

## DESARROLLO Y VALIDACION DE UN METODO ANALITICO (HPLC-RP) PARA LA DETERMINACION DE LEVAMISOL

Jaime H. Rojas\*<sup>1</sup>, Rosalba Guevara\*\*, Ligia A. Leiva\* y Gabriel Rodríguez\*

\* Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Farmacia, AA 14490, Santafé de Bogotá, Colombia,

\*\* Instituto Colombiano Agropecuario ICA, 1 E-mail: jairoja@ciencias.ciencias.unal.edu.co

### RESUMEN

El levamisol se utiliza ampliamente en el medio veterinario como agente antiparasitario. En este artículo se presentan los resultados obtenidos durante el proceso de estandarización y validación de un método de análisis para la determinación de levamisol clorhidrato en medicamentos de uso veterinario. El método consiste en una separación cromatográfica en fase inversa mediante una columna de octadecilsilano C18 y detección espectrofotométrica a 220 nm.

**Palabras claves:** levamisol, cromatografía líquida, C18, detección ultravioleta, estandarización, validación.

### SUMMARY

#### DEVELOPMENT AND VALIDATION OF AN ANALYTICAL METHOD (HPLC-RP) FOR THE DETERMINATION OF LEVAMISOLE

A reverse high performance liquid chromatography method was developed for the quantitative assay of levamisole hydrochloride, a drug substance used in veterinary for the treatment of endoparasitaries sickness. The method was validated and then applied to the assay of levamisole in veterinary drug products. A C18 column was used and the detection was performed at 220 nm.

**Key words:** levamisole, high performance liquid chromatography, C18, UV detection, standardised, validation.

### INTRODUCCION

El levamisol es un fármaco de amplio espectro empleado en medicina veterinaria para el tratamiento de enfermedades endoparasitarias especialmente en ganado vacuno y porcino (1-3). En el medio veterinario de nues-

tro país se ha cuestionado su eficacia sin que haya una explicación racional al respecto; ello puede deberse al empleo de materias primas de baja calidad, cambio de proveedores como es frecuente en nuestro país, a la elaboración de productos que no satisfacen las necesidades del consumidor final o aún al empleo de procedimientos analíticos incorrectos.

Los métodos de análisis reportados en la literatura carecen de sensibilidad y especificidad apropiadas (4-7) al igual que el método oficial establecido por la Farmacopea Británica (8) el cual consiste en una titulación en medio no acuoso tanto para control de materia prima como de producto terminado. A ello se suma la baja capacidad de absorción de radiación ultravioleta por parte de la molécula de levamisol.

En el presente trabajo se presentan los resultados obtenidos en la estandarización y validación de un método de análisis por HPLC en fase inversa, empleando una columna de octadecilsilano y detección por espectrofotometría ultravioleta a 220 nm (9).

### PARTE EXPERIMENTAL

#### Materiales

**Equipos:** Cromatógrafo líquido Perkin Elmer con Integrador Perkin Elmer LCI 100, Detector UV Waters Ass. 434, Inyector Ass U6K, Bomba Waters Ass. 584, Columna microBondapack (100 x 5 mmID, 5 mm), Membranas Milipore 47 x 13 mm, 0.45 mm, Microjeringa Hamilton, Equipo de filtración Milipore.

**Reactivos:** Levamisol clorhidrato patrón de referencia (99.8% Cyanamid), MeOH HPLC Merck. Otros reactivos RA empleados fueron : AcOH glacial, ácido hexanosulfónico, acetofenona, benzaldehído, AcOEt, CHCl<sub>3</sub>, carbonato de amonio, HCl, NaOH.

Recibido para su publicación: 4 de agosto de 1997

Aprobada su publicación: 22 de agosto de 1997

### Estandarización del Sistema Cromatográfico

De acuerdo a las propiedades espectroscópicas del levamisol se seleccionó 220 nm como longitud de onda para la determinación y para cada una de las fases móviles ensayadas (Tabla 1) se empleó una atenuación de 128 y un flujo de 1 mL/min. La concentración de levamisol empleada fue de 800 mcg/mL y un volumen de inyección de 25 microlitros.

**Tabla 1 . Fases móviles estudiadas para la determinación de levamisol por HPLC en fase reversa**

	Fase Móvil	Composición
1	Agua-Metanol* -Acido acético	55:45:1
2	Agua-Metanol- Acido acético	55:45:1
3	Agua-Metanol* -Acido acético	75:25:1
4	Agua-Metanol-Acido acético	75:25:1
5	Agua-Metanol-Acido acético	65:35:1
6	Agua-Metanol*	55:45
7	Metanol-Carbonato de Amonio 0.005M	55:45

\* Metanol con ácido hexanosulfónico en concentración 0.005M

Luego de seleccionar la fase móvil más adecuada se realizaron estudios de variación de flujo entre 0.5 y 1.5 mL/min y se verificó la longitud de onda de máxima absorción del levamisol en la misma. Bajo las condiciones optimizadas se ensayaron soluciones en etanol de acetofenona y de benzaldehido (10) con el propósito de seleccionar el estándar interno.

Para la optimización de la extracción del levamisol se preparó un producto de composición similar a uno comercial y se ensayaron AcOEt y CHCl<sub>3</sub> como solventes para la extracción. El proceso de extracción optimizado consistió en una alcalinización con NaOH, extracción con AcOEt, evaporación del solvente y disolución del residuo en MeOH previa adición de 1 mL de HCl 1N.

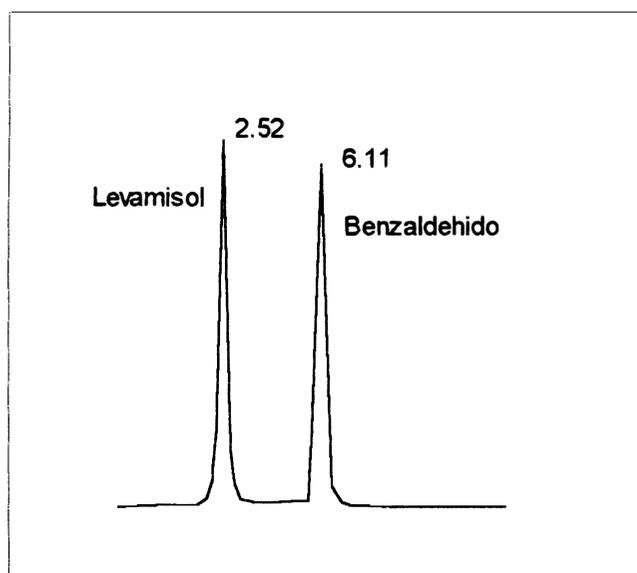
### Validación del Método de Análisis

Una vez optimizado el proceso de separación se procedió a validar el método analítico propuesto para lo cual se estudiaron los siguientes parámetros: selectividad, linealidad del sistema y del método, precisión, exactitud, límites de detección y de cuantificación y sólidez.

### RESULTADOS Y DISCUSION

Los cromatogramas obtenidos con las fases móviles que contenían ácido hexanosulfónico 0.005 M presentaban asimetría, mientras que con la fase móvil No.2 el tiempo de retención del levamisol era muy próximo al del solvente. La fase móvil No.5 produjo los mejores resultados, presentando el levamisol un tiempo de retención de 2.52 minutos y un factor de asimetría de 1.31 (Fig. 1). Como flujo óptimo se estableció 1 mL/min.

Como estándar interno se eligió el benzaldehido de-



**Figura 1.** Cromatograma ilustrativo de la separación entre levamisol y el estándar interno benzaldehido

bido a que la acetofenona estudiada presentó dos picos cromatográficos, uno de los cuales con un tiempo de retención cercano al del levamisol. La concentración de benzaldehido empleada fue de 125 mcg/mL y su tiempo de retención de 6.11 minutos (Fig. 1).

Los porcentajes de extracción del levamisol clorhidrato con los solventes CHCl<sub>3</sub> (99.20, 99.35 y 99.29%) y AcOEt (99.30, 99.25 y 99.32%) fueron similares; sin embargo por cuestiones de orden práctico se continuó con éste último.

**Linealidad.** Luego de estudios con concentraciones de levamisol clorhidrato entre 100 y 2000 mcg/mL se verificó la linealidad del sistema (n=40) y del método (n=20) con concentraciones entre 100 y 500 mcg/mL.

La Figura 2 presenta los datos obtenidos para la linealidad del método.

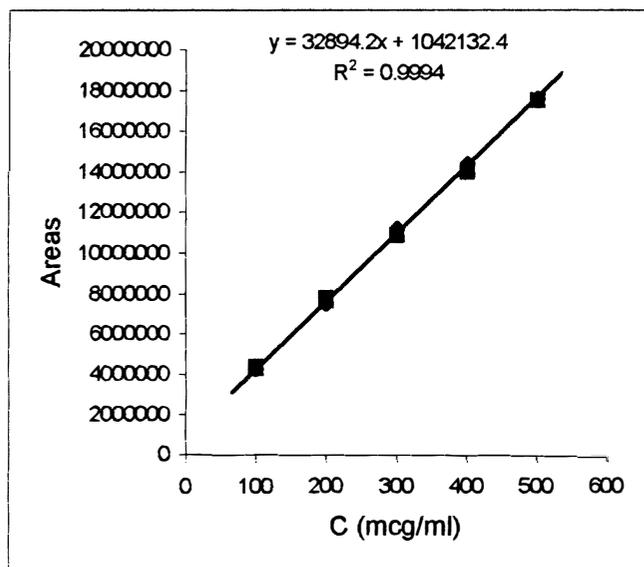


Figura 2. Curva de calibración para el método

Los valores de t para interceptos y pendientes en ambos casos indicaron valores significativamente diferentes de cero (Tabla 2). La ecuación de la recta para el método y el valor del respectivo coeficiente de determinación se encuentra sobre la figura. La Tabla 3 que presenta el análisis de varianza de la regresión indica la linealidad del método.

**Precisión y Exactitud.** Los coeficientes de variación encontrados para el sistema y para el método, 0.78 y 1.06% respectivamente, se determinaron mediante seis inyecciones del estándar (300 mcg/mL) o de alícuotas (300 mcg/mL) provenientes de la extracción de una muestra placebo adicionada del estándar.

Tabla 2. Valores de interceptos y pendientes para linealidad del sistema y del método\*

	Parametro	Valor	Error Std.	t exp
S	Intercepto	1107826.97	123089.53	9.00
	Pendiente	32651.67	371.1289	87.95
M	Intercepto	1042132.40	64663.80	16.140
	Pendiente	32894.21	194.97	168.70

\*S: sistema, t cal (38, 0.05): 2.025  
M: método, t cal (18, 0.05): 2.101

Tabla 3. Anova de la regresión para linealidad del método

Fuente	Gl	SC	CM	Fexp
Regresión	1	4.3281x10 <sup>14</sup>	4.3281x10 <sup>14</sup>	28191.6
Error	18	2.7634x10 <sup>11</sup>	1.5352x10 <sup>10</sup>	
Desvio	3	5.7339x10 <sup>10</sup>	1.9113x10 <sup>10</sup>	1.309
Dentro	15	2.1901x10 <sup>11</sup>	1.4600x10 <sup>10</sup>	0.951
Total	19	4.3309x10 <sup>14</sup>		

F<sub>tab</sub> (1/18, 0.05) : 4.41; F<sub>tab</sub> (3/15, 0.05) : 3.29

La exactitud del método se determinó al mismo nivel de concentración mediante análisis completo de seis muestras independientes. La recuperación media observada de 99.31% indica un método exacto; se calculó además un coeficiente de variación de 1.05% y un valor de t de 1.62 inferior al valor de t de la tabla de Student, 2.57.

**Límites de Detección y de Cuantificación.** Mediante el método de curvas de calibración a bajas concentraciones se calcularon valores de 0.17 mcg/mL para el límite de detección y de 0.36 mcg/mL para el límite de cuantificación.

**Selectividad.** La selectividad del método se analizó frente a los ingredientes placebo de un producto típico así como por análisis de muestras de levamisol sometidas a procesos de degradación por hidrólisis ácida y alcalina y a exposición solar por un período de dos meses.

No se observó la presencia de señales extrañas por los procesos de degradación bajo las condiciones cromatográficas establecidas. En cuanto a los auxiliares de formulación se observaron únicamente dos señales cromatográficas con tiempos de retención de 7.62 y 32.13 minutos correspondientes al metilparabeno y al propilparabeno respectivamente, demostrándose así la selectividad del método (Fig. 3). La Figura 4 representa el cromatograma obtenido luego del proceso de extracción con AcOEt y adición del estándar interno; se observa únicamente la señal correspondiente al metilparabeno y no se indica la del propilparabeno que aparece a 32.13 minutos.

**Solidez.** Esta característica se demostró mediante pequeñas variaciones de algunos parámetros del método y análisis estadístico siguiendo un diseño de Plackett Burman (Tabla 4). Para todas las variables estudiadas se encontró que la diferencia del producto de la desviación estándar de la precisión del método por la raíz cuadrada de 2 fue mayor que la diferencia observada para cada nivel de la variable estudiada, concluyéndose que el método es sólido frente a las variaciones realizadas.

**Tabla 4. Influencia de la variación de algunos parámetros en la respuesta**

Variable	1	2	3	4	5	6	Diferencia*
Temperatura	22	22	22	15	15	15	159778.0
Analista	2	1	1	2	2	1	23252.6
Día	2	1	1	2	2	1	139421.3
Preparación (hr.)	24	1	24	1	1	24	84794.7
Almacenamiento °C	20	20	5	5	20	5	96970.7
Area	11294014	11113679	10957690	11021366	10845215	1109468	---

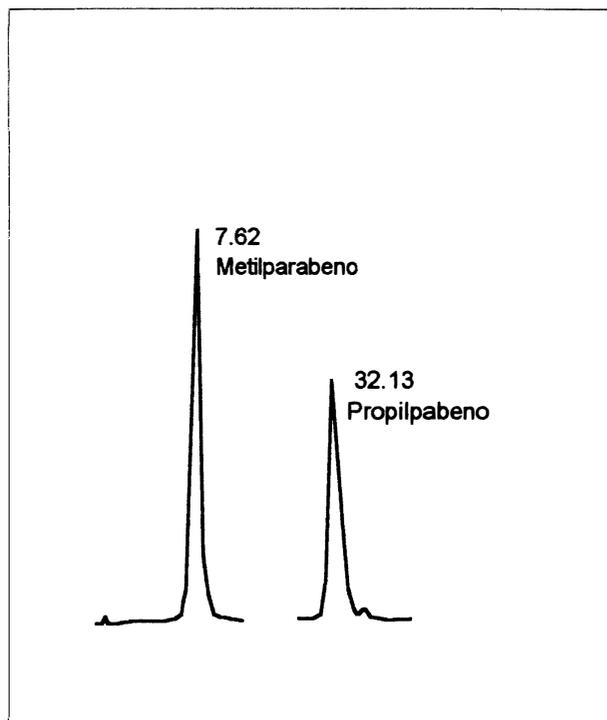
\*media límite superior - media límite inferior.  
 Desviación estandar del método x 1.4142 = 161800

El método validado se aplicó a la determinación de levamisol en muestras placebo adicionadas de estandar a la concentración crítica (7.5 mg/mL), tanto por el método del estandar externo como del estandar interno (n=8). Las cantidades encontradas fueron respectivamente 7.485 y 7.535 mg/mL con desviaciones estandar respectivas de 0.067 y 0.032 y coeficientes de variación de 0.89 y 0.42%.

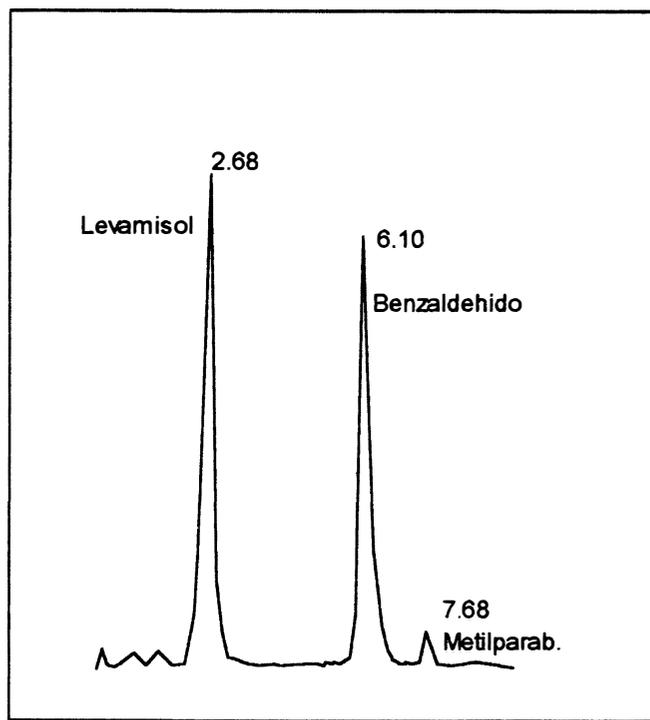
**CONCLUSIONES**

Un método de análisis preciso, exacto, sólido y reproducible fue desarrollado y validado para la determi-

nación cuantitativa de levamisol en productos para uso veterinario como parte de su control de calidad. El método es selectivo frente a los auxiliares de formulación y productos de descomposición pero no discrimina entre levamisol y dexamisol, isómero dextro del primero. En un próximo artículo se tratará de la separación de estos enantiómeros. Sin embargo, si la materia prima empleada en la elaboración del producto ha sido controlada en cuanto a su rotación óptica, el método en fase inversa desarrollado es adecuado para su aplicación en control



**Figura 3.** Selectividad del sistema frente a los auxiliares de formulación



**Figura 4.** Cromatograma obtenido a partir de un inyectable adicionado del estandar interno

de calidad y teniendo en cuenta su estabilidad, para estudios relacionados con este aspecto.

**Agradecimientos**

Se agradece al Instituto Colombiano Agropecuario ICA-LANIP por su apoyo financiero para la realización del presente trabajo.

**BIBLIOGRAFIA**

1. C.H. Gibbs, et al., *Food Animal Practices*, **2**, 483 (1988).
2. D.C. Blood, J.A. Henderson y O.M. Radostits, "Medicina Veterinaria", 6<sup>a</sup>. Ed., Interamericana, 1988, p. 995.
3. D. Parra, "Los parásitos y su importancia en ganadería", I Simposio Colombiano en Ganado Lechero", Bogotá, Colombia, 1981, p. 25-36.
4. S. Mariner, E.A. Galbraith y J.H. Bogan, *Analyst*, **105**, 993 (1980).
5. T. Mizutani, *J. Liq. Chrom.*, **8**, 925 (1985).
6. D. Mourot, B. Delepine, J. Boisseau y G. Gayot, *J. Pharm. Sci.*, **68**, 796 (1979).
7. M. Alvinerie, P. Galtier y G. Escoula, *J. Chrom.*, **223**, 445 (1981).
8. The British Pharmacopoeia, Her Majesty's Stationary Office, London, 1988. p. 331.
9. L. A. Leyva y G. Rodriguez, "Determinación de Levamisol en Medicamentos de Uso Veterinario", Tesis de Grado, Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Farmacia, 1996.
10. E.J. Kikta, A.E. Stange, *J. of Chrom.* **138**, 41 (1977).