

Nielegalne stosowanie β -agonistycznych anaboliów

ANDRZEJ POSYNIAK, JAN ŻMUDZKI, TOMASZ ŚNIEGOCKI

Zakład Farmakologii i Toksykologii PIWet, ul. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Posyńiak A., Żmudzki J., Śniegocki T.

Illegal use of β -agonistic anabolics

Summary

β -agonistic compounds can be used illegally as growth stimulators. Residues of these compounds in the edible tissues of animals which have been treated by them present a serious risk to consumers. Directives 96/22, 96/23/EC, and Regulation 2377/90EEC control the use of β -agonists, which are banned in the UE and other countries. This paper reviews the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of β -agonistic compounds and their residues remaining in experimentally or illegally treated animals. It also discusses analytical procedures used to detect and confirm the presence of β -agonists.

Keywords: anabolic β -agonistics, residues, methods, food safety

Jednym ze skutków działania środków β -agonistycznych jest efekt anaboliczny, który nielegalnie może być wykorzystywany przez sportowców i hodowców. Następstwem podawania tych związków w tuczu zwierząt może być szkodliwe oddziaływanie na zdrowie konsumentów żywności zawierającej pozostałości klenbuterolu lub innych β -agonistów (12, 15, 19). Do szczególnie rozległych w skutkach zatruc, ze względu na zakres i objawy, dochodziło w Hiszpanii (20), gdzie po raz pierwszy powiązano obecność klenbuterolu w wątrobie wołowej ($> 100 \mu\text{g}/\text{kg}$) z toksycznymi objawami występującymi u konsumentów.

Niekontrolowane stosowanie i związane z tym konsekwencje zdrowotne doprowadziły do nasilenia nadzoru weterynaryjnego nad hodowlą zwierząt i produkcją żywności pochodzenia zwierzęcego, a wymóg badania pozostałości β -agonistów obejmujący Unię Europejską (Dyrektywy 96/22 EC i 96/23 EC) rozszerzono również na inne kraje, w tym również i Polskę. Artykuł 4.1. Ustawy o środkach żywienia zwierząt z dnia 23 sierpnia 2001 r. (Dz. U. Nr 123 poz. 1350, 2001) zabrania wytwarzania, wprowadzania do obrotu i stosowania w żywieniu zwierząt substancji o działaniu hormonalnym, tyreostatycznym, i β -agonistycznym. Natomiast w Ustawie o warunkach zdrowotnych żywności i żywienia z dnia 11 maja 2001 r. (Dz. U. Nr 36 poz. 364, 2001) w artykule 6 zakazuje się wykorzystywania do żywienia ludzi lub do produkcji innych środków spożywczych produktów pochodzących od zwierząt lub ze zwierząt, którym podawano substancje o działaniu hormonalnym, tyreostatycznym i β -agonistycznym.

Pomimo prowadzonej na szeroką skalę kontroli, która w wielu krajach ma policyjny charakter, na „czarny rynek” oprócz klenbuterolu trafiają inne środki β -ago-

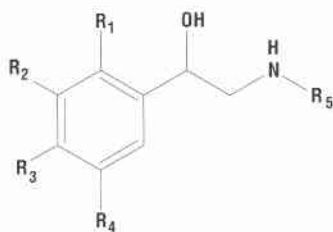
nistyczne, w tym nowe analogi o nierozpoznanych właściwościach farmakologicznych i toksykologicznych. Do walki z nielegalnym obrotem i niedozwolonym stosowaniem β -agonistycznych anaboliów wykorzystywana jest coraz bardziej niezawodnie działająca aparatura analityczna. Zaś poznawanie właściwości fizyko-chemicznych i parametrów farmakokinetycznych daje możliwość umiejętnego dobrania materiału do badań kontrolnych i prawidłowego postępowania z próbkami materiału biologicznego.

W artykule omówiono zależności zachodzących między budową chemiczną a właściwościami farmakodynamicznymi, farmakokinetyką i utrzymywaniem się pozostałości, oraz przedstawiono najnowsze kierunki rozwoju systemów analitycznych wykorzystywanych w kontroli β -agonistów.

Budowa chemiczna

Zazwyczaj przyjmuje się, że leki o zbliżonej budowie chemicznej, tak jak sulfonamidy czy tetracykliny, posiadają podobne działanie. Jednak nie zawsze uzasadnione jest uogólnianie efektów farmakologicznych lub fizjologicznych na podstawie budowy chemicznej. Testosteron, estrogen i aldosteron, hormony steroidowe, mają wspólne cechy chemiczne, lecz spełniają odmienne funkcje fizjologiczne. Podobnie jest z adrenergicznymi związkami fenetanoloaminowymi, które mają podobną budowę chemiczną, ale nie wszystkie agonistycznie oddziałują na receptory β -adrenergicznej części układu wegetatywnego (31).

Niektóre pochodne fenetanoloaminy aktywują receptory α , w tej grupie można wyróżnić także substancje posiadające równoczesne działanie na receptory α i β . Różnice w budowie strukturalnej mogą w istotny sposób wpływać na siłę działania i zachowanie się w or-

Tab. 1. Struktura chemiczna leków β -agonistycznych

Pochodne	Leki	-R ₁	-R ₂	-R ₃	-R ₄	-R ₅
Aniliny	Klenbuterol	-H	-Cl	-NH ₂	-Cl	-C(CH ₃) ₃
	Cimbuterol	-H	-NC	-NH ₂	-H	-C(CH ₃) ₃
	Bromobuterol	-H	-Br	-NH ₂	-Br	-C(CH ₃) ₃
	Mabuterol	-H	-CF ₃	-NH ₂	-Cl	-C(CH ₃) ₃
	Mapenterol	-H	-CF ₃	-NH ₂	-Cl	-C(CH ₃) ₂ C ₂ H ₅
	Klenpenterol	-H	-Cl	-NH ₂	-Cl	-C(CH ₃) ₂ C ₂ H ₅
	Cimaterol	-H	-NC	-NH ₂	-H	-CH(CH ₃) ₂
	Klenproperol	-H	-Cl	-NH ₂	-Cl	-CH(CH ₃) ₂
Fenolu	Salbutamol	-H	-CH ₂ OH	-OH	-H	-C(CH ₃) ₃
	Karbuterol	-H	-NHCONH ₂	-OH	-H	-C(CH ₃) ₃
	Isoxsupryna	-H	-H	-OH	-H	-C(CH ₃) ₂ CH ₂ OC ₆ H ₅
	Pirbuterol	-H	-CH ₂ OH	-OH	-H	-C(CH ₃) ₃
	Tulobuterol	-Cl	-H	-OH	-H	-C(CH ₃) ₃
	Raktopamina	-H	-H	-OH	-H	-CHCH ₃ (CH ₂) ₂ C ₆ H ₄ OH
Rezorcyiny	Terbutalina	-H	-OH	-H	-OH	-C(CH ₃) ₃
	Fenoterol	-H	-OH	-H	-OH	-CHCH ₂ C ₆ H ₄ OH
	Metaproterenol	-H	-OH	-H	-OH	-CH(CH ₃) ₂

ganizmie zwierzęcym. Z tego też względu związki β -agonistyczne dzielone są na niepolarne pochodne aniliny oraz mające bardziej polarny charakter pochodne rezorcinolu i fenolu (tab. 1). Ze względu na asymetryczne podstawniki, leki β -agonistyczne są racemiczną mieszaniną dwóch enancjomerów, mających różne właściwości optyczne i farmakologiczne.

Mechanizm działania i zastosowanie

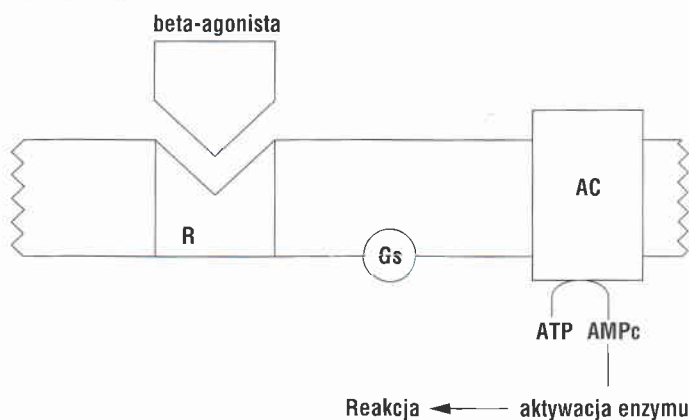
Środki β -agonistyczne, będące syntetycznymi analogami adrenaliny, wywołują szereg reakcji biochemicznych zainicjowanych połączeniem z receptorami β w błonie komórkowej (ryc. 1). Aktywowany receptor (R) poprzez białko stymulujące (G_s) uaktywnia enzym, adenylową cyklatazę (AC), po czym trifosforan adenozy ATP przechodzi w cykliczny 3,5-monofosforan adenozy (cAMP), który z kolei poprzez stymulację kinazy proteinowej (PK) indukuje fosforylację enzymatyczną dając reakcję. Wynikiem pobudzenia receptorów jest wzrost akcji serca, rozkurcz oskrzeli, macicy i jelit, stymulacja wydzielania insuliny, zmniejszenie poziomu glikogenu (4).

Leki β -agonistyczne w medycynie ludzkiej, wykorzystywane są do usuwania objawów astmy i chronicznego zapalenia oskrzeli (tab. 2). Klenbuterol wykazu-

je szczególnie duże powinowactwo do oskrzeli, które ulegają całkowitemu rozkurczowi po zastosowaniu dawek od 100 do 250 razy mniejszych w porównaniu do salbutamolu.

Również w praktyce weterynaryjnej klenbuterol znalazł zastosowanie jako środek bronchorelaksacyjny oraz jako tokolityk. W wielu krajach Unii Europejskiej został zarejestrowany z przeznaczeniem do stosowania u koni, bydła niemlecznego i zwierząt towarzyszących. Według Rozporządzenia Rady 2377/90/EEC klenbuterol znalazł się w aneksie I, w którym zebrano leki posiadające ustalone maksymalne dopuszczalne wartości (MRL) dla pozostałości (tab. 3). Inne leki tej grupy nie są dozwolone do stosowania u zwierząt hodowlanych. Z drugiej jednak strony klenbuterol znalazł się w grupie leków, które mogą być stosowane do celów leczniczych tylko w wyjątkowych, ograniczonych, przypadkach (Dyrektywa Rady 22/96/EC i Dyrektywa Rady 23/96/EC).

Ubočnym skutkiem długotrwałego (2-3 tygodnie) stosowania podwyższonych (5-10 razy) dawek środków β -agonistycznych jest przyrost masy mięśniowej w stosunku do tkanki tłuszczowej. Zwierzęta otrzymujące klenbuterol lub inne środki β -agonistyczne szybciej produkują nie przesońnięte tłuszczem, jasne mięso (29, 30). Zwiększanie

Ryc. 1. Schemat działania β -agonistów

masy mięśniowej zachodzi szybciej niż po zastosowaniu hormonalnych sterydów (1), a u wielu gatunków efekt anaboliczny uzyskiwany jest przy zmniejszonym zapotrzebowaniu na pasze (13). Jednocześnie dochodzi do magazynowania w mięśniach dużych ilości tlenu, które zyskują wyższy potencjał energetyczny. Właściwość tą dość szybko wykorzystano w sporcie, gdyż bogate w tlen mięśnie mogą pokonywać zwiększony wysiłek. Podawanie klenbuterolu wywołuje również zahamowanie atrofii mięśni szkieletowych oraz hipertrofię mięśnia sercowego.

Tab. 2. Dawki terapeutyczne β -agonistów u ludzi

Lek	Dawka p.o.		Dawka/Dzień
	μg	$\mu\text{g/kg m.c.}$	
Klenbuterol	10-20	0,16-0,33	2
Fenoterol	2500-5000	42-83	3
Salbutamol	2000-4000	33-67	3-4
Terbutalina	5000	83	3

Jednak po dłuższym podawaniu klenbuterolu dochodzi do zmian w narządach wewnętrznych, następuje trwałe rozszerzenie światła tchawicy, powstają mikrotorbiele na jajnikach, widoczna jest wodnista wydzielina z macicy oraz dochodzi do zmiany aktywności enzymów wątrobowych (28).

Natomiast pozostałości występujące w produktach spożywczych negatywnie wpływają na zdrowie konsumentów prowadząc do zatrucia z dość rozległymi objawami, które występowały po upływie 0,5 godziny lub w kilka dni od spożycia żywności z zawierającej klenbuterol. Najczęściej pojawiały się drżenia mięśni szkieletowych, częstoskurcz, bóle głowy, bóle mięśni, pobudzenie nerwowe, nudności i zawroty głowy. U większości pacjentów stwierdzono obecność klenbuterolu w moczu. Objawy ustępowały po zastosowaniu propranololu, β -blokeru, farmakodynamicznego antagonisty klenbuterolu (11, 12, 19).

Po aferach dopingowych przed i w trakcie olimpiady w Barcelonie, w 1992 r. decyzją narodowych federacji sportowych i MKOl wprowadzono zakaz stosowania β -agonistów u sportowców i koni wyścigowych, a organizacje międzynarodowe nadzorujące obrót żywnością umieściły je na liście substancji niedozwolonych do stosowania u zwierząt hodowanych dla spożycia przez ludzi (15, 24).

Farmakokinetyka i pozostałości

Po komplikacjach wywołanych stosowaniem klenbuterolu zwrócono uwagę na zachowanie się β -agonistów w organizmach zwierzęcych. W badaniach farmakokinetycznych ustalono, że leki z grupy klenbuterolu po jednorazowej dawce terapeutycznej osiągają stężenia w osoczu niższe od 1 $\mu\text{g/l}$, ale mają przy tym dość długi okres półtrwania (około 30 godzin). Wydalanie następuje przez nerki w postaci metabolitów I fazy, a ich poziom w moczu nie przekracza 10-20 $\mu\text{g/l}$. Natomiast salbutamol i jemu podobne osiągają wyższe stężenie w osoczu (1-10 $\mu\text{g/l}$), ale okres półtrwania jest

dość krótki (1-7 godzin). Dzięki obecności grup fenolowych łatwo powstają koniugaty z kwasem siarkowym lub glutarowym, a wydalanie (35-90%) zachodzi w postaci metabolitów II fazy (15, 31).

Utrzymywanie się środków β -agonistycznych w tkankach i narządach nie zostało jeszcze w pełni rozpoznane. Jak dotąd zaledwie w kilku pracach (22, 25, 31) dokonano oceny zawartości substancji macierzystych i metabolitów.

Cechą charakterystyczną tych środków farmakologicznych jest brak powinowactwa do tkanki tłuszczowej. Stężenia raktopaminy w wątrobie świń są ok. 19 razy wyższe niż w tkance tłuszczowej, a klenbuterolu w wątrobie bydła 4 razy. Podobnie zachowują się klenbuterol, fenoterol i terbutalina u szczurów, myszy i królików (31).

Raktopamina występuje w wyższych stężeniach w tkankach spełniających funkcje wydalnicze, w wątrobie stężenia są niższe niż w nerkach, przez które wydalane jest 88% leku. Natomiast u indyków w wątrobach wartości te są wyższe niż w nerkach.

Tab. 3. Dopuszczalna maksymalna wartość (MRL) klenbuterolu w produktach zwierzęcych (Regulacja Unijna 2377/90)

Substancja aktywna farmakologicznie	Substancja oznaczana	Gatunek	MRL ($\mu\text{g/kg}$)	Tkanka
Klenbuterol	Klenbuterol	bydło	0,1	mięśnie
			0,5	wątroba
			0,5	nerka
		konie	0,05	mleko
			0,1	mięśnie
			0,5	wątroba
			0,5	nerka

Tab. 4. Występowanie pozostałości leków β -agonistycznych w tkankach i narządach zwierząt

Lek	Zwierzę	Dni	Tkanki $\mu\text{g/kg}$			źródło
			wątroba	nerki	oko	
Klenbuterol	bydło	39	0,7	nie stwierdzono	116	11
Klenbuterol	bydło	56	0,4	nie stwierdzono	89	11
Klenbuterol	kury	2	2,2	3,7	845,5	11
Klenbuterol	owce	7	10,8	1,5	brak wyniku	11
Salbutamol	kury	14	4	< 1	19	22
Salbutamol	bydło	7	110	10	brak wyniku	22
Terbutalina	kury	14	7	< 2	< 2	22
Raktopamina	świnie	3	2	3	brak wyniku	31

Inaczej niż raktopamina zachowuje się klenbuterol, którego stężenia w wątrobach i nerkach wołowych są znacznie większe niż w analogicznych tkankach świń. Inną zasadniczą różnicą między tymi związkami jest zawartość substancji macierzystej w narządach, klenbuterol występuje w nerkach i w wątrobie odpowiednio w 44 i 63%, a raktopamina tylko w 5,5 i 16% (31).

Gromadzenie się klenbuterolu u bydła zależy od wielkości dawki i okresu stosowania (28). Najwyższe stężenia występują bezpośrednio po zakończeniu podawania, po czym następuje dwufazowa eliminacja, z początkowym okresem półtrwania 30-40 godzin, który wydłuża się do 150-170 godzin (tab. 4). Po 3 tygodniowym dawkowaniu, klenbuterol znajduje się w płucach, w wątrobie i nerkach. W innych narządach stężenia są dużo niższe, mięśnie szkieletowe zawierają 1/5 wartości stwierdzonej w wątrobie.

Środki β -agonistyczne długo utrzymują się we włosach, a ich zawartość zależy od koloru sierści zwierząt. Klenbuterol jest silnie zatrzymywany przez czarne włosy, w których stężenia są 30-40 krotnie wyższe od wartości występujących w białej lub brązowej sierści. W odróżnieniu od klenbuterolu, salbutamol nie jest tak silnie zatrzymywany, jego stężenie w czarnych włosach jest 50 razy niższe, a we włosach brązowych cztery razy. Po zastosowaniu dawek terapeutycznych (0,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$) klenbuterol został wykryty w sierści już w 4 dniu podawania i pozostawał aż do 60 dnia po zaprzestaniu stosowania. Po dawkach promujących wzrost, najwyższe stężenie dochodziło do 1720 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i było znacznie wyższe od poziomów osiąganych po dawkach terapeutycznych. Po dawce 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, stosowanej przez 3 tygodnie w zabarwionej sierści klenbuterol wykrywano przez 18 tygodni, a w białej 8 tygodni po zakończeniu podawania (31).

Wysokie stężenia klenbuterolu występują również w gałce ocznej, największe ilości w tęczęwce i siatkówce, gdzie utrzymują się przez około 20 tygodni. Jednak jego obecność nie wpływa na procesy biochemiczne zachodzące w oku, w związku z tym przypuszcza się, że nie ma wpływu na zdolność widzenia (9).

Za długie utrzymywanie się klenbuterolu odpowiedzialna jest melanina, barwnik występujący w dużych ilościach zarówno we włosach jak i w oku. Leki o mniejszej polarności (klenbuterol) silniej wiążą się z melaniną niż bardziej polarne (salbutamol), lub ich metabolity, podobnie jak kokaina, czy heroina w porównaniu do 6-monoacetylmorfiny lub morfiny (18).

Matryca biologiczna i metody wykrywania

Właściwości farmakokinetyczne i zdolność kumulowania się w określonych tkankach docelowych determinują wybór materiału biologicznego do badań kontrolnych. O doborze materiału decyduje również łatwość pozyskiwania próbek i możliwość wyizolowania.

W kontroli prowadzonej w gospodarstwie lub fermie do badań pobierane są próbki moczu lub plazmy, w których po anabolicznym stosowaniu, stężenia β -

agonistów łatwe są do wykrycia (17, 23). Jednak zarówno z moczu jak i z plazmy ulegają one szybkiej eliminacji w kilka dni po zaprzestaniu podawania. W związku z tym w badaniach przyżyciowych zwraca się coraz większą uwagę na możliwość wykonywania oznaczeń w próbkach sierści (33, 34). W rzeźniach do badań pobierane są próbki wątrób, narządu docelowego, w którym jeszcze przez kilkanaście dni po zaprzestaniu stosowania występują stężenia możliwe do wykrycia.

Klenbuterol i jego analogi wykazujące silne powinowactwo do melaniny długo utrzymują się w gałce ocznej i po kilkudziesięciu dniach od zakończenia stosowania możliwe jest wykrycie ich obecności, dlatego też coraz więcej jest metod wykorzystujących ten materiał do badań diagnostycznych (14).

Przy nielegalnym stosowaniu obserwuje się tendencje do optymalizacji dawkowania, ustalenia jak najmniejszych, jeszcze efektywnych a jednocześnie trudnych do wykrycia dawek. Jednym ze sposobów minimalizowania dawkowania jest równoległe stosowanie różnych środków β -agonistycznych lub łączenie z innymi substancjami czynnymi farmakologicznie np. dekсамetazonem, który obniża zawartość klenbuterolu w tkankach zwierząt. W takich przypadkach trudne jest rozróżnienie, czy klenbuterol stosowano w celach leczniczych, czy też dla uzyskania efektu anabolicznego.

Do wykrywania i identyfikacji środków β -agonistycznych stosuje się testy przesiewowe (skryningowe) i metody potwierdzające, gdyż tylko taki układ gwarantuje wykonanie badań w dużej ilości próbek materiału biologicznego, przy jednoczesnym zapewnieniu wiarygodności prowadzonych badań (3, 4, 7, 10).

Obecnie w kontroli, do badań skryningowych najczęściej wykorzystywane są komercyjne testy immunoenzymatyczne (ELISA), natomiast chromatografia cienkwarstwowa (TLC), która początkowo odgrywała dość ważną rolę to jednak ze względu na zbyt wysokie wymagania (poziom wykrywalności) obecnie jest mniej przydatna (6).

Zestawy ELISA przystosowane są do wykrywania klenbuterolu lub salbutamolu, a niektóre dzięki reakcjom krzyżowym mogą być również zastosowane do oznaczania innych β -agonistów (mabuterolu, cimaterolu, itp.). Testy ELISA umożliwiają wykonywanie oznaczeń w moczu i w wątrobach, jednak dość często sprawność przygotowania próbek nie jest adekwatna do deklaracji producenta. Dlatego też testy powinny być sprawdzone w laboratoriach kontrolnych lub referencyjnych, w celu uniknięcia otrzymywania fałszywie dodatnich wyników (4,8,16).

Zalecane jest (Dyrektywa 93/256 EEC) aby wyniki badań skryningowych były potwierdzone przy użyciu spektrometrii mas (MS) w połączeniu z chromatografią gazową (GC). W analizie spektrometrią mas poszukuje się w badanym materiale 4 jonów diagnostycznych, charakterystycznych dla poszczególnych β -agonistów (2, 10, 21).

Jednak przygotowanie próbek do badań techniką GC-MS jest dość złożone i czasochłonne, wymaga dokładnego oddzielenia analizowanych substancji od endogennych składników matrycy, a następnie uzyskania pochodnych, najczęściej silanowych, które są lotne w warunkach chromatografii gazowej (25-27).

W związku z nielegalnym stosowaniem nowych, często znacznie różniących się budową cząsteczkową związków β -agonistycznych przed analitykami zajmującymi się kontrolą tych substancji stoi niezwykle trudne zadanie opracowania efektywnych sposobów wykrywania i identyfikacji. Istotną rolę w systemach analitycznych odgrywa selektywna izolacja z matrycy biologicznej i ekstrakcja do fazy stałej z mieszanymi lub połączonymi z ligandami fazami, które pozwalają właściwie przygotować próbkę do badań (4, 5). Natomiast przez zastosowanie chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas (LC-MS) nie wymagającej stosowania pochodnych następuje usprawnienie i znaczne skrócenie czasu analizy (35).

Zastosowane warunki analizy zapewniają wykrycie i oznaczenie śladowych ilości β -agonistów w próbkach kontrolnych, a tym samym umożliwiają eliminację nieuczciwych hodowców stosujących niedozwolone substancje w tuczu zwierząt.

Prowadzona w naszym kraju od szeregu lat kontrola pozostałości chemicznych w tkankach zwierząt i żywności pochodzenia zwierzęcego wskazuje na brak w analizowanych próbkach obecności związków β -agonistycznych.

Piśmiennictwo

- Baker P. K., Dalrymple R. H., Ingle D. L. and Ricks C. A.: Use of β -adrenergic agonist to alter muscle and fat deposition in lambs. *J. Anim. Sci.* 1984, 59, 1256-1261.
- Batjoens P., Courtheyn D., De Brabander H. F., Vercaemmen J., De Wasch K., Logghe M.: Gas Chromatographic-tandem mass spectrometric analysis of clenbuterol residues in faeces. *J. Chromatogr. A.* 1996, 750, 133-139.
- Boyd D., O'Keefe M., Smyth M. R.: Matrix Solid-phase Dispersion as a Multiresidue Extraction Technique for β -Agonists in Bovine Liver Tissue. *Analyst* 1994, 119, 1467-1470.
- Boyd D., O'Keefe M., Smyth M. R.: Methods for the Determination of β -Agonists in Biological Matrices. *Analyst* 1996, 121, 1R-10R.
- Cai J., Henion J.: Quantitative multi-residue determination of β -agonists in bovine urine using on-line immunoaffinity extraction-coupled column packed capillary liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* 1997, 691, 357-370.
- Degroodt J.-M., Wyhowski de Bukanski B., Beernaert H. and Coutheyn D.: Clenbuterol residues analysis by HPLC-HPTLC in urine and animal tissues. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 1989, 189, 128-131.
- Delahaut Ph., Dubois M., Pri-Bar I., Buchman O., Degand G. and Ectors F.: Development of a specific radioimmunoassay for the detection of clenbuterol residues in treated cattle. *Food Additives and Contaminants*. 1991, 8, 43-53.
- Dürsch I., Meyer H. H. D.: A Multi-residue Enzyme Immunoassay for Screening Illegally Used β -agonists. *Food & Agricultural Immunology*. 1992, 4, 211-218.
- Dürsch I. and Meyer H. H. D.: In vitro investigations of β -agonist accumulation in the eye. *Analytica Chimica Acta*. 1993, 275, 189-193.
- Dumasia M. C. and Hoghton E.: Screening and confirmatory analysis of β -agonists, β -agonists and their metabolites in horse urine by capillary gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography*. 1991, 564, 503-513.
- Elliott C. T., McEvoy J. D. G., McCaughey W. J., Shortt D. H. and Crooks S. R. H.: Effective laboratory monitoring for the abuse of the beta-agonist clenbuterol in cattle. *Analyst*. 1993c, 118, 447-448.
- Elliott C. T., Shortt H. D., Kennedy D. G., McCaughey W. J.: Monitoring for clenbuterol abuse in N. Ireland 1989-1994. *Vet Quart* 1996, 18, 41-44.
- Geesink G. H., Smulders F. J. M., van Laack H. L. J. M., van der Kolk J. H., Wensing Th., Breukink H. J.: Effect on Meat Quality of the Use of Clenbuterol in Veal Calves. *J. Anim. Sci.* 1993, 71, 1161-1170.
- Gigosos P. G., Ferrández T. F., Mariz O. C., Sampayo C. A. F., Abuin C. F., Sáez A. C.: Rapid and simple determination of clenbuterol residues in retina by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. 1996, 677, 167-171.
- Gustin P., Ansay M. et Maghuin-Rogister G.: La Pharmacologie et le problème des résidus des agonistes β_2 adrénergiques chez les bovins. 1989, 133, 293-311.
- Hahnau S., Jüllicher B.: Evaluation of commercially available ELISA test kits for the detection of clenbuterol and other β_2 -agonists. *Food Additives and Contaminants*, 1996, 13, 259-274.
- Hooijcrink H., Schilt R., Haasnoot W. and Courtheijn D.: Determination of Clenbuterol in urine of Calves by high-performance and electrochemical detection. *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*. 1991, 9, 485-492.
- Howells L., Godfrey M. and Sauer M. J.: Melanin as an Adsorbent Drug Residues. *Analyst*. 1994, 119, 2691-2693.
- Jarvic D. R., Thompson A. M., and Dyson E. H.: Laboratory and clinical features of self-poisoning with salbutamol and terbutaline. *Clinica Chimica Acta*. 1987, 168, 313-322.
- Kuiper H. A., Noordam M. Y., van Doorren-Flipsen M. M. H., Schilt R. and Roos A. H.: Illegal Use of β -adrenergic Agonists: European Community. *J. Anim. Sci.* 1998, 76, 195-207.
- Leyssens L., Driessen C., Jacobs A., Czech J., Raus J.: Determination of β_2 -receptor agonist in bovine urine and liver by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr.* 1991, 564, 515-527.
- Malucelli A., Ellendorff F. and Meyer H. H. D.: Tissue distribution and residues of clenbuterol, salbutamol and terbutaline in tissues of treated broiler chickens. *J. Anim. Sci.* 1994, 72, 1550-1560.
- Meyer H. H. D., Rinke L., Dürsch I.: Residue screening for the β -agonists clenbuterol, salbutamol and cimaterol in urine using enzyme immunoassay and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 1991, 564, 551-556.
- Mitchell G. A. and Dunnagan G.: Illegal Use of β -adrenergic Agonists in the United States. *J. Anim. Sci.* 1998, 76, 208-211.
- Montrade M.-P., Le Bizec B., Monteau F. and Andre F.: Analysis of β -agonist in urine and tissue by capillary gas chromatography-mass spectrometry: In vivo study of salbutamol disposition in calves. *Food Addit. Contam.* 1995, 12, 625-636.
- Polettini A.: Bioanalysis of β_2 -agonists by hyphenated chromatographic and mass spectrometric techniques. *J. Chromatogr. B.* 1996, 687, 27-42.
- Ramos F., Santos C., Silva A., da Silveira M. I. N.: β_2 -adrenergic agonist residues: simultaneous methyl- and butyl boronic derivatization for confirmatory analysis by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* 1998, 716, 366-370.
- Re G., Badino P., Novelli A., Girardi C.: Effects of Clenbuterol as a Repartitioning Agent on β -Adrenoceptor Concentrations in Heart, Bronchi and Brain of Veal Calves. *The Veterinary Journal*. 1997, 153, 63-70.
- Ricks C. A., Dalrymple R. H., Baker P. M., Ingle D. L.: Use of β -agonist to alter fat and muscle deposition in steers. *J. Anim. Sci.* 1984, 59, 1247-1255.
- Roliński Z., Kowalski C., Wlaz P.: Postęp w zakresie stymulatorów wzrostu u zwierząt. *Medycyna Wet.* 1992, 48, 549-552.
- Smith D. J.: The Pharmacokinetics, Metabolism, and Tissue Residues of β -adrenergic Agonists in Livestock. *J. Anim. Sci.* 1998, 76, 173-194.
- Takahashi K., Akiba Y. and Horiguchi M.: Effects a beta-adrenergic agonist (clenbuterol) on performance, carcass composition, hepatic microsomal mixed function oxidase and antibody production in female broilers treated with or without corticosterone. *British Poultry Science*. 1993, 34, 167-175.
- van Ginkel L. A., Stephany R. W., van Rossum J.: Development nad Validation of a Multiresidue Method for β -Agonists in Biological Samples and Animal Feed. *Veterinary Analytical Toxicology*. 1992, 75, 554-560.
- van Rhijn J. A., Heskamp H. H., Essers M.L., van de Wetering H. J., Kleijnen H. C. H., Roos A. H.: Possibilities for confirmatory analysis of some β -agonists using two different derivatives simultaneously. *J. Chromatogr. B.* 1995, 665, 395-398.
- Van Vyncht G., Preece S., Gaspar P., Maghuin-Rogister G., DePauw E.: Gas and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry for the multiresidue analysis of β -agonists in biological matrices. *J. Chromatogr. A.* 1996, 750, 43-49.