

Validación de un método por Cromatografía de Gases para la determinación de los ácidos grasos que componen el D-004 ingrediente activo

Eduardo A. Rodríguez-Leyes, David Marrero Delange,* Víctor L. González Canavaciolo, Roxana Sierra Pérez y Yuliamny Adames Fajardo.

Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Calle 198 entre Avenidas 19 y 21, Reparto Atabey, Playa, Apartado Postal 6414, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 20 de junio de 2008. Aceptado: 7 de octubre de 2008.

Palabras clave: D-004, ácidos grasos, cromatografía gaseosa, validación, *Roystonea regia*.
Key words: D-004, fatty acids, gas chromatography, validation, *Roystonea regia*.

RESUMEN. El D-004 es un nuevo ingrediente activo obtenido a partir de los frutos de la palma real cubana (*Roystonea regia*), el cual ha demostrado su efectividad en modelos experimentales de hiperplasia prostática. Esta sustancia está compuesta principalmente por una mezcla de ácidos grasos (AG) saturados e insaturados libres, entre 8 y 18 átomos de carbono. Se desarrolló y validó un método por cromatografía gaseosa para la determinación de los AG en el D-004. Los AG fueron analizados como ésteres metílicos, obtenidos por reacción con cloruro de acetilo al 10 % en metanol y separados en una columna capilar *widebore* BPX-5 utilizando ácido tridecanoico como patrón interno. En el estudio de especificidad se demostró que no hubo interferencias en la determinación de esta mezcla, una vez que las muestras fueron sometidas a condiciones de estrés. La determinación del contenido de AG totales fue lineal ($r > 0,999$; CVs de los factores de respuesta y la pendiente menores que 5 y 2 %, respectivamente) y sin sesgo en todo el intervalo estudiado, desde 50 a 150 % de la masa nominal. Se obtuvieron recobrados elevados en el estudio de exactitud (100,4 a 100,8 %), realizado en un intervalo de 80 a 120 % de la concentración nominal. Se obtuvieron buenos resultados en los estudios de repetibilidad y precisión intermedia (CV < 2 %), lo que probó que el método es preciso. Conforme a estos resultados, el procedimiento validado es apropiado para el control de calidad y los estudios de estabilidad de este ingrediente activo.

ABSTRACT. D-004 is a new active ingredient obtained from the Cuban royal palm (*Roystonea regia*) fruits. This substance is mainly composed by a mixture of saturated and unsaturated free fatty acids, from 8 to 18 carbon atoms, and has shown to be effective in experimental model of prostate hyperplasia. A capillary gas chromatographic method for the determination of the fatty acids in D-004 was developed and validated. The acids were analyzed as methyl ester derivatives, which were obtained by reaction with 10 % acetyl chloride in methanol and separated in a BPX-5 wide-bore column using tridecanoic acid as internal standard. The specificity study showed no interferences regarding the determination of this mixture, once the samples were submitted to stress conditions. Determination of the total fatty acid content was linear ($r > 0.999$; CVs of the response factors and of the slopes lower than 5 and 2 %, respectively) and without bias in the studied concentration range, from 50 to 150 % of the nominal mass. In the accuracy study, over the range 80 to 120 % of the nominal fatty acid concentration, high recoveries (100.4 to 100.8 %) were reached. Good results were obtained in the repeatability and intermediate precision studies (CV < 2 %), proving that the method is precise. These results support that this method is properly validated, being appropriate for the quality control and stability studies of this active ingredient.

INTRODUCCIÓN

La hiperplasia prostática benigna (HPB) es una de las patologías más frecuentes en los hombres con más de 50 años y su frecuencia se incrementa con la edad. Hoy día los medicamentos de primera elección para el tratamiento de la HPB son los inhibidores de la 5-alfa reductasa prostática y los bloqueadores de los receptores α_1 -adrenérgicos de origen sintético.¹ Por otra parte, existen al-

gunas sustancias de origen vegetal como el extracto lipídico de saw palmetto (*Serenoa repens*), que también son ampliamente empleados en el tratamiento de esta patología.² Teniendo en cuenta estos antecedentes, queda justificada la búsqueda de medicamentos eficaces, seguros y bien tolerados a partir de fuentes existentes en el país para la terapia y prevención de la HPB, los cuales podrían incrementar la expectativa y la calidad de vida de la población cubana.

*Correspondencia:

David Marrero Delange

correo electrónico: david.marrero@cnic.edu.cu o david_delange@yahoo.com

El D004 es un nuevo ingrediente activo que consiste en un extracto lipídico de los frutos de la palma real cubana (*Roystonea regia*), el cual ha demostrado efectividad en modelos experimentales de HPB.³⁻⁵ Esta sustancia está compuesta por una mezcla de ácidos grasos (AG) libres entre 8 y 18 átomos de carbono, siendo los ácidos oleico, láurico, palmítico y mirístico los componentes mayoritarios.

El desarrollo de un nuevo ingrediente activo lleva implícito, entre otros requerimientos químico farmacéuticos, contar con métodos analíticos suficientemente exactos y precisos para su control de la calidad y sus estudios de estabilidad. Actualmente, los AG son analizados principalmente por Cromatografía de Gases (CG) en forma de ésteres metílicos y separados por columnas capilares.^{6,7} Teniendo en cuenta que en este tipo de extracto lipídico la actividad farmacológica se le atribuye fundamentalmente a los AG saturados ($C_{12:0}$, $C_{14:0}$),²⁻⁵ en el presente trabajo se decidió desarrollar y validar una metodología para la determinación de los AG que componen el D-004 ingrediente activo por CG empleando una columna apolar, la cual permite la determinación individual de los AG saturados y la conjunta de los AG insaturados con igual número de átomos de carbono. El procedimiento propuesto fue validado siguiendo criterios bien establecidos⁸⁻¹¹ para asegurar su aplicación en el control de la calidad y estudios de estabilidad de dicha sustancia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos y disoluciones

D-004 ingrediente activo (lote 020205) obtenido en el Departamento Química del Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas (Ciudad de La Habana). Patrones de los ácidos decanoico (cáprico, $C_{10:0}$), dodecanoico (láurico, $C_{12:0}$), tetradecanoico (mirístico, $C_{14:0}$), hexadecanoico (palmítico, $C_{16:0}$), 9-octadecenoico (oleico, $C_{18:1}$), octadecanoico (esteárico, $C_{18:0}$), tridecanoico ($C_{13:0}$) y ésteres metílicos de los ácidos octanoico (caprílico, $C_{8:0}$), 9-hexadecenoico (palmitoléico, $C_{16:1}$) y 9-octadecenoico (oleico, $C_{18:1}$).

Disolución metilante (DME) de cloruro de acetilo 10 % en metanol.

Disolución de hidróxido de sodio en agua ($\text{NaOH-H}_2\text{O}$) 2 mol/L.

Disolución acuosa de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) 30 %.

Disolución matriz de referencia (DMR). Se pesaron con exactitud de 0,1 mg, alrededor de 10 mg de cada uno de los ácidos siguientes: $C_{10:0}$, $C_{12:0}$, $C_{14:0}$, $C_{16:0}$ y $C_{18:0}$ en un tubo de ensayos y se aplicó la metodología analítica.

Disolución de Referencia de ácidos (DRA). Se pesaron 15,37; 452,61; 188,10; 247,12; 53,38 y 829,00 mg de los ácidos $C_{10:0}$, $C_{12:0}$, $C_{14:0}$, $C_{16:0}$, $C_{18:0}$ y $C_{18:1}$ y se disolvieron en 100 mL de n-hexano.

Disolución de patrón interno (DPI). Se pesó con exactitud de 0,1 mg, alrededor de 1 g de $C_{13:0}$ y se disolvió en 100 mL de metanol.

En el estudio se emplearon patrones de SIGMA (St. Louis, MO, USA); reactivos y disolventes (MERCK, Darmstadt, Alemania) y agua destilada.

Equipos

Cromatógrafo de gases GC 14A (Shimadzu, Japón) con detector de ionización por llama (DILL), acoplado a sistema de cómputo (Konixbert, Barcelona, España), con columna capilar *wide-bore* con fase enlazada BPX-5 (30 m x 0,53 mm d.i. y 1,5 μm de espesor de película, SGE, Aus-

tralia). Programación: de 120 (2 min) a 320 °C, a 10 °C/min. Flujo del gas portador (H_2): 8 mL/min. Temperatura del detector y el inyector: 320 °C y volumen de inyección: 1 μL en modo *splitless*.

La especificidad del método se comprobó por CG-Espectrometría de Masas (CG-EM). Se utilizó un cromatógrafo de gases 6890N con detector selectivo de masas 5975 B *Inert* acoplado a un sistema de cómputo y con columna capilar HP-5MS (30 m x 0,25 mm d.i., 0,25 μm de espesor de película, Agilent Technologies, CA, USA). Programación: de 70 °C (1 min) a 180 a 20 °C/min, de 180 a 230 °C a 2 °C/min, y de 230 a 320 °C a 20 °C/min. Temperatura del inyector: 300 °C, y volumen de inyección: 0,5 μL en modo *splitless*. Flujo del gas portador (He): 1 mL/min. Temperaturas de la fuente, la interfase y el cuadrupolo fueron 250, 300 y 150 °C, respectivamente. La energía de ionización fue 70 eV. El espectro de masas fue adquirido continuamente de 40 a 800 m/z en modo *scan*.

Preparación de la muestra

En un tubo de ensayos se pesaron, con exactitud de 0,1 mg, alrededor de 100 mg de D-004. Se agregó 1 mL de la DPI, 3 mL de DME, 5 mL de n-hexano y se cerró herméticamente. Se colocó en un termostato seco a 85 °C durante 30 min con agitación vigorosa ocasional. Se sacó del termostato y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se adicionaron 3 mL de la disolución de NaOH. Se agitó en la zaranda durante 15 min. Se dejó reposar durante 2 min para separar las fases y se extrajo una alícuota de 1 mL de la fase orgánica (superior) hacia un vial, se reconstituyó con 1 mL de hexano, se cerró y se agitó manualmente durante 30 s. Finalmente se tomó 1 μL por la técnica de *solvent-flush* para el análisis por CG.⁶

Método de análisis cualitativo

Como criterio de identificación por CG-DILL se determinó la retención relativa de cada uno de los ácidos siguientes: $C_{8:0}$, $C_{10:0}$, $C_{12:0}$, $C_{14:0}$, $C_{16:1}$, $C_{16:0}$, $C_{18:1}$ y $C_{18:0}$ para lo cual se tomó como referencia al patrón interno $C_{13:0}$. La retención relativa determinada fue comparada con la obtenida del análisis de sus patrones comerciales como ésteres metílicos. La identificación fue corroborada por CG-EM a través de la comparación de los espectros de cada AG con los de los patrones comerciales y los que aparecen en la biblioteca Wiley. Los fragmentos característicos (principalmente, m/z 74, 87, 143) e iones moleculares (M^+) de los ésteres metílicos de los AG fueron examinados e interpretados.

Método de análisis cuantitativo

La determinación cuantitativa se realizó por el método del patrón interno, previo cálculo de los f_i^m a partir de la DMR y utilizando como referencia al patrón interno $C_{13:0}$. Los ácidos linoleico ($C_{18:2}$) y linolénico ($C_{18:3}$) se cuantificaron como ácido oleico ($C_{18:1}$), para el ácido $C_{8:0}$ se utilizó el f_i^m calculado para el ácido $C_{10:0}$ y para el ácido palmitoléico ($C_{16:1}$) se utilizó el f_i^m calculado para el ácido $C_{16:0}$.

El contenido de cada compuesto (C_i) en el D-004 se determinó por el método del patrón interno,¹² mediante la ecuación siguiente:

$$C_i = \frac{A_i \times f_i^m \times m_{pi} \times 100}{A_{pi} \times m_m} \quad (\%)$$

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.

El contenido total de D-004 se determinó por la sumatoria de los porcentajes individuales hallados. Los f_i^m se calcularon a partir del análisis cromatográfico de la DMR.

Validación

Aplicabilidad del sistema. Se realizaron seis réplicas de inyección de una muestra de D-004 siguiendo la preparación descrita anteriormente. A partir de los cromatogramas obtenidos se determinó: la resolución cromatográfica entre los ácidos $C_{16:0}$ - $C_{16:1}$ ($n = 3$), la cual debía ser mayor o igual a 1; la retención relativa de cada ácido ($n = 3$), la que debía coincidir con la calculada con cada patrón y la repetibilidad de la inyección, para la cual el CV % de la cuantificación total ($n = 6$) debía ser menor que 0,8 %.

Especificidad. La especificidad del método fue determinada al comparar los cromatogramas del D-004, el estándar interno y las muestras de D-004 sometidas a condiciones propicias a la ocurrencia de degradación. Estas condiciones fueron: termólisis (103 °C, 7 d), oxidación (1 g de D-004 en 1,5 mL de H_2O_2 al 30 % a 25 °C, 7 d), y fotólisis (254 nm a 25 °C, 7 d); y se llevaron a cabo en ampollas de vidrio neutro, a las cuales se les insufló nitrógeno y se sellaron ($n = 3$). La pureza cromatográfica de las señales fue comprobada por CG-EM.

Linealidad. El estudio constó de cinco puntos, con tres réplicas cada uno. Estos puntos representaron el 50, 80, 100, 120 y 150 % de la masa de D-004 que se emplea en el análisis de las muestras, por lo que se pesaron alrededor de 50, 80, 100, 120 y 150 mg de D-004 y posteriormente, se procedió con la preparación descrita anteriormente. A partir de las masas analizadas y las áreas obtenidas, se calculó la ecuación de regresión: $y = b x + a$, por el método de los mínimos cuadrados. Para ello, se graficaron las relaciones de áreas obtenidas ($y = A_i/A_{pi}$) en función de las relaciones de masas añadidas ($y = m_i/m_{pi}$), donde A_i y m_i son el área y la masa del total de AG y A_{pi} y m_{pi} son el área y la masa del patrón interno. Se realizaron pruebas estadísticas ($p = 0,05$) para comprobar la linealidad y proporcionalidad, para lo cual se debían cumplir los criterios siguientes: coeficiente de correlación (r) $\geq 0,990$, coeficientes de variación de los factores de respuesta (CV_y) y de la pendiente (CV_b) ≤ 5 % y ≤ 2 %, respectivamente. Además, los límites de confianza del intercepto (a) debían incluir el cero.⁸⁻¹¹

Exactitud. La exactitud se evaluó por un estudio de recobrado en un intervalo de 80 a 120 % de la concentración nominal de AG. Se aplicó el método de Adición de Patrón, para lo cual se utilizó la DRA, la cual simula la proporción en que se presentan estos AG en el D-004. De esta disolución, se tomaron 1, 2 y 3 mL y se añadieron a tubos de ensayos ($n = 3$). Luego se llevaron a sequedad a 40 °C con un flujo suave de N_2 y se adicionaron 60 mg aproximadamente de D-004. Se analizaron en paralelo las muestras de D-004 sin y con adición de la mezcla patrón de AG. La diferencia de resultado de "muestra + patrón" menos "muestra" se comparó con la cantidad añadida. Con el objetivo de comprobar si la concentración afectaba los resultados se realizó una prueba de Cochran para $p = 0,05$. Los recobrados fueron calculados [(cantidad encontrada/cantidad añadida) x 100 %] y

se les realizó una prueba t de Student ($p = 0,05$) para comprobar si existían diferencias significativas con el 100 %, según la ecuación siguiente:⁸⁻¹¹

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

donde:

\bar{R} recobrado promedio obtenido.

n número de réplicas.

Precisión. Este parámetro se determinó mediante ensayos de repetibilidad (un mismo analista realizó 10 réplicas de análisis de la misma muestra, en el mismo día y en el mismo equipo) y de precisión intermedia (dos analistas analizaron tres muestras independientes con cuatro réplicas en tres días diferentes, en el mismo equipo). Se calcularon los CV (%) de la determinación de cada ácido y del contenido total, y se halló además, el límite de confianza ($LC = media \pm t \times DE/n^{1/2}$) de la determinación del contenido total de ácidos para $p = 0,05$. Para determinar si hubo diferencias significativas, se realizó una prueba ANOVA de dos vías ($p = 0,05$). Además, se consideró como criterio que los CV deberían ser ≤ 2 %.⁸⁻¹¹

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El procedimiento analítico permitió una determinación rápida, confiable y reproducible de los AG que componen el D-004 ingrediente activo. Debido a que los f_i^m de los AG individuales estuvieron alrededor de la unidad, por lo que se asumió que el $f_i^m = 1$ para el cálculo cuantitativo de cada AG, lo cual coincide con lo descrito para el análisis de AG por CG con DILL^{6,7} y demuestra que en el proceso de inyección no ocurren efectos discriminatorios.

Al estudiar la aplicabilidad del sistema, se comprobó que la resolución cromatográfica entre los ácidos $C_{16:1}$ y $C_{16:0}$ en las tres determinaciones fue mayor que el límite de aceptación (1,0); lo cual garantizó una separación adecuada de las señales de interés (Fig. 1, tabla 1). La determinación del contenido total de AG en las seis réplicas de inyección presentó un CV de 0,5 %, inferior al límite de aceptación (0,8 %). También, las retenciones relativas calculadas ($n = 3$) coincidieron con las obtenidas para los patrones de referencia, todo lo cual permitió comprobar que el sistema analítico cumplía con los criterios de aplicabilidad para ser utilizado en la validación del método.

Especificidad. En los cromatogramas obtenidos, se observó una adecuada resolución entre las señales correspondientes a los AG que componen el D-004 ingrediente activo. No se detectó interferencia con el patrón interno $C_{13:0}$ (Fig. 1), lo cual permitió su empleo como sustancia de referencia. Al analizar los cromatogramas de las muestras sometidas a condiciones de estrés no se observó la aparición de ninguna señal que interfiriera con los analitos de interés (Fig. 2). A su vez, se comprobó por CG-EM la pureza cromatográfica de las señales correspondientes a las muestras analizadas, con lo que se descartó el solapamiento de posibles productos de degradación u otras interferencias con los AG que componen el D-004. El método, por tanto, demostró ser específico para el análisis del D-004, incluso al ser este sometido a condiciones extremas, por lo que puede ser utilizado en estudios de estabilidad.

Linealidad. La ecuación de regresión calculada a partir de relaciones de masas analizadas y las relaciones de áreas obtenidas (Tabla 2) para el total de AG fue:

$$y = (0,914 \pm 0,012) x - (0,080 \pm 0,121),$$

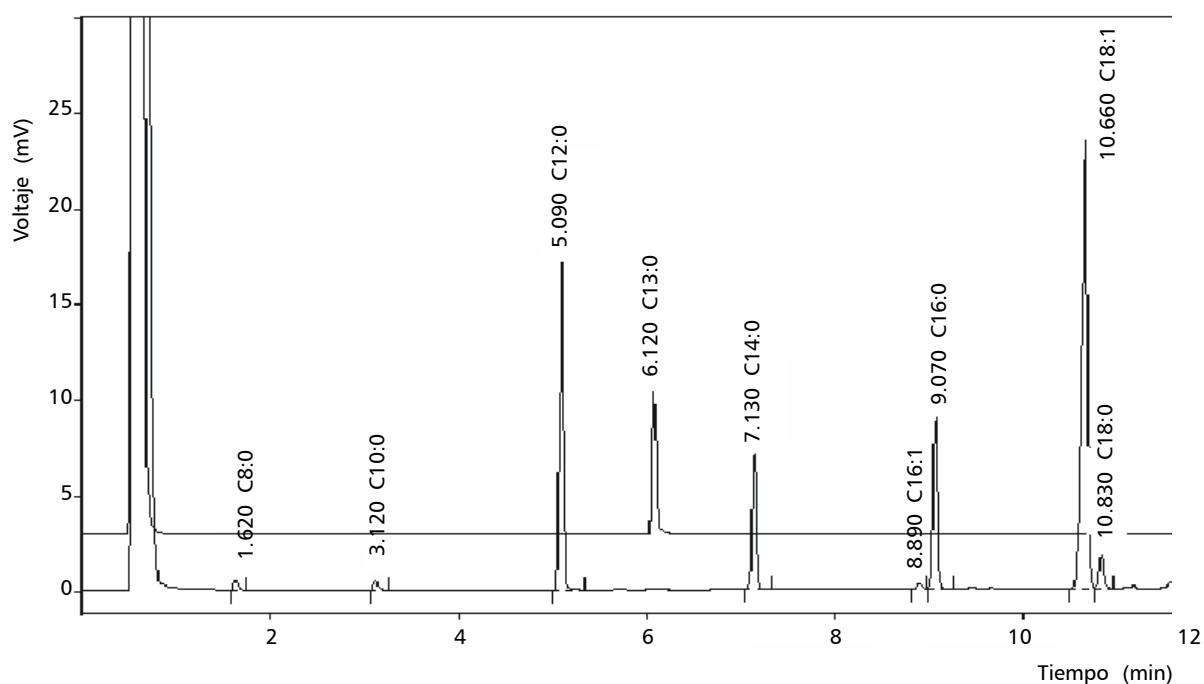


Fig. 1. Superposición de los perfiles cromatográficos de D-004 (superior) y ácido tridecanoico (C13:0) utilizado como estándar interno. Todos analizados como ésteres metílicos.

Tabla 1. Resolución cromatográfica $C_{16:1}$ - $C_{16:0}$ ($n = 3$) y cuantificación ($n = 6$).

Réplica	$R_{16:1-16:0}$	Contenido de AG (%)
1	1,47	90,6
2	1,50	90,8
3	1,54	91,2
4	—	90,9
5	—	91,6
6	—	91,7
CV (%)		0,5

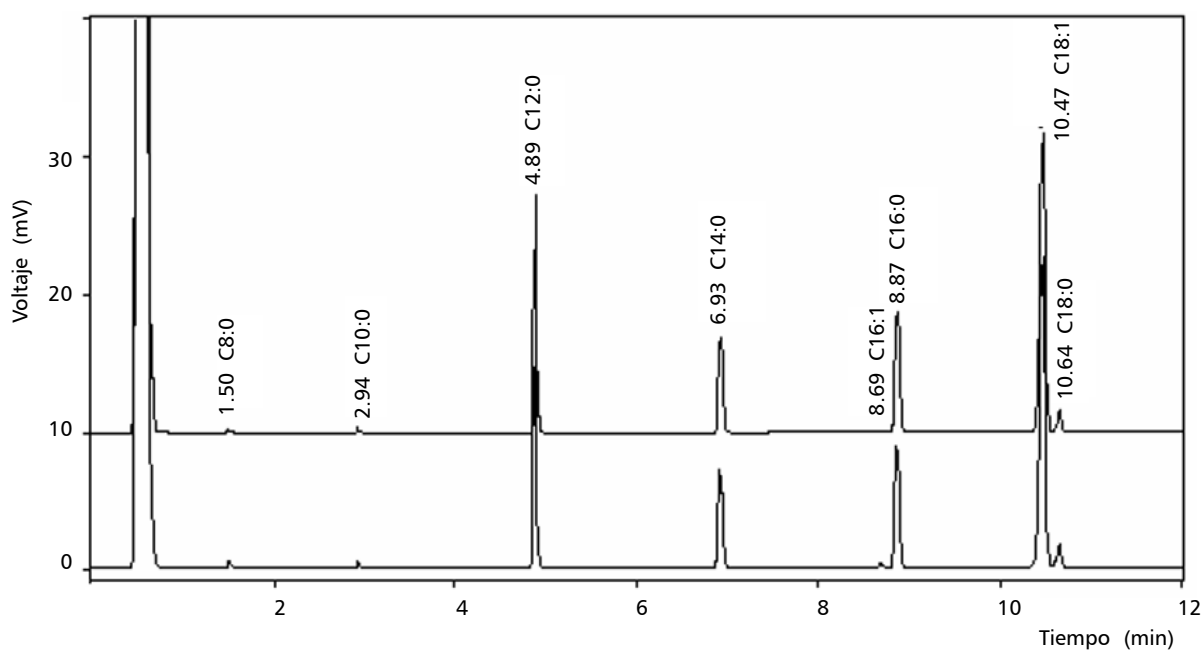


Fig. 2. Superposición de perfiles cromatográficos de D-004 (superior) y D-004 sometido a condiciones de degradación (termólisis).

Tabla 2. Resultados del ensayo de linealidad del método.

m_i/m_{pi}	A_i/A_{pi}
4,7	4,2
5,0	4,5
4,9	4,4
8,2	7,3
8,0	7,3
8,2	7,4
10,1	9,2
10,0	9,1
10,1	9,2
12,2	11,0
12,2	11,0
12,1	11,0
14,7	13,4
14,8	13,5
14,7	13,4

Tabla 3. Resultados del estudio de exactitud del método ($n = 3$)

Añadida	Masa Encontrada			Recobrado medio (%)	t_{exp}
	(mg)	1	2	3	
17,9	17,4	18,6	17,8	100,4	0,23
35,7	36,4	36,1	35,5	100,8	1,19
53,6	52,9	55,3	53,6	100,6	0,48
Total				100,6	0,93

Tabla 4. Resultados del ensayo de repetibilidad ($n = 10$).

AG	Media \pm DE (%)	CV
C _{8:0}	0,7 \pm 0,05	7,1
C _{10:0}	0,7 \pm 0,00	0,0
C _{12:0}	22,8 \pm 0,18	0,8
C _{14:0}	9,6 \pm 0,05	0,5
C _{16:1}	0,4 \pm 0,00	0,0
C _{16:0}	12,4 \pm 0,08	0,7
C _{18:1} ^a	41,8 \pm 0,23	0,6
C _{18:0}	2,6 \pm 0,05	1,9
Total	91,0 \pm 0,42	0,4

^a Incluye los ácidos C_{18:2} y C_{18:3} reportados como ácido C_{18:1}

con intervalos de confianza calculados para un 95 % de confiabilidad. El coeficiente de correlación ($r = 0,999$) fue superior al límite de aceptación (0,990), el CV de los factores de respuesta ($CV_f = 0,8 \%$) y el CV de la pendiente ($CV_b = 0,6 \%$) fueron menores que los límites de aceptación (5 y 2 %, respectivamente), y el intervalo de confianza del intercepto incluyó el cero, indicando la ausencia de sesgo. Dichos parámetros cumplieron con los criterios exigidos,⁸⁻¹¹ por lo que se pudo considerar que el método es lineal en el intervalo de masas estudiado.

Exactitud. En este ensayo los recobrados promedios obtenidos estuvieron entre 100,4 y 100,8 % (Tabla 3). Al aplicar la prueba estadística t se encontró que no había diferencias significativas entre los recobrados y el 100 %, al ser las t_{exp} inferiores a las t tabuladas para un 95 % de confiabilidad (4,30 para los puntos individuales y 2,31 para el promedio). También se detectó que las varianzas de las determinaciones en las diferentes concentraciones utilizadas eran equivalentes, al ser la G_{exp} (0,59) $< G_{tab}$ (0,87), lo cual indica que el factor concentración no influyó en la variabilidad de los resultados. En tal sentido, se encontró que existía una adecuada correlación entre las masas teóricas y las encontradas en la práctica (mg), al ser $r = 0,999$ y $p < 0,000$ 1. La ecuación de regresión fue:

$$y = (1,016 \pm 0,041) x - (0,241 \pm 1,575),$$

lo cual demuestra que la pendiente incluye al 1 y al quedar incluido el cero en el intervalo de confianza del intercepto no existe sesgo.⁸⁻¹¹ Estos resultados confirman que el método es exacto en todo el intervalo de concentraciones estudiado.

Precisión. En el ensayo de repetibilidad los CV variaron de la forma esperada, de acuerdo con los contenidos individuales de los AG del D-004 (Tabla 4). Así, la dispersión más alta se obtuvo para el componente que se encuentra en menor proporción: el C_{8:0}, sin embargo esto no afectó la dispersión de la determinación para el total, cuyo CV = 0,4 % asegura la repetibilidad de los resultados al ser aplicado el método, pues es inferior al límite de aceptación comúnmente exigido para este tipo de análisis (2 %).⁸⁻¹¹ Al estudiar la precisión intermedia (Tabla 5), la determinación realizada por los dos analistas en los tres días de estudio ($n = 24$) presentó un CV = 0,6 %, resultado inferior al límite de aceptación (2 %);² lo que indica que los factores *analista* y *día* no influyeron en la precisión de los análisis. También se constató, mediante la prueba de ANOVA, ausencia de diferencias significativas entre ambas series de resultados en cuanto a la determinación del contenido

Tabla 5. Resultados del ensayo de precisión intermedia.

Contenido de AG (%)						
Analista						
Réplicas	1			2		
	1	2	Día 3	1	2	3
1	90,5	90,7	90,4	90,4	90,5	90,0
2	91,1	91,5	90,4	91,3	90,1	90,2
3	91,6	90,8	90,6	91,6	90,0	89,3
4	90,6	90,8	89,9	91,1	91,1	90,8
Media (%) \pm DE	90,7 \pm 0,48			90,5 \pm 0,66		
CV (%)	0,5			0,7		

de AG totales ($p = 0,43$), lo cual confirma la adecuada precisión del método. Los LC calculados en este ensayo fueron: $(90,6 \pm 0,3) \%$.

CONCLUSIONES

El método analítico propuesto para la determinación del contenido de los AG en el D-004 ingrediente activo, cumplió con los requerimientos para considerarse validado, demostrando ser específico, lineal, exacto y preciso. De esta manera el método puede ser utilizado en el proceso de control de calidad y estudios de estabilidad de este ingrediente activo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bhargava S., Canda A.E. and Chapple C.R. A rational approach to benign prostatic hyperplasia evaluation: recent advances. **Curr. Opin. Urol.**, **14**,1-6, 2004.
2. Bent S., Kane C., Shinohara K., Neuhaus J., Hudes E.S., Godelberg H. and Avins A.L. Saw palmetto for benign prostatic hyperplasia. **N. Engl. J. Med.**, **354**, 557-566, 2006.
3. Laguna A., *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.
4. Carbajal D., Arruzazabala M.L., Mas R., *et al.* Effects of D-004, a Lipid Extract from Cuban Royal Palm Fruit, on Inhibiting Prostatic Hyperplasia Induced with Testosterone or Dihydrotestosterone in a Rat Model: A Randomized, Controlled Study. **Curr. Ther. Res.**, **65**, 505-514, 2004.
5. Carbajal D., Molina V., Mas R. and Arruzazabala M.L. Therapeutic effect of D-004, a Lipid Extract from *Roystonea regia* fruits, on prostate hyperplasia induced rats. **Drugs Exp. Clin. Res.**, **31**, 193-197, 2005.
6. Marrero D. Obtención y determinación de ácidos grasos de muy elevada masa molecular. **Revista CENIC Ciencia Químicas**, **37**, 23-33, 2006.
7. Christie W.W. The preparation of derivatives of fatty acids. In *Gas Chromatography and Lipids-A Practical Guide*. Christie W.W. (ed.) Scotland, The Oily Press, 64-84, 1989.
8. 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.
9. Green C. A step-by-step approach to establishing a method validation program. **J. Validation Technology**, **6**, 622-33, 2000.
10. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Methodology Q2B, 1996.
11. Regulación No. 41-2007 "Validación de métodos analíticos", Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos, Cuba, 2007.
12. Novák J. Quantitative Analysis by Gas Chromatography, Second Edition, Cazes J. (ed.) New York, Marcel Dekker, 79-135, 1988.