



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

CORSO DI LAUREA IN CHIMICA

Clenbuterolo: usi, implicazioni e determinazione analitica.

Relatrice: Prof.ssa Alice Sosic

Laureanda: Sara Pavan

ANNO ACCADEMICO 2025/2026

INDICE

ABSTRACT.....	5
1. STORIA, APPLICAZIONI E INDICAZIONI TERAPEUTICHE.....	6
2. STRUTTURA E PROPRIETÀ CHIMICO FISICHE.....	7
2.1 Proprietà acido-base.....	7
2.2 Solubilità, Polarità e ripartizione in membrana.....	7
2.3 Tautomeria, equilibri conformazionali e stereochimica.....	8
3. SINTESI.....	12
4. I RECETTORI ADRENERGICI (AR).....	14
4.1 Il Sistema Adrenergico.....	14
4.2 I recettori β adrenergici: bersagli primari del Clenbuterolo.....	17
5. FARMACODINAMICA ED EFFETTI FISIOLOGICI.....	18
5.1 Meccanismo conformazionale di riconoscimento molecolare.....	18
5.2 Effetti fisiologici.....	19
5.2.1 Effetto primario (Terapeutico): Rilassamento della Muscolatura Liscia Bronchiale.....	19
5.2.2 Effetti Metabolici sul Tessuto Adiposo: origine dell'effetto lipolitico.....	19
5.2.3 Effetti Anabolici sul Muscolo Scheletrico.....	20
5.2.4 Effetti Collaterali Cardiotossici.....	20
6. FARMACOCINETICA e PROPRIETÀ A.D.M.E.....	21
6.1 Assorbimento (A) e Distribuzione (D).....	21
6.2 Metabolismo (M) e Eliminazione (E).....	21
7. PROFILO TOSSICOLOGICO.....	23
7.1 Effetti collaterali e disintossicazione.....	23
7.2 Normative in Ambito Civile e Sportivo.....	23
8. METODI ANALITICI DI RILEVAZIONE.....	24
8.1 L'Esigenza di Analisi Sensibili.....	24

8.2 Preparazione del Campione.....	24
8.3 Tecniche di Analisi e di Separazione.....	25
8.3.1 Cromatografia Liquida ad Alta Prestazione (HPLC).....	25
8.3.2 Spettrometria di Massa in Tandem (LC-MS/MS): La tecnica d'Elezione.....	25
8.3.3 Tecniche Immunologiche (ELISA).....	27
8.4 Tecniche secondarie di Supporto all'analisi.....	27
8.5 Confronto dei Metodi Analitici	28
9. CONCLUSIONI.....	29
BIBLIOGRAFIA.....	30

Abstract: Il Clenbuterolo è un potente agonista β_2 -adrenergico, noto non solo per le sue proprietà broncodilatatrici, ma anche per i marcati effetti anabolizzanti e lipolitici che ne spingono un diffuso abuso in ambito zootecnico e sportivo. Il presente lavoro di tesi si propone di analizzare in modo sistematico il profilo del farmaco, correlando le sue peculiari proprietà chimico-fisiche con la persistenza biologica e le sfide legate alla sua rilevazione analitica. Verrà descritta la farmacodinamica per evidenziare come l'elevata potenza della molecola derivi da una specifica interazione con i recettori β_2 -AR, mentre l'esame della farmacocinetica chiarisce il meccanismo della sua eccezionale emivita di eliminazione. In seguito, ci si concentrerà sugli effetti collaterali, gli aspetti tossicologici e i rischi per la salute, che sono le ragioni per cui il farmaco è vietato per l'uso umano e zootecnico-alimentare e sulle metodologie analitiche necessarie per il monitoraggio forense. Le prospettive future evidenziano la necessità di sviluppare nuove strategie analitiche per distinguere le contaminazioni accidentali dall'assunzione deliberata, garantendo al contempo l'evoluzione verso agonisti adrenergici più selettivi e sicuri.

1. STORIA, APPLICAZIONI E INDICAZIONI TERAPEUTICHE

Il Clenbuterolo (nome IUPAC: 1-(4-ammino-3,5-diclorofenil)-2-(terz-butilammino)etan-1-olo) è una piccola molecola di sintesi (NME), utilizzata in forma cloridrata come decongenstante e broncodilatatore.^[1] È stato sintetizzato per la prima volta dalla Boehringer Ingelheim (Biberach, Germania) nel 1967, brevettato negli Stati Uniti nel 1970 e commercializzato con i nomi di Spirospen e Ventipulmin.^[2] La dose orale consigliata è 20-40 µg, due volte al giorno per l'uomo, e 0.8 µg/ kg di peso corporeo nei cavalli.^[3] Sebbene sia approvato in alcuni paesi, il Clenbuterolo fa oggi parte delle sostanze vietate da World Anti-Doping Agency (WADA) e Food and Drug Administration (FDA). È utilizzato illecitamente nell'allevamento e nello sport come farmaco anabolizzante e lipolitico.^{[4], [5]}

Questo elaborato si propone di studiare il Clenbuterolo, i sistemi per la sua rilevazione ed i rischi legati al suo abuso.

2. STRUTTURA E PROPRIETÀ CHIMICO-FISICHE

Il Clenbuterolo è un'anilina sostituita con formula molecolare $C_{12}H_{18}Cl_2N_2O$ e peso molecolare pari a 277.19 g/mol.^[6] Si presenta come un solido bianco, con punto di fusione 174-175.5°C^[3] e densità 1.42 g/cm³.^[7]

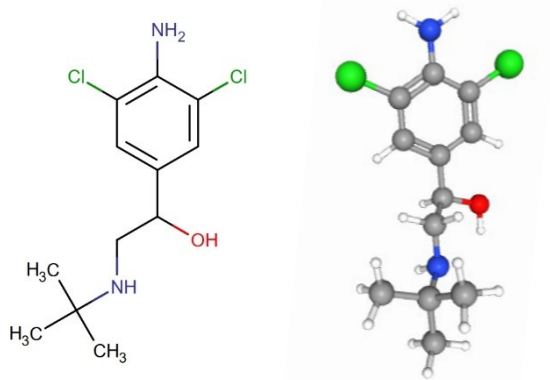


Figura 1: Struttura 2D (a sinistra) e 3D (a destra) del Clenbuterolo. Sono messi in evidenza lo scaffold aromatico e i vari sostituenti.^[8]

2.1 Proprietà acido-base

L'ammina primaria aromatica è debolmente basica e per questo può essere protonata, contribuendo alla polarità e alla solubilità. Tuttavia, il carattere basico di questo gruppo è diminuito dalla delocalizzazione di carica sull'anello e dall'effetto elettron-attrattore dei cloruri in meta. Il gruppo più basico è l'ammina secondaria alifatica, che può essere protonata (specialmente a pH acido, ma anche a pH fisiologico) e assumere carica positiva. Non sono presenti invece gruppi particolarmente acidi; l'OH è lievemente acido ma ha maggiore importanza nella formazione di legami a idrogeno poiché risulta deprotonabile solo a pH molto basici. Il fatto che la molecola abbia due gruppi basici e nessun acido rilevante, fa supporre che, a pH fisiologico, la forma protonata (carica +1) sia quella predominante. Per la molecola libera si stima una pK_a di 13.29±0.20, e quindi è una base debole.^[7]

2.2 Solubilità, Polarità e ripartizione in membrana

Il Clenbuterolo è una molecola moderatamente polare a causa della distribuzione asimmetrica della densità elettronica, conferita da gruppi polari come OH, NH₂, NH e Cl. Presenta però anche dei gruppi apolari-idrofobici quali l'anello aromatico e il terz-butile. Per questo è una molecola anfipatica, ovvero si scioglie in acqua (specialmente in forma protonata), ma è anche in grado di attraversare le membrane biologiche. La solubilità in acqua per la forma libera neutra è stimata 0.112 mg/mL, mentre il dato sperimentale per il sale cloridrato è circa 0.0465 mg/mL (a pH 7.4).^[1] Questi dati possono

sembrare in contrasto tra loro perchè la solubilità del sale risulta inferiore rispetto a quella della forma neutra mentre è corretto aspettarsi il contrario. Tuttavia si deve specificare che i due valori non sono tra loro confrontabili in quanto il primo deriva da modelli computazionali predittivi (ALOGPS) ed il secondo è un valore sperimentale.

Per farsi un'idea generale della solubilità della forma neutra, è possibile sfruttare la legge di Friesen, basata sul numero di atomi di C, N e O formanti la molecola:

$$S = \frac{C}{(N+O)} = \frac{12}{(2+1)} = 4 \rightarrow \text{MODERATAMENTE SOLUBILE (3<S<5)}$$

Formula 1: Previsione della solubilità (S) del Clenbuterolo in base alla classificazione di Friesen.

Dalle banche dati risulta che il logP (coefficiente di ripartizione olio/acqua in scala logaritmica) del Clenbuterolo (come valore medio, calcolato con ALOGPS trascurando i differenti stati conformazionali) è uguale a 2.94.^[1] Poichè la forma ionizzata è la prevalente a pH fisiologico, è conveniente considerare anche il logD (coefficiente di distribuzione a pH specifico) che, a pH=7 risulta compreso tra -2.0 e +0.3.^[9]

Questi valori sono ideali per un farmaco ad uso orale, solubile in acqua ma anche capace di attraversare e permanere in membrane biologiche, anche a livello del Sistema Nervoso Centrale.

2.3 Tautomeria, equilibri conformazionali e stereochimica

La struttura molecolare del Clenbuterolo è stabile all'isomerismo tautomerico, sia cheto-enolico che ammino-imminico. Infatti non contiene gruppi funzionali capaci di originare trasferimento protonico intramolecolare con riorganizzazione dei legami π . Non presenta neppure un sistema aromatico eterociclico che possa essere soggetto a spostamenti protonici interni.

Al contrario, il Clenbuterolo manifesta diversi equilibri conformazionali per rotazione dei suoi quattro angoli diedri tra i legami singoli formanti la flessibile catena laterale alifatica. Essendo questa la parte farmacologicamente attiva, l'importanza di ciò sta nella possibilità di ottenere uno schema interattivo diverso con il bersaglio, specialmente in base al posizionamento dell'eventuale carica positiva sull'ammina secondaria e alla direzionalità dei legami a idrogeno instaurati dall'ossidrile, sia con il target che intramolecolarmente.

La Figura 2 mostra la formula costituzionale e i conformeri sfalsati del Clenbuterolo. Gli indici t, g e h si riferiscono ai rotameri in cui i gruppi più voluminosi e vicini si trovano rispettivamente in posizione trans, gauche e hondered. ^[10]

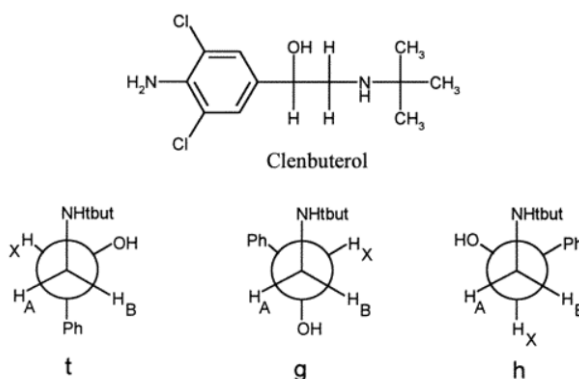


Figura 2: Formula costituzionale e conformeri sfalsati del Clenbuterolo.^[10]

Le rotazioni cruciali sono due:

1. del legame C(sp²)-C(sp³) che unisce lo scaffold aromatico al sostituito etanolamminico, perchè determina l'orientazione di tutta la catena laterale rispetto all'anello;
2. del legame C(alcolico)-C(amminico), che modula l'adattamento al sito di legame, l'entità del legame a idrogeno (OH)⋯(NH) nella catena e il valore di logP.^[10]

La conformazione più stabile del Clenbuterolo è piegata (chiamata ciclica e indicata con t in figura 2) e mostra un logP leggermente più elevato rispetto alle altre (tabella 1). Infatti, la formazione del legame a idrogeno intramolecolare (OH)⋯(NH) scherma l'interazione dei gruppi polari con l'acqua-solvente, favorendo la penetrazione in membrana e aumentando la lipofilia.

rotamer	<i>p</i>	log <i>p</i>
t	747 ± 132	2.87
g	138 ± 73	2.14
h	375 ± 291	2.57

*Tabella 1: Valori sperimentali di *P* con relative incertezze e logP per i tre rotameri del Clenbuterolo in sistema H₂O/ottanolo.^[10]*

In figura 3 sono specificati gli equilibri tra i tre rotameri in un sistema acqua/ottanolo, ognuno con il suo logP e popolazione percentuale nelle due fasi. Come previsto, il conformero più lipofilo e abbondante in ottanolo è t. Segue il rotamero h, in cui è ancora possibile la formazione del legame a idrogeno intramolecolare, ma la solvatazione ottanolica del fenile è ostacolata dalla posizione gauche

del gruppo terz-butililamminico, voluminoso e polare. La forma g è la più idrofila perchè l'OH è esposto, libero e facilmente accessibile all'acqua.^[10]

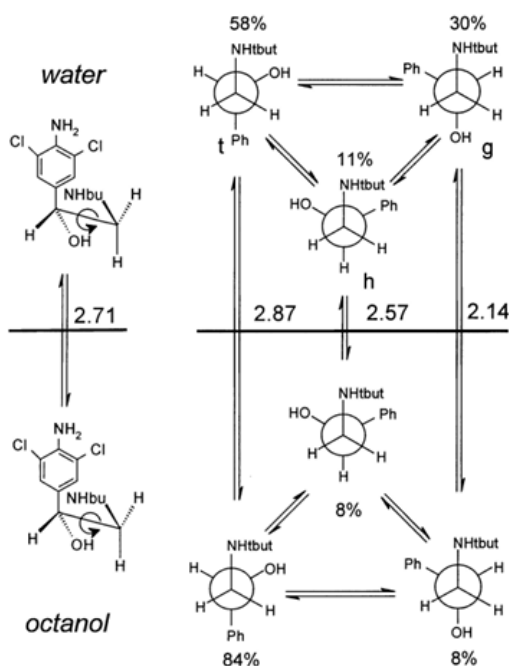


Figura 3: Schema degli equilibri di ripartizione in sistema H₂O/ottanolo dei conformeri, con i logP e le frazioni molari %.^[10]

Da questi dati si può presumere che il rotamero t sia la specie leader nei processi di afflusso in membrana, mentre il rotamero g è predominante nei fenomeni di deflusso da membrana.

Per quanto riguarda la stereochimica, il Clenbuterolo possiede un solo centro chirale, e quindi solo due enantiomeri, R e S. Essi sono chimicamente analoghi ma non sono legati da alcun equilibrio di interconversione e hanno attività ottiche e biologiche diverse.

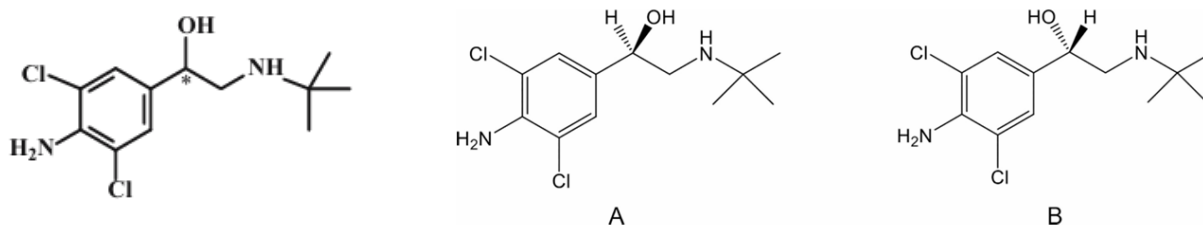


Figura 4: Centro chirale (*) del Clenbuterolo^[11] ed enantiomeri (a) R-(-)-Clenbuterolo e (b) S-(+)-Clenbuterolo.^[12]

Studi condotti su diversi modelli animali hanno confermato che hanno stessa attività anabolica ma l'effetto di broncodilatazione è maggiore per l'isomero R, mentre l'S risulta quasi inattivo.^[11] L'S-Clenbuterolo può avere altre conseguenze, tal volta collaterali. Per esempio blocca i recettori β_1 ,^[12]

riduce la pressione sanguigna, aumenta la glicemia,^[13] è eliminato più lentamente e si distribuisce in modo diverso nell'organismo.^[14]

3. SINTESI

In figura 5 si riportano i passaggi della sintesi del Clenbuterolo in forma cloridrato a partire dal 4-amminoacetofenone:

1. Clorurazione aromatica;
2. α -Bromurazione;
3. Sostituzione nucleofila del bromo con la terz-butililammina;
4. Riduzione selettiva del gruppo chetonico con NaBH_4 e ottenimento del Clenbuterolo racemo neutro;
5. Salificazione a cloridrato per acidificazione con HCl gassoso in solvente anidro.^[15]

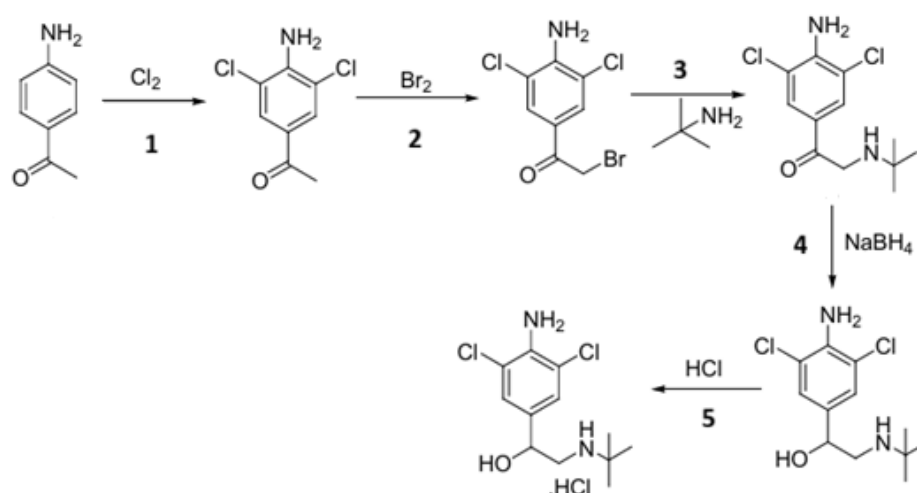


Figura 5: Schema di sintesi del Clenbuterolo Cloridrato.^[2]

La sintesi industriale più vantaggiosa fornisce la miscela racemica, che è comunque efficace in quanto l'enantiomero S non è tossico né interferente. Per migliorare le prestazioni farmacologiche e ridurre gli effetti collaterali, studi più recenti hanno esplorato tecniche per l'ottenimento del solo enantiomero R, come la risoluzione ottica del racemo post-sintesi o l'inclusione nel processo di una riduzione asimmetrica catalizzata.^{[11], [16]} Tuttavia le soluzioni sono risultate tutte complesse e costose.

Per il processo in figura 5, la Farmacopea Britannica ed Europea ha identificato sei impurezze principali, mostrate in figura 6. In tabella 2 invece si riassumono la loro origine e i possibili metodi di controllo.

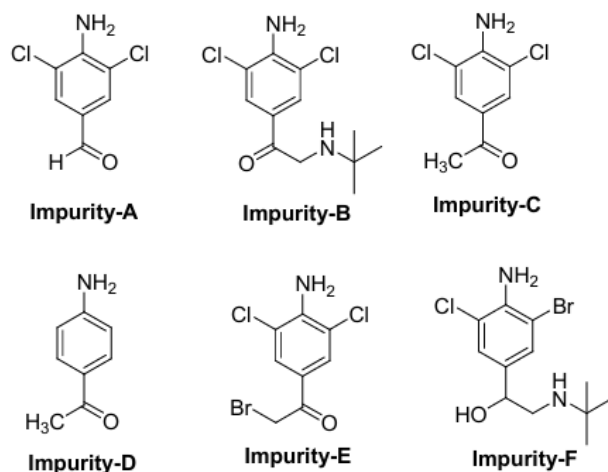


Figura 6: Impurezze relative alla sintesi del Clenbuterolo secondo la Farmacopea.^[2]

Impurity	Source of impurity	Control of impurity
Impurity-A	It is the one of by product in Stage-I reaction. It will form in the synthesis of 4-Amino-3,5-dichloro acetophenone by over chlorination reaction (haloform reaction).	This impurity can be controlled by using crystallization technique.
Impurity-B	It is one of the intermediates in the manufacturing process of clenbuterol. It may be present in the final product if any un reacted material present in the process.	This impurity has soluble nature in organic solvents and hence it can be eliminated from the process during crystallization process.
Impurity-C	It is one of the intermediates in the manufacturing process of clenbuterol. It may be present in the final product if any un reacted material is present in the process.	This impurity contains soluble nature in organic solvents and hence it can be eliminated from the process during crystallization process.
Impurity-D	It is one of the key starting materials in the manufacturing process of clenbuterol. It may be present in the final product if any un reacted material is present in the process.	This impurity contains soluble nature in acidic water and hence it can be eliminated from the process during reaction work-up.
Impurity-E	It is one of the intermediates in the manufacturing process of clenbuterol. It may be present in the final product if any un reacted material is present in the process.	This impurity contains soluble nature in alcohol and hence it can be eliminated from the process during reaction work-up.
Impurity-F	Mainly this impurity will form from 4-Amino -3-chloro acetophenone (mono chloro impurity). It is one of the known intermediate in chlorination reaction. In further stage it will react with bromine and form 1-(4-amino-3-bromo-5-chlorophenyl)-2-bromoethanone. It will cause formation of bromoclenbuterol.	Mono chloro impurity contains soluble nature in organic solvent and is brought under control or eliminated during the crystallization process.

Tabella 2: Origini e metodi di controllo delle impurità nel Clenbuterolo Cloridrato.^[2]

L'impurità F monoclorurata è la più insidiosa perchè, essendo molto simile al Clenbuterolo, non è facilmente eliminabile dal prodotto. Per evitarne la formazione bisogna favorire la diclorurazione durante la fase 1 del processo di sintesi, per esempio utilizzando un eccesso di Cl_2 per contrastare l'effetto disattivante del primo Cl aggiunto.^[2]

4. I RECETTORI ADRENERGICI (AR)

4.1 Il Sistema Adrenergico

Insieme al sistema colinergico, il sistema adrenergico è una parte fondamentale del Sistema Nervoso Periferico (SNP). Controlla anche diverse funzioni del Sistema Nervoso Centrale (SNC) come il sonno, le emozioni, la termoregolazione e l'appetito.

Gli agonisti endogeni del sistema adrenergico sono il neurotrasmettitore Noradrenalina e l'ormone Adrenalina. Entrambi sono classificati come catecolammine, perchè costituiti da una catena alchilamminica legata a un anello catecolico (1,2-benzendiolico). Nel processo di neurotrasmissione hanno più o meno gli stessi effetti e possono essere affiancati da cotrasmettitori.^[16]

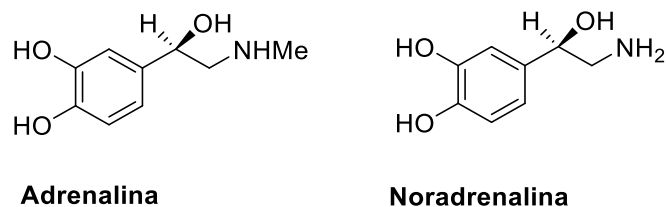


Figura 7: Strutture molecolari dei trasmettitori adrenergici endogeni.^[16]

Ci sono due tipi di recettori adrenergici, α - e β -AR, che a loro volta si suddividono in base a struttura e funzione nei sottotipi α_1 , α_2 e β_1 , β_2 , β_3 . I vari AR tendono a localizzarsi per tipo in specifici distretti corporei, in quanto la loro attivazione comporta effetti diversi (tabella 3).

Organo o tessuto	AR predominanti	Effetto dell'attivazione	Effetto fisiologico
Muscolatura cardiaca	β_1	Contrazione	Aumento della forza di contrazione e della frequenza cardiaca
Muscolatura liscia bronchiale	α_1	Contrazione	Broncocostrizione
	β_2	Rilassamento	Broncodilatazione
Muscolatura liscia delle arteriole (irroranti i muscoli)	α	Contrazione	Costrizione delle arteriole e aumento della pressione sanguigna (ipertensione)
Muscolatura liscia delle arteriole (non irroranti i muscoli)	β_2	Rilassamento	Dilatazione delle arteriole e aumento dell'irrorazione dei muscoli
Vene	α	Contrazione	Vasocostrizione e ipertensione
	β_2	Rilassamento	Vasodilatazione e ipotensione

Fegato	$\alpha 1$ e $\beta 2$	Attivazione degli enzimi che metabolizzano il glicogeno e disattivazione di quelli che lo sintetizzano	Degradazione del glicogeno a glucosio
Muscolatura liscia del tratto gastrointestinale	$\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\beta 2$	Rilassamento	Blocco della digestione
Rene	$\beta 2$	Secrezione di renina	Aumento della pressione sanguigna
Cellule adipose	$\beta 3$	Attivazione enzimi	Catabolismo dei grassi

Tabella 3: Distribuzione ed effetti dei recettori adrenergici.^[16]

Uno schema del recettore β_2 è riportato in figura 8 e anche gli altri AR hanno una struttura simile: tutti sono accoppiati a una proteina G (G_0 per la forma α e G_s per la β) e costituiti da una singola catena peptidica divisa in sette eliche idrofobiche transmembrana (TM).

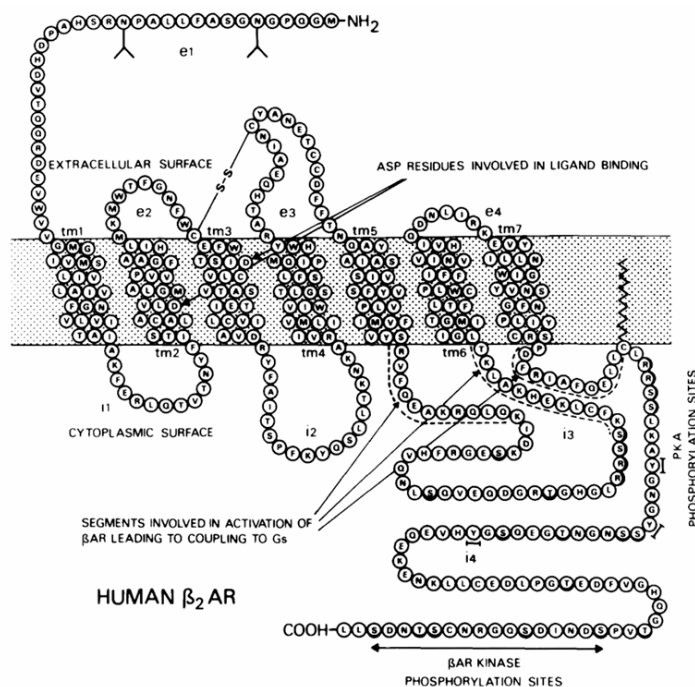


Figura 8: Struttura modello del β_2 -AR umano.^[17]

Sulla base di studi di mutagenesi e modellistica molecolare, è stato proposto che tre delle eliche transmembrane (TM3, TM5, TM6) formino il sito di legame, caratterizzato dai residui Asp-113, Phe-290, Ser-207 e Ser-204. Le due serine interagiscono con legami a idrogeno con i gruppi fenolici delle catecolammine, l'anello aromatico di Phe-290 lega l'anello catecolamminico con interazioni di Van der Waals, mentre Asp-113 instaura un legame ionico con l'atomo di azoto protonato della

catecolammina. È stata anche ipotizzata un'ulteriore interazione a idrogeno tra Asn-293 e la funzione alcolica della catecolammina.^[16]

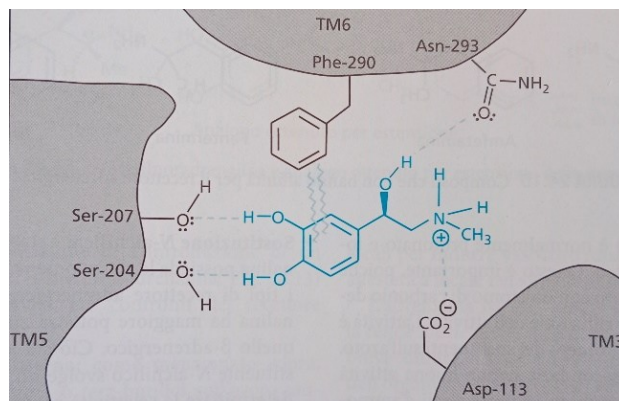


Figura 9: Interazioni tra Adrenalina e sito attivo del recettore β_2 -AR.^[16]

Studi di relazione struttura-attività (SAR) hanno evidenziato che un buon agonista in genere possiede un gruppo alcolico, un anello catecolico intatto con entrambi i gruppi fenolici e un gruppo amminico ionizzato. La figura 10 schematizza quali caratteristiche strutturali conferiscono selettività per uno o l'altro tipo di recettore AR.^[16]

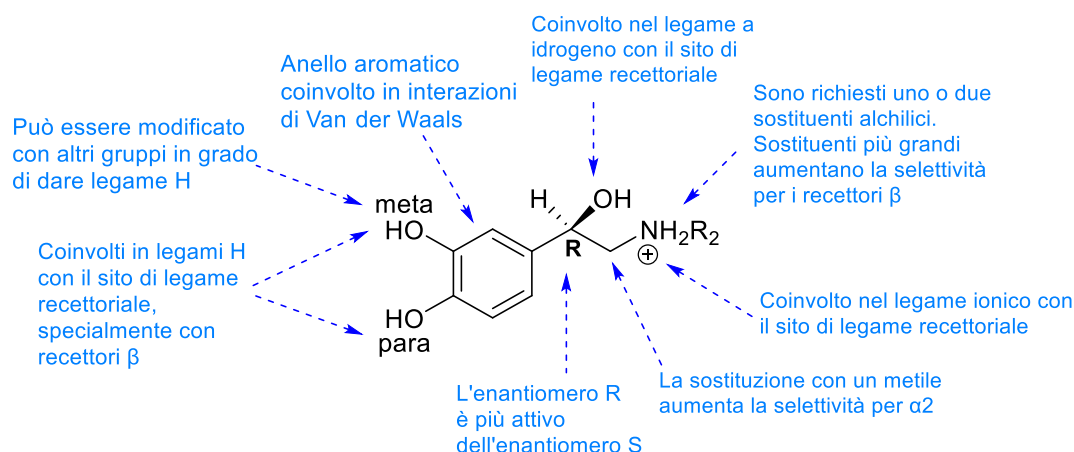


Figura 10: Struttura generale di un agonista adrenergico.^[16]

Sostituenti N-alchilici più ingombranti (come isopropile o terz-butile), aumentano la selettività verso l'attivazione dei β -AR, probabilmente perché questi recettori possiedono una tasca idrofobica più grande rispetto agli α -AR. I gruppi fenolici sono particolarmente importanti per il tipo β , mentre un'eventuale alchilazione in alfa all'ammina aumenta la selettività per il tipo α . In fine, l'allungamento della catena alchilica non comporta alcun vantaggio.^[16]

4.2 I recettori β adrenergici: bersagli primari del Clenbuterolo

Il Clenbuterolo è un agonista selettivo e completo per β_2 -AR, ma a dosi elevate può attivare parzialmente anche β_1 e β_3 poiché i tre sottotipi sono omologhi al 65-70%.

Tutti sono accoppiati ad una proteina Gs e sono formati da una catena polipeptidica di 413 residui amminoacidici, con l'N-terminale extra-cellulare, sette eliche transmembrana di 21-28 residui, tre anse extra- e tre intra-cellulari, e un tratto C-terminale intracellulare contenente diversi siti di fosforilazione per le proteine chinasi A e β -chinasi del recettore adrenergico. Eventuali modifiche post-traduzionali includono la N-glicosilazione nella regione ammino-terminale, la palmitolazione di Cys-341 e uno o più ponti disolfuro.^[17]

Ci sono buone evidenze che i β_2 -AR oscillino tra una forma attiva e una inattiva, e che a riposo l'equilibrio sia spostato verso quest'ultima. Il recettore β_2 -attivo è associato alla subunità α della proteina Gs, insieme a una molecola di trifosfato di guanosina (GTP). La sostituzione del GTP con il GDP (difosfato di guanosina) riduce drasticamente l'affinità della subunità α per il recettore, causando la dissociazione e inducendo il ritorno alla forma inattiva a bassa energia. Gli agonisti β_2 completi, come il Clenbuterolo, si legano e stabilizzano la forma attiva. Gli agonisti parziali stabilizzano una conformazione diversa oppure la stessa conformazione attiva ma meno frequentemente. Gli agonisti inversi si legano al recettore inattivo.^[18]

5. FARMACODINAMICA ED EFFETTI FISIOLGICI

In questo capitolo si analizzerà l'azione del Clenbuterolo sul sito attivo e i conseguenti effetti, anche in relazione alla dose.

5.1 Meccanismo conformazionale di riconoscimento molecolare

Tramite il meccanismo di selezione conformazionale, il Clenbuterolo, si comporta da agonista “simpaticomimetico”: mimando le catecolammine endogene (il substrato naturale), lega il sito ortosterico di tutti i recettori β -AR, stabilizzandone la forma on, ma con intensità ed effetti fisiologici diversi. ^{[11],[19]}

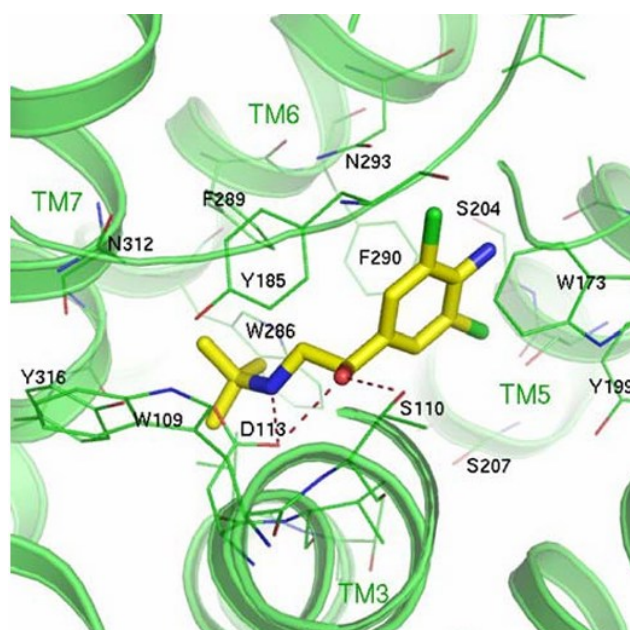


Figura 11: Docking predittivo delle interazioni del Clenbuterolo con i residui del sito attivo β_2 -AR.^[20]

Le forze di legame Clenbuterolo-sito ortosterico, sono molto simili a quelle già descritte nel capitolo 4, con alcune specificità:

1) Legami a idrogeno: posizionano il farmaco nella corretta orientazione spaziale e lo ancorano all'interno della tasca. Si formano tra i gruppi OH e NH della catena etanolamminica e i residui di Ser-110 e Asp-113.

2) Interazioni ionico/saline: il gruppo amminico alifatico, protonato e positivo a pH fisiologico, attira verso di sé il residuo anionico Asp-113. Così, l'elica TM3 ruota verso l'interno, seguita dagli altri domini transmembrana, ed è possibile agganciare la proteina Gs.

3) Interazioni idrofobiche con residui amminoacidici non polari (come Phe, Val e Leu): l'anello dicloro-fenilico si inserisce nella parte più idrofobica della tasca, stabilizzando la molecola attraverso interazioni di Van der Waals e π - π con altri anelli aromatici (Trp-173). Il gruppo terz-butilico garantisce la selettività β_2 poiché è un sostituito ingombrante e occupa bene la sua ampia tasca.^[20]

Poiché il sito di legame è chirale, è importante anche la stereochimica d'interazione. L'(R)-Clenbuterolo è l'enantiomero più attivo perché i suoi gruppi hanno un'orientazione spaziale ottimale a massimizzare le energie dei legami.^[11]

Gli atomi di Cloro aromatici, tipici della molecola del Clenbuterolo, non sono direttamente coinvolti nelle interazioni di legame con il sito attivo ma hanno un ruolo indiretto fondamentale: stabilizzano il gruppo amminico aromatico (NH_2) e favoriscono la protonazione dell' NH alifatico anche a pH fisiologico. Inoltre, aumentano la lipofilia complessiva dell'anello aromatico, che così riesce a intercalarsi meglio nella tasca idrofobica del recettore.

5.2 Effetti fisiologici

L'attivazione dei recettori β -AR da parte del Clenbuterolo, da avvio alla cascata di amplificazione del segnale "Gs/cAMP/PKA" che, aumentando i livelli intracellulari di cAMP (Adenosina Monofosfato Ciclica), attiva l'effettore finale proteina chinasi A (PKA). PKA può poi fosforilare diverse proteine bersaglio per dare quattro effetti fisiologici.^[21]

5.2.1 Effetto primario (Terapeutico): Rilassamento della Muscolatura Liscia Bronchiale

Quando PKA fosforila l'enzima Miosina Chinasi a Catena Leggera (MLCK), riduce la sua affinità per il complesso Ca^{2+} -Calmodulina. Così MLCK non può più fosforilare la miosina, un passaggio a monte della contrazione muscolare. Contemporaneamente, il meccanismo biochimico della miosina fosfatasi, che rimuove i gruppi fosfato dalla testa della catena leggera della miosina, diventa dominante. La de-fosforilazione della miosina la rende incapace di legare l'actina e causa il rilassamento del muscolo liscio delle vie aeree, portando alla broncodilatazione e al miglioramento della respirazione.^[22]

5.2.2 Effetti Metabolici sul Tessuto Adiposo: origine dell'effetto lipolitico

Se il Clenbuterolo lega recettori β_2 -AR presenti sulla membrana delle cellule adipose, PKA migra nel citoplasma e fosforila diversi bersagli chiave, tra cui l'enzima Lipasi Ormone-Sensibile (HSL) e la Lipasi Adipocitaria (ATGL), avviando l'idrolisi delle riserve di trigliceridi. Gli acidi grassi liberi

rilasciati vengono utilizzati per produrre energia in forma di ATP. Questa mobilitazione del grasso è alla base dell'uso illecito del Clenbuterolo come agente lipolitico-dimagrante.

L'attivazione di β_2 e β_3 -AR nell'adipe può supportare la combustione dei grassi anche incrementando il tasso metabolico basale (BMR) e la termogenesi, perché stimola l'espressione di proteine disaccoppianti (UCPs) nella membrana interna mitocondriale, che dissipano il gradiente protonico mitocondriale sotto forma di calore.^[19]

Nonostante l'effetto lipolitico e termogenico, il Clenbuterolo non è approvato per la cura di malattie come obesità e diabete perché promuove effetti collaterali cardiovascolari e il rilascio di glucosio (iperglicemia).

5.2.3 Effetti Anabolici sul Muscolo Scheletrico

L'effetto del Clenbuterolo sulla muscolatura scheletrica è quello di promuovere l'ipertrofia muscolare sopprimendo le vie di degradazione proteica e promuovendo, anche indirettamente, la proteosintesi. In particolare, viene rallentato il catabolismo proteico del sistema ubiquitina-proteosoma e favorito il pathway di mTOR (Mammalian Target of Rapamycin), un sensore di nutrienti e via di segnalazione per la crescita cellulare e la sintesi proteica.

La capacità del Clenbuterolo di rimodellare la composizione corporea spostando il bilancio metabolico verso la conservazione muscolare e l'ossidazione dei lipidi è chiamata "Ripartitioning", cioè ripartizione. Questo meccanismo ne spiega l'abuso nello sport perché aumenta il rapporto tra massa magra e grassa e migliora le prestazioni fisiche.^[19]

5.2.4 Effetti Collaterali Cardiotossici

Il rischio cardiovascolare è il principale fattore limitante nell'uso di Clenbuterolo e si verifica nel caso di somministrazione di dosi elevate o per periodi prolungati nel tempo.

In questi casi il Clenbuterolo perde la selettività β_2 e inizia a saturare anche i siti di legame β_1 nel miocardio (il tessuto muscolare del cuore). Qui la PKA fosforila specifici canali ionici e proteine di regolazione cardiaca, aumenta l'ingresso di ioni Ca^{2+} nelle cellule cardiache, e conseguentemente anche la forza di contrazione e la frequenza cardiaca. A questo si imputano effetti avversi, quali tachicardia, aritmie e palpitazioni.^[22] In casi altamente seri, si possono verificare anche cambiamenti strutturali del miocardio, che aumentano il rischio di insufficienza cardiaca.

6. FARMACOCINETICA e PROPRIETÀ A.D.M.E.

La lipofilia e lo stato di ionizzazione del Clenbuterolo determinano la sua farmacocinetica. Il Clenbuterolo è sufficientemente lipofilo da poter diffondere nelle membrane biologiche, specialmente in forma neutra, ma non così eccessivamente da impedire la solubilità nel plasma acquoso, specialmente se il gruppo amminico è protonato.

6.1 Assorbimento (A) e Distribuzione (D)

Il Clenbuterolo viene assunto principalmente per via orale o, meno frequentemente, per inalazione o somministrazione parentale.^{[3], [23]} Successivamente, viene trasportato per diffusione passiva non stereoselettiva nell'intestino tenue, dove viene rapidamente assorbito.^[24] Data la straordinaria resistenza al metabolismo di primo passaggio epatico, la biodisponibilità orale del Clenbuterolo è alta (F% compreso tra 70% e 80%) come anche la concentrazione di farmaco attivo in circolazione anche dopo molte ore.^[23]

Il Clenbuterolo si distribuisce in modo non uniforme nel corpo e i siti principali di accumulo sono il tessuto adiposo, la muscolatura scheletrica e liscia e l'SNC, tutti tessuti estesi, ricchi di lipidi e/o di recettori β_2 -AR. Qui vi risiede per un tempo prolungato, venendo rilasciato in modo lento e graduale. Questo meccanismo di “sequestro tissutale” e rilascio ritardato contribuisce alla lunga emivita di eliminazione ($t_{1/2}$), compresa tra 25 e 39 ore.^[23] Il Clenbuterolo è definito infatti un agonista β -AR a lunga durata d'azione.^{[3], [24]}

6.2 Metabolismo (M) e Eliminazione (E)

Il profilo metabolico del Clenbuterolo è atipico. Subisce un metabolismo epatico minimo e mostra notevole resistenza agli enzimi metabolizzanti di Fase I, Catecol-O-Metiltransferasi (COMT) e Monoamino Ossidasi (MAO), in quanto l'anello diclorosostituito non è loro substrato.^[23]

Il Clenbuterolo viene prevalentemente gestito attraverso diverse vie metaboliche di Fase II. Nell'uomo si sono individuati cinque derivati, ottenuti per ossidazione del gruppo anilina (N-OH-Clb e NO₂-Clb), O-glucuronidazione (due diastereoisomeri: Gluc¹-Clb e Gluc²-Clb), metilazione del gruppo amminico dell'anello aromatico (N_{ar}-Met-Clb) (figura 12). Tuttavia, una consistente parte della dose assorbita rimane inalterata. In altre specie sono possibili anche reazioni di scissione ossidativa della catena laterale e solfonatazione.^[25] Poiché i metaboliti di specie diverse non sono gli

stessi, se si rivelano derivati che non sono prodotti dal metabolismo umano, è possibile discriminare l'uso illecito dall'intossicazione per ingestione di carne contaminata.^[26]

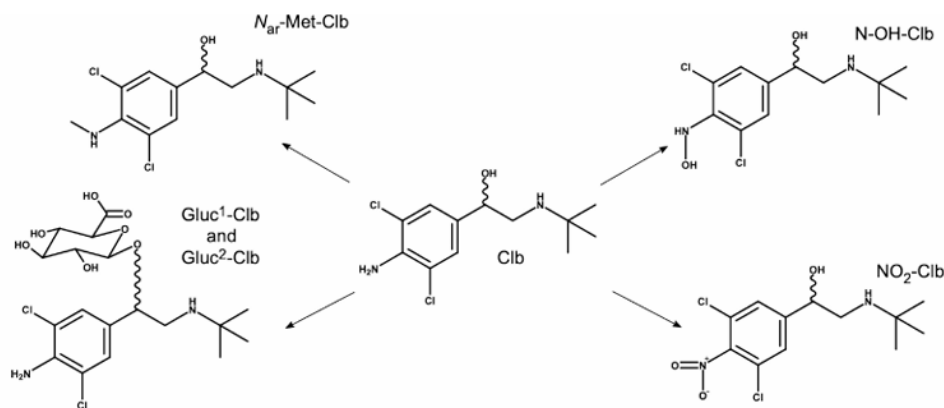


Figura 12: Metaboliti del Clenbuterolo nell'uomo.^[25]

L'eliminazione del Clenbuterolo e dei suoi metaboliti dall'organismo avviene prevalentemente per via renale (escrezione urinaria).^[3]

7. PROFILO TOSSICOLOGICO

7.1 Effetti collaterali e disintossicazione

Il sovradosaggio di Clenbuterolo stimola in modo eccessivo e prolungato i β_2 -AR. Ne derivano mal di testa, vertigini, sensazione di svenimento, tinnito, debolezza muscolare, tremore, sudorazione, nausea, vomito, ansia, agitazione, dolore toracico, palpitazioni, tachicardia sinusale, ipotensione, ipokaliemia, ipofosfatemia, acidosi metabolica e iperglicemia. I segni di intossicazione possono persistere fino a 24 ore.^[23]

Intervenendo tempestivamente su pazienti vigili, un'opzione di disintossicazione è il carbone attivo, ma non ci sono dati clinici che ne confermino l'efficacia. Gli antagonisti β -adrenergici sono potenziali antidoti ma, poichè non esistono β_2 -bloccanti selettivi, devono essere somministrati con cautela in quanto potrebbero aggravare la situazione perchè la stimolazione α -adrenergica resta incontrastata. Inizialmente si somministra un antagonista β -adrenergico a breve durata d'azione per invertire rapidamente i sintomi. Se non si verificano anomalie, si può intensificare il trattamento con un antagonista β -adrenergico a lunga durata d'azione.^[23]

7.2 Normative in Ambito Civile e Sportivo

A causa dei gravi rischi sanitari, le normative sul Clenbuterolo in ambito civile e farmaceutico sono restrittive. Le agenzie regolatorie internazionali ed europee ne limitano l'uso quasi esclusivamente al settore veterinario e, per evitare intossicazioni alla persona, ne vietano l'impiego nell'uomo e nella zootecnica-alimentare.^[12]

Il Clenbuterolo è una delle sostanze più problematiche nel contesto sportivo. La WADA lo inserisce nella Sezione S1 della Lista delle Sostanze e dei Metodi Proibiti, tra gli agenti anabolizzanti.^[19]

La proibizione del Clenbuterolo è totale, sia in competizione che fuori. Non esiste alcun livello di soglia tollerata e qualsiasi rilevazione positiva comporta severe sanzioni, in linea con le disposizioni del Codice Mondiale Antidoping.^[4]

8. METODI ANALITICI DI RILEVAZIONE

8.1 L'Esigenza di Analisi Sensibili

La lunga $t_{1/2}$ e la persistenza tissutale, favoriscono le analisi forensi e antidoping perchè trattengono il Clenbuterolo nelle urine e nei tessuti per diversi giorni o settimane dopo la sospensione della somministrazione. Tuttavia, la rilevazione del Clenbuterolo in questo tipo di campioni è insidiosa a causa della natura complessa della matrice e della bassa concentrazione di analita. Per ciò serve una metodologia analitica in grado di separare il Clenbuterolo dagli interferenti e di identificarlo con la massima sensibilità, specificità e accuratezza, in modo da evitare falsi positivi o negativi.^[27] Un altro vincolo è imposto dalle normative, che richiedono Limiti di Rilevabilità (LOD) e di Quantificazione (LOQ) estremamente bassi. Nei controlli antidoping, WADA richiede un livello minimo di prestazione richiesto (MRPL) di 2 ng/mL nelle urine e approva come metodi di rilevamento GC-MS e LC-MS.^[28]

8.2 Preparazione del Campione

Il pretrattamento del campione è un passaggio quasi obbligatorio a prescindere dalla tecnica di analisi che si userà, perchè permette di concentrare l'analita e di eliminare impurezze che potrebbero interferire con l'analisi o danneggiare le strumentazioni. La natura fisica del campione determina la procedura di pretrattamento.

Nei liquidi, le particelle sospese sono rimosse mediante centrifugazione e filtrazione. Segue l'idrolisi enzimatica o acida dei metaboliti, durante la quale il campione viene incubato con l'agente idrolizzante, che converte i derivati a Clenbuterolo immodificato. Così, l'analisi si semplifica perchè, rispetto al campione non idrolizzato, si avrà un solo analita a concentrazione maggiore e sarà più facile valutare la dose originariamente assunta (immodificata + metabolizzata).^[27] La scelta dell'idrolizzante dipende dal metabolita; per esempio, la rottura del legame glicosidico tra Clenbuterolo e acido glucuronico negli O-glucuronidi, è catalizzata dalla β -glucuronidasi.^[28]

Successivamente, si esegue la purificazione e concentrazione del Clenbuterolo. L'estrazione in fase solida (SPE) è la tecnica preferita, perchè è automatizzabile e poco dispendiosa in termini di solventi, tempo e manodopera. Si usa una cartuccia SPE a scambio ionico, a fase inversa C_{18}/C_8 o mista. Il Clenbuterolo, viene trattenuto selettivamente sulla fase stazionaria, mentre le altre sostanze vengono lavate via con un solvente opportuno. In fine, viene eluito in un piccolo volume di solvente organico (come t-butil-metiletere, metanolo o una miscela toluene/diclorometano).

In alcuni casi, la SPE può essere sostituita o combinata con altre procedure, come ripartizione liquido-liquido, dispersione in fase solida della matrice o cromatografia di immunoaffinità (IAC).^[27] Una tipologia di SPE più avanzata ma anche più complessa e costosa è la SPE a impronta molecolare (MISPE), che usa polimeri a impronta molecolare (MIP) come materiale sorbente nell'estrazione in fase solida.^[29]

Quando la matrice è solida, come nel caso di analisi di carni, la preparazione richiede passaggi aggiuntivi, al fine di ottenere una soluzione. L'approccio più comune prevede l'omogeneizzazione del campione in acqua, acido o in un tampone acquoso, seguita da centrifugazione. Il surnatante può essere ulteriormente trattato in vari modi: reso acido, alcalino o privato di grassi e proteine tramite estrazione con solventi. In fine, si isola l'analita per estrazione liquido-solido.^[27]

8.3 Tecniche di Analisi e di Separazione

Le procedure analitiche accettate combinano un'efficace separazione cromatografica con un'identificazione altamente specifica e sensibile. Quale sia la metodologia da preferire dipende dal tempo, dagli strumenti, dai fondi a disposizione, dai limiti normativi e richiesti dal cliente. Di seguito si riportano i metodi più comunemente utilizzati.

8.3.1 Cromatografia Liquida ad Alta Prestazione (HPLC)

Sottoporre il campione purificato ad HPLC, spesso in colonna a fase inversa C₁₈ o C₈, è il metodo più semplice per isolare il Clenbuterolo in base alla sua lipofilia e all'affinità chimica per la fase mobile e stazionaria. Con colonna chirale è anche possibile separare l'enantiomero R dall'S. Tuttavia, l'HPLC da sola è utile solo nello screening o nell'analisi in matrici semplici in quanto il tempo di ritenzione è un parametro identificativo ma non sufficiente nel contesto forense. Per rafforzare il risultato, l'HPLC è accoppiato a tenciche immunenzimatiche o spettrometria di massa.^[27]

8.3.2 Spettrometria di Massa in Tandem (LC-MS/MS): La tecnica d'Elezione

La cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa in tandem (LC-MS/MS) è considerata lo standard di riferimento nei laboratori antidoping e di sicurezza alimentare, perchè offre la sensibilità e la specificità richieste per la quantificazione legale e fornisce anche uno spettro identificativo della molecola e dei suoi derivati. La tecnica è ideale per campioni prelevati giorni o settimane dopo l'assunzione perché è in grado di rilevare concentrazioni di Clenbuterolo dell'ordine dei pg/mL. Le analisi sono spesso eseguite in Modalità di Monitoraggio di Reazione Multipla (MRM), in colonna a fase inversa C₁₈ e fase mobile costituita da un gradiente di acetonitrile e acqua

più addittivi come acido formico.^[30] Dopo la separazione LC, la molecola di Clenbuterolo viene ionizzata a ione molecolare, tipicamente tramite Ionizzazione a Elettrospray (ESI), adatta a molecole polari e termolabili. Nel primo quadrupolo (MS1), viene selezionato solo lo ione precursore, che poi viene fatto collidere con un gas inerte (es. Argon) in una cella di collisione, generando frammenti ionici identificativi, che vengono rilevati dal secondo quadrupolo (MS2). La presenza e l'abbondanza relativa di almeno due ioni prodotto caratteristici rappresenta una firma molecolare univoca del Clenbuterolo, e quindi la conferma della sua presenza.^[31]

In figura 13, si riporta un esempio di spettro LC-MS/MS del Clenbuterolo. I picchi e le loro intensità relative possono variare in funzione dei parametri impostati, quali per esempio il tipo di ionizzazione e l'energia di collisione.

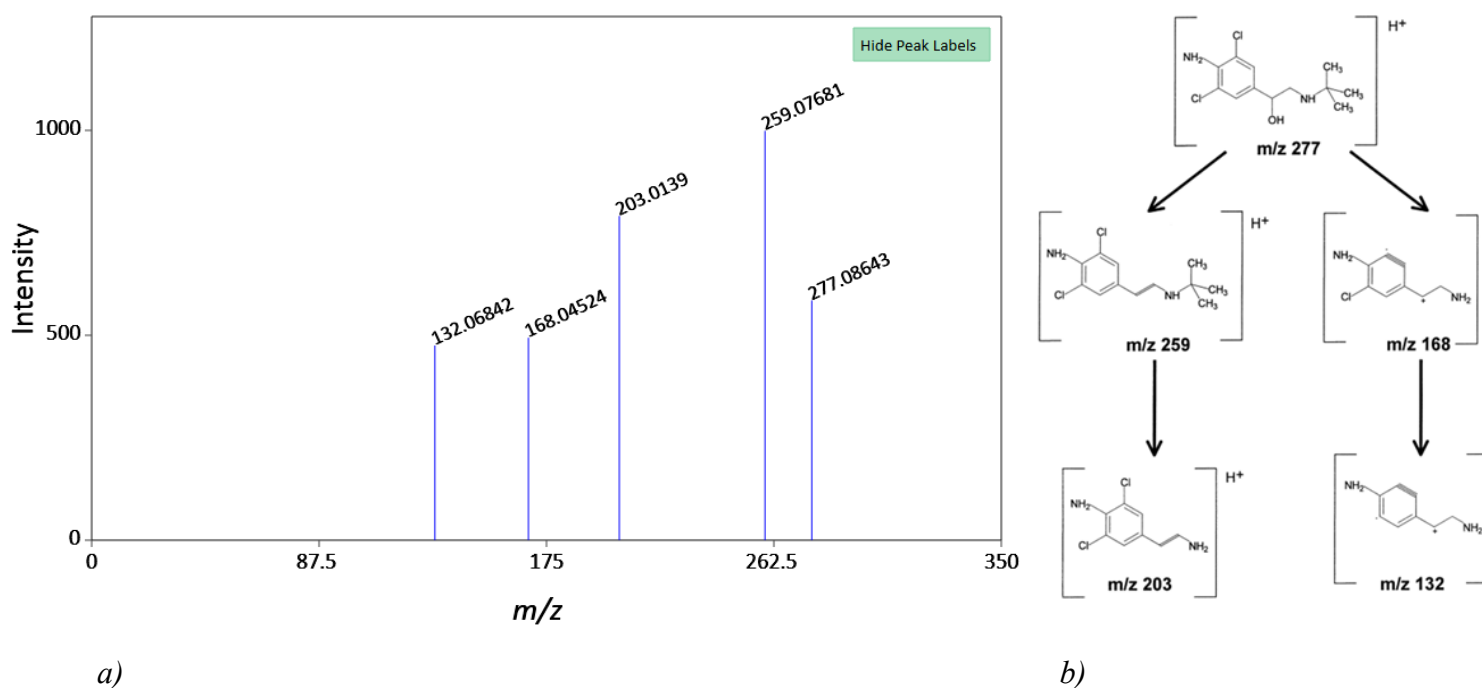


Figura 13: a) Spettro LC-MS/MS del Clenbuterolo. Strumento Exploris 480 Orbitrap (Thermo Scientific), tipo LC-ESI-QFT, ionizzazione positiva ESI, energia di collisione a rampa 20%-70%, frammentazione HCD, Colonna Acque; Acquity UPLC BEH C18, 3,0 x 100 mm, 1,7 μ m, Waters, tempo di ritenzione di 7.95 min.^[6] b) Possibili vie di frammentazione a partire dallo ione molecolare protonato.^[32]

Tra i picchi più intensi troviamo lo ione molecolare protonato $[M+H]^+$ (277.08643 m/z), i frammenti generati dalla perdita del gruppo OH come H_2O (259.07681 m/z , picco base) e successiva perdita di isobutilammina (C_4H_8) (203.0139 m/z). Quest'ultimo picco potrebbe derivare anche dalla perdita della terz-butilammina in $[M+H]^+$. In fine, gli ultimi due segnali sono presumibilmente generati dal distacco successivo degli atomi di Cl dall'anello aromatico, il primo come radicale (168.04524 m/z) e il

secondo come molecola di HCl (132.0642 m/z). La transizione 277.0→203.0 può essere utilizzata per la quantificazione mentre la 277.0→132.1 come identificatore.^[33] Tradizionalmente, il Clenbuterolo è identificato con il tempo di ritenzione e le transizioni ioniche 277.1→203.0 e 277.1→259.1. A scopo di controllo antidoping, è stato progettato e validato un metodo migliorato LC-MS/MS per lo screening del Clenbuterolo nelle urine umane, che usa due nuove transizioni ioniche: 277.1→132.0 e 277.1→168.0. Il risultato è confermato confrontando l'intensità relativa delle transizioni 277.1→132.0, 277.1→168.0 e 277.1→140.0. Il LOD del metodo proposto è di 2 pg/mL, inferiore al MRPL fissato dalla WADA.^[31]

8.3.3 Tecniche Immunologiche (ELISA)

Oltre alle tecniche cromatografiche, sono importanti anche i saggi immunoenzimatici (ELISA), utilizzati per valutare rapidamente un elevato numero di campioni durante i controlli di massa sulla produzione alimentare. L'ELISA quantifica il Clenbuterolo tramite un segnale enzimatico-cromatico a seguito di una reazione specifica con un anticorpo. Nonostante la velocità e economicità del test ELISA, i risultati positivi devono essere sempre confermati con LC-MS/MS prima di poter essere utilizzati per procedimenti legali in quanto la tecnica manca della specificità e robustezza opportune e c'è una certa probabilità che il test generi falsi positivi per rilevazione di molecole strutturalmente simili all'analita.^[34]

8.4 Tecniche secondarie di Supporto all'analisi

Altre tecniche di analisi possono aiutare l'identificazione e la quantificazione. Le spettrofotometrie (UV-VIS, IR e NMR) trovano utilità nella caratterizzazione e conferma strutturale del farmaco puro o dei suoi metaboliti isolati. La Gas-Cromatografia accoppiata a Spettrometria di Massa (GC-MS) è stata a lungo la tecnica analitica di riferimento per la rilevazione di molte sostanze dopanti, incluso il Clenbuterolo, ma oggi non è più conveniente in termini di tempi, costi e riproducibilità. Essendo il Clenbuterolo una molecola termolabile e poco volatile, prima dell'analisi GC deve essere derivatizzato (spesso per sililazione) in un derivato compatibile con le condizioni di lavoro. La maggior parte dei laboratori moderni l'ha quindi rimpiazzata con la LC-MS/MS.^[27] Tuttavia sono stati validati metodi GC piuttosto sensibili, specifici e affidabili nelle analisi antidoping, come GC-MS in modalità SIM (monitoraggio degli ioni selezionati), gascromatografia-spettrometria di massa a triplo quadrupolo tandem (GC-MS-MS) e gascromatografia ad alta risoluzione con spettrometria di massa (GC-HRMS).^[28]

8.5 Confronto dei Metodi Analitici

Le tabelle 6 e 7 riassumono i parametri da valutare per scegliere il metodo più appropriato in base ai requisiti analitici specifici, come sensibilità, matrice e produttività. I dati sperimentali provengono da vari studi di validazione.^[30]

Performance Characteristic	LC-MS/MS	GC-MS	ELISA
Limit of Detection (LOD)	0.03 - 2 ng/mL	0.06 - 2 ng/mL	1.2 - 11.1 ng/mL
Limit of Quantification (LOQ)	0.1 - 1.5 ng/mL	0.7 ng/μL	Not consistently reported
Accuracy/Recovery (%)	93.1 - 98.7%	86 - 112%	44 - 75%
Precision (RSD%)	1.26 - 9.3%	< 15%	Inter & Intra-assay variations noted as a quality concern
Linearity (r^2)	> 0.999	0.997 - 1.000	Characterized by measuring range limits

Tabella 6: Confronto delle prestazioni del metodo nei campioni di urina.^[30]

Performance Characteristic	LC-MS/MS	GC-MS	ELISA
Limit of Detection (LOD)	5 pg/g	2.5 ng/mL (in blood)	0.1 μg/kg
Limit of Quantification (LOQ)	10 pg/g	5 ng/mL (in blood)	Not consistently reported
Accuracy/Recovery (%)	93.4 - 100.4%	89 - 101% (in plasma)	72.0 - 84.2% (in meat)
Precision (RSD%)	0.54 - 3.25%	High reliability and reproducibility noted	< 6% (CV in meat)
Linearity (r^2)	> 0.99	0.997 - 1.000 (in plasma)	$R^2 = 0.999$ (in meat)

Tabella 7: Confronto delle prestazioni del metodo in tessuti e altre matrici (carne, fegato, plasma).^[30]

9. CONCLUSIONI

Concludendo, il Clenbuterolo è un esempio emblematico di come le proprietà chimiche si traducano direttamente in conseguenze cliniche, tossicologiche e forensi.

Nonostante le solide conoscenze acquisite, il futuro della ricerca risiede nello sviluppo di agonisti adrenergici più sicuri e specifici, al fine di disaccoppiare gli effetti terapeutici da quelli dannosi. Studi futuri dovrebbero concentrarsi sulla farmacologia dei singoli enantiomeri, in particolare l'R-Clenbuterolo, in modo da migliorare la selettività β_2 -AR e potenziare l'efficacia broncodilatatrice a discapito degli effetti collaterali.^[11] La riprogettazione strutturale della molecola di Clenbuterolo (Drug Redesign) potrebbe condurre ad analoghi strutturali ottimizzati. Le modifiche dovrebbero mirare a diminuire il logP senza tuttavia intaccare la selettività β_2 -AR. Una via per ottenere questo risultato è sostituire alcuni gruppi funzionali con bioisosteri meno lipofili.

Uno sguardo al futuro dovrebbe essere rivolto anche alle tecniche di analisi. Valutare matrici alternative (es. capelli o unghie) potrebbe essere la chiave per confermare l'uso cronico o remoto e superare i limiti di rilevabilità a lungo termine.^[35] Altro aspetto importante da approfondire è la possibilità di discriminare tra abuso e intossicazione accidentale in base ai metaboliti rilevati.

BIBLIOGRAFIA

- [1] [DrugBank Online | Database for Drug and Drug Target Info](#); accesso in rete 17/10/2025.
- [2] Kannasani, R.K.; Battula, S.R.; Sannithi, S.B.; Mula, S.; Babu, V., *Med. Chem.*, **2016**, 6, 546-548.
- [3] Willson, c., “Clenbuterol”, *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, Enna, S.J. (Ed.); Bylund, D.B. (Ed.), Elsevier Masson, La Vista (U.S.), 2009, p. 1-9.
- [4] <https://www.wada-ama.org/en/prohibited-list>; accesso in rete 24/10/2025.
- [5] <https://www.fda.gov/>; 17/10/2025.
- [6] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>; 17/10/20025.
- [7] <https://www.chemicalbook.com/>; 17/10/2025.
- [8] Sweetman, S. C., “The Complete Drug Reference”, *Martindale*, Sweetman, S. C. (Ed.), Pharmaceutical Press, London, 2009, 36th ed., p. 1120.
- [9] Baglietto, M.; Benedetti, B.; Di Carro, M.; Magi E., *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2024**, 416, 1679-1695.
- [10] Kraszni, M.; Bányai, I.; Noszál, B., *J. Med. Chem.*, **2003**, 46, 2241-2245.
- [11] Čižmaríková, R.; Valentová, J.; Horáková, R., *Open Chemistry*, **2020**, 18, 628-647.
- [12] Velasco-Bejarano, B.; Bautista, J.; Rodríguez, M.E.; López-Arellano, R.; Arreguín-Espinosa, R.; Carrillo R.V., *Journal of Analytical Toxicology*, **2020**, 44, 237-244.
- [13] Culmsee, C.; Junker, V.; Thal, S.; Kremers, W.; Maier, S.; Schneider, H.J.; Plesnila, N.; Krieglstein, J., *Eur. J. Pharmacol.*, **2007**, Dec 1;575(1-3), 57-65.
- [14] Hirosawa, I.; Ishikawa, M.; Ogino, M.; Ito, H.; Hirao, T.; Yamada, H.; Asahi, M.; Kotaki, H.; Sai, Y.; Miyamoto, K.I., *Biopharm Drug Dispos.*, **2014**, 35, 207-17.
- [15] Keck, J.; Kruger, G.; Machleidt, H.; Noll, K.; Engelhardt, G.; Eckenfels, A., “4-amino-3,5-dichloro- α -[(tert-butylamino)methyl]benzyl alcohol and salts thereof”, US 3,536,712, 1970.
- [16] Graham, L.P., “Farmaci attivi sul Sistema nervosa adrenergico”, *Chimica Farmaceutica*, Costantino, G. (Ed.), EdiSES: Napoli, 2015, pp 669-678.
- [17] Strosberg, A.D., *Protei Sci.*, **1993**, 2, 1198-209.

- [18] Johnson, M., *J. Allergy Clin Immunol*, **2006**, *117*, 18-24.
- [19] Hostrup, H.; Jacobson G.A.; Jessen, S.; Lemminger, A.K., *Drug Test Anal.*, **2020**, *12*, 597-609.
- [20] Krystek, S.R.; Kimura, S.R.; Tebben, A.J., *J Comput Aided Mol Des*, **2006**, *20*, 463–470.
- [21] Graham, L.P., “Recettori e trasduzione del segnale”, *Chimica Farmaceutica*, Costantino, G. (Ed.), EdiSES: Napoli, 2015, pp 58-68.
- [22] Xing, G.; Woo, A.Y.H; Lin, L.P.B; Cheng, M.S., *J of Med. Chem.*, **2020**, *63*, 15218-15242.
- [23] Rhee, J.; Erickson, T, “Clenbuterol and Salbutamol (Albuterol)”, *Medical Toxicology of Drug Abuse: Synthesized Chemicals and Psychoactive Plants*, Donald G. Barceloux (Ed.), John Wiley & Sons: 2012, 295-299.
- [24] Vakily, m.; Mehvar, R.; Brocks, D., *The Annals of Pharmacotherapy*, **2002**, *36*, 694-701.
- [25] Prezelj, A.; Obreza, A.; Pecar, S., *Current Medicinal Chemistry*, **2003**, *10*, 281-290.
- [26] Gómez-Tagle, A.; Bressan, C.; Ventura, R.; Álvarez-Sanchez, A.; Cardenas-Yong, E.; Velasco-Bejarano, B., *Drug Testing and Analysis*, **2025**, *0*, 1–9.
- [27] Boyd D.T., “Analysis of some B-adrenergic agonists in biological matrices after evaluation of various extraction methodologies and determination procedures”. PhD thesis, Dublin City University, **1994**.
- [28] Yang, S.; Liu, X.; Xing, Y.; Zhang, D.; Wang, S.; Wang, X.; Xu, Y.; Wu, M.; He, Z.; Zhao, J., *Journal of Chromatographic Science*, **2013**, *51*, 436–445.
- [29] Widstrand, C.; Larsson, F.; Fiori, M.; Civitareale, C.; Mirante, S.; Brambilla, G., *Journal of Chromatography B*, **2004**, *804*, 85–91.
- [30] https://www.benchchem.com/product/b1669167?utm_src=pdf-interest; 09/12/2025.
- [31] Yang, Z.; Wu, M.; He, G.; Dong, y.; Ouyang, G.; Wu, Y.; Lu, J.; Yang, S.; Xu, Y.; Wang, X., *LCGC Nord America*, **2013**, *31*, 240-247.
- [32] Guy, A.P.; Savoia, M.C.; Stadler, R.H., *J. Chromatogr. B*, **1999**, *736*, 209–219.
- [33] Slíž, K.; Olešová, D.; Piešťanský, J.; Mikuš, P., *Separations*, **2022**, *9*, 440.
- [34] Hajrulai-Musliu, Z.; Uzunov, R.; Stojkovski, V.; Dimitrieska-Stojkovik, E.; Stojanovska-Dimzoska, B.; Sekulovski, P., *AIIC*, **2013**, 24-26.

[35] Pascal, K., “Detection of Doping Agents in Human Hair”, *Analytical and Practical Aspects of Drug Testing in Hair*, Pascal, K. (Ed.), Taylor e Francis: Boca Raton, 2006, 241-253.