ensayos, se añadieron 140 µL de MSTFA y 0,5 mL de la DPI, se tapó y se calentó a 80 °C durante 1 h. Muestras de todos los lotes se analizaron además sin la adición de la DPI, en estos casos se sustituyó esta disolución por cloroformo.

Para realizar el estudio de recobrado se pesaron 5 g D004 en un balón y se le adicionó 1 mL de la DPI, posteriormente se aplicó el proceso de saponificación y extracción para obtener el MNS, el cual se disolvió en 17 mL de cloroformo (n= 2). Se tomaron 3 viales, se adicionaron 50 µL de la DPI y se llevaron a sequedad, a uno se le añadió 0,5 mL de cloroformo y a los otros se le adicionaron 0,5 mL de cada MNS obtenido (n= 2). A las 6 muestras se les añadieron 140 µL de MSTFA, se taparon, se calentaron a 80 °C durante 1 h y se analizaron por CG-EM para obtener las respuestas (áreas) y las masas correspondientes al C20OH. Para calcular el recobrado, primero se determinaron las diferencias entre las áreas y masas obtenidas de las muestras con MNS y sin este. Esas diferencias (contenido hallado)

se dividieron entre los contenidos teóricos añadidos de C20OH y los cocientes se multiplicaron por 100 para determinar el recobrado del método.

La identificación se llevó a cabo por comparación de los espectros obtenidos con los espectros de la biblioteca Wiley-275 y con los espectros de los patrones comerciales disponibles. También se compararon las retenciones relativas obtenidas para los analitos de interés al emplear al C20OH como patrón interno (PI), con las obtenidas para los patrones comerciales. La determinación del porcentaje relativo se basó en el método del PI (n= 3), previo cálculo del recobrado del método y de los factores másicos de respuesta relativa con la DRA y la DPI.

RESULTADOS

Mediante el estudio de recobrado se determinó que el método empleado permite una recuperación de alrededor de 50 % del contenido de alcoholes grasos del D004 (tabla 1). Teniendo en cuenta el resultado anterior se realizó el análisis de los 9 lotes y se encontró que en estos las fracciones de alcoholes constituían entre 27,3 y 77,8 % del MNS, lo que representa entre 0,18 y 5,1 % del D004 (tabla 2). Como se aprecia en la figura 1, que representa un cromatograma obtenido por la técnica de extracción de iones (m/z 103), las fracciones estuvieron compuestas por alcoholes grasos entre el C22OH y el C32OH. Los alcoholes predominantes fueron los de número par de átomos de carbono, siendo el C28OH el mayoritario, seguido del C30OH y del C26OH (tabla 3). Otros alcoholes grasos detectados en algunos lotes, pero no cuantificados por aparecer en niveles de trazas (< 0,01%), fueron: C14OH, C15OH, C16OH, C18OH, C20OH y C34OH.

Tabla 1. Resultados del estudio de recobrado para el C20OH en el material no saponificable

Masa añadida de C20OH (mg)	Masa determinada (mg)/recobrado (%)		Recobrado promedio (%)	CV (%)
	Réplica 1	Réplica 2		
0,23	0,111/48,3	0,119/51,7	50,0	4,8

Tabla 2. Contenido total de alcoholes en el material no saponificable y en el D004

	Contenido de alcoholes grasos en cada lote (%)									Media (%) ± DE
	190106	20907	61206	60607	111206	230508	180406	61207	300109	
MNS	56,87	48,21	76,31	65,38	77,81	69,19	53,72	27,27	52,36	58,57 ± 15,796
D004	1,49	0,54	4,80	5,10	4,84	3,57	1,59	0,18	1,44	2,62 ± 1,960

Tabla 3. Composición de las mezclas de alcoholes presentes en los lotes evaluados de D004, datos normalizados

Alcohol	Tiempo de retención (min)	Contenido de alcoholes grasos en cada lote (%)									Media (%) ± DE
		190106	20907	61206	60607	111206	230508	180406	61207	300109	
C22OH	10,31	0,11	0,00	0,21	0,22	0,13	0,12	0,25	0,00	0,21	0,14±0,093
C23OH	11,11	0,05	0,00	0,08	0,08	0,07	0,05	0,08	0,00	0,05	0,05±0,032
C24OH	11,91	1,05	1,44	2,26	3,00	2,00	1,85	2,26	1,81	2,24	1,99±0,554
C25OH	12,71	0,16	0,00	0,38	0,38	0,36	0,29	0,25	0,00	0,32	0,24±0,151
C26OH	13,50	8,00	15,83	15,22	18,55	14,24	15,03	12,12	16,26	14,36	14,40±2,959
C27OH	14,25	1,00	5,04	1,42	1,08	1,54	1,22	0,84	3,61	1,17	1,88±1,446
C28OH	15,01	52,76	53,96	46,86	50,36	54,05	53,36	52,92	56,63	55,54	52,94±2,883
C29OH	15,75	0,84	2,16	1,42	0,84	1,21	0,78	0,88	0,00	0,85	1,00±0,581
C30OH	16,50	33,56	21,58	30,01	23,65	24,50	25,64	28,80	21,69	23,71	25,91±4,066
C32OH	18,07	2,42	0,00	2,42	1,59	1,97	1,68	2,05	0,00	1,50	1,51±0,919

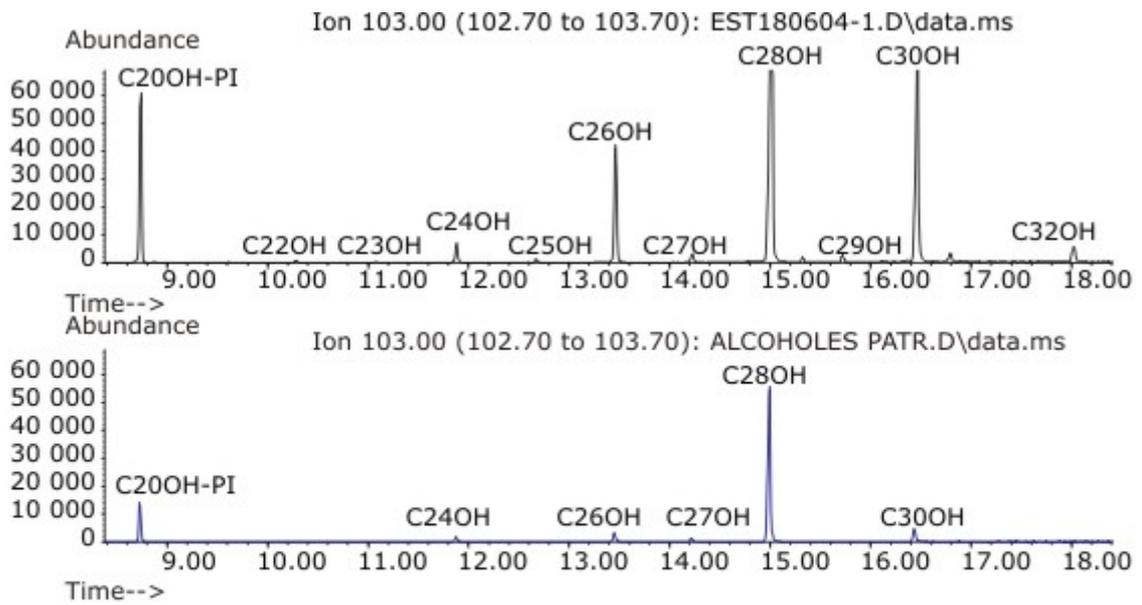


Fig. 1. Comparación de perfiles parciales por cromatografía de gases-espectrometría de masas (extracción de iones, m/z 103) del material no saponificable del D004 Lote 180406 (superior) y patrones comerciales de alcoholes (inferior).

En la figura 2, presentada como ejemplo de identificación de estos compuestos, se puede apreciar la similitud entre el espectro del C28OH hallado en el MNS del D004 y el espectro presente en la biblioteca del equipo. Las identificaciones realizadas se corroboraron además por comparación de los espectros y las retenciones relativas obtenidas con los de patrones comerciales.

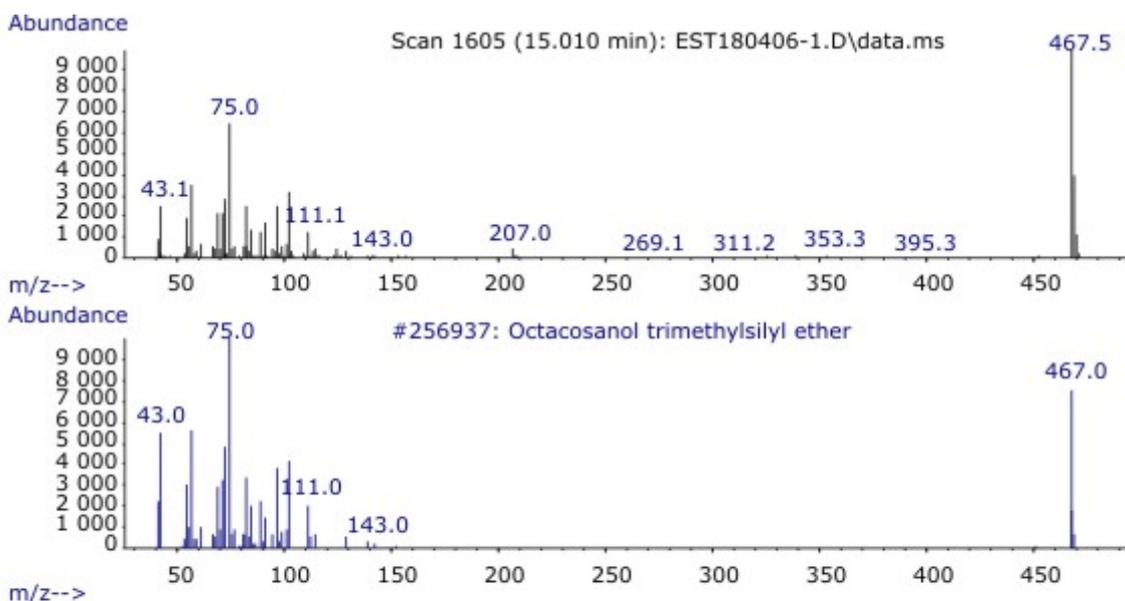


Fig. 2. Comparación del espectro del 1-octacosanol presente en el material no saponificable del D004 Lote 180406 (tr 15,01 min) con el espectro de la biblioteca WILEY del equipo de cromatografía de gases-espectrometría de masas.

DISCUSIÓN

Primeramente se decidió determinar el porcentaje de alcoholes que se recuperaba por la metodología propuesta, siendo la primera vez que se realiza este estudio con el MNS proveniente de un extracto lipídico de *R. regia*. Para esa determinación se empleó el C20OH, compuesto que ha sido utilizado como PI en el análisis de extractos de *Saw palmetto* (*Serenoa repens*),^{8,11} donde al igual que en el D004 solo ha sido detectado a niveles de trazas.

Los recobrados obtenidos no fueron elevados, lo cual pudiera deberse a que el reparto se ve afectado por la competencia de diferentes familias de compuestos con características físico-químicas similares en su afinidad por el disolvente de extracción, como los esteroides, parafinas y triterpenos. No obstante, en ocasiones no se toma esto en cuenta y se adiciona el PI al final del proceso para evaluar la composición de lo que se inyecta, se utiliza el método de normalización interna sin tener en cuenta la pérdida por manipulación u otras causas, se asume que todo lo que se inyecta se volatiliza, o se utilizan como PI compuestos con respuestas cromatográficas diferentes a la del analito de interés, todo lo cual puede traer incongruencias en los resultados cuantitativos.¹²

Como se puede apreciar en la tabla 3 y la figura 1, los alcoholes con número par de átomos de carbono fueron los predominantes en el perfil cromatográfico, principalmente el C28OH, C30OH y C26OH. Este resultado coincide con lo descrito para el extracto lipídico de *S. repens*, donde el C28OH (73 %), C30OH (16, 5 %) y C26OH (8,5 %)^{8,10-13} son también mayoritarios.^{8,10,11,13,14} Estos alcoholes, sin embargo, no han sido detectados en los MNS de otras palmáceas,^{11,15} debido quizá a que el mayor interés se le ha prestado a la fracción de esteroides. Ante este panorama se puede entender que otros alcoholes minoritarios encontrados en el D004 tampoco hayan sido reportados en otras palmáceas. Debe señalarse en este sentido que varios de los alcoholes minoritarios encontrados en el presente trabajo,

solo pudieron detectarse gracias a la elevada sensibilidad y especificidad alcanzada con la técnica de extracción de iones por espectrometría de masas, habiéndose escogido en este caso el ión con m/z 103 [CH₂=O-Si(CH₃)₃] por ser un fragmento característico y específico de los alcoholes derivatizados como trimetilsilil.

Resulta de interés señalar que el contenido medio de alcoholes encontrado (2,6 %) supera el contenido de esteroides anteriormente determinado en el D004 (0,6 %),⁹ comportamiento que no es usual en los aceites vegetales, donde en general predominan los esteroides.¹⁰⁻¹⁵ Esto pudiera deberse a varias causas, tales como las características genéticas de la especie, el empleo del fruto entero (cuya corteza pudiera contener cera) y la probable degradación de los esteroides durante las 2 etapas de saponificación a que fueron sometidos: la aplicada al aceite de *R. regia* para obtener D004¹ y la aplicada al D004 para obtener el MNS. Por otra parte, hubo una apreciable variabilidad en los contenidos de alcoholes entre los lotes estudiados, lo cual pudiera deberse a diferencias en: los estados de maduración de los frutos, las condiciones climáticas, las épocas, los años y lugares de recolección, así como a las variaciones intrínsecas de los métodos de preparación y análisis empleados.¹¹

Como resumen final se puede plantear que se identificaron y se cuantificaron por el método del patrón interno, mediante CG-EM, contenidos de alcoholes grasos en el D004 entre 0,18 y 5,10 %, de los cuales predominan el C28OH, C30OH y C26OH.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Laguna AM, Rodríguez EA, Más RM, Carbajal D, Arruzazabala ML, Molina V, et al. Extracto obtenido a partir de frutos de *Roystonea regia* utilizado contra la hiperplasia prostática y la prostatitis. La Habana, Cuba. Patente No. 5239/2007.
2. Arruzazabala ML, Carbajal D, Más R, Molina V, González V, Rodríguez E. Preventive effect of D004, a lipid extract from Cuban royal palm (*Rostoynea regia*) fruits, on testosterone induced prostate hyperplasia in intact and castrated rodents. *Drugs Exp Clin Res.* 2004;30(5-6):227-33.
3. Carbajal D, Molina V, Mas R, Arruzazabala ML. Therapeutic effect of D-004 a lipid extract from *Roystonea regia* fruits on prostate hyperplasia induced in rats. *Drugs Exp Clin Res.* 2005;31(5-6):193-7.
4. Pérez Y, Menéndez R, Más R. *In vitro* effect of D004, a lipid extract of the fruit of the Cuban Royal palm (*R. regia*), on prostate steroid 5 α -reductase activity. *Curr Ther Res.* 2006;67(6):396-405.
5. Menéndez R, Más R, Pérez Y, González RM. *In vitro* effect of D004, a lipid extract of the ground fruits of the Cuban royal palm (*R. regia*), on rat microsomal lipid peroxidation. *Phytother Res.* 2007;21(1):89-95.
6. Pérez Y, Molina V, Mas R, Menéndez R, González RM, Oyarzábal A, et al. Ex vivo antioxidant effects of D004, a lipid extract from *R. regia* fruits, on rat prostate tissue. *Asian J Androl.* 2008;10(4):659-66.
7. Menéndez R, Carbajal D, Más R, Pérez Y, Molina V, Arruzazabala ML, et al. Efecto del D-004, extracto lipídico de los frutos de la palma real (*R. regia*), sobre el

granuloma inducido por algodón en ratas y sobre la lipooxigenasa presente en leucocitos polimorfonucleares. Lat J Pharm. 2006;25(2):213-8.

8. The United States Pharmacopoeia 27 and National Formulary 22 (USP27-NF22), Supplement 1 [CD-ROM]. Washington: The United States Pharmacopoeial Convention, Inc; 2004.

9. Marrero Delange D, Rodríguez Leyes EA, González Canavaciolo VL, Adames Y, Vicente Murillo R. Determinación de esteroides en el ingrediente activo D-004 por CG-EM. Rev CENIC Ciencias Químicas. 2010;41(Número Especial).

10. Institute for Nutraceutical Advancements. INA method 109.001. Sterols content in Saw palmetto by gas chromatography [citado May 2005]. Disponible en: <http://www.nsf.org/business/ina/sterols.asp?program=INA>

11. Bruneton J. Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas medicinales. 2 ed. Zaragoza (España): Editorial ACRIBIA S.A.; 2001. p. 163-4.

12. WHO. Fructus Serenoae Repentis. World Health Organization Monographs on Selected Medicinal Plants, vol. 2. Geneva: World Health Organization; 2002. p. 285-99.

13. Cristoni A, Morazoni P, Bombardelli E. Chemical and pharmacological study on hypercritical CO₂ extracts of *Serenoa repens* fruits. Fitoterapia. 1997;68(4):355-8.

14. Gee PT. Analytical characteristics of crude and refined palm oil and fractions. Eur J Lipid Sci Technol. 2007;109:373-9.

15. Christie WW. Gas chromatography and lipids, a practical guide. AYR, Scotland: The Oily Press; 1989.

Recibido: 9 de junio de 2011.

Aprobado: 28 de octubre de 2011.

David Marrero Delange. Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC). Calle 198 entre 19 y 21, Atabey, municipio Playa, AP 6414. La Habana, Cuba. Correo electrónico: david.marrero@cnic.edu.cu