

ARTÍCULO ORIGINAL

## Desarrollo y validación de un método de cromatografía líquida de alta resolución para la determinación y cuantificación de clenbuterol en hígado de bovino

F. Morales-Trejo<sup>I</sup>, S. Vega y León<sup>I</sup>, A. Escobar-Medina<sup>II</sup>, J.J. Pérez-González<sup>I</sup>,  
G. Urbán-Carrillo<sup>I</sup>, R. Gutiérrez-Tolentino<sup>I</sup>

<sup>I</sup>Departamento de Producción Agrícola y Animal. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, México, D.F.  
Correo electrónico: [reygut@correo.xoc.uam.mx](mailto:reygut@correo.xoc.uam.mx); <sup>II</sup>Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10,  
San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba

**RESUMEN:** Se desarrolló una metodología para la determinación de clenbuterol en hígado de bovino por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La extracción se realizó con acetonitrilo e isopropanol. El extracto se analizó empleando una columna de fase reversa C18, un detector UV a 214 nm y una mezcla de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.05M (pH 3.0)/acetonitrilo (85:15, v/v) como fase móvil. El tiempo de retención para el clenbuterol fue 24.82 min. La recta de mejor ajuste de la curva de calibración del estándar fue  $y = 1340.8563x - 1539.7319$ , con un  $r^2=0.9997$  ( $p<0.05$ ). Los límites de detección y de cuantificación mostraron valores de 0.9 y 1.8 ng/mL, respectivamente. Las medias de recuperación de clenbuterol fueron de 111.7, 82.0 y 84.8%, para tres niveles de concentración preparados (26.2, 104.9 y 209.8 ng/mL, respectivamente), los cuales se consideran adecuados para el método propuesto. La precisión del método se midió por la desviación estándar relativa, el cual fue inferior a 4.74%. Se analizaron 17 muestras de hígado comprados en mercados públicos, de los cuales 11 de ellos presentaron concentraciones de clenbuterol superiores al LMR con una mediana de 17.68ppb. Este método es exacto y confiable debido a su límite de detección, grado de separación cromatográfica, precisión, exactitud, sensibilidad y estabilidad.

**Palabras clave:** clenbuterol, HPLC, validación, hígado de bovino.

---

### Development and validation of a high performance liquid chromatography method for the identification and quantification of clenbuterol in bovine liver

**ABSTRACT:** A methodology for the determination of clenbuterol in bovine liver by high performance liquid chromatography was developed. Extraction was performed with acetonitrile and isopropanol. The extract was analyzed using a reverse phase column C18, a UV detection at 214 nm, and  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.05M (pH 3.0)/acetonitrile (85:15, v/v) as the mobile phase. The retention time for clenbuterol was 24.82 min. The best-fit line of the standard calibration curve was  $y = 1340.8563x - 1539.7319$ , and  $r^2=0.9997$  ( $p<0.05$ ). The detection and quantification limits showed values of 0.9 and 1.8 ng/mL, respectively. The mean recovery of clenbuterol were 111.7, 82.0 and 84.8%, for the concentration levels prepared (26.2, 104.9 and 209.8 ng/mL, respectively), which are considered suitable for the proposed method. The method accuracy was measured by the relative standard deviation, which was less than 4.74%. Seventeen liver samples purchased in public markets of México City were analyzed, of which 11 of them had concentrations above the MRL for clenbuterol with a median of 17.68ppb. This method is accurate and reliable due to its limit of detection, chromatographic separation efficiency, precision, accuracy, sensitivity and stability.

**Key words:** clenbuterol, HPLC, validation, liver bovine.

---

## INTRODUCCIÓN

El clenbuterol (clorhidrato de 4-amino-3,5-dicloro-alfa(((1,1-dimetiletil)amino)benzenmetanol) es una sustancia  $\beta$ -agonista del grupo de los  $\beta$ -adrenérgicos. Su uso como aditivo alimenticio en la engorda de ganado genera un efecto anabólico (1, 2, 3). Se le denomina «agente de repartición» en virtud de que reduce la grasa a la vez que fomenta la síntesis proteínica, debido a que los  $\beta$ -agonistas pueden incrementar el flujo sanguíneo a ciertas regiones del cuerpo (4, 5).

Teóricamente, la utilización de estas sustancias presenta una serie de ventajas relacionadas no sólo con la mejora de productividad, sino también de la calidad de la carne (6). Sin embargo, a finales de la década de los 80's, se empezó a descubrir que también tenía efectos secundarios en los consumidores de la carne y vísceras de animales expuestos al clenbuterol, causando intoxicaciones agudas (5), con presencia de síntomas como la aparición brusca de temblores musculares, palpitaciones, taquicardia, nerviosismo, cefaleas y mialgias; dichos síntomas tienen una duración de 40 h. (7, 8).

Existen diversos métodos analíticos para identificar y cuantificar al clenbuterol en muestras de tejido (hígado, músculo, riñón, córneas, etc.), los cuales están clasificados en métodos de detección y de identificación/cuantificación (o confirmativos) (3). Los de detección son generalmente ensayos inmunoenzimáticos cualitativos, mientras que los confirmativos se centran en el uso de la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) y la Cromatografía de Gases acoplado con Espectrometría de Masas (GC/MS/MS) (9, 10).

En México se han emitido Normas que prohíben el empleo del clenbuterol en la alimentación de los animales domésticos, así como su importación, comercialización, transportación y suministro en todo el territorio nacional (11, 12, 13). No obstante a su prohibición, se tiene conocimiento de su utilización en la engorda de ganado bovino, incluso se han detectado casos de intoxicación de humanos por el consumo de carne con contenido de clenbuterol en el área Metropolitana de la Ciudad de México, por lo que se requiere realizar un monitoreo de su posible presencia en la carne o hígado de bovino que se comercializa en esta zona. Es de enorme importancia que se establezcan procedimientos eficaces de detección de su uso, a fin de evitar que la carne, las vísceras y despojos comestibles lleguen al público consumidor. Por lo tanto, los objetivos de esta investigación fueron el establecimiento y estandarización de las técnicas de HPLC para determinar clenbuterol, así como hacer un diagnóstico de

su presencia en el tejido hepático del ganado bovino comercializado en la Ciudad de México.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Reactivos.** El estándar de clorhidrato de clenbuterol (CLB•HCl) se obtuvo de Sigma-Aldrich Chemical Company (pureza mínima 95%) (MO, EUA). Acetonitrilo e isopropanol fueron grado HPLC;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y  $\text{MgSO}_4$  fueron grado reactivo ACS. Se usó agua ultrapura Tipo I (Purelab Flex).

**Solución estándar.** Se preparó una solución madre de clorhidrato de clenbuterol disolviendo una cantidad apropiada del reactivo en agua ultrapura, para obtener una concentración de 1 mg/mL (aproximadamente), se guardó en oscuridad a 4°C. La concentración de CLB•HCl fue corregida por su pureza y contenido de sal, ya que el clenbuterol es el analito de interés y no CLB•HCl (14), por lo tanto, la concentración real en la solución madre fue de 839.56  $\mu\text{g/mL}$ . Las soluciones de trabajo (0.006 - 0.419  $\mu\text{g/mL}$ ) se prepararon el mismo día mediante diluciones graduales con fase móvil.

**Procedencia de las muestras.** Las muestras de hígado de bovino fueron colectadas de mercados públicos de la Ciudad de México durante los meses de julio y agosto de 2012. Las muestras se mantuvieron en congelación a -20°C hasta su análisis.

**Extracción.** Se pesaron  $5.0 \pm 0.1$  g de hígado homogeneizado. Se agregaron 4 mL de acetonitrilo y 2 mL de isopropanol y licuaron por 30 segundos. La mezcla se colocó en un tubo de centrifuga de 50 mL y se agregaron 1.2 g de  $\text{NaCl}$ , mezclándose en vortex por 2 minutos; luego se agregaron 4 g de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y 0.5 g de  $\text{MgSO}_4$  y mezclaron en vortex durante otros 2 minutos. Las muestras fueron centrifugadas durante 15 minutos a 2000 g. Se transfirió la totalidad del extracto a un matraz de fondo redondo de 50 mL y se rotoevaporó hasta sequedad. El residuo se disolvió en 1 mL de fase móvil, fue sonificado por 2 minutos y filtrado usando filtros de nylon de 0.45  $\mu\text{m}$ . Se tomaron 50  $\mu\text{L}$  de esta solución y se inyectaron al equipo de HPLC.

**Aparatos y equipos.** Se empleó un cromatógrafo de líquidos de alta resolución Hitachi Elite LaChrom equipado con un detector UV-VIS (L-2420), horno de columna (L-2300), automuestreador (L-2200) y una bomba cuaternaria (L-2130); limpiador ultrasónico Branson 2510R-MTH (Connecticut, EUA); rotavapor Büchi R-114 (Flawil, Suiza); vortex mezclador Velp Scientifica (Usmate, Italia); centrifuga IEC Centra-7 (Massachusetts, EUA); balanza analítica Shimadzu AUX 120 (Kyoto, Japón).

**Condiciones cromatográficas.** El análisis mediante HPLC se llevó a cabo usando el sistema Hitachi Elite LaChrom. Se usó el software EZChrom Elite 3.3.2 SP2 como sistema de adquisición de los datos. La separación cromatográfica se ejecutó en una columna analítica Restek Ultra C<sub>18</sub> (250mm x 4.6mm I.D., 5 µm) (Pennsylvania, EUA). La fase móvil fue NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.05M (pH 3.0)/acetonitrilo (85:15, v/v) y su tasa de flujo fue establecido a 1.0 mL/min. La longitud de onda del detector se estableció a 214 nm. La temperatura de la columna se mantuvo a 25°C.

### Identificación y cuantificación del clenbuterol

Para el establecimiento del procedimiento se evaluaron los indicadores de: selectividad o especificidad, linealidad de la curva de calibración, límite de detección (LD) y de cuantificación (LC), exactitud y precisión.

**Especificidad.** Se prepararon tres muestras de hígado de un mismo lote, a las cuales se les realizó el proceso de extracción descrito arriba. Dos de ellas fueron fortificadas, previo a la homogenización, con 10 y 125 ng/mL de clenbuterol, mientras que una muestra más no fue fortificada (blanco).

**Linealidad.** Se procesaron cinco concentraciones en un intervalo de 6.5-104.9 ng/mL del patrón de referencia por triplicado; se realizó un análisis de regresión entre el área y la concentración del analito para determinar la pendiente, el intercepto y el coeficiente de determinación. Para la determinación del límite de detección (LD) y cuantificación (LC) se procesaron curvas en el intervalo de la determinación (6.5-104.9 ng/mL) y cercana al límite de detección (3.28, 6.56 y 9.84 ng/mL) por triplicado en cada uno de los puntos. Se procedió a determinar los valores de límite de detección y límite de cuantificación y se consideraron tres y diez desviaciones estándares del blanco para  $n$  medidas individuales (ecuaciones 1 y 2).

$$LD = (Y_{bl} + 3S_{bl}) / b \quad (\text{ecuación 1})$$

$$LC = (Y_{bl} + 10S_{bl}) / b \quad (\text{ecuación 2})$$

Donde  $Y_{bl}$  es el estimado de la respuesta del blanco,  $S_{bl}$  es el estimado de la desviación estándar del blanco y  $b$  es la pendiente.

**Exactitud.** Se agregaron tres niveles de concentración de clenbuterol: 26.2, 104.9 y 209.8 ng/mL, por triplicado, en muestras de hígado y se determinó el porcentaje de recuperación por comparación de las cantidades teóricas con los valores determinados, aplicando la ecuación 3.

$$\text{Porcentaje de recuperación} = \frac{\bar{x}}{\hat{x}} \cdot 100 \quad (\text{ecuación 3})$$

Donde  $\bar{x}$  es el valor medio y  $\hat{x}$  el valor verdadero.

**Precisión.** Se estudió la repetibilidad mediante el procesamiento de tres réplicas de cada uno de tres lotes de hígado diferentes en condiciones óptimas (equipo, analista y lotes de reactivos idénticos), realizando su análisis en el mismo día. Se determinó la media y la desviación estándar ( $s$ ) para cada lote analizado, además del «estimador agrupado» de la desviación estándar ( $s_g$ ) y la desviación estándar relativa (RSD) mediante las ecuaciones 4 y 5.

$$s_g = \sqrt{\left(\frac{1}{N-k}\right) \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X}_i)^2} \quad (\text{ecuación 4})$$

$$RSD = \frac{s_g \cdot 100}{\bar{x}} \quad (\text{ecuación 5})$$

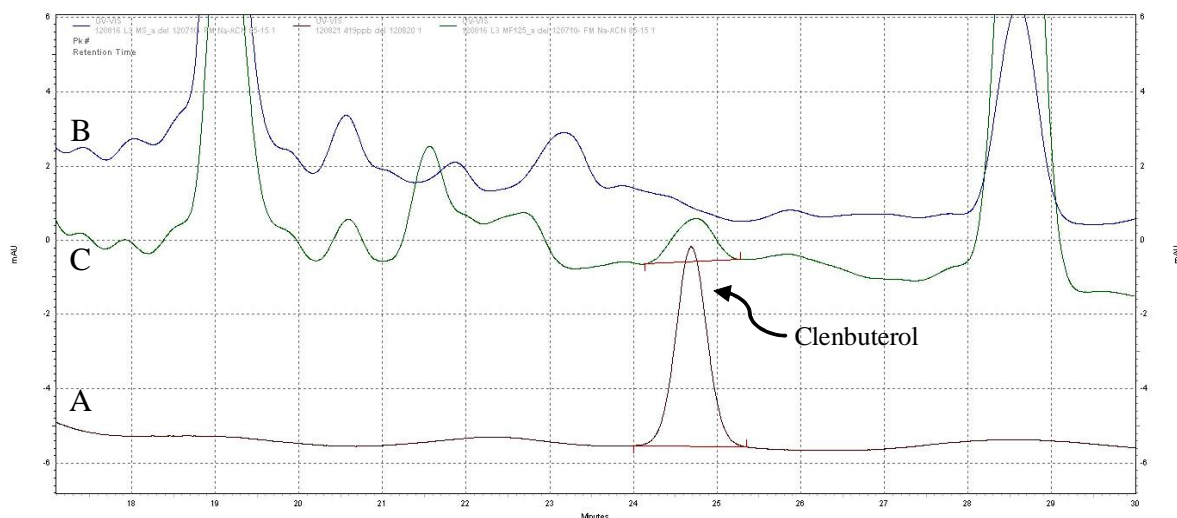
donde  $N$  es el número total de determinaciones,  $k$  el número de muestras,  $n$  el número de determinaciones sobre cada muestra,  $X_i$  el valor medido en el ensayo  $i$  y  $\bar{X}_i$  el estimador de la media poblacional  $\mu$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El establecimiento de las condiciones descritas en este artículo se basan en la metodología propuesta por la USDA (14) para la determinación de  $\beta$ -agonistas en tejidos de bovinos, con modificaciones realizadas de acuerdo a trabajos en los cuales emplearon detectores UV-VIS (1, 2, 15, 16). Para la obtención de los resultados, fueron probados diversos métodos de extracción, formulaciones de fase móvil, longitudes de onda en el detector UV y el uso de columna de extracción de fase sólida (C<sub>18</sub>) en la purificación. Debido a estas modificaciones, resulta fundamental llevar a cabo la validación previa de esta metodología, que permita confiar en los resultados, para lo cual se analizó la especificidad, la linealidad, los límites de detección y cuantificación, la exactitud y la precisión.

### Especificidad

Se realizó el proceso de extracción a una muestra de 5 g de hígado de bovino (blanco), que posteriormente fue analizada cromatográficamente como se describió previamente. El cromatograma fue guardado y comparado con las correspondientes a dos muestras de hígado fortificadas con 10 y 125 ng/mL de CLB, respectivamente. En la Figura 1 se muestra que con un tiempo de retención de 24.82 minutos para el CLB, ningún pico de la matriz interfiere con el  $\beta$ -agonista. La resolución tiene un valor de 1.1 respecto a los picos adyacentes, lo cual permite la identificación adecuada para el analito.



**FIGURA 1.** Perfil cromatográfico de hígado de bovino (blanco (B) y fortificado (C)) respecto al estándar de clenbuterol (A), empleando un sistema de HPLC con columna de fase reversa C18./ *Chromatographic profile of liver bovine (blank (B) and fortified (C) samples) with regard to the clenbuterol pattern (A), using a HPLC system with column of reverse phase C18.*

Los análisis de selectividad permiten garantizar que el CLB se determine de manera confiable, descartando la posibilidad de falsos positivos por la presencia de interferencia de los constituyentes de la matriz empleada en la prueba o debido a elementos derivados de la descomposición (17, 18).

#### Linealidad, límite de detección y de cuantificación

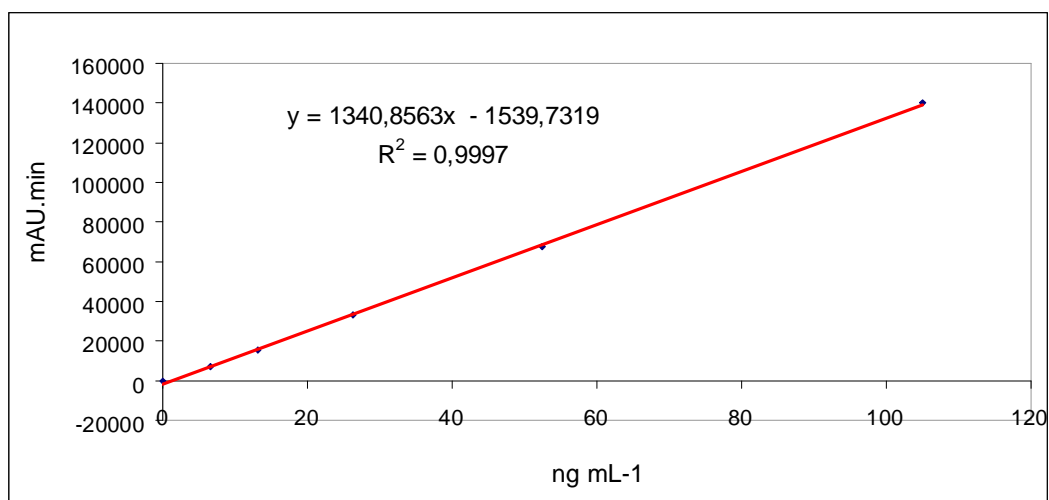
La linealidad del método en el intervalo de 6.5-104.9 ng/mL, presentó un coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de 0.9997 ( $p < 0.05$ ) y la ecuación de la recta de mejor ajuste de la curva de calibración del estándar fue  $y = 1340.8563x - 1539.7319$  (Figura 2). Se corroboró la

linealidad de la curva al aplicar la prueba *t de Student* (17), rechazándose la hipótesis nula (la no correlación entre  $X$  y  $Y$ ), por lo que la correlación lineal es significativa.

Los límites de detección (LD) y de cuantificación (LC) mostraron valores de 0.9 y 1.8 ng/mL, respectivamente.

#### Exactitud

La recuperación media del clenbuterol fue de 111.7, 82.0 y 84.8% para los tres niveles probados (Tabla 1). Estos valores se consideran aceptables, dado que en



**FIGURA 2.** Curva de calibración de clenbuterol disuelta en fase móvil ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.05M (pH 3.0)/ $\text{CH}_3\text{CN}$  (85:15, v/v))./ *Calibration curve of clenbuterol dissolved in mobile phase ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.05M (pH 3.0)/ $\text{CH}_3\text{CN}$  (85:15, v/v)).*

el análisis de trazas no siempre se alcanzan recuperaciones tan elevadas y se consideran habituales valores de recuperación entre el 60 y 80% (17, 18).

### Precisión

Muestras de hígado de tres lotes diferentes fueron extraídas y analizadas por triplicado, bajo condiciones de igualdad del equipo, analista y lotes de reactivos idénticos. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 2.

Uno de los factores que más pueden influir en la repetibilidad del método de análisis es la concentración del analito, ya que la desviación estándar de las respuestas obtenidas aumenta al disminuir la concentración del analito (18). Para el análisis de impurezas, la AOAC (Association of Official Analytical Chemists) propone una serie de valores límite de desviaciones estándar relativos (RSD) del método en función de la concentración del analito, de tal manera que al trabajar con niveles entre 1 ppm y 100 ppb, los RSD aceptables son 11 y 15%, respectivamente (18), por lo tanto, los resultados obtenidos en esta investigación (RSD = 4.74%) cumplen las especificaciones establecidas.

### Aplicación del método

Se colectaron 17 muestras de hígado de bovino en mercados públicos de la Ciudad de México, se trataron de acuerdo a la metodología descrita arriba para la extracción del clenbuterol y se analizaron mediante HPLC.

Como puede verse en la Tabla 3, de acuerdo a la metodología establecida en esta investigación, en 11 muestras de hígado de bovino se detectaron niveles superiores de clenbuterol a los LMR establecidos por el *Codex Alimentarius* de la FAO, que es de 0.6 ng/g para hígado (10). Dado que la carne de bovino forma parte de la dieta integral del mexicano, se han establecido medidas preventivas que buscan desalentar a los productores sobre el uso de clenbuterol en la engorda de ganado (19). Sin embargo, de acuerdo a los resultados obtenidos, es una realidad que el empleo ilegal de esta sustancia durante la engorda, continúa siendo una práctica común por parte de algunos productores.

La utilización ilegal del clenbuterol en la producción animal, ha ocasionado severos casos de envenenamiento por el consumo de alimentos contaminados. Existen reportes en los que se han encontrado concentraciones hasta de 9.8 mg/kg (ppm) en hígados de bovinos, incluso después de 16 días de retiro de la droga (3). Estos elevados niveles de clenbuterol en el animal, sin duda que llegarán a manifestar los efectos farmacológicos en la población humana que pudiera consumirlo, lo cual subraya la necesidad de desarrollar métodos de detección apropiados y sistemas de control.

El uso del clenbuterol con fines de engorda de ganado no es permitido a nivel internacional; sin embargo, se han reportado casos de envenenamiento humano por esta sustancia debido a su presencia en hígado

**TABLA 1.** Porcentajes de recuperación en muestras de hígado de bovino contaminadas artificialmente con clenbuterol./ *Recovery percentages of bovine liver samples artificially contaminated with clenbuterol.*

Valor teórico (µg/g)	Valor obtenido (µg/g)	Recuperación (%)	RSD** (%)
26.24	29.3±2.3	111.7±8.6	7.7
104.9	86.0±5.0	82.0±4.8	5.8
209.8	178.0±5.2	84.8±2.5	2.9
Media±s*		94.2±15.4	16.4

\* Desviación estándar (s)

\*\* Desviación estándar relativa (RSD)

**TABLA 2.** Resultados del estudio de precisión en condiciones óptimas de extracción./ *Results of the precision study at optimal conditions of extraction.*

	Lote A	Lote B	Lote C	Estimador agrupado de s
Media	1004215	609656	626336	746736
s*	56308	20273	13579	
RSD**	5.6	3.3	2.2	<b>4.74</b>
Rango crítico				
S <sub>α</sub>				35431

\* Desviación estándar (s)

\*\* Desviación estándar relativa (RSD)

**TABLA 3.** Niveles de clenbuterol presentes en hígados de bovino extraídos y analizados por HPLC./ *Clenbuterol levels in bovine livers extracted and analyzed by HPLC.*

Muestra	Media (ng/g)	s**	RSD***
L1	0.57	0.02	3.75
L2	0	nd*	nd
L3	0	nd	nd
L4	0	nd	nd
L5	150.02	8.40	5.60
L6	0.56	0.01	2.06
L7	6.39	0.21	3.32
L8	17.68	0.05	0.28
L9	92.61	3.80	4.11
L10	13.11	0.42	3.21
L11	10.65	0.58	5.43
L12	38.10	8.25	21.65
L13	10.24	1.85	18.07
L14	88.38	8.88	10.05
L15	93.15	2.59	2.78
L16	0.53	0.02	3.01
L17	6.50	0.57	8.77

\*nd: no determinado

\*\* Desviación estándar (s)

\*\*\* Desviación estándar relativa (RSD)

de bovino, tal es el caso de lo ocurrido en España en 1990, afectando a 135 personas que sufrieron los síntomas característicos de esta contaminación. En este caso se encontró que los residuos de clenbuterol oscilaron entre 160 a 291  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (ppb) de hígado fresco (3, 20, 21).

Como antecedentes en la determinación del  $\beta$ -agonista en México, se encuentra reportado un trabajo llevado a cabo en Yucatán en 2005 (5), en el cual no encontraron residuos de clenbuterol en el hígado de 138 bovinos sacrificados en el rastro municipal de Mérida y en el de la FMVZ-UADY. No obstante, en 2008, Estrada-Montoya *et al.* (22) hallaron residuos de clenbuterol en carne de bovino obtenida en mercados del Estado de Sonora, con valores de hasta 6.12  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

Se han reportado los efectos adversos en humanos, después de la ingestión de clenbuterol a una dosis oral de 10  $\mu\text{g}$  por persona, cuatro veces diarias. El consumo de 100 g de hígado contaminado con clenbuterol en las concentraciones de las muestras contaminadas (160 a 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), podría exceder el nivel de efecto farmacológico que es de 5  $\mu\text{g}$  por persona (3).

De acuerdo a los resultados obtenidos en la validación de este método, es posible establecer que es exacto y confiable en la determinación y cuantificación de clenbuterol, debido al bajo límite de detección, buen

grado de separación cromatográfica, precisión, exactitud y sensibilidad.

Con la simplicidad de este método en el pretratamiento de las muestras, es posible determinar y cuantificar de manera práctica los niveles de clenbuterol en hígado de bovino mediante HPLC con detector UV. También permite el ahorro de muchos de los reactivos usados respecto a otros métodos de extracción.

Los niveles de clenbuterol encontrados en algunas muestras de hígado de la presente investigación alertan sobre un posible problema de salud pública en la Ciudad de México.

## AGRADECIMIENTOS

Esta investigación se realizó gracias al otorgamiento de una Beca de Estancia Posdoctoral por parte de la Rectoría de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, en la convocatoria de julio de 2011.

## REFERENCIAS

1. Lin-Ying C, Shin-Shou C, Deng-Fwu H. High performance liquid chromatography to determine animal drug clenbuterol in pork, beef and hog liver. *J Food Drug Anal.* 2005;13(2):163-167.

2. Baomi L, Hongyuan Y, Fengxia Q, Yuru G. Determination of clenbuterol in porcine tissues using solid-phase extraction combined with ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction and HPLC-UV detection. *J Chromatogr B*. 2011;879:90-94.
3. Kuiper HA, Noordam MY, Van Dooren-Flipsen MMH, Schilt R, Roos AH. Illegal use of  $\beta$ -adrenergic agonists: European Community. *J Anim Sci*. 1998;76:195-207.
4. Sumano LH, Ocampo CL, Gutiérrez OL. Clenbuterol and other  $\beta$ -agonists, are they an option for meat production or a threat for public health? *Vet Mex*. 2002;33(2):137-159.
5. Ortiz-Borges J, Alcocer-Vidal V, Castellanos-Ruelas A. The gas/mass method for clenbuterol determination and quantification in bovines from two abattoirs. *Tec Pecu Mex*. 2005;43:57-67.
6. Waldeck B, Widmark E. Steric aspects of agonism and antagonism at beta-adrenoceptors: experiments with the enantiomers of clenbuterol. *Acta Pharmacol Toxicol*. 1985; 56(3):221-227.
7. Villar-Pastor C. Modificaciones del timo de becerros tratados con clenbuterol para el consumo humano. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba. Facultad de Medicina. 2005. Págs. 56-71.
8. Ku-Vera J. Clenbuterol: su uso en medicina veterinaria y producción animal. *Bioagrociencias*. 2011;4(1):49-52.
9. NOM-004-ZOO-1994. Proyecto de modificación a la Norma Oficial Mexicana. Grasa, hígado, músculo y riñón en aves, bovinos, caprinos, cérvidos, equinos, ovinos y porcinos. Residuos tóxicos. Límites máximos permisibles y procedimientos de muestreo. *Diario Oficial de la Federación*. 12 de mayo de 2011.
10. CAC/LMR 2. Compendio de métodos de análisis identificados como idóneos para respaldar los LMR del Codex. Comisión del Codex Alimentarius. 2011.
11. NOM-061-ZOO-1999. Norma Oficial Mexicana. Especificaciones zoonosológicas de los productos alimenticios para consumo animal. *Diario Oficial de la Federación*. 11 de octubre de 2000.
12. NOM-EM-015-ZOO-2002. Norma Oficial Mexicana de Emergencia. Especificaciones técnicas para el control del uso de beta-agonistas en los animales. *Diario Oficial de la Federación*. 01 de Marzo de 2002.
13. NOM-194-SSA1-2004. Norma Oficial Mexicana. Productos y servicios. Especificaciones sanitarias en los establecimientos dedicados al sacrificio y faenado de animales para abasto, almacenamiento, transporte y expendio. Especificaciones sanitarias de productos. *Diario Oficial de Federación*. 18 de septiembre de 2004.
14. USDA. Screening and confirmation of beta-agonists by HPLC/MS/MS – CLG-AGON1.04. United States Department of Agriculture- Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health Science. 2012.
15. Lawrence JF, Ménaud C. Determination of clenbuterol in beef liver and muscle tissue using immunoaffinity chromatographic cleanup and liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection. *J Chromatogr B*. 1997;696:291-297.
16. Wan-Hua Y, Wen-Ting L, Qin F, Gui-Liang C. Determination of clenbuterol-like  $\beta$ -agonist residues in hair. *LC GC N Am*. 2011;29(7):600.
17. Quattrocchi OA, Abelaira de AS, Laba RF. Introducción a la HPLC: Aplicación y práctica. Ed. Artes Gráficas Farro SA. Buenos Aires. 1992. Págs: 301-328.
18. AEFI. Validación de métodos analíticos. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. Sección Catalana de AEFI. 2001.
19. [www.senasica.gob.mx](http://www.senasica.gob.mx). Generalidades del clenbuterol. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Noviembre de 2009. Fecha de revisión: 16 de enero de 2012. Disponible en: <http://www.senasica.gob.mx/includes/asp/download.asp?IdDocumento=15984&IdUrl=22607>
20. Martínez-Navarro JF. Food poisoning related to the consumption of illicit  $\beta$ -agonists in liver. *The Lancet*. 1990;336:1311.
21. Pulce C, Lamaison D, Keck G, Bostvironnois C, Nicolas J, Descotes J. Collective human food poisonings by clenbuterol residues in veal liver. *Vet Hum Toxicol*. 1991;33:480-481.
22. Estrada-Montoya MC, Gonzalez-Cordova A, Torrescano G, Camou J, Vallejo-Cordova B. Monitoreo y confirmación de la presencia de residuos de clenbuterol en carne de bovino comercializada en el Noroeste de México. *Cienc Tecnol Aliment*. 2008;6(2):130-136.

Recibido: 28-8-2012.

Aceptado: 13-2-2013.