

# DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO BIOANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE LASALOCIDA SÓDICA EN LECHE CRUDA BOVINA\*

Alejandro Jerez<sup>1</sup>, Fernando Wittwer<sup>2</sup>, Ricardo Chihuilaf<sup>2</sup>, Mirela Noro<sup>2</sup>, Rene Anrique<sup>3</sup>,  
María Nella Gai<sup>4</sup>

Institutos de <sup>1</sup>Farmacia, <sup>2</sup>Cs. Clínicas Veterinarias, <sup>3</sup>Producción Animal, Universidad Austral de Chile, Valdivia, <sup>4</sup>Depto. Cs. y Tec. Farmacéuticas, Universidad de Chile, Santiago.

E-mail: [alejandrojerez@uach.cl](mailto:alejandrojerez@uach.cl)

## INTRODUCCIÓN

La demanda de leche para exportación ha aumentado considerablemente en Chile en los últimos años como consecuencia de la apertura de nuevos mercados (Gariazzo, 2004). De ello se desprende la necesidad de cumplir con las exigencias de bioseguridad de los países receptores para estos productos como una manera de lograr su aseguramiento. En la producción lechera nacional se ha permitido el uso de ionóforos, tales como la monensina y la lasalocida (SAG, 2007; 2009), los cuales no deben encontrarse en leche bovina de exportación. Este estudio tuvo como objetivo elaborar y validar un método para la determinación de lasalocida en leche cruda según las exigencias de la FDA para métodos bioanalíticos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Para el desarrollo de la técnica se utilizó un cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia (Shimadzu Prominence) equipado con detectores de arreglo de diodos (DAD) y de fluorescencia, autosampler, horno, bomba y desgasificador. La columna correspondió a una Kromasil C18, 250 mm x 4,6 mm. La fase móvil fue metanol:agua:TFA 0,45% en proporciones de 90:10:3. La detección UV fue a 305 nm y la de fluorescencia a 310 ex y 440 em. La velocidad de flujo fue de 1,2 mL/min, la temperatura de 25°C y el volumen de inyección de 100 µL. Como estándar se empleó lasalocida sódica (Alpharma Inc) con un grado de pureza del 95,1%. Muestras de leche de estanco fueron obtenidas de un rebaño lechero cuya dieta estaba basada en pastoreo y suplementado con 4 kg/vaca/d de concentrado libre de aditivos. La leche fue transportada refrigerada al laboratorio y procesada en un tiempo no superior a 24 horas luego de la ordeña. Las muestras fueron fortificadas y la extracción del compuesto fue del tipo líquido-líquido utilizando diclorometano y metanol, para luego llevar a sequedad en corriente de nitrógeno y reconstituir en fase móvil para proceder a la inyección en el equipo. Para la confirmación de la pureza de la señal cromatográfica del compuesto se utilizó el detector DAD y la función de índice de pureza del software cromatográfico. Para la validación de la metodología se utilizó como referencia la guía para validación de métodos bioanalíticos de la FDA (FDA, 2001). Dentro de la validación de la metodología se determinó la linealidad y el rango de la curva de calibración en solvente y en la matriz, la precisión respecto a repetibilidad y precisión intermedia, la exactitud, estabilidad frente a ciclos de congelamiento y descongelamiento en la leche y en la solución stock.

Adicionalmente, para ensayar la metodología se administró la lasalocida sódica por vía oral a una vaca Frisón Negro en lactancia durante 18 días. Los primeros 10 días a dosis de 300 mg/día; del día 11 al 14 una dosis de 450 mg y del día 15 al 18 una dosis de 600 mg.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La curva de calibración obtenida cubrió el rango de 0,5 a 3,0 µg/mL con un total de 6 puntos (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0). El límite más bajo de cuantificación fue de 0,5 µg/mL con una

---

\* Proyecto M2P8, Consorcio Lechero financiado por FIA (FIC-CS-C2004-1-P-001)

recuperación media (n = 6) de 85,1% y un CV de 8,050%. El coeficiente de correlación en leche fortificada fue de 0,9999. Para la precisión, en repetibilidad se utilizaron 5 inyecciones en los niveles de concentración de 0,5; 1,5 y 3,0 µg/mL obteniéndose valores de CV de 8,006%, 6,418% y 7,169% respectivamente. En el caso de la precisión intermedia estos valores fueron de 8,006%, 5,622% y 4,787%, respectivamente. En la determinación de exactitud y recuperación se utilizaron concentraciones de 0,5; 1,5 y 3,0 µg/mL. Los resultados promedios de recuperación de 5 inyecciones fueron de 85,1%; 89,5% y 79,0%, respectivamente. Las muestras demostraron ser estables luego de ser congeladas por 24 horas a -30°C.

En las muestras de leche obtenidas diariamente del animal al cual se le administró lasalocida, no se detectó este compuesto, lo que podría indicar que el compuesto no es excretado en la leche a las dosis administradas.

## **CONCLUSIÓN**

Se desarrolló y validó un método bioanalítico para la detección de la lasalocida sódica en leche cruda de acuerdo a las exigencias de la FDA para métodos bioanalíticos. Preliminarmente, en leche de vaca suplementada con lasalocida no se detectó el compuesto utilizando el método validado.

## **REFERENCIAS**

- FDA, Food and Drug Administration, USA. 2001. Guidance for Industry – Bioanalytical Method Validation.
- GARIAZZO, A. 2004. Tratados de Libre Comercio y desafíos competitivos para Chile. CEPAL. Pp. 1-78.
- SAG, Servicio Agrícola y Ganadero, Chile. 2007. Número de registro 192 – B.
- SAG, Servicio Agrícola y Ganadero, Chile. 2009. Número de registro 1951 - B.