

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



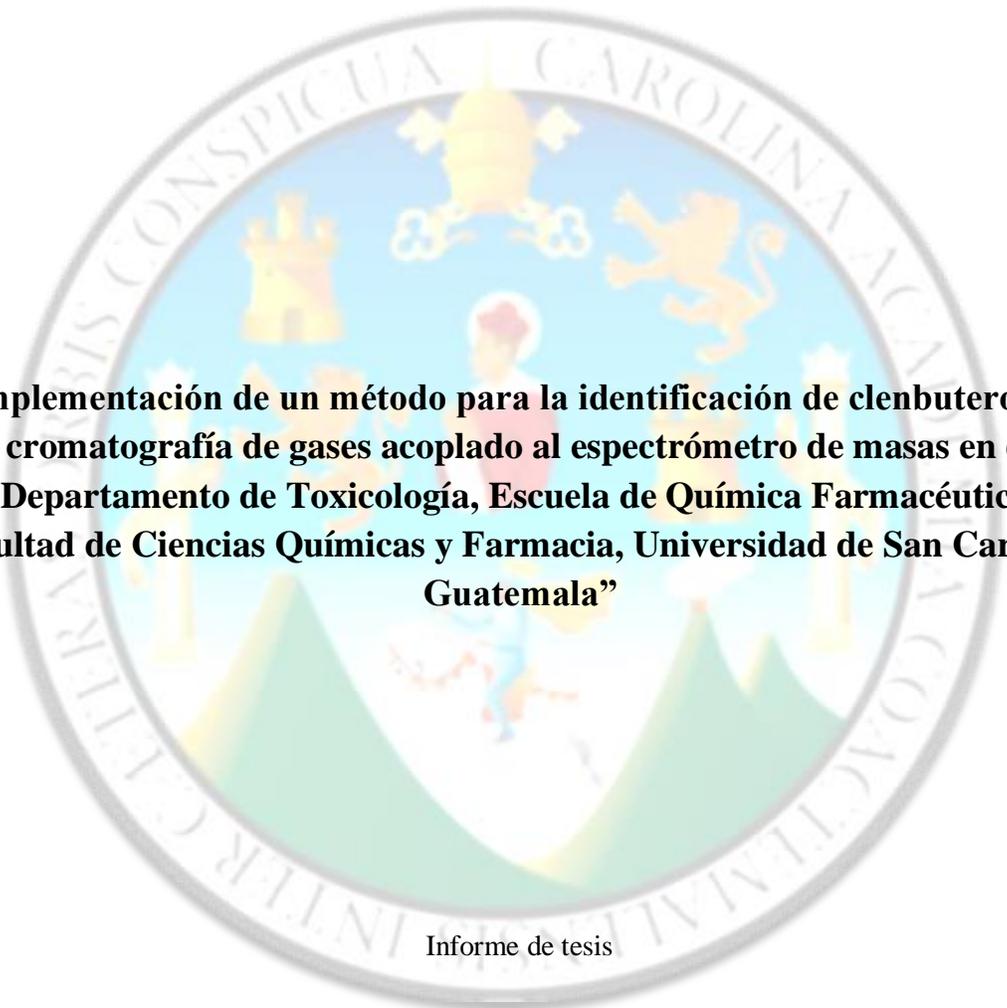
“Implementación de un método para la identificación de clenbuterol por cromatografía de gases acoplado al espectrómetro de masas en el Departamento de Toxicología, Escuela de Química Farmacéutica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala”

Jorge Emilio Arroyo Robles

Químico Farmacéutico

Guatemala, Mayo 2018

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central shield with a blue background, depicting a figure in a red and white robe. Above the shield are two golden castles and a golden crown. The shield is flanked by two golden lions. The entire emblem is set against a light blue background with green hills at the bottom. The Latin motto "SIBIS CONSPICUA CAROLINA ACIA" is inscribed around the top inner edge of the seal, and "UNIVERSITATIS INTER-CENTRALIS GUATEMALENSIS" is inscribed around the bottom inner edge.

“Implementación de un método para la identificación de clenbuterol por cromatografía de gases acoplado al espectrómetro de masas en el Departamento de Toxicología, Escuela de Química Farmacéutica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala”

Informe de tesis

Presentado Por:

Jorge Emilio Arroyo Robles

Para optar por el título de

Químico Farmacéutico

Guatemala, Mayo 2018

DEDICATORIA

A Dios

Por haberme permitido llegar hasta este momento y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A mi Esposa Stella Cobar

Por su amor. Por haberme apoyado en todo momento, por su paciencia, y el apoyo incondicional. Pero mas que nada, por ser la mejor mujer del mundo.

A mis Hijos Monserrat y Emilio Arroyo

Por ser la inspiración y la motivación que necesitaba para alcanzar esta meta.

A mi Mamá Beatriz de Arroyo

Por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, y ser la mejor madre del mundo.

A mi Papá Emilio Arroyo

Por los ejemplos de perseverancia y constancia que lo caracterizan, por el valor demostrado para salir adelante y por su amor.

A mi Hermana Lourdes Arroyo

Por ser mi mejor amiga y apoyarme en todas las metas de mi vida.

A mi Hermana Alejandra Arroyo

Por estar conmigo y apoyarme siempre.

A mis Abuelos

Por quererme y apoyarme siempre, esto también se lo debo a ustedes.

A mi Familia, mis Tíos y mis Primos

Por su cariño, apoyo y resguardo que me han dado en todo momento.

Agradecimientos:

A la Universidad de San Carlos de Guatemala y a la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

A la Licda Miriam Carolina Guzmán Quilo MSc., por su asesoría, paciencia y apoyo en la realización de esta tesis.

A la Licda. Cinthya Paola Rivera, por la revisión, apoyo y observaciones pertinentes para la elaboración eficaz del presente trabajo de investigación.

Al Departamento de Toxicología, Escuela de Química Farmacéutica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala

A todas las personas que de una u otra manera contribuyeron en la elaboración de la misma.

JUNTA DIRECTIVA

| | |
|---|------------|
| Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda | Decano |
| Licda. Elsa Julieta Salazar Meléndez de Ariza, M.A. | Secretaria |
| MSc. Miriam Carolina Guzmán Quilo | Vocal I |
| Dr. Juan Francisco Pérez Sabino | Vocal II |
| Lic. Carlos Manuel Maldonado Aguilera | Vocal III |
| Br. Andreina Delia Irene López Hernández | Vocal IV |
| Br. Carol Andrea Betancourt Herrera | Vocal V |

Índice

| | | |
|-----|-----------------------------------|----|
| 1. | Introducción | 1 |
| 2. | Antecedentes | 3 |
| 3. | Justificación | 9 |
| 4. | Objetivos | 10 |
| 5. | Hipótesis | 11 |
| 6. | Materiales y Métodos | 12 |
| 7. | Resultados | 21 |
| 8. | Discusión | 47 |
| 9. | Conclusiones | 57 |
| 10. | Recomendaciones | 59 |
| 11. | Referencias | 60 |
| 12. | Anexo 1 | 64 |
| 13. | Anexo 2 | 76 |
| 14. | Anexo 3 | 83 |

1. Introducción

El clenbuterol es clasificado como un esteroide de la familia de los beta-adrenérgicos. Actualmente según el Acuerdo Ministerial 821-2007 del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación (MAGA) se prohíbe su uso y comercialización en todas las ramas pecuarias, por sus efectos anabolizantes, se utiliza para acelerar el desarrollo del ganado vacuno y para incrementar el peso vivo y el de la masa muscular. Por lo tanto, el clenbuterol pasa al cuerpo humano cuando se consume la carne contaminada con esta sustancia y causa efectos secundarios no deseados en el organismo humano como taquicardia, temblores, náusea, vómitos, dolor de pecho y dolores musculares (Mencías et al., 2000).

En el ámbito farmacoterapéutico no se considera como un medicamento controlado, ya que no se encuentra incluido dentro de las listas de Psicotrópicos y Estupefacientes del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. El clenbuterol se puede encontrar de forma inyectable para uso pecuario, tabletas y jarabes para uso humano, cabe mencionar que la presentación utilizada para el dopaje de atletas es de la forma inyectada.

El uso ilegal en humanos como agente dopante, específicamente en atletas de alto rendimiento se da debido a su acción estimulante y termogénica por lo que produce aumento en la capacidad anaeróbica en el organismo. El clenbuterol se clasifica como estimulante del sistema nervioso central por lo que produce incremento de la presión arterial e incremento en el transporte de oxígeno (Mecías et al., 2000).

Debido a los usos del clenbuterol ya mencionados es importante un adecuado control ya sea en el producto vacuno o bien como análisis a los atletas de alto rendimiento. Ya que el clenbuterol es una molécula de compleja extracción y análisis instrumental debido a su estructura molecular, es de vital importancia instaurar su análisis en el Departamento de Toxicología de la Facultad de Ciencias

Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos para prestar el servicio a la población.

El clenbuterol se identifica por varios métodos analíticos como los ensayos inmunoabsorbentes ligados a una enzima (ELISA), por cromatografía líquida (HPLC) y por cromatografía de gases (GC), mientras que para la confirmación se necesitan métodos más sensitivos como la cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MS) (Ye, et al., 2015). Tomando en cuenta el apoyo que podría brindar el Departamento de Toxicología en la identificación de clenbuterol se considera adecuado realizar el protocolo de identificación por medio del GC-MS.

2. Antecedentes

El clenbuterol al principio se utilizó como un medicamento en la veterinaria debido a su acción broncodilatadora, descongestionante (González et al., 1996; Mersmann, 2002). Posteriormente, se descubrió que a dosis diez veces superiores a las terapéuticas, presentaban una acción anabolizante, favoreciendo la síntesis de proteína y disminuyendo la de grasa, lo que dio lugar a la denominación de este grupo como: agentes repartidores de energía. Este efecto se comprobó en diferentes especies animales: bovinos (Ricks et al., 1984); ovinos y porcinos (Jones et al., 1985).

Desde el año 1981 la comunidad económica europea empieza a regular el uso de ciertas sustancias químicas que, con efecto hormonal o promotor del crecimiento, puedan emplearse en la cría del ganado (Reig, 2008). Es hasta el 16 de septiembre de 1989 que se incluye a los β -agonistas en general y al clenbuterol en particular a la directiva 86/469/EEC, el cual prohíbe el uso de estas sustancias con fines de promotores de crecimiento, obligando a cada país del bloque a hacer una ampliación del Código Penal, tipificando el uso del clenbuterol en los animales cuyas carnes o productos se destinen al consumo humano, como delito contra la salud pública (Kuiper et al., 1998).

En los Estados Unidos después de las intoxicaciones ocurridas en Europa y algunos casos similares en Texas, la FDA lanza en 1991 las primeras cartas de aviso sobre la posibilidad del uso ilegal del clenbuterol en alimento para animales domésticos, y no es, sino hasta 1995 cuando el método para la determinación de residuos de clenbuterol en retina es validado, que se prohíbe el uso del clenbuterol en la alimentación animal y sólo se autoriza para su uso terapéutico en caballos. No obstante, el zilpaterol y la ractopamina se autorizan como promotores de crecimiento en ganado bovino. (Mitchell and Dunnavan, 1998).

2.1 Métodos para la detección de los β -agonistas

Debido a la naturaleza, estructura y tamaño de la molécula de clenbuterol, existe una gran variedad de procedimientos analíticos que se han publicado en la literatura desde 1990, para la determinación de residuos de clenbuterol y otros β -agonistas en diferente tipo de tejidos. Los métodos para monitoreo incluyen a los ensayos inmunoabsorbentes ligados a una enzima (ELISA), a la cromatografía de líquidos (HPLC) y la cromatografía de gases (GC), mientras que para la confirmación de tejidos positivos se necesitan métodos más sensitivos como la cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MS), los cuales presentan límites inferiores de detección a 0.01 mg por kg (Girault, Fourtillan, 1990; Heitzman, 1996).

2.1.1 Ensayos inmunoenzimáticos:

Los ensayos inmunoenzimáticos permiten la detección de todos los compuestos capaces de unirse a un receptor, incluyendo las moléculas recién sintetizadas. El primer ensayo inmunoenzimático para análisis de clenbuterol fue descrito por Yamamoto e Iwata (1982) usado para determinar clenbuterol en plasma de humanos tratados por vía oral. La principal ventaja de estos métodos es la rapidez: el manejo de la muestra es fácil y sencillo cuando son pocas muestras, además de ser más barato que el uso de otro tipo de técnicas instrumentales como las cromatografías. El tiempo necesario para llevar a cabo un ensayo de placa de ELISA es menos de 6 horas para la mayoría de los kits, excluyendo la extracción y el límite de detección es generalmente cercano a 100 ng de clenbuterol por ml (Yamamoto e Iwata, 1982; Kim and Kim, 1997). Los anticuerpos del ensayo inmunoenzimático son selectivos, sin embargo, existe una reactividad cruzada entre los análogos estructurales del clenbuterol. En un estudio realizado por Hahnau y Jülicher (1996) los anticuerpos del salbutamol mostraron 100% de reactividad cruzada con clenbuterol entre los kits de prueba. Actualmente los inmunoensayos se han convertido cada vez más específicos con la excepción de unos pocos sistemas que implican una reactividad cruzada con alguna mezcla de anticuerpos.

Algunos autores mencionan que el inmunoensayo puede ser utilizado para detectar la presencia de clenbuterol, pero los resultados positivos deben ser confirmados por métodos instrumentales, como la cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas, este tipo de métodos son muy costosos y tardados para trabajos de rutina, además de la preparación de la muestra consume tiempo y es más laborioso debido a que implica una hidrólisis, extracción, purificación y derivatización (Lin-Ying et al., 2005).

2.1.2 Cromatografía de líquidos:

La cromatografía de líquidos proporciona ventajas significativas sobre la cromatografía de gases para el análisis de clenbuterol, en este método no hay necesidad de derivatización, y el sistema cromatográfico es compatible con muestras biológicas, el desarrollo de interfaces de la cromatografía de líquidos como la termopulverización y electrospray ha permitido el análisis de clenbuterol en varias matrices como: orina, suero, plasma, hígado, pelo y retina, con límites de detección de 0.01 a 0.5 ng L (Lin-Ying, 2005). En lugar de detección por espectrómetro de masas, se han acoplados otros métodos instrumentales como: detectores electroquímicos y ultravioleta que proporcionan la sensibilidad necesaria para la confirmación de clenbuterol, sin embargo, la selectividad es menor que en el caso del detector selectivo de masas (Gratacós, 2007).

2.1.3 Espectrometría de masas:

La Espectrometría de Masas es una técnica microanalítica usada para identificar compuestos desconocidos, cuantificar compuestos conocidos, y para elucidar la estructura y propiedades químicas de las moléculas. Requiere cantidades pequeñas de muestra y obtiene información característica como el peso y algunas veces la estructura del analito (Gallego, 2017).

En la Espectrometría de masas la muestra es ionizada y por tanto destruida usando diversos procedimientos para ello el más usual y utilizado es la técnica denominada de Impacto Electrónico consistente en el bombardeo de la muestra

previamente vaporizada mediante el uso de alto vacío y una fuente de calor con una corriente de electrones a alta velocidad. Mediante este proceso, la sustancia pierde algunos electrones y se fragmenta dando diferentes iones, radicales y moléculas neutras. Los iones moléculas o fragmentos cargados son entonces conducidos mediante un acelerador de iones a un tubo analizador curvado sobre el que existe un fuerte campo magnético y conducidos a un colector/analizador sobre el que se recogen los impactos de dichos iones en función de la relación carga/masa de los mismos (Gallego, 2017).

La cromatografía de gases es una técnica separativa que permite la separación de mezclas muy complejas. Pero una vez separados, detectados, e incluso cuantificados todos los componentes individuales de una muestra problema, el único dato de que disponemos para la identificación de cada uno de ellos es el tiempo de retención de los correspondientes picos cromatográficos. Este dato no es suficiente para una identificación inequívoca, sobre todo cuando analizamos muestras con un número elevado de componentes (Gallego, 2017).

Por otra parte, la espectrometría de masas puede identificar de manera casi inequívoca cualquier sustancia pura, pero normalmente no es capaz de identificar los componentes individuales de una mezcla sin separar previamente sus componentes, debido a la extrema complejidad del espectro obtenido por superposición de los espectros particulares de cada componente (Gallego, 2017).

2.2 Investigaciones relacionadas

A continuación, se hará una reseña cronológica de diversas investigaciones que se han realizado acerca de la extracción, identificación y cuantificación de clenbuterol en diferentes matrices, el denominador común de los artículos presentados a continuación es la identificación y cuantificación con la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

2.1.1 En 2015 Ye De, et al, realizan la extracción, identificación y cuantificación de clenbuterol en carne de cerdo por microextracción en fase sólida de inmersión directa, en el artículo se concluye que el método de microextracción en comparación con extracción con disolventes disminuye los costos de análisis y obtiene el objetivo esperado el cual es la detección de clenbuterol en carne de cerdo con un porcentaje de recuperación del 97,4-105,7%. (Ye De,2015).

2.1.2 En el 2013, Uzunov realizó el estudio que tenía como objetivo monitorear la presencia de residuos de clenbuterol en el músculo de carne de bovino, se recolectaron 55 muestras y se utilizó método de extracción líquido-líquido con derivatización con BSTFA-TMS. Los resultados obtenidos fueron confirmatorios por lo que indicaron que el clenbuterol todavía se utiliza ilegalmente como promotor del crecimiento bovino. (Uzunov, R., et al, 2013).

2.1.3 En 2012, Yang, et. al, realizaron un estudio que se basó en la detección de clenbuterol a niveles traza para análisis de dopaje utilizando distintas técnicas cromatográficas en gases – masas, en el mismo se utilizan muestras biológicas de orina las cuales se someten a procesos de hidrolización con enzimas glucoronidasas y de derivatización con trifluoroacetamida. El artículo concluye que el GC-MS es un método excelente para la detección de clenbuterol, sin embargo, también concluye que los métodos GC-MS-MS y GC-HRMS pueden confirmar clenbuterol cuando su concentración es inferior a 2 ng / ml. El porcentaje de recuperación obtenido oscila en un rango de 86-112% (Yang S et. al, 2012).

2.1.4 En 2005, Otiz JC, en Mérida, Yucatán, México, se lleva a cabo un estudio en el cual utilizaron muestras de tejido hepático bovino, se estandariza la técnica cromatográfica con condiciones específicas y se obtiene un porcentaje de recuperación de 90.2%. El artículo concluye que la técnica de gases/masas resultó efectiva para detectar clenbuterol. (Ortiz, J C., 2005).

2.1.5 En 2002, Sniegocki T., realiza el estudio en el departamento de Farmacología y Toxicología del Instituto Nacional de Investigación de Polonia en el año 2002, donde describe un método de espectrometría de masas cromatográfica de gases específico para la determinación de clenbuterol en muestras de orina e hígado. El método, preparado para fines de confirmación, incluye la extracción en fase sólida para la limpieza de muestras biológicas, derivatización con BSTFA-TMS y análisis de los derivados de clenbuterol. El límite de detección se estableció a 0.5 ng / g en el hígado y 0.5 ng / ml en la orina, y las recuperaciones fueron superiores al 80% (Sniegocki T., et al, 2002).

2.1.6 En el año 2000, Abukhalaf, I. K., se describe un procedimiento utilizando GC-MS para la identificación y cuantificación de clenbuterol en plasma, orina y tejido hepático. Se realiza extracción en fase sólida y se derivatiza utilizando trimetilboroxina. Se concluye que el método es confiable, simple y sensible con porcentajes de recuperación que oscilan de 91 al 101 % (Abukhalaf, I. K., 2000).

2.1.7 En 1999, Black R., en Australia se realizó un estudio que detalla un método sensible y cuantitativo para la determinación de salbutamol, clenbuterol y otros beta agonistas en plasma y orina utilizando extracción por fase sólida y derivatizante BSTFA-TMS, el método fue tan exitoso que fue adoptado por el Laboratorio Nacional de Ciencias Forenses de Australia en 1999 (Black R., 1999).

3. Justificación

El clenbuterol es un beta agonista el cual causa un aumento en la capacidad aeróbica, estimula el sistema nervioso central, la presión sanguínea y el transporte de oxígeno. Debido a sus cualidades es un compuesto prohibido por el Comité Olímpico Internacional, y actualmente también está prohibido para el uso pecuario ya que por esta vía es consumido por la población.

El uso farmacológico es autorizado en Guatemala por el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. Sin embargo, debido a que es un esteroide y sus efectos son anabólicos, la utilización de este compuesto es un problema que posiblemente no se ha dimensionado debido a que no se mide.

Es de suma importancia, que la Universidad de San Carlos de Guatemala, pueda contar con un método verificado para la determinación y cuantificación de este compuesto, tomando en cuenta que el Departamento de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, cumple con los requisitos de equipo y personal debidamente calificados para proveer este tipo de análisis la población, así como la capacidad de realizar proyectos de investigación relacionados con clenbuterol y garantizar la calidad de los resultados, se propone este estudio.

4. Objetivos

4.1 Objetivo General:

4.1.1 Implementar el método de detección y cuantificación de clenbuterol por cromatografía de gases-espectrometría de masas en el Departamento de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala

4.2 Objetivos Específicos:

4.2.1 Determinar el método para identificar y cuantificar clenbuterol, más accesible a las condiciones de CG-MS Perkin Elmer Clarus SQ 8s – Clarus s80 disponible para el estudio.

4.2.2 Describir las condiciones adecuadas al método y equipo seleccionado para su montaje.

4.2.3 Verificar los parámetros de desempeño del método seleccionado: linealidad, exactitud, respetabilidad, precisión, límite de detección, límite de cuantificación y rango.

4.2.4 Determinar conforme al método verificado, la concentración del clenbuterol en muestras de orina marcadas.

5. Hipótesis

La identificación y cuantificación de clenbuterol por medio de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas puede ser verificada con precisión, exactitud, linealidad y especificidad, determinando al mismo tiempo el límite de detección, el límite de cuantificación y rango.

La hipótesis se acepta en un rango de 20 a 100ppm cumpliendo con los parámetros de precisión, linealidad y repetibilidad, determinando al mismo tiempo el límite de detección, el límite de cuantificación y rango.

6. Materiales y Métodos

6.1 Universo de trabajo:

Dada la naturaleza del estudio no aplica definir población y muestra.

6.2 Recurso:

6.2.1 Humanos:

Autor: Jorge Emilio Arroyo Robles

Asesora: MSc. Miriam Carolina Guzmán Quilo

Revisora: Licenciada Cinthya Paola Rivera

6.2.2 Institucionales:

Departamento de Toxicología, Escuela de Química Farmacéutica, de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

Biblioteca virtual de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

CEDOFB - Biblioteca Central Universidad San Carlos de Guatemala

6.2.3 Materiales y Equipo de Laboratorio:

6.2.3.1 Materiales

- Hojas
- Útiles de oficina
- Computadora
- Impresora

6.2.3.2 Cristalería y Equipo

- Cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas Perkin Elmer Clarus SQ8+HS
- Columna Elite 5MS
- Balanza analítica Shimadzu
- Vasos de precipitar
- Probetas
- Balones aforados de 10, 50 y 100 mL
- Pipetas volumétricas automáticas de 0.1-1 mL y 0.001 – 0.1 mL
- Puntas para pipetas automáticas
- Pipetas serológicas
- Bulbos para pipetas
- Guantes de látex
- Gradillas
- Tubos de vidrio
- Espátulas
- Agitador eléctrico
- Centrífuga
- Campana de Extracción

6.2.3.3 Reactivos

- Metanol (grado HPLC)
- Estándar de trabajo de clenbuterol
- Estándar interno de clenbuterol deuterado –D9
- Metapirileno
- Agente derivatizante MSTBFA

6.3 Metodología

6.3.1 Se desarrolló una revisión bibliográfica y de artículos científicos exhaustiva para compilar los métodos disponibles en la literatura (anexo 1).

6.3.2 Se registraron los métodos a ensayar, en documentos y tablas estadísticas (anexo 2).

6.3.3 Se procedió al montaje y verificación de las pruebas conforme los parámetros de desempeño: precisión, exactitud, linealidad, límite de cuantificación, rango, selectividad y robustez, en el cromatógrafo de gases acoplado al espectrómetro de masas Perkin Elmer Clarus SQ8+HS.

6.3.4 Una vez se definió la metodología más apropiada por su cumplimiento de parámetros, se procedió a marcar muestras de orina en concentraciones que corresponden al rango de trabajo (clenbuterol no metabolizado) y simultáneamente muestras control y blanco.

6.3.5 La curva de calibración se desarrolló en el rango de 5 a 100 ppm de clenbuterol en orina. Se analizaron los puntos de 5, 20, 50 y 100 ppm de clenbuterol.

6.3.6 Se hicieron los ajustes a la curva según los límites de detección que se presentaron en el equipo.

6.4 Análisis estadístico

6.4.1. Linealidad

Se evaluó la linealidad realizando inyecciones de estándares de clenbuterol en el rango detectable y cuantificable por el equipo, las concentraciones verificadas abarcaron desde 20 hasta 100 ppm de clenbuterol. Luego se

realizaron curvas de calibración con el propósito de realizar cálculos de la ecuación de la recta y regresión y el coeficiente de determinación (r cuadrado) (Oficina de Acreditación Guatemalteca, C.A., 2007).

La ecuación de la regresión lineal ($y = mx + b$) calculada por el método de mínimos cuadrados basado en lectura (y) versus concentración (x).

Criterios de aceptación:

- Coeficiente de correlación r mayor o igual a 0.990
- Coeficiente de determinación r^2 mayor o igual a 0.980
- El intervalo de confianza del intercepto (α) debe de incluir el cero

6.4.2 Exactitud

Para la evaluación de exactitud se prepararon muestras de orina fortificada con estándar de clenbuterol y metapirileno como estándar interno, estándares de clenbuterol derivatizados, en concentraciones de 5, 20, 50 y 100 ppm (cuatro concentraciones diferentes del analito) (ICH Topic Q2(R1), 2006).

Para cada muestra, se reportó el valor teórico, el valor del ensayo y el porcentaje de recuperación. Se calculó el porcentaje de recuperación para todas las muestras. Se registraron resultados en una hoja de datos (Oficina de Acreditación Guatemalteca, C.A., 2007).

Según las normas de la ICH, la exactitud se puede inferir al establecer que el método es preciso, lineal y específico.

Criterio de Aceptación: El porcentaje de coeficiente de variación debe ser menor o igual al 2.0%.

6.4.3. Repetibilidad

Se realizaron 25 inyecciones de estándares de clenbuterol que cubren el rango especificado para el análisis, esto es, 5 réplicas a cada una de 5 concentraciones diferentes; las soluciones de estándar de clenbuterol se analizaron en el mismo laboratorio, bajo las mismas condiciones de operación, por el mismo analista, con el mismo equipo y reactivos y en el curso de la misma serie de análisis efectuados.

Se registraron los resultados en el formato de datos, así como los cálculos de la media, desviación estándar, desviación estándar relativa (coeficiente de variación) o intervalo de confianza del tiempo de retención del clenbuterol (Oficina de Acreditación Guatemalteca, C.A., 2007

Criterio de Aceptación: El porcentaje de coeficiente de variación debe ser menor o igual al 2.0%.

6.4.4. Precisión

Se evaluó de acuerdo con un diseño experimental con variaciones que globalmente se dan de día a día y en equipo. Se registraron los resultados en el formato de datos, así como los cálculos de la media, la desviación estándar, la desviación estándar relativa (coeficiente de variación) y el intervalo de confianza (Oficina de Acreditación Guatemalteca, C.A., 2007). Se analizaron soluciones de estándar de clenbuterol en concentraciones de 20, 50 y 100 ppm, se realizaron en dos días diferentes, en las mismas condiciones de operación. (ICH Topic Q2(R1), 2006).

Criterio de Aceptación: El porcentaje de coeficiente de variación debe ser menor o igual al 2.0%.

6.4.5. Límite de Detección

Se determinó la menor concentración a la que se detectó el analito en la matriz de la muestra (Oficina de Acreditación Guatemalteca, C.A., 2007).

6.4.6. Límite de Cuantificación

Se determinó la menor concentración en la que un analito en la matriz/muestra puede ser determinada con la exactitud y precisión requeridas para el método (Oficina de Acreditación Guatemalteca, C.A., 2007)..

6.4.7. Rango

Se verificó que el método analítico proporcionara linealidad, precisión y repetibilidad aceptables cuando se aplican a las muestras que contienen el analito en los extremos y dentro del intervalo (Oficina de Acreditación Guatemalteca, C.A., 2007). Para el rango del método se analizaron soluciones estándar de clenbuterol a tres diferentes concentraciones por triplicado, en un rango de 80 a 120% bajo las mismas condiciones de operación, por el mismo analista y en el mismo día (ICH Topic Q2(R1), 2006).

6.5 Procedimiento del marcaje de orina

Se procedió a tomar como muestra, orina para fortificar de un paciente voluntario que tenga mínimo 12 horas de ayuno. Se procedió a realizar una curva de calibración que contenga al menos 3 niveles de concentraciones de clenbuterol detectada, se procedió a realizar extracción del estándar en las orinas fortificadas por medio de fase sólida y luego se sometieron las muestras a proceso de derivatización para su inmediata inyección en el equipo cromatográfico (Clean Screen, Extraction Column. Applications Manual WorldWide Monitoring Corporation.)

Se realizó el marcaje con estándar de referencia de clenbuterol, estándar interno y se utilizó como derivatizante MSTBFA.

Se realizó una extracción en fase sólida, luego se procedió a derivatizar las muestras con MSTBFA a 70°C e inyectarlas en el Cromatógrafo de Gases acoplado a Espectrometría de Masas (United Nations Office on Drugs and Crime,2011).

6.5.1 Procedimiento realizado

6.5.1.1 Preparación de la muestra

Objetivo: contar con una muestra en solución, sin presencia de segmentos sólidos que perjudiquen el proceso final de elusión, a un pH que sea susceptible para que los analitos queden atrapados en su momento en la sílica.

- Aproximadamente 2.0 mL de muestra se le agregó agua desmineralizada para llegar a un volumen de 5 mL.
- Se agregó 100 ul de cada concentración del calibrador que contiene clenbuterol y metapirileno
- Se mezcló en vórtex.
- Se centrifugó por 10 minutos a 2000 rpm y descarto el precipitado.
- Con un dispensador se agregó 2 mL de buffer de fosfatos (pH 6.0).
- Se mezcló en vórtex.
- Se verificó el pH de la muestra el cual debía estar entre 6.0 ± 0.5 .
- Se ajustó el pH con fosfato monobásico 100 mM (para disminuir el pH) o fosfato dibásico sódico 100 mM (para incrementar el pH).

6.5.1.2. Preparación del sistema de vacío

- Se colocaron las columnas identificadas en el sistema de vacío manifold verificando que los dispositivos estén debidamente cerrados.
- Se colocaron tubos colectores de desechos dentro del sistema de vacío
- Se cerró el sistema manifold el sistema de vacío y conectarlo para graduar el vacío el cual debe estar aproximadamente en 5 pulgadas de mercurio.

6.5.1.3. Preparación de la columna de extracción

Objetivo: Humedecer la sílica a efecto de no perder muestra en el proceso, y adecuar el pH de ésta.

Con un dispensador:

- Se agregó 3 mL de metanol, aspirar.
- Se agregó 3 mL de agua desmineralizada, aspirar.
- Se agregó 1 mL de buffer de fosfatos 100 mM, aspirar.

Nota: aspirar igual o menos de 5 pulgadas de mercurio para prevenir que la columna se seque. Dejar la mitad del volumen del buffer para continuar con la adición de la muestra.

6.5.1.4. Adición de la muestra

Objetivo: hacer llegar los analitos a la columna previamente humedecida y a un pH ajustado.

- Se agregó la muestra a 1-2 mL/min.

6.5.1.5. Lavado de la columna

Objetivo: eliminar las impurezas propias de la matriz, llevar a sequedad la columna y permitir que allí permanezcan los analitos sujetos a ser extraídos con soluciones a los que son afines.

Con un dispensador:

- Se agregó 3 mL de agua desmineralizada, aspirar.
- Se agregó 3 mL de ácido acético 1.0 M, aspirar.
- Se secó la columna (2-5 minutos a 10 ó más pulgadas de Hg).
- Se agregó 2 mL de hexano, aspirar.

6.5.1.6. Elusión de drogas ácidas y neutras

Objetivo: utilizar una mezcla de solventes que garantice el arrastre de drogas ácidas y neutras.

- Se quitaron los tubos colectores de desechos y se recolectaron en viales cónicos.
- Con un dispensador se agregaron 3 mL de hexano/acetato de etilo (50:50).
- Se recolectó la porción eluyente a una velocidad de 1-2 mL/min.

6.5.1.7. Secado del solvente eluido

Objetivo: eliminar el solvente con que se extrajeron las drogas ácidas.

- Se evaporaron a sequedad a menos de 40 °C.

6.5.1.8. Lavado de la columna

Objetivo: eliminar impurezas con un solvente que no afecte las drogas básicas aún allí retenidas.

- Colocar los tubos colectores de desechos.
- Con un dispensador agregar 3 mL de metanol, aspirar.
- Se secó la columna (2-5 minutos a 10 pulgadas de Hg).

6.5.1.9. Elusión de drogas básicas

Objetivo: extraer con una mezcla de solventes de polaridad y afinidad adecuada las drogas básicas retenidas en la red de sílica gel de la columna.

- Se quitaron los tubos colectores de desechos y se recolectaron en viales cónicos
- Con un dispensador se agregó 3 mL de diclorometano/isopropanol/hidróxido de amonio concentrado (78:20:2).
- Se recolectó la porción eluyente a una velocidad de 1-2 mL/min.

Secado del solvente eluido

Objetivo: eliminar el solvente con que se extrajeron las drogas básicas.

- Se evaporó a sequedad a menos de 40 °C, en éste hay compuestos que son lábiles a las altas temperaturas.

6.5.1.10. Derivatización de las porciones eluidas

- Se identificaron y redisolviaron los calibradores, el blanco y la muestra de la siguiente manera:
- Una vez evaporado a sequedad se adicionó 75 uL de acetato de etilo y se agregó 75 uL de MSTBFA , se agitó en vortex, se cerró el tubo cónico, derivatizó calentando en el horno a 70°C por 20 minutos, se enfrió y trasvasó al inserto de polipropileno, luego se selló.

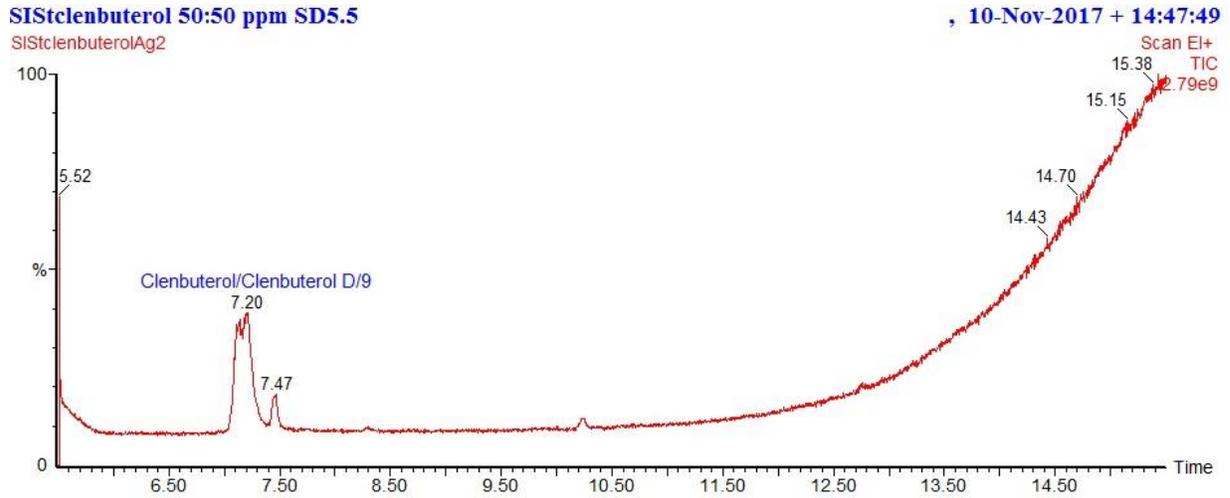
7. Resultados

7.1 Montaje del método cromatográfico

7.1.1. Clenbuterol deuterado

Imagen No. 1

Inyección estándar de clenbuterol y clenbuterol deuterado



Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Departamento de Toxicología, Escuela de Química Farmacéutica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala

Tabla No. 1

Condiciones cromatográficas para análisis de clenbuterol y clenbuterol deuterado

Rampa de temperatura del horno

| Rampa | Temperatura | Temperatura | Tiempo |
|---------------|-------------|-------------|-----------|
| Temp. Inicial | | 200 °C | 1 minuto |
| Rampa 1 | 5°C hasta | 250 °C | 0 minutos |
| Rampa 2 | 20 °C hasta | 300 °C | 5 minutos |

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Departamento de Toxicología, Escuela de Química Farmacéutica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala

Condiciones del cromatógrafo de gases

Volumen de Inyección = 2 µL de estándar de clenbuterol con clenbuterol deuterado

Tiempo total corrida cromatográfica: 18.50 minutos

Flujo del sistema: 1.56250 pts/s

Tipo de inyección Splitless

Condiciones del espectrómetro de masas

Solvent delay: 0.00 minutos – 3.30 minutos

Inyección: Modo SCAN

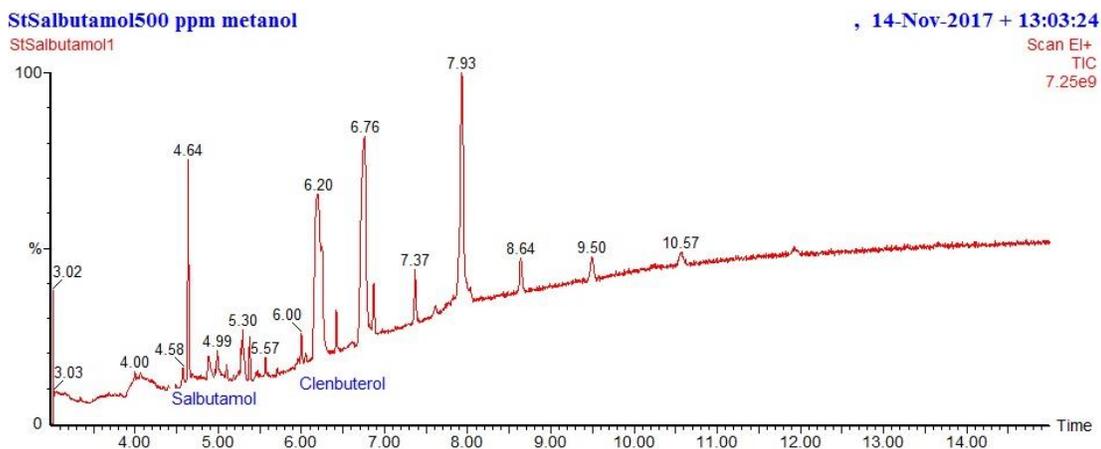
Tiempo de barrido: 5.50 – 15.00 minutos

Masas escaneadas 28-300

7.1.2. Salbutamol

Imagen No. 2

Inyección estándar de clenbuterol y salbutamol como estándar interno



Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Departamento de Toxicología, Escuela de Química Farmacéutica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala

Tabla No. 2

Condiciones cromatográficas para análisis de clenbuterol y salbutamol

Rampa de temperatura del horno

| Rampa | Temperatura | Temperatura | Tiempo |
|---------------|-------------|-------------|-----------|
| Temp. Inicial | | 150 °C | 1 minuto |
| Rampa 1 | 30°C hasta | 300 °C | 9 minutos |

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Departamento de Toxicología, Escuela de Química Farmacéutica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala

Condiciones del cromatógrafo de gases

Volumen de inyección = 2 µL de estándar de clenbuterol con salbutamol

Tiempo total corrida cromatográfica: 15.00 minutos

Flujo del sistema: 1.56250 pts/s

Tipo de inyección Splitless

Condiciones del espectrómetro de masas

Solvent delay: 0.00 minutos – 3.00 minutos

Inyección: Modo SCAN

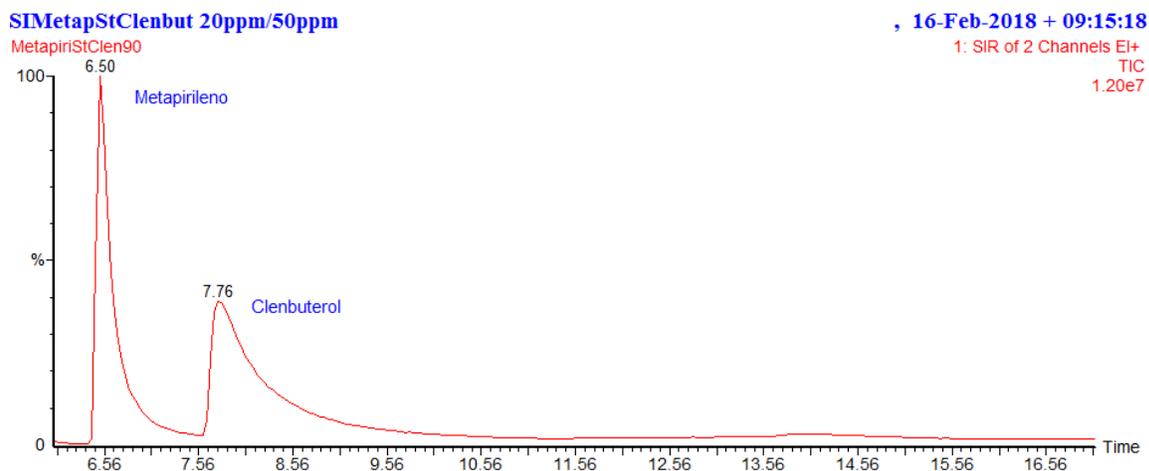
Tiempo de barrido: 3.00 – 15.00 minutos

Masas escaneadas 30-260

7.1.3. Metapirileno:

Imagen No.3

Inyección estándar de clenbuterol y metapirileno como estándar interno



Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Departamento de Toxicología, Escuela de Química Farmacéutica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala

Tabla No. 3

Condiciones cromatográficas para análisis de clenbuterol y metapirileno

Rampa de temperatura del horno

| Temperatura | Temperatura | Tiempo |
|-------------|-------------|-----------|
| | 180 °C | 0 minutos |
| 7 °C hasta | 200 °C | 0 minutos |
| 3 °C hasta | 225 °C | 0 minutos |
| 40 °C hasta | 300 °C | 4 minutos |

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Departamento de Toxicología, Escuela de Química Farmacéutica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala

Condiciones del cromatógrafo de gases

Volumen de Inyección = 1 µL de estándar de clenbuterol con metapirileno

Tiempo total corrida cromatográfica: 17.07 minutos

Flujo del sistema: 1.56250 pts/s

Tipo de inyección Splitless

Condiciones del espectrómetro de masas

Solvent delay: 0.00 minutos – 6.00 minutos

Inyección: Modo SCAN y SIM

Tiempo de barrido: 6.00 – 17.07 minutos

Masas escaneadas 35-300

7.1.4 Condiciones del método cromatográfico ensayado:

Tabla No.4

Condiciones cromatográficas para análisis de clenbuterol y metapirileno

Rampa de temperatura del horno

| Temperatura | Temperatura | Tiempo |
|-------------|-------------|-----------|
| | 180 °C | 0 minutos |
| 7 °C hasta | 200 °C | 0 minutos |
| 3 °C hasta | 225 °C | 0 minutos |
| 40 °C hasta | 300 °C | 4 minutos |

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Departamento de Toxicología, Escuela de Química Farmacéutica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala

Condiciones del cromatógrafo de gases

Volumen de Inyección = 1 µL de estándar de clenbuterol con metapirileno

Tiempo total corrida cromatográfica: 17.07 minutos

Flujo del sistema: 1.56250 pts/s

Tipo de inyección Splitless

Condiciones del espectrómetro de masas

Solvent delay: 0.00 minutos – 6.00 minutos

Inyección: Modo SCAN y SIM

Tiempo de barrido: 6.00 – 17.07 minutos

Masas escaneadas 35-300

- Tiempo de retención de clenbuterol = 7.76 minutos
- Tiempo de retención de metapirileno = 6.50 minutos.

Tabla No. 5

Diluciones realizadas para preparación de estándares de clenbuterol con metapirileno a 20 ppm

| Estándar de clenbuterol ppm | Clenbuterol 1000 ppm en (uL) | Metapirileno 100 ppm en (uL) | Metanol grado HPLC (uL) |
|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------|
| 12.5 | 2.5 | 40 | 157.5 |
| 25 | 5 | 40 | 155 |
| 50 | 10 | 40 | 150 |
| 100 | 20 | 40 | 140 |

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Departamento de Toxicología, Escuela de Química Farmacéutica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala

Tabla No. 6

Áreas y tiempos de retención del clenbuterol y metapirileno

| Concentración Estándar de Clenbuterol | Tiempo de Retención | Área | Concentración Estándar de Metapirileno | Tiempo de Retención | Área |
|---------------------------------------|---------------------|-------|--|---------------------|-------|
| 12.5 ppm | 7.76 minutos | 28335 | 25 ppm | 6.50 minutos | 16996 |
| 25 ppm | 7.76 minutos | 30286 | 25 ppm | 6.50 minutos | 18961 |
| 50 ppm | 7.76 minutos | 34835 | 25 ppm | 6.50 minutos | 49021 |
| 100 ppm | 7.76 minutos | 60236 | 25ppm | 6.50 minutos | 25238 |

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Departamento de Toxicología, Escuela de Química Farmacéutica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala

Tabla No. 7

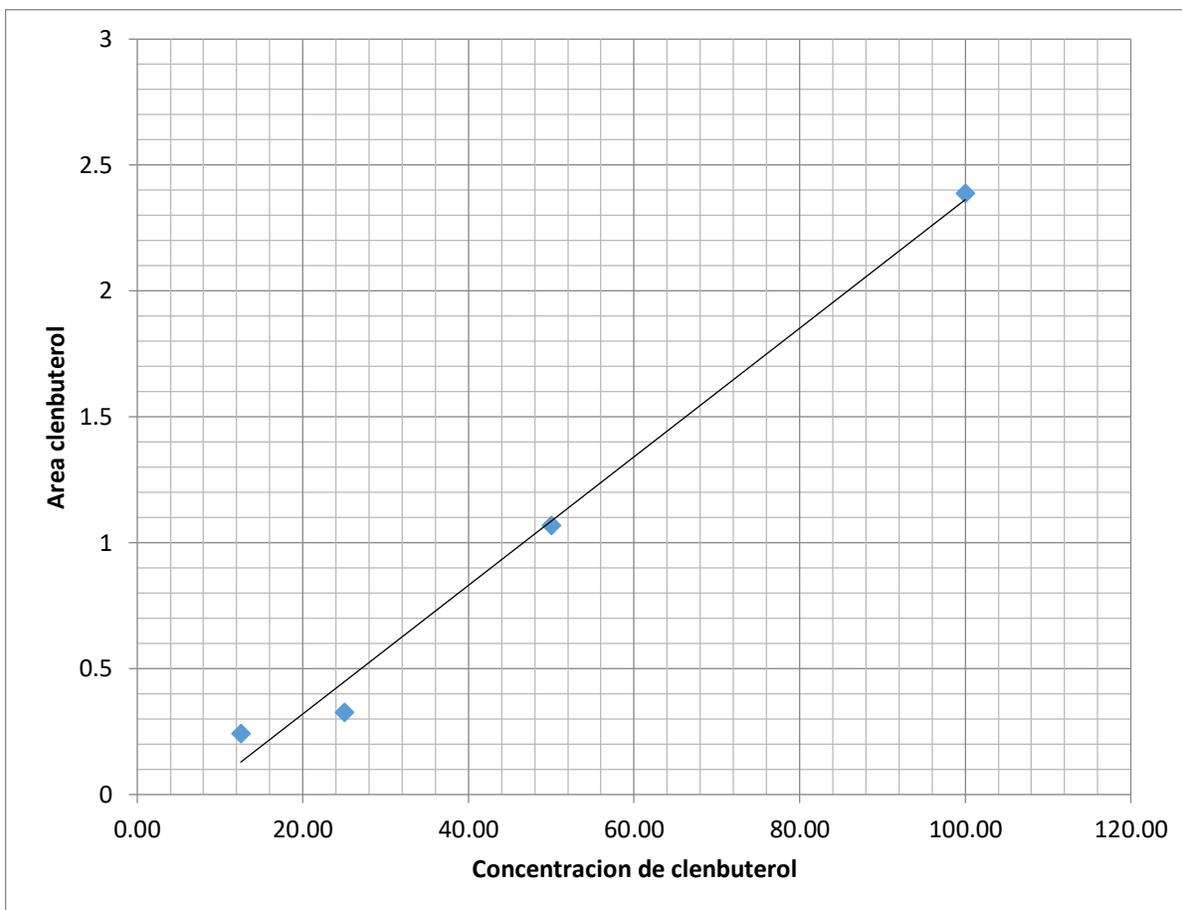
Relación de áreas de clenbuterol y metapirileno

| Concentración de clenbuterol (ppm) | Relación de áreas |
|------------------------------------|-------------------|
| 12.50 | 0.2422 |
| 25.00 | 0.3264 |
| 50.00 | 1.07 |
| 100.00 | 2.3867 |

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Departamento de Toxicología, Escuela de Química Farmacéutica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala

Gráfica No.1

Curva de calibración de clenbuterol y metapirileno



Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Departamento de Toxicología, Escuela de Química Farmacéutica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala

Eje de intersección: -0.190247826

Pendiente: 0.025526887

Coefficiente de correlación r: 0.995172756

7.2. Verificación de parámetros de desempeño del método propuesto

7.2.1 Linealidad

Tabla No. 8

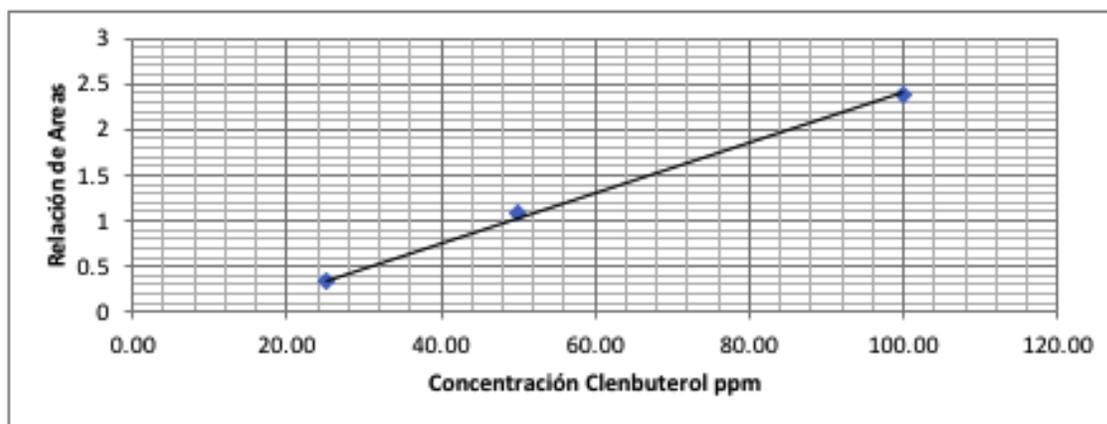
Estándares de clenbuterol y metapirileno sin proceso de derivatización

| CONCENTRACION DE ESTANDAR DE CLENBUTEROL (ppm) | RELACION DE AREAS (CLENBUTEROL vs METAPIRILENO) |
|--|---|
| 25.00 | 0.3264 |
| 50.00 | 1.07 |
| 100.00 | 2.3867 |

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Departamento de Toxicología, Escuela de Química Farmacéutica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala

Gráfica No.2

Curva de calibración de clenbuterol y metapirileno sin proceso de derivatización



Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Departamento de Toxicología, Escuela de Química Farmacéutica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala

Tabla No. 9

Ecuación de la recta

| | |
|--|--------------|
| Eje intersección | -0.190247826 |
| Pendiente | 0.025526887 |
| Coefficiente r | 0.995172756 |
| Coefficiente de Determinación r ² | 0.990368814 |

Tabla No. 10

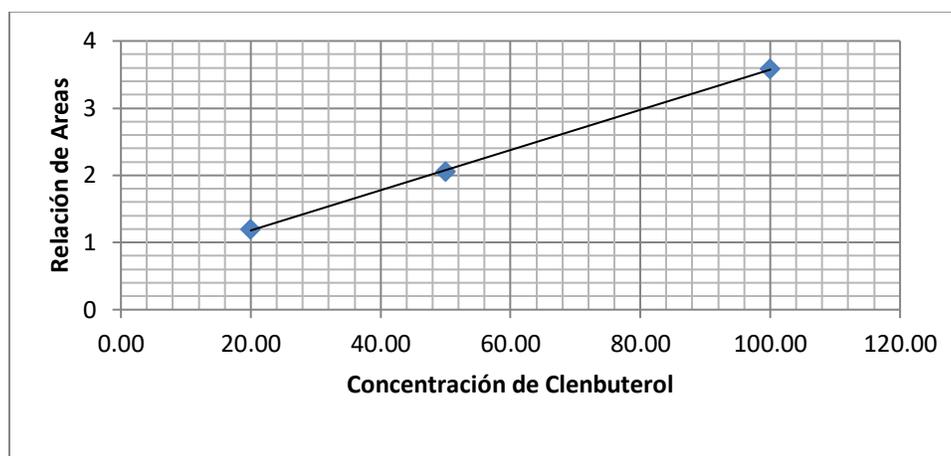
Estándares de clenbuterol y metapirileno con derivatización con MTBSTFA

| CONCENTRACION DE ESTANDAR DE CLENBUTEROL (ppm) | RELACION DE AREAS (CLENBUTEROL vs METAPIRILENO) |
|--|--|
| 20.00 | 1.193199037 |
| 50.00 | 2.055052408 |
| 100.00 | 3.581464746 |

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Departamento de Toxicología, Escuela de Química Farmacéutica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala

Gráfica No.3

Curva de calibración de clenbuterol y metapirileno con derivatización con MTBSTFA



Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Departamento de Toxicología, Escuela de Química Farmacéutica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala

Tabla No. 11

Ecuación de la recta

| | |
|---------------------------|-------------|
| Eje intersección | 0.580981224 |
| Pendiente | 0.029922191 |
| Coficiente r | 0.999872884 |
| Coficiente r ² | 0.999745784 |

7.2.2 Repetibilidad

Tabla No. 12

Análisis de repetibilidad de estándar de clenbuterol

| No. | Concentración | Detección | Tiempo de retención |
|------------------------------|---------------|--------------|---------------------|
| 1 | 5 ppm | | 8.35 minutos |
| | | | 8.35 minutos |
| | | | 8.35 minutos |
| | | | 8.42 minutos |
| | | | 8.38 minutos |
| Promedio tiempo de retención | | 8.37 minutos | |
| 2 | 10 ppm | | 8.27 minutos |
| | | | 8.31 minutos |
| | | | 8.27 minutos |
| | | | 8.27 minutos |
| | | | 8.27 minutos |
| Promedio tiempo retención | | 8.28 minutos | |
| 3 | 20 ppm | | 8.11 minutos |
| | | | 8.11 minutos |
| | | | 8.15 minutos |
| | | | 8.15 minutos |
| | | | 8.15 minutos |
| Promedio tiempo de retención | | 8.13 minutos | |
| 4 | 40 ppm | | 7.95 minutos |
| | | | 7.91 minutos |
| | | | 7.91 minutos |
| | | | 7.91 minutos |
| | | | 7.95 minutos |
| Promedio tiempo de retención | | 7.92 minutos | |
| 5 | 50 ppm | | 7.80 minutos |
| | | | 7.80 minutos |
| | | | 7.76 minutos |
| | | | 7.80 minutos |
| | | | 7.80 minutos |
| Promedio tiempo de retención | | 7.79 minutos | |

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Departamento de Toxicología, Escuela de Química Farmacéutica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala

Tabla No.13

Variables calculadas

| VARIABLE | VALOR |
|------------------------------|--------------|
| Coeficiente de variación | 1.8% |
| Promedio tiempo de retención | 8.10 minutos |

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Departamento de Toxicología, Escuela de Química Farmacéutica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala

7.2.3. Precisión

Tabla No.14

Inyección de curva de calibración del 29 de enero 2018

| CONCENTRACION DE ESTANDAR DE CLENBUTEROL (ppm) | RELACION DE AREAS (CLENBUTEROL vs METAPIRILENO) |
|--|--|
| 25.00 | 0.3264 |
| 50.00 | 1.07 |
| 100.00 | 2.3867 |

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Departamento de Toxicología, Escuela de Química Farmacéutica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala

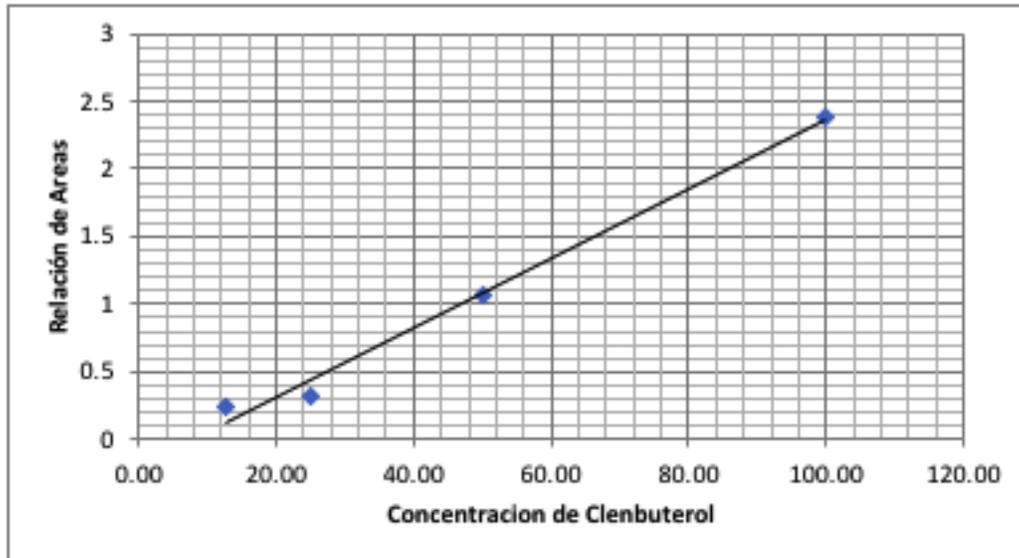
Tabla No. 15

Ecuación de la recta

| | |
|----------------------------|--------------|
| Eje intersección | -0.190247826 |
| Pendiente | 0.025526887 |
| Coeficiente r | 0.995172756 |
| Coeficiente r ² | 0.99036333 |

Gráfica No.4

Curva de calibración de clenbuterol y metapirileno



Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Departamento de Toxicología, Escuela de Química Farmacéutica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala

Tabla No.16

Inyección de curva de calibración del 19 de febrero 2018

| St clenbuterol ppm | Rel. Área clenb./metapirileno |
|--------------------|-------------------------------|
| 20 | 1.193199037 |
| 50 | 2.055052408 |
| 100 | 3.581464746 |

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Departamento de Toxicología, Escuela de Química Farmacéutica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala

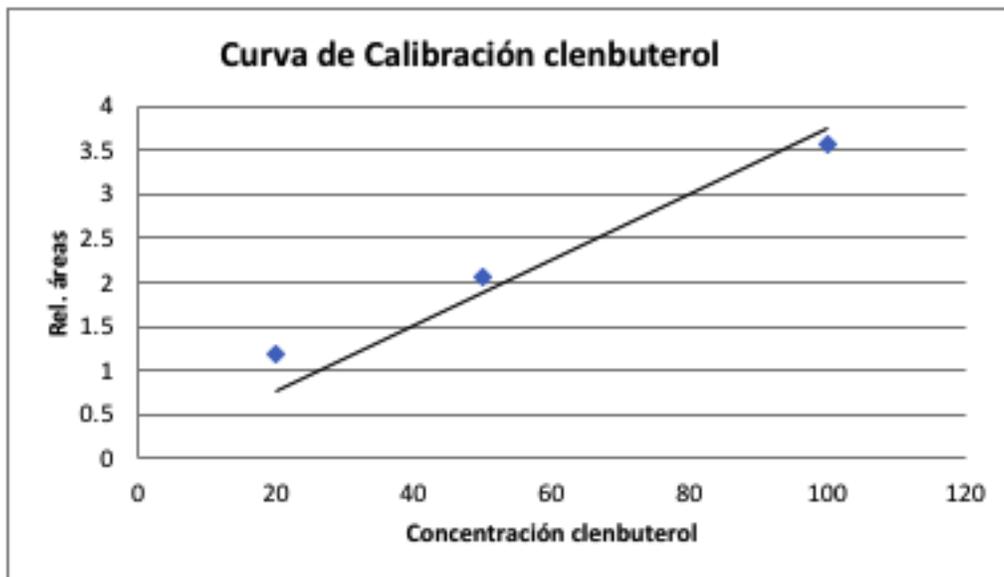
Tabla No. 17

Ecuación de la recta

| | |
|-----------------------------|-------------|
| Eje intersección | 0.580981224 |
| Pendiente | 0.029922191 |
| Coefficiente r | 0.999872884 |
| Coefficiente r ² | 0.999740020 |

Gráfica No.5

Curva de calibración de clenbuterol y metapirileno

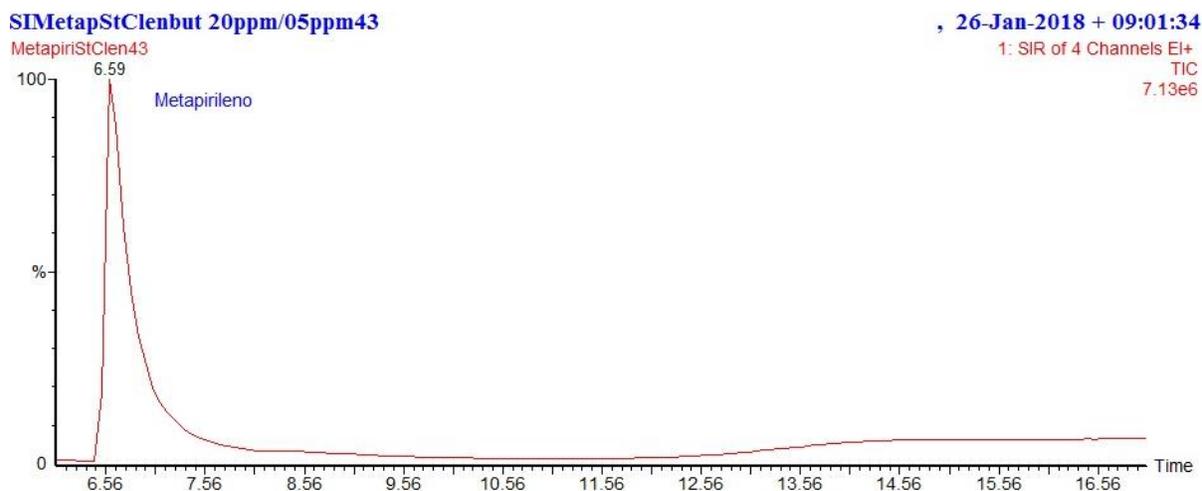


Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Departamento de Toxicología, Escuela de Química Farmacéutica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala

7.2.3. Límite de detección

Imagen No. 5

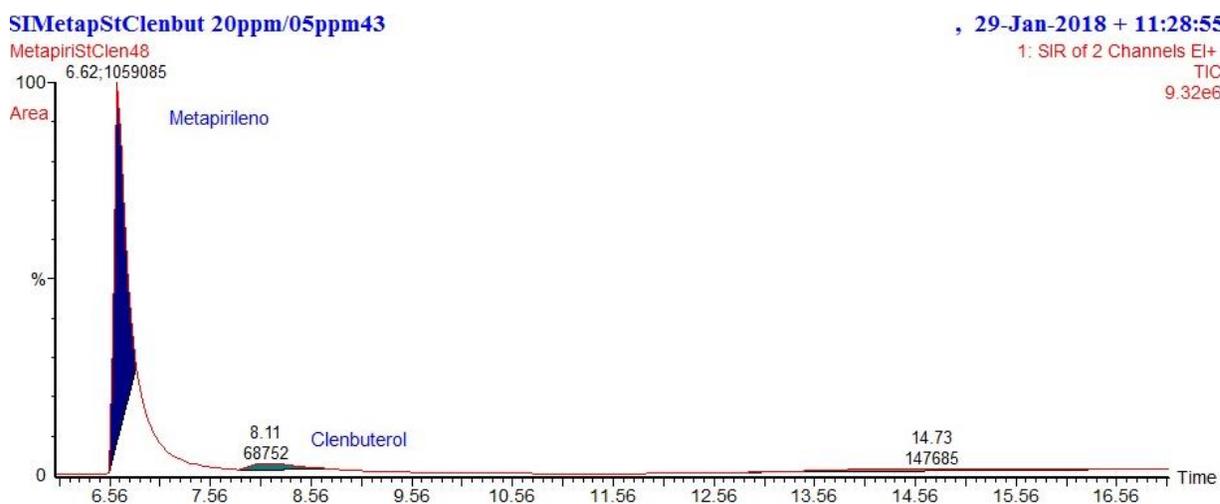
Estándar de clenbuterol 5 ppm con metapirileno a 20 ppm



Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Departamento de Toxicología, Escuela de Química Farmacéutica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala

Imagen No. 6

Estándar de clenbuterol 5 ppm con metapirileno a 20 ppm

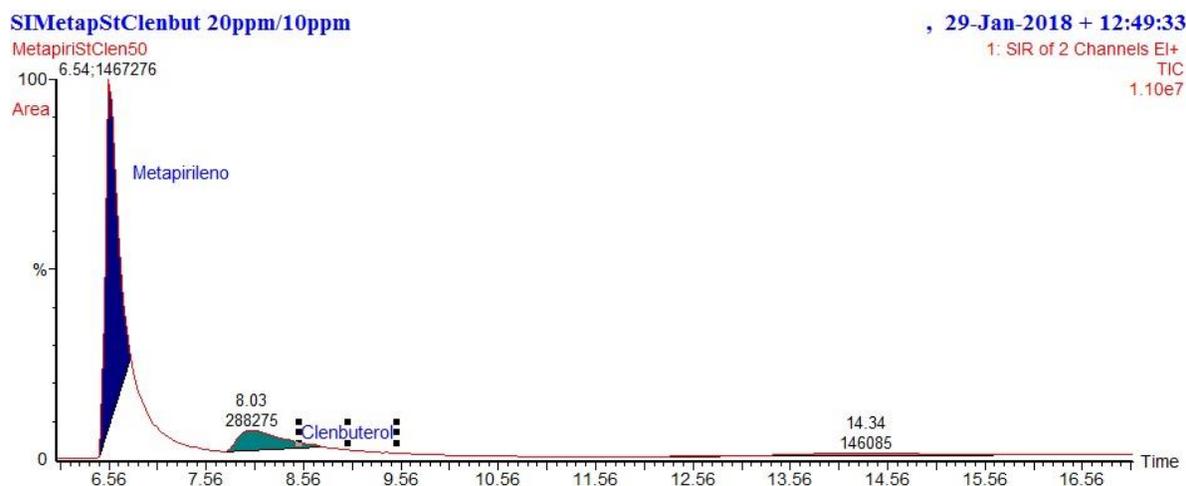


Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Departamento de Toxicología, Escuela de Química Farmacéutica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala

7.2.4. Límite de cuantificación

Imagen No. 7

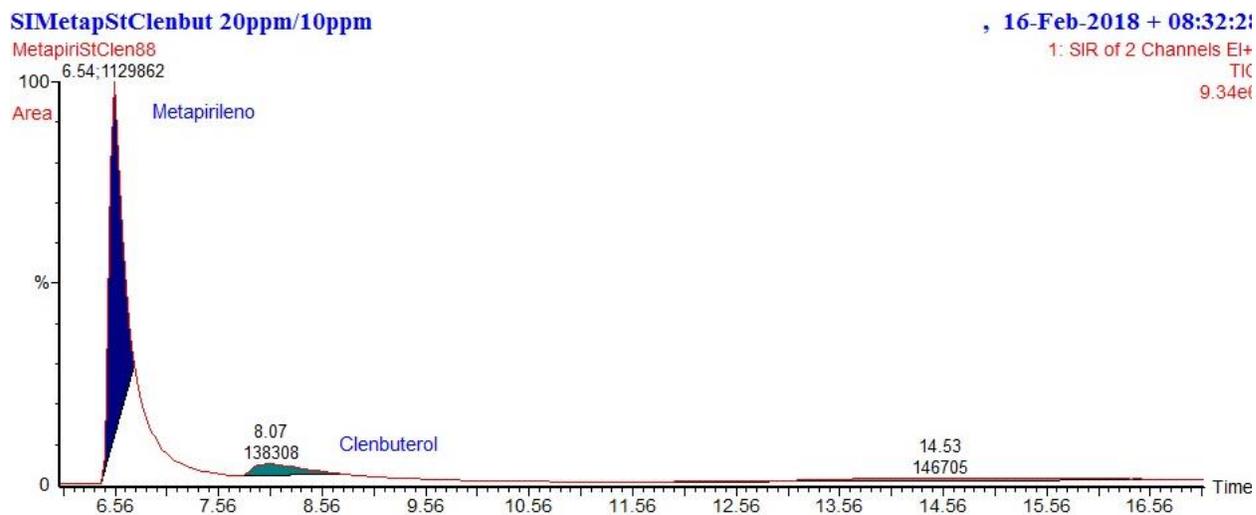
Estándar de clenbuterol 10 ppm con metapirileno a 20 ppm



Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Departamento de Toxicología, Escuela de Química Farmacéutica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala

Imagen No. 8

Estándar de clenbuterol 10 ppm con metapirileno a 20 ppm



Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Departamento de Toxicología, Escuela de Química Farmacéutica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala

7.2.5. Exactitud

Tabla No. 18

Cálculo del porcentaje de recuperación de orina marcada con estándar de clenbuterol

| Concentración teórica de estándar de clenbuterol | Concentración extraída de estándar de clenbuterol | Concentración obtenida en la extracción | % de recuperación |
|--|---|---|-------------------|
| 5 ppm | -7.43 | 0.93 | -167.19 |
| 20 ppm | 20.46 | 7.09 | 67 |
| 50 ppm | 49.26 | 33.63 | 31 |
| 100 ppm | 100.28 | 64.19 | 36 |

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Departamento de Toxicología, Escuela de Química Farmacéutica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala

7.3. Prueba de detección utilizando otros métodos instrumentales disponibles en el Departamento de Toxicología de la Universidad de San Carlos

7.3.1. Cromatógrafo de gases acoplado a detector FID-NPD marca Agilent 7890B

Tabla No. 19

Rampa de temperatura del horno

| Temperatura | Temperatura | Tiempo |
|---------------|-------------|--------------|
| | 180 °C | 0 minutos |
| 10.69°C hasta | 200 °C | 0 minutos |
| 4.58°C hasta | 225 °C | 0 minutos |
| 61.08°C hasta | 300 °C | 2.62 minutos |

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Departamento de Toxicología, Escuela de Química Farmacéutica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala

Columna HP 5 de 15 m

Detector FID

Volumen de inyección = 2 µL

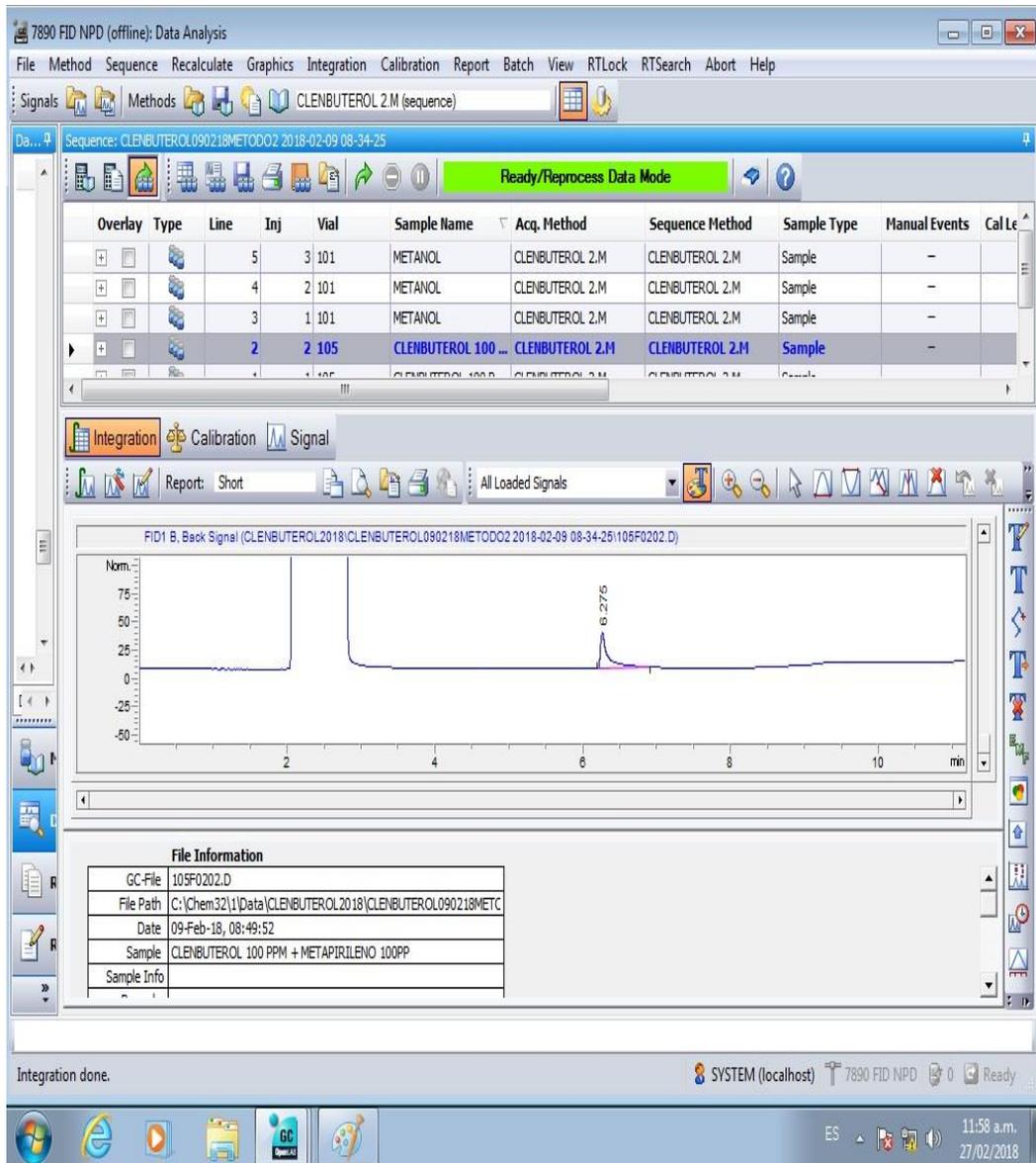
Flujo de columna = 5 ml/min

Presión del sistema = 76.68psi

- Tiempo de retención de clenbuterol: 6.275 minutos

Imagen No. 9

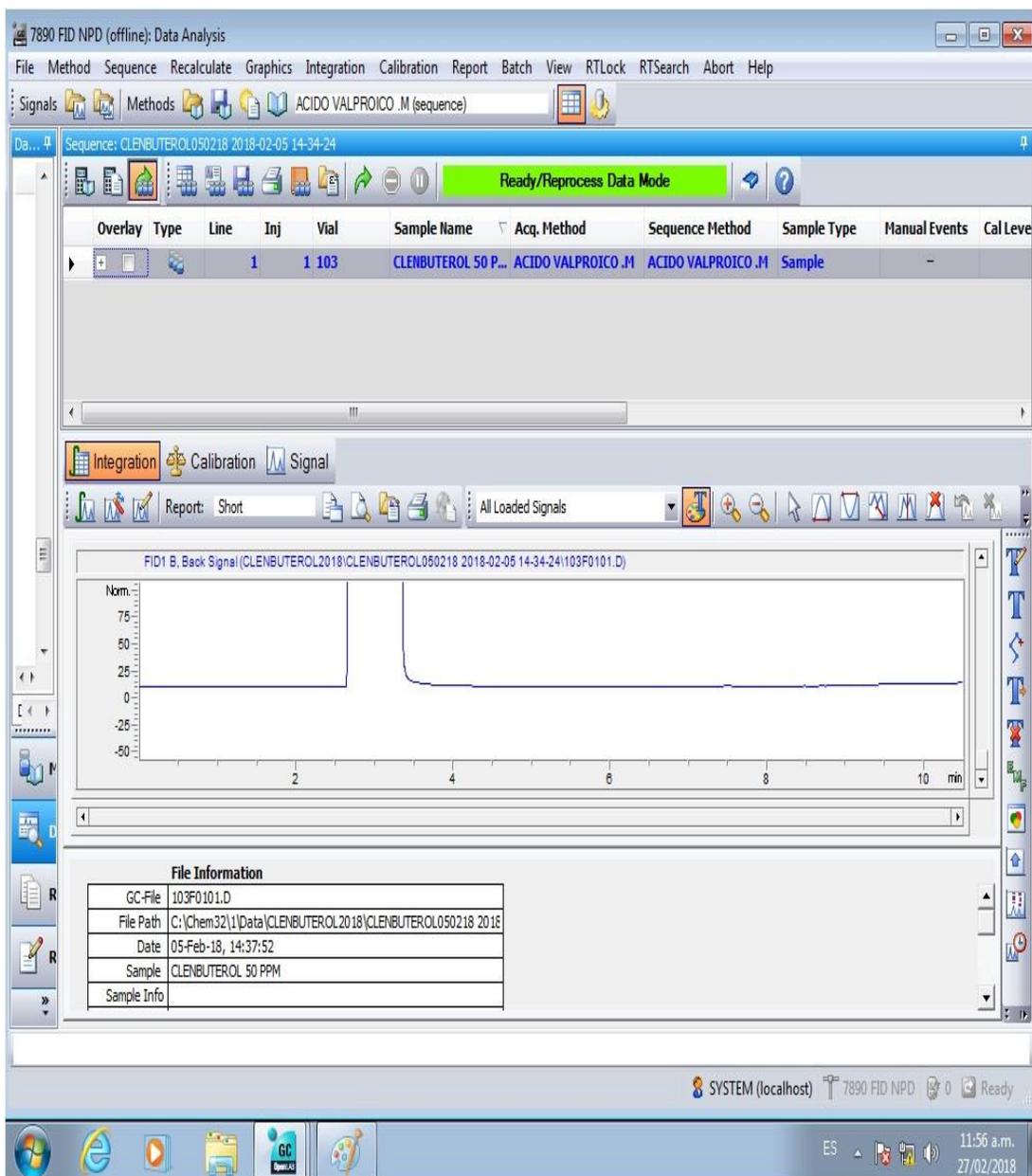
Estándar de clenbuterol a 100 ppm.



Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Departamento de Toxicología, Escuela de Química Farmacéutica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala

Imagen No. 10

Estándar de clenbuterol a 50 ppm.



Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Departamento de Toxicología, Escuela de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala

7.3.2. Cromatógrafo líquido de alta resolución HPLC con detector de arreglo de diodos marca Hitachi La-Chrome Elite

Columna utilizada: RP-18

Fase móvil: Metanol -Agua 35:65

Flujo: 4 ml/minuto

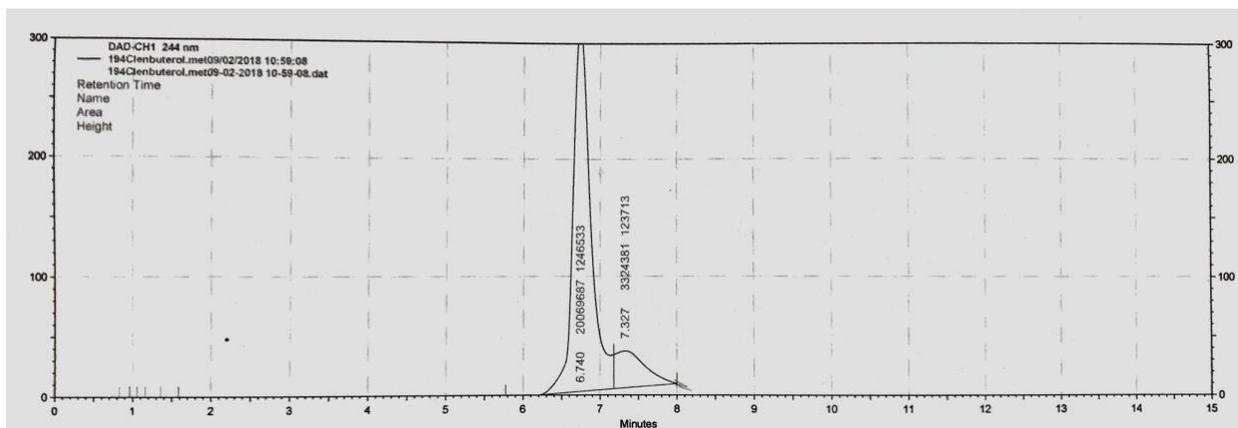
Temperatura: 25°C

Longitud de onda del detector: 244 nm

Volumen de Inyección: 20 uL

Imagen No. 11

Estándar de clenbuterol 10 ppm/metapirileno 20ppm en HPLC



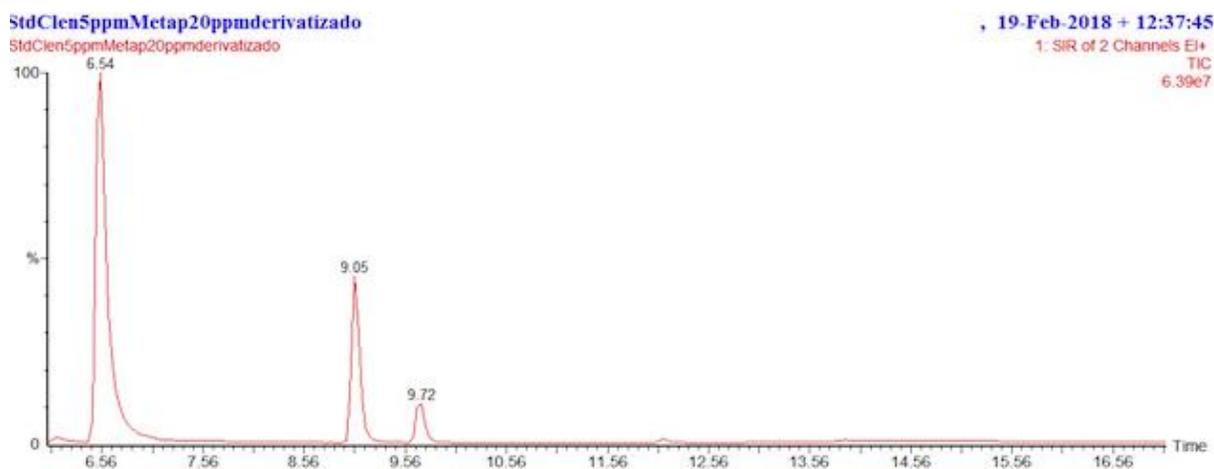
Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Departamento de Toxicología, Escuela de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala

7.4. Fortificación de orina con estándar de clenbuterol y metapirileno inyectado en el cromatógrafo de gases marca Perkin Elmer Clarus SQ 8s – Clarus s80

7.4.1 Cromatogramas de estándares de clenbuterol con metapirileno derivatizados

Imagen No. 12

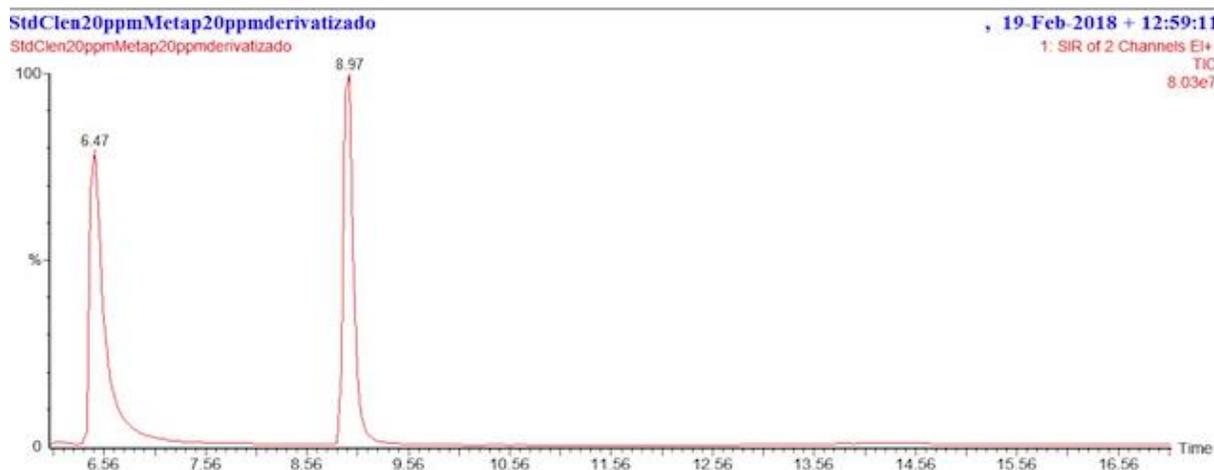
Estándar de clenbuterol 5ppm y 20ppm de metapirileno



Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Departamento de Toxicología, Escuela de Química Farmacéutica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala

Imagen No. 13

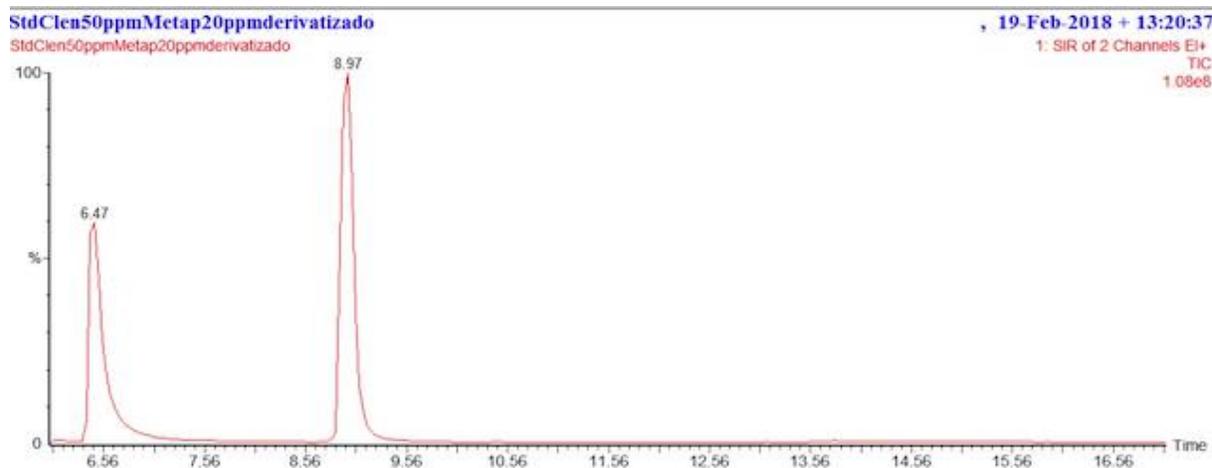
Estándar de clenbuterol 20 ppm y 20 ppm de metapirileno



Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Departamento de Toxicología, Escuela de Química Farmacéutica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala

Imagen No. 14

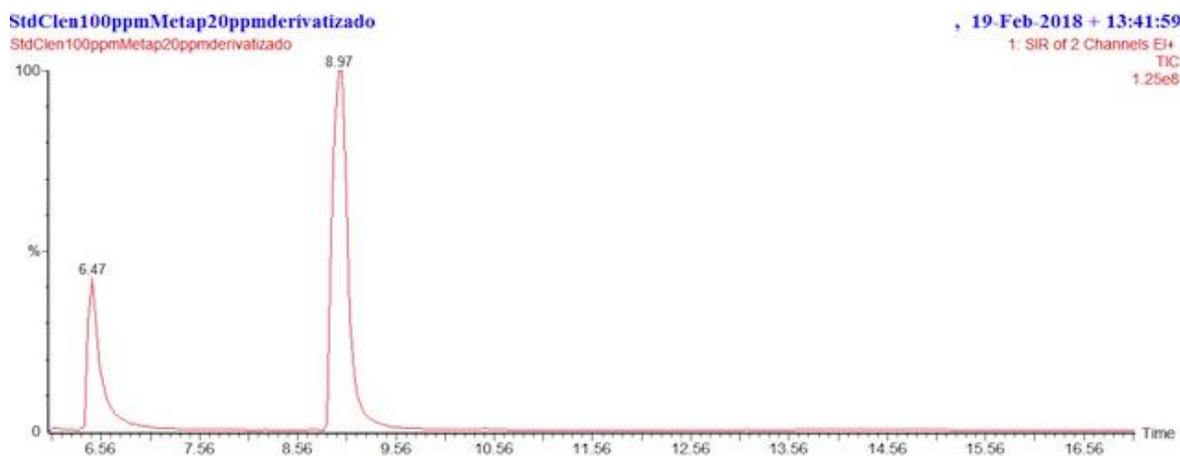
Estándar de clenbuterol 50 ppm y 20 ppm de metapirileno



Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Departamento de Toxicología, Escuela de Química Farmacéutica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala

Imagen No. 15

Estándar de clenbuterol 100 ppm y 20 ppm de metapirileno

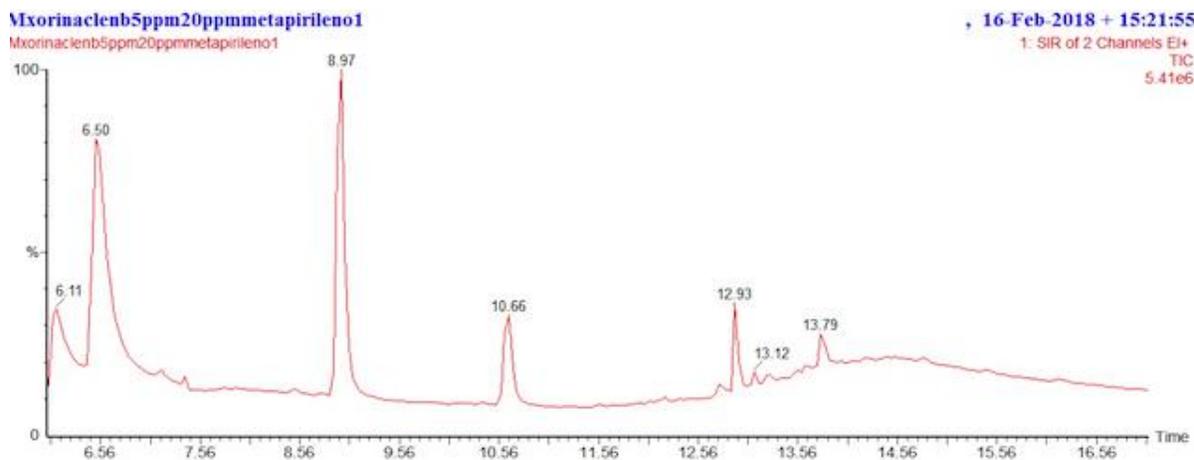


Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Departamento de Toxicología, Escuela de Química Farmacéutica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala

7.4.2. Espectros de orina fortificada

Imagen No. 16

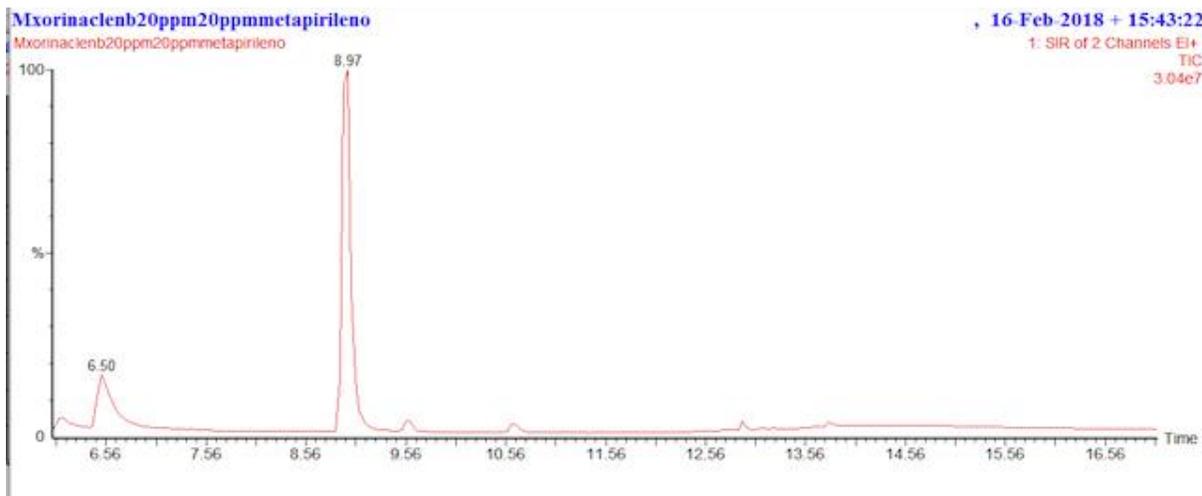
Estándar de clenbuterol 5ppm y 20ppm de metapirileno



Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Departamento de Toxicología, Escuela de Química Farmacéutica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala

Imagen No. 17

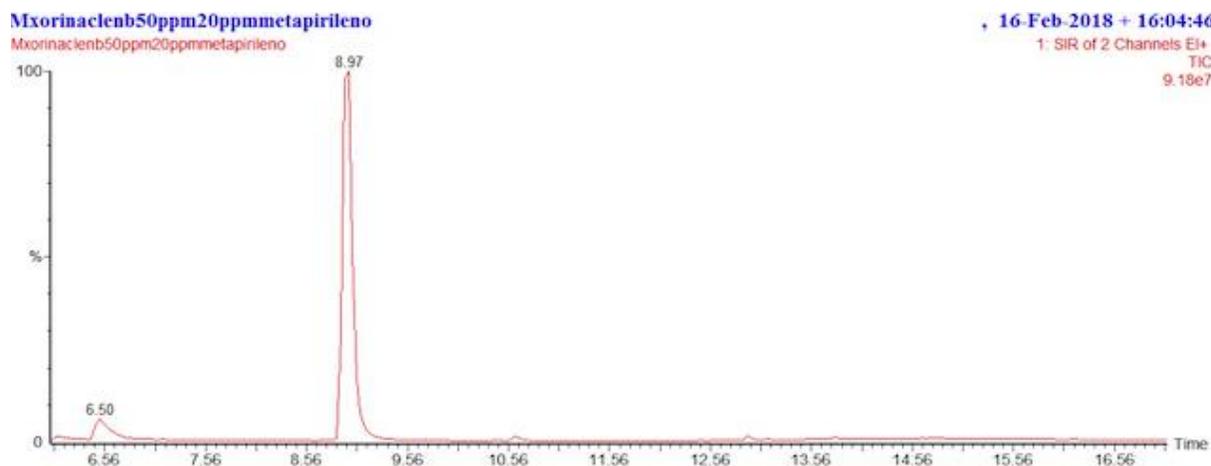
Estándar de clenbuterol 20 ppm y 20 ppm de metapirileno



Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Departamento de Toxicología, Escuela de Química Farmacéutica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala

Imagen No. 18

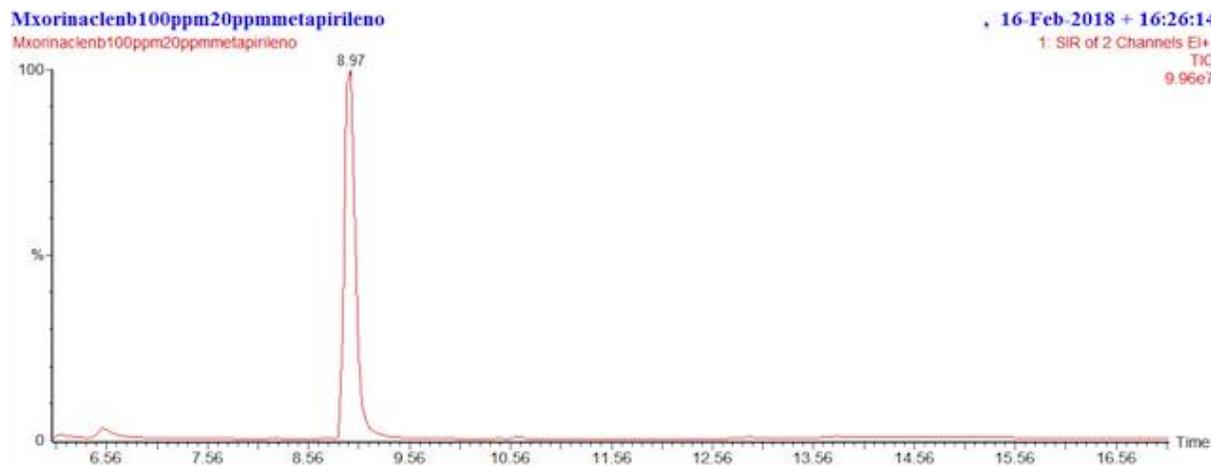
Estándar de clenbuterol 50 ppm y 20 ppm de metapirileno



Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Departamento de Toxicología, Escuela de Química Farmacéutica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala

Imagen No. 19

Estándar de clenbuterol 100 ppm y 20 ppm de metapirileno



Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Departamento de Toxicología, Escuela de Química Farmacéutica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala

8. Discusión

El presente trabajo de tesis se constituyó en cuatro etapas las cuales se desarrollan a lo largo del presente apartado y que incluyen: montaje del método cromatográfico, verificación de parámetros de desempeño del método propuesto, pruebas de detección utilizando otros métodos instrumentales disponibles en el Departamento de Toxicología de la Universidad de San Carlos de Guatemala así como la fortificación de orina con estándares a diferentes concentraciones de clenbuterol y metapirileno inyectados en el cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas marca Perkin Elmer Clarus SQ 8S-Claurs S80

8.1. Montaje del método cromatográfico

Para la determinación de clenbuterol en el cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas se sometieron a prueba 19 diferentes métodos cromatográficos con variación de diversas condiciones como rampas de temperatura, flujo total del sistema y flujo de columna.

8.1.1. Búsqueda de estándar interno

Se inyectaron muestras de estándar de clenbuterol con diferentes estándares internos para determinar el más idóneo para realizar el montaje del método cromatográfico en modo SCAN.

Entre las sustancias utilizadas como estándares internos testados fueron:

8.1.1.1. Clenbuterol deuterado

Se realizó la prueba con el compuesto deuterado (clenbuterol-D9) en referencia al método utilizado por Sheng Yang et al, en el cual se presentan diferentes técnicas de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas para la detección de clenbuterol a niveles traza en análisis de dopaje.

Tanto el estándar primario de clenbuterol como el clenbuterol deuterado eluyen en el mismo tiempo de retención como se pueden observar en la imagen No. 1 en los resultados. En la tabla No.1 se describen las condiciones cromatográficas para el análisis de clenbuterol con el clenbuterol deuterado.

- Tiempo de retención de clenbuterol = 7.20 minutos
- Tiempo de retención de clenbuterol deuterado = 7.20 minutos

Por lo que no se consiguió realizar la separación adecuada de los compuestos ya que la diferencia entre ambos es de nueve hidrógenos únicamente comprobándose en la lectura con la biblioteca del equipo con los pesos moleculares de ambos, lo que indica la necesidad de más sensibilidad para la determinación de un compuesto deuterado.

8.1.1.2. Salbutamol

Se realizó la prueba con salbutamol como estándar interno en referencia al método utilizado por Black R. et al, en el estudio se detalla un método sensible y cuantitativo para la determinación de salbutamol, clenbuterol y otros beta agonistas en plasma y orina utilizando extracción por fase sólida los resultados obtenidos en el presente estudio fueron adaptados en el Laboratorio Nacional de Ciencias Forenses en Australia.

El salbutamol utilizado para el presente análisis es grado materia prima con una pureza de 99.53%; sin embargo, a pesar de conseguir separación adecuada de tiempos de retención, no se consiguió una adecuada resolución del pico y se obtuvo además un cromatograma con varios picos que disminuían la resolución y la integración del salbutamol como tal como se pueden observar en la imagen No. 2 en los resultados. En la tabla No.2 se describen las condiciones cromatográficas para el análisis de clenbuterol con el salbutamol.

- Tiempo de retención del salbutamol = 4.99 minutos
- Tiempo de retención del clenbuterol = 6.00 minutos.

Se procedió entonces a realizar la purificación de salbutamol incrementando su pH con NaOH 1N y luego purificando con cloroformo para eliminar el exceso de excipientes que pudiera tener el polvo. Sin embargo, en posteriores inyecciones no se logró la eliminación de dichas impurezas las cuales incidirían en la cuantificación del estándar.

8.1.1.3. Metapirileno:

Se realizó la prueba con metapirileno como estándar interno en referencia al método utilizado por el laboratorio de toxicología forense de la ciudad de Nueva York en Estados Unidos, en el estudio se detalla un método la determinación clenbuterol por medio de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.

El metapirileno es un estándar interno ampliamente utilizado en la analítica por sus propiedades físicas. Se realiza la prueba de varias condiciones cromatográficas y finalmente se consiguen picos claros y bien definidos del metapirileno. Los tiempos de retención del clenbuterol con respecto al metapirileno son lo suficientemente distintos para concluir que el metapirileno es el estándar interno ideal para la implementación de este método, como se pueden observar en la imagen No. 3 en los resultados. En la tabla No.2 se describen las condiciones cromatográficas para el análisis de clenbuterol con el metapirileno.

- Tiempo de retención de clenbuterol = 7.76 minutos
- Tiempo de retención de metapirileno =6.50 minutos.

Por lo que se utilizó la presente sustancia como estándar interno.

8.1.2 Condiciones del método cromatográfico ensayado:

Una vez finalizada la identificación del estándar interno más adecuado, se utilizaron las condiciones para el método, las cuales se describen en la tabla No. 4; basados en artículos científicos de los siguientes autores Ye De, et al , Uzunov, Yang, et. al, Sniegocki T, Abukhalaf, I. K.

Procedimiento:

Se realizaron diluciones del estándar de clenbuterol a partir de un stock de clenbuterol a una concentración de 1000 ppm, se realizó una mezcla con cantidades proporcionales de solución stock de metapirileno a 100 ppm ya que la concentración requerida es de 20 ppm y se llevó a volumen con metanol grado HPLC, tal como se

presentan en la tabla No.5. Se analizaron las áreas y tiempos de retención y el metapirileno descritas en la tabla No. 6 y se evaluaron la relación de áreas descritas en la tabla No, 7 y se concluyó que cumplían con los criterios cromatográficos para la implementación del método, así como una linealidad de 0.995, el cumple con los criterios de la ICH (grafica No.1).

Para el presente método se encuentran los siguientes parámetros;

- Límite de detección: 5 ppm de clenbuterol
- Límite de cuantificación: 10 ppm de clenbuterol
- Rango de Trabajo: 10 a 100 ppm de clenbuterol

8.2. Verificación de parámetros de desempeño del método propuesto

8.2.1. Linealidad

Metodología

Se realizó la inyección de estándares de clenbuterol en concentraciones conocidas de acuerdo a los límites de detección determinados en el método propuesto utilizando metapirileno como estándar interno, se realiza una curva de calibración sin derivatizar (tabla No.8) (grafica No. 2) (tabla No.9) y la otra derivatizando con MTBSTFA (N-Methyl-N-tert-butyltrimethylsilyltrifluoroacetamide) (tabla No.10) (grafica No. 3) (tabla No.11), la última con el propósito de detectar en orina fortificada a diferentes concentraciones el clenbuterol.

Criterios de aceptación:

- Coeficiente de correlación r mayor o igual a 0.990
- Coeficiente de determinación r^2 mayor o igual a 0.980
- El intervalo de confianza del intercepto (α) debe de incluir el cero

Interpretación

La curva de calibración para clenbuterol con metapirileno como estándar interno sin sobrellevar el proceso de derivatización se considera lineal.

La curva de calibración para clenbuterol con metapirileno como estándar interno utilizando MTBSTFA como agente derivatizante se considera lineal.

8.2.2 Repetibilidad

Metodología:

Se prepararon 5 muestras de estándar de clenbuterol adicionado con metapirileno como estándar interno en concentraciones de 5, 10, 20, 40 y 50 ppm, luego se procedió a inyectar cada estándar de clenbuterol preparado 5 veces, por el mismo analista, el mismo día.

Criterio de aceptación:

El método de clenbuterol debe ser identificado correctamente mediante el tiempo de retención previamente caracterizado. El coeficiente de variación no debe ser mayor de 2%.

Interpretación de resultados:

Como se observa en la tabla No.12, en la evaluación de repetibilidad del método de clenbuterol, el coeficiente de variación sobrepasa el 2.0% (tabla No. 13). Esto significa, que en condiciones homogéneas de análisis y en un periodo corto de tiempo, los resultados presentan variación significativa en el rango de 5-50 ppm, sin embargo, en un rango de 10-20 ppm y de 40-50 ppm no presentan variación significativa.

Esto significa que el método planteado no es repetible en el rango desde 5 ppm, más si, de 20 a 100 ppm.

8.2.3. Precisión

Metodología

Para determinar la precisión del método propuesto se realizan curvas de calibración inyectando estándares de clenbuterol utilizando metapirileno como estándar interno en 2 días diferentes 29 de enero de 2018 (tabla No.14,15) (grafica

No.4) y 19 de febrero de 2018 (tabla No.16,17) (grafica No.5) y se registran en los resultados.

Criterio de aceptación:

Los resultados de las curvas de calibración inyectadas en diferentes días deben poseer:

- Coeficiente de correlación r mayor o igual a 0.990
- Coeficiente de determinación r^2 mayor o igual a 0.980
- El intervalo de confianza del intercepto (α) debe de incluir el cero

Interpretación de resultados:

Según los datos obtenidos con los cálculos de ecuación de la recta en ambas curvas de calibración inyectadas en dos diferentes días, ambas curvas de calibración cumplen con los parámetros de coeficiente de correlación r y r^2 . Obteniendo para la curva del 29 de enero de 2018 un r de 0.995 y un r^2 de 0.990 y para la del 19 de febrero un r de 0.999 y un r^2 de 0.999. Por lo que el método se considera preciso en concentraciones de 20 a 100 ppm. de clenbuterol.

8.2.4. Límite de detección

Metodología:

El Límite de detección se estimó realizando inyecciones de estándares de clenbuterol y metapirileno preparados en concentraciones de 3, 5, 7 y 8 ppm de clenbuterol.

El Límite de detección de clenbuterol es de 5 ppm ya que es la concentración mínima detectada en el cromatógrafo de gases sin embargo no fue repetible su detección a lo largo de la elaboración del presente trabajo de tesis, como se puede observar en las imágenes No. 5 y No.6.

8.2.5. Límite de Cuantificación

Metodología

Se realiza la inyección de estándares en concentraciones de 7, 8 y 10 ppm de clenbuterol y se determina que a una concentración de 10 ppm se logra la exactitud y precisión requeridas para el método, como se puede observar en las imágenes No. 7 y No.8.

8.2.6. Rango

Basados en las tablas No. 12 a la No. 16 del presente aparatado en un rango de 20 a 100 ppm se pudo evaluar la mayor precisión, linealidad y repetibilidad del método propuesto.

8.2.7. Exactitud

Para evaluar la exactitud, se procedió a marcar muestras de orina en diferentes concentraciones de clenbuterol, con el objetivo de definir si, el método planteado puede usarse con esta matriz y también si el procedimiento de extracción es el adecuado.

Criterio de aceptación: Para muestras biológicas se acepta un rango de recuperación de 80-120%.

Interpretación de resultados:

Como puede observarse en la tabla No. 18 ninguna de las muestras de orina marcadas cumple con el porcentaje de recuperación establecido por la norma por lo que la metodología no es exacta con este proceso de extracción propuesto, sin embargo, si es posible identificarlo.

8.3. Prueba de detección utilizando otros métodos instrumentales disponibles en el Departamento de Toxicología de la Universidad de San Carlos

Con los antecedentes que se obtuvieron con el cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas se procede a ensayar en cromatógrafo de gases acoplado a detector FID y con el cromatógrafo líquido de alta resolución HPLC los cuales se describen a continuación.

8.3.1. Cromatógrafo de gases acoplado a detector FID-NPD marca Agilent 7890B

Se realizó la prueba con el compuesto deuterado (clenbuterol-D9) en referencia al método utilizado por Sheng Yang et al, en el cual se presentan diferentes técnicas de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas para la detección de clenbuterol a niveles traza en análisis de doping, para poder realizar pruebas de detección con el presente equipo se utilizó una herramienta del software para conversión de los parámetros del cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas al cromatógrafo de gases con detector FID-NPD todo esto debido a que el GC-masas utiliza como fase móvil helio y el GC-FID utiliza nitrógeno, por lo tanto, la presión total de sistema, el flujo de la muestra y del mismo gas, rampas de temperaturas deben modificarse.

Se realizó una prueba de 4 diferentes métodos cromatográficos en los cuales básicamente se cambiaron las rampas de temperatura, el flujo del sistema, la presión de nitrógeno.

Según las pruebas realizadas, se logra la identificación adecuada de clenbuterol, a una concentración de 100 ppm la cual es muy elevada, las condiciones del equipo se encuentran descritas e la tabla No.19. No se detecta señal alguna a 50 ppm.

Por lo que se determina que en el cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas es mejor que el cromatógrafo de gases con detector FID

para el análisis de clenbuterol en el cual el límite de detección es de 5 ppm, como se puede observar en las imágenes No. 9 y No.10.

8.3.2. Cromatógrafo líquido de alta resolución HPLC con detector de arreglo de diodos marca Hitachi La-Chrome Elite

Se realizó la investigación bibliográfica y se adecuaron las condiciones cromatográficas al equipo de acuerdo al método propuesto por . Se realiza la prueba con un estándar de clenbuterol de 10 ppm ya que la sensibilidad del equipo es alta y se obtuvo un pico cromatográfico de clenbuterol bien definido a esa concentración. Se realizó la prueba con diversas temperaturas, volúmenes de inyección, flujos de fase móvil y longitud de onda del detector.

Las condiciones en las cuales se detectó el estándar de clenbuterol a 10 ppm se pueden observar en el apartado 7.3.2, y en la imagen No.11. Como puede observarse la resolución del pico de Metapirileno no es la adecuada ya que no se logró la separación de ambos.

8.4. Fortificación de orina con estándar de clenbuterol y metapirileno inyectado en el cromatógrafo de gases marca Perkin Elmer Clarus SQ 8s – Clarus s80

La identificación y/o cuantificación de drogas presentes en fluidos biológicos requiere de la extracción de los analitos de interés de la matriz en donde se encuentran. Para ello es necesario un procedimiento de extracción que permita una recuperación de la muestra en función del pH que generan las diferentes drogas en solución acuosa, es decir drogas ácidas, básicas y neutras.

El presente procedimiento describe como se realiza la extracción de clenbuterol y metapirileno en muestras de orina en concentraciones de 5, 20, 50 y 100 ppm de clenbuterol utilizando la metodología de extracción en fase sólida

basado en el manual de la World Wide monitoring corporation para clean screen extraction column.

El procedimiento se realiza en varios pasos y requiere la utilización de un sistema de vacío, columnas clean screen ZSDAU020 y una serie de solventes y reactivos para realizar la extracción respectiva.

Inicialmente, la muestra se ajusta a un pH de 6.0 ± 0.5 y es adicionada en una columna, a este pH muchas drogas no se ionizan y se adsorben hidrofóbicamente en la columna y otros analitos se adsorben por atracción iónica.

El proceso de extracción se realiza con lavados con solventes tales como agua, metanol, ácido acético entre otros con el objetivo de eluir el clenbuterol y metapirileno que son los analitos de interés según unión hidrofóbica a la columna de fase sólida.

Se hace necesario una derivatización del clenbuterol en orina para poder ser detectado en el cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas. Para lo cual se utilizó el MTBSTFA y acetato de etilo.

Inyección en el cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas

- Se realizó la inyección de los estándares de clenbuterol derivatizados en las concentraciones previamente descritas y se pueden identificar los picos desde la imagen No. 12 hasta la imagen No. 19 con suma claridad; el modo de inyección fue SIM y SCAN y se logró una adecuada resolución del pico debido a el modo de inyección SIM ya que monitorea únicamente los iones específicos (pico base) de cada elemento en el tiempo de retención esperado.
- Se realizó el cálculo del porcentaje de recuperación del analito derivatizado, sin embargo no cumple con el criterio de aceptación propuesto por la ICH para muestras biológicas, lo anterior debido a que el proceso de derivatización puede sobrellevar a la pérdida del analito de interés debido a reacciones químicas específicas para silación del compuesto.

9. Conclusiones

- 9.1. La metodología implementada en el presente trabajo es aplicable para la detección y cuantificación de clenbuterol por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas en el Departamento de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala en un rango de 20 ppm a 100 ppm.
- 9.2. Se diseñó un método de análisis para identificar y cuantificar clenbuterol, el cual fue el más acorde a las condiciones de CG-MS Perkin Elmer Clarus SQ 8s – Clarus s80. Las condiciones adecuadas al método fueron modificadas con respecto a la bibliografía, para obtener un mejor resultado y mejores espectros cromatográficos.
- 9.3. Las condiciones adecuadas para el montaje del método y equipo seleccionado que se consideran idóneas para la identificación de clenbuterol consisten en programar el equipo a un rango de temperatura entre 180°C y 300 °C. El tipo de inyección que se debe de utilizar para mejor identificación es modo SIM. El tiempo total de corrida cromatografica fue de 17.07 minutos,
- 9.4. Se determinó y demostró que la metodología propuesta cumple con los parámetros de linealidad, repetibilidad, precisión y especificidad según lo establece la Farmacopea Estadounidense (USP) y Normas de Validación of Analytical Procedures ICH.
- 9.5. El método propuesto es repetible ya que el porcentaje de coeficiente de variación obtenido es menor o igual al 2.0%.
- 9.6. El método evaluado para identificar y cuantificar clenbuterol es preciso, ya que el coeficiente de variación es menor a 2.0%

- 9.7. El método propuesto es lineal. Por lo tanto, las respuestas obtenidas son directamente proporcionales a las diferentes concentraciones, siempre que se trabaje en el intervalo de concentración indicado.
- 9.8. El método seleccionado es confiable en la identificación del clenbuterol en la orina, por medio de extracción en fase sólida y con posterior proceso de derivatización con MTBSTFA dentro de los límites de identificación establecidos mas no son cuantificables, en la concentración de 20ppm a 100ppm.

10. Recomendaciones

- 10.1 Se recomienda realizar el montaje del método para la identificación y cuantificación de clenbuterol en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución HPLC, conforme lo sugerido en este estudio, como una posibilidad analítica alterna con su respectiva verificación de parámetros de desempeño.
- 10.2 Debido al rango de concentraciones de identificación y cuantificación de clenbuterol en el cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas se recomienda realizar marcaje en tejido bovino para así aplicar la técnica en el sector pecuario.
- 10.3 Es recomendable realizar pruebas de identificación y cuantificación de clenbuterol utilizando como fase móvil hidrógeno y determinar si se mejora la sensibilidad del método.
- 10.4 Es recomendable realizar pruebas de identificación y cuantificación de clenbuterol utilizando diferente columna cromatográfica y determinar si se mejora la sensibilidad del método, como una CARBOWAX de 60 mts de longitud y un diámetro de 0.25 mm.

11. Referencias

- Abukhalaf, I. K., Deutsch, D. A., Parks, B. A., Wineski, L., Paulsen, D., Aboul-Enein, H. Y., & Potter, D. E. (2000). *Comparative analytical quantitation of clenbuterol in biological matrices using GC-MS and EIA. Biomedical Chromatography*, 14(2), 99-105. doi:10.1002/(sici)1099-0801(200004)14:2<99::aid-bmc933>3.0.co;2-g.
- Anderson, R., Bramley, R., Clarke, D., & Lillsunde, P. (2010). *Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos*. Viena: Naciones Unidas.
- AOAC Internacional. (s.f.). *Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL*, 20th Edition (2016). Retrieved 18 de septiembre de 2017 from AOAC:
http://www.aoac.org/aoac_prod_imis/AOAC/Publications/Official_Methods_of_Analysis/AOAC_Member/Pubs/OMA/AOAC_Official_Methods_of_Analysis.aspx
- Black, S. B., & Hansson, R. C. (1999). *Determination of Salbutamol and Detection of Other -Agonists in Human Postmortem Whole Blood and Urine by GC-MS-SIM. Journal of Analytical Toxicology*, 23(2), 113-118. doi:10.1093/jat/23.2.113
- Del Barrio, A. S., M. A. García-Calonge, A. Fernández-Quintela, E. Simón, M. P. Portillo, L. Astiasaran, and J. A. Martínez. (1995). *Effects of the beta-adrenergic agonist salbutamol and its withdrawal on protein metabolism of lambs. Annals of Nutrition and Metabolism* 39: 317-324.
- Duffau, B., Rojas, F., Guerrero, I., Roa, L., Rodríguez, L., Soto, M., et al. (2010). *Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: "Aspectos generales sobre la validación de métodos"*. Instituto de Salud Pública de Chile, Chile.
- Gallego, L.P. (2017) Unidad de Espectrometría de Masas. Observado el 24 de mayo (2017). de la página. <http://www.scai.uma.es/servicios/aqcm/ems/ems.html>.
- González G., P., T. Fernández F., O. Cadahía M., C. Fente S., C. Franco A., and A. Cepeda S. (1996). *Rapid and simple determination of clenbuterol residues in retina by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. Journal of Chromatography Biomedical Applications* 677: 167-171.

- Hawkins, D. R., L. F. Elsom, M. H. Dighton, A. Kaur, and D. M. Cameron. (1993). *The pharmacokinetics, metabolism and residues of 14C-clenbuterol (14C-N-AB 365 CL) following intramuscular administration to calves*. No. HRC/BOI 140/921418 de la base de datos de la OMS. http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_876_spa.pdf. Consultado el 24 de abril de 2011.
- Heitzman, R. J. (1996). Clenbuterol. <http://www.fao.org/docrep/w4601e/w4601e06.htm>. Consultado el 22 de enero de 2010.
- Hernández P., G., R. García V., I. Mangas G., F. Martínez N., J. Martín, O. González. (2001). *Intoxicaciones por Clenbuterol en España*. Boletín Epidemiológico de España 9:1-8.
- ICH Topic Q2(R1). (2006). *Guidance on validation of analytical procedures text and methodology*. Retrieved 18 de septiembre de 2017 from European Medicines Agency: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002662.pdf
- Jones, R.W., R. A. Easter, F. K. McKeith, R. H. Dalrymple, H. M. Maddock, P. J. Behtel. (1985). *Effect of the β -adrenergic agonist cimaterol (CL 263,780) on the growth and carcass characteristics of the finishing swine*. Journal of Animal Science 61: 905-913.
- MAGA. (2007). ACUERDO MINISTERIAL No. 821-2007 Edificio Monja Blanca, Guatemala, 18 de diciembre del 2007.
- Mencías E.R., Mayero L.M., (2000). Manual de Toxicología Básica. Ediciones Díaz Santos S.A.. España p. 192-198.
- Mersmann, H. J. (2002). Beta-adrenergic receptor modulation of adipocyte metabolism and growth. Journal of Animal Science 80: 24-29.
- Moore, N. G., U. G. Pego, and M. N. Sillence. (1994). Anabolic effects of the β_2 -adrenoreceptor agonist salmeterol are dependent on route of administration. American Journal of Physiology 267: 475-484.
- Morgan, D. J. (1990). Clinical pharmacokinetics of β -agonists. Clinical Pharmacokinetics 18.
- Oficina de Acreditación Guatemalteca, C.A. 2007. Política de Selección y Validación de Métodos de Ensayo (OGA-GEC-016). Guatemala.

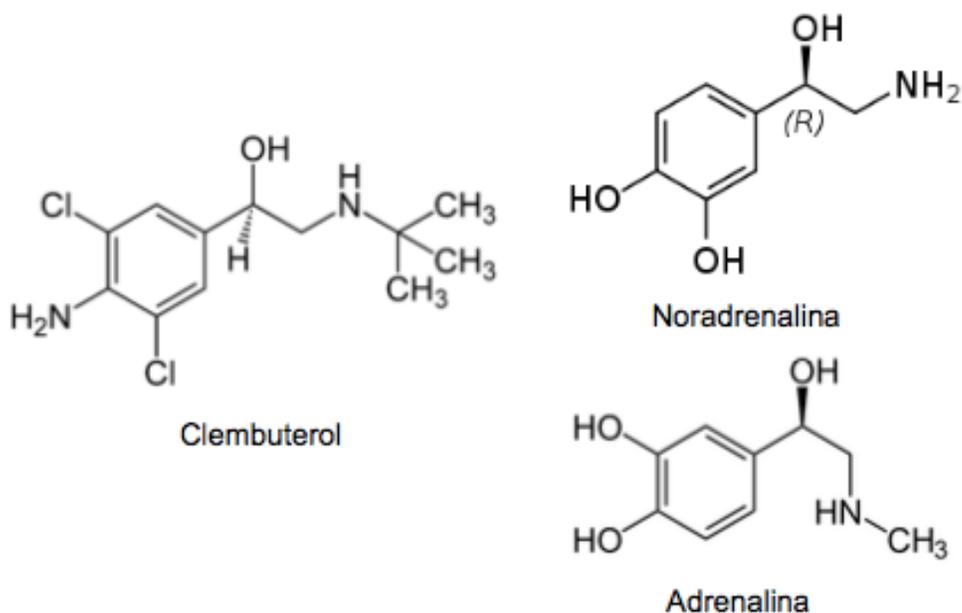
- Ortiz, J C., (2005). Determinación de clenbuterol por el método gases/ masas y su cuantificación en bovinos sacrificados en dos rastros.
- Ricks, C. A., R. H. Dalrymple, P. K. Baker, D. L. Ingle. (1984). Use of β -agonist to alter fat and muscle deposition in steers. *Journal of Animal Science* 59: 1247-1255.
- RTCA 65.05.51:08. (2010). Acuerdos Conexos sobre Medicamentos Veterinarios y Productos Afines. Listado de Medicamentos veterinarios y productos afines de conformidad con su nivel de riesgo. Guatemala.
- Salleras, L., A. Domingues, E. Mata, J. L. Taberner, I. Moro, and P. Salva. (1995). Epidemiologic study of an outbreak of clenbuterol poisoning in Catalonia, Spain. *Public Health Reports* 110(3): 338–342.
- Smith, D. J., and G. D. Paulson. (1997). Distribution, elimination and residues of [^{14}C] clenbuterol HCL in Holstein calves. *Journal of Animal Science* 75: 454-461.
- Smith, D. J. (1998). The pharmacokinetics, metabolism and tissue residues of beta-adrenergic agonists in livestock. *Journal of Animal Science* 76: 70- 79.
- Sniegocki, T. Zmudzki, J. Posyniak, A. Semeniuk, S. (2002). Gas Chromatography-Mass spectrometric confirmation method for the determination of Clenbuterol residues in animal urine and liver samples. Department of Pharmacology and Toxicology, National Veterinary Institute, Polonia.
- Soria J., L. B., y J. A. Arias M. (1997). Señalización celular por segundos mensajeros. *In: Curso Internacional Precongreso: Actualización en Fisiología. XI Congreso Nacional de Temas Fisiológicos. Ed. Sociedad Nacional de Temas Fisiológicos. México Distrito Federal del 6 al 8 de octubre. 305 p. (4):270-294.*
- Thomas, M., R. Poms, B. Pöpping, M. Saarela, D. Spichtinger. (2010). Some key emerging food safety issues. *Quality Assurance and Safety of Crops and Foods* 2:141–148.
- Uzunov, R., et al, (2013). Determination of clenbuterol in meat samples with ELISA and GC-MS method. 1st Annual International Interdisciplinary Conference.
- WADA. (2011). statement on Clenbuterol., from <https://www.wada-ama.org/en/media/news/2011-06/wada-statement-on-clenbuterol>.

- Yang, S., Liu, X., Xing, Y., Zhang, D., Wang, S., Wang, X., . . . Zhao, J. (2012). Detection of Clenbuterol at Trace Levels in Doping Analysis Using Different Gas Chromatographic-Mass Spectrometric Techniques. *Journal of Chromatographic Science*, 51(5), 436-445. doi:10.1093/chromsci/bms160.
- Ye, D., Wu, S., Xu, J., Jiang, R., Zhu, F., & Ouyang, G. (2015). Rapid Determination of Clenbuterol in Pork by Direct Immersion Solid-Phase Microextraction Coupled with Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *Journal of Chromatographic Science*. doi:10.1093/chromsci/bmv126.

12. Anexo 1

Clenbuterol

El clenbuterol o hidrocloreuro de clenbuterol es un β -agonista del grupo de los adrenérgicos, cuyo nombre químico es 4-amino-3,5 dicloro- α -terbutil- aminometil-bencil alcohol, presenta una estructura química parecida a las catecolaminas como la adrenalina y noradrenalina (Figura 1). El clenbuterol tiene un punto de fusión variable de 170-176 °C, soluble en metanol y etanol, moderadamente soluble en cloroformo e insoluble en benceno, siendo estas características dependientes de la casa comercial de donde provenga; su apariencia consta de ser un polvo microcristalino incoloro o ligeramente amarillo (Heitzman, 1996).



Heitzman, 1996

Figura 1. Estructura química del clenbuterol, adrenalina y noradrenalina.

Farmacocinética del clenbuterol Absorción

Los sitios de absorción y el efecto del clenbuterol están en relación a la ubicación de los β -adrenoreceptores (Cuadro 1). El clenbuterol trabaja de manera similar a la de los transmisores adrenérgicos adrenalina-noradrenalina con propiedades selectivas a los receptores β_2 estimulantes y con un mínimo efecto a los β_1 y α , actuando sobre los terminales posganglionares del sistema nervioso simpático (Soria y Arias, 1997; Mersmann, 2002).

Algunos estudios localizan residuos de clenbuterol en corazón, pulmones, vaso, hígado, riñones, cerebro tejido adiposo, estómago e intestinos de bovinos tratados con esta sustancia (Smith y Paulson, 1997; Smith, 1998). El tiempo de absorción del clenbuterol depende de la vía de administración, por vía oral, la absorción alcanza los niveles máximos plasmáticos entre la 2 y 3 hora, sin embargo, por vía subcutánea o intramuscular, es aún más rápida, alcanzándose las máximas concentraciones dentro de los 15-30 minutos después de la aplicación (Morgan, 1990; Moore et al., 1994).

Cuadro 1. Proporción del tipo de β -receptores en algunos órganos y posible efecto a la administración del clenbuterol.

| Órgano | Tipo de Receptores | Efecto |
|-------------------------|---------------------|--|
| Corazón | $\beta_2 > \beta_1$ | Aumento de la fuerza de contracción, de la frecuencia cardíaca |
| Vasos Sanguíneos | $\beta_2 > \beta_1$ | Relajación |
| Tracto Gastrointestinal | $\beta_2 > \beta_1$ | Relajación |
| Musculo Liso | $\beta_2 > \beta_1$ | Relajación |
| Esfínter | $\beta_2 > \beta_1$ | Relajación |
| Músculos bronquiales | $\beta_2 > \beta_1$ | Relajación |
| Útero | $\beta_2 > \beta_1$ | Relajación |
| Riñón | $\beta_2 > \beta_1$ | Liberación de renina |
| Lipocitos | $\beta_2 > \beta_1$ | Lipólisis |
| Músculo esquelético | $\beta_2 > \beta_1$ | Glucogenólisis |
| Páncreas | $\beta_2 > \beta_1$ | Liberación de insulina |
| Hígado | $\beta_2 > \beta_1$ | Glucogenólisis |

Moore et al., 1994

En los animales de laboratorio y humanos que fueron tratados con clenbuterol, mostraron un pico máximo de concentración de clenbuterol 2-4 h después de la administración, con una vida media plasmática que varió entre 16 y 105 h (Heitzman, 1996; FAO/OMS, 1998), sin embargo, algunas investigaciones coinciden que la absorción en rumiantes es más lenta ya que el pico máximo de concentración se presentó 2 a 12 horas después de la administración (Heitzman, 1996).

Distribución

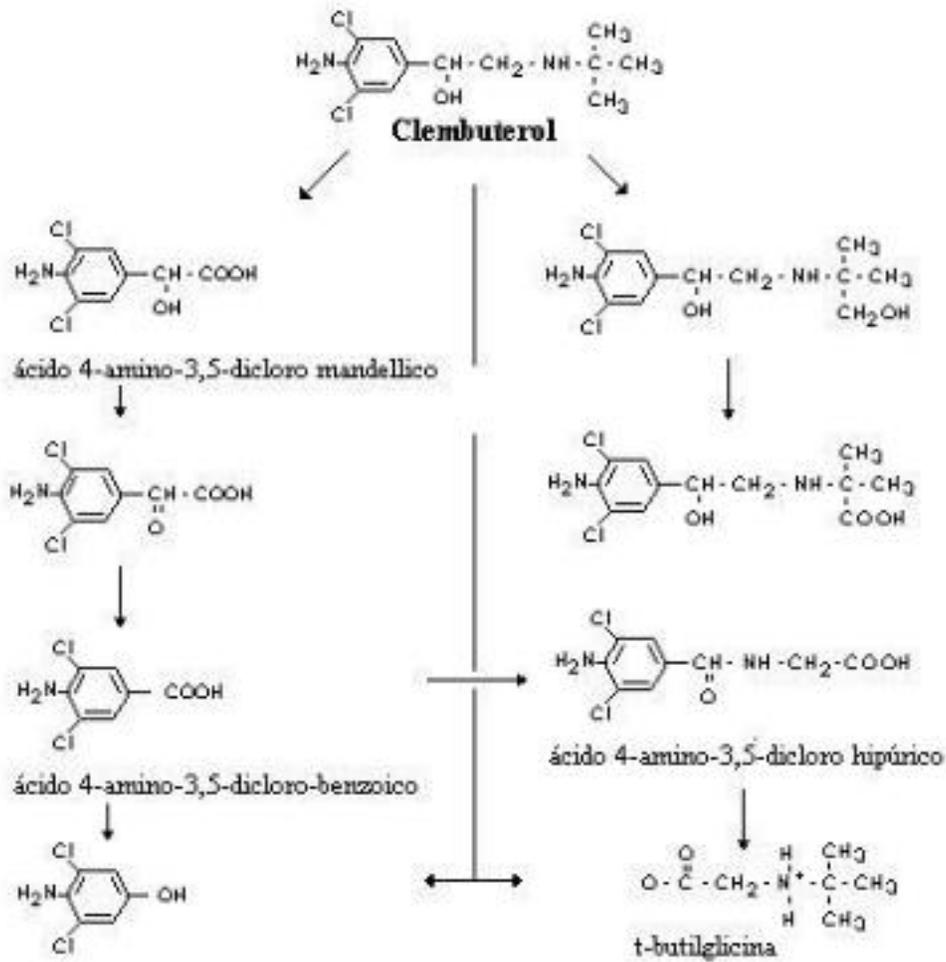
El clenbuterol se distribuye en casi todos los tejidos debido a la ubicación de los β -adrenoreceptores. En la mayoría de las investigaciones sobre residuos de clenbuterol en tejidos de ganado bovino, coinciden que los niveles máximos de residuos se encuentran en ojo, hígado, riñones, y pulmones mientras que en el músculo y la grasa presentan los niveles más bajos (Cuadro 2) (Smith y Paulson, 1997; Smith, 1998).

Residuos en órganos.

| Órgano | Clenbuterol $\mu\text{g kg}^{-1}$ | Proporción de los residuos de clenbuterol (%) |
|----------|-----------------------------------|---|
| Pulmones | 6.8 | 81 |
| Hígado | 2.2 | 44 |
| Riñones | 3.7 | 63 |
| Corazón | 0.9 | 64 |

Smith, 1998

En diversos β -agonistas adrenérgicos se desconoce la relación cuantitativa entre el compuesto inicial y el de sus metabolitos. Tampoco ha quedado claro si los conjugados de clenbuterol son totalmente excretados, ya que posiblemente los que permanezcan sean susceptibles a la circulación enterohepática y estos sean convertidos a clenbuterol nuevamente en el tracto intestinal de los humanos (Figura 2) (Smith, 1998). La biotransformación del clenbuterol difiere entre especies, por lo que se han identificado diferentes metabolitos, sin embargo, el principal componente identificado en estas especies ha sido el clenbuterol no metabolizado, seguido de los óxidos y conjugados con otras estructuras (Heitzman, 1996). En el ganado bovino y caballo, algunos autores han identificado al clenbuterol no metabolizado como el principal residuo encontrado en orina e hígado, también se han identificado pequeñas cantidades de ácido 4-amino-3,5-diclorobenzoico y ácido 4-amino-3,5-diclorohipúrico en músculo no se encontraron otros residuos a excepción del clenbuterol no metabolizado (Hawkins et al., 1993),



Hawkins et al., 1993

Figura 2. Biotransformación del clenbuterol en mamíferos.

Actualmente, se desconoce si los metabolitos del clenbuterol poseen un riesgo toxicológico para los humanos, sin embargo, sugieren que el clenbuterol n-hidroxiarilamina y n-nitroso, encontrados en la orina de ratas, son inestables y podrían transformarse de nuevo en clenbuterol bajo ciertas condiciones. No obstante, menciona que los conjugados de ácidos glucorónicos pueden ser susceptibles a la hidrólisis (ya sea enzimática o ácida) y que la reabsorción del componente inicial podría ocurrir subsecuente a la hidrólisis en el intestino, en consecuencia si los conjugados de clenbuterol presentes en tejidos comestibles están sujetos a la circulación enterohepática, entonces los análisis que miden el

clenbuterol, pero no toman en consideración los metabolitos podrían tener una estimación equivocada del potencial toxicológico del compuesto en el tejido contaminado.

Excreción

El clenbuterol se excreta rápidamente y en gran proporción por la orina en forma de clenbuterol no metabolizado, y el resto se elimina en su mayor parte con las heces.

Efecto y funciones del clenbuterol

Efecto metabólico

Los efectos metabólicos están relacionados con la concentración tisular de Adenosín Monofosfato cíclico (AMPc), a nivel muscular y hepático, la conversión de Adenosín Trifosfato (ATP) en AMPc se produce de manera acelerada al igual que la activación de distintas enzimas, fundamentalmente de tipo fosforilasa, que catalizan la transformación de glucógeno en glucosa, aunque también están implicadas otras, como proteincinasas, lipasas y fosfofructocinasas, de esta manera, se produce una aceleración de la movilización de los ácidos grasos, formándose ácido láctico en sangre, hígado y musculatura esquelética, también presenta una tendencia especial hacia el incremento de la lipólisis o descenso de la lipogénesis (Del Barrio et al., 1995). En los tejidos adiposo y muscular, es el responsable de que los nutrientes sean dirigidos fuera de los depósitos grasos hacia la formación de proteínas que contribuyen a la formación de musculatura al utilizarse las cadenas carbonatadas de los ácidos grasos libres, en la formación de aminoácidos. En el tejido adiposo aumenta el metabolismo de los lípidos en el adipocito, por tanto impiden y reducen, la síntesis y la esterificación de ácidos grasos dentro del triacilglicerol resultando en una reducción en el anabolismo de los lípidos en el adipocito, conduciendo a una hipertrofia reducida del adipocito, además, la activación de los receptores β -adrenérgicos, causa un aumento en el AMPc, que activa a la proteincinasa A, la cual a su vez fosforila a la hormona sensible a lipasa dando inicio a la lipólisis (Mersmann, 2002).

En el tejido muscular incrementa el adenosin monofosfato cíclico (AMPc); de manera que una proteína atraviesa la membrana celular siete veces, formando tres asas intracelulares y tres extracelulares a los que se unen la adrenalina y la noradrenalina, aumentan la perfusión sanguínea hacia el músculo dando como resultado una mayor disponibilidad de energía y aminoácidos, en consecuencia aumenta la síntesis y retención de proteína que favorece la hipertrofia muscular, principalmente de los músculos del cuarto posterior del animal (Mersmann, 2002).

En el músculo, además de la hipertrofia, ocurren cambios en el tipo de fibra muscular y en la proporción de ARN de transcripción para proteínas musculares como la miosina y actina. En ovinos y bovinos se ha observado que aumenta el peso de los músculos en 40%, y que la magnitud de la respuesta varía dependiendo de la influencia de factores como la especie, la raza, la edad, el sexo y la concentración del clenbuterol en la dieta (Mersmann, 2002).

Funciones terapéuticas

Una de las principales funciones del clenbuterol es servir como agente broncodilatador tanto en medicina humana como veterinaria, debido a que relaja la musculatura lisa de los bronquios y disminuye la resistencia de la vía aérea, lo que ha sido aprovechado para el tratamiento del asma en humanos y otras enfermedades respiratorias de tipo obstructivo.

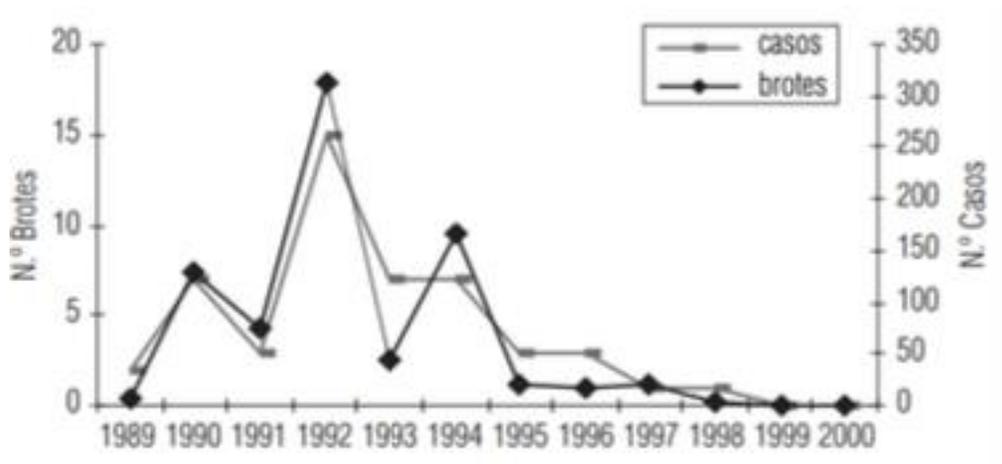
Otra función es ser estimulante cardíaco, por sus efectos cronotrópico e inotrópico positivos, lo que resulta de gran utilidad en tratamientos de urgencia de bradicardias producidas por bloqueo cardíaco o cuando es necesario aumentar la contractilidad miocárdica. En el tratamiento de varios procesos degenerativos, en estudios practicados sobre ratas a las que se les induce cierto tipo de tumores y se administra clenbuterol, demuestran que los efectos anabólicos del clenbuterol preservan la masa muscular y el contenido proteico, traduciéndose en una reducción del crecimiento del tumor (Mersmann, 2002).

Para el tratamiento de enfermedades que van asociadas a un catabolismo muy elevado, como es el caso de grandes quemaduras, diabetes o denervación muscular retrasa la atrofia producida en ciertas lesiones musculares, como distrofias o atrofas debidas a la no movilización de los miembros. El efecto ejercido por el clenbuterol sobre la síntesis proteica, en los casos de atrofia muscular, puede ser debido a posibles cambios en la capacidad del ARN en todo el músculo o sobre un nivel específico del ARNm, o al fenómeno combinado de la reducción de la constante de degradación (Mersmann, 2002).

También puede servir como coadyuvante en el empleo de los agentes antiobesidad, ya que además de incrementar el índice metabólico, también estimula la síntesis proteica, lo que puede ayudar a prevenir la pérdida de masa magra corporal, asociada a la reducción de peso. Los compuestos que tienen propiedades de lipomovilización, poseen un efecto antiobesidad usado comúnmente en roedores genéticamente obesos (Mersmann, 2002).

Intoxicación por clenbuterol

Con el uso del clenbuterol como promotor de crecimiento en la producción animal, han aparecido casos de intoxicación en el mundo, siendo España el primer país con casos registrados de intoxicaciones por el consumo de hígado con residuos de clenbuterol, no obstante, durante el período comprendido entre los años 1990 y 2000, se declararon 47 brotes y 3 episodios aislados, con un total de 809 casos (Figura 3) (Hernández et al., 2001).



Hernández et al., 2001

Figura 3. Brotes y casos de intoxicación por consumo de tejidos con residuos de clenbuterol en España durante el periodo de 1989-2000 (Hernández et al., 2001).

Las intoxicaciones ocurridas en el mundo por consumo de algún tejido de origen animal con residuos de clenbuterol se han presentado con gran variabilidad de concentración de residuos (Cuadro 7).

Cuadro 7. Intoxicaciones ocurridas en el mundo por consumo de tejidos con residuos de clenbuterol.

| Año | País | Casos | Origen | Concentración (μkg^{-1}) | Referencia |
|------|----------|-------|-----------------------------------|--|-----------------------------------|
| 1990 | España | 125 | Hígado de res | 160 a 290 | Martínez-Navarro, 1990 |
| 1990 | Francia | 113 | Hígado de ternera | 375 a 500 | Pulce <i>et al.</i> , 1990 |
| 1992 | España | 22 | Hígado de ternera | 19 a 5395 | Salleras <i>et al.</i> , 1995 |
| 1995 | Italia | 16 | Carne de res | 500 | Ramos <i>et al.</i> , 2003 |
| 1996 | España | 15 | Hígado de ternera | 500 | Bilbao-Garay <i>et al.</i> , 1997 |
| 1996 | Italia | 62 | Carne de res | 800 a 7400 | Sporano <i>et al.</i> , 1998 |
| 1997 | Italia | 15 | Carne de ternera | 1140 a 1480 | Brambilla <i>et al.</i> , 2000 |
| 1998 | Portugal | 10 | Carne de borrego | 9.7 a 343 | Ramos <i>et al.</i> , 2003 |
| 1998 | China | 1750 | Carne de cerdo | NR | Thomas, 2010 |
| 2000 | Portugal | 2 | Hígado de res | 1420 | Ramos <i>et al.</i> , 2003 |
| 2000 | China | 35 | Carne de cerdo Hígado de cerdo | 2 a 460 190 a 3060 | Shiu y Chong, 2001 |
| 2002 | México | 132 | Hígado de bovino | NR | García-López, 2002 |

NR. No registrada

Thomas, 2010

China es uno de los países donde los casos de intoxicaciones por consumo principalmente de carne de cerdo han sido recurrentes durante el periodo de 1998 a 2010 (Thomas, 2010).

Síntomas de la intoxicación por clenbuterol

El comité mixto de la FAO/OMS (1998) sin afán de proponer el uso del clenbuterol como promotor de crecimiento, basado en resultados de estudios in vivo de ratones de laboratorio, propuso el índice de la Ingesta Diaria Admisible (IDA) en 0.004 µg de clenbuterol kg de peso vivo día, teniendo en metabolitos.

El diagnóstico de una posible intoxicación por residuos de clenbuterol está basado en los signos y síntomas de activación simpática junto con la sospecha clínica de la ingesta de vísceras de bovino (hígado, principalmente), (Cuadro 8) El manejo integral de este padecimiento requiere de una total coordinación entre los responsables de la salud humana, que permitirá limitar los daños producidos por la ingesta inadvertida de esta sustancia.

Cuadro 8. Síntomas y su frecuencia de aparición por la intoxicación causada por consumo de tejidos con residuos de clenbuterol.

| Síntomas | Frecuencia de aparición (%) |
|-----------------------------------|-----------------------------|
| Taquicardia (120 latidos por min) | 82 |
| Temblores musculares | 75 |
| Nausea | 74 |
| Epigastralgias | 68 |
| Diarrea | 50 |
| Fiebre | 36 |
| Dolores de cabeza y mareos | 36 |
| Mialgias y astenia | 22 |
| Hipertensión (>150/80 mm Hg) | 18 |
| Vómito | 18 |
| Boca seca y cambios de voz | 10 |

Salleras et al., 1995

El periodo de la aparición de los síntomas puede variar dependiendo la cantidad de residuos que haya contenido el tejido, algunos autores registran que varía de 10 minutos hasta seis horas, mientras que la duración de los síntomas puede prolongarse entre 90 minutos hasta seis días. De acuerdo con Salleras et al. 1995 a edad y el sexo no fueron determinantes para la aparición y duración de los síntomas (Salleras et al., 1995).

La guía propuesta para casos de intoxicación por clenbuterol, recomienda realizar para el diagnóstico: una colección de orina y sangre de los pacientes, para después realizar un hemograma y análisis de glucemia e hipocalcemia, además de un electrocardiograma al paciente. También sugieren que es indispensable coleccionar el alimento sospechoso y preservar a -20 °C (para su posterior confirmación en un laboratorio especializado). El tratamiento recomendado por estos autores es la administración de β -bloqueadores y una intravenosa de cloruro de potasio (para corregir la hipocalcemia) debido a que puede causar arritmias graves, sobre todo en pacientes que toman antiarrítmicos como la digoxina o de otro tipo de cardiotónicos. Sin embargo, debido a que la intoxicación puede persistir, puede ser necesario ampliar el tratamiento. Debido a la toxicidad de los residuos de clenbuterol en los alimentos, también sugieren que los pacientes sean vigilados de cerca, especialmente si sufren de una cardiopatía isquémica, hipertensión arterial, si necesitan diuréticos, o si están siendo tratados con medicamentos del mismo grupo terapéutico (Salleras et al., 1995).

13. Anexo 2

METODOS CROMATOGRAFICOS PARA DETECCION DE CLENBUTEROL POR GC-MS

Artículo 1

Autor: Julio C. Ortiz Borgeds et al. /Tec Perú Mex 2005

Tabla No. 1

Parámetros propuestos por Autores

| Parámetro | |
|--------------------------|---|
| Columna | HP 5MS de 30um de longitud, 0.25 mm |
| Fase Móvil | Helio |
| Flujo de Fase Móvil | 1.8 ml |
| Presión | 13.72 libras por pulgada cuadrada |
| Velocidad | 48 cm/ seg |
| Temperatura del Inyector | 260 °C |
| Volumen de Inyección | 1.2 uL splitless |
| Temperatura del Horno | 150°C inicial por 1 minuto, incremento de 30 °C/min y una temp. Final de 300 °C por 2.5 minutos |
| Iones Monitoreados | 86,127, 98 |

Límite de Detección: 113.2 ng

Límite de Cuantificación: 2.76 ppm

Tiempo de Retención: 5 minutos

Artículo 2

Autor: Sheng Yang et al , National Antidoping Lab China 2012

Tabla No. 2

Parámetros propuestos por Autores

| | |
|---------------------------|---|
| Parámetro | |
| Columna | HP 1 MS , 0.2 mm diámetro |
| Fase Móvil | Helio |
| Flujo de Fase Móvil | 2.25 ml/min |
| Presión | 89 kPa |
| Velocidad | ' |
| Temperatura del Inyector | |
| Volumen de Inyección | 2uL splitless |
| Temperatura del Horno | 180°C inicial por 0 minutos, incremento de 3.3 °C/min hasta 230°C por 0 minutos luego programar horno a 30°C/minuto hasta llegar a 310°C mantener 2 minutos una temp. Final de 300 °C por 2.5 minutos |
| Iones Monitoreados | 86, 335,337,217 |
| EI (Impacto Electrónico) | 70 eV a 230°C |
| Rango de Scan | 50 a 650 amu 4 scans por minuto |

Límite de Detección en orina : 0.2 ng/ml

Tiempo de Retención: 4.41 minutos

Concluye el autor GC-MS como método de detección mas no de cuantificación

Artículo 3

Autor: Imad Abukhalaf , Atlanta USA 1999.

Tabla No. 3

Parámetros propuestos por Autores

| | |
|---------------------------|---|
| Parámetro | |
| Columna | HP 1 MS , 0.2 mm diámetro |
| Fase Móvil | Helio |
| Flujo de Fase Móvil | 1.1 ml/min |
| Presión | 25 psi |
| Velocidad | ' |
| Temperatura del Inyector | 280°C |
| Volumen de Inyección | 2uL splitless |
| Temperatura del Horno | 150°C inicial por 1 minuto, incremento de 15°C/min hasta 215°C por 0 minutos luego programar horno a 35C/minuto hasta llegar a 300°C mantener 2 minutos |
| Iones Monitoreados | 242,244,285 y 300 |
| EI (Impacto Electrónico) | 70 eV a 230°C |
| Rango de Scan | 50 a 650 amu 4 scans por minuto |

Límite de Detección: 0.5 ng/ml en plasma

Límite de Cuantificación en plasma: 1.5 ng/mL

Tiempo de Retención:9.76 minutos

Artículo 4

Autor: S.B. BLACK Y R.C. HANSSON Australia 1999

Tabla No. 4

Parámetros propuestos por Autores

| | |
|---------------------------|--|
| Parámetro | |
| Columna | DB 1 MS , 0.2 mm diámetro |
| Fase Móvil | Helio |
| Flujo de Fase Móvil | 1 ml/min |
| Presión | 89 kPa |
| Velocidad | ' |
| Temperatura del Inyector | 270°C |
| Volumen de Inyección | 2uL splitless |
| Temperatura del Horno | 120°C inicial por 1 minutos, incremento de 25 °C/min hasta 300°C por 2 minutos luego programar horno a 30°C/minuto hasta llegar a 310°C mantener 2 minutos una temp. Final de 300 °C por 2.5 minutos |
| Iones Monitoreados | 86, 262,243 |
| EI (Impacto Electrónico) | 70 eV a 230°C |
| Rango de Scan | |

Tiempo de Retención 4.50 minutos

Artículo 5

Autor: TOMASZ SNIEGOCKI , Poland 2002.

Tabla No. 5

Parámetros propuestos por Autores

| | |
|---------------------------|--|
| Parámetro | |
| Columna | DB 1 MS , 0.2 mm diámetro |
| Fase Móvil | Helio |
| Flujo de Fase Móvil | 1 ml/min |
| Presión | |
| Velocidad | ' |
| Temperatura del Inyector | 250°C |
| Volumen de Inyección | 2uL splitless |
| Temperatura del Horno | 70°C a 200 °C a una proporción de 18 °C/min luego 250°C a 5 °C/min y finaliza a 300 °C a razón de 20°C/min y se mantiene 8 minutos |
| Iones Monitoreados | 86, 262,245, 264 y 333 |
| EI (Impacto Electrónico) | |
| Rango de Scan | |

Tiempo de Retención 6.20minutos

Artículo 6

Autor: Zehra Hajrulaj, Universidad de Macedonia 2013

Tabla No. 6

Parámetros propuestos por Autores

| | |
|---------------------------|---|
| Parámetro | |
| Columna | DB 1 MS , 0.2 mm diámetro |
| Fase Móvil | Helio |
| Flujo de Fase Móvil | 1 .5 ml/min |
| Presión | |
| Velocidad | ' |
| Temperatura del Inyector | 250°C |
| Volumen de Inyección | 2uL splitless |
| Temperatura del Horno | 70°C a 200 °C a una proporción de 25 °C/min mantener por 6 minutos y finalizar a 300 °C a razón de 25°C/min y se mantiene 5 minutos |
| Iones Monitoreados | 57, 86, 212, 243 |
| EI (Impacto Electrónico) | 70 eV |
| Rango de Scan | |

Artículo 7

Autor: Diru Ye et al, China, 2015

Tabla No. 7

Parámetros propuestos por Autores

| | |
|---------------------------|--|
| Parámetro | |
| Columna | HP 5 MS , 0.25 mm diametro |
| Fase Movil | Helio |
| Flujo de Fase Movil | 1.2 ml/min |
| Presión | |
| Velocidad | ' |
| Temperatura del Inyector | 250°C |
| Volumen de Inyección | 2uL splitless |
| Temperatura del Horno | 80°C a 220 °C a una proporción de 30 °C/min luego 245°C a 5 °C/min y finaliza a 280 °C a razón de 30°C/min y se mantiene 2 minutos |
| Iones Monitoreados | 73, 86, 243, 262, 277 |
| EI (Impacto Electronico) | |
| Rango de Scan | |

Tiempo de Retencion 12.83 minutos

14. Anexo 3

Fotografías

Fotografía No. 1



Cromatógrafo de asas acoplado a espectrometría de masas del Departamento de Toxicología, Escuela de Química Farmacéutica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala

Fotografía No. 2



Viales conteniendo las diluciones de estándar de clenbuterol a diferentes concentraciones, obtenidos en el Departamento de Toxicología, Escuela de Química Farmacéutica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala

Fotografía No. 3



Ampolla estándar de referencia de clenbuterol, obtenida en el Departamento de Toxicología, Escuela de Química Farmacéutica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala

Fotografía No. 4



Columnas ZSDAU020 Clean Screen para extracción en fase sólida del clenbuterol, obtenidas en el Departamento de Toxicología, Escuela de Química Farmacéutica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.

Fotografía No. 5



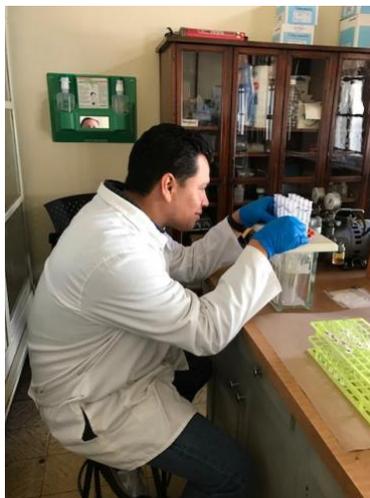
Preparación de reactivos para la extracción en fase sólida de clenbuterol en el Departamento de Toxicología, Escuela de Química Farmacéutica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala

Fotografía No. 6



Sistema de manifold para extracción en fase sólida del clenbuterol, obtenidas en el Departamento de Toxicología, Escuela de Química Farmacéutica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.

Fotografía No. 7



Procedimiento de extracción en fase sólida de clenbuterol en el Departamento de Toxicología, Escuela de Química Farmacéutica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala



Jorge Emilio Arroyo Robles

Autor



MSc. Miriam Carolina Guzmán Quilo

Asesora



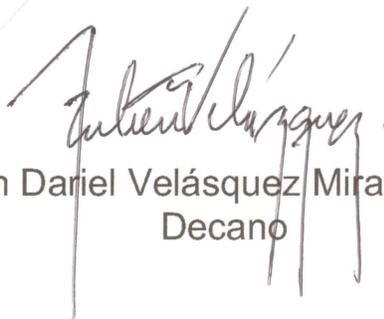
Licenciada Cinthya Paola Rivera

Revisora



M.A. Raquel Pérez Obregón

Directora



Rubén Daríel Velásquez Miranda Ph.D.

Decano