



## GC Determination of Long and Very Long Chain Fatty Acids (C<sub>24:0</sub>-C<sub>36:0</sub>) that Compose D003 in 5-mg Film-coated Tablets by a Fast Methylation Method

Ernesto J. MENDEZ\*, David MARRERO & Víctor. G. CANAVACIOLO

*Center of Natural Products, National Center for Scientific Research,  
Cubanacán, Playa, PO Box 6414, Havana City, Cuba*

**SUMMARY.** A fast gas chromatographic methodology for determining 5-mg of D003 (active ingredient consisting of a mixture of free saturated long and very long chain fatty acids, from C<sub>24:0</sub> to C<sub>36:0</sub>, with antioxidant, antiosteoporotic, antiplatelet and cholesterol-lowering effects) in film-coated tablets was validated. This methodology applied first a hot-extraction of the fatty acids from tablets with chloroform. Then, it involved simultaneously the steps of methylation with a 2% sulphuric acid-methanol and the extraction of the formed esters with n-hexane. The gas chromatographic analysis was carried out using a DB-5 wide-bore column and nonadecanoic acid as internal standard. While 90 min had been proved to be necessary to reach the maximum efficiency for D003 methylation reaction in a previous GC method validated with the same aim, only 10 min were enough by the current method. Validation assays, applied to latter method, proved: good linearity (correlation coefficient higher than 0.9991, RSD of slope and RSD of response factors were 0.99% and 1.42%, respectively, and no bias) and accuracy (average recovery from 98.7 to 101.1%) over a range 38-150% of the nominal concentration. Good specificity was also proved, even for samples subject to stress conditions. Intra-day and inter-day precision at the nominal concentration were characterized by RSDs of 1.06% and 0.8%, respectively, and non-difference in the quantitative results by the current method with the previous method was demonstrated too. With regards to previous method, the current method was found more suitable for quality control and stability studies of these film-coated tablets.

**RESUMEN.** "Determinación de los Ácidos Grasos de Alto y Muy Alto Peso Molecular que Componen el D003 (C<sub>24:0</sub>-C<sub>36:0</sub>) en Tabletas Recubiertas con Dosis de 5 mg a través de un Método Rápido de Metilación que emplea la Cromatografía de Gases". Fue validada una metodología rápida para determinar 5 mg de D003 (ingrediente activo que consiste en una mezcla de ácidos grasos de alto y muy alto peso molecular, desde el C<sub>24:0</sub> hasta el C<sub>36:0</sub>, con efectos antioxidantes, antiosteoporóticos, antiagregante plaquetario e hipocolesterolemico) en tabletas recubiertas empleando la Cromatografía de Gases (CG). Esta metodología aplicó primeramente una extracción de los ácidos grasos presentes en las tabletas usando cloroformo caliente, después involucró simultáneamente los pasos de metilación con un 2% de ácido sulfúrico en metanol y de extracción de los ésteres formados con n-hexano. El análisis cromatográfico se realizó en una columna DB-5 de amplio diámetro y como patrón interno se utilizó el ácido nonadecanoico. Mientras 90 min son necesarios por un método previamente validado con igual objetivo para alcanzar la eficacia máxima en la reacción de metilación, sólo 10 min fueron suficiente por el método actual. La validación de este último demostró adecuadas linealidad (coeficientes de correlación mayor de 0,9991, el RSD de la pendiente y el RSD de los factores de respuesta fueron 0,99% y 1,42%, respectivamente, y ningún sesgo) y exactitud (recobrados promedio entre 98,7% y 101,1%) en un rango entre 38 % y 150 % de la concentración nominal. La especificidad fue también adecuada, incluso para las muestras sujetas a condiciones de estrés. La precisión en el mismo día y en días diferentes presentó RSD de 1,06 % y 0,80 %, respectivamente. No se encontraron diferencias en los resultados cuantitativos entre el método actual y el previamente validado. Los resultados obtenidos demostraron que el actual método es más adecuado para el control de la calidad y los estudios de estabilidad de las tabletas analizadas.

**KEY WORDS:** D003 tablets, Fast methylation method, GC analysis, Long and very long chain fatty acids (C<sub>24</sub>-C<sub>36</sub>), Validation.

**PALABRAS CLAVE:** Ácidos grasos de alto y muy alto peso molecular (C<sub>24</sub>-C<sub>36</sub>), Análisis por CG, Metilación rápida, Tabletas de D003, Validación.

\* Author to whom correspondence should be addressed. *E-mail:* ejmantolin@yahoo.es