

# DIŞ ALIMLA SAĞLANAN SIĞIRLARDA İDRAR ÖRNEKLERİNİN CLENBUTEROL KALINTILARI YÖNÜNDEN ARAŞTIRILMASI\*

## THE RESEARCH OF CLENBUTEROL RESIDUES ON URINE SAMPLES IMPORTED BEEF CATTLE

Ahmet AKILLI\*\*

### ÖZET

Bu çalışmada, Türkiye'ye alımı yapılan kasaplık sığırlara ait 1000 adet idrar örneği clenbuterol kalıntıları yönünden araştırıldı. Biyolojik matriks etkisini gösteren temel değerlerin saptanması ve geri kazanım çalışmalarında kullanılmak amacıyla Erzurum Et ve Balık Kurumu Kombinasında kesimi yapılan kasaplık sığırlardan elde edilen 30 adet idrar örneği kör olarak analize alındı. Çalışmada, clenbuterol'ün sığır idrarlarından pikogram düzeyinde saptanmasına olanak sağlayan hazır ticari kitler kullanılarak ELISA yöntemi uygulandı. Kör olarak deneye alınan sığır idrar örneklerinden clenbuterole eşdeğer en düşük bağlanma değeri (B/Bo) %78.2, en yüksek %88.3, ortalama %82.7 olarak saptandı. Geri kazanım çalışmaları için deneye alınan kontrol örneklerine ait sonuçlar en düşük %93.9, en yüksek %97.9, ortalama %95.1 olarak bulundu. Çalışmanın ikinci döneminde, Türkiye'ye alımı yapılan sığırlardan alınan 1000 adet idrar örneği clenbuterol kalıntıları yönünden araştırıldı ve sonuçlar negatif olarak bulundu.

**Anahtar Sözcükler:** Clenbuterol, kalıntı, idrar, sığır.

### ABSTRACT

In this study, 1000 urine samples, taken from beef cattles which are imported by Turkey, have been examined in terms of clenbuterol residues. 30 urine samples, taken from beef cattles slaughtered in Erzurum Meat and Fish Foundation Slaughterhouse, was taken to analyze as blank in order to be used in recovery studies and the determination of background values wich exhibit the biological matrix effect. In this study, ELISA technique was applied by

\* Bu Araştırma Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu Tarafından Desteklenmiştir.

\*\* Etlik Vet. Kont. Arşt. Enst. ANKARA

use of ready commercial kits which make possible to determine clenbuterol in picogram level from cattle urine. In the blank samples, clenbuterol equivalent binding values ( $B/B_0$ ) was determined as minimum 78.2%, maximum 88.3%, mean 82.7%. The results of control samples, which was used in recovery studies, was found to be minimum 93.9%, maximum 97.9% and mean 95.1%.

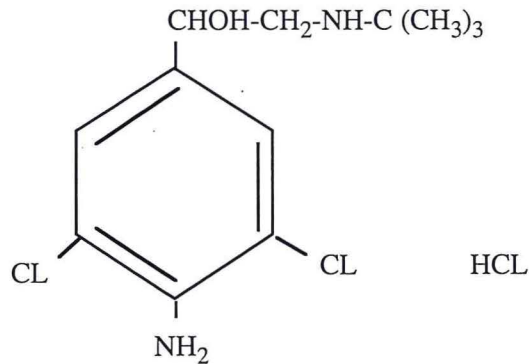
In the second period of this study, 1000 urine samples taken from cattles which are imported by Turkey, have been examined in terms of clenbuterol residues and the results was found to be negative.

**Key Words:** Clenbuterol, residue, urine, cattle.

## GİRİŞ

Clenbuterol oral olarak aktif beta-adrenerjik bir maddedir. Beta-adrenoreseptörler üzerine etkili olan ilaçlar, iki kısımda toplanır. Bunlardan birincisi simpatikomimetik  $\beta_2$  - agonistler, bunlar bronkodilatatör gibi kullanılır. Clenbuterol bu gruptandır. Diğerleri  $\beta$ -antagonistler (blokerler) olup, antihipertensif ilaçlar gibi kullanılır. Bunlar nörotransmitterler olarak rol oynayan adrenalin ve noradrenalin gibi endojen katekolaminlerin kimyasal modifikasyonudurlar (8).

Clenbuterol, kimyasal kaynaklarda (4-amino-3,5 dikloro- $\alpha$  (tert- butil amino) metil]- benzil alkol hidroklorit) olarak kaydedilmiş olup, yapısal açık formülü aşağıdaki gibidir (9).



Şekil 1. Clenbuterol'ün Yapısal Açık Formülü.

Clenbuterol, suda %99.5 oranında çözünen kısmen polar, lipolitik amino ve halojen bir yapıya sahiptir (10,14).

Yapay  $\beta$ -adrenerejik bir ilaç olan clenbuterol, 1972 yılında ilk kez astımlı, kronik bronşitli ve akciğer amfizemi olan hastalarda kullanılmaya başlanmış ve ilacın kuvvetli bir bronkodilatatör olduğu bildirilerek, insanlarda günde bir kez 40  $\mu$ g dozda iyileştirici olarak kullanılabileceğine işaret edilmiştir (19). Clenbuterol, merkezi olarak  $\beta$ -sempatikomimetik etkiye sahip olup,  $\beta_2$ -reseptör bölgesinde aktiftir, arzu edilmeyen kardiyak etkisi çok az olduğundan bilhassa atlarda kronik solunum yolu hastalıklarının sağıtımında kullanılır. Aynı zamanda bronşial bezleri ve cilia hücrelerini de uyarak mukoz sekresyonu artırır. Kuvvetli bir bronkospazmolitik etkiye sahip olan clenbuterol, bronşial düz kas aktivitesini azaltır ve solunum yollarını genişletir. Bu ilaç, diğer  $\beta$ -adrenerejik etkide olan salbutamol ve metaproterenol'dan daha fazla spazmolitik etkiye ve daha uzun tesire sahiptir. Clenbuterol'ün bu etkileri gösterdiği  $\beta_2$ -reseptörlerinin, bronşların düz kaslarında, damar yataklarında ve uterus'ta bulunduğu işaret edilmektedir. Clenbuterol oral veya parenteral uygulandığında, çabuk absorbe olur. Sağıtım dozunda oral uygulamada herhangi bir yan etkisinin olmadığı, fakat parenteral uygulamada kas tremorları, kısa terlemeler, anoreksia gibi yan etkilerinin olabileceği bildirilmektedir (9, 10, 14). Clenbuterol, veteriner hekimlikte sağıtım amacıyla, uterus kaslarını gevşetici ve bronkodilatatör olarak, bilhassa atlarda kullanılmaktadır. Koyun ve buzağılara uygulandığında ilk birkaç gün esnasında kalp atışında artma ve kan basıncında düşmeye sebep olduğu ve günlük 1.5 mg.'ın üzerindeki dozlarda (beş güne kadar) iştahta azalmaya neden olduğuna değinilmektedir (4, 10).

Normal olarak sağıtımda kullanılan clenbuterol'ün amaç dışı anabolizan olarak kasaplık hayvanlarda kullanılması ile, tüketiciler açısından potansiyel bir kalıntı riski başlamıştır. Clenbuterol'ün eti için yetiştirilen hayvanların gelişimleri üzerine olan pozitif etkilerine, ilk defa 1984 yılında işaret edilmiştir (3,6,17). Vücut yağlanması olmaksızın kassel gelişimi hızlandırıcı anabolizan etki göstermesinin, normal sağıtım dozunun 5-10 katı üzerinde verilmesi ile mümkün olduğuna işaret edilmektedir (13).

Clenbuterol'ün çiftlik hayvanlarının daha ekonomik bir şekilde yetiştirilmelerine olanak sağlayan anabolik etkisi yüzünden, amaç dışı olarak yasadışı bir şekilde kullanımı ve diğer taraftan, kasaplık hayvanların dokularında bıraktığı kalıntı riski, halk sağlığını olumsuz olarak etkilemektedir. Diğer  $\beta$ -agonistlerin, (Salbutamol, cimaterol) kalıntı bıraktığına dair bilgi yoktur (12).

İnsanlara sağıtım dozunda (40  $\mu$ g/gün) uygulandığında, plasmadaki yarılanma ömrünün 35 saat, ratlara 2  $\mu$ g/kg. dozda uygulandığında yarılanma



ömrünün 30 saat, tavşanlara aynı dozda uygulandığında plasmadaki yarılanma ömrünün, 9 saat olduğu saptanmıştır (19).

Anabolik etki dozunda (10 µg/kg/gün) buzağılara 21 gün süreyle oral olarak clenbuterol uygulaması yapıldığında, clenbuterol'ün idrarda yarılanma ömrü, eliminasyonun ilk fazında 10 saat, ikinci fazında ise 2.7nci gün olduğu ve bifazik eliminasyonun benzer şekilde köpeklerde, insanlarda ve ratlarda da olduğu ve insanlara sağıtım dozunda uygulandığında, en yüksek yoğunluğun idrarda 10-20 ng/ml, en düşük ise 1-2 ng/ml bulunduğu ve bu sonuçların ilaç uygulamasından 48 saat sonraki değerler olduğu, plazma yarılanma ömrünün insan, sığır ve atlarda 22-32 saatler arasında saptandığı bildirilmektedir (10,18).

Clenbuterol'ün yapılan bir farmakokinetik kalıntı çalışmasında, deneysel olarak buzağılara, anabolik tesir dozunda oral yol ile üç hafta süreyle verilmiş ve bu süreç esnasında doku ve vücut sıvılarındaki yoğunlukları araştırılmıştır. Oral yol ile ilacın verilmesinden sonraki 20-60 dak. arasında plazma clenbuterol yoğunluğunda yükselme görülmüş, uygulamanın birinci, üçüncü ve yirmibirinci günlerindeki plazma yoğunluklarının karşılaştırılmasında, clenbuterol'ün emiliminin hızlı olduğu ve ilacın uygulamasından sonraki 2-7 nci saatler arasında da clenbuterol yoğunluğu, plato seviyesine erişmiştir. Plasmanın ml'sinde birinci günde 0.5 ng, üçüncü günde 0.7 ng ve uygulamanın son günü olan 21.nci günde 1.1 ng'a erişilmiş ve maksimum plazma clenbuterol yoğunluğu, uygulamadan sonra ilk 2-3'ncü saatler arasında bulunmuştur (10).

Clenbuterol'ün özellikle lipolitik etkisinden dolayı, koyunlarda yağsız karkas eti elde edimesi üzerine yapılan çalışmalarda, olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Uygulama yapılan koyunlarda ilk üç gün esnasında kan basıncında düşme, kalp atım sayısında artış görüldüğü halde, devam eden uygulamalarda kan basıncı ve kalp atışı üzerinde herhangi bir olumsuz etkinin olmadığı ve günlük 1.5 mg'ın üzerine çıkılan dozlarda iştahta azalmaya neden olduğu gözlenmiştir (4). Kümes hayvanlarında kullanıldığında, lipolisisi uyarmasıyla karkas kompozisyonunun değiştiği ve 0.25-4 ppm dozlarında piliçlere 4-7 hafta boyunca yem ile birlikte verildiğinde tüm vücut yağlarında azalma, protein miktarında artma, büyüme ve yemden yararlanma yeteneğinin arttığına işaret edilmektedir (5). Clenbuterol'ün yukarıda da değinildiği gibi çeşitli hayvan gruplarında kassel gelişmeye, vücut yağlarında azalmaya, nitrojen tutulmasına ve yemden yararlanmayı arttırıcı etkileri, bunun yasadışı bir şekilde zooteknik amaçlarla kullanımını yaygınlaştırmakta ve bu durum tüketici sağlığı için potansiyel bir tehlike meydana getirmektedir. 1988 yılından iti-

baren, başta AB ülkeleri olmak üzere bir çok ülke clenbuterol için, denetim programları geliştirmeye başlamışlardır. Yapılan deneysel çalışmalarda, anabolik etki dozunda uygulama yapılan hayvanların dokularındaki ilaç yoğunluğu son uygulamadan 14 gün sonra tolerans seviyesine (0.08/ng/g) inmektedir. Bu oranların üstündeki miktarları saptayabilmek için çabuk sonuç alınabilen, günlük analizlere uygun ve çok sayıda örneği kısa sürede analiz edebilen çok duyarlı laboratuvar yöntemlerine gereksinim vardır (7). Şimdiye kadar clenbuterol'ün laboratuvar teşhisinde kullanılan bir çok yöntem tarif edilmiştir. Henion ve Maylın isimli araştırmacılar TLC ve MS metodunu geliştirmişler, Daldrup ve ark. GC metodunu yine Hamann ve ark. clenbuterol'ün farmakolojik jel formasyonundan teşhisi için bir HPLC metodu geliştirmişlerdir. Tarif edilen bu yöntemlerde, teşhis sınırı, yenilebilen dokular (böbrek, karaciğer, et) için 0.54 ng/g, idrar örnekleri için ise 0.25 ng/ml olarak saptanmıştır. TLC, HPLC, GC, GC-MS metodlarının kullanılmasında uzun ve zahmetli ekstraksiyon işlemi ve analiz için deney örneğinin çok iyi bir şekilde saflaştırılması gerekmektedir. Yukarıdaki teşhis sınırlarına ancak bu şekilde ulaşılabileceğine işaret edilmektedir (7,9,18).

Diğer taraftan yukarıda da belirtildiği gibi clenbuterol'ün yasadışı kullanımlarında tüketici sağlığı üzerine olan riskin ortadan kaldırılmasına yönelik izleme programlarında, çabuk sonuç alınabilen duyarlı analiz yöntemlerine gereksinim vardır. Bu amaçla son yıllarda uzun ve uğraşlı ekstraksiyon ve purifikasyon işlemlerine gerek duyulmayan ELISA yöntemleri geliştirilmiştir. ELISA yöntemlerinin 0.2-0.8 ng/g arasında bir teşhis sınırına inebildiği belirtilerek clenbuterol'ün günlük analizleri için kullanılabilceği bildirilmektedir. (12).

## **MATERYAL ve METOT**

Türkiye'ye dış alımla sağlanan kasaplık sığırların idrar örnekleri, Gümrük Veteriner Müdürlükleri tarafından resmi yazı ile birlikte mühürlü olarak, hormon analizleri yönünden, Ankara Etlik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsündeki Laboratuvarımıza gönderilmektedir. 1993-1995 yılları arasında Estonya, Çek Cumhuriyeti, Polonya, Litvanya, Macaristan, Moldavya, Romanya, Beyaz Rusya, Slovakya ve Ukrayna'dan satın alınan kasaplık sığırlara ait 1000 adet idrar örneği, clenbuterol yönünden de materyal olarak kullanıldı. Diğer taraftan biyolojik matriks etkisini gösteren background değerlerinin saptanması ve recovery çalışmalarında da kullanılmak üzere, Erzurum Et ve Balık Kurumunda kesilen ve clenbuterol uygulaması yapılmamış kasaplık sığırlardan elde edilen 30 adet idrar örneği, kör olarak deneye alın-



dı. Çalışmada kullanılan ELISA kitleri, İtalyan Genego S.P.A. firmasından satın alındı. Ticari olarak satışa sunulan bu kit içerisinde sırasıyla tavşan IgG'lere karşı hazırlanmış antikorlarla kaplı 96'lık mikroplytler, altı değişik yoğunlukda (0.3 ng/ml, 0.6 ng/ml, 1.25 ng/ml, 2.5 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml.) hazırlanmış standart clenbuterol solusyonları, kullanıma hazır anti-clenbuterol antikorları, ve konjuget, sulandırma solusyonu, yıkama solusyonu, sitrat buffer ve kromojen bulunmaktadır.

### **Metot**

Clenbuterol'ün sığır idrar örneklerinden pikogram düzeyinde saptanmasına olanak sağlayan indirect competitive enzyme immunoassay yöntemi uygulandı (15).

Metodun Prensipleri: Keçi anti-tavşan IgG'leri ile kaplanmış mikroplyte sırasıyla, clenbuterol standardı veya örnek, enzimle-işaretli konjuget, tavşan anti-clenbuterol antikorları ilave edilerek pleyt inkübasyona bırakılır. İnkübasyon esnasında anti-clenbuterol antikorları, hareketsiz IgG'ler tarafından bağlanır. Serbest ve enzimle-işaretli clenbuterol, clenbuterol antikorlarına ulaşmak için yarışır. İnkübasyon sonunda bağlanmamış materyal yıkılarak gelişimi için pleyt tekrar inkube edilir. Kolorimetrik substrat, peroksida-zın varlığında yeşil bir renk oluşturur. Renk yoğunluğu, örnekteki clenbuterol konsantrasyonu ile ters orantılıdır. Meydana gelen renk yoğunluğu mikroplyte okuyucusunda 405 nm'de ölçülerek, bilinmeyen clenbuterol miktarı, konsantrasyonları bilinen clenbuterol standartları ile hazırlanan kalibrasyon eğrisinden hesaplanır.

### **Çalışma Solusyonlarının Hazırlanması**

Yıkama solusyonu 10 misli, sulandırma solusyonu 20 misli distile suyla, substrat ise, kromojenin 1/25 oranında, sitrat buffer ile sulandırılmasıyla hazırlandı.

### **İdrar Örneklerinin Hazırlanması**

İdrar örnekleri 2000 devirde 10 dak. santrifüj edildi. 1/2 oranında sulandırma solusyonu ile sulandırılarak analize hazırlandı.

### **İmunoassay İşlemi**

Kör olarak ayrılan mikroplyte gözüne 200 µg, maksimum bağlama olarak ayrılan mikroplyte gözüne 50 µl distile su, metod prosedürüne uygun olarak konuldu. Standartlar için ayrılan gözlere herbir standarttan 50 µl, örnekler için ayrılan gözlere herbir örnekten 50 µl konuldu. Kör haricinde tüm gözlere sırasıyla 50 µl enzim konjuget ve 100 µl anti-clenbuterol antikorları ilave

edildi. Mikropleyt hafifçe karıştırıldı, 30 dak. oda derecesinde inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda boşaltılan pleyt, yıkama işlemine alındı.

### **Yıkama İşlemi**

Mikropleyt, beş kez yıkama solusyonu ile yıkanarak tüm gözlere 200 µl substrat ilave edildi. 30 dak. oda derecesinde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda absorbens değerleri, mikrolaka okuyucusunda 405 nm'de havaya karşı ölçüldü.

### **Değerlendirme**

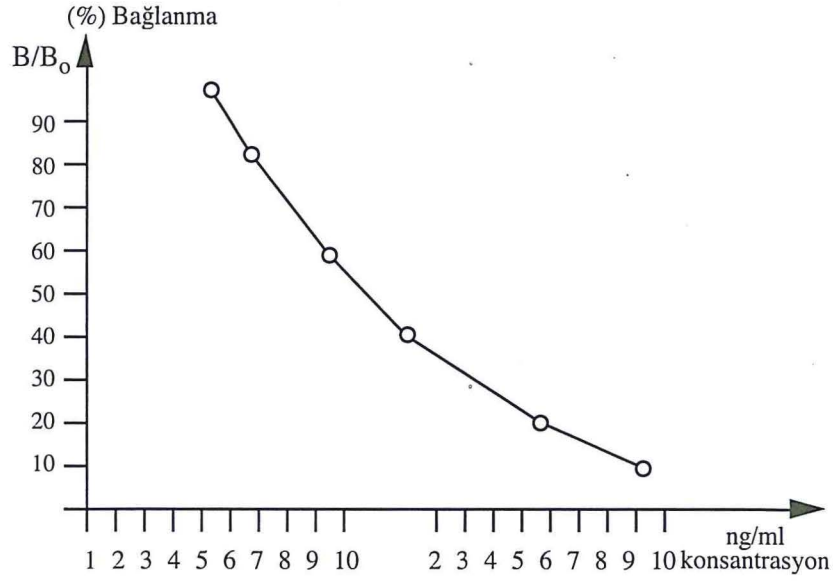
Standart ve örneklerin absorbens değerleri (B), maksimum bağlama absorbens değerine (Bo) bölünerek, aşağıdaki formüle göre % bağlama değerleri bulundu.

$$B/Bo (\% \text{ Bağlanma}) = \frac{\text{Örnek veya standart absorbens değeri}}{\text{Maksimum bağlama absorbens değeri}} \times 100$$

Herbir standart veya örnek için saptanan % bağlama değerleri semilogaritmik grafik kağıdın koordinat kısmında, standart clenbuterol konsantrasyonlarına karşı işaretlenerek, kalibrasyon eğrisinden clenbuterol miktarı belirlendi.

## **BULGULAR**

Türkiye'ye satın alınan kasaplık sığırlara ait idrar örnekleri, clenbuterol kalıntıları yönünden ELISA yöntemi ile analize alındı. Çalışmanın ilk döneminde kit içerisinde kullanıma hazır olarak bulunan altı değişik yoğunlukdaki clenbuterol standartları ile çalışıldı. Standartlara ait kalibrasyon eğrisi Şekil 2 de görüldüğü gibi 0.3-10 ng/ml sınırlarında çizildi. Sığır idrar örneklerinin, clenbuterol'e eşdeğer background % bağlanma değerlerinin saptanması amacıyla, clenbuterol uygulaması yapılmamış sığırlardan elde edilen 30 adet idrar örneği kör olarak ELISA yöntemi ile deneye alındı. Bunlara ait biyolojik matriks etkisini gösteren background değerleri, bunların ortalamaları standart sapma değerleri Tablo 1'de görüldüğü gibi saptandı. En düşük bağlanma değeri (B/Bo) %78.2, en yüksek % 88.3 ortalama %82.7 olarak belirlendi. Elde edilen sonuçlar, kit protokolündeki sığır idrar örneklerine ait background değerleri ile uyumlu bulundu.



Şekil 2. Clenbuterol'un Standart Kalibrasyon Eğrisi



**Tablo 1.** Kör olarak kullanılan sığır idrar örneklerinin clenbuterol'e eşdeğer background % bağlanma değerleri.

Kör Olarak Kullanılan Sığır İdrarları	B/Bo (%) Bağlanma Değeri
1 Nolu İdrar	83.9
2 Nolu İdrar	78.2
3 Nolu İdrar	84.4
4 Nolu İdrar	86.4
5 Nolu İdrar	83.1
6 Nolu İdrar	78.2
7 Nolu İdrar	80.6
8 Nolu İdrar	85.2
9 Nolu İdrar	80.1
10 Nolu İdrar	81.9
11 Nolu İdrar	79.7
12 Nolu İdrar	83.8
13 Nolu İdrar	83.2
14 Nolu İdrar	85.9
15 Nolu İdrar	79.3
16 Nolu İdrar	83.4
17 Nolu İdrar	83.2
18 Nolu İdrar	84.1
19 Nolu İdrar	81.7
20 Nolu İdrar	82.2
21 Nolu İdrar	82.5
22 Nolu İdrar	84.3
23 Nolu İdrar	85.3
24 Nolu İdrar	88.3
25 Nolu İdrar	87.6
26 Nolu İdrar	80.8
27 Nolu İdrar	82.4
28 Nolu İdrar	80.7
29 Nolu İdrar	82.7
30 Nolu İdrar	80.1
Deneye Alınan İdrar Sayısı :	30
Ortalama B/Bo (%) :	82.77
Standart Sapma (%) :	2.57

Analiz yönteminin etkinliğine yönelik recovery çalışmalarında da, negatif olduğu bilinen sığır idrar örneklerine sırasıyla 1.25 ng/ml, 2.5 ng/ml, 5 ng/ml, 10ng/ml yoğunluklarında clenbuterol standardı katılarak kontroller hazırlandı. Deneye alınan kontrollere ait Recovery sonuçları Tablo 2’de görüldüğü gibi en düşük %93.9, en yüksek %97.9, ortalama %95.1 olarak saptandı. Elde edilen bu sonuçlar, kit protokolü ile uyumlu bulundu. Çalışmanın ikinci döneminde, Türkiye’ye alımı yapılan kasaplık sığırlara ait 1000 adet idrar örneği, clenbuterol kalıntıları yönünden araştırıldı ve sonuçlar negatif olarak bulundu.

**Tablo 2.** Recovery Çalışma Sonuçları

İdrar Örneklerine Katılan Clenbuterol Konsantrasyonu (ng/ml)	Test Sayısı	Elde Edilen Ortalama Clenbuterol Konsantrasyonu (ng/ml.)	Recovery (%)
1.250	5	1.224	97.9
2.500	5	2.349	93.9
5.000	5	4.731	94.6
10.000	5	9.418	94.1

n : 20

Ortalama % Recovery : 95.1

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Bronşial hastalıkların sağıtımında, bilhassa atlarda kullanılan clenbuterol’un, anabolik etkisinin anlaşılmasından sonra, kasaplık hayvanlarda yasadışı bir şekilde yüksek dozlarda kullanılmaya başlanması, halk sağlığını ciddi bir şekilde tehlikeye düşürmüş ve eti yenen hayvanların dokularında bıraktığı yüksek kalıntı yoğunluğu, clenbuterol ile ilgili izleme programlarının başlatılmasına neden olmuştur. Clenbuterol’ün vücut yağlanması olmaksızın kassel gelişimi hızlandırıcı anabolik etki gösterebilmesinin, ancak normal tedavi dozunun 5-10 katı üzerinde verilmesiyle mümkün olabileceği bildirilmektedir(10).

Clenbuterol’ün yapılan bir farmakokinetik kalıntı çalışmasında, danalara günde iki kez olmak üzere, 5 µg/kg dozda oral yolla 21 gün süresince veril-

mesi esnasında, doku ve vücut sıvılarındaki clenbuterol yoğunlukları, araştırılmış ve kalıntı birikimi kan plazmasına oranla iç organlarda (akciğer, karaciğer, böbrek, dalak) yaklaşık 20-90 katı, kas ve yağ dokularında ise 3-15 katı daha yüksek bulunmuş, 61 adet idrar örneğinde bulunan clenbuterol konsantrasyonları en düşük 6 ng/ml, en yüksek 193 ng/ml ve ortalama 47 ng/ml olarak saptanmış olup, bu değerler plasma clenbuterol konsantrasyonuna oranla 40 katı daha yüksektir. Bu eksperimental çalışmada, en yüksek kalıntı yoğunluğuna üç haftalık ilaç verme süresi sonunda göz dokusunda rastlanmış ve göz dokusundaki kalıntı yoğunluğu, plasma clenbuterol yoğunluğu olan 1.1 ng/ml miktarına oranla 107 kat daha yüksek olarak saptanmıştır. Farmakolojik olarak aktif clenbuterol dozunu, anabolik amaçlı uygulama yapılmış ve kesim öncesi bekletilmemiş sığır akciğeri ve karaciğerinden 100 g'a kadar tüketen kişilerin alabileceği, et olarak tüketilmesi durumunda ise, bu miktarın 1 kg'a eşit olabileceğine dikkat çekilerek, clenbuterol tolerans seviyesinin, uygulama yapılan hayvanların dokularında 0.08 ng/g olduğu ve bu hayvanların kesim öncesi iki hafta kadar bekletilmesi gereğine işaret edilmektedir(10). Clenbuterol'ün laboratuvar teşhisinde en önemli deney örneğinin idrar olduğu belirtilmekte, çünkü insanlarda, sığırlarda ve atlarda clenbuterol'ün önemli bir kısmının idrarla metabolize olmadan atılmakta olduğu ve bu değişime uğramamış clenbuterol miktarının bu türlerde %34-43 sınırları arasında bulunduğu, bunun da doping ve anabolizan amaçlı yasadışı kullanımların ortaya çıkartılmasında, plasma örnekleri gibi dozlama zamanına bağlı kritik durum göstermeyen idrar örneklerinin en uygunu olduğuna değinilmektedir(18).

Clenbuterol'ün iyileştirici ve klinik kullanımlarından ayrı olarak anabolik ve doping amaçlı yasadışı bir şekilde kullanılıyor olması, clenbuterol ile ilgili kalıntı izleme programlarının başlatılmasına sebep olmuş ve Avrupa Birliği ülkelerinde 86/469/EEC sayılı direktif çerçevesinde topluluk içi denetimlere 1988 yılından itibaren başlanmış ve ayrıca üçüncü ülkelere topluluğa alınacak canlı hayvan ve bunlara ait ürünlerinden de clenbuterol ile ilgili analiz raporu şartı getirilmiştir(1).

Diğer taraftan Uluslararası Olimpik Komite, clenbuterolü yasaklanmış kimyasal maddeler listesine dahil ederek, doping amaçlı kullanımını önlemiştir(8).

Clenbuterol'ün Avrupa Birliği tarafından denetim programına alınmasından sonra yapılan sistemik kontrollerde birçok yasadışı kullanım olayları tespit edilmeye başlanmıştır. 1988 yılında Almanya'da clenbuterol'ün 100 bine yakın danaya anabolik amaçlı olarak uygulanması ve olayın çok büyük bo-



yutlu olması, Almanya'da hayvancılık sektöründe dehşet yaratmış ve çiftliklere yapılan baskınlarda çok sayıda anabolik hormonlar ile karıştırılmış clenbuterol preparatları ele geçirilmiştir. Bavyera bölgesi Veteriner Odası olayın, halk sağlığını yakından ilgilendirdiğini ve clenbuterol'ün yasak yollardan üreticilere satıldığını belirtmiş, Bavyera polisi 1984 yılında ilk kez karaborsa ilaç dağıtım zincirinin ilk halkalarını saptadıklarını ve büyük bir örgütün varlığı ile karşı karşıya olduklarını açıklamıştır(2).

Almanya'da patlak veren skandalın etkisi, diğer Avrupa ülkelerini de sarmış, başta Belçika, Hollanda, Fransa olmak üzere birçok ülkede ortaya çıkan skandalın kendi ülkelerine de bulaşmış olduğu kaygısıyla, halk sağlığını korumaya yönelik, clenbuterol denetim programını başlatmışlardır. 1989 yılında, İspanya'da sığır karaciğerinin tüketilmesine bağlı olarak meydana gelen bir zehirlenme olayında, klinik verilerin incelenmesiyle, zehirlenme sebebinin yüksek dozda clenbuterol uygulanmış sığırlardan elde edilen karaciğerlerin tüketilmesi sonucu olduğu anlaşılmıştır. Bu olayda tipik klinik bulgular olarak, kas tremorları, kalp çarpıntısı, taşikardi, sinirlilik hali, kas ağrıları gözlenmiştir. Bu zehirlenmede, 43 aile etkilenmiş ve görülen klinik belirtiler, 40 saat sonra kaybolmuş ve ölüm meydana gelmemiştir. Olayı sorgulayan epidemiyologlar, zehirlenen kişilerden kan ve idrar örnekleri olarak clenbuterol şüphesiyle örnekleri analiz ettirmişler ve 2-4 ppb arasında clenbuterol pozitif bulunmuştur. Zehirlenmeye sebebiyet veren karaciğerler de analiz ettirilmiş ve 160-291 ppb clenbuterol saptanmıştır.(11)

Clenbuterol kapsayan sığır karaciğerlerinin tüketilmesine bağlı olarak toplu meydana gelen bir diğer zehirlenme olayı da, 1990 yılında Fransa'da ortaya çıkmış, bu olayda 21 kişi dana karaciğerini yedikten 1-3 saat sonra baş ağrısı, tremor, taşikardi baş dönmesi ve halsizlik şikayetleri ile hastaneye başvurmuşlar ve olayın infeksiyöz bir sebebe bağlı olmadığını anlayan doktorlar, tipik  $\beta$ -agonist zehirlenmesine bağlı klinik belirtileri gördükten sonra, olayı clenbuterol yönünden araştırmışlar ve zehirlenmeye sebep olan dana karaciğerlerinin laboratuvar analizinde numunelerde 375-500 ng/g clenbuterol saptanmıştır(16).

Yukarıda değinildiği gibi, sağıtım dozunun çok üzerinde anabolizan olarak yasadışı bir şekilde kasaplık sığırlara verilen ve bir çok ülkede ulusal sınırlar içerisinde halk sağlığını korumak için denetim programlarına alınan clenbuterol'ü, rutine uygulanabilen, çabuk sonuç alınabilen ve güvenilir bir analiz yöntemi olan ELISA yöntemiyle araştırdık. Bu amaçla çeşitli ülkelerden Türkiye'ye satın alınan kasaplık sığırlara ait 1000 adet idrar örneği analize alındı ve sonuçlar negatif bulundu. Elde edilen sonuçlar, Türkiye'ye sa-

tın alınan hayvanlarda anabolik amaçlı ve yasadışı clenbuterol kullanımının olmadığını ve halk sağlığının korunması yönünden memnuniyet verici olduğunu göstermektedir.

#### KAYNAKLAR

- 1- **Anon.** (1986). Concerning examination of animals and fresh meat for the presence of residues. J Eur Com L223-18.
- 2- **Anon.** (1988). Cumhuriyet Gazetesi İstanbul 20 Ağustos.
- 3- **Baker P K, Dairymple R H, Ingle D L, Ricks C A.** (1989). Use of a  $\beta$ -adrenergik antagonist to alter muscle and fat deposition in lambs. J Anim Sci 59.
- 4- **Brockway J M, Macrae J C, Williams P E V** (1987). Side effects of clenbuterol as a repartitioning agent. Vet Rec 120 381-383.
- 5- **Buyse J, Deauypere E, Hyyghebaert G, Herremans M** (1991). The effect of clenbuterol supplementation on growth performance and on plasma hormone and metabolite levels of broilers. Poultry Sci 70 993-1002.
- 6- **Dairymple R H, Baker P K, Gingham D E, Ingle D L, Pensack J M, Ricks C A** (1989). A repartitioning agent to improve performance and carcass composition of broilers. Poult Sci 63.
- 7- **Degroodt J M, Bukanski B W, Beernaert H, Courtheyn D** (1989). Clenbuterol residue analysis by HPLC-HPTLC in urine and animal tissues. Lebenson unters Forsch 189 128-131.
- 8- **Dumassia C M, Houghton E** (1985). Screening and Confirmatory analysis of  $\beta$ -agonists  $\beta$ -antagonists and their metabolites in horse urine by capillary gas chromatography mass spectrometry. J. chromatography 564-503-513.
- 9- **Eddins C, Hamann J, Johnson K** (1991). HPLC Analysis of clenbuterol a beta-adrenergic drug in equine urine. J. chromatographic sci 23.
- 10- **Heinrich H, Meyer D, Lucia M** (1991). The Pharmacokinetics and residues of clenbuterol in veal calves. J Anim Sci 69 4538-4544.
- 11- **Martinez J F** (1990). Food Poisoning related to consumption of illicit  $\beta$ -agonist in liver. Lancet 336.
- 12- **Meyer H H D, Rinko L, Dürsch I** (1991). Residue screening for the  $\beta$ -agonists clenbuterol salbutamol and cimaterol in urine using enzyme immunoassay and high performance liquid chromatography. J chromatography 564 551-556.

**13- Miller N P, Garcia D K, Coleman M E, Ekeren P A, Lunt D K, Wagner K A, Procknor M, Welsh T H, Smith S B** (1988). Adipose tissue Longissimus muscle and anterior pituitary growth and function in clenbuterol fed heifers. *J Anim Sci* 66.

**14- Nazzal C A** (1986). The clinical pharmacology of clenbuterol. *Southern Veterinarian* 36 2 121 125.

**15- Paleologo M O, Giacomini G, Ballaben F, Berti F, Benedetti F, Bagnati R, Bastiani E** (1992). An enzyme linked immunosorbent assay for the direct analysis of beta-agonist drugs in urine and sera. *Food and Agricultural Immunology* 4 73-85.

**16- Pulce C, Lamaison D, Keck G, Bostvironnois C, Nicolas J, Descotes J** (1991). Collective human food poisonings by clenbuterol residues in veal liver. *Vet-Hum Toxicol* 33.

**17- Rick C A, Baker P K, Dairympte R H, Doscher M E, Ingle D L, Pankavish J** (1984). Use of clenbuterol to alter muscle and fat accretion in swine. *Fed Proc* 43.

**18- Wiley J** (1988). A rapid liquid solid extraction procedure for the quantification of clenbuterol in urine. *Biomed Environ Mass Spectrum* 17 415-416.

**19- Yamamoto I, Iwata K, Nakashima M** (1985). Pharmacokinetics of plasma and urine clenbuterol in man rat and rabbit. *J Pharmacobio-Dyn* 8 385-391.