

Determinación de los compuestos polares presentes en el OLEOZON[®]

Oscar Ledea, Mayhery Escobar, Aristides Rosado*, Teresa Correa*, Daniel Jardines y Jesús Molerio

Centro de Investigaciones del Ozono, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, AP 6412 ó 6414, Ciudad de La Habana, Cuba y *Departamento de Química Analítica, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, AP 6412 ó 6414, Ciudad de La Habana, Cuba

Recibido: 23 de marzo del 2000

Aceptado: 12 de julio del 2000

Palabras clave: OLEOZON[®], ozono, cromatografía de gases, espectrometría de masas, extracción líquido-líquido
Key words: OLEOZON[®], ozone, gas chromatography, mass spectrometry, liquid-liquid extraction

RESUMEN. En este trabajo se desarrolla una metodología para la identificación y cuantificación de los compuestos más polares presentes en el OLEOZON[®]. Los análisis se realizaron por combinación de la extracción líquido-líquido con las técnicas de cromatografía de gases (CG) y cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM). La fracción polar del OLEOZON[®] resultó estar compuesta fundamentalmente por aldehídos y ácidos carboxílicos (saturados e insaturados), siendo el hexanal, el nonanal y el 3-nonenal los compuestos mayoritarios de dicha fracción. Se encontró que las concentraciones de los aldehídos eran un orden mayor que la de los ácidos carboxílicos correspondientes. El método de análisis empleado resultó lineal en un intervalo de concentraciones de 0,01–0,1 mol/L para los aldehídos y de 0,001–0,01 mol/L para los ácidos, con un coeficiente de correlación mayor de 0,999 para todos los compuestos estudiados. Los valores de recobrados obtenidos en el estudio de exactitud del método fueron superiores al 90 % para todos los aldehídos y los ácidos carboxílicos estudiados. Los coeficientes de variación obtenidos en el estudio de repetibilidad fueron inferiores al 2 % para todos los compuestos. El límite de detección tanto para los aldehídos como para los ácidos carboxílicos fue de 10^{-6} mol/L, varios órdenes menor que el valor de las concentraciones de estos compuestos en la muestra real (10^{-3} – 10^{-1} mol/L). El método analítico empleado es lineal, exacto, preciso y sensible en las condiciones de análisis estudiadas además de permitir la identificación de los compuestos presentes en la fracción polar del OLEOZON[®].

ABSTRACT. The components of the polar fraction of OLEOZON[®] were identified and quantified by a combination of a liquid-liquid extraction method with gas chromatographic (GC) and gas chromatographic-mass spectrometry techniques (GC-MS). Saturated and unsaturated aldehydes and carboxylic acids were the main products found. Hexanal, nonanal and 3-nonenal were the main components of the polar fraction of OLEOZON[®]. The aldehyde concentration was an order higher than the respective carboxylic acid. Good linearity was proven within the concentration range from 0.01 to 0.1 mol/L for aldehydes and from 0.001 to 0.01 mol/L for carboxylic acids, according to the values of the correlation coefficient (> 0.999) for all the studied compounds. The values of recovery obtained in the accuracy assay were higher than 90 % for all the aldehydes and carboxylic acids assayed. The variation coefficients from the repeatability study were lower than 2 % for all the studied compounds. The detection limit for both kind of compounds was in the same order (10^{-6} mol/L) and some orders lower than the concentration of the aldehydes and carboxylic acids in the real sample (10^{-3} – 10^{-1} mol/L). The analytical method employed was lineal, accurate, precise and sensible under the studied conditions and allowed the identification of the different compounds present in the polar fraction of OLEOZON[®].

INTRODUCCION

El OLEOZON[®] es un medicamento obtenido a partir de la ozonización del aceite de girasol. Este producto farmacéutico se presenta como un líquido oleoso, algo viscoso, de color amarillo claro y de olor característico. En cuanto a su composición se plantea que es una mezcla compleja, fundamentalmente formada por triglicéridos insaturados, triglicéridos modificados con funciones ácidas o aldehídicas, compuestos carbonílicos, compuestos carboxílicos y compuestos peroxídicos en forma de emulsión.¹

Los compuestos peroxídicos, como los ozónidos y peróxidos, tienen un marcado poder germicida, de aquí que el OLEOZON[®] sea un producto muy útil en la cura de afecciones de etiología infecciosa.^{2,3} El análisis de este medicamento, requiere de un fraccionamiento previo debido a su composición heterogénea, ya que está formado por una mezcla de compuestos. La extracción con un solvente polar como el metanol permite separar del OLEOZON[®] aquellos compuestos polares y de polaridad intermedia.

El análisis de los compuestos polares, presentes en el OLEOZON[®], se ha realizado por diferentes técnicas cromatográficas, como purgamiento gaseoso con trampa fría o purgamiento gaseoso con adsorción sobre un polímero poroso; con un posterior análisis por cromatografía de gases. El análisis por estas técnicas arrojó que la fracción polar está compuesta principalmente por aldehídos y ácidos carboxílicos con longitud de cadena de tres y nueve átomos de carbono.^{1,4}

Por otra parte, Aparicio y Morales⁵ determinaron por combinación del purgamiento gaseoso con la cromatografía de gases (PG-CG), que los aldehídos con hasta nueve átomos de carbono son los principales componentes de la fracción volátil de los aceites vegetales oxidados y que el hexanal y distintos isómeros del hexenal son los que más aportan al aroma de dichos aceites. Malcolmson y col.⁶ utilizaron una combinación similar para caracterizar la fracción volátil de diferentes calidades de aceite de Canola y encontraron que la misma está formada por aldehídos saturados e insaturados de cadena con entre 3 y 10 átomos de carbono.

Stashenko y col.⁷ utilizaron dos métodos de extracción (líquido-líquido y líquido-sólido) y cuatro detectores cromatográficos diferentes (detector de captura electrónica, de nitrógeno-fósforo, de ionización de llama y de espectrometría de masas) para analizar los compuestos carbonílicos presentes en varios aceites vegetales calentados (aceite de girasol, maíz y palma), encontrando aldehídos saturados (C1-C11), acetona, acroleína, isopentanal, crotonaldehído y aldehídos insaturados (2-hexenal, 2-octenal y 2-nonenal).

Los ácidos carboxílicos como el hexanoico y el nonanoico se encuentran formando parte de las fracciones volátiles de distintos alimentos, aceites esenciales y sustancias vegetales, sin embargo, los mismos no son detectados por los métodos de PG-CG al no ser retenidos por los polímeros porosos más comúnmente empleados en estas técnicas (Tenax GC o TA, Porapak, entre otros).^{5, 8, 9}

Este trabajo tiene como objetivo el establecimiento de una metodología de análisis cromatográfico para la identificación y cuantificación de los compuestos polares presentes en el OLEOZON®. Esta metodología, una vez establecida, puede ser utilizada tanto para obtener una mayor información fundamental del producto como para el control del proceso de producción del medicamento o su control de calidad.

MATERIALES Y METODOS

Reactivos y solventes

Los solventes empleados: acetato de etilo, éter etílico, metanol, acetona

y acetonitrilo son de grado analítico y provienen de la BDH (Inglaterra). El etanol utilizado es de producción nacional y se destiló previamente a su uso.

El aceite de girasol utilizado para la producción del OLEOZON® y para la preparación de la matriz sintética es de calidad comestible y fue suministrado por Agustín Roig S.A. (Tarra-gona, España).

Los aldehídos patrones: hexanal, octanal y nonanal (> 98 %) y el sulfato de sodio anhidro provienen de la Merck (Alemania), mientras que los ácidos carboxílicos utilizados: ácido hexanoico, ácido octanoico y ácido nonanoico (> 99 %) fueron suministrados por la SIGMA (USA).

Equipos

La identificación de los componentes de la fracción polar del OLEOZON® se realizó utilizando un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas de la serie AUTOMASS y a una computadora Dell 433 DX con una base de datos de 55 000 espectros de masas provenientes de la firma UNICAM (Inglaterra).¹⁰ Para el análisis cromatográfico, se utilizó una Columna FFAP con una longitud de 30 m, un diámetro interno de 0,32 mm y un espesor de la fase estacionaria de 0,25 µm con el siguiente gradiente de temperaturas: T_{col} = 40 °C (1 min) – 100 °C a 4 °C/min – 220 °C a 8 °C/min y 5 min isotérmico a la temperatura final. El flujo del gas portador (Helio) fue de 1 mL/min con una presión de 4 bar. El inyector y el detector se calentaron hasta 280 y 250 °C, respectivamente. El volumen de inyección fue de 1 µL y se empleó el modo *splitless* (30 s) con una relación de *split*: 20:1. Como condiciones del detector cuadrupolar, se fijó el rango de masas a monitorear entre 30 y 400 Dalton y la energía de los electrones, en 70 eV. Las temperaturas de la interface y de la fuente se fijaron en 240 y 250 °C, respectivamente.

La cuantificación de los compuestos presentes se realizó utilizando un cromatógrafo de gases de la serie 610 con inyector del tipo "*split-splitless*" y detector de ionización por llama, acoplado a una computadora, provenientes de la firma UNICAM. Se utilizaron las mismas condiciones cromatográficas que en el análisis por CG-EM.

Preparación de la muestra de OLEOZON® y de la matriz sintética

De cada uno de los 10 lotes consecutivos de OLEOZON® seleccionados, se tomaron 60 mL que se mezclaron para conformar la muestra de análisis adicionándole por cada 5 mL de esta mezcla 0,0400 g y 0,0090 g de los patrones internos octanal y ácido octanoico, respectivamente. La muestra se conservó a 4 °C hasta su posterior análisis.

La matriz sintética se conformó a partir del aceite de girasol utilizado como materia prima, adicionándole cantidades conocidas de los compuestos identificados en la matriz real y disponibles en el laboratorio (hexanal, nonanal, ácido hexanoico, ácido nonanoico) y los patrones internos octanal y ácido octanoico.

Selección del solvente

Se probaron cuatro solventes (acetona, etanol, metanol y acetonitrilo) teniendo en cuenta sus constantes de polaridad según el criterio de Snyder. En un tubo de ensayos se adiciona 1 mL del solvente a ensayar al cual se le añaden; con una microjeringuilla, pequeños volúmenes de una matriz sintética formada por aceite de girasol y cantidades conocidas de octanal (0,0102 g/mL) y ácido octanoico (0,0018 g/mL), el tubo se agita homogéneamente durante 5 min. Transcurrido este tiempo, se comprueba visualmente la permanencia de las dos fases y se analiza el extracto por CG con detección de ionización de llama. El solvente a seleccionar debe extraer los compuestos polares presentes en el OLEOZON® y no debe disolver los triglicéridos que componen el aceite de girasol.

Diseño experimental

El análisis de la influencia de dos factores experimentales que inciden en la extracción líquido-líquido, se realizó aplicando el siguiente diseño factorial (2²) tanto a la matriz sintética como a la muestra de OLEOZON® (Tabla 1).

Tabla 1. Parámetros de la matriz experimental

X ₁	X ₂
-1 (1:4 v/v)	-1 (3 min.)
1 (1:8 v/v)	-1
-1	1 (5 min.)
1	1

donde:

X₁ Relación de volúmenes entre la muestra y el solvente utilizado en la extracción.

X₂ Tiempo de extracción.

Para cada análisis se utilizó 0,5 mL de muestra. La variable respuesta del diseño fue el recobrado de todas las sustancias disponibles (6) y se realizaron duplicados de cada punto experimental del diseño. En cada corrida experimental se analizó una muestra "blanco" de aceite de girasol. El análisis de los resultados obtenidos se realizó utilizando el programa estadístico StatGraphics Plus.¹¹

Para el estudio del OLEOZON[®] se adicionaron cantidades conocidas de octanal (0,0509 g) y ácido octanoico (0,0092 g) a 5 mL del medicamento. Se toman 0,5 mL de esta muestra para cada análisis. La variable de respuesta del diseño (Y_n) fue el recobrado de ambas sustancias y se realizaron duplicados de cada punto experimental del diseño para el análisis de los resultados obtenidos fue también con el uso del programa estadístico StatGraphics Plus.¹¹

Procedimiento para el análisis de las distintas muestras

Se adicionan 0,5 mL de la muestra (OLEOZON[®] o matriz sintética) a un tubo de ensayos de 15 mL de capacidad, al que se le adiciona el solvente de extracción en una relación de 1:8 en volumen. Se agita la muestra durante 5 min en un vortex-mixer, se deja en reposo 1 min, se retira el solvente a otro tubo de ensayo (previamente rotulado) y se adiciona otra porción fresca de metanol (4 mL). Este procedimiento se repite tres veces colectando los extractos en el mismo tubo de ensayos, la solución metanólica se seca por adición de sulfato de sodio anhidro. Se efectúa una primera inyección del extracto en el cromatógrafo de gases y en el CG-EM para la determinación de los aldehídos y la identificación de los compuestos presentes. Posteriormente se evapora el metanol por purgamiento con nitrógeno gaseoso y el residuo se redissuelve en éter etílico para la metilación con diazometano. A continuación se realiza la determinación, por ambas técnicas, de los ácidos carboxílicos en forma de sus correspondientes ésteres metílicos.⁴

Determinación de la concentración de los componentes analizados

La cuantificación de los compuestos se realizó utilizando los métodos del estándar interno y la curva de calibración. Para la construcción de las curvas de calibración, se prepararon soluciones patrones de hexanal, octanal, nonanal, ácido hexanoico, octanoico y nonanoico en el intervalo de concentración de 10⁻⁴ a 10⁻² mol/L.

Los factores de respuesta cromatográficos se determinaron experimentalmente preparando soluciones de igual concentración de los analitos y el patrón correspondiente (0,1 mol/L) y analizándolas por cromatografía de gases en seis ocasiones con el correspondiente análisis estadístico. La expresión utilizada para el cálculo de este parámetro fue:

$$f = A_p \cdot C_a / A_a \cdot C_p$$

La concentración de los analitos en la muestra real se determinó utilizando la siguiente expresión:

$$C_a = A_a / A_p \cdot C_p \cdot f \cdot r_a$$

donde:

C_a - Concentración del analito

A_a - Área del analito en el cromatograma

A_p - Área del patrón en el cromatograma

C_p - Concentración del patrón

f - Factor de respuesta cromatográfico

r_a - Recobrado del analito

El cálculo de la concentración de los analitos que no se disponían se determinó considerando el factor de respuesta igual a la unidad y asumiendo que su recobrado es igual al del patrón correspondiente.

Linealidad

Se prepararon matrices similares al OLEOZON[®], a partir del aceite de girasol, adicionando cantidades crecientes de los compuestos analizados en un intervalo de concentración de 10⁻² a 10⁻¹ mol/L para los aldehídos y de 10⁻³ a 10⁻² para los ácidos carboxílicos. Se calculó la ecuación de regresión por el método de mínimos cuadrados. Se aplicaron pruebas de proporcionalidad y de significación estadística de "a". Como criterios de linealidad se consideraron los coeficientes de correlación (r > 0,99) y que el cero quedara incluido dentro del intervalo de confianza del intercepto

(IC). Calculado según:

IC = a ± t DE_a, donde DE_a es la desviación estándar del intercepto y t es el valor tabulado para p = 0,05.^{12, 13}

Exactitud

La exactitud del método se determinó por el recobrado de acuerdo con la expresión siguiente:

$$R = \text{moles extraídos} / \text{moles adicionados} \times 100 \%$$

Se calculó la ecuación de regresión por el método de mínimos cuadrados, de los moles extraídos en función de los moles adicionados y calculando el R correspondiente a cada punto, se procedió a la comparación de las varianzas de los cinco puntos de la recta mediante la prueba G de Cochran para p = 0,05.^{12, 13}

Precisión (repetitividad y reproducibilidad)

Repetitividad: Se realizaron 10 réplicas en la misma sesión de trabajo de la extracción de los compuestos analizados a la matriz sintética del OLEOZON[®]. Se procesaron los resultados obtenidos estadísticamente calculando: la media aritmética, la desviación estándar (DE), el coeficiente de variación (CV < 2 %) y el intervalo de confianza.^{12, 13}

Reproducibilidad: Se realizaron 5 determinaciones a la matriz sintética del OLEOZON[®] durante dos días consecutivos. Los resultados se procesaron estadísticamente y se determinó la media aritmética, la desviación estándar, el coeficiente de variación y el intervalo de confianza para cada día de trabajo. Se aplicaron las pruebas de Fisher y de Student para determinar si las medias y las varianzas de ambos días eran homogéneas entre sí para p = 0,05.^{12, 13}

Límite de detección

Este parámetro se determinó realizando el análisis repetido del blanco de la muestra (n = 10) y utilizando la siguiente expresión.¹³

$$LD = (Y_{bl} + 3 DE_{bl}) / b$$

donde:

LD - Límite de detección

Y_{bl} - Valor medio de la respuesta de los n-blancos

DE - Desviación estándar de la respuesta

b - Pendiente de la recta de calibración

RESULTADOS Y DISCUSION

Selección del solvente

Se realizó un estudio preliminar para determinar, en iguales condiciones de extracción, cuál de los solventes empleados era el mejor. Los resultados (Tabla 2) mostraron que de los cuatro solventes ensayados, el metanol es el que muestra los mejores resultados; al extraer las mayores cantidades de los compuestos polares que formaban la matriz sintética.

De igual forma, si se compara el metanol con los otros solventes ensayados, vemos que después de la acetona es el de menor punto de ebullición, aspecto que hay que tener en cuenta al ser necesaria la concentración de la muestra para su análisis.

Diseño experimental

Una vez seleccionado el solvente a emplear, se realizó un diseño experimental, para estudiar la tendencia de los resultados al variar los parámetros que pueden afectar los valores del recobrado para cada compuesto. A continuación se muestran los resultados de este diseño para el análisis de la matriz sintética del OLEOZON[®], por las técnicas de extracción líquido-líquido y cromatografía de gases. En él se evalúa la influencia de la relación de volúmenes entre la muestra y el solvente de extracción y el tiempo de extracción, manteniendo constante el

Tabla 2. Selección del solvente para la extracción

Solventes	Acetona	Metanol	Etanol	Acetonitrilo
Temperatura de ebullición (°C)	56,20	65,00	78,50	81,60
Polaridad (Snyder)	5,40	6,60	5,20	6,20
Recobrado de octanal (%)	14,97	25,49	12,83	20,99
Recobrado del ácido octanoico (%)	13,68	25,98	13,56	21,77

resto de los parámetros (número de extracciones = 3 y el solvente extrayente: metanol). El análisis estadístico del diseño arrojó los siguientes resultados:

$$Y_1 (\text{hexanal}) = 83,30 + 7,16 X_1$$

$$Y_2 (\text{octanal}) = 90,83 + 4,67 X_1$$

$$Y_3 (\text{nonanal}) = 88,40 + 4,05 X_1$$

$$Y_4 (\text{ácido hexanoico}) = 92,30$$

$$Y_5 (\text{ácido octanoico}) = 95,85$$

$$Y_6 (\text{ácido nonanoico}) = 95,44$$

De estos resultados se observa que para el caso de los aldehídos; sólo influye significativamente en el recobrado, la variable relación de volúmenes, mientras que en la extracción de los ácidos no influye significativamente ninguna de las variables estudiadas. Este resultado puede explicarse si se tiene en cuenta que la concentración de los aldehídos en la matriz es mucho mayor que la de los ácidos y además que la solubilidad en metanol, de los ácidos carboxílicos es mayor que la de sus respectivos aldehídos. La mayor

relación de volúmenes, favoreció los recobrados de todos los aldehídos ensayados.

Una vez realizado el diseño experimental en la matriz sintética, se realizó un diseño similar en la muestra real, pero con adición al OLEOZON[®], de las mismas cantidades de los patrones (octanal y ácido octanoico) que se utilizaron en la matriz sintética. Esto se realizó con el objetivo de analizar la posible interferencia, en la extracción líquido-líquido, de otros compuestos presentes en el OLEOZON[®] y que no forman parte de la matriz sintética.

De la comparación de los resultados obtenidos en el cálculo de las concentraciones de los patrones internos (Tabla 3) tanto en la matriz sintética del OLEOZON[®] como en la muestra real se puede afirmar que no existen diferencias en el comportamiento de estos compuestos en las diferentes matrices. Por lo que los resultados obtenidos con la matriz sintética son extrapolables a la muestra real del OLEOZON[®].

Tabla 3. Comparación estadística entre la muestra real y la matriz sintética del OLEOZON[®]

	Octanal en OLEOZON [®] Concentración extraída (x 10 ³ mol/L)	Octanal en la matriz (x 10 ³ mol/L)	Acido octanoico en OLEOZON [®] Concentración extraída (x 10 ⁴ mol/L)	Acido octanoico en la matriz (x 10 ⁴ mol/L)
1	2,59	2,55	4,33	4,29
2	2,57	2,56	4,29	4,34
3	2,55	2,58	4,34	4,35
4	2,55	2,54	4,31	4,29
5	2,55	2,56	4,28	4,32
Media	2,56	2,56	4,31	4,32
DE (x 10 ⁵)	1,73	1,48	0,26	0,29
CV(%)	0,68	0,58	0,62	0,68
F _{exp}	1,37		1,24	
F _{tab}	6,39		6,39	
	F _{exp} < F _{tab}		F _{exp} < F _{tab}	
t _{exp}	0,17		0,48	
t _{tab}	1,86		1,86	
	t _{exp} < t _{tab}		t _{exp} < t _{tab}	

Análisis cualitativo y cuantitativo

El análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM) permitió la identificación de diez de los doce compuestos obtenidos (Fig. 1) incluyendo los patrones internos utilizados.

La presencia de los aldehídos: hexanal, nonanal, 3-nonenal y los ácidos: hexanoico, nonanoico y 3-nonenoico puede explicarse teniendo en cuenta el mecanismo de Criegee para la ozonización de olefinas.¹⁴ El hexanal y el ácido hexanoico se forman de la reacción del ozono con el doble enlace del ácido linoleico, ubicado entre las posiciones 12 y 13 de la cadena carbonada, mientras que el 3-nonenal y el ácido 3-nonenoico se forman de la reacción con el otro doble enlace del mismo ácido graso (ubicado en la posición 9 y 10 de la cadena carbonada).

De forma similar, el nonanal y el ácido nonanoico se obtienen de la reacción del ozono con el ácido oleico que también está presente en los triglicéridos del aceite de girasol. El ácido oleico presenta una sola insaturación entre las posiciones 9 y 10 de la cadena carbonada.

La presencia en el extracto de los aldehídos: heptanal y 2-nonenal, pudiera explicarse teniendo en cuenta que los aceites vegetales pueden sufrir procesos de autooxidación dando lugar a la formación de este tipo de compuestos. Sin embargo, al analizar el blanco del aceite de girasol, utilizado para la producción del OLEOZON[®], no se detectaron estos aldehídos. Esta aparente contradicción pudiera tener explicación si se considera que estos compuestos pueden formarse también por la descomposición térmica de las distintas especies peroxídicas obtenidas en la ozonización o suponiendo que estos compuestos peroxídicos son capaces de iniciar y acelerar la autooxidación de los triglicéridos insaturados incrementándose la concentración de estas especies en el OLEOZON[®] hasta niveles tales que permitan su detección por el método de análisis utilizado. Esto último está en concordancia con lo planteado por Pryor y col.¹⁵ que demostraron la capacidad de los ozónidos y otras especies peroxídicas de iniciar la autooxidación del linoleato de metilo.

La identificación de los isómeros de posición 3-nonenal y 2-nonenal que coeluyen en un mismo pico cromato-

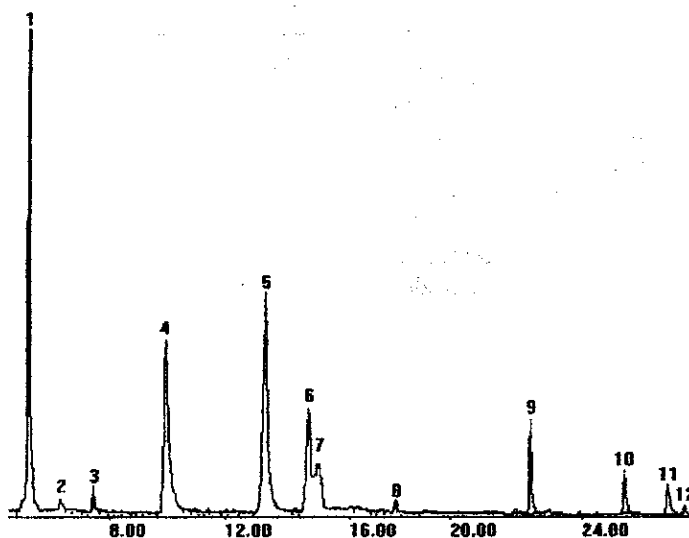


Fig. 1. Cromatograma obtenido por CG-EM de un extracto metanólico del OLEOZON[®]

1) hexanal, 2) no identificado, 3) heptanal, 4) octanal, 5) nonanal, 6) 3-nonenal, 7) 2-nonenal, 8) no identificado, 9) ácido hexanoico, 10) ácido octanoico, 11) ácido nonanoico, 12) ácido 3-nonenoico

grafico, se pudo realizar gracias a la espectrometría de masas, teniendo en cuenta los iones característicos de cada compuesto (2-nonenal: m/z 68, 80 y 3-nonenal: m/z 69, 84). Otra explicación de la presencia del 2-nonenal; es teniendo en cuenta el equilibrio aldo-enólico del 3-nonenal, el cual se estabiliza por la formación, en la forma enólica de una estructura 1,3 butadieno, la cual a su vez puede encontrarse en equilibrio con la estructura mesomérica $\alpha \beta$ insaturada del 2-nonenal.

Por otra parte, al analizar las concentraciones de los compuestos extraídos (Tabla 4), se observa que los aldehídos: hexanal, nonanal, y 3-nonenal son los compuestos mayoritarios en la muestra, decreciendo sus concentraciones en ese mismo orden. Se observa que los valores de concentración de los ácidos carboxílicos son un orden inferior que los determinados para los aldehídos correspondientes, manteniéndose la disminución de los valores de sus concentraciones al pasar del ácido hexanoico, al nonanoico, al 3-nonenoico.

Tabla 4. Composición del extracto metanólico del OLEOZON[®]

Compuestos	Concentración media (mol/L)	DE ($\times 10^4$)	CV (%)
Hexanal	0,1580	14,34	0,90
NI	0,0025	0,35	1,42
Heptanal	0,0027	0,12	0,44
Acido hexanoico m. e.	0,0260	4,94	1,88
Octanal	0,0770	11,67	1,51
Acido octanoico m. e.	0,0127	0,95	0,74
Nonanal	0,1120	19,68	1,75
3-nonenal + 2-nonenal	0,1132	6,62	1,59
Acido nonanoico m. e.	0,0115	0,88	0,77
Acido 3-nonenoico			
+ ácido 2-nonenoico m. e.	0,0053	0,50	0,94
NI	0,0015	0,15	1,01

Nota: Se consideró para el cálculo de la concentración, de los compuestos no adicionados a la matriz sintética y no identificados (NI), que el factor de respuesta es igual a uno y el recobrado igual al del patrón correspondiente. Los ácidos carboxílicos presentes se determinaron como sus ésteres metílicos (m.e.)

Linealidad y exactitud

En el estudio de linealidad (Tabla 5) se observó que todos los compuestos en el intervalo estudiado presentan un comportamiento lineal, con valores de coeficiente de correlación muy cercanos a la unidad. El cero en todos los casos se encuentra incluido dentro del intervalo de confianza del intercepto, por lo que se concluyó que el método, además de ser lineal en el intervalo estudiado, no presenta sesgo.

La extracción líquido-líquido con metanol permitió obtener altos valores de recobrado (R %), por encima del 90 %, para todos los compuestos (Tabla 6). Los valores del coeficiente de variación (CV) obtenidos se encuentran por debajo del 2 % que es el límite máximo permitido en el análisis de compuestos que no están en el orden de las trazas. Los valores experimentales para G resultaron en todos los casos menores que el valor tabulado (0,7457 para p = 0,05), lo que evidencia que la concentración de los analitos no influye en la variabilidad de los resultados.

Precisión (repetitividad y reproducibilidad)

Los resultados del estudio de la repetitividad (Tabla 7) muestran que el valor del CV para todos los compuestos analizados es inferior al 2 % para p = 0,05.

Tabla 5. Ecuaciones de regresión y parámetros de linealidad

Compuesto	Ecuación	r	IC
Hexanal	$Y = -0,45882 + 43012,4x$	0,9999	-5,65 a 4,73
Octanal	$Y = -0,14027 + 61104,9x$	0,9998	-6,64 a 6,36
Nonanal	$Y = -0,80954 + 61354,5x$	0,9999	-5,47 a 3,89
Acido hexanoico m.e.	$Y = 0,20489 + 32166,1x$	0,9999	-0,34 a 0,75
Acido octanoico m.e.	$Y = 0,13765 + 38068,8x$	0,9998	-0,81 a 1,08
Acido nonanoico m.e.	$Y = 0,00547 + 33712,6x$	0,9996	-0,89 a 0,70

Tabla 6. Exactitud del método de determinación

Compuesto	R (%)	CV	t _{exp}	G _{exp}
Hexanal	90,5	0,95	0,733	0,5788
Octanal	96,4	1,02	0,088	0,4237
Nonanal	92,5	1,14	0,655	0,4353
Acido hexanoico m.e.	92,7	1,15	0,686	0,6992
Acido octanoico m.e.	96,1	0,99	0,754	0,6148
Acido nonanoico m.e.	95,3	0,98	0,852	0,6958

n = 10

Los valores calculados en la prueba de Fisher (Tablas 8 y 9), del estudio de reproducibilidad, resultaron menores que el valor tabulado para cuatro grados de libertad. Al comparar los valores de concentración media con ayuda de la prueba de Student se encontró que no existen diferencias significativas entre éstas al ser el valor de t_{ext}, para todos los casos, menor que la t_{tab} para n = 8 y p = 0,05. Todo

esto demuestra que el método empleado es preciso.

Límite de detección

Todos los valores del límite de detección del método (Tabla 10), para todos los compuestos estudiados, se encuentran en el mismo orden de concentración (x 10⁻⁶ mol/L), el cual es varios ordenes inferior al valor de las concentraciones de estos compuestos en la muestra real.

Tabla 7. Repetitividad del método

Compuesto	Hexanal	Octanal	Nonanal	Acido hexanoico m.e.	Acido octanoico m.e.	Acido nonanoico m.e.
Concentraciones adicionadas (x 10 ³ mol/L)						
	3,73	2,68	1,83	0,60	0,45	0,29
Concentraciones extraídas (x 10 ³ mol/L)						
1	3,41	2,55	1,68	0,55	0,43	0,28
2	3,41	2,56	1,72	0,55	0,43	0,28
3	3,42	2,56	1,70	0,56	0,43	0,28
4	3,37	2,56	1,69	0,56	0,44	0,28
5	3,38	2,58	1,69	0,56	0,43	0,27
6	3,37	2,54	1,67	0,55	0,43	0,28
7	3,36	2,58	1,69	0,55	0,43	0,27
8	3,40	2,56	1,71	0,56	0,44	0,28
9	3,39	2,55	1,69	0,56	0,43	0,28
10	3,35	2,55	1,67	0,56	0,43	0,28
Media	3,39	2,56	1,69	0,56	0,43	0,28
CV (%)	0,72	0,48	0,83	0,80	0,71	0,84

Tabla 8. Reproducibilidad entre días de los aldehídos en matriz sintética

Compuesto	Hexanal		Octanal		Nonanal	
	3,73		2,68		1,83	
			Concentración añadida ($\times 10^3$ mol/L)			
			Concentración extraída ($\times 10^3$ mol/L)			
Réplicas	Día 1	Día 2	Día 1	Día 2	Día 1	Día 2
1	3,38	3,41	2,55	2,57	1,68	1,69
2	3,37	3,38	2,56	2,58	1,69	1,70
3	3,36	3,40	2,56	2,57	1,69	1,67
4	3,40	3,41	2,56	2,56	1,67	1,67
5	3,35	3,33	2,56	2,56	1,69	1,69
Conc. media ($\times 10^3$)	3,37	3,39	2,56	2,57	1,68	1,69
DE ($\times 10^5$)	2,14	0,34	4,90	8,60	7,10	1,45
CV (%)	0,64	0,99	0,19	0,34	0,42	0,86
F _{exp}	2,42		3,06		4,21	
F _{tab}	6,39		6,39		6,39	
	F _{exp} < F _{tab}		F _{exp} < F _{tab}		F _{exp} < F _{tab}	
t _{exp}	0,66		1,56		0,32	
t _{tab}	1,86		1,86		1,86	
	t _{exp} < t _{tab}		exp < t _{tab}		t _{exp} < t _{tab}	
IC ($\times 10^3$)	3,32 a 3,45		2,55 a 2,58		1,66 a 1,71	

Tabla 9. Reproducibilidad entre días de los ácidos carboxílicos en matriz sintética

Compuesto	Acido hexanoico m.e.		Acido octanoico m.e.		Acido nonanoico m.e.	
	6,01		4,51		2,91	
			Concentración añadida ($\times 10^4$ mol/L)			
			Concentración extraída ($\times 10^4$ mol/L)			
Réplicas	Día 1	Día 2	Día 1	Día 2	Día 1	Día 2
1	5,55	5,50	4,33	4,36	2,76	2,74
2	5,50	5,63	4,29	4,28	2,77	2,79
3	5,57	5,56	4,34	4,37	2,74	2,80
4	5,52	5,50	4,30	4,35	2,78	2,79
5	5,55	5,54	4,29	4,36	2,74	2,77
Conc. media ($\times 10^4$)	5,54	5,55	4,31	4,34	2,76	2,78
DE ($\times 10^5$)	0,28	0,55	0,25	0,35	0,17	0,23
CV (%)	0,51	0,99	0,58	0,82	0,61	0,82
F _{exp}	3,78		1,99		1,85	
F _{tab}	6,39		6,39		6,39	
	F _{exp} < F _{tab}		F _{exp} < F _{tab}		F _{exp} < F _{tab}	
t _{exp}	0,28		1,58		1,50	
t _{tab}	1,86		1,86		1,86	
	t _{exp} < t _{tab}		t _{exp} < t _{tab}		t _{exp} < t _{tab}	
IC ($\times 10^3$)	5,48 a 5,59		4,28 a 4,41		2,74 a 2,82	

Tabla 10. Límite de detección de los compuestos estudiados

Compuesto	Hexanal	Octanal	Nonanal	Acido hexanoico	Acido octanoico	Acido nonanoico
LD ($\times 10^6$ mol/L)	9,07	9,57	9,23	9,27	9,61	9,53

CONCLUSIONES

La combinación de las técnicas de extracción líquido-líquido y cromatografía de gases permitió la identificación y la cuantificación de los compuestos presentes en la fracción polar del OLEOZON®. Dicha fracción resultó estar compuesta fundamentalmente por aldehídos y ácidos carboxílicos, tanto saturados como insaturados, siendo el hexanal, el nonanal y el 3-nonenal los compuestos mayoritarios.

El método utilizado es un método de análisis cuantitativo simple que posee las características de precisión, exactitud, linealidad y límites de detección aceptables para la cuantificación de los compuestos polares presentes en el OLEOZON®. Todas estas propiedades hacen posible la utilización del método tanto en investigaciones básicas sobre el producto como en el control de la calidad del medicamento.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigaciones del Ozono del CNIC por el financiamiento de estas investigaciones y a la Lic. Tamara Angulo Alemán por su participación como analista en la etapa final de la validación de la técnica empleada. Igualmente agradezco al Dr. Carlos Hernández y a la Dra. Lidia Asela Fernández por su invaluable ayuda en la revisión de este documento.

BIBLIOGRAFIA

1. Ledea O., Correa T., Méndez E. and Jardines D. Volatile Components of Ozonized Oil OLEOZON®. Preliminary Results, Proceedings of 14th Ozone World Congress, Dearborn, Michigan, USA, 557-565, 1999.
2. Lezcano I., Molerio J., Gómez M., Contreras R., Roura G. y Díaz W. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, **29**, 209, 1998.
3. Falcón L., Menéndez S., Daniel R., Garbayo E., Moya S. y Abreu M. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, **29**, 192, 1998.
4. Escobar M. Identificación y Cuantificación de los Compuestos Presentes en la Fracción volátil del OLEOZON®. Trabajo de Diploma Universitario, UH-Centro de Inves-

tigaciones del Ozono, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, 1999.

5. Aparicio R. and Morales T. J. *Food Chem.*, **46**, 1 116, 1998.
6. Malcolmson L., Vaisey-Geuser M., Przybylski R., Ryland D., Eskin N. and Armstrong L. *JAOCs*, **73**, 1 153, 1996.
7. Stashenko E., Ferreira M., Sequeda L., Martínez J. and Wong J. J. *of Chromatography, A*, **779**, 360, 1997.
8. Moshonas M. and Shaw P. J. *of Agricultural and Food Chemistry*, **44**, 1 105, 1996.
9. Gulshan A., Carmiery F. and Byong L. J. *of Agricultural and Food Chemistry*, **45**, 748, 1998.
10. Base de datos automatizada con una biblioteca de 55 000 espectros de masas. Instituto Nacional de Estándar y Tecnología, NIST, USA, 1990.
11. Paquete de programas de StatGraphics Plus, Serie 3866713, versión 2.1.
12. Validation of analytical procedures: Methodology, European agency for the evaluation of medicinal products, 1995.
13. Castro M., Gascón S., Pujol M., Sans J.M. y Vicente L. Validación de métodos analíticos A.E.F.I. Sección Catalana, 1989.
14. Bailey P.S. Ozonation in Organic Chemistry. Vol.1, Academic Press, New York, 1978.
15. Pryor W.A. and Wu M. *Chem. Res. Toxicol.*, **5**, 505, 1992.