

# **Informe final de proyecto**

*Desarrollo de técnicas para la determinación de aditivos en piensos*

---

**Centro: NEIKER**

**Participantes: Miriam Pinto (mpinto@neiker.net)  
Joana Larreta**

**Año 2005**

## **Desarrollo de técnicas para la determinación de aditivos en piensos**

El trabajo realizado durante el desarrollo del proyecto “Desarrollo y aplicación de técnicas analíticas para la evaluación y trazabilidad de aditivos y residuos en alimentos para animales” financiado por el Dpto. Agricultura y Pesca del Gobierno Vasco, intentaba poner a punto y optimizar las técnicas de determinación de los aditivos más comunes en alimentos animales, para de esta manera conferir al laboratorio de NEIKER las herramientas necesarias para controlar la seguridad alimentaria desde la base de la misma cadena.

### **Determinación del perfil de esteroides**

#### **1.- Objeto**

Técnica empleada en Neiker para la presencia de colesterol (animal) en piensos de consumo animal.

El objetivo del procedimiento es describir la sistemática utilizada en el Laboratorio de Agrosistemas y Producción Animal de Neiker para la detección de colesterol en piensos (forrajes, materias primas y mezclas de materias primas). Para ello se realiza una extracción ácida con saponificación y derivatización para perfiles de esteroides.

#### **2.- Campo de aplicación**

Se aplica a productos (piensos) de consumo animal en los que se quiera detectar la presencia de colesterol.

#### **3.- Documentación de referencia**

- Referencias a métodos oficiales:  
Official Journal of the European Communities L 257/23.
- Referencias a artículos donde se describen las técnicas:  
J. Toivo et al. 1998  
J. Toivo et al. 2000  
J. Toivo et al. 2001

#### **4.- Controles, Patrones y Reactivos**

Patrones de esteroides:

- Colesterol, colestanol, ergosterol, campesterol, colestane, sitosterol y stigmasterol de la casa comercial SUPELCO.
- Cloroformo (for ultra-trace analysis) ( $\text{CH}_3\text{Cl}_3$ ) pureza de 99% M= 119.38, d= 1.47 SCHARLAU
- Metanol (ACS ISO) ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) pureza de 99.8%, M= 32.04, d= 0.792 PANREAC
- Etanol Absoluto ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ), M= 46.07, d= 0.789 PANREAC
- Acido clorhídrico (HCl) pureza de 37%, M= 36.46, d= 1.19 PANREAC
- n-Hexano ( $\text{C}_6\text{H}_{14}$ ) pureza de 96%, M= 86.18, d= 0.66 SCHARLAU

- Dietil eter (H<sub>2</sub>O max. 0.0075%) (C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>O), 99.5%, M= 74.12, d= 0.71 (Stabilized with aprox. 7 ppm of 2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol) SCHARLAU
- Pyrogallol 99% ACS ALDRICH
- Hidroxido potasico (KOH) 85%, M= 56.11 PANREAC
- Piridina (H<sub>2</sub>O max. 0.01%) (C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N), 99.5%, M= 79.10, d= 0.98 SCHARLAU
- Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamida with 1% of trimethylchlorosilane (BSTFA-TMSC) ALDRICH

## 5.- Materiales y equipos

Para realizar el perfil de esteroides es necesario constar de (Tabla 1)

Tabla 1. Equipos necesarios para la realización de este procedimiento.

<b>Nombre</b>	<b>Descripción</b>
Placa termostática	Regulada a $80 \pm 2$ °C. Calibrada.
Baño de arena	Más o menos a 60°C
Evaporador analítico (Turbo Vap)	Regulado a 40°C con una corriente de nitrógeno regulada para que no haya pérdida de muestra
Micro pipetas	Volúmenes que abarquen el rango 20-1000 µL. Calibradas.
Centrífuga	De tubos

## 6.- Condiciones ambientales

Este procedimiento se lleva a cabo a temperatura ambiente 25°C no precisa de cambios de atmósfera.

## 7.- Método

### 7.1.- Preparación de la muestra:

La muestra (pienso) se molera y se pasara por un tamiz de 0.5 mm. Se pasan 2g.

### 7.2.- Hidrólisis ácida

- Añadir 1 mL de etanol y 20 mg·L<sup>-1</sup> (50 µg de estándar en 2.5 mL de MeOH) de estándar interno (dihidrocolesterol en etanol) y agitar.
- Añadir 5 mL de ácido clorhídrico 6M
- Calentar la muestra en una placa termostática a 80°C durante 1 hora, agitando el sistema cada 10 minutos.
- Dejar enfriar (se le puede pasar agua para enfriar antes)
- Se añaden 5 mL de etanol y 20 mL de la mezcla de n-hexano:dietileter (1:1 v/v) y se agita.
- Se centrifuga para su separación a 500 rpm durante 10 minutos (centrifuga de horticultura).
- Recoger 15 mL de fase orgánica y se llevan a sequedad con una corriente de nitrógeno (TurboVap).

### **7.3.- Saponificación**

- Reconstituir el extracto en 8 mL de mezcla de pirogalol:etanol (3% p/v) se prepara al día.
- Añadir 0.5 mL de hidróxido potásico (1.3% p/v) para saponificar
- Calentar en la placa termostática a 80°C durante 10 minutos agitando cada 2 minutos.
- Deja enfriar
- Añadir 20 mL de hexano y 12 mL de agua destilada y agitar
- Centrifuga para su separación a 500 rpm durante 10 minutos.
- Recogen 15 mL de fase orgánica y se llevan a sequedad con una corriente de nitrógeno (TurboVap).

### **7.4.- Derivatización**

- Reconstituir el extracto en 0.25 mL de una mezcla de piridina:bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida con 1% de trimetilclorosilano (BSTFA-TMSC) al 1:1( v/v).
- Calentar en el baño de arena a 60°C durante 30 minutos
- Deja durante toda una noche a temperatura ambiente antes de su medida.

### **8.- Condiciones de conservación y eliminación de las muestras**

La muestra analizada se recoge en un bote de residuos específico para residuos contaminados con piridina.

### **9.- Control de calidad del método**

Se realiza un calibra externo de 5 punto en nivel de concentración de  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  rango entre 1-50  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Se elige el punto central del calibrado y se repite el punto 3 veces.

Cada muestra se extrae 2 veces.

La medida de cada disolución de muestra y calibrado en el GC/MS se repite dos veces.

También se acometió la puesta a punto de las vitaminas A y E en piensos y se puso a punto la técnica que se detalla a continuación, esta técnica además se ha comprobado con ensayo interlaboratoriales y se ha rutinizado y añadido a la carta de servicios.

## **Determinación simultánea de las vitaminas A y E en piensos animales**

### **1.- Objeto**

Describir la técnica empleada en NEIKER para estimar la concentración de las Vitaminas A (retinol acetato) y E (alfa-tocoferol) en piensos animales mediante Cromatografía Líquida de Alta Presión.

El objeto del presente procedimiento es describir la sistemática utilizada en el Laboratorio de Nutrición Animal de NEIKER para la detección en piensos de los aditivos Alfa-tocoferol y Retinol acetato mediante la técnica anteriormente citada.

### **2.- Campo de aplicación**

Se aplica a aquellos productos destinados al consumo animal en los que se quiera cuantificar las cantidades de Vitamina A y E adicionadas.

### **3.- Parámetros de la técnica**

Parámetros obtenidos de algún trabajo publicado, mediante la Validación de la técnica u otro tipo de documentación.

### **4.- Documentación de referencia**

- Método oficial de las comunidades Europeas
- Método facilitado por Ken. L. Ritter del Instituto de Química de Indiana
- Método facilitado por los Laboratorios Alkemi

### **5.- Controles, Patrones y Reactivos**

#### **5.1- Reactivos**

1. Todos los disolventes empleados serán de calidad HPLC (Scharlau):

- Metanol.
- Etanol Absoluto.
- Eter de Petróleo (Punto de ebullición 40-60°C)
- Acetona.
- Acetonitrilo.

2. H<sub>2</sub>O (Grado 1)
3. Pyrogallol 99 % , Grado ACS (Sigma-Aldrich)
4. KOH 50% (Disolver 500 g de hidróxido potásico en agua; dejar enfriar y diluir a un litro; almacenar en botellas de polietileno) (Panreac).
5. Solución de enrase: Etanol:Agua (3:1).

## 5.2- Patrones

**Solución madre combinada:** Con el fin de agilizar la preparación de los patrones es posible preparar un patrón combinado que contenga ambas vitaminas. Para ello se pesaran 0.45 g de Vitamina A y 0.15 g de Vitamina E y se les añadirá 5 ml de acetona. Se diluirán hasta volumen (50 ml) con etanol en un matraz aforado ámbar. Esta solución ha de conservarse en la oscuridad y permanece estable un periodo aproximado de 2 semanas.

## 6.- Materiales y equipos

Será necesario el equipamiento habitual de un laboratorio y en particular el siguiente (Tabla 1):

<b>Nombre</b>	<b>Descripción</b>
<i>Molino de piensos</i>	<i>Equipado con un tamiz de 0.5 mm.</i>
<i>Digestor</i>	<i>Establecido a 70 °C.</i>
<i>Tubos de tapa roscada</i>	<i>50 ml</i>
<i>Tubos de tapa roscada</i>	<i>20 ml</i>
<i>Material ámbar</i>	<i>Matraces aforados de 50 ml.</i>
<i>Micropipetas</i>	<i>Volúmenes que abarquen el rango 20-6000 ul. Calibradas</i>
<i>Pipetas dispensadoras</i>	<i>Calibradas</i>
<i>Turvovap</i>	<i>Con Baño de agua a 50°C y presión de Nitrógeno a 12.5 p.s.i</i>
<i>Tubos para el turbovap</i>	<i>20 ml</i>
<i>Jeringuillas</i>	<i>De plástico, 2 ml, de un solo uso</i>
<i>Filtros de jeringa</i>	<i>Nylon, 0.22 micras y 17mm de D.I, de un solo uso</i>
<i>Viales ámbar</i>	<i>Capacidad 2 ml.</i>
<i>Envasadora</i>	<i>Para almacenamiento de muestras</i>

Tabla 1. Equipos necesarios para la realización de este procedimiento.

## 7.- Condiciones ambientales

La técnica se desarrollará a temperatura ambiente.

## **8.- Método**

### **8.1- Molienda.**

El pienso ha de ser molido el mismo día en el que vaya a ser sometido a análisis. Para ello se utilizara el molino de piensos equipado con un tamiz de malla 0.5 mm. (Evitando en lo posible la producción excesiva de calor).

### **8.2- Preparación de los reactivos y standard.**

Se preparará una única solución standard que contenga ambas vitaminas según procedimiento establecido en el punto 5.2.

### **8.3- Saponificación de la muestra.**

Se pesan 5 g de pienso en tubos de tapa roscada de 50 ml (Todos los análisis se realizaran por duplicado). Se añaden 4 ml de agua ultrapura, 17 ml de etanol y 4 ml de KOH. Se agita vigorosamente y se coloca en el bloque digestor para su saponificación durante 40 min. La temperatura del bloque se establece a 70°C. (Agitar los tubos cada 5 minutos aprox.)

### **8.4- Dilución de la muestra.**

Una vez pasados los 40 minutos los tubos se enfrían con agua del grifo para posteriormente diluirlos con una mezcla de etanol:Agua (3:1) hasta alcanzar un volumen de 30 ml.

### **8.5- Extracción.**

Coger 3 ml de esta solución (sin dejar decantar) y pasarlos a un tubo de tapa roscada de 10 ml. Añadir 6 ml de eter de petróleo y agitar vigorosamente. Dejar reposar 5 minutos hasta observar una separación de fases.

### **8.6- Concentración**

Tomar 4ml de la fase etérica y colocarlos en un tubo del turbovap, para posteriormente ser llevado a sequedad y ser reconstituido en 2 ml de metanol.

### **8.7- Filtrado.**

Filtrar el reconstituido utilizando para ello filtros de jeringa de nylon de 0.20 um.

### **8.8- Análisis Cromatográfico.**

Columna: C18, (15 x 4.6 ), 5 um. Con Precolumna equivalente

Volumen de Inyección: 10 ul.

Fase Móvil: Metanol

Flujo: 1 ml/min.

Detector: Fluorescencia (325nm-475nm para la Vitamina A, y 290nm-330nm para la vitamina E).

Tiempo de Análisis: 8 minutos.

### **8.9- Interpretación de resultados**

Registrar las áreas de los picos y extrapolarlas en la recta de calibrado obtenida.

### **9.- Condiciones de conservación y eliminación de las muestras**

Una vez recibido, el pienso ha de conservarse a 4°C y bajo atmósfera de nitrógeno hasta su análisis. (Nunca ha de ser molido si no va a ser analizado en el día).

### **10.- Control de calidad del método**

Se realiza un calibra externo de 5 punto en nivel de concentración de UI/l para la Vitamina A y de mg/l para la Vitamina E. Se elige el punto central del calibrado y se repite el punto 3 veces.

Cada muestra se extrae 2 veces.

La medida de cada disolución de muestra y calibrado en el HPLC se repite dos veces.

## **Determinación de $\beta$ -Agonistas (Clenbuterol, Salbutamol y Cimaterol) en pelo mediante Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas**

### **1- Objeto**

Describir la técnica empleada en NEIKER para realizar la determinación cuantitativa de  $\beta$ -agonistas: clenbuterol, salbutamol y cimaterol en muestras de pelo mediante Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas.

El objeto del presente procedimiento es describir la sistemática utilizada en el Laboratorio de Nutrición Animal de NEIKER para la detección en pelo de los beta-agonistas: clenbuterol, salbutamol y cimaterol mediante la técnica anteriormente citada.

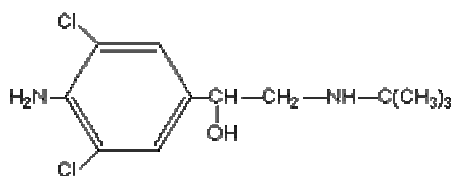
### **2.- Campo de aplicación**

Este método se aplica a muestras de pelo de vacuno. El clenbuterol, según establece el Reglamento CEE 2377/90 y el Reglamento CEE 1312/96, se encuentra dentro del Anexo I de la legislación, correspondiendo al grupo de sustancias farmacológicamente activas para las que se ha establecido un límite máximo de residuos definitivo. Este límite máximo de residuos establecido en équidos y bovino es de 0,1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  en músculo, 0,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  en hígado y riñón, y de 0,05  $\mu\text{g}/\text{kg}$  en la leche procedente de vacas tratadas con el fármaco. Con respecto a los otros dos beta-agonistas (Salbutamol y Cimaterol) no existen límites máximos de residuos.

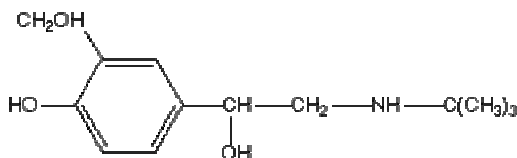
El límite de detección de la técnica es de      ng de clenbuterol, de      ng de salbutamol y de      ng de cimaterol por gramo (ppb) de pelo. El límite de cuantificación es de      ng de clenbuterol, de      ng de salbutamol y de      ng de cimaterol por gramo (ppb) de pelo.

### **3.- Definiciones**

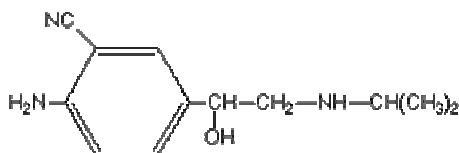
El clenbuterol, salbutamol y cimaterol son drogas  $\beta$ -adrenérgicas ilegalmente usadas como promotores del crecimiento en producción animal. Producen una notable reducción de los depósitos grasos y favorecen la síntesis de proteínas, lo cual permite la obtención de canales libres de grasa y con un extraordinario desarrollo de la masa muscular.



**CLEMBUTEROL** o 4-amino-3,5-dicloro- $\square$ -[[1,1-di-metiletil)amino]metil]bencenometanol;  
4-amino- $\square$ -[(*tert*-butilamino)metil]-3,5-diclorobencil alcohol.  
CAS REGISTRY NUMBER: [37148-27-9]; FORMULA: C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>C<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O; PESO MOLECULAR: 277,18



**SALBUTAMOL** o  $\square$ -[[1,1-dimetiletil)amino]metil]-4-hidroxi-1,3-bencenodimetanol;  
 $\square$ -[(*tert*-butilamino)metil]-4-hidroxi-m-xileno- $\square$ , $\square$ '-diol.  
CAS REGISTRY NUMBER: [18559-94-9]; FORMULA: C<sub>13</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>3</sub>; PESO MOLECULAR: 239,31



**CIMATEROL** o 2-amino-5-[1-hidroxi-2-[(1-metil-etil)amino]etil]benzonitrilo  
CAS REGISTRY NUMBER: [54239-37-1]; FORMULA: C<sub>12</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O; PESO MOLECULAR: 219,29

#### 4.- Parámetros de la técnica

Parámetros obtenidos de algún trabajo publicado, mediante la Validación de la técnica u otro tipo de documentación.

#### 5.- Documentación de referencia

##### ■ Legislación

##### Disposiciones nacionales

Real Decreto 2178/2004, de 12 de Noviembre de 2004, por el que se prohíbe utilizar determinadas sustancias de efecto hormonal y tireostático beta-agonistas de uso en la cría de ganado (BOE. 274/2004, de 13 de noviembre de 2004). Directivas objeto de trasposición:

Directiva 2003/74/CEE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2003, modifica la Directiva 96/22/CE del Consejo, por la que se prohíbe utilizar determinadas sustancias de efecto hormonal y tireostático y sustancias beta-agonistas en la cría de ganado (DO L 262 de 14 de octubre de 2003).

Directiva 96/22/CEE 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 y por la que se derogan las Directivas 81/602/CEE, 88/146/CEE y 88/299/CEE (DO L 125 de 23 de mayo de 1996).

Real Decreto 1749/1998, de 31 de Julio de 1998, por el que se establecen las medidas de control aplicables a determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos (B.O.E. de 7 de agosto de 1998). Disposiciones objeto de transposición:

Directiva 96/23/CEE, 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 y por la que se derogan las Directivas 85/358/CEE y 86/469/CEE y las Decisiones 89/187/CEE y 91/664/CEE (DO L 125 de 23 de mayo de 1996).

Decisión de la Comisión 97/747/CEE, de 27 de octubre de 1997 por la que se fijan los niveles y frecuencias de muestreo previstas en la Directiva 96/23/CE del Consejo, con vistas al control de determinadas sustancias y sus residuos en determinados productos animales (DO L 303 de 6 de noviembre de 1997).

### **Disposiciones comunitarias**

Reglamento 324/2004, de 25 de Febrero de 2004, de la Comisión de 25 de febrero de 2004 que modifica el anexo I del Reglamento (CEE) N° 2377/90 del Consejo por el que se establece un procedimiento comunitario de fijación de los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal (DO L 58 de 26 de febrero de 2004)

Decisión de la Comisión 2002/657/CEE, de 12 de agosto de 2002, por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados (DO L 221 de 17 de Agosto de 2002).

Reglamento CEE N° 2391/2000 de la Comisión de 27 de octubre de 2000 por el que se modifican los anexos I, II y III del Reglamento (CEE) N° 2377/90 del Consejo de 26 de junio de 1990 por el que se establece un procedimiento comunitario de fijación de los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal. (DO L 276 de 28 de octubre de 2000).

Decisión 98/179/CEE, de 23 de Febrero de 1998, por la que se fijan normas específicas relativas a la toma de muestras oficiales para el control de determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos (DO L 65 de 5 de marzo de 1998).

Reglamento CEE 2377/90 del Consejo, de 26 de Junio de 1990, por el que se establece un procedimiento comunitario de fijación de los límites máximos de residuos

de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal (DO L 224 de 18 de agosto de 1990).

## **6.- Controles, Patrones y Reactivos**

### **6.1- Reactivos**

- \* Reactivos: Merck (Darmstadt, Germany) analytical grade Ref.
  - Ácido clorhídrico (ClH) 0,1M    Ácido clorhídrico (HCl) = 0,1 mol/l (0,1 N)  
109060
  - Potasio dihidrogenofosfato anhidro 99,995 Suprapur®  
105108
  - Hidróxido de sodio (NaOH) 2M
  - Metanol (CH<sub>4</sub>O)            Metanol para cromatografía de gases  
106011
  - di-Potasio hidrogenofosfato anhidro 99,99 Suprapur  
105109
  - Ácido acético 1M            Ácido acético (glacial) 100% para análisis  
100063
  - Acetato de etilo            Etilo acetato para análisis  
109623
  - Amoniaco                  Amoniaco en solución 32%  
105426
  - Éter dietílico              Éter dietílico
- \* Agua purificada o desionizada Milli-Q system.
- \* Derivatizante: Aldrich N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (MSTFA)  
394866
- \* Cartuchos de extracción en fase sólida (spe)  
500 mg (6 ml) Bond Elut Certify Varian                    Scharlab            01210-2093

#### **6.1.1 Preparación reactivos:**

*Acido acético 1,0 M:* En 400 ml de Agua desionizada añadir 28,6 ml de Ácido acético glacial.

Diluir hasta 500 ml con Agua desionizada. Almacenamiento: 25°C en cristal o plástico. Estabilidad: 6 meses.

*Buffer fosfato, 0,1M, pH 6,0:* Disolver 6,81 g de Potasio dihidrogenofosfato K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> en 450 ml de Agua desionizada. Ajustar el pH a 6,0±0,1 con 1,0 M Hidróxido potásico. Añadir hasta 500 ml de Agua desionizada. Mezclar.

## 6.2- Patrones

			Ref.
Clenbuterol hydrochloride	Clenbuterol hydrochloride	Sigma	C5423
Salbutamol hemisulfate	Salbutamol hemisulfate salt	Sigma	S5013
Cimaterol	Cimaterol	Biogen Científica S.L. (Tocris)	0435/10 MG

**Solución madre individual:** Preparan solución madre, en metanol, con concentración de 1 mg/ml, almacenar en vial ámbar a -20°C.

Tomar 1 ml de solución madre y llevar a concentración de 20 □g/ml (1 ml de la solución madre de concentración 1 mg/ml y llevarlo a 50 ml con metanol), almacenar en matraz ámbar a -20°C.

Tomar 5 ml de la solución de concentración 20 □g/ml y llevar a concentración de 2 □g/ml (5 ml de la solución de concentración 20 □g/ml y llevarlo a 50 ml con metanol), almacenar en matraz ámbar a -20°C.

Tomar 5 ml de la solución de concentración 2 □g/ml y llevar a concentración de 0,2 □g/ml (5 ml de la solución de concentración 2 □g/ml y llevarlo a 50 ml con metanol), almacenar en matraz ámbar a -20°C (Concentración final 200 nanogramos/ml).

## 7.-Materiales y equipos

Será necesario el equipamiento habitual de un laboratorio y en particular el siguiente (Tabla 1):

Nombre	Descripción
Tijeras	
Pinzas	
Estufa	Establecida a 60 °C.
Estufa	Establecida a 75 °C.
Digestor	Establecido a 60 °C.
Baño ultrasonidos	
Vasos de precipitados	200 ml
Tubos de tapa roscada	50 ml
Tubos de tapa roscada	20 ml
Material ámbar	Matraces aforados de 50 ml.
Material transparente	Matraces aforados de 100 ml, 50 ml, 25 ml, 10 ml, 5 ml
Micropipetas	Volúmenes que abarquen el rango 20-6000 ul. Calibradas
Estación de extracción en fase sólida (spe)	Con bomba de vacío
Turvovap	Con Baño de agua a 40°C y presión de Nitrógeno a 12.5 p.s.i
Tubos para el turbovap	20 ml

Tabla 1. Equipos necesarios para la realización de este procedimiento.

## **8.- Condiciones ambientales**

*La técnica se desarrollará a temperatura ambiente.*

## **9.- Método**

### **9.1- Pretratamiento del pelo**

Lavar las muestras de pelo por tres veces bajo agua del grifo y por otras tres veces con agua purificada con ayuda de ultrasonidos, secar en estufa a 75°C durante 30 minutos, posteriormente lavar con éter dietílico con ayuda de ultrasonidos y se secan en estufa a 75°C durante 30 minutos. El prelavado es necesario para eliminar los restos de sangre y de materia orgánica. Almacenar las muestras de pelo secas a 4°C en contenedores de cristal hasta su uso.

### **9.2- Preparación de los reactivos y estándares**

Preparar soluciones estándares que contenga los tres beta-agonistas según procedimiento establecido en el punto 6.2.

### **9.3- Extracción**

Tomar 0,5 gr de pelo añadir 15 ml de HCl 0,1M y mantener a 60°C durante una noche (unas 18 horas), después el líquido de extracción se deja enfriar. A los extractos se añaden 10 ml de buffer fosfato 0,1M, ajustando a pH 6,0 con soluciones de HCl o NaOH y someter a extracción en fase sólida (SPE) en cartuchos Bond Elut Certify.

Activar los cartuchos antes de utilizarlos con 2 ml de metanol, 2 ml de agua y 2 ml de buffer pH 6,0 de potasio dihidrogenofosfato.

Filtrar el extracto. Lavar el cartucho con 1 ml de ácido acético 1M y secar a vacío (presión negativa 760 mmHg) durante 5 minutos (1 mmHg=133,322 Pa). Seguidamente lavar el cartucho con 6 ml de acetato de etilo y secar a vacío durante 2 minutos. La elución final se lleva acabo con 6 ml de acetato de etilo-amoniaco 32% (en proporción 98:3).

### **9.4- Concentración**

Evaporar los extractos hasta la sequedad bajo un lecho moderado de nitrógeno a 40°C en el turbovap.

### **9.5- Derivatización**

La derivatización se realiza con 50  $\mu$ l de MSTFA, en el bloque digestor a 60°C durante 15 minutos. Se deja enfriar, y se inyecta en CG/EM.

## 9.6- Análisis Cromatográfico

Inyectar la muestra en cromatógrafo Varian CP-3800 acoplado a un detector selectivo de masas Varian Saturn 2200. El control del instrumento, la adquisición de los datos y el procesamiento de los mismos lleva a cabo con un Software GC/MS Workstation de Varian.

Columna: HP 5MS (30 m x 0,25 mm ID, 0,25  $\mu$ m espesor de película)

Rampa de Temperatura: Temperatura inicial 100°C durante 1 minuto; aumento de 10°C  $\text{min}^{-1}$  hasta 280°C, y a 5°C  $\text{min}^{-1}$  hasta 300°C, esta temperatura se mantiene durante 5 minutos

Volumen de Inyección: 2  $\mu$ l

Modo de inyección: splitless

Temperatura del inyector: 260°C

Temperatura de línea de transferencia: 275°C

Gas portador: Helio

Flujo: 1,0  $\text{ml min}^{-1}$

Tiempo de Análisis: 28 minutos.

Detección: Selected ion monitoring (SIM).

La naturaleza de los beta-agonistas, los tiempos de retención y los iones seleccionados son los siguientes:

---

Compuesto (m/z)	Nº grupos TMS	Tiempo Retención	Iones seleccionados		
Clembuterol ( <i>básico</i> )	1	13.69	262*	264	244
Salbutamol ( <i>ácido</i> )	3	13.83	369*	370	371
Cimaterol ( <i>básico</i> )	2	14.39	291*	292	293

---

\* Ion seleccionado para cuantificación

## 9.7- Interpretación de resultados

Registrar las áreas de los picos y extrapolarlas en la recta de calibrado obtenida.

## 10.- Condiciones de conservación y eliminación de las muestras

Una vez recibidas, las muestras de pelo han de conservarse a 4°C.