



Universidad de Oviedo

MÁSTER EN CIENCIAS  
ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS

Trabajo Fin de Máster

***Determinación de  $\beta$ -agonistas  
mediante dilución isotópica y  
GC-MS.***

***Ángela Calvar Santamaría.***  
Julio 2013, Oviedo

**Índice:**

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>4</b>
1.1. <b>LOS <math>\beta</math>-AGONISTAS. ....</b>	<b>5</b>
1.1.1. <i>Definición. ....</i>	5
1.1.2. <i>Propiedades físicas y químicas. ....</i>	6
1.1.3. <i>Farmacocinética. ....</i>	7
1.1.4. <i>Legislación. ....</i>	8
1.1.5. <i>Determinación de <math>\beta</math>-agonistas en muestras biológicas. ....</i>	9
1.2. <b>CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS CON FUENTE DE IONIZACIÓN ELECTRÓNICA. ....</b>	<b>10</b>
1.2.1. <i>La Cromatografía de Gases. ....</i>	10
1.2.2. <i>La fuente de ionización electrónica (EI). ....</i>	12
1.2.3. <i>Analizador de masas: cuadrupolo. ....</i>	13
1.3. <b>ANÁLISIS POR DILUCIÓN ISOTÓPICA (IDA). ....</b>	<b>14</b>
1.3.1. <i>Fundamentos del análisis por dilución isotópica. ....</i>	14
1.3.2. <i>La dilución isotópica en análisis elemental. ....</i>	15
1.3.2.1. <i>Ventajas del Análisis por dilución isotópica. ....</i>	17
1.3.2.2. <i>Requisitos del análisis por dilución isotópica. ....</i>	18
1.3.3. <i>La dilución isotópica en el análisis orgánico y bioquímico. ....</i>	18
1.3.4. <i>Deconvolución de perfiles isotópicos. ....</i>	19
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>24</b>
<b>3. EXPERIMENTAL.....</b>	<b>26</b>
3.1. <b>INSTRUMENTACIÓN. ....</b>	<b>27</b>
3.1.1. <i>Equipo GC-MS Agilent 6890N- Agilent 5975B. ....</i>	27
3.1.2. <i>Equipo GC-MS Agilent 7890A-Agilent Series 7000 QqQ. ....</i>	27
3.2. <b>MATERIALES Y REACTIVOS. ....</b>	<b>28</b>
3.3. <b>PROCEDIMIENTOS.....</b>	<b>29</b>
3.3.1. <i>Preparación del reactivo derivatizante. ....</i>	29
3.3.2. <i>Análisis cualitativo de los <math>\beta</math>-agonistas. ....</i>	30
3.3.3. <i>Determinación de la pureza de un fragmento molecular. ....</i>	34
3.3.4. <i>Extracción y derivatización de los <math>\beta</math>-agonistas en muestras de agua. ....</i>	35

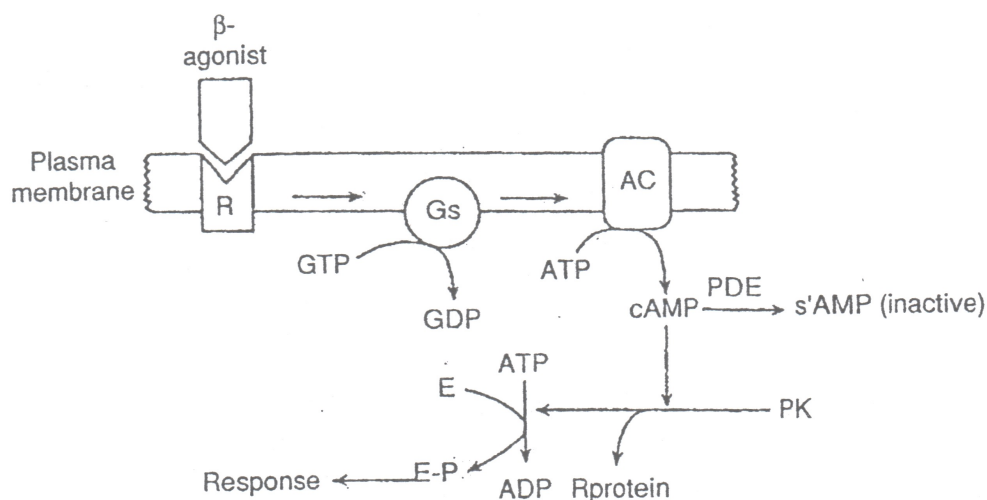
3.3.5. Extracción y derivatización de los $\beta$ -agonistas en muestras de orina. ....	36
4. <i>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.</i> .....	37
4.1. ANÁLISIS CUALITATIVO DE LOS B-AGONISTAS. ....	38
4.2. ESTUDIO DE LA FRAGMENTACIÓN DE LOS $\beta$ -AGONISTAS EN LA FUENTE DE IONIZACIÓN ELECTRÓNICA. ....	43
4.3. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LOS PATRONES DE LOS B-AGONISTAS POR DILUCIÓN ISOTÓPICA INVERSA. ....	46
4.4. ESTUDIOS DE RECUPERACIÓN DE $\beta$ -AGONISTAS EN MUESTRAS DE AGUA Y ORINA. ....	47
4.4.1. Determinación de los $\beta$ -agonistas en muestras de agua utilizando el equipo GC-MS Agilent 6890N-Agilent 5975B. ....	47
4.4.2. Determinación de los $\beta$ -agonistas en muestras de agua y orina utilizando el equipo GC-MS Agilent 7890A-Serie 7000 QqQ. ....	51
5. <i>CONCLUSIONES.</i> .....	56
6. <i>BIBLIOGRAFÍA.</i> .....	58
<i>Bibliografía:</i> .....	59

## *1. INTRODUCCIÓN.*

## 1.1. LOS $\beta$ -AGONISTAS.

### 1.1.1. Definición.

Los beta agonistas son derivados sintéticos de las catecolaminas y tal como su nombre indica se unen a los  $\beta$ -receptores de la membrana celular, produciendo determinados efectos fisiológicos, como el incremento del ritmo cardíaco. Su mecanismo de acción, mostrado en la Figura 1.1, es similar al seguido por neurotransmisores como la adrenalina o la noradrenalina, fundamentales, junto con las catecolaminas, para el buen funcionamiento del sistema nervioso autónomo. En él, los  $\beta$ -agonistas se unen al receptor situado en la membrana plasmática, estimulando así la enzima adenililciclasa (AC), el ATP se convierte en cAMP, que estimula la actividad de la proteína quinasa (PK) y ésta a su vez, induce la fosforilación enzimática<sup>[1]</sup>.



**Figura 1.1.** Mecanismo de acción de los  $\beta$ -agonistas sobre la membrana celular<sup>[1]</sup>.

Los principales efectos de la activación del  $\beta$ -receptor son un incremento del ritmo cardíaco, la relajación del tejido muscular de los bronquios, del útero y de la pared intestinal, la estimulación de la producción de insulina y la degradación del glucógeno. Por ello, los  $\beta$ -agonistas se han usado principalmente, para tratar enfermedades respiratorias y la tocólisis. Sin embargo, dichos compuestos también han sido usados fuera del ámbito terapéutico, debido a dos razones principales:

1) Su efectos sobre el sistema respiratorio y el sistema nervioso autónomo, los hacen atractivos como agentes dopantes, tanto en humanos como en animales.

2) Cuando se administran dosis excesivas de estos compuestos a animales de granja, se produce un cambio en el flujo de nutrientes desde el tejido adiposo al muscular, conocido como “efecto de reparto” provocando una disminución de la materia grasa y un aumento de la masa muscular.

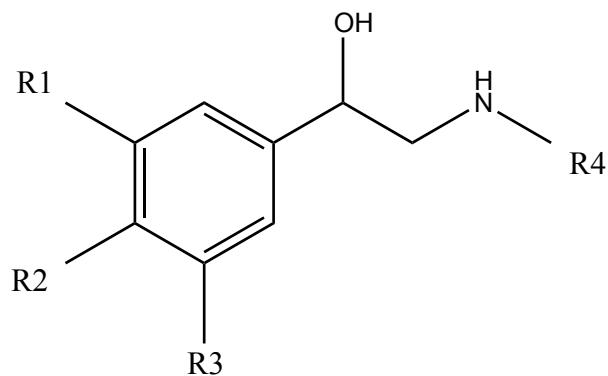
La segunda razón ha provocado que algunos productores de carne, utilicen los  $\beta$ -agonistas para aumentar su producción. De este modo, el uso del clenbuterol en producción animal, ha sido la causa de varias intoxicaciones graves en diferentes países, produciendo taquicardias, náuseas, diarrea, fiebre, astenia e hipertensión. Lo que ha provocado la prohibición de su uso, al igual que el resto de los  $\beta$ -agonistas, como promotores del crecimiento en toda la UE.

#### *1.1.2. Propiedades físicas y químicas.*

El comportamiento químico de los  $\beta$ -agonistas viene determinado principalmente por la presencia del nitrógeno amino, que le proporciona un carácter básico y la presencia del grupo  $\beta$ -hidroxilo, responsable de la relativamente alta polaridad de estos compuestos. Dicha polaridad, se incrementa sensiblemente cuando en la molécula están presentes grupos hidroxilo aromáticos o alifáticos, como ocurre en el caso del salbutamol. Existen más de 50  $\beta$ -agonistas que se dividen en dos grandes grupos,

- 1) Los del tipo anilina, como el clenbuterol o cimaterol, siendo el clenbuterol el más famoso de entre ellos.
- 2) Los del tipo fenol, como el salbutamol y la terbutalina.

La Figura 1.2. muestra la estructura general de los  $\beta$ -agonistas, en la que se puede observar la presencia de un grupo  $\beta$ -hidroxiamino común a todos ellos, siendo la principal diferencia entre unos y otros, los sustituyentes que los forman. En la Tabla 1.1 se muestran los sustituyentes de los  $\beta$ -agonistas objeto de estudio.



**Figura 1.2.** Estructura general de los  $\beta$ -Agonistas.

**Tabla 1.1.** Sustituyentes en la estructura general de la Figura 1.2 de los  $\beta$ -agonistas objeto de estudio.

$\beta$ -agonistas	R1	R2	R3	R4
Salbutamol	CH <sub>2</sub> OH	OH	H	C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>
Terbutalina	OH	H	OH	C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>
Clenproperol	Cl	NH <sub>2</sub>	Cl	C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
Clenpenterol	Cl	NH <sub>2</sub>	Cl	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
Clencyclohexerol	Cl	NH <sub>2</sub>	Cl	(C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> )OH
Clenbuterol	Cl	NH <sub>2</sub>	Cl	C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>
Brombuterol	Br	NH <sub>2</sub>	Br	C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>

### 1.1.3. Farmacocinética.

En base a la farmacocinética, los  $\beta$ -agonistas se pueden dividir en dos grupos, los de baja polaridad y los de alta polaridad. Los de baja polaridad, como el clenbuterol, son activos terapéuticamente a muy bajas dosis orales (20-40 $\mu$ g), presentando tiempos de vida media en plasma, relativamente altos (30 horas, en el caso del clenbuterol).<sup>[2]</sup> Son excretados a través de la orina como metabolitos sin modificar, en niveles que nunca exceden los 10-20 ngmL<sup>-1</sup> después de las dosis terapéuticas. Los de alta polaridad (como el salbutamol), se caracterizan por dosis terapéuticas mayores (2-10 mg) y tiempos de vida media menores, de 1-7 horas en plasma.

La excreción urinaria representa el 35-90% de la dosis administrada y prevalecen los metabolitos fase II (glucuronidos o sulfatos). En orina, se han encontrado residuos del clenbuterol y salbutamol en animales, con tiempos de vida media de 1 a 3 días, permitiendo la detección de residuos hasta 2 ó 3 semanas después del tratamiento.

#### 1.1.4. Legislación.

La legislación referente a los  $\beta$ -agonistas se encuentra recogida principalmente en las siguientes normativas:

- ❖ *Reglamento (UE) n°37/2010 de la Comisión de 22 de Diciembre de 2009.* En él, se encuentran recogidos los límites máximos de residuos (LMR) de sustancias farmacológicamente activas, en productos alimenticios de origen animal, entre ellos el clenbuterol, tal como muestra la Tabla 1.2.

**Tabla 1.2.** Límite máximo de residuos (LMR) para el Clenbuterol en productos alimenticios de origen animal, según el Reglamento (UE) n°37/2010 de la Comisión de 22 de Diciembre de 2009.

<b>Especie</b>	<b>LMR y tejido diana</b>
<b>Bovinos</b>	0,1 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ en músculo.
<b>Équidos</b>	0,5 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ en hígado y riñón.
<b>Bovinos</b>	0,05 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ leche.

- ❖ Directiva 96/22/CE del Consejo de 29 de abril de 1996 por la que se prohíbe utilizar determinadas sustancias de efecto hormonal y tireostático y sustancias  $\beta$ -agonistas en la cría de ganado. Dicha directiva prohíbe el uso de los  $\beta$ -agonistas con fines de engorde, aunque los permite administrar con fines terapéuticos en las siguientes condiciones:
  - ✓  $\beta$ -agonistas a équidos y a animales de compañía, siempre que se utilicen con arreglo a las especificaciones del fabricante.
  - ✓  $\beta$ -agonistas, en forma de inyección, para la inducción de la tocólisis en las vacas parturientas.



En estas condiciones se pueden administrar los  $\beta$ -agonistas siempre y cuando dicha administración sea efectuada por un veterinario, ya que además se prohíbe a los titulares de la explotación, que tengan en su poder medicamentos veterinarios que contengan  $\beta$ -agonistas y que puedan ser utilizadas a fin de inducir la tocólisis.

❖ Directiva 96/23/CE del consejo de 29 de abril de 1996 relativa a las medidas de control aplicables respecto de determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos. Dicha directiva establece las medidas de control relativas a los  $\beta$ -agonistas, clasificados en la misma, como sustancias con efecto anabolizante y no autorizadas. Se incluye también la lista de sustancias que se deben detectar, los métodos de análisis, las normas de interpretación de los resultados y el número de muestreos que deberán efectuarse.

❖ Agencia Mundial Antidopaje WADA (World Antidoping Agency). Prohíbe todos los  $\beta$ -agonistas, incluidos sus isómeros ópticos, excepto el salbutamol (dosis máxima de 1600 microgramos por 24 horas), el formoterol (dosis máxima liberada de 54 microgramos por 24 horas) y el salmeterol, cuando son administrados por inhalación, de acuerdo al régimen terapéutico recomendado por el fabricante. Cuando la concentración en orina del salbutamol es mayor de  $1000 \text{ ng mL}^{-1}$  o la del formoterol es mayor de  $40 \text{ ng mL}^{-1}$ , se entiende que no es consecuencia de su uso terapéutico y se considera como dopaje.

#### 1.1.5. Determinación de $\beta$ -agonistas en muestras biológicas.

La determinación de  $\beta$ -agonistas en muestras biológicas no es sencilla, debido a los bajos niveles en que se encuentran en las muestras ( $\text{ng mL}^{-1}$ ) y a la relativamente alta polaridad de los compuestos. El plasma y la orina se pueden analizar en animales vivos, pero muchos  $\beta$ -agonistas se eliminan rápidamente del cuerpo. Por ello, la detección de los  $\beta$ -agonistas también se realiza en órganos que son capaces de acumularlos, como el cabello, el hígado, los músculos o la retina.<sup>[3,4]</sup>

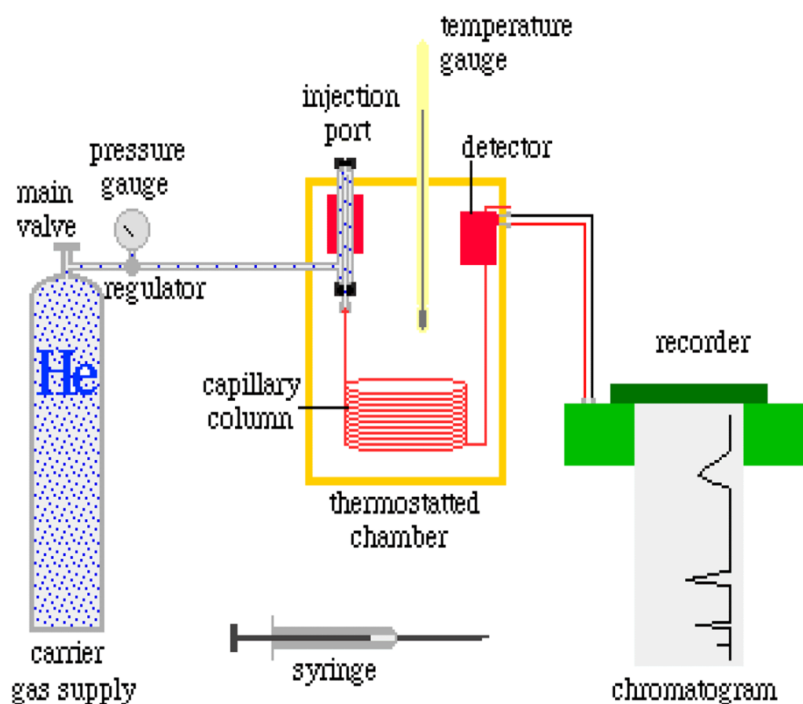
En el hígado, por ejemplo, se puede detectar clenbuterol en concentraciones de  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , hasta dos semanas después de eliminarlo de la dieta del animal. En la retina, se han encontrado concentraciones en un orden de magnitud mayor que en el hígado, debido al elevado número de células  $\beta$ - receptoras presentes en el ojo. Sin embargo, ambas matrices no permiten la monitorización de estos compuestos en seres vivos, por lo que el análisis del cabello está adquiriendo cada vez más interés dentro la comunidad científica. Los  $\beta$ -agonistas suelen encontrarse unidos a la melanina del cabello, por lo que después de una fase de lavado para evitar la contaminación, son extraídos mediante un proceso de digestión ácida.

En cualquiera de los casos anteriores, la determinación de  $\beta$ -agonistas combina una extracción eficiente, con una preconcentración de los analitos. Así pues, se han descrito procedimientos inmunológicos, electroquímicos y espectrofotométricos<sup>[5]</sup> para la determinación de dichos compuestos. Sin embargo, son la Cromatografía de Líquidos o la Cromatografía de Gases acoplada a la Espectrometría de Masas, las que presenta una mayor aceptación debido a su elevada sensibilidad y selectividad.

## 1.2. CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS CON FUENTE DE IONIZACIÓN ELECTRÓNICA.

### 1.2.1. La Cromatografía de Gases.

La Cromatografía de Gases (GC) es una técnica analítica que permite separar, identificar y cuantificar los componentes químicos de una mezcla compleja según las diferentes velocidades con las que se desplazan a través de una fase estacionaria, cuando son transportados por una fase móvil, en este caso, un gas. Las partes fundamentales que constituyen un cromatógrafo de gases se muestran en la Figura 1.3.



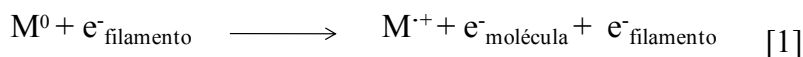
**Figura 1.3.** Esquema de un cromatógrafo de gases.

En la CG la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica, que es donde se produce la separación de los componentes a analizar.<sup>[6]</sup> La elución se produce por el flujo de una fase móvil de gas inerte. A diferencia de los otros tipos de cromatografía, la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito, sino que su única función es la de transportarlo a través de la columna. Dicha columna se encuentra dentro de un horno a temperatura controlada (constante o gradual, según interese) para que se produzca la elución de dichos analitos en función de su volatilidad. La mayor parte de los compuestos orgánicos, pueden separarse por cromatografía de gases, siempre y cuando sean volátiles o térmicamente estables, en caso contrario es necesario un proceso de derivatización. Una vez separados y detectados los componentes individuales de la mezcla, se pueden identificar cada uno de ellos en función de su tiempo de retención. Sin embargo, esto no es suficiente para una identificación inequívoca de los mismos, por lo que la CG se usa conjuntamente con la Espectrometría de Masas (GC-MS), permitiendo así llevar a cabo una adecuada separación e identificación de muestras complejas.

En nuestro caso, debido a la baja volatilidad de los β-agonistas y sobre todo a su alta polaridad, su separación por GC necesita un proceso de derivatización previo antes de su introducción en el cromatógrafo de gases.

### *1.2.2. La fuente de ionización electrónica (EI).*

Tras la etapa de separación en el GC, los compuestos son introducidos en la fuente de ionización electrónica (EI). La función básica de dicha fuente de ionización (que se encuentra a alto vacío,  $<10^{-6}$  mbar), es la formación de iones a partir de moléculas neutras en fase gaseosa (M). Dicha fuente de ionización, consiste en un filamento calentado de wolframio o de renio en forma de cable o bobina, capaz de emitir electrones que son acelerados a un potencial de 70 eV, aplicado entre el filamento y el ánodo. Si la energía de estos electrones es superior al potencial de ionización de las moléculas del analito, éstos las ionizan al chocar contra ellas, causando la pérdida de electrones por repulsiones electrostáticas, tal como muestra la ecuación [1].



El ión radical  $M^{+\bullet}$  se denomina ión molecular y proporciona información analítica debido a que tiene el mismo peso molecular que la molécula original. Tal como se puede observar en la Figura 1.4, los iones positivos formados, son atraídos por una placa de aceleración y repelidos por una placa de repulsión, mediante una diferencia de potencial aplicada entre ambas, con objeto de introducirlos en el analizador de masas.

Las colisiones entre moléculas de analito y los electrones, producen en algunos casos iones moleculares con exceso de energía que se pierde mediante procesos de fragmentación molecular, dando lugar a fragmentos iónicos con una masa menor que la del ión molecular. Para un compuesto determinado y siempre que se reproduzcan las condiciones de ionización, las proporciones relativas del ión molecular y de los fragmentos producidos serán fijas, constituyendo el patrón de fragmentación de esa molécula y considerándose como la huella digital de la misma. El rendimiento de ionización en la fuente de EI es máximo a 70 eV para la mayor parte de las moléculas orgánicas y además, la fragmentación es reproducible independientemente del espectrómetro de masas utilizado, lo que permite la existencia de bibliotecas de compuestos a esta energía de ionización, usadas para la identificación de los mismos.

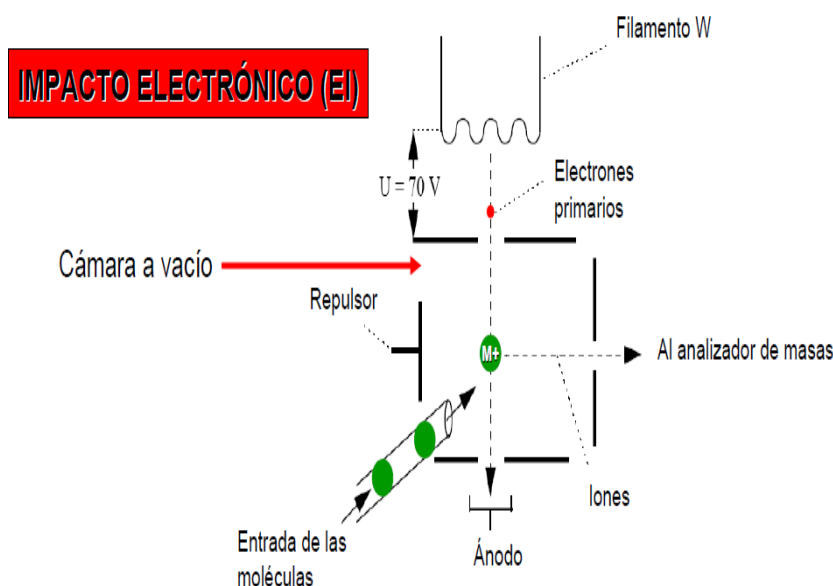
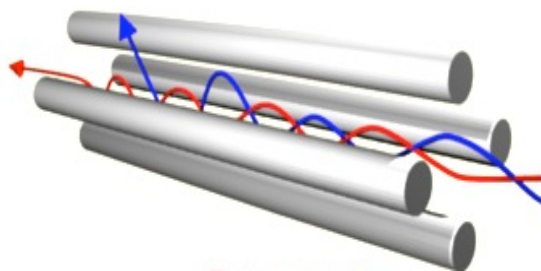


Figura 1.4. Esquema de la fuente de impacto electrónico.

### 1.2.3. Analizador de masas: cuadrupolo.

Una vez generados los fragmentos moleculares, éstos pasan al analizador de masas, que separa los iones de acuerdo a su relación masa/carga ( $m/z$ ). El analizador de masas más utilizado en GC-MS es el cuadrupolo, que consta de cuatro barras, generalmente de Molibdeno, de sección cilíndrica o hiperbólica, paralelas y equidistantes entre sí. Cada pareja de barras opuestas está conectada y sometida a voltajes de corriente continua y radiofrecuencias ( $U \pm V \cos wt$ ), de tal forma que para una configuración determinada, únicamente los iones con una relación  $m/z$  adecuada tendrán una trayectoria iónica estable, llegando al detector, mientras que el resto de iones colisionarán con las barras de molibdeno. El cuadrupolo es un analizador de masas secuencial aunque puedan realizar barridos de 200 unidades de masa en menos de 1 ms.

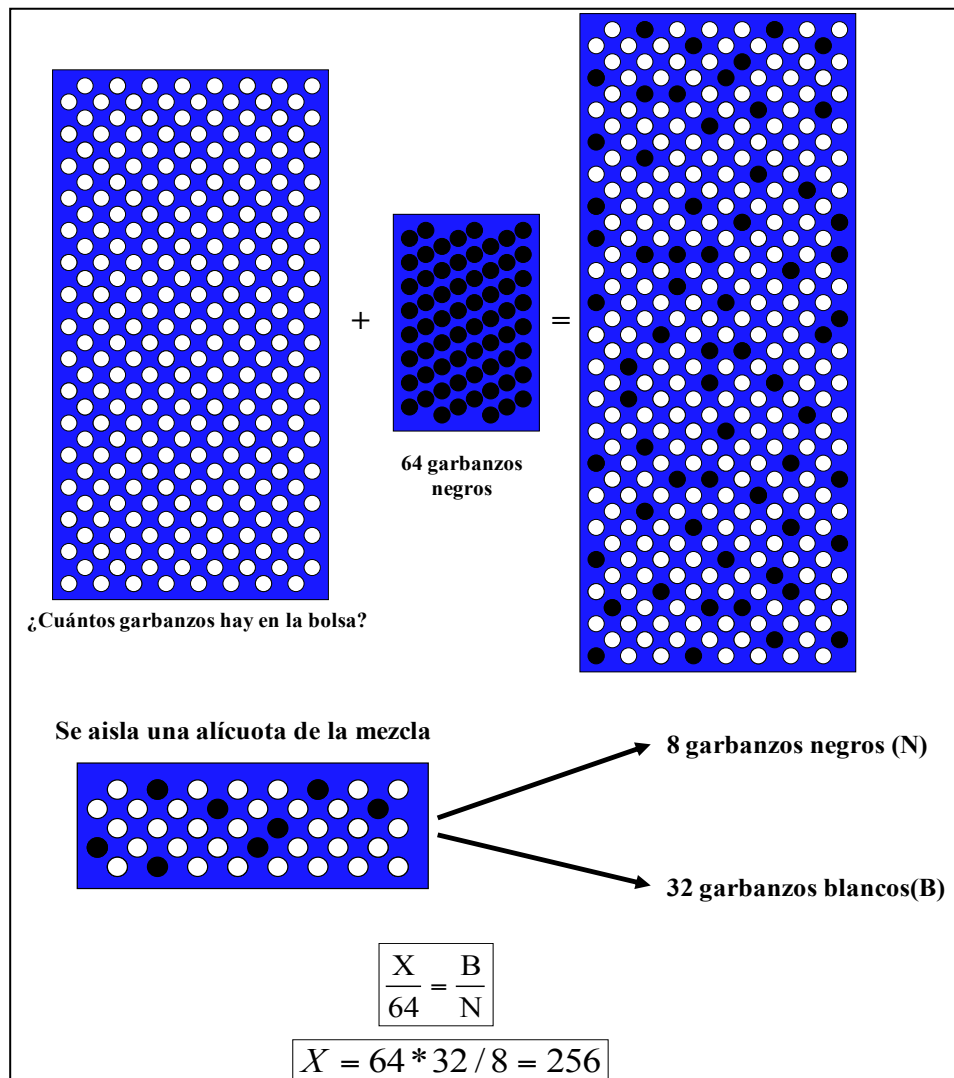


**Figura 1.5.** Esquema de un cuadrupolo, donde se muestra una trayectoria estable (rojo) y otra inestable (azul), de dos iones con distinta  $m/z$ .

### 1.3. ANÁLISIS POR DILUCIÓN ISOTÓPICA (IDA).

#### 1.3.1. Fundamentos del análisis por dilución isotópica.

El concepto del análisis por dilución isotópica, se puede explicar con un sencillo ejemplo, como es la determinación del número de garbanzos que hay en una bolsa de 1 Kg<sup>[7]</sup>. Aunque lo más sencillo sería contarlos, esto llevaría mucho tiempo y se cometerían muchos errores. Si disponemos, por ejemplo, de bolsitas que contienen 64 garbanzos negros cada una y la única diferencia entre los garbanzos blancos y negros es el color, podemos aplicar el concepto de dilución isotópica para saber la cantidad de garbanzos blancos que tenemos en una bolsa de 1 Kg. Para ello, se añade una bolsita de 64 garbanzos negros al Kg de garbanzos blancos. Una vez que el contenido está completamente homogenizado, podemos coger un puñado de la mezcla en la que, contando el número de garbanzos blancos y negros, obtenemos la relación que se muestra en la Figura 1.6.



**Figura 1.6.** Ilustración de un análisis por dilución isotópica mediante un ejemplo con garbanzos.

Si realizamos un balance de masas se puede obtener el número de garbanzos blancos que había en la bolsa de 1 Kg, suponiendo despreciable la presencia de garbanzos negros en la bolsa de 1 Kg y de garbanzos blancos en las bolsitas de garbanzos negros. De esta manera, la relación de garbanzos blancos y negros es igual a la relación entre el número total de garbanzos que hay de cada tipo.

### 1.3.2. La dilución isotópica en análisis elemental.

El análisis por dilución isotópica elemental, está basado en la alteración intencionada de las abundancias isotópicas de un elemento presente en la muestra, mediante la adición de una cantidad conocida del mismo, pero con una abundancia

isotópica alterada, que se denomina trazador. En la Figura 1.7 se representa el principio básico de la dilución isotópica en análisis elemental, para un elemento que contiene dos isótopos diferentes a y b. Como se puede ver, el isótopo a es el más abundante en la muestra, mientras que el trazador está claramente enriquecido en el isótopo b. Por lo tanto, las abundancias isotópicas de la mezcla final, serán intermedias entre las de la muestra y las del trazador y van a depender tanto de la cantidad de trazador añadido, como de la cantidad del elemento original presente en dicha muestra.

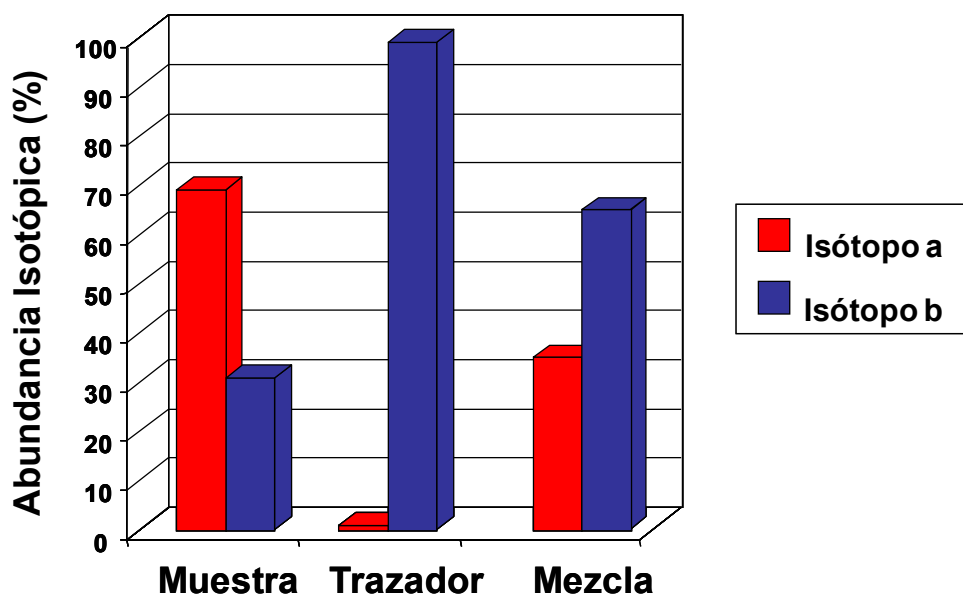


Figura 1.7. Abundancias isotópicas de un elemento que contiene dos isótopos a y b.

La concentración inicial del elemento natural en la muestra, se puede calcular mediante la aplicación de la ecuación de la dilución isotópica:

$$C_s = C_t \frac{m_t}{m_s} \frac{M_s}{M_t} \frac{A_t^b}{A_s^a} \left( \frac{R_m - R_t}{1 - R_m \cdot R_s} \right) \quad [2]$$

donde:

- $C_s$  y  $C_t$  son la concentración del elemento en la muestra y en el trazador, respectivamente.
- $m_s$  y  $m_t$  son la masa tomada de muestra y la masa añadida de trazador, respectivamente.



- $M_s$  y  $M_t$  son los pesos atómicos del elemento en la muestra y en el trazador, respectivamente.
- $A_t^b$  y  $A_s^a$  son las abundancias relativas del isótopo b en el trazador y del isótopo a en la muestra, respectivamente.
- $R_m$ ,  $R_s$  y  $R_t$  son las relaciones isotópicas de los isótopos a y b en la mezcla, en la muestra y en el trazador, respectivamente.

En dicha ecuación, con excepción de la relación isotópica  $R_m$ , todos los demás parámetros son conocidos. Por lo que la concentración del elemento en la muestra  $C_s$ , puede determinarse a partir de la medida del valor de la relación isotópica en el mezcla ( $R_m$ ) utilizando un espectrómetro de masas.

#### *1.3.2.1. Ventajas del Análisis por dilución isotópica.*

El análisis por dilución isotópica, proporciona una serie de ventajas respecto a otros métodos de análisis.

- Al contrario que con otras técnicas de calibración, como la calibración externa o las adiciones estándar, en la Ecuación [2] no existe ningún parámetro relativo a la sensibilidad instrumental. Por tanto, posibles factores que afecten a la sensibilidad del equipo, tales como la deriva de la señal o efectos de matriz, no tendrán efecto en el valor final de la concentración  $C_s$ .
- Una vez alcanzado el equilibrio isotópico entre la muestra y el trazador, las pérdidas de sustancia no afectan al resultado final, ya que cualquier alícuota de la muestra tendrá la misma  $R_m$  durante todo el proceso.
- La incertidumbre en la medida de la concentración, depende solamente de la incertidumbre en la medida de las relaciones isotópicas  $R_s$ ,  $R_t$  y  $R_m$ .

En la mayor parte de los casos,  $R_s$  es conocida y  $R_t$  puede determinarse previamente o ser conocido si se utiliza un trazador certificado.

Por lo tanto, el único parámetro que tiene que ser determinado experimentalmente es  $R_m$  y esta determinación puede realizarse con una elevada exactitud y precisión, utilizando un espectrómetro de masas.

### *1.3.2.2. Requisitos del análisis por dilución isotópica.*

Para que el análisis por dilución isotópica proporcione las ventajas descritas en el apartado anterior, se han de cumplir las siguientes condiciones:

- Que no haya pérdidas de analito o de trazador antes de que se produzca el equilibrio isotópico entre ambos.
- La ausencia de interferencias espectrales entre las señales de analito y trazador, obtenidas mediante Espectrometría de Masas.
- Una corrección adecuada de los parámetros que afectan a la exactitud en la medida de las relaciones isotópicas, como el tiempo muerto del detector y la discriminación de masas.
- Control riguroso de los valores del blanco, ya que cualquier contaminación en la mezcla, afectará al valor de  $R_m$  y por tanto, a la exactitud del resultado final.

En caso de que cualquiera de estos requisitos no se cumpla, la relación isotópica de la mezcla no proporcionará un valor exacto de la concentración inicial del elemento en la misma.

### *1.3.3. La dilución isotópica en el análisis orgánico y bioquímico.*

La dilución isotópica orgánica presenta los mismos principios fundamentales de la dilución isotópica convencional, sin embargo, presenta también una serie de limitaciones importantes, como son:

- Las diferencias de masa entre el trazador y la muestra, pueden producir pequeñas diferencias en las propiedades físico-químicas de ambos, dando lugar a lo que se conoce como "efectos isotópicos"<sup>[8]</sup>. Los efectos isotópicos se observan principalmente en compuestos deuterados, ya que la diferencia de masa relativa entre  $^2\text{H}$  y  $^1\text{H}$  es proporcionalmente más grande que entre el  $^{13}\text{C}$  y  $^{12}\text{C}$ .
- Las fuentes de ionización utilizadas en el análisis orgánico (ionización electrónica o electrospray), producen para un determinado compuesto, un clúster isotópico<sup>[9]</sup>, en el que se incluye no sólo la masa nominal  $M^+$  del fragmento, sino también las masas  $M+1$  y  $M+2$  debido a la presencia natural de isótopos de  $^{13}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ . Por tanto, cuando se introduce un compuesto marcado isotópicamente

en una muestra, se puede producir un solapamiento espectral entre el compuesto natural y el trazador. Dicho solapamiento espectral, se puede solucionar con el uso de trazadores que posean una masa significativamente distinta a la del compuesto natural. Sin embargo, el número de átomos marcados, especialmente cuando se trabaja con  $^2\text{H}$ , no debe ser muy elevado, con el fin de evitar los efectos isotópicos mencionados anteriormente.

Debido a estas dos limitaciones, la cuantificación en análisis por dilución isotópica orgánica, no se realiza aplicando la ecuación de la dilución isotópica convencional [2] (donde la relación isotópica de la mezcla muestra-trazador proporcionaba directamente la concentración inicial de analito), sino que se aplican procedimientos de calibración, basados en la medida de la relación isotópica, utilizando patrones de calibrado. En estos casos, el trazador isotópico se utiliza como patrón interno y la curva de calibrado obtenida es lineal, cuando no existen solapamientos espectrales entre la muestra y el trazador. Además posee una pendiente próxima a uno, en función de las abundancias isotópicas del compuesto marcado y no marcado, respectivamente. Sin embargo, cuando existe solapamiento espectral estas curvas de calibrado solamente son lineales en un rango determinado, de modo que cuando existe un exceso de analito o de trazador, la función está gobernada por los isótopos naturales de analito o por los enriquecidos del trazador, respectivamente.

Por todo ello, en el presente trabajo Fin de Master se ha optado por utilizar compuestos mínimamente marcados para disminuir los posibles efectos isotópicos entre analito y trazador y utilizar herramientas matemáticas, como la regresión lineal múltiple para extraer las fracciones molares de analito y trazador a partir de un espectro de masas cuando existe solapamiento espectral entre ambos.

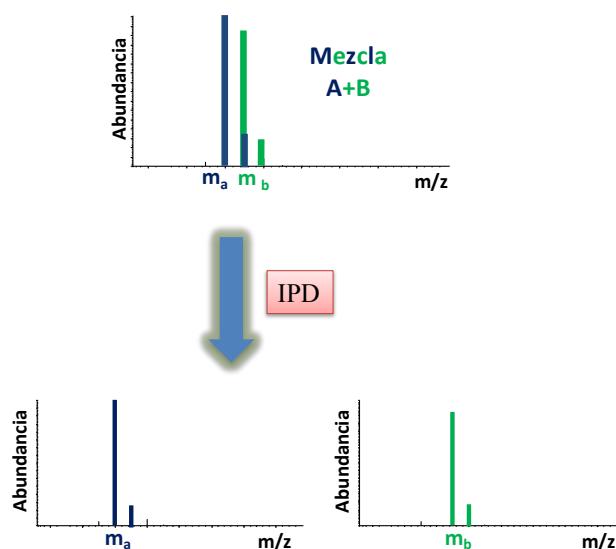
#### *1.3.4. Deconvolución de perfiles isotópicos.*

La deconvolución de perfiles isotópicos (IPD)<sup>[10]</sup>, es una herramienta matemática basada en la regresión lineal múltiple cuyo objetivo es conocer la contribución de los diferentes perfiles isotópicos, que puedan existir en un espectro de masas experimental. Se entiende como perfil isotópico, al conjunto de abundancias isotópicas relativas de todos los isótopos estables de un elemento o todos los

isotopólogos de una molécula. La suma de todas las abundancias isotópicas relativas de cualquier perfil isotópico es, por definición, 1. En el caso de compuestos orgánicos el perfil isotópico es el conjunto de abundancias relativas de los distintos fragmentos moleculares (isotopólogos) que pueden formar un determinado compuesto, en función de las abundancias isotópicas de sus elementos constituyentes.

El perfil isotópico de un elemento o compuesto que se encuentra en la naturaleza y por tanto en la mayoría de las muestras a analizar, se denomina perfil isotópico natural. Cuando usamos un elemento o compuesto enriquecido isotópicamente, podemos hablar de un perfil isotópico alterado. Normalmente, en estos perfiles isotópicos alterados, un isótopo se encuentra en una abundancia isotópica relativa más elevada que en el correspondiente elemento natural, mientras que el resto de isótopos tienen una abundancia menor.

Cuando se realiza un análisis por dilución isotópica, estamos preparando mezclas de dos perfiles isotópicos distintos: un perfil isotópico natural y un perfil isotópico alterado. El objetivo de la deconvolución de los perfiles isotópicos es determinar la contribución de cada perfil isotópico, natural o alterado, al perfil isotópico observado en la mezcla, tal y como se observa en la figura 1.8.



**Figura 1.8.** Esquema representativo de la deconvolución de perfiles isotópicos (IPD) cuando se mezclan un compuesto de abundancia isotópica natural (A) con un análogo enriquecido isotópicamente (B).

Así pues, haciendo un balance de masas:

$$N_{mix} = N_{nat} + N_{enr} \quad [3]$$

donde:

- $N_{mix}$  = cantidad total de compuesto en la mezcla.
- $N_{nat}$  = cantidad de compuesto con abundancia isotópica natural.
- $N_{enr}$  = cantidad conocida de compuesto trazador añadido a la mezcla.

Se pueden plantear balances de masa similares para todas los isotopólogos del compuesto:

$$N_{mix}^i = N_{nat}^i + N_{enr}^i \quad [4]$$

Dicha ecuación puede expresarse como:

$$N_{mix} \cdot A_{mix}^i = N_{nat} \cdot A_{nat}^i + N_{enr} \cdot A_{enr}^i \quad [5]$$

donde

- $A_{mix}^i$  = la abundancia isotópica relativa medida experimentalmente para el isotopólogo  $i$  en la mezcla.
- $A_{nat}^i$  = la abundancia teórica relativa para el isotopólogo  $i$  del compuesto natural.
- $A_{enr}^i$  = la abundancia teórica relativa para el isotopólogo  $i$  del compuesto isotópicamente enriquecido.

Dividiendo ambas ecuaciones obtenemos:

$$A_{mix}^i = x_{nat} \cdot A_{nat}^i + x_{enr} \cdot A_{enr}^i \quad [6]$$

donde:

$$x_{nat} = \frac{N_{nat}}{N_{nat} + N_{enr}} \quad [7]$$

$$x_{enr} = \frac{N_{lab}}{N_{nat} + N_{enr}} \quad [8]$$

$X_{nat}$  y  $X_{enr}$  indican las fracciones molares del compuesto en la mezcla, procedentes de cada perfil isotópico.

Si tenemos un compuesto que tiene varios isotopólogos, podemos establecer una ecuación similar a la Ecuación [6] para cada masa nominal, que se puede expresar en forma matricial como:

$$\begin{bmatrix} A_{mix}^1 \\ A_{mix}^2 \\ A_{mix}^3 \\ \dots \\ A_{mix}^{n-1} \\ A_{mix}^n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_{nat}^1 & A_{enr}^1 \\ A_{nat}^2 & A_{enr}^2 \\ A_{nat}^3 & A_{enr}^3 \\ \dots & \dots \\ A_{nat}^{n-1} & A_{enr}^{n-1} \\ A_{nat}^n & A_{enr}^n \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} x_{nat} \\ x_{enr} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e^1 \\ e^2 \\ e^3 \\ \dots \\ e^{n-1} \\ e^n \end{bmatrix} \quad [9]$$

En la ecuación [9] hay más parámetros (masas nominales) que incógnitas (fracciones molares) por lo que tenemos un sistema sobredeterminado que puede resolverse mediante un ajuste por mínimos cuadrados. Las soluciones de este sistema son las fracciones molares de compuesto natural y compuesto enriquecido isotópicamente.

Todos los cálculos matriciales pueden resolverse por medio de hojas de cálculo utilizando la función de “Estimación Lineal” de Excel, que permite obtener las fracciones molares junto con sus incertidumbres. Finalmente, como la cantidad de compuesto marcado añadido es conocido, la cantidad de moles de compuesto natural se puede calcular mediante la Ecuación [10]:

$$\frac{N_{nat}}{N_{lab}} = \frac{x_{nat}}{x_{enr}} = R \quad [10]$$

Obteniendo de esta forma la ecuación [11], que permite obtener la concentración en peso del compuesto de abundancia natural, a partir de la relación de fracciones molares  $X_{nat}$  y  $X_{enr}$ .

$$[Conc. natural] = (Conc trazador) * \left( \frac{g_{trazador}}{g_{analito}} \right) * \left( \frac{Peso Molecular_{trazador}}{Peso Molecular_{analito}} \right) * R \quad [11]$$

Cabe resaltar, que cuando se representa la relación de fracciones molares ( $X_{nat}/X_{enr}$ ) frente a la relación de moles ( $N_{nat}/N_{enr}$ ) debería obtenerse una recta de pendiente 1 y ordenada en el origen 0, independientemente del marcaje del compuesto

enriquecido, siempre y cuando no existan efectos isotópicos durante la preparación de muestra. Esto permite eliminar la necesidad de realizar un calibrado y cuantificar de una manera análoga a como se realiza en la dilución isotópica inorgánica.

## *2. OBJETIVOS.*



El objetivo general del presente Trabajo Fin de Máster, es el desarrollo de un método de análisis para la determinación de  $\beta$ -agonistas mediante la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), haciendo uso de la dilución isotópica, con marcaje mínimo y deconvolución de perfiles isotópicos.

Dicho objetivo principal se abordará a través de los siguientes objetivos parciales:

- ✓ Estudio de la fragmentación de los  $\beta$ -agonistas en la fuente de ionización electrónica.
- ✓ Determinación de la concentración de los patrones de los  $\beta$ -agonistas por dilución isotópica inversa.
- ✓ Estudios de recuperación de  $\beta$ -agonistas en muestras de agua y orina.

### *3. EXPERIMENTAL.*

### 3.1. INSTRUMENTACIÓN.

A lo largo del presente Trabajo Fin de Máster se han utilizado principalmente, dos equipos GC-MS diferentes de la casa comercial Agilent Technologies. El primero de ellos fue el cromatógrafo de gases 6890N acoplado a un espectrómetro de masas 5975B y el segundo un cromatógrafo de gases 7890A acoplado a un espectrómetro de masas de tipo triple cuadrupolo Agilent Series 7000 QqQ.

#### 3.1.1. Equipo GC-MS Agilent 6890N- Agilent 5975B.

En dicho equipo, el cromatógrafo de gases empleado está equipado con un inyector split/splitless. La columna es una columna capilar HP-5MS de 30m de longitud, 0.25mm de diámetro interno y 0.25 $\mu$ m de espesor de fase estacionaria, formada por 5% fenil- y 95% dimetilpolixilosano. El cromatógrafo se acopla a la fuente de ionización mediante una línea de transferencia a través de la cual se hace pasar el final del capilar de la columna cromatográfica. Dicha línea de transferencia se puede calentar hasta 350°C para evitar la condensación de los analitos. Para la calibración del equipo, se utiliza perfluorotributilamina (PFTBA), que permite la calibración del equipo en un intervalo amplio de masas, siendo los picos más intensos los correspondientes a las masas 69, 218 y 502. Mediante el procedimiento de “autotune”, se ajustan automáticamente los parámetros relativos a la calibración de masas, extracción, enfoque, aceleración y detección de los iones, con el fin de obtener la mayor sensibilidad y una adecuada resolución.

#### 3.1.2. Equipo GC-MS Agilent 7890A-Agilent Series 7000 QqQ.

En dicho equipo el cromatógrafo de gases también está equipado con un inyector split/splitless, siendo la principal diferencia la incorporación del sistema “backflush” que se aplica al final de cada separación cromatográfica permitiendo una mejor limpieza del sistema cromatográfico y de la fuente de ionización.

La columna cromatográfica empleada en este equipo es una DB-5MS, de 30m de longitud, 0.25mm de diámetro interno y 0.25 $\mu$ m de espesor de fase estacionaria, formada por un polímero de fenil arileno equivalente a la fase estacionaria 5% fenil- y 95% dimetilpolixilosano Aunque este equipo permite trabajar en modo MS/MS para alcanzar mejores límites de detección, a lo largo de este Trabajo Fin de Máster se utilizó solamente en modo SIM (monitorización selectiva de iones) o SCAN. Trabajando en

estos modos de adquisición este equipo presenta también una mejor sensibilidad instrumental en comparación con el equipo GC-MS descrito en el apartado anterior. Esto es debido a la presencia de la celda de colisión formada por un hexapolo de pequeño diámetro, sometido a una elevada frecuencia, que ayuda a capturar y focalizar los iones hacia el detector. En ella también se utiliza helio además de nitrógeno como gas de colisión, que ayuda en el proceso de fragmentación y reduce el ruido espectral eliminando iones de He metaestables. Otro de los factores que explican la mayor sensibilidad es el sistema de dinodo de elevada energía (HED) con triple eje, que evita que las partículas neutras lleguen al detector. Su calibración también se realiza utilizando la perfluorotributilamina (PFTBA) y cabe resaltar que el “autotune” debe hacerse en función del método de adquisición que se usará posteriormente. Es decir, para medir en el modo de adquisición SIM y SCAN, el “autotune” debe hacerse con la celda de colisión despresurizada y para medir en el modo MSMS, el “autotune” debe hacerse con la celda de colisión presurizada con nitrógeno y helio.

### 3.2. MATERIALES Y REACTIVOS.

La instrumentación pequeña y los materiales que se han utilizado a lo largo de este Trabajo Fin de Máster son:

- Balanza analítica AB204-S (Mettler Toledo, Zurich, Suiza).
- Centrífuga P-Selecta (Barcelona, España).
- Evaporadores/concentradores Minivap (Supelco, Bellefonte, EEUU).
- Placa calefactora IKA RCT Basic (Staufen, Alemania).
- Vortex FB15024 (Fisher Scientific, Madrid, España).
- pHmetro Basic 20 (Crison, Barcelona, España).
- Viales de 2 y 7 ml con tapón de rosca (Supelco).
- Viales plástico de 15 ml.(Deltalab, Barcelona, España).
- Viales de 2ml para cromatografía de gases y sus correspondientes insertos (Supelco).
- Micropipetas eppendorf con sus correspondientes puntas y pipetas pasteur.

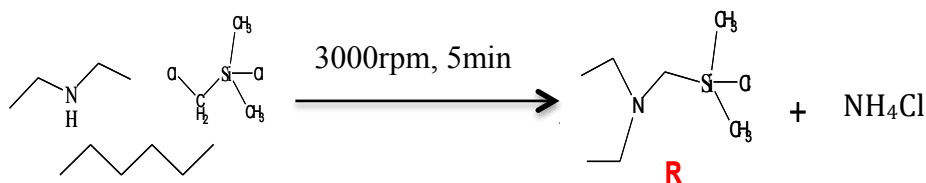
Los reactivos utilizados fueron:

- Agua ultrapura obtenida de un sistema Milli-Q (Millipore Co, Bedford, EEUU).
- Terbutil-metil-eter ( $C_5H_{12}O$ ): P.M.=88.15 g/mol (Fluka, Buchs, Suiza).
- Hidróxido de sodio (NaOH): P.M.=40 g/mol , 98% pureza (Sigma-Aldrich).
- Cloruro sódico (NaCl):P.M.=58.44 g/mol, 99.5 % pureza (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Hexano ( $C_6H_{14}$ ): P.M.=86.18 g/mol (Sigma-Aldrich).
- Tolueno ( $C_6H_5CH_3$ ): P.M.=92.14 g/mol, 99.9% de pureza (Sigma-Aldrich).
- Dietilamina ( $C_4NH_{11}$ ):P.M.=73.14 g/mol, 99.5% de pureza (Sigma-Aldrich).
- Clorometildimetilclorosilano ( $C_3H_8C_{12}Si$ ): P.M.=143.09 g/mol, 98% de pureza (Aldrich).
- Patrones de abundancia isotópica natural de los  $\beta$ -agonistas a analizar: clenproperol, clenbuterol, clenpenterol, brombuterol, terbutalina, salbutamol y clenclorhexerol, proporcionados por la empresa ISC-Science (Oviedo, España).
- Patrones marcados en un átomo de  $^{13}C$  de los  $\beta$ -agonistas clenproperol, clenbuterol, clenpenterol, brombuterol, terbutalina, salbutamol y clenclorhexerol, proporcionados por la empresa ISC-Science.

### 3.3. PROCEDIMIENTOS.

#### 3.3.1. Preparación del reactivo derivatizante.

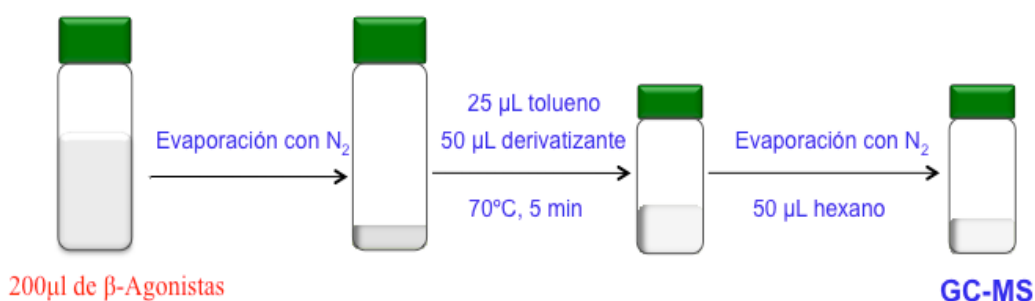
Para preparar el reactivo derivatizante<sup>[11,12]</sup> y tal como se puede observar en la Figura 3.1, se vierten en un vial 4 ml de hexano, se añaden 300 $\mu$ l de dietilamina y 300 $\mu$ l de clorometildimetilclorosilano, observándose la formación de un precipitado blanco ( $NH_4Cl$ ). Éste se centrifuga a 3000rpm durante cinco minutos y con ayuda de una micropipeta se toma una alícuota del sobrenadante, que constituye el reactivo de derivatización (R).



**Figura 3.1.** Esquema del proceso de obtención del reactivo derivatizante empleado en este Trabajo Fin de Máster.

### 3.3.2. Análisis cualitativo de los $\beta$ -agonistas.

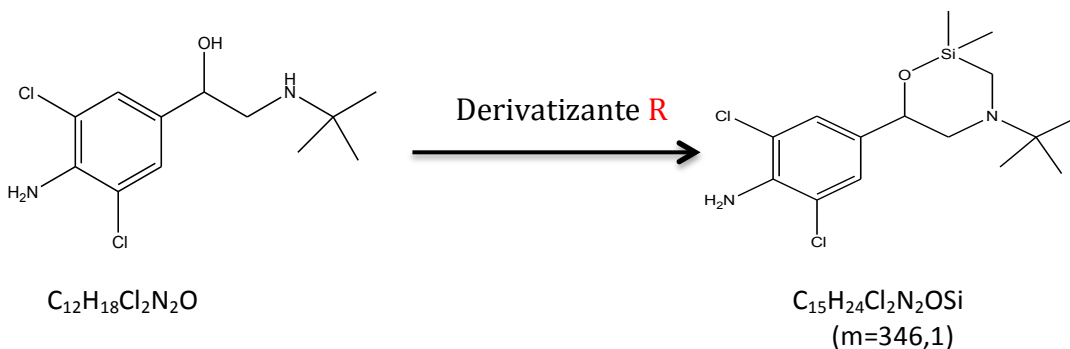
Para realizar el análisis cualitativo de los compuestos, se prepara una disolución concentrada ( $300\text{-}500\text{ mg L}^{-1}$ ) de los 7 agonistas objeto de estudio a partir de los patrones naturales de cada uno de ellos y de igual manera, se prepara otra con los compuestos marcados isotópicamente. En un vial de 2ml, se añade  $200\mu\text{l}$  de la disolución de compuestos de abundancias naturales preparados con anterioridad y en otro,  $200\mu\text{l}$  de la disolución de compuestos marcados isotópicamente. Ambas disoluciones se llevan a sequedad mediante una corriente de nitrógeno, se añaden  $25\mu\text{l}$  de tolueno y  $50\mu\text{l}$  del agente derivatizante (R), se agita en el vortex y se calienta a  $70^\circ\text{C}$  durante 5 min. Posteriormente se evaporan de nuevo bajo la corriente de nitrógeno y se reconstituyen en  $50\mu\text{l}$  de hexano. El esquema de dicho procedimiento se puede observar en la Figura 3.2.



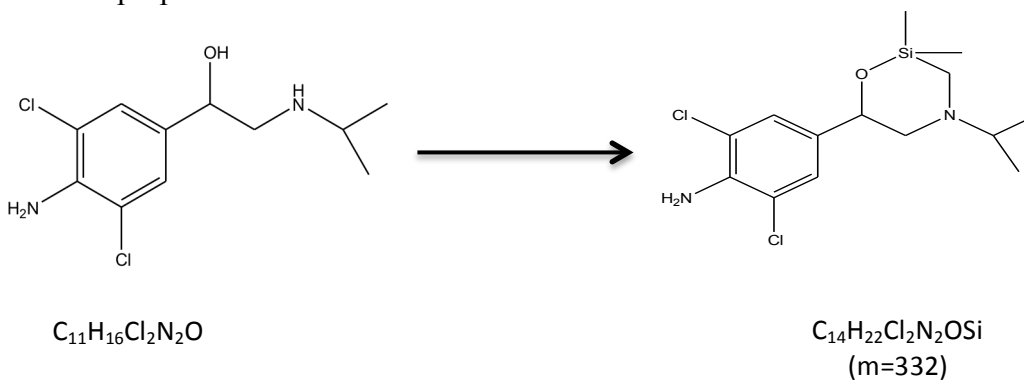
**Figura 3.2.** Procedimiento de derivatización de los  $\beta$ -agonistas para su determinación por GC-MS.

La estructura química de los compuestos formados tras el proceso de derivatización se muestra en la Figura 3.3:

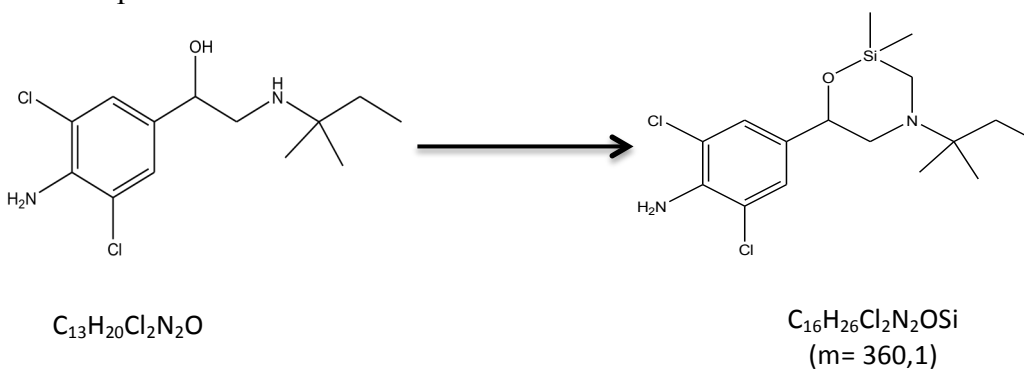
❖ Clenbuterol:



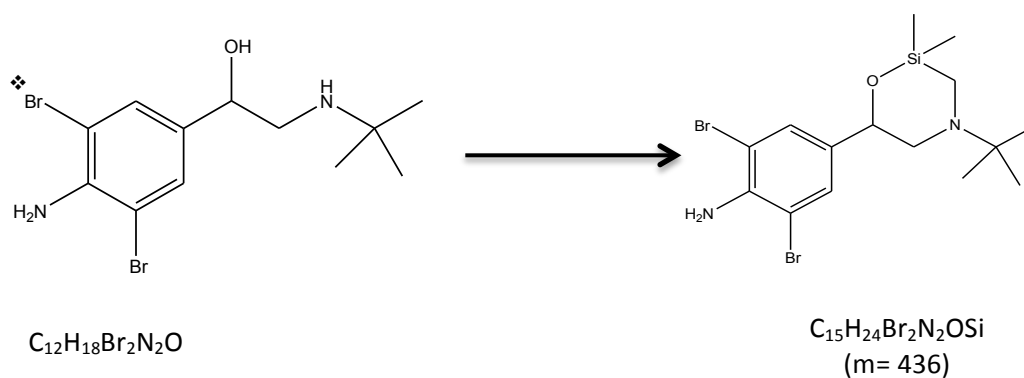
❖ Clenproperol:



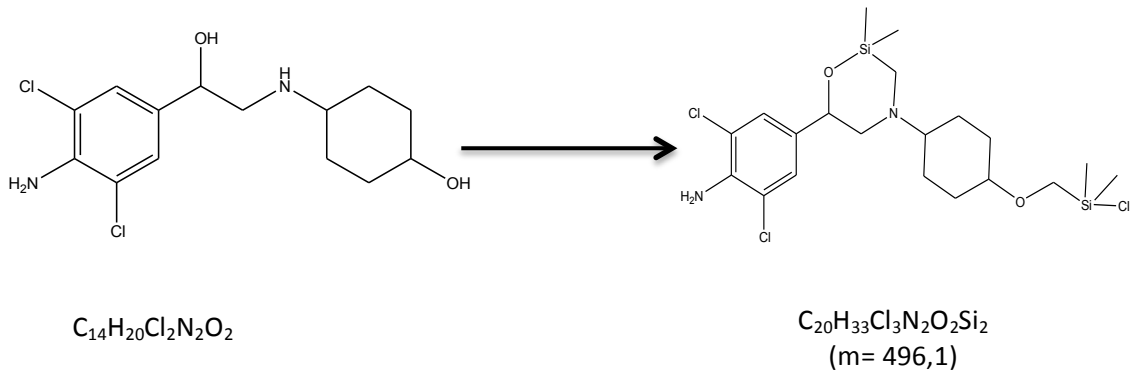
❖ Clenpenterol:



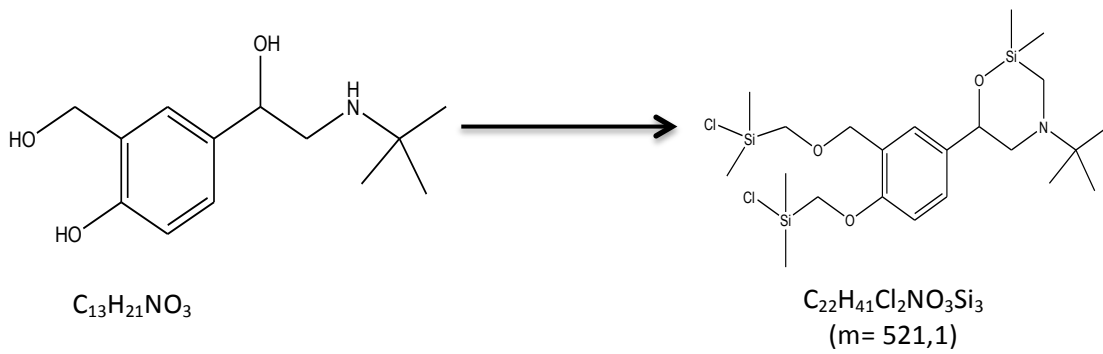
❖ Brombuterol:



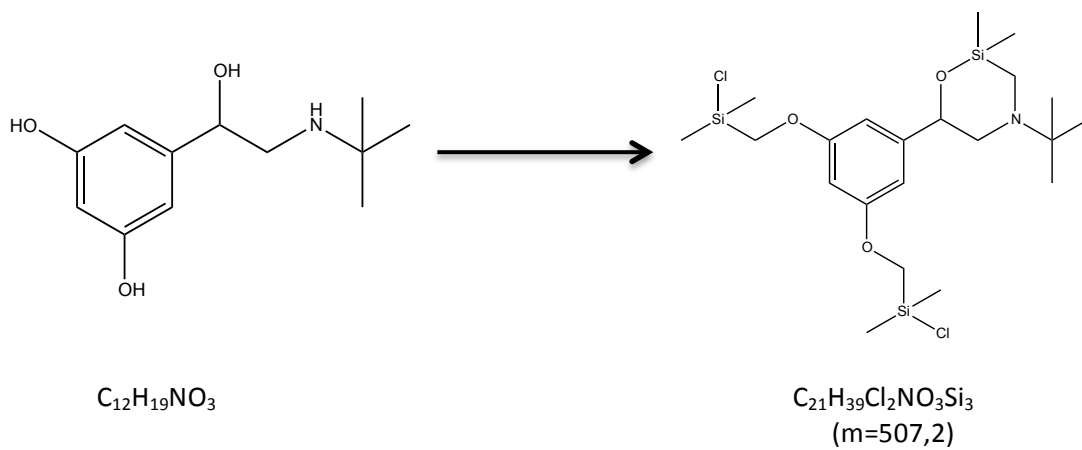
❖ Clenciclohexerol:



❖ Salbutamol:



❖ Terbutalina:



**Figura 3.3.** Estructura de los  $\beta$ -agonistas objeto de estudio tras la reacción de derivatización.



La identificación de dichos compuestos tras la etapa de derivatización se llevó a cabo mediante GC-EI-MS bajo las condiciones experimentales que se recogen en la Tabla 3.1. y 3.2.

**Tabla 3.1.** *Condiciones experimentales del GC-EI-MS empleadas utilizando el equipo Agilent 6890N- 5975B.*

<b>Cromatógrafo de Gases</b>	Agilen 6890N
<b>Espectrómetro de Masas</b>	Agilent 5975B
<b>Columna cromatográfica</b>	Agilent HP-5MS
<b>Programa de temperatura</b>	50°C(1min)/ 15°C- 300°C (15°C/min)/ 300°C(5 min)
<b>Modo de Inyección</b>	Splitless (tiempo de purga 1min.)
<b>Volumen de inyección</b>	0,5 $\mu$ L
<b>Temperatura del inyector</b>	260 °C
<b>Temperatura de la interfase</b>	280 °C
<b>Temperatura de la fuente</b>	230 °C
<b>Temperatura del cuadrupolo</b>	150 °C
<b>Flujo de gas portador (He)</b>	2 ml/min

**Tabla 3.2.** *Condiciones experimentales del GC-EI-MS empleadas utilizando el equipo Agilent 7890A- Series 7000 QqQ.*

<b>Cromatógrafo de Gases</b>	Agilent 7890A
<b>Espectrómetro de Masas</b>	Agilent Series 7000 QqQ
<b>Columna cromatográfica</b>	Agilent DB-5MS
<b>Programa de temperatura</b>	50°C(1min)/ 15°C- 300°C (15°C/min)/ 300°C(5 min) Post run (4 min a 300°C)
<b>Modo de Inyección</b>	Splitless (tiempo de purga 1min.)
<b>Volumen de inyección</b>	2 $\mu$ L
<b>Temperatura del inyector</b>	260 °C
<b>Temperatura de la interfase</b>	280 °C
<b>Temperatura de la fuente</b>	230 °C
<b>Temperatura del cuadrupolo</b>	150 °C
<b>Flujo de gas portador (He)</b>	2 ml/min

### 3.3.3. Determinación de la pureza de un fragmento molecular.

En el desarrollo matemático de la deconvolución de perfiles isotópicos, se asume que la distribución isotópica medida en una mezcla mediante Espectrometría de Masas, proviene de un mismo fragmento molecular  $M^+$ . Sin embargo, un efecto importante observado en la medida de abundancias isotópicas utilizando GC-MS es la coexistencia de diferentes fragmentos moleculares, debido a que el ión molecular  $M^+$  puede perder  $H^+$  durante su fragmentación en la fuente de ionización. Por tanto, el efecto de la pureza del fragmento molecular sobre el que se van a realizar las medidas de las abundancias isotópicas, debe ser evaluado con detalle antes de aplicar la deconvolución de perfiles isotópicos en dilución isotópica orgánica.

Dicha pureza del ión molecular se puede estudiar aplicando la siguiente ecuación matricial:

$$\begin{bmatrix} A_{\text{exp}}^1 \\ A_{\text{exp}}^2 \\ A_{\text{exp}}^3 \\ \dots \\ A_{\text{exp}}^{n-1} \\ A_{\text{exp}}^n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_M^1 & A_{M-H}^1 & A_{M-2H}^1 \\ A_M^2 & A_{M-H}^2 & A_{M-2H}^2 \\ A_M^3 & A_{M-H}^3 & A_{M-2H}^3 \\ \dots & \dots & \dots \\ A_M^{n-1} & A_{M-H}^{n-1} & A_{M-2H}^{n-1} \\ A_M^n & A_{M-H}^n & A_{M-2H}^n \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \alpha \\ \beta \\ \gamma \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e^1 \\ e^2 \\ e^3 \\ \dots \\ e^{n-1} \\ e^n \end{bmatrix} \quad [12]$$

Donde :

- $A_M$ ,  $A_{M-H}$  y  $A_{M-2H}$  son las abundancias teóricas de los diferentes compuestos que se forman en la fuente de ionización electrónica, debido a la pérdida de átomos de hidrógeno.
- $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  son las fracciones molares de los distintos compuestos que se han formado en la fuente, a causa de la pérdida de átomos de hidrógeno y se conocen como factores de fragmentación.

Una vez determinados dichos factores, la abundancia isotópica del compuesto, puede ser calculada según la siguiente ecuación<sup>[9]</sup>:

$$A_{\text{nat}}^i = \alpha \cdot A_M^i + \beta \cdot A_{M-H}^i + \gamma \cdot A_{M-2H}^i \quad [13]$$

Donde  $A_{\text{nat}}^i$  es la nueva composición isotópica “estimada” para la masa  $i$ , teniendo en cuenta las contribuciones de los compuestos  $A_M^i$ ,  $A_{M+H}^i$ ,  $A_{M-H}^i$  y  $A_{M-2H}^i$  que están presentes en las mismas masas.

Uno de los requisitos generales para la aplicación de la ecuación [9] en dilución isotópica, es que la composición isotópica de los fragmentos presentes en la matriz  $A$ , debe ser calculada teniendo en cuenta la fragmentación del compuesto.

#### 3.3.4. Extracción y derivatización de los $\beta$ -agonistas en muestras de agua.

Como paso previo, se prepara una disolución de los 7  $\beta$ -agonistas objeto de estudio a partir de los patrones naturales de cada uno de ellos y de igual manera, se prepara otra con los compuestos marcados isotópicamente. Para preparar las muestras se introducen 10 g de agua en un vial de plástico de 15 ml y se añade una cantidad conocida de la disolución de patrón natural y de patrón marcado, todas controladas gravimétricamente para evitar errores. Se añade 15  $\mu\text{l}$  de NaOH 1% con objeto de ajustar el pH a 9.6 y 400 mg de NaCl para modificar la fuerza iónica. Tras 5 minutos de agitación se añade 2ml de terbutilmetileter, se agita de nuevo y se transfiere la fase orgánica a un vial de 2 ml con ayuda de una pipeta pasteur. Dicha fase orgánica se lleva a sequedad mediante una corriente de nitrógeno, se añade 25  $\mu\text{l}$  de tolueno y 50  $\mu\text{l}$  del agente derivatizante preparado con anterioridad, se agita en el vortex y se calienta a 70°C durante 5 min. Se evapora de nuevo con la corriente de nitrógeno y se reconstituye con 50  $\mu\text{l}$  de hexano. El esquema de dicho procedimiento se puede observar en la Figura 3.4.

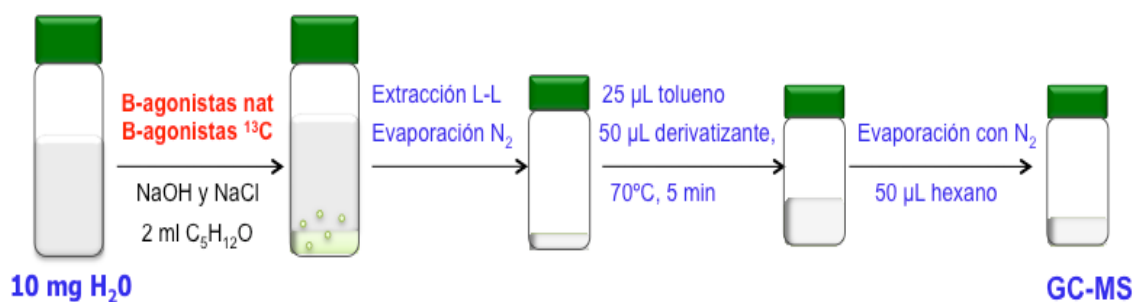


Figura 3.4. Extracción y derivatización de los  $\beta$ -agonistas en agua.

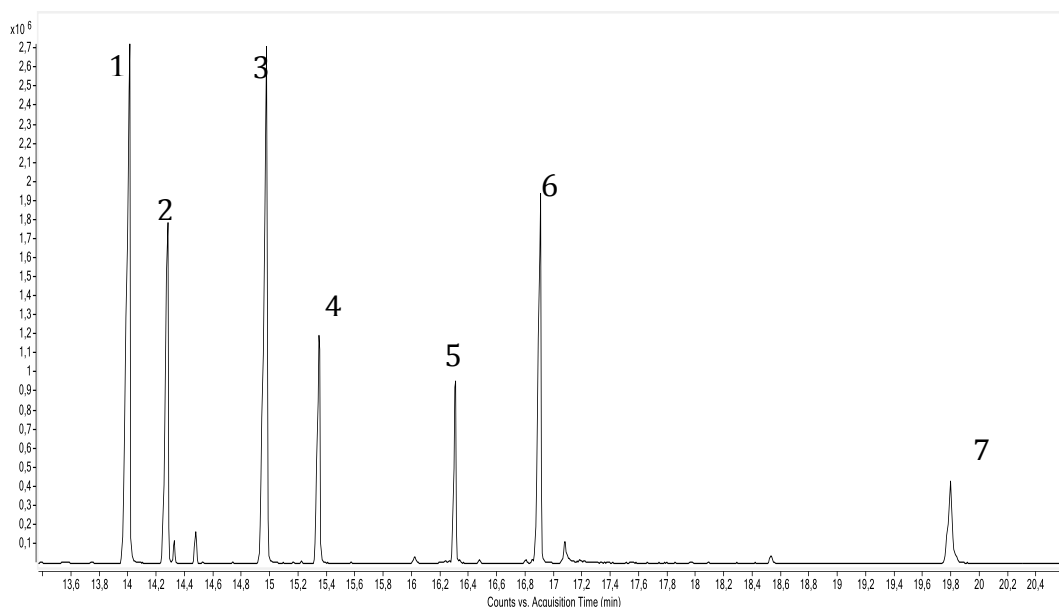
*3.3.5. Extracción y derivatización de los  $\beta$ -agonistas en muestras de orina.*

El procedimiento para la extracción y derivatización de las muestras de orina es igual al mostrado anteriormente, con la salvedad de que se añaden 90 $\mu$ l de NaOH 10% para obtener el pH de 9.6 y se realiza una etapa de centrifugación después de añadir el metiliterbutileter, con el objetivo de favorecer la extracción de la fase orgánica. La cuantificación de dichos compuestos, tanto en agua como en orina, se lleva a cabo mediante GC-EI-MS utilizando las condiciones experimentales recogidas con anterioridad en la Tabla 3.1 y 3.2.

## *4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.*

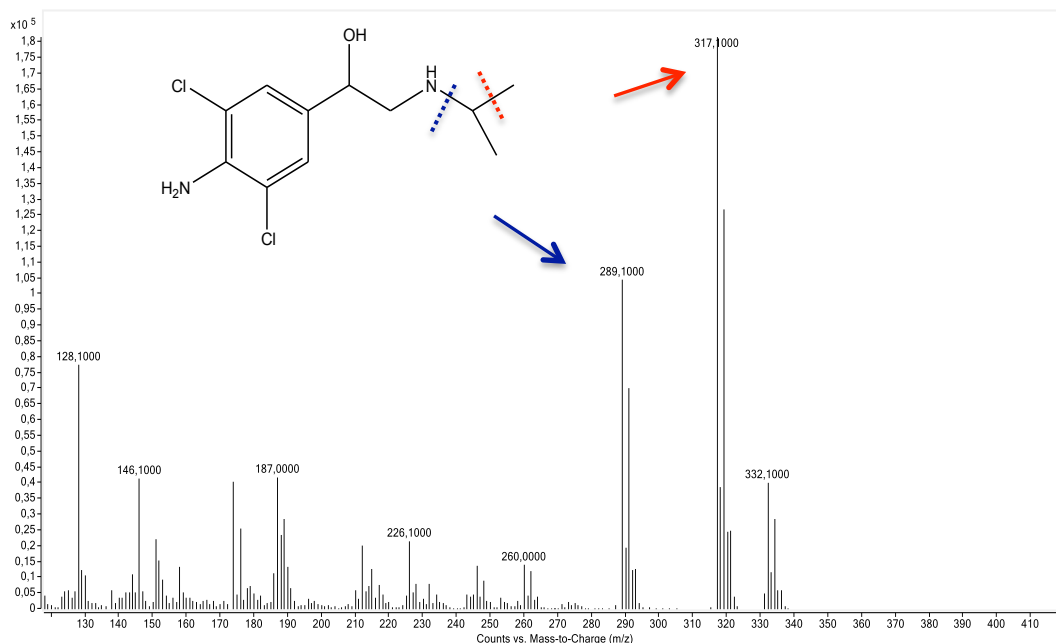
#### 4.1. ANÁLISIS CUALITATIVO DE LOS $\beta$ -AGONISTAS.

El análisis cualitativo de los de los  $\beta$ -agonistas se realizó inyectando una mezcla de los mismos a una concentración aproximada de  $400 \mu\text{g g}^{-1}$  tanto para los compuestos de abundancia isotópica natural como los enriquecidos isotópicamente. La adquisición se realizó en modo SCAN en el rango de masas de 50 a 600 m/z. La Figura 4.1 muestra el cromatograma obtenido para la mezcla de compuestos de abundancia isotópica natural.



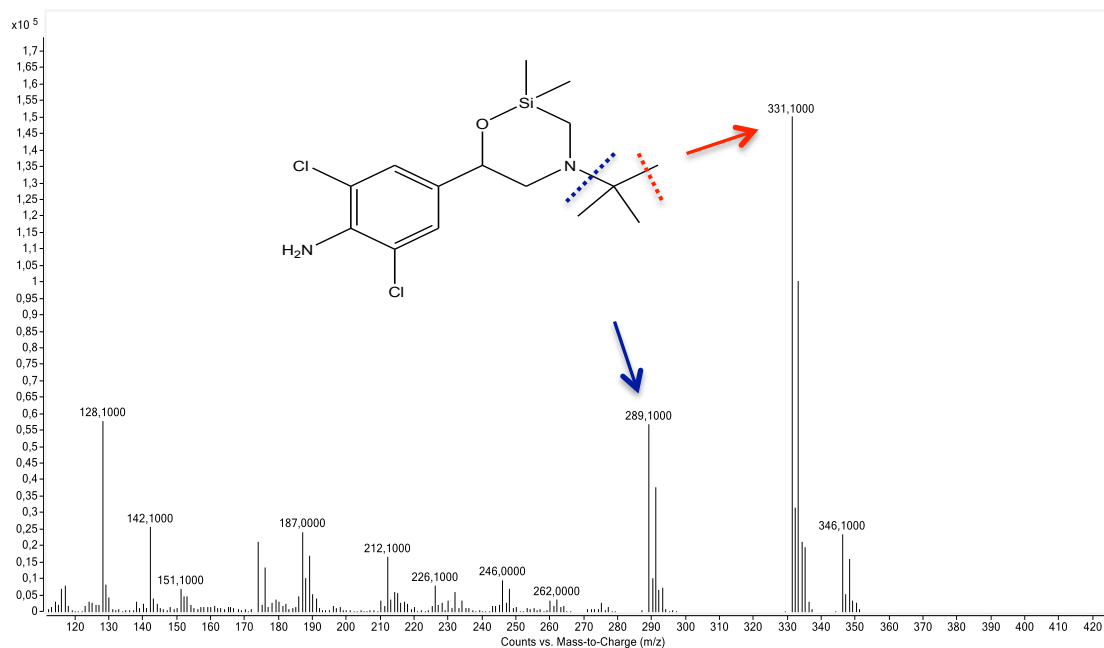
**Figura 4.1.** Cromatograma GC-MS de una mezcla de los compuestos de abundancia isotópica natural a una concentración de  $400 \mu\text{g.L}^{-1}$  en modo SCAN. (1=clenproperol, 2=clenbuterol, 3=clenpenterol, 4=brombuterol, 5=terbutalina, 6=salbutamol, 7=clenciclohexerol).

En la Figura 4.1 se pueden observar los picos cromatográficos correspondientes a la elución de los 7 agonistas presentes en la muestra. El primer pico cromatográfico corresponde al derivado del clenproperol y su espectro de masas se puede observar en la Figura 4.2, donde además del ión molecular de  $m/z$  332.1, se puede observar el fragmento producido por la pérdida de un grupo metilo y el producido por la pérdida del grupo  $\text{C}_3\text{H}_7$ .



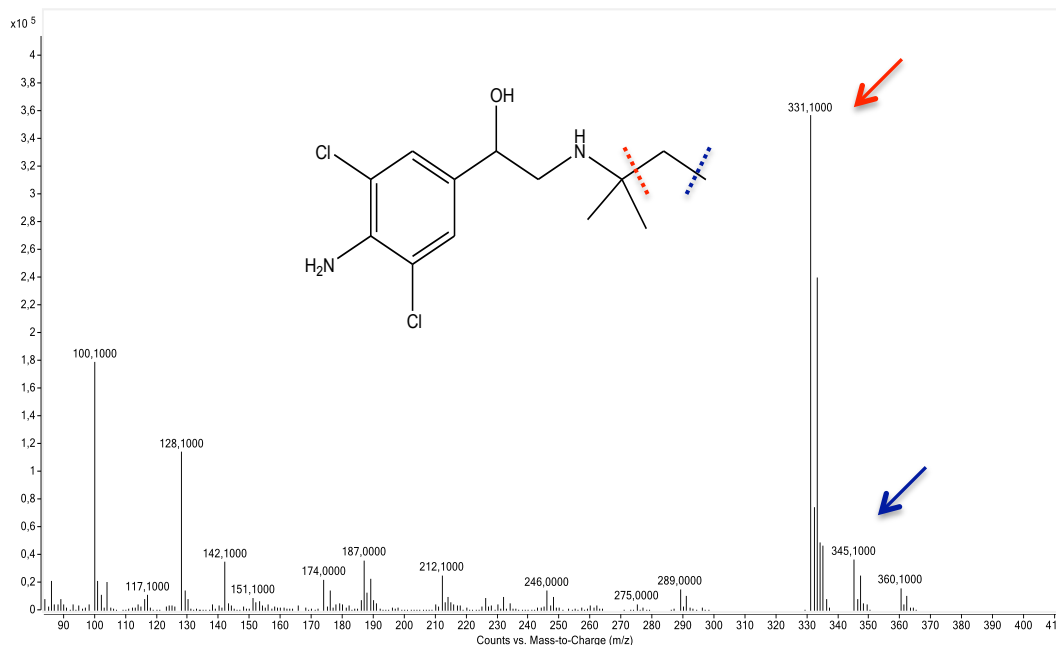
**Figura 4.2.** Espectro de masas obtenido en modo SCAN y estructura del clenproperol derivatizado.

El segundo pico cromatográfico corresponde al derivado del clenbuterol y en la Figura 4.3 se puede observar tanto el espectro del ión molecular  $m/z$  346.1, como el de sus fragmentos producidos tras la pérdida del grupo metilo y del grupo ter-butilo.

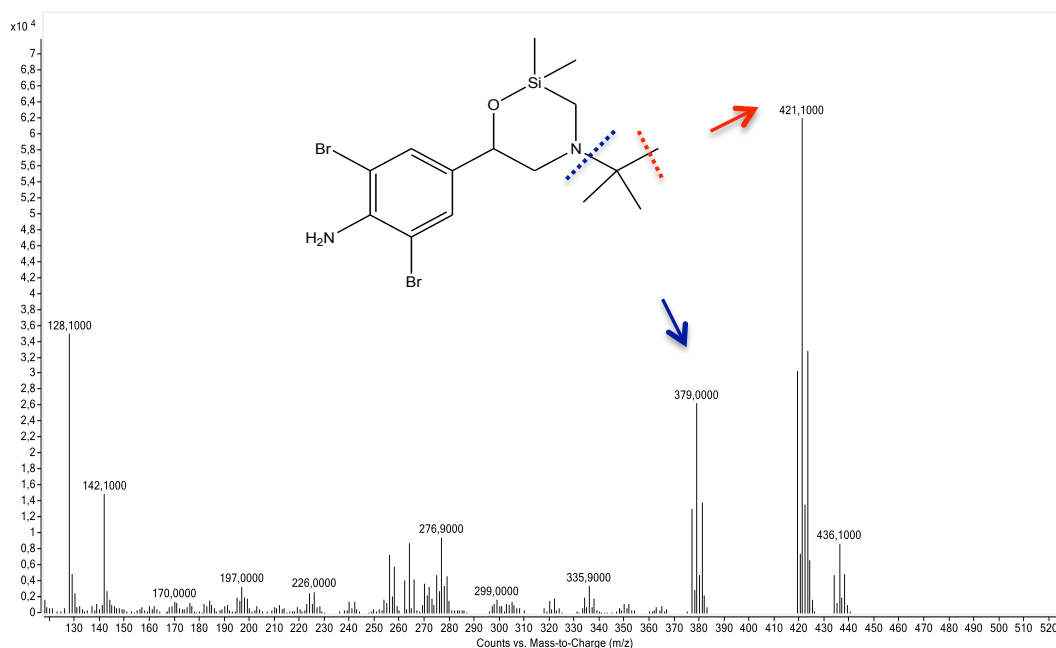


**Figura 4.3.** Espectro de masas obtenido en modo SCAN y estructura del clenbuterol derivatizado.

El tercer pico corresponde al derivado del clenpenterol y su espectro de masas se puede observar en la Figura 4.4. El siguiente compuesto en eluir es el derivado del brombuterol  $m/z$  436.1 con sus correspondientes fragmentos  $m/z$  421.1 y  $m/z$  379, tal como se puede observar en la Figura 4.5.



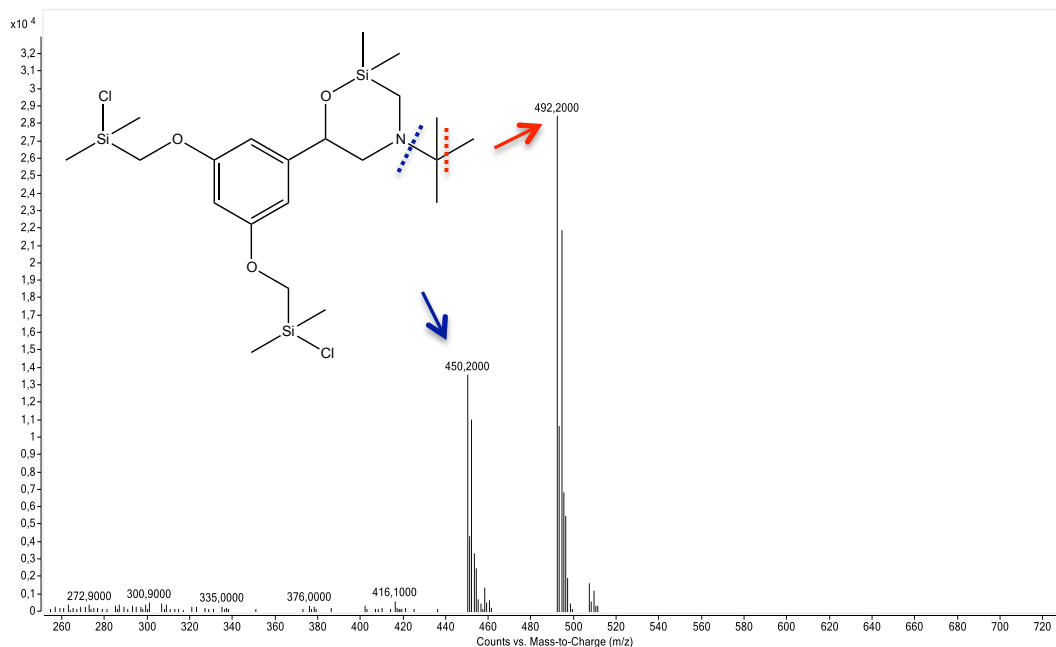
**Figura 4.4.** Espectro de masas obtenido en modo SCAN y estructura del clenpenterol derivatizado..



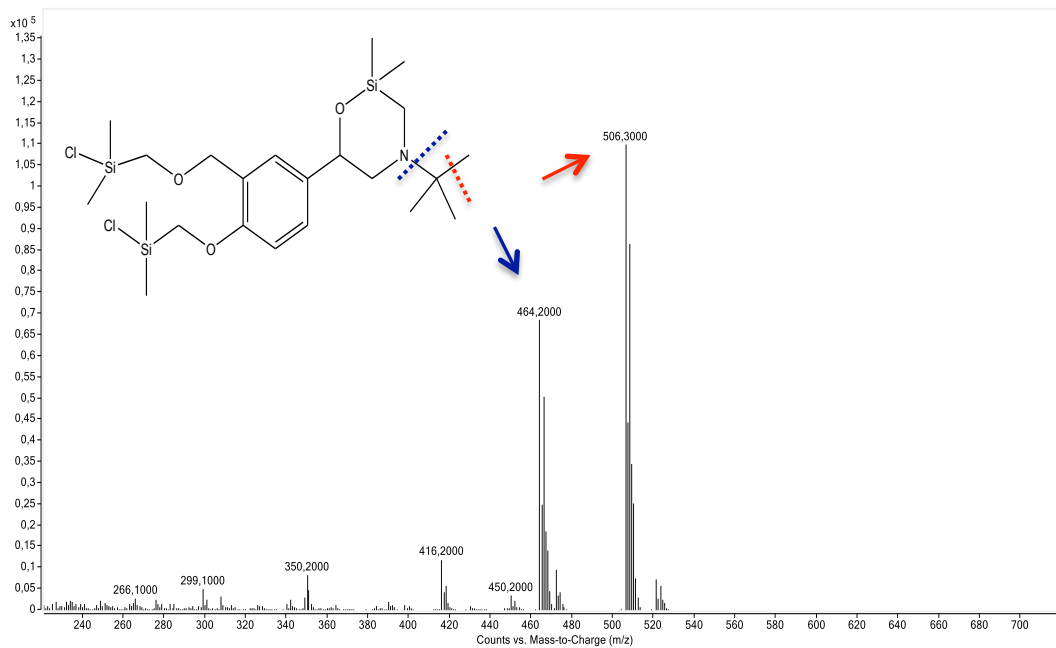
**Figura 4.5.** Espectro de masas obtenido en modo SCAN y estructura del brombuterol derivatizado..



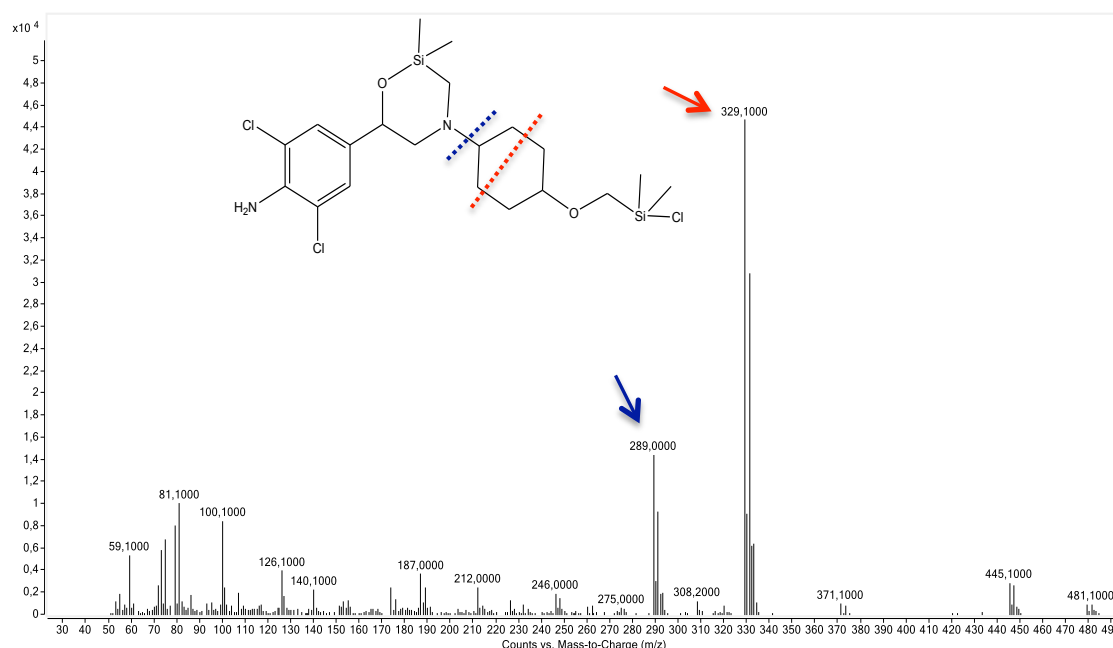
Posteriormente eluyen la terbutalina, el salbutamol y el clenbutolol, cuyos correspondientes espectros de masas se pueden observar en la Figura 4.6, Figura 4.7 y Figura 4.8, respectivamente.



**Figura 4.6.** Espectro de masas obtenido en modo SCAN y estructura de la terbutalina derivatizada..



**Figura 4.7.** Espectro de masas obtenido en modo SCAN y estructura del salbutamol derivatizado.



**Figura 4.8.** Espectro de masas obtenido en modo SCAN y estructura del clenclorhexerol derivatizado..

Los tiempos de retención de dichos compuestos bajo las condiciones experimentales recogidas en las Tablas 3.1 y 3.2 se muestran en la Tabla 4.1.

**Tabla 4.1.** Tiempo de retención de los compuestos formados tras la derivatización de los  $\beta$ -agonistas, en los dos equipos de GC-MS utilizados.

Derivado del $\beta$ -agonista:	Tiempo de retención (min)	
	Equipo Agilent 6890N-5975B.	Equipo Agilent 7890A-Serie 7000 QqQ.
<b>Clenproperol</b>	14,02	14,33
<b>Clenbuterol</b>	14,29	14,61
<b>Clenpenterol</b>	14,99	15,31
<b>Brombuterol</b>	15,35	15,70
<b>Terbutalina</b>	16,31	16,71
<b>Salbutamol</b>	16,91	17,28
<b>Clenciclorhexerol</b>	19,81	20,54

Una vez identificados los compuestos, se desarrolló el método SIM que se utilizará para el estudio de la fragmentación de dichos iones en la fuente de ionización y para los análisis de las muestras realizadas con posterioridad. Para ello se seleccionaron las masas correspondientes al clúster más abundante de cada uno de los compuestos, tal como aparece recogido en la Tabla 4.2.

**Tabla 4.2.** *Relaciones m/z de los iones detectados en SIM para los compuestos formados tras la derivatización de los  $\beta$ -agonistas.*

Derivado del $\beta$ -agonista:	<b>m/z de los iones detectados en modo SIM.</b>
<b>Clenproperol</b>	315.1-324.1
<b>Clenbuterol</b>	329.1-338.1
<b>Clenpenterol</b>	329.1-338.1
<b>Brombuterol</b>	417.1-426.1
<b>Terbutalina</b>	490.2-499.2
<b>Salbutamol</b>	504.2-513.2
<b>Clenciclohexerol</b>	327.1-336.1

#### 4.2. ESTUDIO DE LA FRAGMENTACIÓN DE LOS $\beta$ -AGONISTAS EN LA FUENTE DE IONIZACIÓN ELECTRÓNICA.

Para el estudio de la fragmentación de los  $\beta$ -agonistas en la fuente de ionización electrónica se preparó una disolución de aproximadamente  $1 \mu\text{g g}^{-1}$  de los 7 agonistas objeto de estudio a partir de los patrones de cada uno de ellos, tanto naturales como marcados isotópicamente. Se derivatizaron  $300 \mu\text{l}$  de cada una de estas disoluciones según el procedimiento descrito con anterioridad (Figura 3.2), se inyectaron por quintuplicado en el GC-MS bajo las condiciones descritas en la Tabla 3.1. y aplicando la ecuación [12] se obtuvieron los resultados mostrados en la Tabla 4.3.

**Tabla 4.3.** Factores de fragmentación de los clústeres del fragmento molecular más abundante de cada uno de los  $\beta$ -agonistas objeto de estudio, resultantes de su ionización en la fuente de ionización electrónica.

COMPUESTO		FRAGMENTO	(M-15) <sup>+</sup>	M-H <sup>+</sup>
<b>Clenproperol</b>	Natural	C <sub>13</sub> H <sub>19</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Si <sup>+</sup> (m/z=317.1)	0.9920±0.0013	0.0121±0.0010
	<sup>13</sup> C	<sup>13</sup> C C <sub>12</sub> H <sub>19</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Si <sup>+</sup> (m/z=318.1)	0.9933±0.0083	0.0200±0.0083
<b>Clenbuterol</b>	Natural	C <sub>14</sub> H <sub>21</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Si <sup>+</sup> (m/z=331.1)	0.9880±0.0015	0.0125±0.0003
	<sup>13</sup> C	<sup>13</sup> C C <sub>13</sub> H <sub>21</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Si <sup>+</sup> (m/z=332.1)	0.9547±0.0082	0.0378±0.0082
<b>Clenpenterol</b>	Natural	C <sub>14</sub> H <sub>21</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Si <sup>+</sup> (m/z=331.1)	0.9844±0.0012	0.0153±0.0007
	<sup>13</sup> C	<sup>13</sup> C C <sub>13</sub> H <sub>21</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Si <sup>+</sup> (m/z=332.1)	0.9851±0.0036	0.0148±0.0027
<b>Brombuterol</b>	Natural	C <sub>14</sub> H <sub>21</sub> Br <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Si <sup>+</sup> (m/z=421.1)	0.9942±0.0075	0.0093±0.0073
	<sup>13</sup> C	<sup>13</sup> C C <sub>13</sub> H <sub>21</sub> Br <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Si <sup>+</sup> (m/z=422.1)	1.0042±0.0023	0.0099±0.0015
<b>Terbutalina</b>	Natural	C <sub>20</sub> H <sub>36</sub> Cl <sub>2</sub> NO <sub>3</sub> Si <sub>3</sub> <sup>+</sup> (m/z=492.2)	0.9957±0.0075	0.0097±0.0051
	<sup>13</sup> C	<sup>13</sup> C C <sub>19</sub> H <sub>36</sub> Cl <sub>2</sub> NO <sub>3</sub> Si <sub>3</sub> <sup>+</sup> (m/z=493.2)	0.9764±0.0022	0.0418±0.0040
<b>Salbutamol</b>	Natural	C <sub>21</sub> H <sub>38</sub> Cl <sub>2</sub> NO <sub>3</sub> Si <sub>3</sub> <sup>+</sup> (m/z=506.2)	0.9981±0.0017	0.0069±0.0018
	<sup>13</sup> C	<sup>13</sup> C C <sub>20</sub> H <sub>38</sub> Cl <sub>2</sub> NO <sub>3</sub> Si <sub>3</sub> <sup>+</sup> (m/z=507.2)	0.9971±0.0004	0.0093±0.0004
<b>Clenciclohexerol</b>	Natural	C <sub>14</sub> H <sub>19</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Si <sup>+</sup> (m/z=329.1)	0.9962±0.0021	0.0079±0.0010
	<sup>13</sup> C	<sup>13</sup> C C <sub>13</sub> H <sub>19</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Si <sup>+</sup> (m/z=330.1)	0.9983±0.0042	0.0073±0.0042
<b>Promedio</b>	<b><math>\beta</math>-Agonistas naturales</b>		<b>0.9927±0.0049</b>	<b>0.0105±0.0029</b>
	<b><sup>13</sup>C- <math>\beta</math>-Agonistas</b>		<b>0.9870±0.0169</b>	<b>0.0201±0.1413</b>

En los resultados que se muestran en la Tabla 4.3 se observa que para todos los agonistas objeto de estudio, la contribución mayoritaria es la que pertenece al fragmento molecular y las contribuciones debidas a la pérdida de un átomo de H en la fuente de ionización son prácticamente despreciables, tanto para los compuestos de abundancia natural, como para los marcados isotópicamente, siendo el derivado del clenbuterol marcado isotópicamente el que presenta una menor contribución del ion M<sup>+</sup> en la fuente de ionización (M<sup>+</sup>=0.9547±0.0082).

Una vez calculadas las contribuciones de cada uno de los perfiles isotópicos en el perfil isotópico experimental y teniendo en cuenta los perfiles isotópicos teóricos,

podemos calcular las composición isotópicas “estimadas” de los  $\beta$ -agonistas haciendo uso de la ecuación [13]. Dichas composiciones isotópicas “estimadas” se muestran en la Tabla 4.4.

**Tabla 4.4** Composición isotópica “estimada” para los  $\beta$ -agonistas natural y marcado isotópicamente.

Compuesto	m/z	Composición isotópica “estimada” $\beta$ -Agonistas	
		Natural	Marcado
<b>Clenproperol</b>	316	0,0055	0,0001
	317	0,4504	0,0122
	318	0,0945	0,4509
	319	0,3123	0,0942
	320	0,0617	0,3117
	321	0,0618	0,0591
	322	0,0112	0,0612
	323	0,0026	0,0105
<b>Clenbuterol</b>	330	0,0056	0,0002
	331	0,4452	0,0228
	332	0,0985	0,4364
	333	0,3097	0,1031
	334	0,0644	0,3025
	335	0,0618	0,0618
	336	0,0117	0,0598
	337	0,0027	0,0109
<b>Clenpenterol</b>	330	0,0069	0,0001
	331	0,4445	0,0108
	332	0,0989	0,4474
	333	0,3093	0,0972
	334	0,0643	0,3103
	335	0,0617	0,0618
	336	0,0117	0,0614
	337	0,0027	0,0111
<b>Brombuterol</b>	418	0,0019	0,0000
	419	0,2001	0,0036
	420	0,0463	0,2030
	421	0,4004	0,0481
	422	0,0861	0,4058
	423	0,2113	0,0847
	424	0,0431	0,2134
	425	0,0109	0,0414
<b>Terbutalina</b>	491	0,0034	0,0008
	492	0,3552	0,0337
	493	0,1368	0,3401
	494	0,2887	0,1475
	495	0,1015	0,2741
	496	0,0792	0,0977
	497	0,0240	0,0742
	498	0,0086	0,0221

<b>Salbutamol</b>	506	0,3521	0,0037
	507	0,1388	0,3559
	508	0,2877	0,1372
	509	0,1037	0,2893
	510	0,0797	0,1018
	511	0,0247	0,0794
	512	0,0088	0,0241
	513	0,0020	0,0087
<b>Clenciclohexerol</b>	328	0,0035	0,0000
	329	0,4470	0,0069
	330	0,0974	0,4494
	331	0,3109	0,0950
	332	0,0644	0,3117
	333	0,0620	0,0615
	334	0,0118	0,0617
	335	0,0027	0,0111

#### 4.3. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LOS PATRONES DE LOS $\beta$ -AGONISTAS POR DILUCIÓN ISOTÓPICA INVERSA.

Para poder cuantificar la concentración de los  $\beta$ -agonistas en muestras reales, es necesario conocer con exactitud la concentración de los patrones marcados isotópicamente. Para ello, a partir de disoluciones de  $1 \mu\text{g g}^{-1}$  de los  $\beta$ -agonistas, se prepararon 4 nuevas disoluciones, añadiendo a cada vial 300  $\mu\text{L}$  de la disolución de  $\beta$ -agonistas de abundancia natural y 300  $\mu\text{L}$  de la disolución de  $\beta$ -agonistas de abundancia enriquecida, (controladas gravimétricamente para evitar errores). Se derivatizaron según el procedimiento descrito con anterioridad (Figura 3.2) y se inyectaron por triplicado en el GC-MS bajo las condiciones descritas en la Tabla 3.1.

La Dilución isotópica inversa consiste en aplicar el concepto de la dilución isotópica para calcular la concentración de los patrones enriquecidos a partir de los patrones de abundancia isotópica natural, de concentración conocida. Para ello, se utilizaron las composiciones isotópicas estimadas calculadas en el apartado anterior y se aplicó la ecuación [11] siendo la incógnita, en este caso, la concentración del trazador. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 4.5.

**Tabla 4.5.** Concentración de los patrones de  $^{13}\text{C}$ - $\beta$ -agonistas obtenidas por dilución isotópica inversa.

Compuesto derivado del $\beta$ -agonista:	Concentración experimental $^{13}\text{C}$ - $\beta$ -agonistas. ( $\mu\text{g/g}$ )
<b>Clenproperol</b>	11.98 $\pm$ 0.10
<b>Clenbuterol</b>	3.08 $\pm$ 0.08
<b>Clenpenterol</b>	7.72 $\pm$ 0.11
<b>Brombuterol</b>	6.95 $\pm$ 0.07
<b>Terbutalina</b>	8.94 $\pm$ 0.01
<b>Salbutamol</b>	14.39 $\pm$ 0.10
<b>Clenciclohexerol</b>	594.98 $\pm$ 5.17

#### 4.4. ESTUDIOS DE RECUPERACIÓN DE $\beta$ -AGONISTAS EN MUESTRAS DE AGUA Y ORINA.

##### 4.4.1. Determinación de los $\beta$ -agonistas en muestras de agua utilizando el equipo GC-MS Agilent 6890N-Agilent 5975B.

Para la determinación de compuestos orgánicos mediante dilución isotópica empleando la deconvolución de perfiles isotópicos, se recomienda que la concentración de compuesto marcado isotópicamente en la mezcla muestra trazador sea semejante a la concentración esperada de él. Por tanto, se prepararon dos disoluciones de concentración 0.5 y 5  $\mu\text{g g}^{-1}$  de patrón natural y otras dos de igual concentración de patrón marcado, con el objetivo de que al añadir 100 mg de cada una de estas disoluciones a los 10 g de agua, se alcancen concentraciones de 50 y 0.5  $\text{ng g}^{-1}$  (ppb), respectivamente, que son los niveles de concentración objeto de estudio. Una vez realizadas dichas disoluciones, se prepararon 3 muestras de cada nivel de concentración según el procedimiento descrito en el apartado 3.3.4 y se inyectaron por triplicado en el equipo GC-Agilent 6890N-Agilent 5975B bajo las condiciones descritas en la Tabla 3.1. También se realizaron tres blancos que fueron inyectados en dicho equipo.

Tras calcular la relación de fracciones molares mediante la ecuación [9] se calculó la concentración de los  $\beta$ -agonistas presentes en dichas muestras mediante la ecuación [11]. La concentración obtenida experimentalmente y la concentración teórica se emplearon en el cálculo de las respectivas recuperaciones. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.4 para los niveles de concentración de 50  $\text{ng g}^{-1}$ , en la Tabla

4.5 para los niveles de  $5 \text{ ng g}^{-1}$  y la Tabla 4.6 muestra los valores correspondientes al blanco.

**Tabla 4.4.** Recuperaciones obtenidas para varios  $\beta$ -agonistas en muestras de agua a una concentración de  $50 \text{ ng g}^{-1}$  utilizando el equipo GC-MS Agilent 6890N-Agilent 5975B.

COMPUESTO	Concentración teórica ( $\text{ng g}^{-1}$ )	Concentración experimental ( $\text{ng g}^{-1}$ )	Recuperación (%)	Recuperación promedio (%)	RSD (%)
<b>Clenproperol</b>	53,01	$50,06 \pm 0,15$	$94,44 \pm 0,29$	94,04 $\pm$ 0,35	0,37
	53,66	$50,31 \pm 0,12$	$93,76 \pm 0,22$		
	49,77	$46,75 \pm 0,39$	$93,94 \pm 0,78$		
<b>Clenpenterol</b>	45,39	$43,47 \pm 0,13$	$95,78 \pm 0,29$	95,17 $\pm$ 0,95	1,00
	45,94	$43,22 \pm 0,19$	$94,07 \pm 0,42$		
	42,61	$40,76 \pm 0,28$	$95,65 \pm 0,65$		
<b>Clenciclohexerol</b>	58,70	$53,14 \pm 0,22$	$90,52 \pm 0,37$	89,24 $\pm$ 1,12	1,25
	59,42	$52,76 \pm 0,73$	$88,78 \pm 1,22$		
	55,12	$48,74 \pm 1,23$	$88,42 \pm 2,24$		
<b>Clenbuterol</b>	54,33	$55,27 \pm 0,33$	$101,74 \pm 0,60$	103,06 $\pm$ 1,76	1,70
	54,99	$56,30 \pm 0,52$	$102,37 \pm 0,94$		
	51,01	$53,58 \pm 0,43$	$105,05 \pm 0,84$		
<b>Brombuterol</b>	57,35	$54,23 \pm 0,23$	$94,57 \pm 0,40$	94,27 $\pm$ 0,77	0,82
	58,05	$54,21 \pm 0,43$	$93,39 \pm 0,75$		
	53,84	$51,07 \pm 1,42$	$94,85 \pm 2,64$		

**Tabla 4.5.** Recuperaciones obtenidas para varios  $\beta$ -agonistas en muestras de agua a una concentración de  $5 \text{ ng g}^{-1}$  utilizando el equipo GC-MS Agilent 6890N-Agilent 5975B.

COMPUESTO	Concentración teórica ( $\text{ng g}^{-1}$ )	Concentración experimental ( $\text{ng g}^{-1}$ )	Recuperación (%)	Recuperación promedio (%)	RSD (%)
<b>Clenproperol</b>	5,41	$5,12 \pm 0,07$	$94,58 \pm 1,36$	95,56 $\pm$ 1,58	1,66
	5,45	$5,30 \pm 0,10$	$97,38 \pm 1,84$		
	5,03	$4,77 \pm 0,10$	$94,71 \pm 1,92$		
<b>Clenpenterol</b>	4,64	$4,57 \pm 0,02$	$98,70 \pm 0,53$	93,28 $\pm$ 8,10	8,69
	4,66	$4,53 \pm 0,11$	$97,17 \pm 2,36$		
	4,31	$3,62 \pm 0,17$	$83,96 \pm 3,92$		
<b>Clenciclohexerol</b>	5,99	$5,48 \pm 0,20$	$91,34 \pm 3,26$	87,68 $\pm$ 5,84	6,66
	6,03	$5,47 \pm 0,16$	$90,75 \pm 2,68$		
	5,57	$4,51 \pm 0,68$	$80,95 \pm 12,13$		
<b>Clenbuterol</b>	5,55	$6,51 \pm 0,12$	$117,33 \pm 2,13$	117,30 $\pm$ 5,75	4,90
	5,58	$6,87 \pm 0,02$	$123,05 \pm 0,42$		
	5,16	$5,75 \pm 0,21$	$111,54 \pm 4,13$		
<b>Brombuterol</b>	5,86	$5,97 \pm 0,15$	$101,95 \pm 2,60$	101,09 $\pm$ 3,02	2,99
	5,89	$5,76 \pm 0,21$	$97,73 \pm 3,55$		
	5,44	$5,64 \pm 0,32$	$103,58 \pm 5,92$		



**Tabla 4.6.** Resultados obtenidos para el blanco de reactivos en la cuantificación de los  $\beta$ -agonistas en agua.

COMPUESTO	Concentración (ng g <sup>-1</sup> )
<b>Clenproperol</b>	0,01±0,17
<b>Clenpenterol</b>	0,81±2,08
<b>Clenciclohexerol</b>	No detectado
<b>Clenbuterol</b>	No detectado
<b>Brombuterol</b>	0,03±0,03

Como se puede observar en la Tabla 4.4 los valores de recuperación obtenidos a un nivel de 50 ng g<sup>-1</sup> están entre 89 y 95% con valores de RSD inferiores al 2%. Como muestra la Tabla 4.5, al disminuir diez veces el nivel de concentración en las muestras el rango de recuperaciones obtenido está entre 87 y 101% a excepción del clenbuterol, donde se obtienen valores inusualmente altos. Las precisiones obtenidas al nivel de 5 ng g<sup>-1</sup> son sensiblemente peores debido la proximidad de las señales con el límite de detección del método.

#### 4.4.2. Determinación de los $\beta$ -agonistas en muestras de orina utilizando el equipo GC-MS Agilent 6890N-Agilent 5975B.

Para la determinación de los  $\beta$ -agonistas en muestras de orina, también se prepararon 3 muestras para cada nivel de concentración siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.3.5 y se inyectaron por triplicado en el equipo GC-MS Agilent 6890N-Agilent 5975B, junto con tres blancos, bajo las condiciones descritas en la Tabla 3.1. Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 4.7, 4.8 y 4.9, respectivamente.

**Tabla 4.7.** Recuperaciones obtenidas para varios  $\beta$ -agonistas en muestras de orina a una concentración de  $50 \text{ ng g}^{-1}$  utilizando el equipo GC-MS Agilent 6890N-Agilent 5975B.

COMPUESTO	Nivel Concentración ( $\text{ng g}^{-1}$ )	Concentración experimental ( $\text{ng g}^{-1}$ )	Recuperación (%)	Recuperación (%)	RSD
<b>Clenproperol</b>	54,13	51,84 $\pm$ 2,16	95,78 $\pm$ 3,99	94,87 $\pm$ 2,55	2,69
	77,58	75,13 $\pm$ 0,37	96,84 $\pm$ 0,48		
	65,20	59,97 $\pm$ 0,07	91,98 $\pm$ 0,10		
<b>Clenpenterol</b>	46,35	41,94 $\pm$ 0,20	90,49 $\pm$ 0,43	91,09 $\pm$ 0,92	1,01
	66,43	61,21 $\pm$ 0,55	92,15 $\pm$ 0,82		
	55,82	50,60 $\pm$ 0,78	90,64 $\pm$ 1,40		
<b>Clenciclohexerol</b>	59,94	55,51 $\pm$ 3,24	92,60 $\pm$ 5,40	97,27 $\pm$ 4,47	4,60
	85,92	83,95 $\pm$ 1,85	97,70 $\pm$ 2,16		
	72,20	73,29 $\pm$ 2,70	101,51 $\pm$ 3,74		
<b>Clenbuterol</b>	55,47	53,21 $\pm$ 0,60	95,92 $\pm$ 1,08	111,22 $\pm$ 20,14	18,11
	79,51	82,46 $\pm$ 1,41	103,71 $\pm$ 1,77		
	66,82	89,56 $\pm$ 4,22	134,04 $\pm$ 6,31		
<b>Brombuterol</b>	58,56	50,99 $\pm$ 1,58	87,07 $\pm$ 2,71	92,43 $\pm$ 4,84	5,23
	83,93	78,70 $\pm$ 1,02	93,77 $\pm$ 1,21		
	70,53	68,03 $\pm$ 1,93	96,46 $\pm$ 2,74		

**Tabla 4.8.** Recuperaciones obtenidas para varios  $\beta$ -agonistas en muestras de orina a una concentración de  $5 \text{ ng g}^{-1}$  utilizando el equipo GC-MS Agilent 6890N-Agilent 5975B.

COMPUESTO	Nivel Concentración ( $\text{ng g}^{-1}$ )	Concentración Experimental ( $\text{ng g}^{-1}$ )	Recuperación (%)	Recuperación (%)	RSD
<b>Clenproperol</b>	6,63	7,88 $\pm$ 0,06	118,71 $\pm$ 0,98	105,38 $\pm$ 14,39	13,66
	5,69	5,13 $\pm$ 0,08	90,12 $\pm$ 1,34		
	6,83	7,33 $\pm$ 0,07	107,31 $\pm$ 0,98		
<b>Clenpenterol</b>	5,68	5,58 $\pm$ 0,07	98,28 $\pm$ 1,25	97,02 $\pm$ 1,27	1,31
	4,87	4,73 $\pm$ 0,11	97,04 $\pm$ 2,31		
	5,85	5,60 $\pm$ 0,13	95,74 $\pm$ 2,30		
<b>Clenciclohexerol</b>	7,35	6,02 $\pm$ 0,22	81,89 $\pm$ 3,03	80,12 $\pm$ 6,33	7,90
	6,30	5,38 $\pm$ 0,26	85,38 $\pm$ 4,13		
	7,56	5,53 $\pm$ 0,29	73,10 $\pm$ 3,86		
<b>Clenbuterol</b>	6,80	6,95 $\pm$ 0,17	102,21 $\pm$ 2,48	104,64 $\pm$ 3,63	3,47
	5,83	6,00 $\pm$ 0,07	102,89 $\pm$ 1,13		
	7,00	7,61 $\pm$ 0,09	108,82 $\pm$ 1,25		
<b>Brombuterol</b>	7,18	7,10 $\pm$ 0,27	98,93 $\pm$ 3,82	91,83 $\pm$ 6,23	6,79
	6,16	5,50 $\pm$ 0,75	89,30 $\pm$ 12,13		
	7,39	6,45 $\pm$ 1,43	87,26 $\pm$ 19,32		

**Tabla 4.9.** *Resultados obtenidos para el blanco de reactivos en la cuantificación de los  $\beta$ -agonistas en orina utilizando el equipo GC-MS Agilent 6890N-Agilent 5975B.*

<b>COMPUESTO</b>	<b>Concentración (ng g<sup>-1</sup>)</b>
<b>Clenproperol</b>	0,29±1,06
<b>Clenpenterol</b>	no detectado
<b>Clencyclohexerol</b>	no detectado
<b>Clenbuterol</b>	no detectado
<b>Brombuterol</b>	0,65±1,31

Como se puede observar en las Tablas 4.7 y 4.8, para ambas concentraciones se obtienen recuperaciones entorno al 95 % y al igual que sucedía con las muestras de agua, las desviaciones estándar medias son mayores para la concentración de 5 ng g<sup>-1</sup> que para la de 50 ng g<sup>-1</sup>. Además, los valores que presentan dichas desviaciones son mayores para las muestras en orina que para las muestras en agua, debido a que la presencia de la matriz hace más probable la aparición de interferencias espectrales. Cabe destacar, que la recuperación de los  $\beta$ -agonistas salbutamol y terbutalina, tanto en agua como en orina, dio lugar a valores muy bajos de recuperación, entre un 5 y 32% y en muchos casos, simplemente no fue posible la integración de los picos cromatográficos, por lo que el método no es adecuado para el análisis de estos compuestos.

*4.4.3. Determinación de los  $\beta$ -agonistas en muestras de agua y orina utilizando el equipo GC-MS Agilent 7890A-Serie 7000 QqQ.*

Las mismas muestras analizadas en el equipo GC-MS Agilent 6890N-Agilent 5975B fueron analizadas en el equipo Agilent 7890A-Serie 7000 QqQ, bajo las condiciones descritas en la Tabla 3.2, obteniéndose los resultados mostrados en las Tablas 4.10, 4.11, 4.12 y 4.13, para las muestras de agua y orina, respectivamente.

**Tabla 4.10.** Recuperaciones obtenidas para varios  $\beta$ -agonistas en muestras de agua a una concentración de  $50 \text{ ng g}^{-1}$  utilizando el Agilent 7890A-Serie 7000 QqQ.

COMPUESTO	Concentración teórica ( $\text{ng g}^{-1}$ )	Concentración experimental ( $\text{ng g}^{-1}$ )	Recuperación (%)	Recuperación promedio (%)	RSD (%)
<b>Clenproperol</b>	53,01	$53,87 \pm 1,77$	$101,62 \pm 3,34$	$98,81 \pm 2,44$	2,47
	53,66	$52,31 \pm 0,05$	$97,49 \pm 0,09$		
	49,77	$48,43 \pm 0,06$	$97,31 \pm 0,12$		
<b>Clenpenterol</b>	45,39	$44,98 \pm 0,86$	$99,10 \pm 1,89$	$98,60 \pm 0,44$	0,45
	45,94	$45,16 \pm 0,09$	$98,30 \pm 0,19$		
	42,61	$41,93 \pm 0,04$	$98,38 \pm 0,10$		
<b>Clenciclohexerol</b>	58,70	$58,65 \pm 2,41$	$99,90 \pm 4,10$	$94,05 \pm 5,46$	5,80
	59,42	$55,34 \pm 0,85$	$93,13 \pm 1,43$		
	55,12	$49,11 \pm 0,50$	$89,11 \pm 0,91$		
<b>Clenbuterol</b>	54,33	$56,16 \pm 0,66$	$103,38 \pm 1,22$	$102,82 \pm 0,48$	0,47
	54,99	$56,37 \pm 0,16$	$102,51 \pm 0,28$		
	51,01	$52,31 \pm 0,01$	$102,56 \pm 0,01$		
<b>Brombuterol</b>	57,35	$56,29 \pm 0,69$	$98,16 \pm 1,20$	$97,27 \pm 0,78$	0,80
	58,05	$56,12 \pm 0,17$	$96,69 \pm 0,29$		
	53,84	$52,21 \pm 0,24$	$96,96 \pm 0,44$		

**Tabla 4.11.** Recuperaciones obtenidas para varios  $\beta$ -agonistas en muestras de agua a una concentración de  $5 \text{ ng g}^{-1}$  utilizando el equipo GC-MS Agilent 7890A-Serie 7000 QqQ.

COMPUESTO	Concentración teórica ( $\text{ng g}^{-1}$ )	Concentración experimental ( $\text{ng g}^{-1}$ )	Recuperación (%)	Recuperación promedio (%)	RSD (%)
<b>Clenproperol</b>	5,41	$6,43 \pm 0,52$	$118,71 \pm 9,61$	$107,46 \pm 9,86$	9,18
	5,45	5,63	103,32		
	5,03	5,05	100,34		
<b>Clenpenterol</b>	4,64	$5,55 \pm 0,46$	$119,83 \pm 9,85$	$113,63 \pm 6,98$	6,15
	4,66	4,95	106,06		
	4,31	4,95	114,99		
<b>Clenciclohexerol</b>	5,99	$6,68 \pm 0,76$	$111,37 \pm 12,71$	$103,89 \pm 6,48$	6,23
	6,03	6,03	99,98		
	5,57	5,59	100,33		
<b>Clenbuterol</b>	5,55	$7,01 \pm 0,46$	$126,33 \pm 8,22$	$121,13 \pm 7,83$	6,47
	5,58	6,26	112,12		
	5,16	6,44	124,95		
<b>Brombuterol</b>	5,86	$6,65 \pm 0,50$	$113,63 \pm 8,55$	$108,38 \pm 6,06$	5,59
	5,89	6,00	101,75		
	5,44	5,98	109,76		

**Tabla 4.12.** Recuperaciones obtenidas para varios  $\beta$ -agonistas en muestras de orina a una concentración de  $50 \text{ ng g}^{-1}$  utilizando el equipo GC-MS Agilent 7890A-Serie 7000 QqQ.

COMPUESTO	Concentración teórica ( $\text{ng g}^{-1}$ )	Concentración experimental ( $\text{ng g}^{-1}$ )	Recuperación (%)	Recuperación promedio (%)	RSD (%)
<b>Clenproperol</b>	54,13	$52,61 \pm 0,81$	$97,19 \pm 1,49$	$97,57 \pm 1,43$	1,46
	77,58	$76,92 \pm 0,37$	$99,15 \pm 0,48$		
	65,20	62,83	96,37		
<b>Clenpenterol</b>	46,35	$44,01 \pm 2,02$	$94,97 \pm 4,36$	$95,52 \pm 3,36$	3,51
	66,43	$65,84 \pm 0,32$	$99,12 \pm 0,48$		
	55,82	51,62	92,48		
<b>Clenciclohexerol</b>	59,94	$61,18 \pm 4,32$	$102,06 \pm 7,21$	$99,20 \pm 10,91$	11,00
	85,92	$93,12 \pm 0,91$	$108,38 \pm 1,06$		
	72,20	62,92	87,14		
<b>Clenbuterol</b>	55,47	$56,86 \pm 1,53$	$102,50 \pm 2,77$	$103,59 \pm 3,15$	3,04
	79,51	$85,19 \pm 1,46$	$107,14 \pm 1,83$		
	66,82	67,58	101,14		
<b>Brombuterol</b>	58,56	$54,67 \pm 2,50$	$93,36 \pm 4,27$	$95,86 \pm 3,02$	3,15
	83,93	$83,27 \pm 1,29$	$99,22 \pm 1,53$		
	70,53	67,00	95,00		

**Tabla 4.13.** Recuperaciones obtenidas para varios  $\beta$ -agonistas en muestras de orina a una concentración de  $5 \text{ ng g}^{-1}$  utilizando el equipo GC-MS Agilent 7890A-Serie 7000 QqQ.

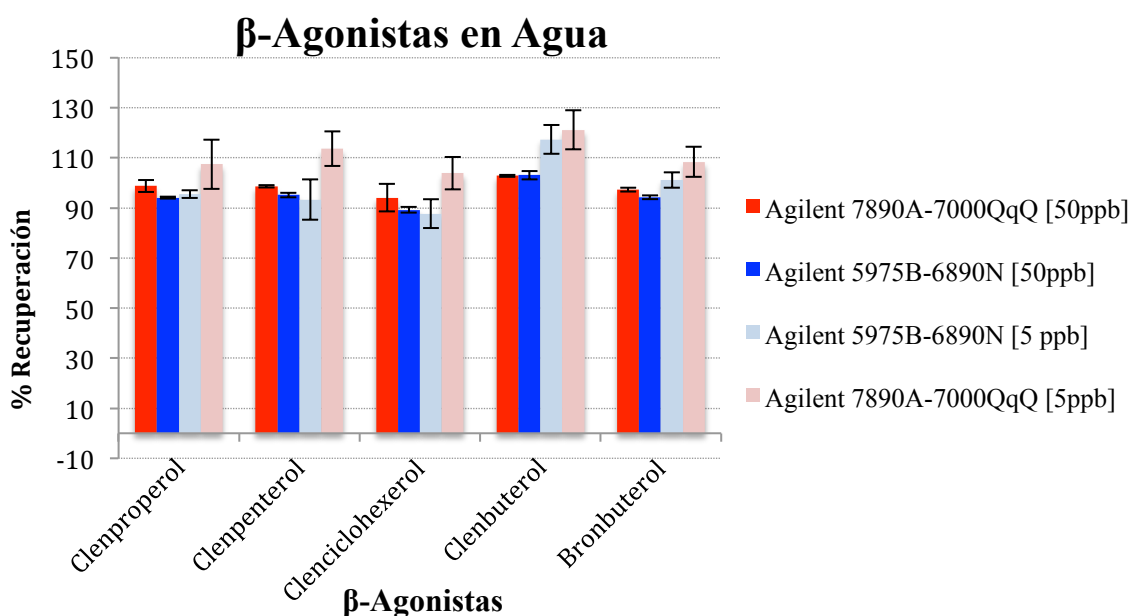
COMPUESTO	Concentración teórica ( $\text{ng g}^{-1}$ )	Concentración experimental ( $\text{ng g}^{-1}$ )	Recuperación (%)	Recuperación promedio (%)	RSD (%)
<b>Clenproperol</b>	6,63	5,12	77,24	$90,99 \pm 12,00$	13,19
	5,69	$5,48 \pm 0,04$	$96,31 \pm 0,65$		
	6,83	$6,79 \pm 0,08$	$99,41 \pm 1,14$		
<b>Clenpenterol</b>	5,68	5,45	96,00	$103,61 \pm 6,75$	6,51
	4,87	$5,16 \pm 0,04$	$105,96 \pm 0,76$		
	5,85	$6,36 \pm 0,12$	$108,86 \pm 2,14$		
<b>Clenciclohexerol</b>	7,35	6,26	99,3	$129,27 \pm 42,38$	32,78
	6,30	$6,26 \pm 0,19$	$99,3 \pm 3,10$		
	7,56	$12,04 \pm 2,17$	$159,24 \pm 28,8$		
<b>Clenbuterol</b>	6,80	6,90	101,55	$110,92 \pm 8,49$	7,65
	5,83	$6,60 \pm 0,03$	$113,13 \pm 0,50$		
	7,00	$8,26 \pm 0,12$	$118,09 \pm 1,71$		
<b>Brombuterol</b>	7,18	6,50	90,57	$95,72 \pm 4,67$	4,88
	6,16	$6,14 \pm 0,18$	$99,69 \pm 2,94$		
	7,39	$7,16 \pm 0,24$	$96,92 \pm 3,28$		

Al igual que sucedía en el caso anterior, el salbutamol y la terbutalina no se pudieron cuantificar usando este método de análisis, ya que no ha sido posible la

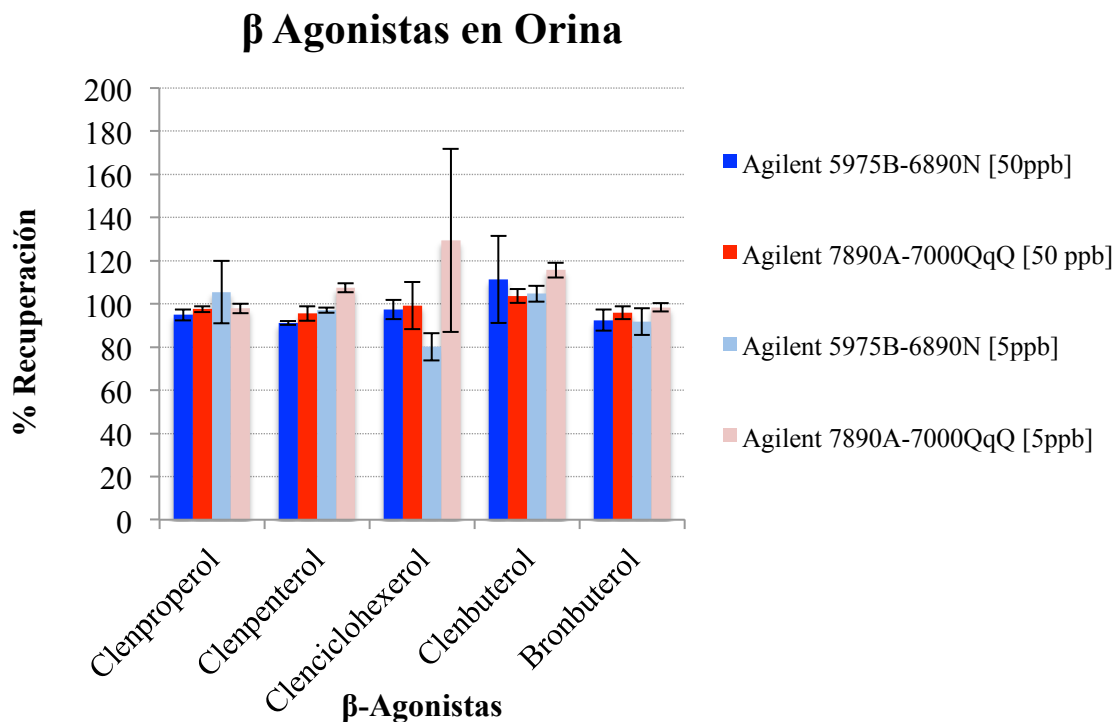
integración de sus picos cromatográficos. Sin embargo no es un problema de sensibilidad del equipo, sino más bien del procedimiento experimental empleado, que demuestra ser válido para compuestos como el clenbuterol, clenproperol y clenpenterol, es decir, compuestos tipo anilina, pero sin embargo, no lo es tanto para compuestos tipo fenol, como la terbutalina o el salbutamol, que poseen una mayor polaridad.

Tanto en el caso de las muestras analizadas en agua, como en orina, cuando la concentración es de  $50 \text{ ng g}^{-1}$ , se obtienen recuperaciones entre el 94-103%, mientras que al disminuir la concentración 10 veces, dichas recuperaciones aumentan debido a la aproximación al límite de detección del método. En el caso del clenclorhexerol, se alcanzan recuperaciones anormalmente altas (130%), debido principalmente a la última muestra, por lo que se asume que ha ocurrido una contaminación en dicha muestra, ya que el valor de la recuperación en el equipo anterior era de un 80% .

En la Figura 4.1 y 4.2, se puede observar la recuperación de los  $\beta$ -agonistas utilizando ambos equipos, tanto en la matriz de agua como en la de orina.



**Figura 4.1.** Recuperación de los  $\beta$ -agonistas en agua, para niveles de concentración de 50 y  $5 \text{ ng g}^{-1}$ , utilizando el equipo Agilent 5975B- 6890N y el Agilent 7890A-Serie 7000 QqQ.



**Figura 4.2.** Recuperación de los  $\beta$ -agonistas en orina, para niveles de concentración de 50 y 5  $\text{ng g}^{-1}$ , utilizando el equipo Agilent 5975B- 6890N y el Agilent 7890A-Serie 7000 QqQ.

En ellas se puede observar que para la mayoría de los  $\beta$ -agonistas se alcanzan recuperaciones superiores al 90% tanto para concentraciones de 5  $\text{ng g}^{-1}$  como de 50  $\text{ng g}^{-1}$ , independientemente del equipo utilizado. Lo que constituye una de las ventajas de la dilución isotópica, ya que a pesar de que el Agilent 5975B-6890N, presenta una sensibilidad 100 veces menor que el Agilent 7890A-Serie 7000 QqQ y así lo reflejan las intensidades de los picos obtenidos en sus respectivos SCAN, es capaz de proporcionar valores de recuperación muy similares como por ejemplo 92.43% frente a 95.86% para el brombuterol a 50  $\text{ng g}^{-1}$ .

## *5. CONCLUSIONES.*



De los resultados obtenidos a lo largo de la realización del presente Trabajo fin de Máster, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- La aplicación de la deconvolución de perfiles isotópicos, permite estudiar la fragmentación de los  $\beta$ -Agonistas en la fuente de ionización electrónica y calcular factores de fragmentación tanto para compuestos de abundancia isotópica natural como para compuestos marcados isotópicamente. Se comprobó que los  $\beta$ -Agonistas objeto de estudio en este trabajo presentan fragmentaciones similares siendo la del fragmento molecular la contribución mayoritaria al espectro de masas y las contribuciones debidas a la pérdida de un átomo de H prácticamente despreciables, tanto para los compuestos de abundancia natural como para los marcados isotópicamente.
- Se demostró que, a excepción del cleniclohexerol en orina a  $5 \text{ ng g}^{-1}$  y el clenbuterol en agua a  $5 \text{ ng g}^{-1}$ , la estrategia basada en el marcaje mínimo del compuesto junto con la deconvolución de perfiles isotópicos, proporciona recuperaciones cuantitativas de cinco de los siete  $\beta$ -Agonistas estudiados en agua y orina (entre 89 y 114 %) a dos niveles de concentración ( $5$  y  $50 \text{ ng g}^{-1}$ ) utilizando dos sistemas GC-MS distintos. Los  $\beta$ -Agonistas salbutamol y la terbutalina de mayor polaridad que el resto no pudieron ser determinados debido a su pobre rendimiento de derivatización.

## *6. BIBLIOGRAFÍA.*

## **Bibliografía:**

- [1] Boyd, D., O'Keeffe, M., & Smyth, M. (1996). *Methods for determination of B-Agonist in biological matrices, A review*. Analyst, 121.
- [2] Poletini, A. (1996). *Bioanalysis of B-agonist by hyphenated chromatographic and mass spectrometric techniques, A review*. Journal of Chromatography B, 687, 27-42.
- [3] Ramos, F., Assuncao, C., & Noronha da Silveira, M. (2003). *Control of illegal use of clenbuterol in bovine production*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 32, 311-316.
- [4] Hernández-Carrasquilla. (2000). *Gas chromatography-mass spectrometry analysis of B-agonists in bovine retina*. Analytica Chimica Acta, 408, 285-290.
- [5] Regiart, M., Fernández-Baldo, M., Bertolino, F., & Raba, J. (2013). *Ultra sensitive microfluidic immunosensor for determination of clenbuterol in bovine hair samples*. Biosensors and Bioelectronics, 41, 211-217.
- [6] Martín, J. M. *Cromatografía de Gases*.(CSIC).
- [7] Rodríguez-González, P., Marchante Gayón, J., García Alonso, J., & Sanz-Medel, A. (2005). *Isotope dilution analysis for elemental speciation:A tutorial review*. Spectrochim. Acta B .
- [8] Wieling. (2002). *LC-MS-MS experiences with internal standards*. J.Chromatographia, 55.
- [9] Meija, J., Centineo, G., García Alonso, J., & Sanz-Medel, A. (2005). *Interpretation of butyltin mass spectra using isotope pattern reconstruction for the accurate measurement of isotope ratios from molecular clusters*. J.Mass Spectrom. , 40.
- [10] García-Alonso, J., & Rodriguez, P. (2011). *La dilución isotópica en el análisis de trazas, en Análisis Químico de trazas*. Síntesis.
- [11] Houghton, E., & Dumasia, M. (1991). *Screening and confirmatory analysis of B-agonists, B-antagonists and their metabolites in horse urine by capillary gas chromatography-mass spectrometry*. Journal of Chromatography, 564, 503-513.
- [12] Gonzalez-Antuña, A., Rodriguez-Gonzalez, P., Lavandera, I., Centineo, G., Gotor, V., & García Alonso, J. (2012). *Development of a routine method for simultaneous confirmation and determination of clenbuterol in urine by minimal labeling isotope pattern deconvolution and GC-EI-MS*. Anal. Bioanal. Chem. , 402, 1879-1888.