

Metodologías analíticas aplicadas al D003, nuevo ingrediente activo obtenido de la cera de la caña de azúcar

Ernesto Méndez Antolín, David Marrero Delange, Víctor González Canavaciolo, Roxana Sierra Pérez, Miriam Cora Medina y Caridad Velázquez Gómez.

Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y 158, Playa, Apartado Postal 6414, Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico: cpn@cnic.edu.cu

Recibido: 14 de mayo de 2006. Aceptado: 14 de noviembre de 2006.

Palabras clave: D003, ácidos grasos saturados de alta masa molecular, cromatografía de gases, métodos analíticos, validación.
Key words: D003, saturated very long chain fatty acids, gas chromatography, analytical methods, validation.

RESUMEN. El D003 es un nuevo ingrediente activo, formado por una mezcla de ácidos grasos saturados lineales entre 24 a 36 átomos de carbono, el cual es aislado y purificado a partir de la cera de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) y ha mostrado efecto hipolipemiente, antiagregante plaquetario, anti-oxidante y anti-osteoporótico. A partir de este ingrediente activo se han elaborado suspensiones acuosas para los estudios preclínicos y tabletas con dosis de 5 y 10 mg, todo lo cual ha requerido el desarrollo y validación de metodologías analíticas por cromatografía de gases para su determinación en las diferentes formas en que se le utiliza. Estas metodologías se basan en el empleo de una columna semicapilar DB-5 y del ácido 1-nonadecanoico como patrón interno. Los ácidos grasos son analizados como ésteres metílicos, para cuya formación se usa una disolución de ácido clorhídrico al 5 % en metanol. Los resultados de las validaciones demostraron que estas metodologías son específicas, al no haber interferencias de otros componentes en las señales de los ácidos grasos, ni siquiera al someter previamente los productos a condiciones extremas de degradación. Estas metodologías también resultaron lineales (coeficientes de correlación > 0,99) y exactas (recobrados totales entre 99,6 y 100,3 %) entre el 50 y el 150 % de las masas nominales. La repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad en las determinaciones presentaron coeficientes de variación < 2,1 %. Los estudios de robustez realizados demostraron que de siete cambios operacionales evaluados, solo el aumento del volumen de inyección afectó la cuantificación y la resolución. Los métodos fueron encontrados adecuados para su empleo en el control de la calidad y los estudios de estabilidad del ingrediente activo, así como de las tabletas y suspensiones.

ABSTRACT. D003 is a new active ingredient made-up of a mixture of saturated linear fatty acids ranging from 24 and 36 carbon atoms. This product has been isolated and purified from sugar cane (*Saccharum officinarum* L.) wax and has shown antiosteoporotic, antioxidant, antiplatelet, and cholesterol-lowering effects. Aqueous suspensions for preclinical studies and 5 and 10 mg dose tablets using this active ingredient have been elaborated. In that sense, the development and validation of gas chromatographic analytical methodologies for their determination has been required. These methodologies are based on the employment of a DB-5 wide-bore column and 1-nonadecanoic acid as internal standard. The acids were analyzed as methyl ester derivatives, prepared using 5 % aqueous HCl-methanol. Validated methods were specific, because no interference was detected, even when samples were subject to stress conditions. Good linearity (correlation coefficient > 0.99) and accuracy (total average recovery between 99.6 and 100.3 %) were proved over a range 50-150 % of the nominal concentration. Repeatability, intermediate precision and reproducibility at the nominal dose (100 %) were < 2.1 %. Robustness studies showed that quantification and resolution were only affected by the injection volume increase and no other of the 7 evaluated operational changes affected the results. The methods proved to be suitable for quality controls and stability studies of the active ingredient, tablets and suspensions.

INTRODUCCION

El D003 constituye una mezcla de ácidos grasos saturados (AGS) desde 24 hasta 36 átomos de carbono, aislada y purificada a partir de la cera de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.).¹ Los lotes industriales de D003 han mostrado una composición reproducible, con los ácidos de número par de átomos de carbono como mayoritarios, siendo el ácido 1-octacosanoico el que se encuentra en mayor proporción.

Estudios con esta mezcla han demostrado una variada acción farmacológica, destacándose efectos como hipolipemiente, antiagregante plaquetario, anti-oxidante y anti-osteoporótico.²⁻⁷ Ensayos experimentales han mostrado además, ausencia de toxicidad aguda, subcrónica y crónica,^{8,9} así como ausencia de genotoxicidad o efectos sobre la fertilidad y la reproducción.^{10,11}

Previo al D003 nunca se había empleado una mezcla de AGS para prevenir o contrarrestar enfermedades aterotrombóticas, ni de otro tipo, siendo por el contrario su presencia en la dieta un tema de controversia, por su influencia sobre las concentraciones de colesterol sanguíneo.¹²⁻¹⁴ Es por ello que el producto D003, al reportársele una importante actividad beneficiosa, incluso como hipocolesterolemizante, constituye una novedad farmacéutica.

A partir del ingrediente activo D003 se han desarrollado, como formas terminadas, tabletas con dosis

de 5 y 10 mg, las cuales se han empleado en los diferentes estudios clínicos realizados.^{15,16} Actualmente, las tabletas de 5 mg de D003 son comercializadas como suplemento nutricional con el nombre de Prevenox. Para la evaluación farmacológica y toxicológica de este producto también se han preparado suspensiones farmacéuticas con el empleo de una disolución de goma acacia en agua destilada.

Como parte de la caracterización química del D003 fue necesario desarrollar, con el empleo de la cromatografía de gases (CG), un método analítico que determinara de manera confiable el contenido de AGS en el ingrediente activo, de forma que permitiera el control de la calidad y los estudios de estabilidad del producto.¹⁷ Este método fue sometido a un proceso de validación en el que se tuvieron en consideración los parámetros recomendados por los organismos farmacéuticos internacionales.¹⁸ La elaboración de diferentes formas terminadas a partir del D003, como las suspensiones acuosas y las tabletas, requirió también el desarrollo y validación de otras metodologías con similares propósitos.¹⁹⁻²¹

El objetivo del presente estudio consistió en resumir las características generales de las metodologías analíticas aplicadas al D003: condiciones cromatográficas, modo de derivatización pre-cromatográfica de los AGS, análisis cualitativos y cuantitativos, entre otras. Serán mostrados también los principales resultados de validación de las metodologías analíticas para la determinación de los AGS presentes en el ingrediente activo, tabletas (5 y 10 mg) y suspensiones (10; 25; 50; 100, 150 y 250 mg/mL).

MATERIALES Y METODOS

Equipos

Cromatógrafo de gases modelo GC-14A (Shimadzu, Japón) acoplado a computadora modelo C-R4A de la misma firma, con programa para procesamiento de datos. La detección se realiza mediante un detector de ionización por llama y se emplea una columna con fase enlazada DB-5 (30 m, 0,53 mm d.i. y 1,5 μ m de espesor de película; J&W, USA). Programación: de 220 °C hasta 320 °C a 5 °C/min y 10 min isotérmico a la temperatura final. El flujo del gas portador (H_2) es aproximadamente de 9 mL/min; para la formación de la llama se emplea un flujo de H_2 y aire de 40 y 400 mL/min, respectivamente. La temperatura del inyector y del detector es de

320 °C. El volumen de inyección es de 1 μ L.

Disoluciones

Disolución de patrón interno (DPI), con el ácido 1-nonadecanoico ($C_{19:0}$) a 1 mg/mL en cloroformo. Disolución metilante (DM) compuesta de ácido clorhídrico al 5 % en metanol (v/v). A partir de AGS patrones con 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 y 31 átomos de carbono (99 %, SIGMA, USA) se prepara una disolución de referencia de ácidos (DRA) en cloroformo cuyas concentraciones son similares a las encontradas en el D003 ingrediente activo. En dicha disolución los AGS se encuentran aproximadamente a: 0,06; 0,05; 0,14; 0,12; 1,5; 0,08; 0,8 y 0,05 mg/mL, respectivamente. Disolución matriz del producto (DMP) en cloroformo, en la que la concentración del producto puede estar entre 1 y 2 mg/mL. Disolución matriz de referencia (DMR) en la que se añaden alícuotas de la DRA y de DPI a un vial, se lleva a sequedad con flujo de aire y calentamiento a 80 °C, se añade DM y se calienta a 80 °C durante 90 min. Posteriormente, se lleva a sequedad con corriente de aire a 80 °C y finalmente, se disuelve el contenido del vial en tolueno y se calienta a 80 °C durante 3 min.

Preparación de las muestras

Ingrediente activo. Se pesan 10 mg del producto en un vial y se adiciona 1 mL de DPI, se lleva a sequedad bajo corriente de aire y calentamiento a 80 °C, se añade 1 mL de la DM y se calienta a 80 °C durante 90 min, se lleva a sequedad con flujo de aire a 80 °C. Luego se disuelve el contenido del vial en 1 mL de tolueno y se calienta a 80 °C durante 3 min.

Tabletas. Se toman aleatoriamente 20 tabletas, se pesan y se determina el peso promedio, se trituran hasta obtener un polvo fino y homogéneo. En un tubo de ensayos se pesa la cantidad correspondiente al peso promedio de una tableta. Luego, se añaden en el tubo de ensayos 0,5 mL de DPI y 3 mL de cloroformo para las tabletas con dosis de 5 mg (1 mL de DPI y 4 mL de cloroformo en las tabletas con 10 mg). Se calienta a 80 °C durante 15 min con agitación ocasional. Se filtra en caliente hacia otro tubo de ensayos. Se toma 1 mL del filtrado y se trasvasa a un vial. Se lleva a sequedad a 80 °C con corriente de aire, se añaden 0,5 mL de DM, se sella el vial y se calienta a 80 °C durante 90 min. Cuando alcanza la temperatura am-

biente, se destapa y se lleva a sequedad a 80 °C con corriente de aire. Se añaden 150 μ L de tolueno para las tabletas con dosis de 5 mg (200 μ L para las de 10 mg de dosis), se sella el vial y se calienta a 80 °C durante 5 min.

Suspensiones. A partir de las suspensiones originales en las que el D003 se encuentra a las concentraciones siguientes: 10, 25, 50, 100, 150 y 250 mg/mL, se toma el volumen necesario para preparar una suspensión de 10 mg/mL. A partir de cada una de estas nuevas suspensiones, y de forma independiente, se transfiere 1 mL a un tubo de ensayos, se añade 1 mL de DPI y 3 mL de cloroformo. Se calienta a 80 °C durante 30 min con agitación ocasional. La mezcla se transfiere a un embudo separador. Luego de separar las fases, se trasvasa la clorofórmica a un tubo de ensayos. Se evapora a 80 °C con corriente de aire. Se añade 1 mL de DM y se calienta a 80 °C durante 90 min. Se lleva a sequedad a 80 °C con corriente de aire. Finalmente, se añade 1 mL de tolueno.

Análisis cualitativo

Como criterio de identificación se determina la retención relativa ($r_{i,p}$) de cada uno de los AGS que forman el D003, para lo cual se toma como referencia al patrón interno $C_{19:0}$. La retención relativa determinada se compara con la obtenida del análisis de una muestra preparada a partir de un lote de referencia del producto, previamente estudiada por CG acoplada a un detector selectivo de masas.

Análisis cuantitativo

El porcentaje de cada ácido graso (P_i) presente en el ingrediente activo se obtiene por el método cuantitativo del patrón interno, mediante la ecuación siguiente:

$$P_i = \frac{A_i \cdot f_i^m \cdot m_{pi} \cdot 100 \%}{A_{pi} \cdot m_m} \quad (1)$$

donde:

A_i área bajo el pico cromatográfico del componente a analizar.

m_{pi} masa de patrón interno (mg).

A_{pi} área bajo el pico cromatográfico del patrón interno.

f_i^m factor másico de respuesta relativa.

m_m masa de la muestra (mg).

El contenido de cada compuesto (C_i) en la tableta (mg), se obtiene por el mismo método y mediante la ecuación siguiente:

$$C_i = \frac{A_i \cdot f_i^m \cdot m_{pi} \cdot m_t}{A_{pi} \cdot m_m} \quad (2)$$

donde:

m_t masa promedio de las tabletas (mg).

En el análisis de cada una de las suspensiones sometidas al proceso extractivo, se calcula C_i a través de la misma ecuación 2, pero sin tener en consideración las variables m_t y m_m . Luego el contenido total de AGS de cada una de estas suspensiones es multiplicado por un factor de dilución (diferente para cada caso) y de esta manera se determina la concentración de las suspensiones originales.

Los factores másicos de respuesta relativa se calculan a partir del análisis cromatográfico de la DMR, según:

$$f_i^m = \frac{A_{pi} \cdot m_i}{A_i \cdot m_{pi}} \quad (3)$$

donde:

m_i masa del componente a analizar.

Al no disponerse de patrones comerciales de los AGS desde 32 hasta 36 átomos de carbono se emplea, para los ácidos $C_{32:0}$, $C_{34:0}$ y $C_{36:0}$ el factor calculado para el ácido $C_{30:0}$ y para los ácidos $C_{33:0}$ y $C_{35:0}$ el del ácido $C_{31:0}$.

Validación

Especificidad. Para estudiar este parámetro el ingrediente activo y las formas terminadas se sometieron a diferentes condiciones extremas (hidrólisis ácida y básica, oxidación, fotólisis y termólisis), para determinar la especificidad del método ante la presencia de posibles productos de degradación.²² Todos los ensayos se realizaron por triplicado. La especificidad se evaluó por comparación de los cromatogramas correspondientes a las muestras sometidas a condiciones extremas con los de la muestra original. También, se compararon independientemente las muestras y el patrón interno.

Linealidad. En este ensayo se abarcaron cinco concentraciones del ingrediente activo, que representaron aproximadamente un 30, 60, 90, 120 y 150 % de su valor nominal ($n = 3$). Para ello, se tomaron diferentes volúmenes en orden creciente de la DMP, los que se trasvasaron a viales, a cada uno de los cuales se le adicionó una alícuota de la DPI. Posteriormente, se llevó a sequedad a 80 °C en corriente de aire, se adicionó un volumen de DM y se calentó a 80 °C durante 90 min. Se llevó nuevamente a sequedad en las mismas condiciones anteriores y finalmen-

te, se disolvió la muestra en tolueno calentando a 80 °C durante 3 min. Para las tabletas se emplearon cinco concentraciones ($n = 3$), las cuales representaron aproximadamente el 50, 75, 100, 125 y 150 % de la dosis de D003 que presentan las tabletas. Se trituró la cantidad requerida de tabletas placebo y del polvo obtenido, se tomaron cantidades equivalentes al peso promedio de las tabletas con D003 y se añadieron a los tubos de ensayo. Las muestras de cada concentración se prepararon añadiéndose volúmenes crecientes de la DMP. Después, se llevaron a sequedad en corriente de aire a 80 °C y a continuación, se desarrolló la metodología analítica. Para las suspensiones el estudio abarcó seis concentraciones del producto, las cuales representaron las concentraciones de las suspensiones empleadas en las investigaciones. Se procedió tal como se describe en el acápite de preparación de muestras.

Los cálculos de las ecuaciones de regresión para el total de AGS se realizaron por el método de ajuste de los mínimos cuadrados, también se determinaron los coeficientes de correlación (r), de variación de las pendientes (CV_b) y de variación de los factores de respuesta (CV_r).²³ En todos los casos, se tuvieron en cuenta las cantidades de cada AGS y del total, determinadas por el método (y), en función de las correspondientes cantidades de componente activo (x) contenidas en las muestras analizadas.

Exactitud. En la evaluación de este parámetro para el ingrediente activo los análisis se realizaron por el método de adición de patrón en un intervalo del 80 al 120 % respecto a la concentración nominal. Se prepararon cuatro grupos de muestras ($n = 3$), a las cuales se les adicionaron volúmenes constantes de DMP y de DPI. Al primero, segundo y tercer grupo se le adicionaron también volúmenes crecientes de la DRA, las muestras del cuarto grupo fueron consideradas blancos. Los volúmenes añadidos de las disoluciones se evaporaron con flujo de aire y calentamiento a 80 °C. Posteriormente, se procedió según el modo de preparación de muestras. Las cantidades totales de AGS patrones añadidas en cada caso fueron determinadas mediante el cálculo de la diferencia entre las masas promedio cuantificadas en los tres primeros grupos y el contenido promedio de las muestras blanco, con lo cual se determinó el recobrado. El estudio para tabletas

y suspensiones se realizó con los datos obtenidos en los estudios de linealidad. Las evaluaciones se realizaron mediante pruebas t de Student ($p = 0,05$), para determinar si existían diferencias significativas entre los recobrados obtenidos y el 100 %, según la ecuación siguiente:

$$t_{exp} = \frac{|100 - \bar{R}|}{CV} \sqrt{n} \quad (4)$$

donde:

$\bar{R}$ recobrado promedio obtenido.

n número de réplicas.

Repetibilidad. Este parámetro se midió a través del CV (%) en la determinación del contenido total de AGS, tanto en el ingrediente activo, como en las tabletas y suspensiones ($n = 8$). Los análisis se realizaron por el mismo analista, día y equipo y los CV calculados fueron comparados con los permitidos por Horwitz según el porcentaje del analito en las muestras.²³⁻²⁴

Reproducibilidad. Este parámetro se evaluó en las metodologías aplicadas al ingrediente activo y a las tabletas de 5 mg. De esta manera los análisis se desarrollaron por dos analistas en diferentes laboratorios. Cada uno preparó de forma independiente tres muestras según el caso, las cuales se analizaron en tres días. Se llevaron a cabo pruebas F de Fisher y t de Student para demostrar si existían diferencias significativas entre los resultados de los analistas. Fueron calculados los límites de confianza (LC) para el total de AGS, para lo cual se tuvieron en consideración los resultados de los dos analistas. Para el cálculo del LC se utilizó la ecuación siguiente:

$$LC = Media \pm t \cdot DE/(n^{1/2}) \quad (5)$$

donde:

t valor de la distribución t de Student para $n-1$ grados de libertad y $p = 0,05$.

Precisión intermedia. Este parámetro se evaluó en la metodología aplicada a las tabletas con dosis de 10 mg y para las suspensiones con 10, 50 y 250 mg_(D003)/mL. Los análisis se llevaron a cabo por dos analistas en el mismo equipo. Cada uno preparó de forma independiente tres muestras y las analizaron en tres días diferentes. Se hicieron las mismas pruebas estadísticas del estudio de reproducibilidad, incluida la determinación de los LC.

Robustez. Este estudio fue aplicado para las dos formulaciones de tabletas. Se variaron siete parámetros experimentales con vistas a determinar si estas variaciones afectaban significativamente los resultados obtenidos en el tiempo de retención relativo para el ácido mayoritario ($C_{28:0}$), la resolución entre los ácidos $C_{28:0}$ y $C_{30:0}$, el contenido total de ácidos (mg) y la desviación estándar de esta última determinación (Tabla 1). Para ambos casos, el modelo que se siguió fue el de Youdin.²⁵

RESULTADOS Y DISCUSION

Las metodologías analíticas aplicadas al D003, aunque presentan procedimientos particulares que las diferencian unas de otras, sobre todo en lo referente a la preparación de las muestras, tienen características comunes, como el hecho de que todas emplean la CG con una columna semicapilar de fase enlazada apolar, y los AGS que forman este producto, previo al ensayo cromatográfico, son derivatizados a ésteres metílicos mediante catálisis ácida con una disolución de HCl en MeOH al 5 % (v/v). Por otra parte, al estar el principio activo en las formas terminadas, bien junto a una gran cantidad de excipientes (tabletas) o suspendidos en un medio acuoso (suspensiones), se practica antes del proceso de derivatización, una extracción clorofórmica y así, se logra concentrar los AGS en la fase orgánica, a partir de la cual se toman las alícuotas necesarias para continuar la preparación de las muestras. Otro aspecto en común es que los análisis cuantitativos se basan en la utilización del ácido $C_{19:0}$ como patrón interno.

Especificidad. En ninguna de las metodologías evaluadas se encontraron interferencias en la detección de los componentes del D003 ni del patrón interno. Así, en los perfiles cromatográficos obtenidos en el estudio de especificidad de la metodología aplicada a las tabletas con 5 mg de

Tabla 1. Parámetros y condiciones evaluados en los estudios de robustez

Parámetros	Condiciones	
	Inferior (-)	Superior (+)
(A) Temperatura del inyector (°C)	315	320
(B) Temperatura del detector (°C)	315	320
(C) Flujo de gas portador (mL/min)	9,2	11,2
(D) Gradiente de temperatura (°C/min)	5	6
(E) Temperatura inicial del horno (°C)	220	230
(F) Volumen de inyección (μL)	1	2
(G) Temperatura final del horno (°C)	315	320

D003, se pudo observar que las señales de los excipientes de las tabletas llegan a resolverse sin interferir con las señales de los compuestos de interés (Fig. 1). Lo mismo ocurrió en las muestras sometidas a condiciones extremas de degradación. Los resultados permiten asegurar que estos métodos pueden ser utilizados en los estudios de estabilidad.

Linealidad. A partir de los resultados de este ensayo (Tabla 2), se calcularon las ecuaciones de regresión para el total de AGS en las metodo-

logías aplicadas al D003. Los coeficientes de regresión (r) fueron siempre mayores de 0,99; los CV_b y los CV_f fueron menores que los límites de aceptación 2 y 5 %, respectivamente. Los intervalos de confianza de los interceptos incluyeron el cero, por lo que no hubo sesgo en ninguno de los casos. Estos resultados demostraron la capacidad de estas metodologías para obtener respuestas linealmente proporcionales a la concentración de los AGS que componen el D003 en las muestras.

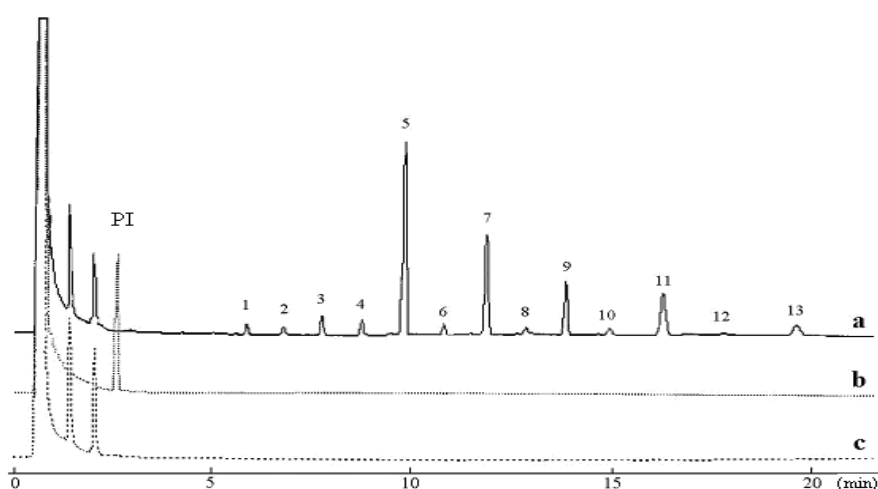


Fig. 1. Perfiles cromatográficos de: a) tabletas con dosis de 5 mg. Los picos del 1 al 13 corresponden a los AGS del $C_{24:0}$ al $C_{36:0}$ presentes en el D003; b) patrón interno (PI, $C_{19:0}$) y c) excipientes; todas las muestras fueron sometidas previamente a un proceso de metilación.

Tabla 2. Resultados de los ensayos de linealidad de las metodologías para la determinación de los AGS que componen el D003.

Método	Ecuación de regresión	r	CV_b	CV_f
			(%)	
Ingrediente activo	$y = (0,767 \pm 0,015)x - (0,098 \pm 0,148)$	0,999 6	0,88	2,15
Tabletas 5 mg	$y = (1,007 \pm 0,036)x - (0,044 \pm 0,183)$	0,999 4	1,71	1,50
Tabletas 10 mg	$y = (1,001 \pm 0,021)x + (0,032 \pm 0,222)$	0,999 4	0,97	1,53
Suspensiones	$y = (1,000 \pm 0,008)x + (0,142 \pm 1,066)$	0,999 8	0,39	1,75

Exactitud. Para cada una de las metodologías los recobrados obtenidos estuvieron entre 99,6 y 100,29 %, y las t experimentales fueron inferiores a las tabuladas para un 95 % de confiabilidad (Tabla 3). Estos resultados demostraron que los métodos evaluados determinan con exactitud el contenido de los AGS que componen el D003 en las muestras.

Precisión. En los ensayos de repetibilidad los CV de la determinación del total de AGS en todas las metodologías fueron menores que los CV permitidos por Horwitz.²⁴ Por otra parte, en los ensayos de precisión intermedia y reproducibilidad, las F y t experimentales fueron inferiores a los valores críticos, y los CV obtenidos no excedieron el 2,1 % (Tabla 4). De esta manera, se comprobó que no hubo diferencias significativas entre las varianzas, ni entre las medias obtenidas por los analistas, por lo que los factores: analista, tiempo y laboratorio, según el caso, no influyeron en la precisión de los análisis.

Robustez. A partir de los resultados de este ensayo (Tabla 5), para la metodología aplicada a las tabletas con dosis de 5 mg, se calcularon los efectos de cada uno de los cambios operacionales realizados. Al compararse con el valor hallado en la expresión $\sqrt{2} \cdot DE$, se encontró que de los siete parámetros estudiados solo el aumento del volumen de inyección influyó en la resolución de los ácidos C28:0 y C30:0, no obstante, esta influencia no afectó la determinación cuantitativa. En el estudio de robustez de la metodología aplicada a las tabletas con dosis de 10 mg se obtuvieron similares resultados, pero en esta ocasión, el incremento del volumen de inyección no solo influyó en la resolución de los ácidos C28:0 y C30:0, sino también, en la determinación cuantitativa.

El aumento del volumen de inyección puede llegar a provocar la sobresaturación de la columna y de esta manera, dar lugar a posibles errores cuantitativos.²⁶ Teniendo en cuenta los resultados de los ensayos de robustez para ambas metodologías, el volumen de inyección constituye un parámetro que debe ser rigurosamente controlado por los analistas al inyectar las muestras en el cromatógrafo.

CONCLUSIONES

Fueron desarrolladas y validadas metodologías analíticas por CG para la determinación de D003, en el in-

Tabla 3. Resultados de los ensayos de exactitud de las metodologías para la determinación de los AGS que componen el D003.

Método	Recobrado total (%) $\pm$ DE	$t_{exp.}$	$t_{tab.}$
Ingrediente activo	99,82 $\pm$ 0,680	0,885	2,306
Tabletas 5 mg	99,60 $\pm$ 1,427	1,291	2,085
Tabletas 10 mg	100,29 $\pm$ 1,609	0,314	2,145
Suspensiones	100,06 $\pm$ 1,75	0,125	2,045

Tabla 4. Resultados obtenidos en los ensayos de precisión de las metodologías para la determinación de los AGS que componen el D003.

Método	LC	CV(%)
Ingrediente activo (%)	76,59 $\pm$ 1,11	0,96
Tabletas 5 mg	5,00 $\pm$ 0,03	1,41
Tabletas 10 mg	10,07 $\pm$ 0,07	1,44
Suspensiones 10 mg/mL	9,98 $\pm$ 0,37	1,76
Suspensiones 50,08 mg/mL	49,89 $\pm$ 2,25	2,10
Suspensiones 251,8 mg/mL	253,48 $\pm$ 6,46	1,20

Tabla 5. Resultados del ensayo de robustez de la metodología aplicada a las tabletas con 5 mg.

Factor	Retención relativa	Resolución	Masa total de ácidos (mg)	DE
Temperatura del inyector	0,08	0,62	0,01	0,01
Temperatura del detector	0,01	0,20	0,03	0,01
Flujo de gas portador	0,36	0,37	0,01	0,00
Gradiente de temperatura	0,24	0,20	0,01	0,01
Temperatura inicial del horno	0,21	0,14	0,01	0,00
Volumen de inyección	0,04	1,28	0,05	0,00
Temperatura final del horno	0,02	0,34	0,00	0,00
$\sqrt{2} \cdot DE$	0,37	1,17	0,06	0,03

grediente activo y en las formas terminadas correspondientes a tabletas con dosis de 5 y 10 mg y suspensiones acuosas, las cuales cumplen con los parámetros de validación recomendados por los organismos farmacéuticos internacionales, por lo que pueden ser empleadas en el control de la calidad y los estudios de estabilidad respectivos.

BIBLIOGRAFIA

- González L., Marrero D., Laguna A., Más R., Arruzazabala M.L., Carbajal D., Cora M., Menéndez R. (Laboratorios DALMER S.A.), Mixture of primary fatty acids obtained from sugar cane wax, Patent CU 22,723; USA 6,486,205.
- Gámez R., Mendoza S., Más R., Mesa R., Castaño G., and Marrero D. Dose-dependent cholesterol-lowering effects of D003 on normocholesterolaemic rabbits. *Curr. Ther. Res.*, **61**, 460-468, 2000.
- Menéndez R., Más R., Marrero D., Amor A., Rodeiro I. Inhibition of cholesterol biosynthesis in cultured fibroblasts by D003, a mixture of very long-chain saturated fatty acids. *Atherosclerosis (special issue)*, **151**, 131, 2000.
- Molina V., Arruzazabala M.L., Carbajal D., Más R., Valdés S. Antiplatelet and antithrombotic effects of D003. *Pharmacol. Res.*, **42**, 137-143, 2000.
- Noa M., Más R., Mendoza S., Gámez R., and Mendoza N. Effects of D-003, a mixture of high molecular weight aliphatic acids from sugarcane wax, on bones of ovariectomized rats. *Drugs Exp. Clin. Res.*, **30**, 35-41, 2004.
- Castaño G., Más R., Fernández L. Assessment of D-003 a new antiplatelet and lipid-lowering compound, in healthy volunteers. *Drug Res. & Develop.*, **3**, 337-348, 2002.
- Menéndez R., Más R. and Amor M.; Inhibition of rat lipoprotein lipid per oxidation by the oral administration of D-003, a mixture of very long-chain

- saturated fatty acids. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, **80**, 13-21, 2002.
8. Gámez R. *et al.* Acute and oral subchronic toxicity of D003 in rats. **Toxicol. Lett.**, **118**, 31-41, 2000.
9. Gámez R. *et al.* Six-month toxicity study of oral administration of D-003 in Sprague Dawley rats. **Drug Res. & Develop.**, **36**, 375-86, 2002.
10. Gámez R., *et al.* *In vivo* genotoxic evaluation of D-003, a mixture of very long-chain aliphatic acids. **J. of Med. Food**, **4**, 85-91, 2001.
11. Rodríguez M., Gámez R, González J, García H, Acosta C, Goicochea E. Lack of developmental toxicity of D-003: a mixture of long-chain fatty acids in rats. **Food Chem. Toxicol.**, **41**, 89-93, 2003.
12. Bonanome A., Grundy S.M. Effect of dietary stearic acid on plasma cholesterol and lipoprotein levels. **New England J. Med.**, **318**, 1244-48, 1988.
13. Caballero B., *et al.* Ácidos grasos saturados e isómeros trans en la nutrición humana, **RNC**, **3**, 40-44, 1998.
14. Kris-Rtherton P.M. and Yu S. Individual fatty acids effects on plasma lipids and lipoproteins: human studies. **Am. J. Clin. Nutr.**, **65**, 628S-1644S, 1997.
15. Arruzazabala M.L., Carbajal D., Más R., Molina V, Castaño G. and Gámez R. Effects of D-003, a new compound purified from sugarcane wax, on platelet aggregation in healthy volunteers: A randomised, double-blinded study. **Clin. Drug Inv.**, **23**, 107-118, 2003.
16. Castaño G., Menéndez R., Más R., Ledón N., Fernández J.C., Pérez J.L., González R.M. and Lescay M. A new hypocholesterolaemic and antiplatelet compound on lipid profile and lipid peroxidation in healthy volunteers. **Clin. Drug Inv.**, **23**, 193-203, 2003.
17. Marrero D., Méndez E. y Canavaciolo V. Determination of D003 by capillary gas chromatography. **Revista CENIC Ciencias Químicas**, **33**, 99-105, 2002.
18. ICH. Validation of analytical Procedures: methodology. In: Harmonized Tripartite Guideline, topic Q2B, Step 4, 6 november 1996, U.K.
19. Méndez E., Marrero D., González V. and Laguna A. GC determination of long chain fatty acids that compose D003 in 5-mg film-coated tablets. **J. Pharm. Biom. Anal.**, **31**, 613-620, 2003.
20. Méndez E., Marrero D., González V., Sierra R. and Tejeda Y. Validation of a gas chromatographic method for determining fatty acids that compose D003 in 10 mg film-coated tablets. **IL Farmaco**, **59**, 543-547, 2004.
21. Tejeda Y., Méndez E., Marrero D. and González V. Gas chromatographic method for determining very long chain fatty acids that compose D003 in aqueous suspensions from 20 to 200 mg/mL, used in pharmaceutical and toxicological studies; **IL Farmaco**, **58**, 521-525, 2003.
22. Fison Instruments. Standard Proc.: Protocol for the Validation of Anal. Methods, CHSP 0152Q, England, October, 1991.
23. 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, 31, 1989.
24. Horwitz W. Evaluation of analytical methods used for regulation of food ad drugs. **J. AOAC**, **65**, 525-530, 1982.
25. Youden W.J. and Steiner E.H, *Statistical Manual of the A.O.A.C.*, Association of Official Analytical Chemists, Arlington, V.A. 1975.
26. Supelco Inc. GC Bulletin 814B. Wide Bore (0.53 mm and 0.75 mm ID) High Efficiency and large sample capacity in packed column or capillary column gas chromatographs, 1-10, 1986.