

Determinación de clenbuterol por el método de gases/masas y su cuantificación en bovinos sacrificados en dos rastros

The gas/mass method for clenbuterol determination and quantification in bovines from two abattoirs

Julio C. Ortiz Borges^a, Víctor M. Alcocer Vidal^a, Arturo F. Castellanos Ruelas^a

RESUMEN

Los objetivos fueron estandarizar la técnica de cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas (CG/EM) para determinar clenbuterol, y diagnosticar su presencia en tejido hepático de ganado bovino sacrificado en los dos rastros más importantes de la ciudad de Mérida, Yucatán, México. Para la estandarización de la técnica se utilizó clorhidrato de clenbuterol en los siguientes procedimientos analíticos: detección del estándar; cálculo del límite de detección del equipo y del método, así como el límite de cuantificación del método; repetibilidad del método; porcentaje de recuperación de clenbuterol. Para el análisis de hígado, se muestrearon animales sacrificados en el rastro de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia la UADY (n=50) y en el rastro municipal de la ciudad de Mérida (n=88). Se utilizó un diseño aleatorio estratificado. El límite de detección de clenbuterol del equipo fue 113.2 ng y el del método 0.55 ppm; el límite de cuantificación del método fue 2.76 ppm. Se encontró un coeficiente de variación en el análisis de clenbuterol inferior al 5%. El porcentaje de recuperación fue de 90.2 %. No se encontró clenbuterol en los hígados analizados. Se concluye que la técnica de CG/EM resultó efectiva para detectar clenbuterol, y que los ganaderos que proporcionaron los bovinos que se sacrificaron en los dos rastros durante el período de muestreo, no utilizaron clenbuterol.

PALABRAS CLAVE: Clenbuterol, Hígado bovino, Gases-masas.

ABSTRACT

A methodology was established and standardized to determine clenbuterol presence using gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS), and it was applied to analyze for clenbuterol presence in liver tissue of bovines slaughtered in two abattoirs in Mérida, Yucatan, Mexico. To standardize the methodology, a standard clenbuterol chlorhydrate sample was run; the equipment's minimum detection and quantification limits were determined; method repeatability was confirmed; and percentage of clenbuterol recovered was calculated. Liver samples were taken from animals slaughtered in the Faculty of Veterinary Medicine abattoir (n= 50) and the Merida municipal abattoir (n= 88). A randomized experimental design was used. Equipment detection limit was 113.2 ng. Method detection limit was 0.55 ppm and quantification limit was 2.76 ppm. The variation coefficient was lower than 5 %. Clenbuterol recovery was 90.2 %. All liver sample analyses produced negative results for clenbuterol, indicating that clenbuterol was not administered to the sampled animals before or during the sampling period. The results establish the GC/MS method as a reliable method for clenbuterol detection.

KEY WORDS: Clenbuterol, Bovine liver, Gas chromatography.

El clenbuterol es una sustancia β -agonista del grupo de los b-adrenérgicos. Tiene efectos de promoción sobre la masa muscular, de reducción de la cantidad de grasa corporal y también manifiesta un impacto sobre el aparato respiratorio y el circulatorio^(1,2).

Clenbuterol is a β -agonist of the b-adrenergic group used as a growth promoter in farm animals for promoting muscular growth, reducing body fat and its effects on the respiratory and circulatory systems^(1,2). It is also known as the "distribution

Recibido el 6 de mayo de 2004 y aceptado para su publicación el 21 de junio de 2004.

^a Facultad de Ingeniería Química. Universidad Autónoma de Yucatán. Av. Juárez # 421. Ciudad Industrial. 97244. Mérida, Yuc. cruelas@tunku.uady.mx. Correspondencia al tercer autor

Se ha utilizado como promotor del crecimiento en animales de granja. Se le denomina “agente de repartición” ya que fomenta la síntesis proteínica, debido a que los β -agonistas pueden incrementar el flujo sanguíneo a ciertas regiones del cuerpo, propiciando hipertrofia y neoformación muscular⁽³⁾.

Las funciones fisiológicas del clenbuterol en los animales van de acuerdo con las demandas recientes por parte de los consumidores de disponer de carne magra⁽⁴⁾. Desde el principio de los años 80's se investigaron y utilizaron los β -agonistas para tal fin, disminuyendo los costos de producción. Se reportaron ganancias de peso muy elevadas en bovinos en engorda y un incremento notorio en el rendimiento en canal⁽²⁾.

Después de popularizarse su uso, se empezó a descubrir que tenía efectos secundarios en el consumidor de la carne de animales expuestos al β -agonista, causando intoxicaciones agudas⁽⁵⁾. Debido a lo anterior, a partir de 1988, se consideró ilegal el uso de este compuesto en los Estados Unidos, Canadá y Europa⁽⁶⁾; sin embargo ha continuado usándose ilícitamente; es por ello que se han presentado casos de intoxicación en humanos en varios países, de Norte América⁽⁶⁾ y Europa⁽⁷⁾. Recientemente, en el año 2003, en Portugal se encontraron concentraciones de entre 1.42 y 4.5 mg/kg de clenbuterol en hígado de bovino, lo cual fue causa de intoxicaciones⁽⁸⁾.

El gobierno de México desde 1999 emitió la Norma Oficial Mexicana-NOM-061-ZOO-1999⁽⁹⁾, que prohibió su empleo en el país. No obstante su prohibición, se han presentado casos de intoxicación. La Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios de la Secretaría de Salud informó de 136 personas afectadas por consumir carne y vísceras de animales alimentados con clenbuterol⁽¹⁰⁾. Los casos se concentraron en siete estados del centro de país y en el D.F.

En la Norma Mexicana NOM-EM-015-ZOO-2002⁽¹¹⁾, se mencionan los métodos analíticos para realizar la identificación del clenbuterol: ensayo inmuno enzimático (Elisa) (cualitativo), cromatografía de gases y cromatografía de líquidos

agent” because β -agonists can foment protein synthesis by increasing blood flow to certain parts of the body, leading to hypertrophy and muscular neoformation⁽³⁾.

These physiological functions coincide with recent consumer demand for leaner meats⁽⁴⁾. To meet these demands, research began in the early 1980's on β -agonists, which were eventually used in livestock systems to reduce production costs. Their use lead to high weight gain in growing bovines and a notable increase in carcass yield⁽²⁾. After its use became widespread, however, it was discovered to have secondary effects in consumers exposed to meat from animals given β -agonists, resulting in acute intoxication⁽⁵⁾. This lead to its eventual prohibition in 1988, in Canada, Europe and the United States; though it is still used illegally. This illicit use has caused intoxications in North America⁽⁶⁾ and Europe⁽⁷⁾, and as recently as 2003 (clenbuterol concentrations between 1.42 and 4.5 mg/kg in beef liver) in Portugal⁽⁸⁾.

Mexico responded to potential clenbuterol intoxication from meat by passing official regulations prohibiting its use (NOM-061-ZOO-1999)⁽⁹⁾, though cases of intoxication have continued to occur. Indeed, in Spring 2002, the Federal Commission for Sanitary Risk Protection (Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios de la Secretaría de Salud) reported 136 intoxication cases from consumption of the meat and organs of animals administered clenbuterol⁽¹⁰⁾. These cases largely occurred in seven states in central Mexico and Mexico City.

This same year a law was passed (NOM-EM-015-ZOO-2002)⁽¹¹⁾ indicating the analytical methods to be used for clenbuterol detection, including enzymatic immune assay (ELISA; qualitative), gas chromatography and high resolution liquid chromatography. Though not included in this law, gas chromatography coupled to mass spectrometry has also been recommended as a trustworthy quantitative method⁽¹²⁾. Sampling sites for clenbuterol detection are the liver, eyes and hair⁽¹³⁾.

To date, no cases of human clenbuterol intoxication have been reported in the state of Yucatan, Mexico,

de alta resolución. Otro método, el de cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas (CG/EM) es recomendado por algunos autores por ser un método cuantitativo confiable⁽¹²⁾. Los sitios de muestreo para detectarlo son el hígado, lo mismo que el globo ocular o el pelo⁽¹³⁾.

En el estado de Yucatán no se han registrado oficialmente casos de intoxicación de humanos, pero se requiere realizar muestreos para detectar la posible presencia de clenbuterol. Por lo tanto, los objetivos de este trabajo fueron establecer y estandarizar la técnica de CG/EM para determinar clenbuterol, así como hacer un diagnóstico de su presencia en el tejido hepático del ganado bovino sacrificado en los dos rastros más importantes de la ciudad de Mérida, Yuc.

Primeramente se procedió a montar y estandarizar la técnica de CG/EM para cuantificar la presencia de clenbuterol, y posteriormente se analizaron muestras de hígado bovino procedentes de los rastros.

Montaje y estandarización de la técnica de CG/EM

Se utilizó la técnica propuesta por Wilson *et al.*⁽¹²⁾, modificada de la siguiente manera: no se utilizó la solución de fosgeno al 20%, debido a que es un reactivo muy peligroso, restringido por las autoridades; la omisión de una filtración en el tratamiento de la muestra ya que se perdía parte de ella al realizarlo y el empleo de un estándar interno para la cuantificación. El método de extracción ha sido descrito previamente⁽¹⁴⁾.

Se utilizó un cromatógrafo de gases marca Agilent Technologies modelo 6890N acoplado con espectrómetro de masas marca Agilent modelo 5973N. Se utilizó una columna modelo HP 5MS de 30 μm de longitud x 250 μm de diámetro y 0.25 mm de recubrimiento interno de fenilmetilsiloxano al 5%, utilizando como fase móvil gas helio con un flujo constante de 1.8 ml, con una presión de 13.72 libras por pulgada cuadrada y una velocidad de 48 cm/seg. La temperatura del inyector fue de 260 °C; el modo de inyección de 1.2 μl de solución problema fue "splitless". Las condiciones de temperatura del horno fueron 150 °C de temperatura inicial por 1 min, con incremento

but it is a livestock-producing region and thus requires regular sampling to detect the potential presence of clenbuterol and comply with public health regulations. In response, this study established and standardized the gas chromatography/mass spectrometer (GC/MS) method for clenbuterol determination and applied it to detection of clenbuterol in the liver of bovines slaughtered in the two largest abattoirs in the city of Merida.

Implementing and standardizing the GC/MS technique

The technique proposed by Wilson *et al.*⁽¹²⁾ was used, modified as follows: the 20% phosgene solution was not used as it is a highly dangerous, controlled reagent; the sample was not filtered as it led to loss of part of the sample and prevented use of an internal standard for quantification. The extraction method has been reported previously⁽¹⁴⁾.

Samples were processed using a gas chromatographer coupled (Agilent Technologies model 6890N) to a mass spectrometer (Agilent model 5973N). The column (model HP 5MS) was 30 cm long x 250 mm in diameter with 0.25 mm of 5% phenylmethylsiloxane internal covering. The mobile phase was helium gas at a constant flow of 1.8 ml, 13.72 lb/in² pressure and 48 cm/sec speed. Injector temperature was 260 °C and a "splitless" injection mode was used for 1.2 μl of problem solution. Oven temperature was initially 150 °C for 1 min followed by a gradual increase of 30 °C/min to a final temperature of 300 °C for 2.5 min.

Technique standardization was done using a series of tests and procedures:

a) Detection of clenbuterol standard and equipment detection standard. Briefly, clenbuterol chloride standards (Sigma C-5423) were prepared, diluted in toluene and analyzed to determine the equipment's minimum detection limit. Sample concentrations were 0.001, 0.01, 0.025, 0.05, 0.5 and 1mg/ml of clenbuterol, and the detection limit was determined using the formulas in the following section.

The samples with low clenbuterol concentrations (0.001, 0.01, 0.025 and 0.05 mg/ml) were not detected by the chromatograph, but higher

gradual de temperatura de 30 °C/min y una temperatura final de 300 °C por 2.5 min.

Se realizaron una serie de pruebas y procedimientos para la estandarización de la técnica, las cuales se mencionan a continuación:

a) Detección de estándar de clenbuterol y límite de detección del equipo. Se prepararon estándares de clorhidrato de clenbuterol (marca Sigma # de catálogo C-5423), diluidos en tolueno, y se analizaron para determinar la mínima concentración detectada por el equipo. Las concentraciones de las muestras fueron las siguientes: 0.001, 0.01, 0.025, 0.05, 0.5 y 1 mg/ml de clenbuterol. El límite de detección se obtuvo empleando las fórmulas que se presentan en el apartado “b”.

Las muestras con concentraciones menores del estándar de clenbuterol (0.001, 0.01, 0.025 y 0.05 mg/ml) no fueron detectadas por el cromatógrafo, mientras que las muestras de concentración mayor (0.5 y 1 mg/ml) sí fueron detectadas. El resultado se encuentra en la Figura 1, en donde se aprecia con claridad el pico. El compuesto detectado fue el registrado en la biblioteca del CG/EM con la referencia siguiente: Clenbuterol 34777 037148-27-9 87.

concentration samples (0.5 and 1 mg/ml) were detected (Figure 1). The detected compound was that recorded in the GC/MS library under reference Clenbuterol 34777 037148-27-9 87.

The result of an analysis of a liver sample added with clenbuterol (1 mg/ml) was similar to that for the clenbuterol standard, indicating that this compound was recovered in the technique using liver tissue (Figure 2). Figure 3 shows clenbuterol fragments identified with the masses 86 and 127 M/Z (reference spectrum stored in GC/MS equipment Nist 98 library, noted in lower portion). The equipment detection limit was calculated as 113.2 ng.

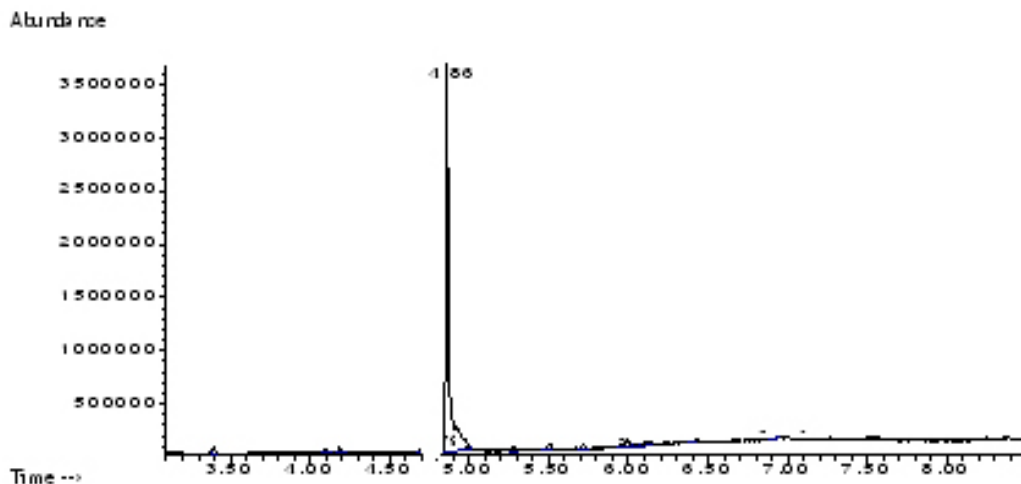
b) Detection limit and quantification method. Briefly, 100 µl of 0.2 mg/ml clenbuterol clorhydrate standard was added to a 10 g sample of liver tissue and the mixture analyzed using the above method. The detection and quantification limits were determined using the origin ordinate of the calibration curve⁽¹⁵⁾. The value of the origin ordinate was then used to determine the area of the value (y) in the detection limit:

$$y = (F)(S_{x/y}) + y_B$$

where:

Figura 1. Cromatograma de un estándar de clenbuterol (1 mg/ml) mediante la técnica de CG/EM

Figure 1. Chromatogram of clenbuterol standard (1 mg/ml) using GC/MS



El resultado de un análisis de clenbuterol añadido (1 mg/ml) a una muestra de hígado se observa en la Figura 2. El cromatograma obtenido es muy similar al estándar de clenbuterol, lo cual indica que en la técnica empleando tejido hepático añadido con clenbuterol, se recupera este compuesto. En la Figura 3 se presenta el espectro de masas del análisis del clenbuterol cuyos fragmentos se identifican con las masas 86 y 127 M/Z, mostrándose en la parte inferior el espectro de referencia almacenado en la biblioteca Nist 98 del equipo CG/EM, correspondiente a la misma sustancia. Con base en la información anterior, el límite de detección del equipo se calculó en 113.2 ng.

b) Límite de detección y cuantificación del método. De un estándar de clorhidrato de clenbuterol de concentración de 0.2 mg/ml, se tomaron 100 µl y se adicionaron a una muestra de 10 g de hígado, analizándose con la metodología referida previamente. Los límites de detección y de cuantificación del método se obtuvieron utilizando la ordenada en el origen de la curva de calibración⁽¹⁵⁾.

y = area in detection limit

$S_{y/x}$ = xy typical error

Y_B = b (origin ordinate)

F = 2 for detection limit

F = 10 for quantification limit

The detection limit was produced by substituting the “y” value in the line equation for each analyte.

$$Y = a + bx$$

The xy typical error was calculated with the formula:

$$S_{y/x} = \left[\frac{1}{n(n-2)} \left[n \sum y^2 - (\sum y)^2 - \frac{[n \sum xy - (\sum x)(\sum y)]^2}{n \sum x^2 - (\sum x)^2} \right] \right]^{1/2}$$

The detection limit and quantification method analysis (Figure 4) showed a clear clenbuterol signal at 0.2 mg/ml concentration, which was identified in the equipment report. Lower concentrations did not have a clear signal. The detection limit of this method was 0.55 ppm and the quantification limit was 2.76 ppm.

Figura 2. Cromatograma de un estándar de clenbuterol adicionado (1 mg/ml) a tejido hepático utilizando la técnica de CG/EM

Figure 2. Chromatogram of clenbuterol standard (1 mg/ml) added to liver tissue using GC/MS

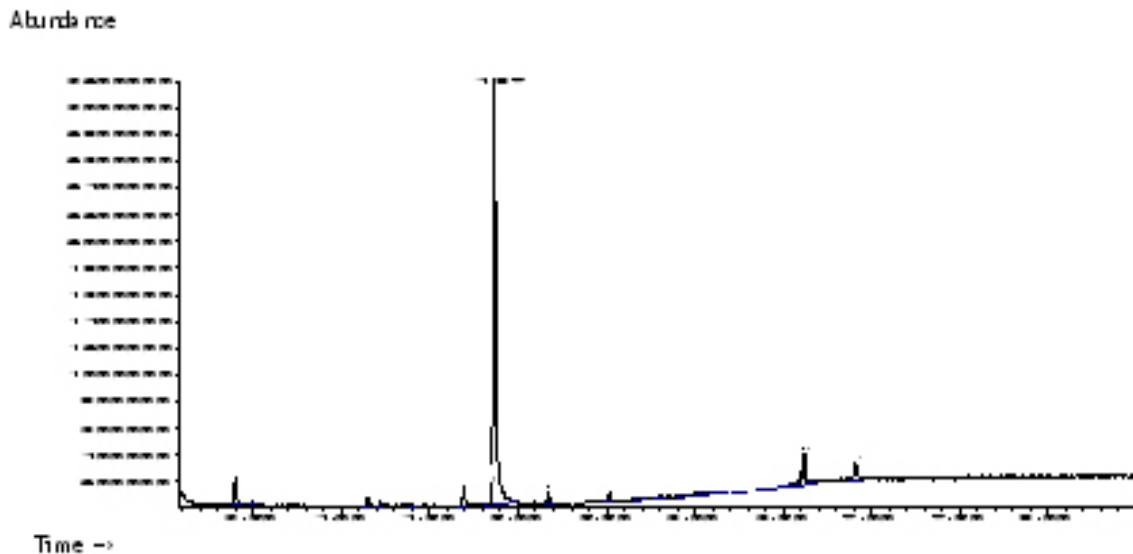
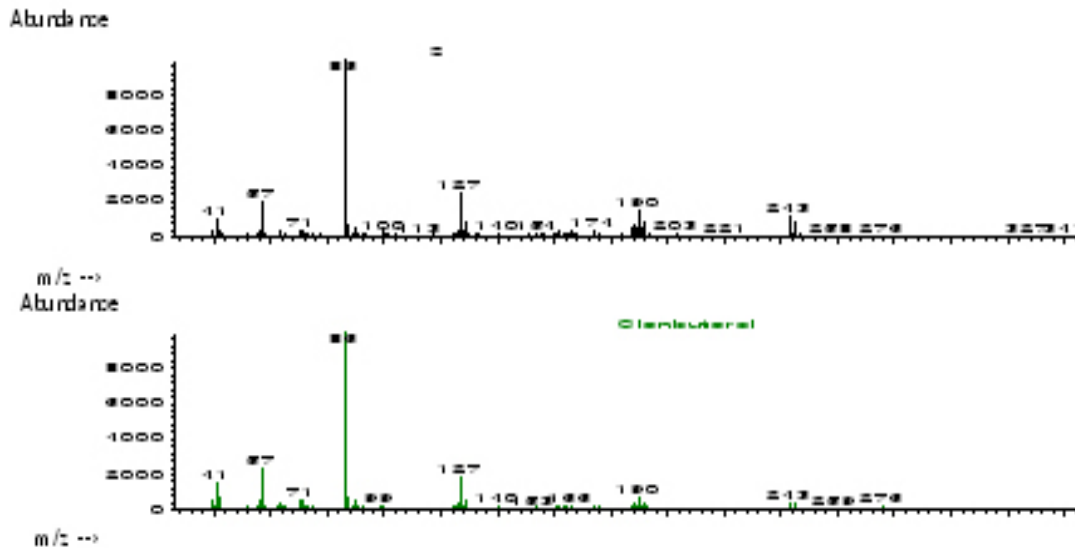


Figura 3. Comparación del espectro de masas del compuesto detectado, con la referencia interna del equipo de CG/EM identificada como clenbuterol

Figure 3. Comparison of mass spectrum of detected compound; internal GC/MS equipment reference identified as clenbuterol



Posteriormente el valor de la ordenada en el origen se utilizó para determinar el valor de la área (y) en el límite de detección.

$$y = (F)(S_{x/y}) + y_B$$

donde:

y = área en el límite de detección

$S_{y/x}$ = Error típico xy

Y_B = b (ordenada en el origen)

F = 2 para límite de detección

F = 10 para límite de cuantificación

Sustituyendo el valor de “y” en la ecuación de la recta para cada analito se obtuvo el límite de detección. $Y = a + bx$

El error típico xy se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$S_{y/x} = \left[\left[\frac{1}{n(n-2)} \right] \left[n \sum y^2 - (\sum y)^2 - \frac{[n \sum xy - (\sum x)(\sum y)]^2}{n \sum x^2 - (\sum x)^2} \right] \right]^{1/2}$$

c) Method repeatability. A clenbuterol standard was added to an extraction made from a liver sample and this mixture injected into the chromatograph for detection. Four injections were made from the same sample for identification of the detected areas of the compound and these were used to calculate the variation coefficient. This same procedure was repeated five days later to compare results between the repetitions and determine sample repeatability.

The first series of four injections produced a variation coefficient of 4.4 %, while the second series done 5 d later produced a 4.9 % coefficient. This indicated that the method consistently quantified the added clenbuterol.

d) Recovery percentage. Briefly, 100 µl of 1 mg/ml clenbuterol standard was evaporated, redissolved in 20 µl toluene, and this mixture injected into the chromatograph. Immediately afterward, material was injected from a 10 g liver sample containing 100 µl of 1 mg/ml clenbuterol standard. This procedure was done four times to generate an average. The standard without added sample had

El resultado del análisis para determinar los límites de detección y cuantificación del método se muestra en la Figura 4. En el recuadro se indica una señal clara del compuesto (clenbuterol) a una concentración de 0.2 mg/ml, el cual fue identificado en el reporte del equipo. Concentraciones menores no presentaron señal clara en el cromatograma. El límite de detección del método fue de 0.55 ppm y el de cuantificación de 2.76 ppm.

c) Repetibilidad del método. Se llevó a cabo una extracción tomando una muestra de hígado, al cual se le añadió el estándar de clenbuterol, para posteriormente inyectarla en el cromatógrafo y realizar su detección; la inyección se realizó cuatro veces tomando la misma muestra, para posteriormente identificar las áreas detectadas del compuesto y con ellas obtener el coeficiente de variación; este mismo procedimiento se realizó cinco días después, para comparar los resultados y observar la repetibilidad de la muestra.

Con el resultado obtenido de las primeras cuatro inyecciones se calculó un coeficiente de variación de 4.4 %. En la repetición de las inyecciones cinco

an average area of 4615050 abundance while the standard with sample had an average area of 4164460, meaning recovery percentage was 90.2 %.

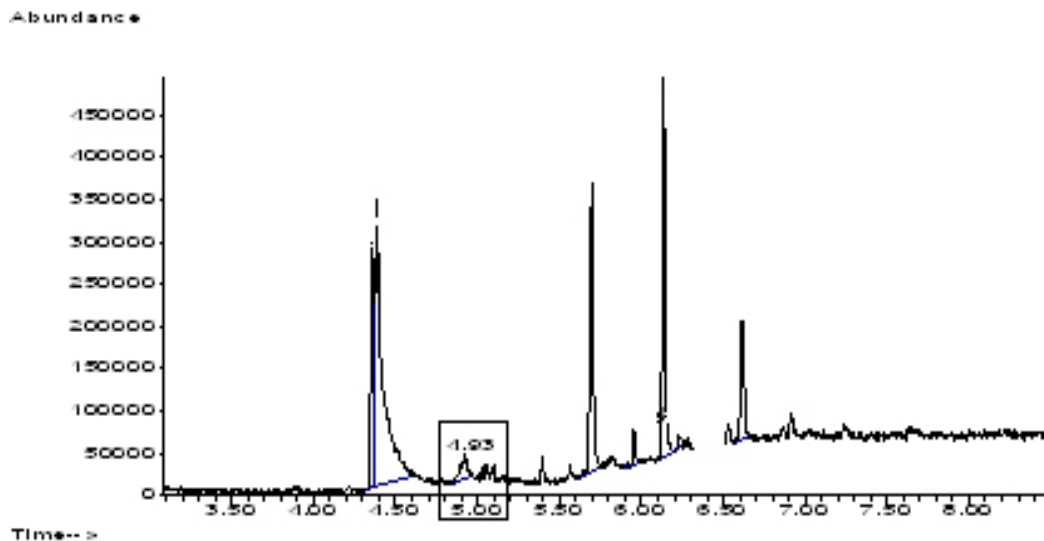
e) Calibration curve. A concentration curve was made to quantify clenbuterol presence should one of the liver samples result positive. The curve was generated using standards with 0.1, 0.2, 0.5, 0.7 and 1 mg/ml concentrations. A correlation of 0.99 was calculated, indicating a highly significant ($P < 0.01$) correlation between the analyzed points. The sample containing the 0.1 mg/ml clenbuterol standard was detected, but the peak area did not register.

Analysis of bovine liver samples

Liver samples were taken from animals slaughtered between 15 April and 7 July 2003 at the abattoir of the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Yucatan (r-FMVZ) and between 4 September and 18 November 2003 at the municipal abattoir of the City of Merida (r-MUNI). The former is primarily used by producers employing intensive production systems. Using a random stratified design⁽¹⁶⁾, weekly, random samples were taken at each abattoir. Each sample was

Figura 4. Cromatograma de un estándar de clenbuterol adicionado a razón de 0.2 mg/ml en un tejido hepático, empleando la técnica de CG/EM

Figure 4. Chromatogram of clenbuterol standard (1 mg/ml) added to hepatic tissue at a ratio of 0.2 mg/ml, using GC/MS



días después, el resultado fue de 4.9 %. Por lo tanto, el análisis de repetibilidad del método indicó que se cuantificó consistentemente el clenbuterol adicionado.

d) Porcentaje de recuperación. Se evaporaron 100 μ l de un estándar de clenbuterol con una concentración de 1 mg/ml sin muestra, posteriormente se redisolvió con 20 μ l de tolueno para inyectarlos al cromatógrafo. Inmediatamente después se inyectó el material extraído a una muestra de 10 g de hígado la cual contenía 100 μ l del estándar de clenbuterol en una concentración de 1 mg/ml. Este procedimiento se realizó en cuatro ocasiones para obtener un promedio. El estándar sin muestra presentó una área promedio de 4615050 de abundancia, mientras que el estándar con la muestra presentó una área promedio de 4164460. El porcentaje de recuperación fue de 90.2 %.

e) Curva de calibración. Se realizó una curva de concentración, para poder cuantificar la presencia de clenbuterol, en dado caso de que alguna de las muestras de hígado muestreadas y analizadas resultaran positivas. Para realizar la curva se prepararon estándares con las siguientes concentraciones: 0.1, 0.2, 0.5, 0.7 y 1 mg/ml. Se calculó una correlación de 0.99, lo cual indica que se estableció una correlación altamente significativa ($P < 0.01$) entre los puntos analizados. La muestra que contenía el estándar de clenbuterol de 0.1 mg/ml fue detectada, pero no se obtuvo registro de la área del pico.

Análisis de muestras de hígado bovino

Se procedió a muestrear a los animales sacrificados en el rastro de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia la UADY (r-FMVZ), del 15 de abril al 7 de julio de 2003 y en el rastro municipal de la ciudad de Mérida (r-MUNI), a partir del 4 de septiembre y hasta el 18 de noviembre de 2003. Al primero concurren ganaderos con animales engordados en condiciones intensivas. Se utilizó un diseño aleatorio estratificado⁽¹⁶⁾ y en ambos se realizó un muestreo semanal de manera totalmente al azar. Se tomaron aproximadamente 200 g de hígado, registrándose la fecha de muestreo, el sexo de los animales y su procedencia.

approximately 200 g of liver with data recorded for sample date, animal sex and its source.

Before slaughter, the animals were brought from the ranch of origin to the abattoir in the morning, where they were weighed and left to rest receiving only water. They were slaughtered the following day.

At the r-FMVZ sample size was determined using the disease detection formula, considering: a total population of 1,024 animals sampled during a three-month period; 5.6 % positive animal results; and a type I error or 0.05 confidence level. Based on this calculation, the number of samples taken was 50. Three samples from 16-animal lots were taken each visit.

At the r-MUNI, using the same calculation as above, the sampled population was 3,600 animals during a 2.5 mo period, probable positive animals was 5 % and a type I error or 0.01 confidence level applied. Total number of samples taken for analysis was 88. Seven samples were taken of 42-animal lots at each sampling.

Samples from the r-FMVZ were taken from animals raised in the center, south and east of the state of Yucatan (Carretera Mérida-Chetumal Km. 71.2 (Tekax); Carretera Mérida-Muna Km. 55; Acanceh; Panabá; Chicxulub; Tizimín; Buctzotz; Cenotillo; and Dzidzantún). All animals were male, except for three females sampled on 20 May, and all samples were negative for clenbuterol.

Animals sampled from the r-MUNI came from central and south Yucatan (Buctzotz, Tizimín, Umán, Tixpeual, Tekit and Panabá), all were male and all samples were negative for clenbuterol.

Considering that it requires from 18 to 65 h to completely metabolize clenbuterol and that maximum clenbuterol limits can be detected in the liver up to 15 d after suspension of use in bovine cattle feed⁽¹³⁾, the presence of this b-adrenergic could have been detected using the methodology described here, if it had been administered. Suspension of a b-adrenergic 15 d before slaughter provides no growth promoter effect, and is contraindicated for effective weight gain.

El manejo que recibieron los animales previo al ingreso a su sacrificio fue el siguiente: por la mañana, fueron transportados del rancho de origen hacia el rastro, en donde se pesaron y descansaron el resto del día, recibiendo sólo agua y al día siguiente, temprano, fueron sacrificados.

En el r-FMVZ se determinó el tamaño de la muestra utilizando la fórmula para detectar una enfermedad⁽¹⁶⁾, considerando: un tamaño total de población en tres meses de trabajo en el rastro de 1,024 animales sacrificados; un porcentaje probable de animales positivos en la población del 5.6 %; un error tipo I o nivel de confianza de 0.05. Con base en este cálculo, el número de muestras obtenidas fueron 50. Se tomaron tres muestras de lotes de 16 animales sacrificados en cada ocasión.

Para el muestreo de los animales sacrificados en el r-MUNI, aplicando el mismo método para obtener el tamaño de muestra se obtuvieron: 3,600 unidades muestreables en un lapso de dos meses y medio, porcentaje probable de animales positivos de 5 % de la población, error tipo I o nivel de confianza de 0.01 El número de muestras de hígado tomadas para el análisis fueron 88. Se tomaron siete muestras de lotes de 42 animales sacrificados en cada ocasión.

En el trabajo realizado en el r-FMVZ, las muestras tomadas provenían de varios establecimientos ganaderos ubicados en el estado de Yucatán: km. 71.2 carretera Mérida-Chetumal (Tekax), km 55 carretera Mérida-Muna, Acanceh, Panabá, Chicxulub, Tizimín, Buctzotz, Cenotillo y Dzidzantún. Como se observa, las muestras provenían del centro, sur y oriente del Estado. Todos los animales muestreados fueron machos, excepto tres hembras muestreadas el 20 de mayo. El resultado de la determinación de clenbuterol de las muestras fue negativo.

En el r-MUNI las muestras provenían de Buctzotz, Tizimín, Umán, Tixpeual, Tekit y Panabá, todos los animales eran machos y no se encontró presencia de clenbuterol.

Considerando que el tiempo requerido para metabolizar completamente el clenbuterol es de 18 a 65 h y que los límites máximos de clenbuterol en

Though the present results were negative, positive clenbuterol results have been reported recently in Mexico. In March 2002, the National Public Health Laboratory analyzed 64 bovine and porcine livers from different states in Mexico with 24 resulting positive for clenbuterol (37.5 % of total). Analysis of new samples continues to date⁽⁵⁾. The same year, the Secretariat of Agriculture, Ranching, Rural Development, Fishing and Food (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación - SAGARPA) emitted the emergency regulation "Technical specifications for control of β -agonist use in animals" (NOM-EM-015-ZOO-2002)⁽¹¹⁾. This states that "with the exception of those β -agonist products registered and authorized by said Secretariat for use and consumption by animals, the production, manufacture, fabrication, elaboration, preparation, conditioning, transport, traffic, marketing, import, supply and use of any known or newly created β -agonist is prohibited." Fines against any person or establishment breaking this regulation range from one thousand to 30 thousand minimum wages (approx. US\$ 4,000 to 12,000).

Since 2002, the Yucatan State Secretariat of Health has also been testing bovine livestock for clenbuterol, using ELISA. No positive results have been produced in the 54 samples taken in 2002, or in the 31 taken up to March 2003⁽¹⁸⁾, coinciding with the present results.

Gas chromatography analysis coupled with mass spectrometry was shown to be an effective technique for detecting clenbuterol. Using the proposed method, the detection limit was established at 0.55 ppm and the quantification limit at 2.76 ppm. The percentage of clenbuterol recovery was 90.2 %. The sampled livestock at both abattoirs was found to be free of clenbuterol and thus it is concluded that clenbuterol was probably not used as a growth promoter immediately before or during the sampling period.

ACKNOWLEDGEMENTS

Financial support for this study was provided by the Fundación Produce Yucatán, A.C., via the

el hígado se detectan hasta 15 días después de suspender su uso en la alimentación del ganado bovino⁽¹³⁾, mediante este manejo, habría sido factible detectar la presencia del b-adrenérgico, en caso de haberse dosificado. Es evidente que suspender el suministro de un b-adrenérgico durante 15 días previos al sacrificio de los animales, propiciaría la pérdida del efecto promotor de la sustancia, siendo contraindicado para su engorda efectiva.

Contrariamente a lo encontrado en este estudio, el Laboratorio Nacional de Salud Pública, en marzo del 2002, analizó 64 muestras de hígado de bovinos y porcinos procedentes de varios estados de la República Mexicana y reportaron positivos a clenbuterol 24 de las muestras, lo que representó el 37.5 % del total. A partir de esa fecha ha seguido en el proceso de análisis de nuevas muestras⁽⁵⁾. Ese mismo año, la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) emitió la Norma Oficial Mexicana de Emergencia NOM-EM-015-ZOO-2002⁽¹¹⁾, “Especificaciones técnicas para el control del uso de b-agonistas en los animales”. En ella se establece que “con excepción de aquellos productos β -agonistas que cuenten con el registro y autorización de dicha Secretaría para su uso y consumo por animales, queda prohibida la producción, manufactura, fabricación, elaboración, preparación, acondicionamiento, transportación, tráfico, comercialización, importación, suministro y utilización de cualquier β -agonista conocido o de nueva creación”. Desatender esta norma es severamente castigado, aplicando sanciones a las personas o establecimientos que lo utilicen, con multas que van de mil a 30 mil salarios mínimos⁽¹⁷⁾.

La Secretaría de Salud del estado de Yucatán, ha realizado muestreos de ganado bovino a partir del 2002 para la detección de clenbuterol, utilizando la técnica de Elisa. Con ella se analizaron 54 muestras en el año 2002 y 31 hasta marzo de 2003, no habiéndose encontrado ninguna muestra positiva⁽¹⁸⁾, coincidiendo con lo observado en este trabajo.

Se concluye que la técnica de análisis de cromatografía de gases acoplada a un

project “Cuantificación de metales pesados, plaguicidas y clenbuterol en carne bovina en Yucatán” (0801). The authors thank the management of both abattoirs for their assistance in sample collection.

End of english version

espectrofotómetro de masas resultó efectiva para detectar clenbuterol. Se establecieron los límites de detección con la metodología propuesta en 0.55 ppm y de cuantificación en 2.76 ppm. El porcentaje de recuperación de clenbuterol fue de 90.2 %. El ganado sacrificado en ambos rastros se encontró libre de la presencia de clenbuterol, por lo tanto, se presupone que durante el periodo de muestreo no utilizaron clenbuterol como promotor del crecimiento.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue financiado parcialmente por la Fundación Produce Yucatán, A.C. mediante el proyecto “Cuantificación de metales pesados, plaguicidas y clenbuterol en carne bovina en Yucatán” clave 0801.

Se reconoce el apoyo de las autoridades de ambos rastros incluidos en el estudio, por las facilidades otorgadas para la recolección de las muestras.

LITERATURA CITADA

1. Sumano L, Ocampo C, Gutiérrez O. Clenbuterol y otros b-agonistas, ¿una opción para la producción pecuaria o un riesgo para la salud? *Vet Méx* 2002;33(2):137-159.
2. Solís M. Más que razones sanitarias en la problemática del clenbuterol [en línea] 2002. <http://www.cuautitlan2.unam.mx/comunidad/2002/num12/uc1.12.htm>. Consultado 10 Dic 2002.
3. García L. Alerta epidemiológica por la intoxicación en humanos con clenbuterol y su empleo en la alimentación del ganado. *Rev Sanid Milit Mex* 2002;56(3):131-134.
4. Geesink G, Smulders F, Van Laak H, Van der Kolk J, Wensing T, Breukink H. Effects on meat quality of the use of clenbuterol in veal calves, *J Anim Sci* 1993;71(5):1161-1170.

DETERMINACIÓN DE CLENBUTEROL EN BOVINOS

5. Asa L. Informe a la comisión de abasto y distribución de alimentos de la II asamblea legislativa 2002. Marzo - abril [en línea] http://www.salud.df.gob.mx/informe/informe_comision_abasto.html. Consultado 15 Oct, 2002.
6. Mitchell G, Dunnavan D. Illegal use of β -adrenergic agonists in the United States. *J Anim Sci* 1998;76(1):208-211.
7. Kuiper H, Noordan M, Van Dooren-Flipse M, Schilt R, Roos A. Illegal use of β -adrenergic agonists: european community. *J Anim Sci* 1998;76(1):195-207.
8. Ramos F, Cristino A, Carrola P, Eloy T, Silva JM, Castilho M, Noronha da Silveira MI. Clenbuterol food poisoning diagnosis by gas chromatography-mass spectrometric serum analysis. *Analytica Chem Acta* 2003;(483):207-213.
9. NOM-061-ZOO-1999. Especificaciones zoosanitarias de los productos alimenticios para consumo animal. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 1999.
10. Secretaría de Salud. Intoxicados por clenbuterol 2002 marzo - abril [en línea]. <http://www.imagenzac.com.mx/2002/04/17/economia1.htm>. Consultado 15 oct, 2002.
11. NOM-EM-015-ZOO-2002. Especificaciones técnicas para el control del uso de beta-agonistas en los animales. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2002.
12. Wilson RT, Groneck JM, Holland KP, Henry CA. Determination of Clenbuterol in cattle, sheep, and swine tissues by electron ionization gas chromatography/mass spectrometry. *J AOAC Int* 1994;77(4):917-924.
13. Stoffel B, Mayer H. Effects of the beta adrenergic agonist clenbuterol in cows: lipid metabolism, milk production, pharmacokinetics and residues. *J Anim Sci* 1993;71(7):1875.
14. Ortiz BJC. Determinación de clenbuterol por cromatografía de gases/masas en tejido hepático de ganado bovino en Yucatán. [tesis de licenciatura] Mérida, Yuc. México: Universidad Autónoma de Yucatán; 2004.
15. Torres A. Estandarización y validación de una técnica para el análisis de compuestos orgánicos volátiles por purga y trampa/desorción térmica/cromatografía de gases [tesis de licenciatura] Mérida, Yuc. México: Universidad Autónoma de Yucatán; 1999.
16. Segura J, Honhold N. Métodos de muestreo para la producción y la salud animal. 1ª ed. Mérida, Yuc. México: Ediciones de la Universidad Autónoma de Yucatán; 2000:101-103.
17. SAGARPA. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Multas de mil a 30 mil salarios mínimos a quien administre clenbuterol al ganado. 2002 marzo - abril [en línea] <http://www.sagarpa.gob.mx/Comunica/boletines/2002/Marzo/B087.pdf> Consultado 13 Ene, 2003.
18. SSY. Secretaría de Salud Yucatán. Mérida Yucatán. 2003. Datos no publicados.

