



ESTUDIOS PRELIMINARES PARA LA DETERMINACIÓN ELECTROQUÍMICA DEL CLENBUTEROL. PARTE 1

Miguel Díaz¹, Yris Martínez¹, Ricardo Hernández¹, Reynaldo Ortíz¹, Jesus Materan¹

1. Laboratorio de Electroquímica, Departamento de Química. Facultad de Ciencias. Universidad de Los Andes. Mérida 5101, Venezuela.

Correspondencia: Dra. Yris Martínez. Núcleo la Hechicera. Facultad de Ciencias.

Laboratorio de Electroquímica. Av. Alberto Carnevali, Núcleo la Hechicera, Edif. A Tercer Piso, Mérida (5101), Venezuela. Tel/Fax. 00(58) 274-2401393.

E-mail: ymartin@ula.ve

RESUMEN

Se realizaron estudios del comportamiento redox del Clenbuterol (CLEN) sobre electrodos de oro y carbón vítreo por voltamperometría cíclica, así como también ensayos por cromatografía líquida (HPLC) con detección UV-visible a muestras de un jarabe comercial de CLEN. El objetivo fundamental de este trabajo, fue establecer las condiciones óptimas del sistema para desarrollar una metodología por HPLC con acoplamiento de un detector electroquímico amperométrico para el análisis cuantitativo de CLEN en formulaciones farmacéuticas orales. Los resultados muestran que el electrodo de carbón vítreo sería el mejor sustrato para la oxidación del CLEN en dicho detector ya que genera un pico de oxidación más agudo y a un potencial de oxidación menor respecto al de oro, el uso de una columna C18 y la fase móvil de buffer fosfato pH 3,0 (más 3 g de la sal sódica del ácido 1-heptanosulfónico), acetonitrilo y metanol 60:20:20 respectivamente, separa los componentes de interés en el jarabe comercial en un tiempo por inyección de 10 min con una velocidad de flujo de 1,5 mL/min.

Recibido: 18/03/2018

Aceptado: 25/04/2018



PALABRAS CLAVE: Clenbuterol, Cromatografía, Detector Electroquímico

**PRELIMINARY STUDIES FOR THE ELECTROCHEMICAL DETERMINATION OF
CLENBUTEROL. PART 1**

ABSTRACT

Studies were performed on the redox behavior of Clenbuterol (CLEN) on gold electrodes and vitreous carbon by cyclic voltammetry, as well as liquid chromatography (HPLC) tests with UV-visible detection on samples of commercial syrup from CLEN. The main objective of this study was to establish optimal conditions of the system to develop an HPLC methodology by coupling an amperometric electrochemical detector for the quantitative analysis of CLEN in oral pharmaceutical formulations. The results show that the vitreous carbon electrode would be the best substrate for the oxidation of CLEN since the oxidation peak is more acute and the potential attributed to the oxidation of CLEN is lower than that observed when the electrode is gold. On the other hand, to separate the components of interest in the commercial syrup by chromatography, it was determined that the appropriate column is C18 with a mobile phase of phosphate buffer at pH 3.0 (with 3 g of the sodium salt of 1-heptanesulfonic acid), acetonitrile and methanol in a ratio of 60:20:20 respectively, at an injection time of 10 min and a flow rate of 1.5 ml / min.

KEYWORDS: Clenbuterol, Chromatography, electrochemical detector

INTRODUCCIÓN

El Clenbuterol (CLEN) es un fármaco simpaticomimético de acción directa con la actividad adrenérgica predominantemente beta y una acción selectiva sobre los receptores beta2 (β 2-agonista). Es usado como un broncodilatador para el tratamiento de la obstrucción reversible de las vías respiratorias, como el asma y a ciertos pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (1). Su estructura está representada en la figura 1.

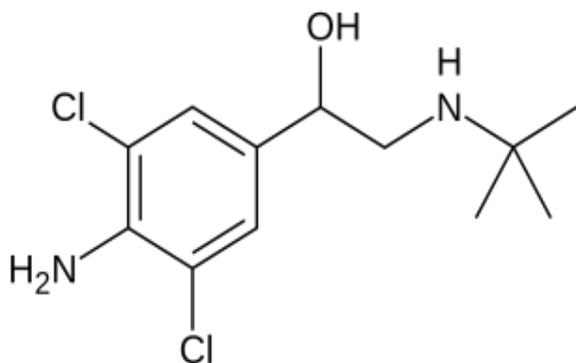


Figura 1. Estructura del Clenbuterol

Su forma de administración y concentración varía según la afección, sin embargo, las preparaciones farmacéuticas orales (jarabes, gotas y soluciones orales) son comúnmente utilizadas en niños y adultos para el tratamiento

sistemático de la enfermedad. La determinación cuantitativa del CLEN en

elaboraciones farmacéuticas requiere del uso de técnicas instrumentales como la cromatografía de alta resolución (HPLC) y espectrofotometría UV-visible entre otras (2,3). La utilización de estas técnicas es de vital importancia al realizar el control de la calidad de los productos en proceso y terminados, así como también para aquellos productos que son sometidos a pruebas de estabilidad en condiciones de almacenamiento normales o a temperaturas y humedades incrementadas, ya que es de suma importancia que para el momento de la aplicación del producto, la concentración del mismo se mantenga dentro de los valores requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado. Existen metodologías oficiales por HPLC que permiten la determinación del CLEN como materia prima de fabricación y se encuentran armonizadas en algunas farmacopeas (4) u otros compendios internacionales. Sin embargo, estas metodologías, no son aplicables en las complejas formulaciones orales de los distintos laboratorios o casas comerciales. Siendo el

efecto de la matriz el causante de estas las limitaciones. Entre estos se puede mencionar: la interferencia producida

por excipientes, productos de degradación, conservantes (metil y propil parabeno) u otros principios activos presentes, tales como el Ambroxol, (figura 2) diferencia de solubilidad en fase móvil, diferencias entre tiempo de retención de los componentes de la mezcla, la relación de concentración, entre otros. De manera que cada laboratorio debe desarrollar y validar una metodología en función a cada una de las diferentes formulaciones, y esto por supuesto acarrea un arduo y costoso trabajo de investigación.

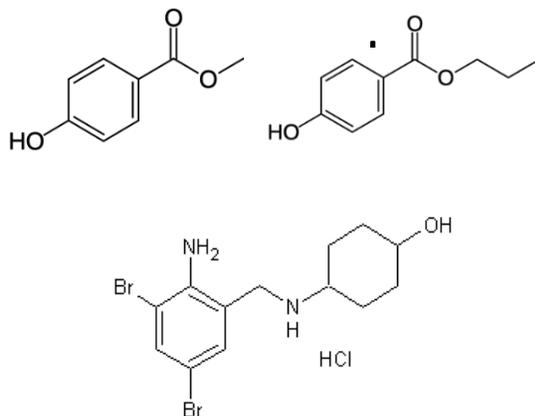


Figura 2. Conservantes y otro posible principio activo en formulaciones orales de CLEN: a)

Metil parabeno, b) Propil parabeno, c) Ambroxol clorhidrato.

En este trabajo, se muestra un estudio electroquímico por voltamperometría, del

comportamiento redox del CLEN sobre electrodos de oro y carbón vítreo. Adicionalmente, se realizó un estudio por HPLC a patrones de CLEN, Ambroxol, metil y propil parabeno; así como también a una muestra de un jarabe comercial que contenía a todos estos. Este estudio es la base para establecer las condiciones óptimas de análisis, para diseñar una metodología que involucre la técnica HPLC acoplada con un detector electroquímico, que permita la determinación del CLEN en formulaciones farmacéuticas complejas.

METODOLOGIA

Todos los reactivos fueron de grado analítico y se utilizaron sin purificación previa. Las soluciones se prepararon con agua 18 MΩ (Nanopure). Los gases utilizados fueron de ultra alta pureza. Los estudios electroquímicos fueron realizados por voltamperometría mediante un potenciostato-galvanostato 20,



Autolab Ecochemie. Se empleó una celda de un compartimiento y tres electrodos, donde el electrodo de referencia, fue de Ag/AgCl(sat.), como electrodo auxiliar se utilizó una lámina de platino de aproximadamente $0,5 \text{ cm}^2$ y

como electrodo de trabajo se utilizaron dos electrodos: un electrodo de oro y otro de carbón vítreo, con una área geométrica de $0,0903$ y $0,0298 \text{ cm}^2$ respectivamente. Ambos fueron pulidos a espejo, con alúmina $1 \mu\text{m}$, enjuagados con agua desmineralizada y colocados en un baño ultrasónico por diez minutos. El volumen solución en cada uno de los experimentos fue de 5 mL . Previo a los experimentos voltamperométricos de oxidación del CLEN, el electrodo de trabajo fue ciclado en una ventana de potenciales entre 0 y $1, 2 \text{ V}$ a una velocidad de $0,1 \text{ V/s}$, aplicando 30 barridos consecutivos en una solución de HClO_4 $0,1 \text{ M}$, con el objeto de acondicionarlo. La concentración de la solución de CLEN fue de $3,25 \times 10^{-3} \text{ M}$ y el medio electrolítico HClO_4 $0,1 \text{ M}$. Los estudios por HPLC fueron realizados en un cromatógrafo líquido marca Agilent technologies, serie 1260 infinity, con un detector UV-visible de arreglo de diodos. Se

empleó una columna de la marca comercial Zorbax Eclipse Plus, C18, de una longitud de $4,6 \times 150 \text{ mm}$, y un tamaño de partícula de $5 \mu\text{m}$. El flujo de la fase móvil fue de $1,5 \text{ mL/min}$, la temperatura de la columna de $40 \pm$

1°C , el volumen de inyección de $50 \mu\text{L}$ y la longitud de onda del detector de 215 nm . Con estas condiciones se logra una y mejor definición de la absorbancia del CLEN. La fase móvil, consistió de una mezcla de metanol, acetonitrilo y una solución buffer fosfato pH $3,0$ combinada con la sal sódica del ácido 1-heptanosulfónico (AHEP); la relación final de la fase móvil fue de $60:20:20$ respectivamente. La solución combinada buffer fosfato pH 3 y AHEP se preparó disolviendo 5 g de fosfato monobásico de potasio y 3 g de AHEP en 1000 mL de agua. El pH se ajustó hasta $3,0$ con ácido fosfórico diluido $1:10$. Tanto las muestras como el estándar se prepararon con un diluyente el cual consistió de una mezcla de solución amortiguadora de fosfato pH $3,0$ y acetonitrilo en una proporción $80:20$ respectivamente. Se utilizó un patrón de trabajo de CLEN clorhidrato estandarizado por HPLC contra un

patrón certificado USP de Clenbuterol HCl, Lote F01214. La metodología utilizada para la estandarización del patrón fue extraída de la farmacopea de los Estados Unidos (2). Mientras que la concentración de los patrones de metil y propil parabeno fue se obtuvo

utilizando por titulación potenciométrica. Se usó como muestra, un jarabe comercial en cuya etiqueta reportaba que el contenido de CLEN y Ambroxol clorhidrato era de 0,01 y 15 mg/5mL respectivamente. Esta se preparó pesando una cantidad equivalente a 5 mL del jarabe en 50 mL, luego se llevó hasta aforo con diluyente. Chang en sus estudios, (3) reportó que el uso de este diluyente (acetonitrilo y fosfato a pH 3,0 en una relación 80:20.) mejora la señal analítica, ya que se incrementa la señal de CLEN.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudios por Espectroscopia UV-visible

Este estudio permitió seleccionar la longitud de onda de trabajo. En la figura 3, se muestra el espectro por UV-visible de cada uno de los patrones por separado a una concentración de 0,001 mg/mL cada uno y diluidos en la fase

móvil, la longitud de onda seleccionada fue de 215nm ya que a esa longitud de onda, se obtiene la mayor respuesta instrumental para el CLEN y una menor contribución de los demás componentes de la formulación, que generalmente, se encuentran en un jarabe

comercial en mayor proporción respecto al CLEN.

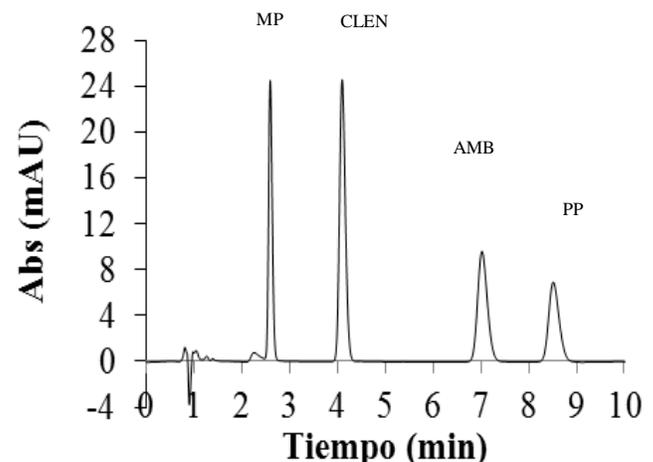


Figura 3. Patrones de CLEN, AMB, MP y PP a una concentración de 0,001 mg/mL, utilizando una columna C18, 4,6 x 150 mm, 5 µm. Con un flujo de 1,5 mL/min, la longitud de onda de 215

nm, a una temperatura $40 \pm 1^\circ\text{C}$ y un volumen de inyección de $50 \mu\text{L}$.

Estudios Cromatográficos

Para identificar los picos en los cromatogramas del jarabe comercial, previamente se inyectó una solución que contenía a los patrones de CLEN clorhidrato, ambroxol clorhidrato (AMB), metil parabeno (MP) y propil parabeno (PP), todos a una

concentración de $0,001 \text{ mg/mL}$. La respuesta de cada uno de ellos se puede ver en cromatograma representado en la figura 4. En esa figura se observa claramente, que bajo las condiciones de trabajo y un tiempo de corrida relativamente corto (10 min), se pueden separar y cuantificar los componentes principales del jarabe comercial, si no existieran efectos de matriz.

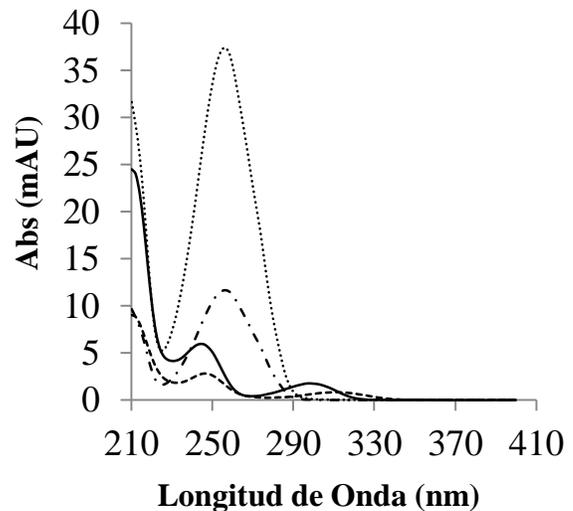


Figura 4. Espectro de UV de CLEN (-), AMB (--), MP (...) y PP (-.-.) en fase móvil, concentración de $0,001 \text{ mg/mL}$.

Posterior a la identificación de cada uno de los componente principales se inyectó en el cromatógrafo una muestra de jarabe comercial, calculando una concentración de CLEN de

aproximadamente $0,0002 \text{ mg/mL}$. En la figura 5a. se observa que existe cierta dificultad para determinar de forma efectiva, el CLEN en presencia de los demás componentes del jarabe ya que los mismos se encuentran en mayor proporción Al ampliar la figura 5a y figura 5b

se corrobora que el principal inconveniente en la determinación del CLEN, es que existe una gran diferencia entre la concentración del CLEN y la de los demás componentes del jarabe; además de la pobre respuesta instrumental que se obtiene con el detector UV-visible.

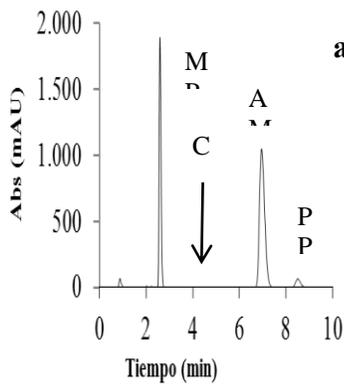


Figura 5^a

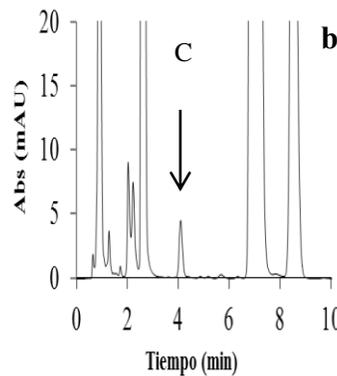


Figura 5^b

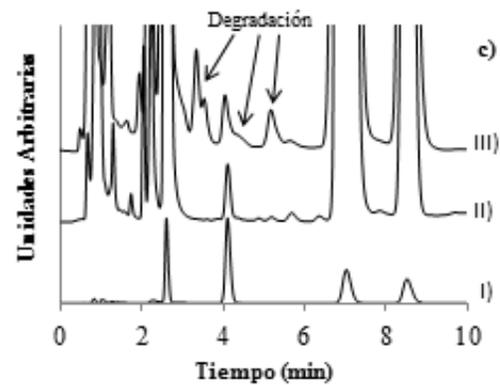


Figura 5^c

Figura 5. a) Cromatogramas de un jarabe comercial CLEN en presencia de AMB, MP y PP. Concentración aproximada del CLEN=0,0002 mg/mL. b) Ampliación. c) Productos de degradación: I) cromatograma de patrones de MP, CLEN, AMB y PP a 0,001 mg/mL, II) jarabe comercial de CLEN recién preparado, III) jarabe comercial luego de 6 meses en condiciones de degradación aceleradas.

Una opción para solventar este problema que podría ser considerada es la de incrementar la concentración de la muestra, sin embargo, esta opción no es viable, ya que al inyectarla muestra en esas condiciones saturaría tanto el detector como la columna. Se puede realizar una extracción ácido base del CLEN y de esta manera aislarlo de los demás componentes



permitiendo así una determinación y cuantificación efectiva; sin embargo, mediante este proceso se introduce un error mayor y se incrementa el costo del análisis. Adicionalmente, se realizó un estudio a muestras de jarabe que fueron sometidas a estudios de estabilidad (condiciones incrementadas de humedad y temperatura). En la figura 5c se observa una limitación adicional del método empleado y es que no es específico para los productos de degradación que se forman en las muestras de jarabe al ser sometidas a estudios de estabilidad, por lo que solo es aplicable a medicamentos recién preparados. Estos resultados confirman que el detector UV-Vis utilizado en esta técnica instrumental presenta limitaciones para la determinación del CLEN en muestras de jarabe.

Estudios Electroquímicos

La literatura reporta (6-8) que para la cuantificación del CLEN, en muestras complejas, lo más apropiado es la utilización de un detector electroquímico amperométrico acoplado a un HPLC, ya que a concentraciones

bajas de analito se obtiene una alta especificidad y una mayor respuesta

instrumental. Chai y Liu, (9) desarrollaron un inmunosensor para la determinación del CLEN usando peroxidasa de rábano picante y anticuerpo monoclonal, ellos reportan que es posible realizar el análisis cuantitativo de clenbuterol de forma rápida y con alta sensibilidad. Otro sensor con el que se obtuvieron buenos resultados fue cuando se modificó un electrodo de carbón vítreo con partículas de PtNiFe obteniéndose buena selectividad, alta sensibilidad, reproducibilidad y estabilidad con un límite de detección de 6.0×10^{-8} mol / L. (10) Por otro lado, un inmunosensor amperométrico para clenbuterol formado por un nanocompuesto de sulfuro de zinc y polianilina (ZnSQD y PANI) depositados sobre un electrodo de oro, donde la detección incluye anclaje de inmunoglobulina G, exhibe mayor sensibilidad al clenbuterol aunque el sistema es más complicado (11). Similarmente, Niu y colaboradores [12], prepararon un sensor electroquímico para la determinación del clenbuterol residual, basado en un compuesto de carbón modificado con platino, níquel y

hierro. Este sensor tiene buena selectividad y reproducibilidad, alta sensibilidad y estabilidad

con un rango lineal de 1.9×10^{-7} - 4.9×10^{-2} mol/L, y un límite de detección de 6.0×10^{-8} mol/L. En la figura 6 se muestran los estudios preliminares de la oxidación de CLEN por voltamperometría cíclica, en ella se puede observar la respuesta de un electrodo de oro sumergido en una solución 0,1 M de HClO₄ y una solución $3,25 \times 10^{-3}$ M de CLEN. El estudio se inicia a potencial de circuito abierto (0,46 V) en una ventana de potencial que va desde 0,0 a 1,6 V; a una velocidad de barrido de 0,1 V/s. La respuesta del electrodo de oro en el medio electrolítico es tal como se esperaba (figura 6 (---)). En el caso en que el electrodo estaba sumergido en la solución que contiene la solución de CLEN (figura 6 (___)), se observa en el primer ciclo, un hombro de oxidación entre 0,8 y 0,9 V, el cual se atribuye a la desorción de oxígeno de la superficie electródica generado por el tratamiento de acondicionamiento realizado al electrodo en HClO₄.

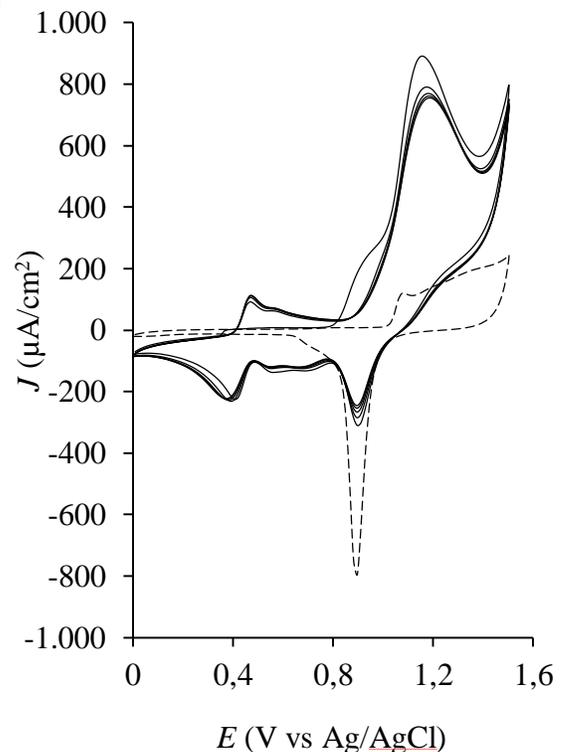
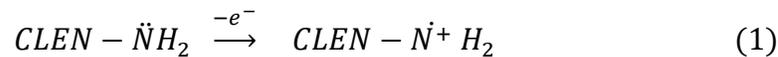


Figura 6. Respuesta voltamperométrica del electrodo de oro sumergido en una solución $3,25 \times 10^{-3}$ M de CLEN disuelta en 0,1 N de HClO₄ (___), medio electrolítico (---). A 0,1 V/s durante 5 ciclos consecutivos

El pico a 1,15 V, es atribuido a la de oxidación del CLEN, la intensidad de este pico tiende a disminuir en función de los ciclos, estabilizándose a partir del 5to ciclo. Bajo estas condiciones experimentales, se observa que durante la oxidación del CLEN, se generan

algunas especies que tienden a permanecer sobre el electrodo, bloqueando la superficie del mismo lo que limita el proceso de interés. Aproximadamente, 0,4 y 0,6 V se encuentra una cupla redox cuasi reversible, la cual no es observada en el primer ciclo, y que es atribuida por la literatura (6,7) a la formación de un

dímero de CLEN-CLEN que se genera por acoplamiento de la especie oxidada a 1,15 V (ver las reacciones 1 y 2). Aunque McGrath y colaboradores, [13] reportan la formación de este dímero a potenciales similares (650mV), cuando se trabaja a pH 5.



La figura 7, muestra la respuesta voltamperométrica del CLEN sobre el carbón vítreo.

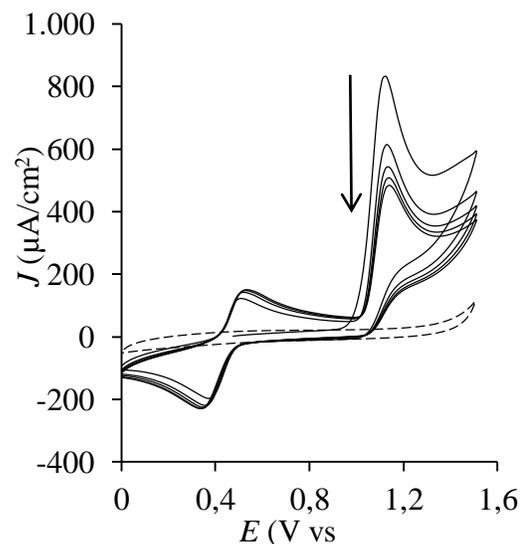


Figura 7. Respuesta voltamperométrica del electrodo de electrodo de CV sumergido en una solución $3,25 \times 10^{-3}$ M de CLEN disuelta en 0,1 N

de HClO_4 (—), medio electrolítico (---). A $0,1 \text{ V/s}$. 5 ciclos consecutivos.

El estudio fue realizado en las mismas condiciones anteriores, con el propósito de seleccionar el mejor sustrato para la oxidación del CLEN. La respuesta obtenida, es muy similar a la encontrada con el electrodo de oro. Al comparar el primer barrido de las figuras 6 y 7, se observan ciertas diferencias de forma e intensidad en la corriente del pico atribuido a

la oxidación del CLEN. Cuando el estudio se realiza con el electrodo de oro, se genera una mayor respuesta en corriente en comparación al electrodo de CV. Sin embargo, la respuesta obtenida cuando se utiliza electrodo de CV, se observa una mejor definición de los picos, por lo tanto se selecciona el electrodo de CV para los estudios posteriores. Al igual que el caso en que se utiliza el electrodo de oro, cuando se realizan ciclos consecutivos en un sistema que contiene una solución de CLEN $3,25 \times 10^{-3} \text{ M}$ se observa que la respuesta en corriente disminuye, esto puede ser atribuido a que se forman algunas especies (dímeros), que no son activas en la cercanías o sobre la superficie del electrodo. Para eliminar las especies que

bloquean en cierta medida la superficie del electrodo, se burbujeó con nitrógeno y se agitó la solución a 500 rpm por 10 min entre cada ciclo.

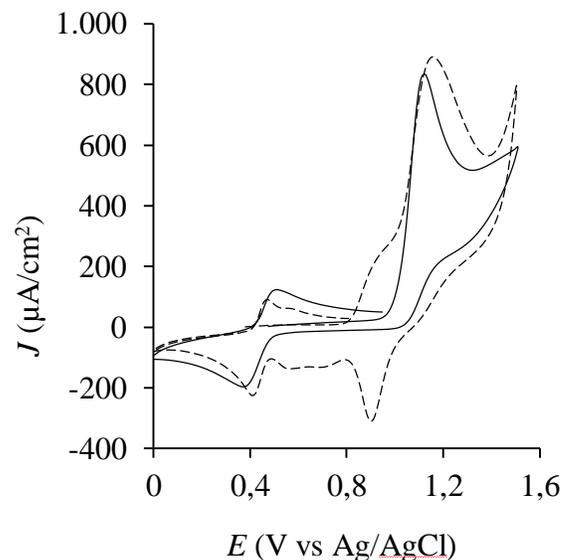


Figura 8. Respuesta voltamperométrica de un electrodo de CV (—), y oro (----) en la oxidación de CLEN $3,25 \times 10^{-3} \text{ M}$, a $0,1 \text{ V/s}$

La figura 9, muestra la respuesta de oxidación del CLEN (I) antes y después del tratamiento con nitrógeno y agitación. En esa figura se puede notar que la respuesta en corriente del pico atribuido a la oxidación del CLEN, entre un ciclo y otro es esencialmente la misma, lo que indica que el tratamiento aplicado permite que el producto que se forma en las cercanías del electrodo difunda hacia el seno de la

solución rápidamente permitiendo que la superficie del electrodo regrese a su condición inicial.

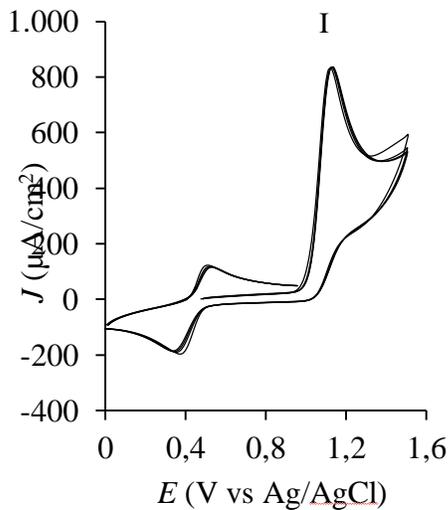


Figura 9. Respuesta voltamperométrica de un electrodo de CV sumergido en una solución $3,25 \times 10^{-3}$ M de CLEN en HClO_4 0,1 N. A 0,1 V/s. Cuatro ciclos no consecutivos con agitación a 500 rpm y burbujeo con nitrógeno por 10 min

La figura 10, muestra el efecto de la velocidad de barrido en una solución $3,25 \times 10^{-3}$ M de CLEN, en ella se puede observar un incremento en la corriente tanto de los picos anódicos (I y III'), como de los picos catódicos (II y III) al incrementar la velocidad de barrido. Previo a cada voltametría se burbujeó con nitrógeno y se agitó a 500 rpm durante por 10 min.

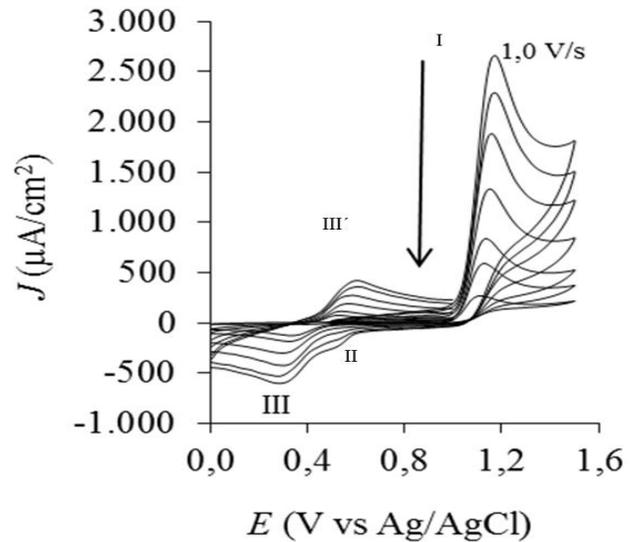


Figura 10^a

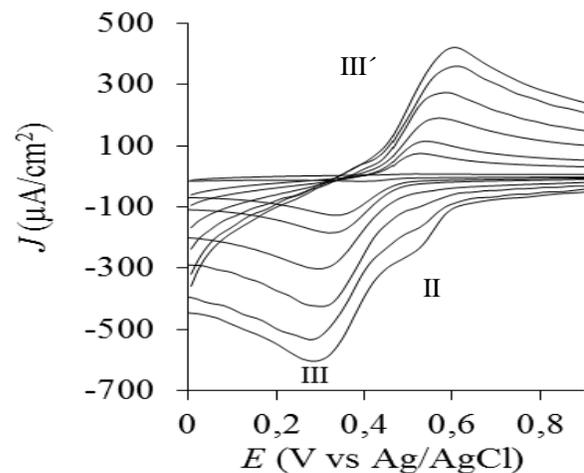


Figura 10b

Figura 10. a) El efecto de la velocidad de barrido en la oxidación del CLEN sobre CV, solución $3,25 \times 10^{-3}$ M. A diferentes velocidades de barrido: 1,0, 0,75, 0,50, 0,25, 0,1, 0,05, 0,01 V/s respectivamente. Entre estas se burbujeó

con nitrógeno y se agitó en conjunto a 500 rpm por 10 min. b) ampliación de la figura a.

La cupla redox que se observa entre 0 y 0,8 V muestra un proceso redox diferente al observado cuando la velocidad de barrido es de 0,1 V/s, el mismo solo se aprecia a altas velocidades. Este es denotado en el voltamperograma como la onda de reducción II aproximadamente a 0,55 V. En la figura 11, se muestran dos ciclos consecutivos del estudio voltamperométrico de la oxidación del CLEN a 0,01 V/s, es de resaltar, que al comparar este resultado con el que se realiza a velocidades de barrido mayores (ver figura 7), la corriente del pico I, no decae de forma drástica. Esto indica que las especies que se forman producto de la oxidación del CLEN, tienen el tiempo suficiente para difundir hacia el seno de la solución y por lo tanto no bloquean la superficie del electrodo.

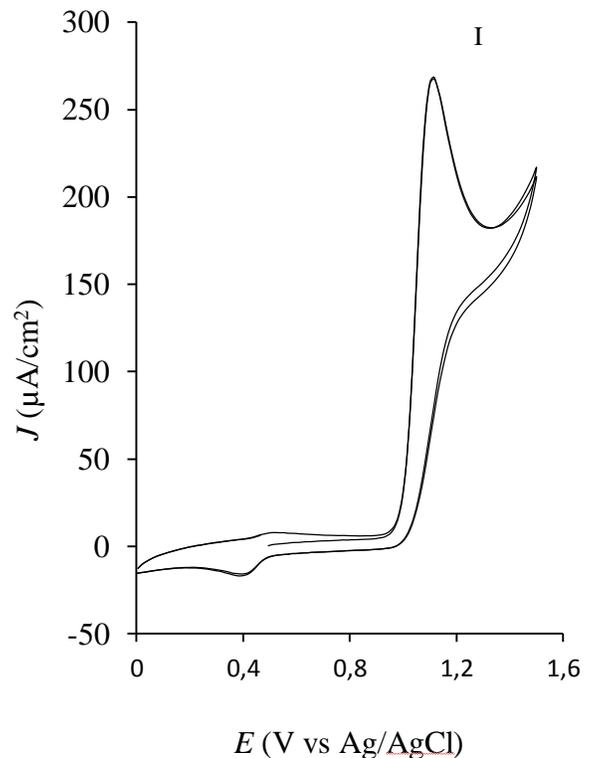


Figura 11. Respuesta voltamperométrica sobre un electrodo de CV para una solución $3,25 \times 10^{-3}$ M de CLEN en 0,1 N de HClO_4 , 0,01 V/s. Dos ciclos consecutivos.

Con el propósito de aprovechar las condiciones analíticas ya estandarizadas en los estudios previos por HPLC con el detector UV-visible, se realizaron adicionalmente, experimentos

voltamperométricos utilizando como medio electrolítico la fase móvil empleada en los

estudios cromatográficos. La figura 12, muestra el comportamiento electroquímico del electrodo de carbón vítreo sumergido en una solución $3,25 \times 10^{-3}$ M de CLEN disuelta en la fase móvil a una velocidad de barrido de 0,1 V/s. Como se puede observar en esta figura, el comportamiento es similar al obtenido cuando se trabaja utilizando como medio electrolítico al HClO_4 0,1 M. El bloqueo de la superficie electrodica propiciado por las especies formadas producto de la oxidación es más significativo cuando se usa la mezcla metanol, acetonitrilo y buffer fosfato, ya que al burbujear con nitrógeno y agitar a 500 rpm por diez minutos, la superficie se mantiene pasivada por lo que la corriente del pico I atribuida a la oxidación del CLEN, continúa decreciendo a medida que se realicen los ciclos no consecutivos.

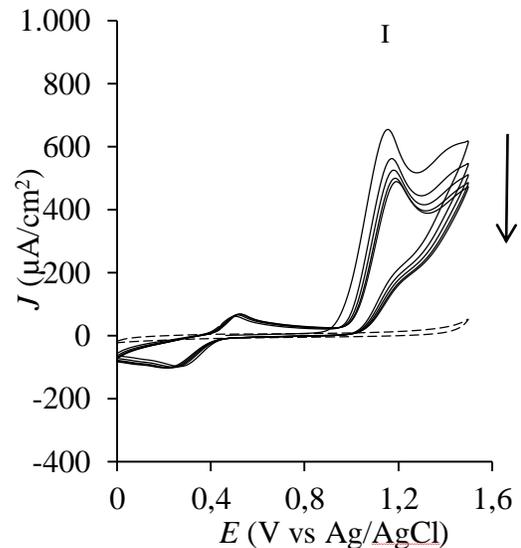


Figura 12. Respuesta voltamperométrica sobre un electrodo de CV para una solución $3,25 \times 10^{-3}$ M de CLEN en fase móvil, 0,1 V/s. 5 ciclos no consecutivos con agitación a 500 rpm y burbujeo con nitrógeno por 10 min.

Usar fase móvil como medio electrolítico tendría la desventaja de pasivación de la superficie electrodica sin embargo esto se pudiera resolver con la aplicación de un programa de pulsos posterior a la oxidación, así como lo demuestran los estudios de Chanpen y colaboradores. (7).



CONCLUSIÓN

Los estudios cromatográficos muestran que el control efectivo de la fase móvil, flujo, longitud de onda, columna, temperatura del sistema y volumen de inyección, son fundamentales para obtener una buena separación de los componentes principales de un jarabe comercial de CLEN en un tiempo de corrida relativamente corto. Sin embargo, la respuesta instrumental encontrada en función de la concentración de CLEN en un jarabe, al utilizar el detector UV-visible no es de gran magnitud. Esto representa una desventaja a la hora de integrar la señal del analito.

Adicionalmente, los compuestos que se forman, producto de la descomposición de los componentes del jarabe con el transcurso del tiempo o cambio de condiciones climáticas, tienden a ser un problema ya que estos productos de degradación presentan tiempos de retención muy cercanos al del CLEN. Por lo tanto esta metodología estaría limitada que solo puede ser usada en productos recién preparados. Los estudios electroquímicos de la oxidación de CLEN en HClO₄ 0,1 M indican

sobre el electrodo de CV, se tiende a generar una respuesta electroquímica más definida y

estable, que al utilizar el electrodo de oro. Por otro lado, los estudios por voltamperometría cíclica, señalan que a bajas velocidades de barrido, las especies oxidadas sobre la superficie o en la cercanía del electrodo, difunden hacia el seno de la solución, permitiendo que se regenere la superficie. A altas velocidades de barrido, se pueden visualizar otros procesos redox que no se aprecian en las condiciones normales de trabajo. Finalmente, los resultados indican que el medio electrolítico marca una gran diferencia en la regeneración de la superficie

electródica lo cual es indispensable en todo estudio cuantitativo.

REFERENCIAS

1. Martindale, The complete drug reference, thirty-second edition, 1999 Pharmaceutical Press, página 752.
2. Haasnoot, W.; Ploum, M.E.; Paulussen, R.J.A.; Schilt, R.; Huf, F.A. Rapid



- Determination of Clenbuterol Residues in Urine by High-Performance Liquid Chromatography with On-line Automated Sample Processing using Immunoaffinity Chromatography. *J. Chromatogr.* 519 (1990) 323–35.
- Lin, L. A.; Tomlinson, R. S.; Stazger, R. D. Detection of Clenbuterol in Bovine Retina Tissue by High Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection. *J. Chromatogr. A* 762 (1997) 275–280.
 - Farmacopea de los estados unidos en español, Monografías oficiales USP A-H, Formulario nacional 30, 2 (2012) 2944-45.
 - Ling-Ying Chang, Shin-Shou, Deng-Fwu Hwang, High Performance Liquid Chromatography to Determine Animal Drug Clenbuterol in Pork, Beef and Hog Liver, *Journal of Food and Drug Analysis*, 13, 2 (2005) 163-167
 - Lijing Liu, Haibo Pan, Min Du, Wenqin Xie, Jian Wang, Glassy carbon electrode modified with Nafion–Au colloids for clenbuterol electroanalysis, *Electrochimica Acta* 55 (2010) 7240–7245.
 - Chanpen Karuwan, Thitirat Mantim, Patcharin Chaisuwan, Prapin Wilairat, Kate Grudpan, Piyada Jittangprasert, Yasuaki Einaga, Orawon Chailapakul, Leena Suntornsuk, Orphan Anurukvorakun, Duangjai Nacapricha, Pulsed Amperometry for Anti-fouling of Boron-doped Diamond in Electroanalysis of β -Agonists: Application to Flow Injection for Pharmaceutical Analysis, *Sensors*, 6 (2006) 1837-1850.
 - Lorrie A. Lin, John A. Tomlinson, R. Duane Satzger, Detection of clenbuterol in bovine retinal tissue by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection, *Journal of Chromatography A*, 762 (1997) 275-280.
 - C. Chai, G. Liu, Studies on the voltammetric determination of clenbuterol at one-touch immunochips, *J. Shanghai Jiaotong Univ.* 1 (2005) 1–14.
 - Y.J. Feng, S.P. Niu, X.Y. Fu, J.H. Zhao, Y.H. Yang, Electrochemical sensor based on platinum-nickel-iron/carbon nanosheets nanocomposite for determination of



- clenbuterol, Chin. J. Anal. Chem. 41, 3 (2013) 427–431.
11. Z. Zhang, F. Duan, L. He, D. Peng, F. Yan, M. Wang, W. Zong, C. Jia, Electrochemical clenbuterol immunosensor based on a gold electrode modified with zinc sulfide quantum dots and polyaniline. Microchimica Acta 183, 3 (2016) 1089–1097
12. Y.J. Feng, S.P. Niu, X.Y. Fu, J.H. Zhao, Y.H. Yang, Electrochemical sensor based on platinum-nickel-iron/carbon nanosheets nanocomposite for determination of clenbuterol, Chin. J. Anal. Chem. 41 (3) (2013) 427–431.
13. G. J. McGrath, E. O'Kane, W.F. Smyth, F. Tagliaro Investigation of the electrochemical oxidation of clenbuterol at a porous carbon electrode, and its application to the determination of this β -agonist in bovine hair by liquid chromatography with coulometric detection, Analytica Chimica Acta, 322, 3 (1996) 159-166