



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“Propuesta de una metodología para la
determinación de clenbuterol en orina
mediante extracción por sorción en barra
magnética seguida de cromatografía de gases
(SBSE-GC)”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO

PRESENTA:

JERÓNIMO ALEJANDRO CABRERA PERALTA



MÉXICO, D. F.

2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Rojo Callejas Francisco

VOCAL: Profesor: García Valdés José de Jesús

SECRETARIO: Profesor: Peña Álvarez Araceli Patricia

1er. SUPLENTE: Profesor: Esturau Escofet Nuria

2° SUPLENTE: Profesor: Gama González Silvia Citlalli

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 101, División de Estudios de Posgrado, Edificio B, Facultad de Química,
Ciudad Universitaria, México, D. F.

ASESOR DEL TEMA

Araceli P. Peña Álvarez

SUPERVISOR TÉCNICO

Rocío del Carmen Juárez Ciprés

SUSTENTANTE

Jerónimo A. Cabrera Peralta

Abreviaturas utilizadas

WADA	Agencia Mundial Antidopaje (<i>World Anti Doping Agency</i>)
MRPL	Nivel de desempeño mínimo requerido (<i>minimum required performance level</i>)
CONADE	Comisión Nacional de Cultura Física Deporte
GC	Gas Chromatography
CL	Cromatografía de líquidos
EM	Espectrometría de masas
UDT	Unidad de desorción térmica
PTV	Vaporizador de temperatura programable (<i>programmable temperature vaporizator</i>)
SIM	Monitorización selectiva de iones (<i>single ion monitoring</i>)
LD	Límite de detección
DER	Desviación estándar relativa
CV	Coefficiente de variación
PDMS	Polidimetilsiloxano
EG	Etilenglicol
BSTFA	N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida
MTBSTFA	N-metil-N-(t-butildimetilsilil)trifluoroacetamida
MSTFA	N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida
TMCS	Trimetilclorosilano
TMIS	trimetilyodosilano
SBSE	Extracción por sorción en barra magnética (<i>stir bar sorptive extraction</i>)
SPME	Microextracción en fase sólida (<i>solid phase micro extraction</i>)

Resumen

Se propuso una metodología para la determinación de clenbuterol en orina mediante extracción por sorción en barra magnética seguida de cromatografía de gases (stir bar sorptive extraction – gas chromatography, SBSE-GC) para su aplicación como prueba antidopaje. Los parámetros experimentales optimizados fueron derivatización, acondicionamiento de la barra extractante, disolvente de desorción y pH de extracción. La derivatización fue óptima con BSTFA a 80 °C por 30 min. La extracción de clenbuterol fue mayor a pH alcalino. Al utilizar acetonitrilo como disolvente de desorción se observaron menos impurezas en los cromatogramas. El acondicionamiento de la barra es importante para activar el polímero para la extracción, aumentando la sensibilidad y la precisión del análisis. Al aplicar el método optimizado a una muestra de orina fortificada a 500 ng mL⁻¹ se determinó el clenbuterol con precisión (CV=10.63 %). Se determinó la linealidad del método ($R^2=0.9896$), sin embargo, no se obtuvo reproducibilidad debido a que el pH alcalino (pH=10.72) degradaba la fase polimérica de la barra de extracción.

Índice

1. Introducción.....	6
2. Justificación del proyecto	8
3. Objetivos.....	8
3.1. Objetivo general.....	8
3.2. Objetivos particulares	8
4. Antecedentes.....	9
4.1. Agencia Mundial Antidopaje.....	9
4.2. Comisión Nacional de Cultura Física y Deporte	9
4.3. Clenbuterol	10
4.4. Preparación de muestra.....	12
4.4.1. Extracción por sorción en barra magnética (SBSE)	13
4.4.2. Derivatización	17
4.5. Cromatografía	18
4.5.1. Cromatografía de gases.....	20
4.5.2. Sistema acoplado CG-EM	27
5. Desarrollo experimental	30
5.1. Material y equipo.....	30
5.1.1. Reactivos, disolventes y materiales	30
5.1.2. Instrumentación	30
5.1.3. Recolección de muestra	31
5.2. Desarrollo experimental	31
5.2.1. Disoluciones estándar	31
5.2.2. Acondicionamiento inicial de la barra de extracción	31
5.2.3. Optimización de parámetros experimentales.....	32
5.2.4. Análisis en orina fortificada con clenbuterol	34
5.2.5. Metodología optimizada	35
3.2.6. Curva de calibración	36

6. Resultados y discusión de resultados.....	37
6.1. Optimización de la metodología.....	37
6.2. Análisis en orina fortificada con clenbuterol.....	41
6.3. Curva de calibración.....	42
7. Conclusiones.....	44
8. Bibliografía.....	45

1. Introducción

Los agonistas del receptor adrenérgico β_2 se caracterizan por producir uno de los efectos característicos de la adrenalina: la relajación del músculo liso. Una de las principales aplicaciones farmacéuticas de estas sustancias es el tratamiento de problemas pulmonares tales como el asma, sin embargo, también poseen ciertos efectos anabólicos por lo que son utilizados ilegalmente en la ganadería intensiva y en el dopaje. El clenbuterol se clasifica como un agonista del receptor adrenérgico β_2 .

La Agencia Mundial Antidopaje (*World Anti Doping Agency, WADA*), la organización encargada de armonizar los códigos antidopaje a nivel mundial, indica que todo análisis antidopaje se debe realizar mediante cromatografía de gases o líquidos acoplada a espectrometría de masas (CG-EM y CL-EM, respectivamente). Debido a que en la mayoría de los análisis antidopaje se desea determinar sustancias a nivel de trazas (del orden de ng mL^{-1}) es necesaria la aplicación de técnicas de preparación de muestra previas al análisis cromatográfico que ayuden a preconcentrar al analito de interés.

En los últimos años se han diseñado técnicas de preparación de muestra que tienden a miniaturizar el volumen de la muestra, reducir el tiempo de análisis y disminuir el consumo de disolventes orgánicos y reactivos. La microextracción en fase sólida (*solid phase micro extraction, SPME*) y la extracción por sorción en barra magnética (*stir bar sorptive extraction, SBSE*) son dos técnicas que siguen esta tendencia. El fundamento de ambas consiste en el reparto de los analitos entre una disolución acuosa y una fase polimérica que se encuentra en una fibra de sílice en caso de SPME y en un tubo de vidrio que recubre una barra magnética en caso de la SBSE. Cuando el analito se reparte hacia la fase polimérica se preconcentra permitiendo su determinación a nivel de trazas. Posteriormente se realiza la desorción térmica o líquida del analito para la realización del análisis instrumental correspondiente, normalmente cromatografía de líquidos o de gases. La principal diferencia entre SBSE y SPME es que el volumen de la fase polimérica en SBSE es mayor, permitiendo una eficiencia de separación superior.

La determinación de clenbuterol en orina se ha reportado anteriormente mediante microextracción en fase sólida seguida de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas ¹ y microextracción en fase sólida seguida de cromatografía de líquidos ², obteniendo límites de detección del orden de ng mL⁻¹. El objetivo de este trabajo fue proponer un método para la determinación de clenbuterol en orina mediante extracción por sorción en barra magnética seguida de cromatografía de gases (*stir bar sorptive extraction – gas chromatography, SBSE-GC*) que fuera sensible, reproducible, sencillo y rápido para una probable aplicación como prueba antidopaje.

2. Justificación del proyecto

La práctica del dopaje ocasiona que las competencias deportivas no dependan solo de la habilidad de los participantes sino también de las sustancias que consuman para aumentar su rendimiento. Para evitar el dopaje y así promover una competencia sana y justa es necesario desarrollar métodos antidopaje sensibles y específicos que determinen la presencia de las sustancias dopantes en el organismo. En este trabajo se propone una metodología para la determinación de clenbuterol en orina mediante SBSE-GC para su aplicación en el análisis antidopaje.

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Proponer una metodología para la determinación de clenbuterol en orina mediante SBSE-GC que pueda ser aplicada en el análisis antidopaje.

3.2. Objetivos particulares

- 1.** Desarrollar un método para la determinación de clenbuterol en orina.
- 2.** Optimizar la derivatización, disolvente de desorción y pH para la extracción de clenbuterol en orina utilizando SBSE.
- 3.** Realizar la validación de la metodología (precisión, linealidad, límite de detección, límite de cuantificación).

4. Antecedentes

4.1. Agencia Mundial Antidopaje

“Dopaje” se define como la administración de fármacos o sustancias estimulantes para potenciar artificialmente el rendimiento del organismo con fines competitivos. La Agencia Mundial Antidopaje (*World Anti Doping Agency, WADA*) es una organización independiente conformada por el movimiento deportivo y por los gobiernos del mundo encargada de regular el dopaje a nivel internacional. Entre las principales actividades de la WADA se encuentran la investigación científica, la educación y el desarrollo de las facultades antidopaje. El Código Mundial Antidopaje es uno de los mayores logros de la organización ya que es un consenso de las políticas antidopaje aceptado y aplicado a nivel internacional.

En conjunto con el Código Mundial Antidopaje se aplican cinco normas internacionales que lo complementan. Estas normas contienen las metodologías para realizar el análisis de las muestras de los deportistas, los requisitos que debe de cumplir un laboratorio que realiza análisis antidopaje y un listado con las sustancias consideradas como dopantes ³.

En la determinación de algunas sustancias dopantes la WADA establece un nivel de desempeño mínimo requerido (*minimum required performance level, MRPL*) que es la concentración de un dopante que los laboratorios acreditados deben poder detectar e identificar. El MRPL no es un límite de detección y para establecer su valor se toma en cuenta el metabolismo, estabilidad, farmacocinética y farmacodinámica del dopante ⁴.

4.2. Comisión Nacional de Cultura Física y Deporte

La Comisión Nacional de Cultura Física y Deporte (CONADE) es una institución del gobierno mexicano encargada de desarrollar e implementar políticas para la incorporación

de la población a actividades físicas, recreativas y deportivas fortaleciendo el desarrollo social y humano en el país. Una de las funciones de la CONADE es propiciar la igualdad de oportunidades en el deporte por lo que las pruebas antidopaje son responsabilidad de esta institución ⁵. El único laboratorio acreditado por la WADA en México pertenece a la CONADE ³.

4.3. Clembuterol

El clembuterol es un agonista del receptor adrenérgico β_2 . Estas sustancias se caracterizan por interactuar con las proteínas receptoras de las membranas celulares produciendo un efecto característico de la adrenalina: la relajación del músculo liso. Clínicamente se utilizan en el tratamiento de problemas pulmonares, particularmente del tipo crónico tal como el asma. Los agonistas del receptor adrenérgico β_2 poseen efectos fisiológicos similares al de los esteroides anabólicos, específicamente promueven el crecimiento del tejido muscular y la reducción de la grasa corporal ^{1,2,6}.

El clembuterol es utilizado en el dopaje y en la ganadería intensiva, un tipo de ganadería caracterizada por criar a los animales con alimentos enriquecidos bajo condiciones de temperatura, luz y humedad artificiales. Actualmente su empleo en la industria cárnica se encuentra prohibido en varios países como México ⁷, Estados Unidos y la Unión Europea ². En el deporte está clasificado como una sustancia anabólica no esteroideal en la lista de sustancias prohibidas por la WADA ⁸. El consumo de clembuterol a una concentración mayor a 0.1 $\mu\text{g/g}$ en el alimento puede ser tóxico, puede causar desde mareo, nerviosismo y taquicardia hasta hipertrofia e isquemia en el miocardio ⁹. El clembuterol tiene una vida media en plasma sanguíneo de aproximadamente 35 h y un lento índice de secreción renal, se metaboliza marginalmente en el hígado y excreta principalmente sin cambio alguno en la orina ¹⁰.

La estructura molecular del clenbuterol se muestra en la *Figura 1*. Los pKa del grupo funcional amino alifático y aromático es de 9.6 y <1, respectivamente ¹¹; el pKa del grupo alcohol es de 13.3 ¹². La WADA establece en 0.2 ng mL⁻¹ el MRPL de clenbuterol ^{4,13}.

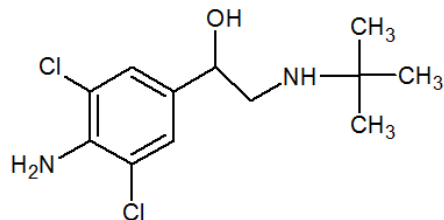


Figura 1. Estructura molecular de clenbuterol.

El análisis de clenbuterol en medicina, veterinaria y antidopaje normalmente se realiza mediante inmunoensayos, electroforesis capilar y cromatografía ¹⁰, sin embargo, la WADA indica que el análisis antidopaje se debe de realizar mediante cromatografía de gases o líquidos acoplada a espectrometría de masas ¹⁴.

Melwanki y compañía determinaron clenbuterol en orina mediante microextracción en fase sólida en modalidad *headspace* seguida de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas ¹. Para esto formaron un derivado de clenbuterol con hexametildisilazano y realizaron el análisis con una fibra de poliacrilato en un intervalo lineal de 1-1000 ng mL⁻¹ obteniendo un límite de detección (LD) de 0.23 ng mL⁻¹ y una desviación estándar relativa (DER) de 3.9 %. Aresta y compañía realizaron el análisis de clenbuterol en orina mediante microextracción en fase sólida seguida de cromatografía de líquidos ². Para esto utilizaron una fibra de polidimetilsiloxano/divinilbenceno en un intervalo lineal de 10-500 ng mL⁻¹ obteniendo un límite de detección (LD) de 9 ng mL⁻¹ y una DER de 5.0-5.3 %. Finalmente, Yang y compañía determinaron clenbuterol en orina mediante extracción líquido-líquido seguida de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en tándem ¹⁰. Utilizaron metil t-butil éter para realizar la extracción y realizaron el análisis en un intervalo lineal de 0.06-8 ng mL⁻¹ obteniendo un LD de 0.03 ng mL⁻¹ y una desviación DER <15 %.

Engelmann y compañía determinaron clenbuterol en disolución estándar mediante microextracción en fase sólida seguida de cromatografía de gases ⁶ (utilizaron una fibra de poliacrilato obteniendo un LD de 1.1 ng mL⁻¹) y microextracción en fase sólida seguida de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de monitoreo selectivo de iones ⁶ (utilizaron una fibra de poliacrilato obteniendo un LD de 0.2 ng mL⁻¹). Xu y compañía determinaron clenbuterol en disolución estándar mediante extracción por sorción en barra magnética con una fase polimérica molecularmente impresa seguida de cromatografía de líquidos ¹⁵. Para ésto utilizaron ractopamina como patrón para la fase polimérica y realizaron el análisis en un intervalo lineal de 1-40 ng mL⁻¹ obteniendo un LD de 0.21 ng mL⁻¹ y una desviación DER de 1.8 %.

4.4. Preparación de muestra

El concepto básico de la preparación de muestra es transformar una muestra a un formato apropiado para su análisis. Los objetivos principales de la preparación de muestra son: aumentar la concentración del analito (y por lo tanto la sensibilidad del método), eliminar los interferentes en el análisis y, en caso de ser necesario, transformar el analito a una forma más apropiada para el análisis.

A pesar de que aún se utilizan varios métodos de preparación de muestra tradicionales, en los últimos años se diseñaron nuevos métodos que se caracterizan por ser menos dañinos para la ecología del planeta. Estas técnicas novedosas comparten la tendencia de miniaturizar el volumen de la muestra, aumentar la especificidad y selectividad de la extracción, aumentar la automatización y el análisis en línea en los métodos y utilizar pequeños volúmenes de disolventes orgánicos ¹⁶. Algunos de estos métodos son microextracción líquido-líquido dispersiva, microextracción asistida con ultrasonido, microextracción en fase sólida y extracción por sorción en barra magnética.

4.4.1. Extracción por sorción en barra magnética (SBSE)

La adsorción es un fenómeno en el cual una sustancia se adhiere a una superficie mediante interacciones físicas. En la absorción las sustancias no solo interactúan con la superficie de un material sino que también se introducen a éste. A los fenómenos de absorción y adsorción en conjunto se les conoce como sorción.

La extracción por sorción en barra magnética (*stir bar sorptive extraction, SBSE*) es una técnica de preparación de muestra que consiste en el reparto de los analitos entre una disolución acuosa y un material polimérico. Para esto se utiliza una barra extractante constituida por una barra magnética recubierta por un tubo de vidrio al cual se funcionaliza el material polimérico. Existen dos modalidades de extracción: inmersión y *headspace* (Figura 2). En el modo inmersión la barra extractante es sometida a agitación magnética en la disolución acuosa. En el modo *headspace* la barra extractante es expuesta a los vapores que se encuentran en el espacio de cabeza del sistema. Para favorecer la volatilización de los analitos en el modo *headspace* se agita la disolución con una barra magnética recubierta de teflón. Después de la etapa de extracción se realiza la desorción térmica o líquida de los analitos para la posterior realización del análisis cromatográfico.

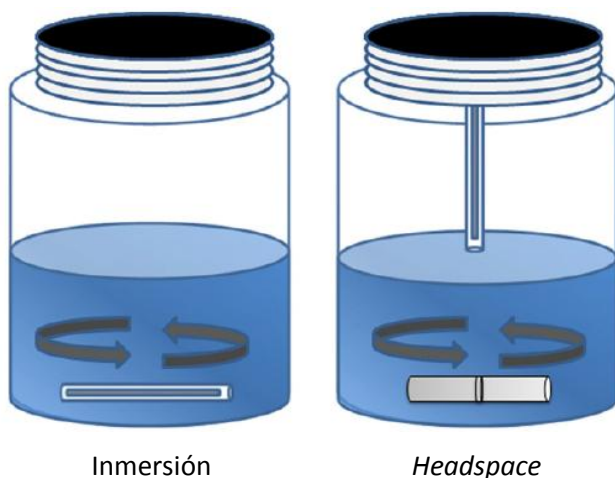


Figura 2. Modos de extracción en SBSE.

[Tomado de Prieto et al. (2010). "Stir-bar sorptive extraction: A view on method optimization, novel applications, limitations and potential solutions". *Journal of Chromatography A*, 1217, p. 2642-2666.]

El equilibrio de reparto del analito entre la matriz estudiada y el material polimérico puede describirse matemáticamente de la siguiente manera:

$$K_d = \frac{C_p}{C_w}$$

donde K_d es la constante de distribución del analito, C_p es la concentración del analito en la fase polimérica y C_w es la concentración del analito en la fase acuosa. Otra forma de expresar la ecuación es:

$$K_d = \frac{m_p}{m_w} \times \frac{V_w}{V_p} = \frac{m_p}{m_w} \times \beta$$

donde m_p es la masa de analito en la fase polimérica, m_w es la masa del polímero en la fase acuosa, V_w es el volumen de la fase acuosa, V_p es el volumen de la fase polimérica y β es la relación de volúmenes de ambas fases. A partir de la ecuación anterior se puede observar que existen dos parámetros determinantes en la extracción mediante SBSE: la afinidad del analito a cada fase y la razón del volumen de las fases (β). Cuanto mayor sea el valor de K_d y menor el de β , mayor será el recobro del analito, tal como se muestra en la *Figura 3*. El rendimiento de extracción también puede ser modificado al variar condiciones tales como el tiempo y temperatura de extracción y desorción, pH de extracción, velocidad de agitación magnética y adición de sal.

El proceso de extracción puede dividirse en dos etapas. En la primera no se ha alcanzado el equilibrio por lo que el proceso está determinado cinéticamente. En la segunda ha pasado el tiempo suficiente para que el sistema llegue al equilibrio. Siempre es recomendable trabajar en condiciones de equilibrio ya que, de lo contrario, pequeñas variaciones en el tiempo de extracción pueden afectar el rendimiento de extracción de manera importante; sin embargo, en algunas ocasiones se prefiere trabajar en la fase cinética para reducir el tiempo de análisis. En la *Figura 4* se muestra el perfil de extracción de algunos contaminantes orgánicos indicando la fase cinética y la fase de equilibrio de la extracción.

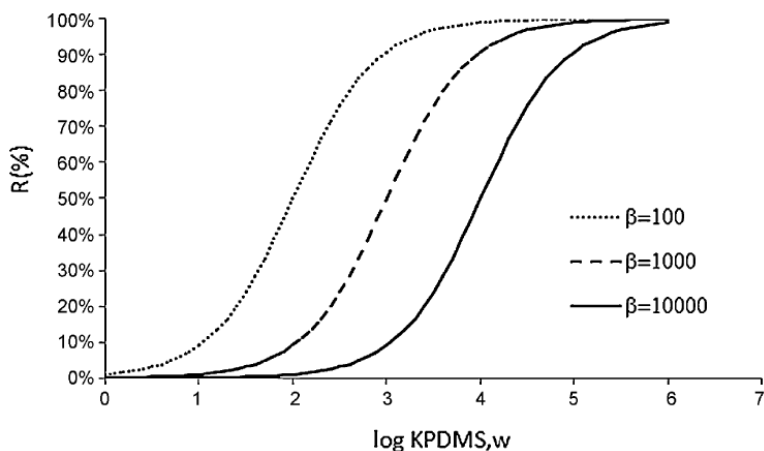


Figura 3. Recobro teórico contra $\log K_{PDMS,w}$ para una fase polimérica de 24 μL de polidimetilsiloxano y una concentración inicial del analito en agua de 1 ng mL^{-1} .

[Tomado de Prieto et al. (2010). *Stir-bar sorptive extraction: A view on method optimization, novel applications, limitations and potential solutions. Journal of Chromatography A*, 1217, p. 2642-2666.]

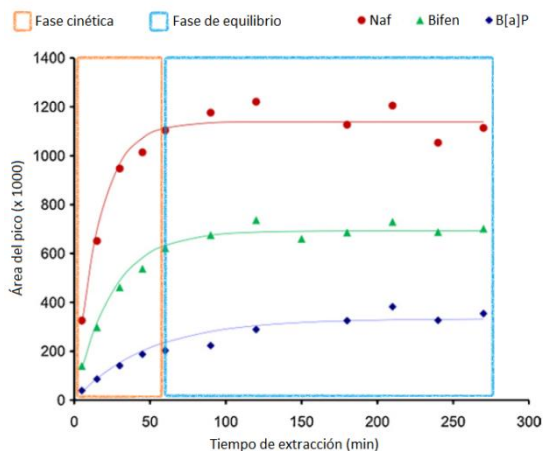


Figura 4. Perfil de extracción de contaminantes orgánicos: naftaleno (Naf), bifenilo (Bifen), benzo[a]pireno (B[a]P).

Modificado de Prieto et al. (2010). *Stir-bar sorptive extraction: A view on method optimization, novel applications, limitations and potential solutions. Journal of Chromatography A*, 1217, p. 2642-2666.]

Como se mencionó anteriormente existen dos formas de desorción: térmica y líquida. En la mayoría de las aplicaciones de SBSE se realiza una desorción térmica seguida de cromatografía de gases con lo que se evita el uso de disolventes orgánicos y se permite la introducción completa de los analitos extraídos al sistema cromatográfico. La desorción

térmica se realiza en un intervalo de temperatura de 150-300 °C y puede durar hasta 15 minutos. Para poder realizar la desorción térmica se debe contar con una unidad de desorción térmica (UDT) que consiste en un vaporizador de temperatura programable (programmable temperature vaporizator, PTV) en el que se introduce y calienta la barra extractante para desorber los analitos. La UDT debe de acoplarse a un sistema cromatográfico con inyector PTV que se encuentre a temperaturas bajas (en el intervalo de -150 a 40 °C) para crioenfocar los analitos antes de su entrada a la columna. Las desventajas de la desorción térmica son el alto precio de la UDT y que está limitada a analitos termoestables y volátiles o semivolátiles ¹⁷.

La desorción líquida se utiliza cuando los analitos son termolábiles, cuando la separación se realizará mediante cromatografía de líquidos o electroforesis capilar o cuando no se cuenta con una UDT. En la desorción líquida se agita magnéticamente la barra extractante en un disolvente o mezcla de disolventes para desorber los analitos extraídos. Los disolventes más utilizados para este fin son: metanol, acetonitrilo y mezclas de estos disolventes o mezclas con agua o amortiguadores acuosos. El disolvente de desorción debe cubrir completamente la barra extractante. La desorción puede ser acelerada con agitación mecánica, aumento de temperatura o sonicación. Se debe tomar en cuenta que la desorción líquida del analito dependerá de su constante de distribución entre el polímero extractante y el disolvente de desorción ¹⁷.

Un material comunmente utilizado como polímero extractante en SBSE es polidimetilsiloxano (PDMS) debido a que su estabilidad térmica permite que sea utilizado en un amplio intervalo de temperaturas (220-320 °C) ¹⁶. Para la extracción de compuestos con una polaridad media se utiliza polidimetilsiloxano/etilenglicol (PDMS/EG) ¹⁸. Una de las principales desventajas de la SBSE es la escasa variedad de fases poliméricas comercialmente disponibles y la pobre selectividad de las mismos ¹⁹.

4.4.2. Derivatización

La derivatización consiste en la transformación química del analito para mejorar su estabilidad térmica, hacerlo más volátil o introducir una “marca” en la molécula con la que el detector lo pueda reconocer con mayor facilidad. La derivatización es muy útil en cromatografía de gases ya que las moléculas que contienen grupos -COOH, -OH, -NH y -SH forman puentes de hidrógeno que ocasionan que la molécula sea poco volátil o que carezca de la estabilidad térmica necesaria para el análisis cromatográfico ²⁰.

La derivatización normalmente se realiza en los grupos polares mediante su alquilación, acilación o silanización. En la alquilación se reduce la polaridad de los compuestos sustituyendo los hidrógenos lábiles por un grupo alifático (-R). En la acilación, los compuestos con hidrógenos lábiles son transformados en ésteres, tioésteres o amidas (R-O-CO-R', R-S-CO-R', R-NH-CO-R'). En la silanización los hidrógenos lábiles de ácidos, alcoholes, tioles, aminas, amidas y cetonas o aldehídos enolizables son sustituidos por grupos trimetilsilil (-Si(CH₃)₃). La silanización es la técnica de derivatización más utilizada pues, al contrario de la alquilación y acilación, no presenta ácidos residuales tras la reacción por lo que no requiere de la purificación del derivado. Los dos reactivos silanizantes más comunes son N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) y N-metil-N-(t-butildimetilsilil)trifluoroacetamida (MTBSTFA) ²⁰.

Ventura y compañía estudiaron la derivatización de varios β_2 -agonistas, entre ellos el clenbuterol ²¹. Para ésto se utilizaron silanizantes como BSTFA y N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA) y catalizadores como trimetilclorosilano (TMCS) y trimetilyodosilano (TMIS). Dependiendo del poder silanizante de cada reactivo se formaron en diferentes proporciones el derivado O-TMS y el N,O-bis(TMS) de clenbuterol, cuyas estructuras moleculares se muestran en la *Figura 5*. En la *Tabla 1* se muestran algunos de los resultados obtenidos en este análisis.

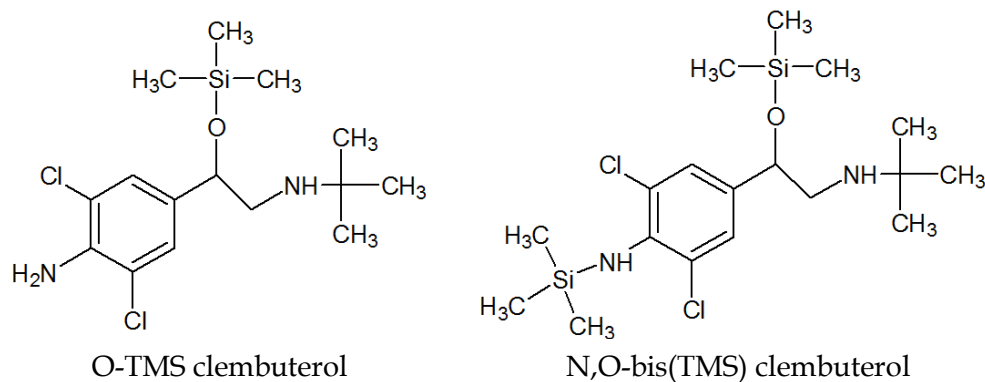


Figura 5. Derivados de clembuterol: O-TMS y N,O-bis(TMS).

Tabla 1. Derivados de clembuterol y sus abundancias respectivas, expresadas como porcentaje del derivado más abundante.

[Modificada de Damasceno et al. (2000). Derivatization procedures for the detection of β_2 -agonists by gas chromatographic/mass spectrometric analysis. *Journal of Mass Spectrometry*, 35, p. 1285-1294.]

Derivatizante	O-TMS (%)	N,O-bis(TMS) (%)
MSTFA	100	30
BSTFA	100	<1
MSTFA-TMCS	100	20
BSTFA-TMCS	100	5
MSTFA-TMIS	10	100

4.5. Cromatografía

La cromatografía es un método físico de separación que consiste en la distribución de los analitos entre una fase estacionaria y una fase móvil. La fase estacionaria se encuentra fija mientras que la fase móvil se mueve sobre o a través de la fase estacionaria arrastrando consigo los analitos que se separan por la interacción diferente de éstos con cada una de las dos fases (Figura 6).

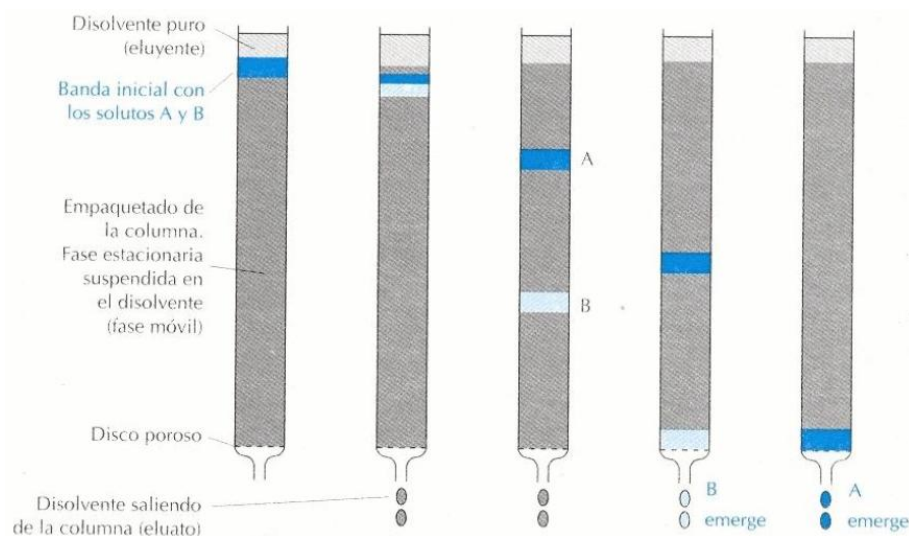


Figura 6. Separación cromatográfica de una mezcla de los solutos A y B.

[Tomado de Harris. (2007). "Análisis químico cuantitativo". Ed. Reverté, 3ª edición, España, capítulo 23.]

El término *cromatografía* surgió a principios del siglo XX cuando Michael Tswett separó pigmentos vegetales usando un disolvente hidrocarbonado como fase estacionaria y polvo de inulina (un hidrato de carbono) como fase estacionaria. La separación dio como resultado un conjunto de bandas coloreadas, hecho por el que Tswett nombró a la técnica *cromatografía*, del griego *chromatos* (color) y *graphos* (escritura) ²². A pesar de que existen trabajos anteriores al de Tswett que utilizan esta técnica, se considera a Tswett como el padre de la cromatografía por haber sido el primero en nombrarla y describirla científicamente ²³.

La cromatografía se clasifica en función del estado de agregación de la fase móvil en: cromatografía de líquidos, de gases y de fluidos supercríticos. A su vez esta clasificación presenta subdivisiones que dependen de la naturaleza de la fase estacionaria y del soporte sobre el que se encuentra la misma. En la *Tabla 2* se detalla la clasificación de los métodos cromatográficos ²⁴.

Tabla 2. Clasificación de los métodos cromatográficos.

[Modificado de Skoog. (2005). "Fundamentos de Química Analítica". Ed. Thomson, 8ª edición, México, capítulo 30.]

Método cromatográfico	Modalidad	Fase móvil	Fase estacionaria
C. GL	Columna	Gas	Líquido
C. GS			Sólido
C. LL	Columna	Líquido	Líquido
C. LS			Sólido
C. II			Resina de intercambio iónico
C. E			Líquido en los intersticios de un sólido polimérico
C. A			Líquido con grupo específico unido a una superficie sólida
C. CF			Sólido
C. P	Plana		Papel
C. FS	Columna	Fluido supercrítico	Especie orgánica unida a una superficie sólida

C. cromatografía, GL gas-líquido, GS gas-sólido, LL líquido-líquido, LS líquido-sólido, II intercambio iónico, E exclusión, A afinidad, CF capa fina, P papel, FS fluidos supercríticos.

4.5.1. Cromatografía de gases

En cromatografía de gases se hace pasar el analito en forma gaseosa a través de la columna arrastrándolo con la fase móvil. La fase estacionaria, que puede ser un líquido no volátil o un sólido ²², se encuentra en el interior de la columna. Para analizar una sustancia mediante cromatografía de gases ésta debe de ser volátil y no debe descomponerse térmicamente bajo las condiciones de trabajo.

En la *Figura 7* se muestran las partes básicas de un cromatógrafo de gases: cilindro de gas, reguladores de flujo, puerto de inyección, horno, columna, detector y sistema de registro.

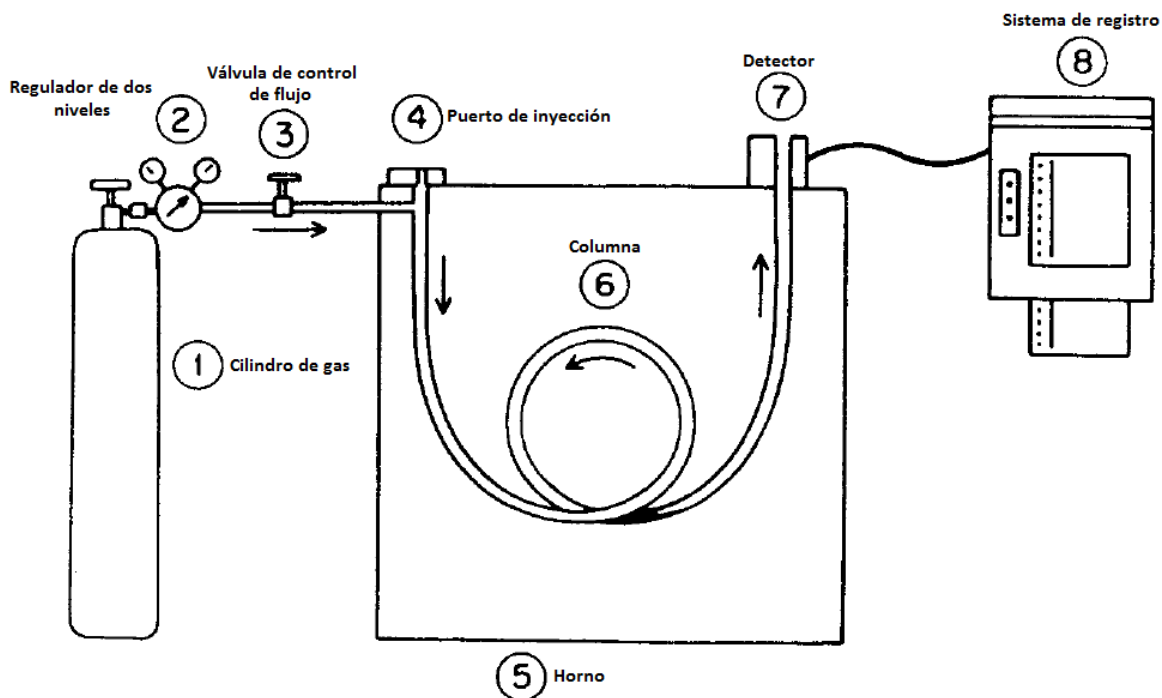


Figura 7. Esquema de un cromatógrafo de gases común.

[Modificado de McNair. (1998). "Basic Gas Chromatography". Ed. Wiley & Sons Inc., 1ª edición, EUA, capítulo 1.]

Gas portador

El gas portador transporta los componentes volátiles de la muestra a través de la columna. El gas debe de ser inerte (ya que no debe de reaccionar con la muestra ni con la fase estacionaria), y compatible con el detector del cromatógrafo ²⁵.

Los gases portadores utilizados son hidrógeno, helio y nitrógeno ²². En la *Figura 8* se puede observar que la altura del plato teórico mínima (valor que corresponde a la mayor eficiencia de separación) para los tres gases es similar, sin embargo, este valor se alcanza a una mayor velocidad lineal del gas portador para hidrógeno, seguido de helio y finalmente nitrógeno. También se puede observar que la pendiente de la curva de nitrógeno es mayor que la de helio e hidrógeno por lo que pequeñas variaciones en la velocidad lineal del gas ocasionarán cambios mayores en la eficiencia de separación. Debido a lo anterior, los gases portadores más utilizados son hidrógeno y helio.

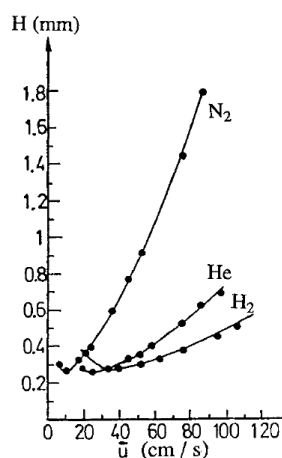


Figura 8. Variación de la altura del plato (eficiencia de separación) en función de la velocidad lineal del gas portador.

[Tomado de Sandra. (1989). Resolution-Column Efficiency. *Journal of High Resolution Chromatography*, 12, p. 273-277.]

Puerto de inyección

En el puerto de inyección se introduce, volatiliza y mezcla la muestra con el gas portador para acarrearla a la columna cromatográfica. Existen diferentes puertos de inyección, a continuación se describirá el funcionamiento de tres: *split/splitless*, *cold on-column* y vaporizador de temperatura programable (*programmable temperature vaporizator*, PTV).

En la *Figura 9* se muestra el esquema de un puerto de inyección *split/splitless*, llamado de esta forma porque permite dos modos de trabajo: *split* (con división de flujo) y *splitless* (sin división de flujo). El procedimiento de inyección *split* consiste en inyectar un volumen pequeño de muestra (normalmente 1 μ L) en un puerto de inyección caliente que contiene un tubo de vidrio silanizado llamado "*liner*" o "*inserto*". La muestra se vaporiza rápidamente y sólo una fracción de ésta (usualmente 1-2%) entra a la columna. El resto de la muestra vaporizada junto con una gran cantidad del gas portador se desecha a través de una válvula de *split* o purga²³. Durante la inyección y el proceso cromatográfico existe un flujo de purga de septo a un caudal de 1 mL/min aproximadamente para eliminar el exceso de vapores de muestra y las sustancias que puedan sangrar del septo²².

El modo *splitless* utiliza el mismo equipo que el *split*, pero la válvula de *split* se encuentra cerrada inicialmente. El procedimiento consiste en inyectar un volumen pequeño (normalmente 1 μL) de la muestra diluida en un disolvente volátil en el puerto de inyección caliente. La muestra se vaporiza y es acarreada a una columna fría donde se condensa junto con el disolvente (crioenfoque) antes de iniciar el programa de temperatura del horno. Después de un tiempo determinado (normalmente 30-60 segundos), la válvula de *split* se abre y los vapores restantes de la muestra son expulsados del sistema ²³. Dado que la mayor parte de la muestra pasa a la columna mientras la válvula de *split* se encuentra cerrada este modo de inyección es utilizado para el análisis de trazas.

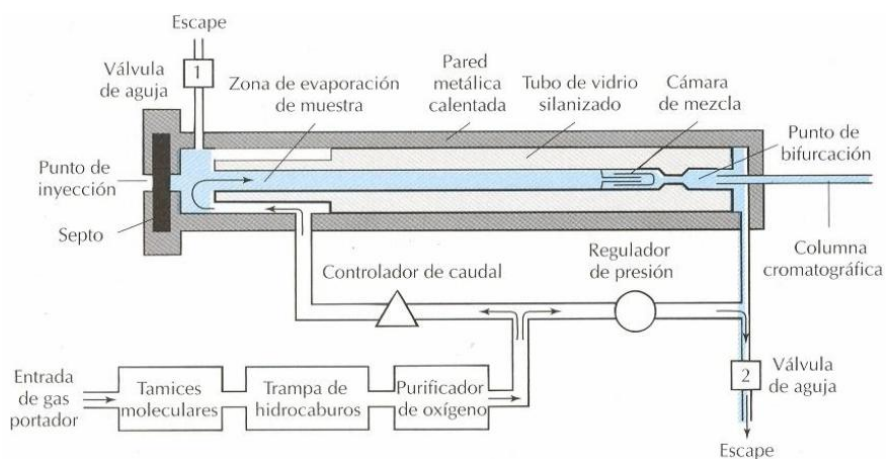


Figura 9. Puerto de inyección *split/splitless*.

[Tomado de Harris. (2007). "Análisis químico cuantitativo". Ed. Reverté, 3ª edición, España, capítulo 24.]

El puerto de inyección *cold on-column* permite la introducción de la muestra directamente en la columna fría. Este método de inyección elimina la discriminación de la muestra pues las sustancias con alta masa molecular son introducidas en la columna, lo que no siempre se logra al utilizar un inyector *split/splitless*. Otra ventaja de este método de inyección es que no altera la composición de la muestra pues las sustancias termolábiles son introducidas directamente en la columna fría, evitando su descomposición en un inyector caliente. La muestra debe de estar diluida y lo más limpia posible para no dañar la columna ²⁷. Debido a que se introduce la muestra completamente en la columna, este método de inyección es utilizado para análisis de trazas. En la *Figura 10* se muestra un

esquema del puerto de inyección *cold on-column*. En la *Figura 11* se muestra un ejemplo de las condiciones de temperatura y flujo utilizadas en el modo de inyección *split*, *splitless* y *cold on-column*.

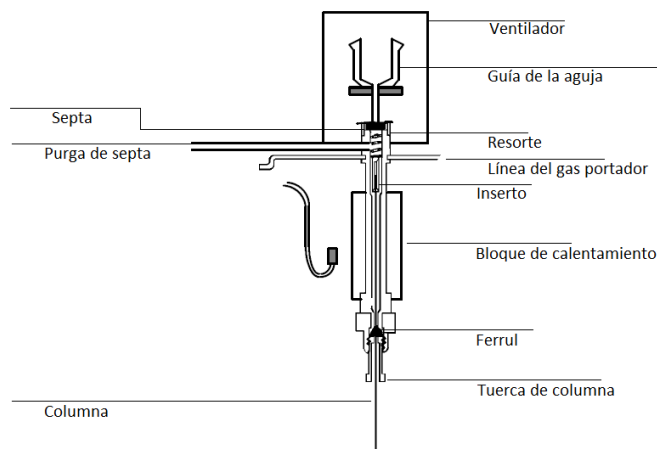


Figura 10. Puerto de inyección *cold on-column*.

[Modificado de Hewlett-Packard Company. (1994). "5890 Series II cool on-column operating manual". 10^a edición, EUA.]

El inyector PTV básicamente consiste en un puerto de inyección *split/splitless* al que se puede establecer un programa de temperatura. El aumento de temperatura del inyector puede ser rápido (500 °C/min, por ejemplo) para analitos termoestables o lento (120 °C/min, por ejemplo) para compuestos termolábiles ²⁸. Una de las principales aplicaciones del PTV es la inyección de grandes volúmenes lo que permite el análisis de muestras con baja concentración de analitos. En este modo el PTV se encuentra inicialmente a 40-60 °C con la válvula de *split* abierta y se realiza la inyección de la muestra (que puede ser de 1-200 µL), lo que permite que el disolvente salga por la purga de *split* mientras que las sustancias con punto de ebullición mayor son retenidas en el *liner*. Posteriormente se cierra la válvula de *split* y se aumenta la temperatura del PTV a 200-300 °C para que los analitos se vaporicen y sean arrastrados a la columna por el gas portador ²⁹.

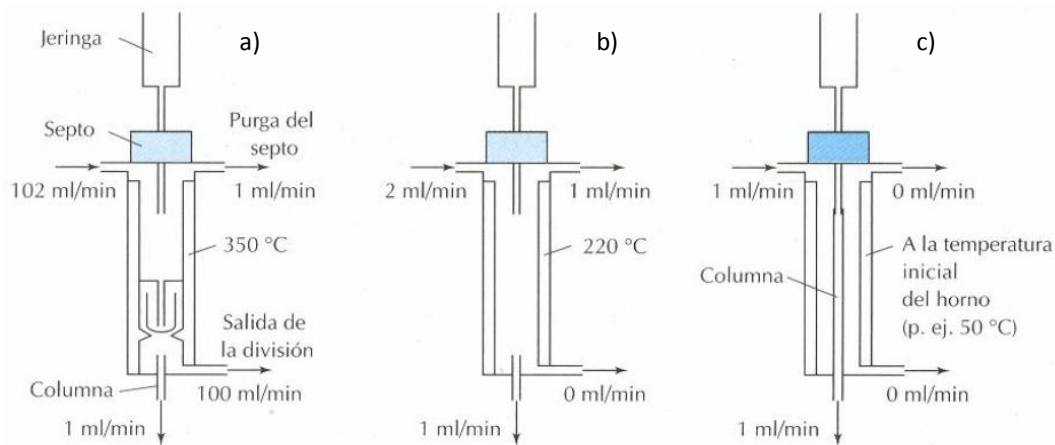


Figura 11. Ejemplo de las condiciones de temperatura y flujo utilizadas en el modo de inyección: a) split, b) splitless y c) cold on-column.

[Tomado de Harris. (2007). "Análisis químico cuantitativo". Ed. Reverté, 3ª edición, España, capítulo 24.]

Columna cromatográfica

En la inmensa mayoría de los análisis se utilizan columnas tubulares abiertas de sílice fundida (SiO_2) recubiertas de poliimida, un plástico capaz de resistir altas temperaturas (columnas capilares). Los diámetros internos típicos son de 0.1 a 0.53 mm y las longitudes típicas de 15 a 100 m. Las columnas tubulares abiertas ofrecen mayor resolución, rapidez de análisis y mayor sensibilidad que las columnas empacadas, sin embargo, tienen menor capacidad de muestra ²².

Tres tipos de columnas tubulares abiertas son: de pared recubierta, de soporte recubierto y de capa porosa. Las columnas tubulares de pared recubierta tienen en su interior una película de fase estacionaria líquida de un grosor de 0.1 a 0.5 μm . Las columnas tubulares de soporte recubierto constan de partículas sólidas adheridas a la pared interior que están recubiertas de la fase estacionaria líquida. Las columnas tubulares de capa porosa constan de partículas sólidas adheridas a la pared interior de la columna que constituyen la fase estacionaria ²². En la *Figura 12* se muestra la sección transversal de estos tres tipos de columna tubular abierta.

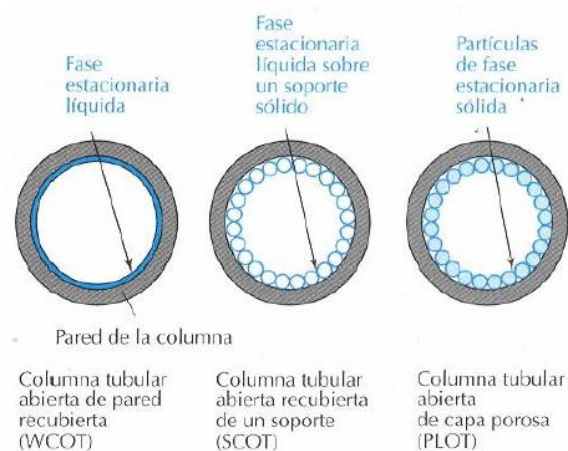


Figura 12. Sección transversal de los tres tipos de columnas tubulares abiertas.

[Tomado de Harris. (2007). "Análisis químico cuantitativo". Ed. Reverté, 3ª edición, España, capítulo 24.]

Detector

El detector se encarga de identificar y cuantificar el paso de los compuestos que salen de la columna. El detector de ionización de llama es el más utilizado en cromatografía de gases. Otra opción común es el sistema acoplado cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas (CG-EM).

El funcionamiento del detector de ionización de llama consiste en mezclar el efluente de la columna con hidrógeno y llevarlo a la punta del quemador donde hay un alto flujo de aire que propicia la combustión. La llama se enciende de manera remota con ayuda de un sistema ignitor. La combustión de la materia orgánica produce iones que son atraídos por un electrodo formando una corriente eléctrica que se convierte en la señal. Mientras no se queme una muestra debería de existir una ionización mínima, debida a las impurezas del aire e hidrógeno utilizados²³. En la *Figura 13* se muestra un esquema del detector de ionización de llama.

No se conoce el mecanismo exacto de la ionización de los compuestos orgánicos en la llama pero la producción de iones es proporcional al contenido de carbono de la muestra²³. Entre las sustancias que no dan respuesta figuran el aire, agua, gases inertes, CO, CO₂ y CS₂. Por no responder al aire ni al agua, el detector de ionización de llama es

particularmente apropiado para el análisis de trazas de muestras acuosas (tales como bebidas alcohólicas y materiales biológicos) y de materia orgánica en aire o agua ²⁵.

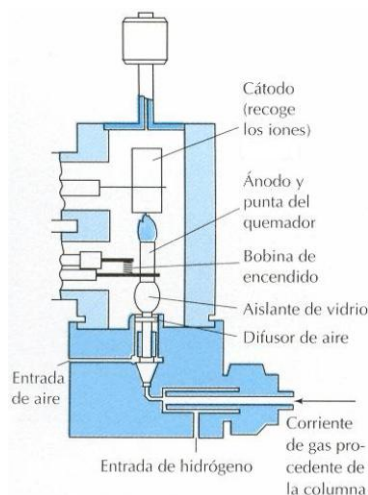


Figura 13. Esquema de un detector de ionización de llama.

[Tomado de Harris. (2007). "Análisis químico cuantitativo". Ed. Reverté, 3^o edición, España, capítulo 24.]

Sistema de registro

El sistema de registro se encarga de transformar la señal eléctrica procedente del detector en un cromatograma. Para este fin actualmente se utilizan computadoras con un software especializado en el tratamiento de datos cromatográficos.

4.5.2. Sistema acoplado CG-EM

La espectrometría de masas (EM) es una técnica que se basa en ionizar moléculas gaseosas (normalmente en cationes), acelerarlas en un campo eléctrico y separarlas de acuerdo a su relación masa/carga. El proceso de ionización puede también provocar que las moléculas se rompan en diversos fragmentos. Como resultado se obtiene un espectro de masas que es una gráfica que muestra la abundancia relativa de cada fragmento formado de la molécula ²². Al pico que representa a la molécula ionizada sin fragmentar se le llama *ion molecular* y al fragmento más abundante se le llama *pico base*. En la *Figura 14* se muestra un diagrama representativo de las partes que integran un espectrómetro de masas. La fuente de ionización, el analizador másico y el detector deben encontrarse en

alto vacío (10^{-5} - 10^{-6} torr) para evitar la pérdida y alteración de los iones formados debida a la colisión con otras moléculas ²³.

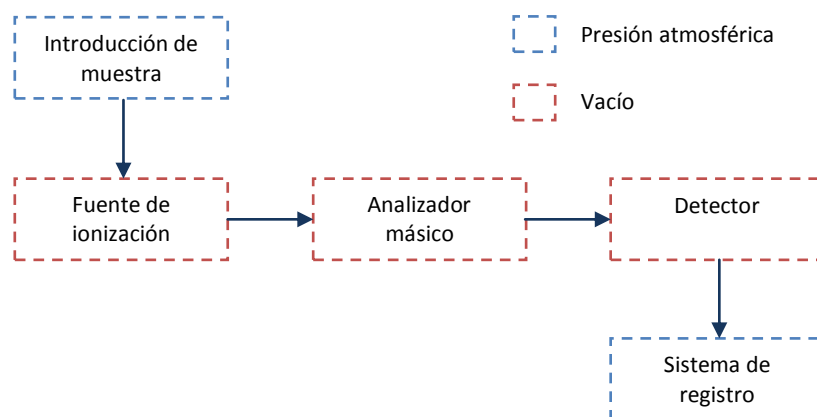


Figura 14. Esquema de las partes de un espectrómetro de masas.

[Modificado de McNair. (1998). "Basic Gas Chromatography". Ed. Wiley & Sons Inc., 1ª edición, EUA, capítulo 10.]

La cromatografía de gases es una técnica que combina velocidad de análisis, resolución, excelentes resultados cuantitativos y un costo moderado, sin embargo, no puede confirmar la correspondencia entre una señal y una sustancia determinada. Ésto se debe a que, a pesar de que los tiempos de retención son característicos para un sistema bien definido, no son únicos para las sustancias asignadas. Por otro lado, la espectrometría de masas es una de las técnicas analíticas que brindan más información pues con tan solo microgramos de una muestra proporciona información cualitativa (estructura, composición elemental y masa molecular) y cuantitativa de los compuestos estudiados. Al acoplar la cromatografía de gases y la espectrometría de masas (CG-EM) se obtiene una técnica analítica rápida con alto poder de resolución que hace posible la identificación de sustancias y análisis cuantitativo de las mismas ²³.

La cromatografía de gases y la espectrometría de masas son técnicas muy compatibles: ambos sistemas operan a temperaturas elevadas (200-300 °C), tratan con compuestos en fase gaseosa y requieren pequeñas cantidades de muestra (del orden de microgramos o nanogramos). Debido que la el cromatógrafo de gases opera a presión atmosférica y ésta

debe ser reducida a un vacío de 10^{-5} - 10^{-6} torr para la entrada al espectrómetro de masas, se utiliza una línea de transferencia entre los dos sistemas ²³.

Existen dos modos de trabajo en CG-EM: barrido de iones (modo SCAN) y monitorización selectiva de iones (*single ion monitoring*, SIM). En el modo SCAN se registra la corriente de todos los iones de un intervalo seleccionado de masas. En el modo SIM sólo se registra la corriente de los iones con una masa determinada.

En este trabajo se propuso una metodología para la determinación de clenbuterol en orina mediante SBSE-GC como prueba antidopaje.

5. Desarrollo experimental

5.1. Material y equipo

5.1.1. Reactivos, disolventes y materiales

Clorhidrato de clenbuterol (95% de pureza), Sigma-Aldrich (Italia). N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA), Supelco (EUA). N-metil-N-trimeilsililtrifluoroacetamida (MSTFA) - trimetlyodosilano (TMIS) Supelco (EUA). Metanol (99.96% de pureza), J. T. Baker (Trinidad y Tobago). Acetonitrilo (99.8% de pureza) y hexano (98.5% de pureza), J. T. Baker (EUA). Acetona (99% de pureza), Distribuidora Química Alvi (México). Nitrógeno (99.998% de pureza) INFRA (México). Disolución amortiguadora (pH=10 a 20 °C) de ácido bórico, hidróxido de sodio y cloruro de potasio, Merck (Alemania).

Para la SBSE se utilizaron barras magnéticas de extracción Gerstel Twister de 10 mm con un recubrimiento de 32 µL de PDMS-EG, Gerstel GmbH & Co.KG (Alemania).

Disolución amortiguadora de $\text{CO}_3^{2-}/\text{HCO}_3^-$, pH=10.72 (16.1420 g de K_2CO_3 y 5.1991 g de KHCO_3 en 50 mL de agua desionizada). Disolución amortiguadora de $\text{CO}_3^{2-}/\text{HCO}_3^-$, pH=9.09 (1.3854 g de K_2CO_3 y 10.0001 g de KHCO_3 en 50 mL de agua desionizada).

5.1.2. Instrumentación

Cromatógrafo de gases HP 5890 series II Plus con inyector *cold on-column* (*oven track on*) y detector de ionización de llama. T_{inyector} 3 °C por encima de la temperatura del horno, T_{detector} 300 °C. Programa de temperatura: T_{inicial} 70 °C durante 1 min, incrementándose 10 °C/min hasta 300 °C mantenidos durante 2 min.

Cromatógrafo de gases HP 5890 con inyector *split/splitless* acoplado a un espectrómetro de masas 5971. $T_{\text{inyector}} 300\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_{\text{línea de transferencia}} 280\text{ }^{\circ}\text{C}$, *splitless* (1 min). Se utilizó el mismo programa de temperatura que en el CG con inyector *cold on-column*.

En ambos equipos se utilizaron columnas Zebron ZB-5 (5%fenil-95%PDMS) de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 μm de espesor de fase estacionaria.

5.1.3. Recolección de muestra

Se tomaron varias muestras de orina de aproximadamente 100 mL de un voluntario sano. Cada muestra se filtró, dividió en alícuotas de 3 y 5 mL y almacenó en jeringas a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ protegidas de la luz hasta su análisis.

5.2. Desarrollo experimental

5.2.1. Disoluciones estándar

Se preparó una disolución de clenbuterol a 1 mg mL^{-1} en metanol. Partiendo esta disolución se obtuvieron las disoluciones de trabajo. Todas las disoluciones se mantuvieron en refrigeración a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis.

5.2.2. Acondicionamiento inicial de la barra de extracción

Al trabajar SBSE seguida de cromatografía de gases es recomendable realizar térmicamente el acondicionamiento inicial de la barra de extracción y la desorción de los analitos tras la extracción. La ventaja principal de la desorción térmica es que permite la introducción completa de los compuestos sorbidos en la fase polimérica al sistema cromatográfico. Debido a que no se contó con una unidad de desorción térmica (UDT), el acondicionamiento y la desorción de los analitos fueron realizados por desorción líquida agitando magnéticamente la barra de extracción en un disolvente.

Cada barra de extracción nueva se acondicionó antes de utilizarla para remover las impurezas de fábrica sorbidas en la fase polimérica. Para ésto se agitó magnéticamente la barra de extracción en 1 mL de metanol a 600 revoluciones por minuto (rpm) durante 30 min dos veces y posteriormente en 1 mL de acetonitrilo a 600 rpm durante 30 min dos veces.

5.2.3. Optimización de parámetros experimentales

En la *Figura 15* se muestran las condiciones experimentales de la metodología planteada inicialmente. Se optimizaron cinco parámetros experimentales en el siguiente orden: derivatizante, tiempo de derivatización, acondicionamiento de la barra extractante, disolvente de desorción y pH de extracción. La optimización del derivatizante se realizó mediante CG-EM mientras que los demás parámetros experimentales se optimizaron en el CG con inyector *cold on-column*. La optimización de la metodología se realizó con una disolución estándar.

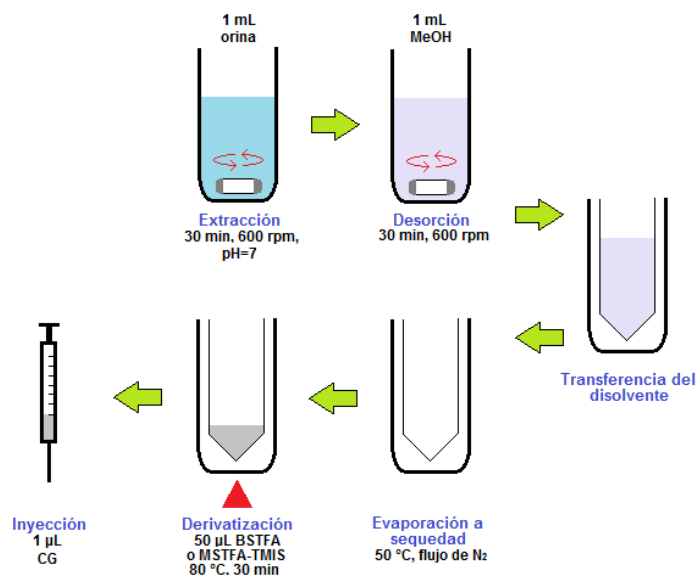


Figura 15. Etapas del procedimiento realizado para la SBSE.

Derivatización de clenbuterol

Para evaluar el derivado de clenbuterol más conveniente se compararon dos reacciones de derivatización mediante CG-EM; una con BSTFA y otra con MSTFA-TMIS. Se adicionaron 20 μL de estándar de clenbuterol ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) en metanol a un vial de fondo cónico, se llevó a sequedad a 50 °C con un flujo suave de nitrógeno, se adicionaron 50 μL del derivatizante a evaluar y se colocó en una estufa a 80 °C durante 30 min. Posteriormente se retiró el derivado de la estufa, se dejó a temperatura ambiente durante 10 min y se inyectó 1 μL al CG-EM.

Se realizó el análisis en modo SIM monitoreando los iones fragmento característicos de cada derivado: $m/z=86$, 243 y 262 para el derivado O-TMS de clenbuterol (producido mayoritariamente en la reacción con BSTFA) y $m/z=86$, 330, 335 y 337 para el derivado N,O-bis(TMS) de clenbuterol (producido mayoritariamente en la reacción con MSTFA-TMIS).

Se estudió la influencia del tiempo de derivatización en la formación de O-TMS de clenbuterol evaluando 30 y 40 min de reacción. Se adicionaron 20 μL de estándar clenbuterol ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) en metanol en un vial de fondo cónico, se llevó a sequedad a 50 °C con un suave flujo de nitrógeno, se adicionaron 50 μL de BSTFA y se colocó en una estufa a 80 °C durante 30 ó 40 min. Posteriormente se retiró el derivado de la estufa, se dejó a temperatura ambiente durante 10 min y se inyectó 1 μL al CG con inyector *cold on-column*.

Acondicionamiento de la barra de extracción previo al análisis

Además del acondicionamiento inicial que debe realizarse a cada barra extractante nueva, en algunos trabajos se reporta un acondicionamiento de la barra previo al análisis que prepara la fase polimérica para la extracción de los analitos. Se evaluó la adición de este paso a la metodología planteada comparando la extracción de 1 mL de estándar de clenbuterol a $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ en medio acuoso mediante SBSE sin y con acondicionamiento

previo al análisis, que consistió en agitar magnéticamente la barra de extracción en 1 mL de metanol a 600 rpm durante 30 min.

Disolvente de desorción

Se evaluó metanol, acetonitrilo y la mezcla de metanol/acetonitrilo (1:1) como disolventes de desorción realizando la extracción de 1 mL de estándar de clenbuterol ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) en medio acuoso mediante SBSE, realizando la desorción líquida con 1 mL del disolvente evaluado agitando magnéticamente a 600 rpm durante 30 min.

pH de extracción

Se estudió la extracción a pH 4.02, 6.50 y 10.72 de 1 mL de estándar de clenbuterol ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) en medio acuoso mediante SBSE. Inicialmente se ajustó la disolución estándar a pH 4.02 y 9.30 adicionando HCl 0.1 M y NaOH 0.1 M, respectivamente, mientras que la extracción a pH 6.50 se realizó sin modificar la disolución estándar.

Al observar precisión baja en el análisis a pH 9.30 se pensó que se debía a la inestabilidad del pH de la disolución por lo que se comparó la extracción a pH 6.50 y 10.72 (ajustado con disolución amortiguadora de boratos) de una disolución estándar de clenbuterol (500 ng mL^{-1}) en medio acuoso mediante SBSE.

5.2.4. Análisis en orina fortificada con clenbuterol

Se optimizó la metodología en disolución estándar, sin embargo, fue necesario comprobar su funcionamiento en orina ya que ésta es la matriz analizada en las pruebas antidopaje de clenbuterol. Debido a lo anterior se realizó la extracción de clenbuterol en orina fortificada utilizando la metodología optimizada. Se fortificó la orina adicionando 50 μL de estándar ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$ en metanol) y 1.5 mL de disolución amortiguadora de $\text{CO}_3^{2-}/\text{HCO}_3^-$ (pH=10.72) y se llevó al aforo a 5 mL con orina. Posteriormente tomó 1 mL de la disolución de orina fortificada y se analizó utilizando la metodología optimizada. El análisis se realizó por triplicado.

5.2.5. Metodología optimizada

Después de optimizar los parámetros en estudio se propuso la siguiente metodología: se coloca la barra de extracción en un vial de 11 mL con 1 mL de metanol y se agita en una parrilla magnética a 600 rpm durante 30 min. Posteriormente se retira la barra de extracción, se seca con papel libre de pelusa y se coloca en un vial de 11 mL que contiene 1.5 mL de disolución amortiguadora de $\text{CO}_3^{2-}/\text{HCO}_3^-$ (pH=10.72) y 3.5 mL de orina. Se realiza la extracción agitando a 600 rpm durante 30 min. Se retira la barra de extracción, se seca con un papel libre de pelusa y se trasfiere a un vial de 11 mL que contiene 1 mL de acetonitrilo. Se realiza la desorción líquida agitando magnéticamente a 600 rpm durante 30 min. Se transfiere el extracto de desorción a un vial con fondo cónico y se evapora el disolvente a sequedad en un baño de agua a 65 °C con un suave flujo de nitrógeno. Posteriormente se adicionan 50 μL de BSTFA, se coloca el vial en una estufa a 80 °C durante 30 min, se retira el derivado de la estufa, se deja a temperatura ambiente durante 10 min y se inyecta 1 μL al CG. En la *Figura 16* se muestra el esquema del desarrollo experimental.

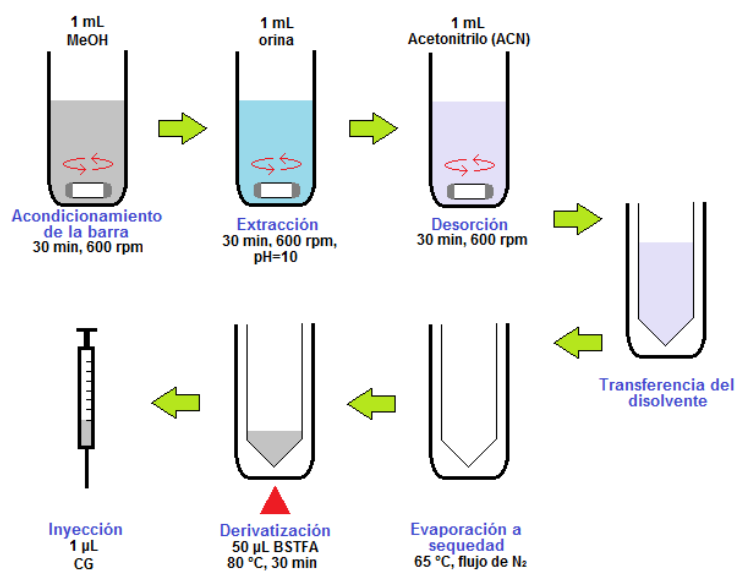


Figura 16. Esquema del desarrollo experimental optimizado.

3.2.6. Curva de calibración

Con la metodología optimizada se realizó una curva de calibración en un intervalo de concentraciones de 100-200 ng mL⁻¹ por triplicado. Se partió de una disolución de clenbuterol 5 µg mL⁻¹ en metanol. En cada punto se adicionó el volumen necesario de la disolución stock y 1.5 mL de disolución amortiguadora de CO₃²⁻/HCO₃⁻ (pH=10.72) y se llevó al aforo a 5 mL con orina. Posteriormente se tomó 1 mL de la disolución de orina fortificada y se analizó mediante SBSE-GC.

6. Resultados y discusión de resultados

6.1. Optimización de la metodología

Derivatización de clenbuterol

En la *Figura 17* se muestra el cromatograma de la derivatización de clenbuterol con BSTFA y con MSTFA-TMIS. En el análisis por CG-EM de la derivatización de clenbuterol con MSTFA-TMIS se observó un pico que presentaba los iones fragmento característicos de los derivados O-TMS y N,O-bis(TMS) de clenbuterol, por lo que se concluyó que la reacción producía la mezcla de ambos derivados. Los otros picos presentes en el cromatograma se debían al derivatizante, sin embargo, éstos no interfirieron con el pico del derivado. Se observó un aumento en la línea base debido a que al menos uno de los iones fragmento monitoreados también provenía de la columna cromatográfica.

En el cromatograma del análisis por CG-EM de la derivatización de clenbuterol con BSTFA se observó un solo pico. Éste presentó mayoritariamente los iones fragmento característicos del derivado O-TMS de clenbuterol. Se observó un aumento en la línea base al igual que en la derivatización con MSTFA-TMIS.

Debido a que en el análisis con BSTFA se obtuvo mayoritariamente un solo derivado se eligió éste como derivatizante óptimo.

Tiempo de derivatización

Posteriormente se evaluó si el aumento del tiempo de derivatización (de 30 a 40 min) favorecía la formación del derivado de clenbuterol. Se observó que el área del pico del derivado fue similar a pesar de modificar el tiempo de derivatización por lo que se concluyó que a los 30 min la reacción ya se había completado. Por lo tanto, se eligió como tiempo de derivatización óptimo 30 min para mantener el tiempo del análisis lo más corto posible.

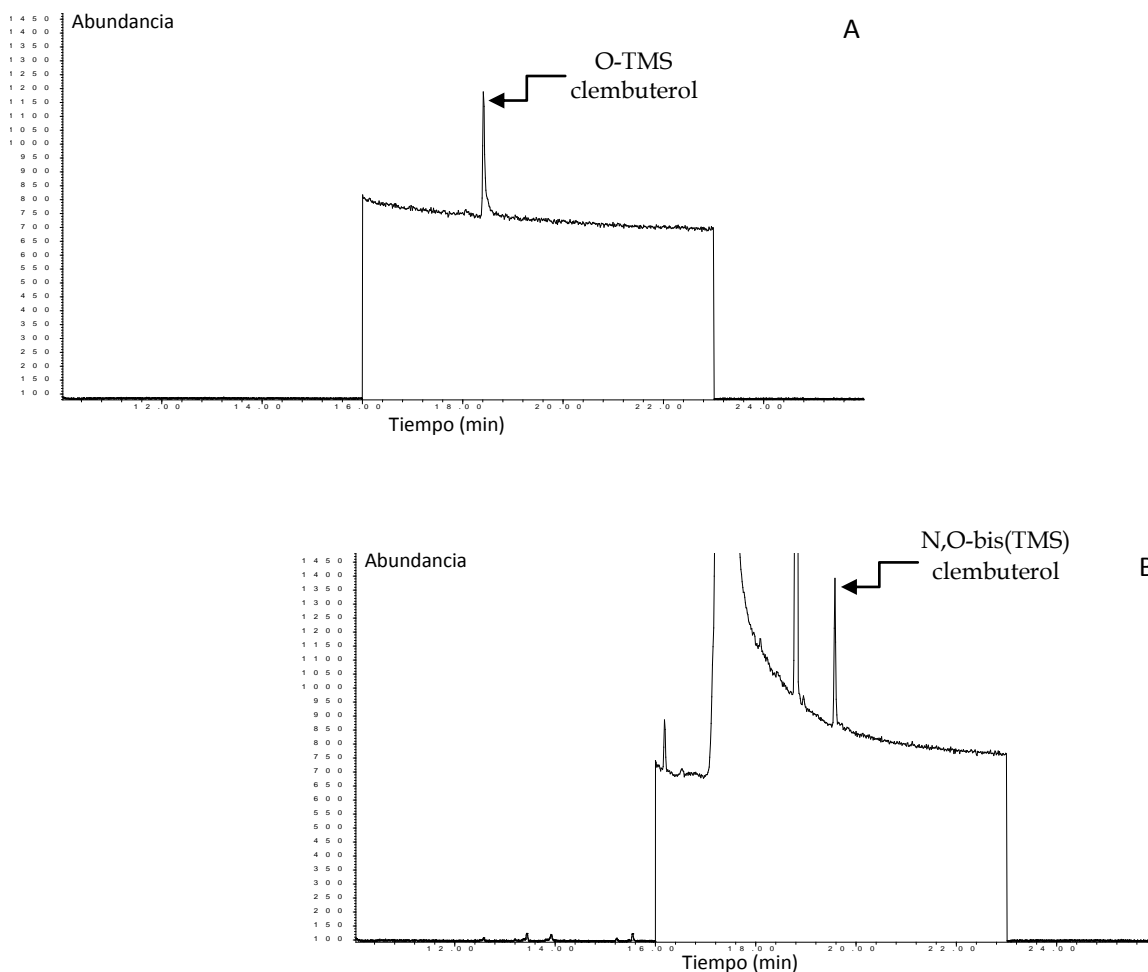


Figura 17. Análisis de la derivatización de clembuterol estándar ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) en modo SIM con:
A) BSTFA y B) MSTFA-TMIS.

Acondicionamiento de la barra de extracción previo al análisis

En algunos trabajos se reporta un acondicionamiento de la barra extractante previo a la extracción. Este acondicionamiento activa la fase polimérica para la sorción de los analitos por lo que se evaluó si realizarlo mejoraría la extracción de clembuterol. Se comparó el análisis de clembuterol con y sin acondicionamiento de la barra extractante. Para realizar el acondicionamiento se colocó la barra de extracción en un vial de 11 mL con 1 mL de metanol, se agitó a 600 rpm durante 30 min y posteriormente se realizó el análisis. Se observó que el acondicionamiento de la barra extractante aumentó la extracción de clembuterol, obteniéndose un $\text{CV} < 20\%$ ($n=3$). Debido a esto se realizó el acondicionamiento de la barra de extracción previo al análisis de clembuterol.

Disolvente de desorción

Hasta este punto la desorción de los analitos se había realizado con metanol por lo que se estudió la desorción con acetonitrilo y con una mezcla metanol/acetonitrilo (1:1) para elegir el disolvente de desorción óptimo. Al utilizar la mezcla metanol/acetonitrilo (1:1) la desorción y la precisión del método fueron bajas (CV>70 %). La desorción fue similar al utilizar metanol y acetonitrilo siendo la precisión aceptable en ambos casos (CV<22 %), sin embargo, se observaron menos impurezas en el análisis con acetonitrilo por lo que se eligió este último como disolvente de desorción óptimo. En la *Figura 18* se muestran cromatogramas de la evaluación del disolvente de desorción.

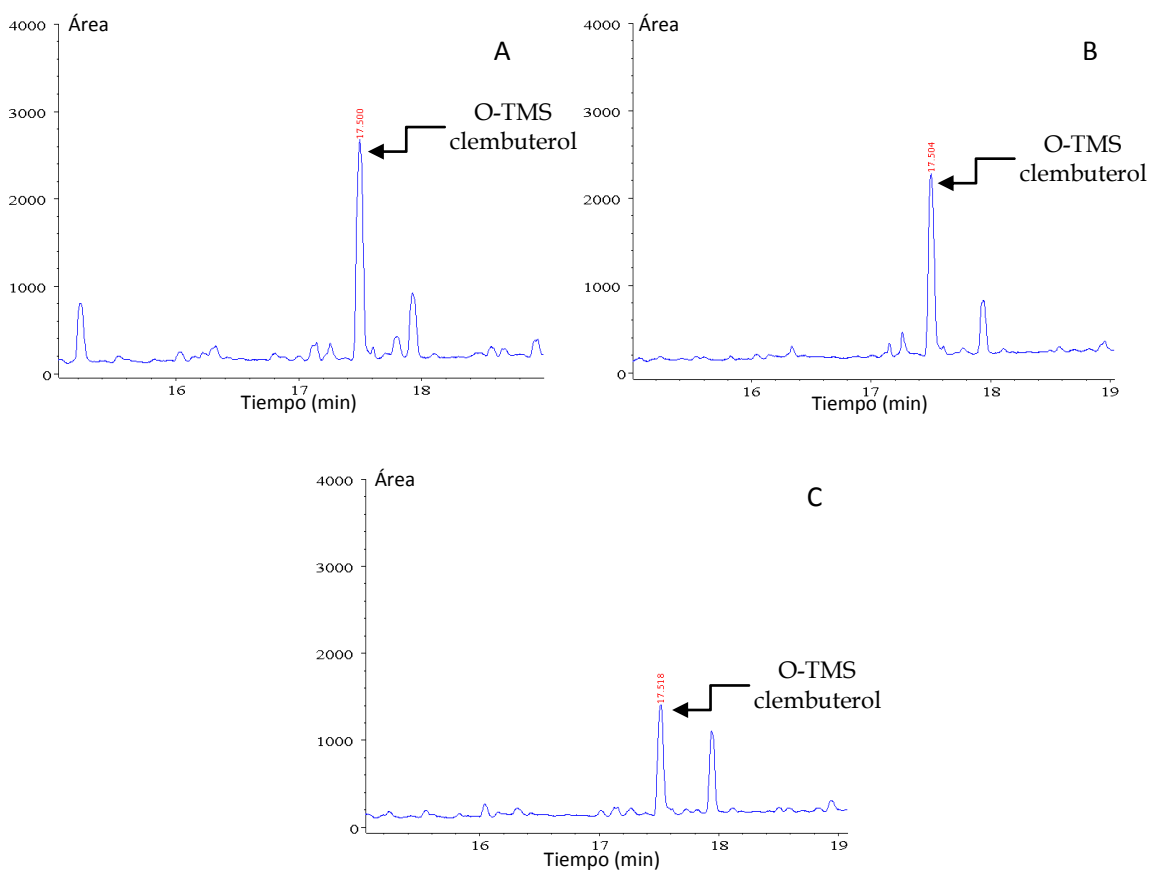


Figura 18. Análisis de la extracción de clenbuterol estándar ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) mediante SBSE. Disolvente de desorción utilizado: A) metanol, B) acetonitrilo y C) mezcla metanol/acetonitrilo (1:1).

Al realizar SBSE se observó que la desorción líquida realizada después de la extracción no era suficiente para desorber todas las sustancias extraídas por la fase polimérica. Para

limpiar a barra de extracción después de cada análisis se realizaron tres desorciones más bajo las mismas condiciones de la primera desorción.

pH de extracción

El pKa del grupo amino alifático y alcohol de clenbuterol es de 9.6 y 13.3, respectivamente, por lo que entre estos valores de pH el clenbuterol se encuentra mayoritariamente en su forma molecular, lo que aumenta su afinidad por la fase polimérica de la barra mejorando la extracción. Para confirmar esto se realizó la comparación de la extracción de clenbuterol en disolución estándar a pH 4, 7 y 10.

La extracción de clenbuterol a pH 4 fue baja, sin embargo, fue mayor a pH 7 que a pH 10, que no era lo que se esperaba. Estos resultados se podrían justificar considerando que el ajuste del pH no se realizó con disolución amortiguadora y debido a esto se observó que el pH variaba durante el análisis. La alta variabilidad observada en los análisis a pH 4 (CV=69 %, n=3) y 10 (CV=31 %, n=3) también puede ser atribuida a la inestabilidad del pH (a pH 7 se obtuvo un CV=22 %, n=3).

Para evitar la variación del pH de extracción, éste fue ajustado con una disolución amortiguadora y se comparó la extracción a pH 7 y 10, observándose lo que se esperaba: una mayor extracción a pH 10 (CV<25 %, n=3 para ambos casos). De acuerdo con estos resultados se eligió trabajar a pH 10 ajustando con disolución amortiguadora. Se observó que a pH>10 la extracción de clenbuterol aumenta, pero de acuerdo con las especificaciones del fabricante de la barra de extracción, a mayor pH la degradación de la fase polimérica aumenta considerablemente.

Se utilizó la metodología optimizada (descrita en la sección 5.2.5.) para realizar la extracción de un estándar de clenbuterol a 500 ng mL⁻¹ en medio acuoso mediante SBSE, obteniendo un CV de 18.17 % (n=6).

6.2. Análisis en orina fortificada con clenbuterol

La metodología fue optimizada en disolución estándar por lo que fue necesario aplicarla en orina ya que ésta es la matriz analizada en las pruebas antidopaje. Al realizar un blanco de orina no se observaron interferencias de la matriz en el tiempo de retención del derivado de clenbuterol (17.5 min).

Posteriormente se realizó por triplicado el análisis de orina fortificada con clenbuterol (500 ng mL⁻¹) mediante SBSE-GC utilizando la metodología optimizada. Se obtuvo un CV=10.63 %, que fue menor que el observado en el análisis de clenbuterol en disolución estándar (CV=18.17 %). No se observaron interferencias de la matriz con el pico del derivado. En la *Figura 19* se muestra un cromatograma del blanco de orina y del análisis de orina fortificada.

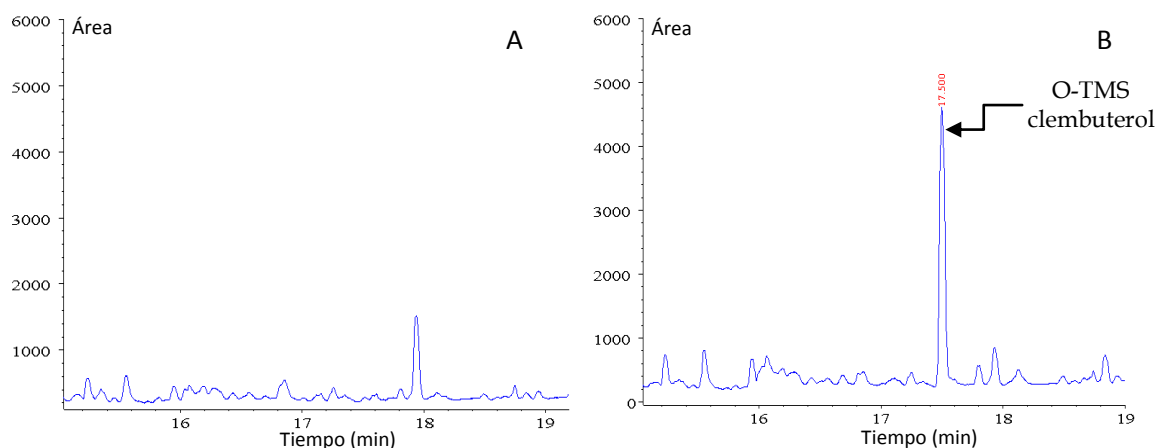


Figura 19. Cromatograma del análisis mediante SBSE-GC de: A) blanco de orina y B) orina fortificada con clenbuterol (500 ng mL⁻¹, pH=10.72).

Cabe señalar que estos análisis en orina fueron realizados con la barra de extracción utilizada para la optimización en agua, con la que se habían realizado 76 extracciones. A partir de los resultados del análisis de clenbuterol en orina fortificada se puede concluir que la barra extractante seguía permitiendo obtener resultados precisos (CV=10.63 %).

Una vez evaluada la precisión en orina fortificada se procedió al estudio de la linealidad del método mediante la elaboración de una curva de calibración.

6.3. Curva de calibración

Se realizó una curva de calibración en el intervalo de concentración de 100-200 ng mL⁻¹ con una barra de extracción nueva para asegurar la máxima capacidad de sorción de la fase polimérica. Se obtuvo un R² de 0.3063 por lo que no se realizó la repetición del análisis. Se pensó que la falta de linealidad se debía a que el intervalo de concentración estudiado era demasiado bajo por lo que se realizó una curva de calibración en un intervalo mayor.

Al realizar la curva de calibración en el intervalo de concentración de 200-300 ng mL⁻¹ por triplicado se obtuvo un R² de 0.8250. Se observó una alta variabilidad en el análisis (se obtuvieron CV hasta de 40 %) debido a la inestabilidad del pH del medio. Para disminuir esta variabilidad se preparó una nueva disolución amortiguadora de CO₃²⁻/HCO₃⁻ (pH=10.72) y se realizó una curva de calibración incrementando el intervalo de concentración a 200-500 ng mL⁻¹. El pH de extracción fue similar para todos los puntos de la curva. No se repitió la curva debido a que se obtuvo un R²=0.7886. Hasta este punto se habían realizado 48 extracciones a pH=10.72 con la barra extractante por lo que se pensó que el medio alcalino podría haber dañado la fase de extracción de la barra, afectando el estudio de la linealidad del método.

Para comprobar si la falta de linealidad se debía a la barra de extracción se repitió la curva de calibración en el mismo intervalo de concentración utilizando una barra extractante nueva, obteniéndose un R² de 0.9757. Se observaron impurezas en los cromatogramas, sin embargo, éstas no interfirieron en el análisis del pico del derivado. Al repetir la curva aumentaron las impurezas y se observó la coelución de éstas con el derivado por lo que se realizó un análisis por CG-EM y se observó que las impurezas correspondían a fragmentos de la fase polimérica de la barra de extracción (siloxanos). Se pensó que la degradación de

la fase polimérica se debía a un defecto de fábrica de la barra extractante por lo que se repitió la curva de calibración en el mismo intervalo de concentración utilizando otra barra de extracción nueva observándose impurezas cuya interferencia con el pico del derivado no permitió realizar el análisis. Se pensó que la degradación de la fase polimérica de la barra extractante se debía al pH del medio (pH=10.72) por lo que se realizó una curva de calibración en el mismo intervalo de concentración ajustando el pH a 9.09 con una disolución amortiguadora de $\text{CO}_3^{2-}/\text{HCO}_3^-$ utilizando otra barra de extracción nueva obteniéndose un $R^2=0.9896$, sin embargo, se observó (en menor grado) la coelución de impurezas con el pico del derivado.

7. Conclusiones

1. Se propuso y optimizó una metodología para la determinación de clenbuterol en orina mediante extracción por sorción en barra magnética seguida de cromatografía de gases.
2. Al aplicar la metodología optimizada a una muestra de orina fortificada (500 ng mL^{-1}) se determinó clenbuterol con una precisión aceptable ($\text{CV}=10.63 \%$).
3. Al realizar la curva de calibración ($200\text{-}500 \text{ ng mL}^{-1}$) en orina fortificada a pH 9.1 se observó una tendencia lineal ($R^2=0.9896$).
4. El método aún no puede ser propuesto como prueba antidopaje debido a que no está validado. Además, debido a la rápida degradación del polímero de la barra extractante a pH 10.7, el método es costoso por requerir el remplazo continuo de la barra extractante.
5. La metodología planteada es un avance importante en el desarrollo de un método para la determinación de clenbuterol en orina mediante SBSE-GC. Es posible evitar la degradación de la fase polimérica realizando la extracción a un $\text{pH}<10.7$, por ejemplo, $\text{pH}=9$. Si bien se observaría una pérdida de sensibilidad debido a la disminución del pH, ésta podría compensarse con la optimización de otros parámetros experimentales tales como el tiempo de extracción y desorción, temperatura de extracción y desorción y adición de sal.

8. Bibliografía

1. Melwanki M., Hsu W., Huang S. (2005). *Determination of clenbuterol in urine using headspace solid phase microextraction or liquid–liquid–liquid microextraction*. *Analytica Chimica Acta*, 552, p. 67–75.
2. Aresta A., Calvano C., Palmisano F., Zambonin C. (2008). *Determination of clenbuterol in human urine and serum by solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 47, p. 641–645.
3. World Anti-Doping Agency (WADA). Información de la WADA.
www.wada-ama.org
Consultado el 1/julio/2014.
4. World Anti-Doping Agency (WADA). *WADA Technical Document – TD2013MRPL*.
www.wada-ama.org
Consultado el 1/julio/2014.
5. Comisión Nacional de Cultura Física y Deporte (CONADE). Misión de la CONADE.
www.conade.gob.mx
Consultado el 1/julio/2014.
6. Engelmann M., Hinz D., Wenclawiak B. (2003). *Solid-phase micro extraction (SPME) and headspace derivatization of clenbuterol followed by GC–FID and GC–SIMMS quantification*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 375, p. 460–464.

7. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). Regulación de clenbuterol en la industria ganadera.
www.senasica.gob.mx
Consultado el 1/julio/2014.
8. World Anti-Doping Agency (WADA). *5.1 The Prohibited List (2011)*.
www.wada-ama.org
Consultado el 1/julio/2014.
9. Chan T. (2001). *Food-Borne Clenbuterol May Have Potential for Cardiovascular Effects with Chronic Exposure (Commentary)*. *Clinical Toxicology*, 39, p. 345–348.
10. Yang S., Liu X., Xing Y., Zhang D., Wang S., Wang X., Xu Y., Wu M., He Z., Zhao J. (2013). *Detection of Clenbuterol at Trace Levels in Doping Analysis Using Different Gas Chromatographic–Mass Spectrometric Techniques*. *Journal of Chromatographic Science*, 51, p. 436-445.
11. Koole A., Jetten A., Luo Y., Franke J., de Zeeuw R. (1999). *Rapid Extraction of Clenbuterol from Human and Calf Urine Using Empore C8 Extraction Disks*. *Journal of Analytical Toxicology*, 23, p. 632-635.
12. American Chemical Society (ACS). Valor estimado de pKa de clenbuterol.
scifinder.cas.org
Consultado el 1/julio/2014.
13. World Anti-Doping Agency (WADA). *WADA Technical Document – TD2014MRPL*.
www.wada-ama.org
Consultado el 1/julio/2014.

14. UK Anti-Doping (UKAD). *Anti-Doping Fact Sheet*.
www.ukad.org.uk
Consultado el 6/04/2014.
15. Xu Z., Hu Y., Li G. (2010). *Investigation of ractopamine molecular imprinted stir bar sorptive extraction and its application for trace analysis of β_2 -agonists in complex samples*. Journal of Chromatography A, 1217, p. 3612-3618.
16. Smith R. (2003). *Before the injection-modern methods of sample preparation for separation techniques*. Journal of Chromatography A, 1000, p. 3-27.
17. Prieto A., Basauri O., Rodil R., Usobiaga A., Fernández L., Etxebarria N., Zuloaga O. (2010). *Stir-bar sorptive extraction: A view on method optimization, novel applications, limitations and potential solutions*. Journal of Chromatography A, 1217, p. 2642-2666.
18. Baltussen E., Sandra P., David F., Cramers C. (1999). *Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: theory and principles*. Journal of Microcolumn Separations, 11, p. 737-747.
19. He M., Chen B., Hu B. (2014). *Recent developments in stir bar sorptive extraction*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 406, p. 2001-2026.
20. Schummer C., Delhomme O., Appenzeller B., Wennig R., Millet M. (2009). *Comparison of MTBSTFA and BSTFA in derivatization reactions of polar compounds prior to GC/MS analysis*. Talanta, 77, p. 1473-1482.
21. Damasceno L., Ventura R., Ortuño J., Segura J. (2000). *Derivatization procedures for the detection of β_2 -agonists by gas chromatographic/mass spectrometric analysis*. Journal of Mass Spectrometry, 35, p. 1285-1294.

22. Harris D. (2007). *Análisis químico cuantitativo*. Ed. Reverté, 3ª edición, España, capítulo 23 y 24.
23. McNair H., Miller J. (1998). *Basic Gas Chromatography*. Ed. Wiley & Sons Inc., 1era edición, EUA, capítulos 1, 2 y 10.
24. Skoog D., West D., Holler F., Crouch S. (2005). *Fundamentos de Química Analítica*. Ed. Thomson, 8ª edición, México capítulo 30.
25. McNair H. (1981). *Cromatografía de gases*. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos, Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Monografía no. 23, EUA, capítulo 3.
26. Sandra P. (1989). *Resolution-Column Efficiency*. *Journal of High Resolution Chromatography*, 12, p. 273-277.
27. Hewlett-Packard Company. (1994). *5890 Series II Cool On-Column operating manual*. 10ª edición, EUA.
28. Standard Research Institute (SRI) Instruments. *PTV-Programmable Temperature Vaporization*.
www.srigc.com
Consultado el 3/octubre/2014.
29. Agilent Technologies. *The PTV Inlet*.
www.ecs.umass.edu
Consultado el 3/octubre/2014.