

Pozostałości tyreostatyków w tkankach zwierząt i żywności

SEBASTIAN WITEK, BARBARA WOŹNIAK, JAN ŻMUDZKI, KATARZYNA SIELSKA

Zakład Farmakologii i Toksykologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Witek S., Woźniak B., Żmudzki J., Sielska K.
Thyreostat residues in animal tissues and food

Summary

Thyreostats are thioamid antithyroid drugs. The activity of these compounds consists in inhibiting the synthesis of thyroid hormones: triiodothyronine (T₃) and thyroxine (T₄), which favors the processes of fattening animals. The weight gain of animals is mainly due to water retention in their tissues and gastrointestinal tract. Because of the cancerogenic and teratogenic properties of thyreostatic drugs, their use for animal fattening has been banned in Europe since 1981. Control studies conducted in Poland show that thyreostats are not used in farm animals. Several cases of endogenous thiouracil content in the urine of cattle and pigs have been reported over recent years. This article presents the properties of thyreostatic compounds, discusses a possible cause of endogenous thiouracil occurrence, and provides an overview of methods used in the analysis of thyreostatic residues.

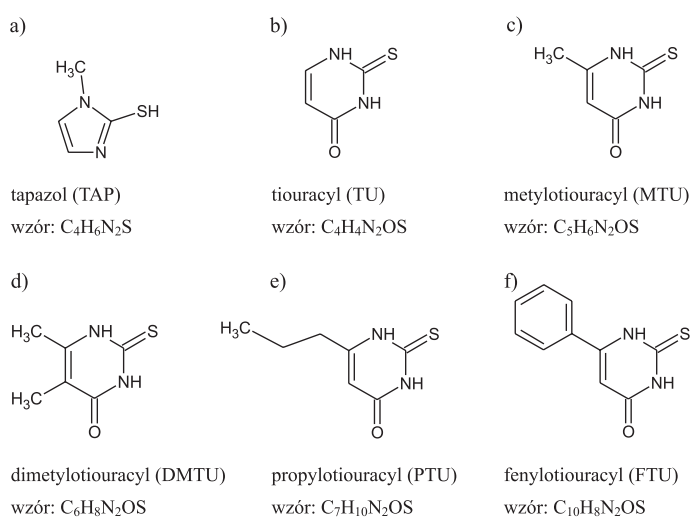
Keywords: thyreostats, LC-MS/MS, residue control, endogenous thiouracil

Substancje tyreostatyczne zwane także antyhormonami oddziałują na funkcjonowanie tarczycy poprzez blokadę syntezy hormonów tarczycowych (19). Niedobór hormonów wytwarzanych przez tarczycę, to jest trijodotyroniny (T₃) i tyroksyny (T₄), sprzyja między innymi procesom tuczu zwierzęcia, ponieważ obydwa hormony biorą udział w regulacji metabolizmu. Dodatkowy przyrost masy ciała zwierząt jest rezultatem zatrzymania wody w tkance podskórnej i mięśniowej, a także w przewodzie pokarmowym (10). Związki tyreostatyczne znalazły uznanie wśród hodowców bydła i były chętnie, choć nielegalnie, stosowane w latach 80. w niektórych krajach europejskich, tym bardziej, że są one łatwe w użyciu, bo są skuteczne po podaniu z paszą. Do najbardziej znanych tyreostatyków stosowanych do intensyfikacji tuczu zwierząt zaliczyć należy tapazol i metylotiouracyl, a także tiouracyl, propylotiouracyl i fenylotiouracyl (32).

Charakterystyka związków tyreostatycznych

Tyreostatyki są związkami polarnymi, o małej masie cząsteczkowej, wywodzącymi się od merkaptoimidazoli lub tiouracylu (ryc. 1).

Tapazol (2-mercapto-1-metyloimidazol) jest syntetycznym tyreostatykiem otrzymywanym w reakcji acetalu dietylo-aminoaldehydu octowego z izotiocyanianem metylu lub przez reakcję kwasu tiocyjanowego z N-aminoacetalem. Został opisany po raz pierwszy



Ryc. 1. Struktura chemiczna i wzory sumaryczne tyreostatyków

w 1949 r. jako związek o działaniu przeciwtarczycowym. W medycynie ludzkiej stosowany jest w leczeniu nadczynności tarczycy przy chorobie Gravesa-Basekowa. Po podaniu związek ten łatwo się wchłania i szybko wydalany jest z organizmu. Jego działanie polega na hamowaniu peroksydazy tarczycowej, co powoduje zmniejszenie produkcji hormonów tarczycy. W następstwie tego procesu zwiększa się wydzielanie hormonu tyreotropowego TSH (2, 14, 35). W doświad-

zeniach na szczurach odnotowano, że w połączeniu z dietą ubogą w jod doustne podawanie tapazolu powoduje powstawanie gruczolaków w komórkach tarczycy (22).

Do drugiej grupy związków tyreostatycznych należą tiouracyl (TU) i jego pochodne (6-metylo-2-tiouracyl, 6-propylo-2-tiouracyl, 6-fenylo-2-tiouracyl). Związki te otrzymywane są głównie w reakcji kondensacji tiomocznika z formylooctanem etylu i acetylooctanem etylu. Pierwsze doniesienia na temat zastosowania tiouracylu i jego pochodnych, jako tioamidowych leków przeciwtarczycowych, ukazały się w połowie lat 40. XX wieku. Ze względu na częste występowanie reakcji niepożądanych, takich jak np. agranulocytoza, zaprzestano używania TU na rzecz mniej toksycznych związków: propylotiouracylu i tapazolu. Badania na gryzoniach wykazały też, że doustne stosowanie tiouracylu i jego pochodnych powoduje guzowy rozrost pęcherzykowych komórek tarczycy. Może powodować także nowotworowe przerzuty z tarczycy do płuc (2).

W eksperymentalnych badaniach z zastosowaniem znanych substancji kancerogennych wykazano, że również metylotiouracyl zwiększa częstotliwość występowania nowotworów pęcherzykowych komórek tarczycy (2). De Brabander (10) w doświadczeniach prowadzonych na zwierzętach z zastosowaniem MTU stwierdził, że w wyniku podania pojedynczej dawki MTU następuje szybki zanik tego związku we krwi, moczu i tkance mięśniowej. Natomiast po dłuższym okresie stosowania obserwowano spowolniony spadek stężenia związku w tkankach, moczu i krwi zwierząt, tak że wykrywano go nawet po okresie karencji wynoszącym 1 miesiąc. W prowadzonych doświadczeniach badano także wpływ obróbki termicznej na pozostałości MTU w mięsie. Nie zaobserwowano istotnych zmian stężenia metylotiouracylu w mięsie po jego ugotowaniu. Niewielka ilość związku przedostała się do płynu utraconego z mięsa podczas gotowania.

Mechanizm działania tej grupy związków, podobnie jak merkaptoimidazoli, polega na hamowaniu działania peroksydazy tarczycowej. Skutkiem tego jest zmniejszenie produkcji hormonów tarczycy, tyroksyny (T_4) oraz trijodotyroniny (T_3) i zwiększona polifercja, która powoduje wzrost wydzielania hormonu tyreotropowego (TSH). Na tym polega prawdopodobnie podstawowy mechanizm powstawania ich rakotwórczych właściwości (2, 10, 14). Według Międzynarodowej Agencji Badań nad Rakiem (IARC), tyreostatyki klasyfikowane są jako substancje o możliwej kancerogenności i teratogenności dla ludzi (grupa 2B) (2).

Stosowanie tyreostatyków

Substancje tyreostatyczne z racji swoich właściwości były i są stosowane w leczeniu chorób związanych z nadczynnością tarczycy. Posiadają również właściwości anaboliczne, ponieważ powodują dodatkowe przyrosty masy ciała zwierząt w krótszym czasie. Ty-

reostatyki nie są obojętne dla zdrowia zwierząt, ponieważ po podaniu mogą wystąpić zaburzenia sercowo-płucne, takie jak: przyspieszona akcja serca, duszność, bezdech. Pozostałości tyreostatyków w tkankach jadalnych zwierząt niosą ze sobą ryzyko dla zdrowia konsumentów, a także znacznie obniżają jakość mięsa, dlatego też już na początku lat osiemdziesiątych ukazała się Dyrektywa Rady 81/602/EEC (15) zakazująca stosowania tyreostatyków w hodowli zwierząt rzeźnych. Kolejne akty prawne, takie jak: Dyrektywa Rady 85/358/EEC (16) oraz Dyrektywa Rady 96/22/EC (17) utrzymują postanowienia wcześniejszych aktów prawnych. W 1996 r. weszła w życie Dyrektywa Rady 96/23/EC (18), w której przedstawiono zasady kontroli pozostałości związków zakazanych, leków weterynaryjnych i zanieczyszczeń środowiskowych. Zgodnie z tym aktem prawnym, tyreostatyki znalazły się w grupie A2, obok hormonów (A1, A3, A4), beta-agonistów (A5) i związków zawartych w załączniku IV do Rozporządzenia Rady 2377/90 (A6).

W 2002 r. ukazała się Decyzja Komisji Europejskiej 2002/657/EC (13), która jest aktem wykonawczym do Dyrektywy 96/23/EC (18), określająca wymagania dla metod analitycznych stosowanych w badaniach pozostałości. Ważnymi wytycznymi tej Decyzji z punktu widzenia analitycznego było określenie sposobów walidacji procedur badawczych, zalecenie odpowiednich do rodzaju analitów technik badawczych oraz wprowadzenia minimalnego wymaganego poziomu oznaczania dla związków zakazanych. W 2007 r. unijne laboratoria referencyjne zaproponowały 10-krotne obniżenie tego rekomendowanego poziomu dla tyreostatyków ze stężenia $100 \mu\text{g L}^{-1}$ do $10 \mu\text{g L}^{-1}$ ($\mu\text{g kg}^{-1}$) (10).

Metody badań

Następstwem stosowania tyreostatyków u zwierząt jest rozrost gruczołu tarczowego. Stwierdzono, że średnia masa tarczycy u cieląt wynosi około 16 g, natomiast u młodego i dorosłego bydła 25 g. Według niektórych badaczy, za mieszczący się w normie należy uznać gruczoł nie przekraczający 50 g, inni natomiast przyjmują granicę 60 g (28), dlatego sprawdzanie masy tarczycy (tzw. metoda grawimetryczna) jest ważnym wstępnym elementem oceny nielegalnego podawania tyreostatyków zwierzętom. Przerost wola może być też następstwem niewłaściwej diety, a także czynników środowiskowych (niedobór jodu). Inną pośrednią metodą badania stosowania tyreostatyków u zwierząt jest test histologiczny, oparty na ocenie zmian przerostowych w gruczole tarczowym (25). Ze względu na wysoki procent wyników fałszywie dodatnich przydatność tego testu jest kwestionowana.

W ostatnich latach największe znaczenie w badaniach pozostałości tyreostatyków odgrywają metody fizykochemiczne. Analizę związków prowadzi się w następujących matrycach: tarczycy (1, 3, 6, 8, 21, 29, 30), moczu (4, 11, 12, 20, 21, 23, 35, 36, 39), tkan-

ce mięśniowej (3, 9, 23, 34, 38), osoczu (27, 31, 37), włosach (23), mleku (39), paszy (23). W latach 60. dominowały metody kolorymetryczne, następnie do badań wprowadzono chromatografię cienkowarstwową, która przez wiele lat z powodzeniem stosowana była w wielu krajach do badań pozostałości tyreostatyków w próbkach biologicznych. De Brabander i Verbeke (7) w 1975 r. przedstawili metodę TLC, w której zastosowali derywatyzację związków z NBD-CL (4-chloro 7-nitrobenzofurazan) i uzyskali limity detekcji w granicach $10 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Kolejne lata to rozwój metod chromatograficznych, takich jak: chromatografia cieczowa (LC) z detektorami: chemiluminescencyjnym (31), UV (36) czy diodowym (DAD) (8) oraz chromatografia gazowa (GC) ze spektrometrią mas (4, 6, 38). Szczególne możliwości daje połączenie chromatografii cieczowej z tandemową spektrometrią mas. Zastosowanie przed analizą LC-MS/MS derywatywacji obecnych w próbce tyreostatyków pozwoliło na obniżenie limitów detekcji w próbkach biologicznych do wartości $1-5 \mu\text{g L}^{-1}$ (3, 33). Najczęściej do derywatywacji stosuje się: 3-IBBr (bromek 3-jodobenzylu), PFBBBr (bromek pentafluorobenzylu), 4-IBBr (bromek 4-jodobenzylu). Derywatywacja powoduje zwiększenie masy cząsteczki oraz stabilizację pojedynczych form tautomerycznych, co jest korzystne z punktu widzenia analizy metodami chromatograficznymi.

W 2010 r. opublikowana została metoda LC-MS/MS, w której bez przeprowadzania tyreostatyków w pochodne i przy zastosowaniu nowego typu kolumny UHPLC (Ultra-High Performance Liquid Chromatography), uzyskano limity wykrywania rzędu $1-10 \mu\text{g L}^{-1}$ (11).

Kontrola pozostałości tyreostatyków

Badania pozostałości tyreostatyków w tkankach i płynach ustrojowych zwierząt rzeźnych prowadzone są w Polsce od 1990 r. Krajowy program badań kontrolnych obecności substancji niedozwolonych oraz pozostałości chemicznych, biologicznych i produktów leczniczych u zwierząt i w żywności pochodzenia zwierzęcego jest obecnie całkowicie dostosowany do międzynarodowych wymagań (40). Zasady prowadzenia badań są zgodne z zaleceniami Dyrektywy Rady 96/23/EC (18) oraz Rozporządzenia Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z 28 lipca 2006 r. (26). Liczba zwierząt kontrolowanych w kierunku tyreostatyków zależy od liczby zwierząt poddanych ubojowi w kraju w roku poprzednim. W przypadku związków wykazujących właściwości anaboliczne próbki do badań pobierane są zarówno w gospodarstwach w trakcie tuczu zwierząt, jak i w rzeźniach, w różnych odstępach czasu rozłożonych w okresie całego roku kalendarzowego. Zgodnie z obecnymi wytycznymi, rocznie bada się około 600 próbek moczu, wody i tkanki mięśniowej pobieranych przez Inspekcję Weterynaryjną zgodnie z instrukcją Głównego Lekarza Weterynarii od: bydła, świń, owiec, koni, drobiu i królików.

Badania prowadzone są metodą chromatografii cieczowej z tandemową spektrometrią mas, która spełnia kryteria dla metod stosowanych w badaniach pozostałości związków niedozwolonych i umożliwia wykrywanie tyreostatyków znacznie poniżej obowiązującego poziomu działania wynoszącego $10 \mu\text{g L}^{-1}$ (33). W ciągu ostatnich czterech lat w 8 próbkach moczu pobranych od bydła i świń stwierdzono obecność tiouracylu, były to pierwsze od 20 lat badań wyniki niezgodne z wymaganiami. Przeprowadzone we wszystkich przypadkach dochodzenie nie dało podstawy do stwierdzenia, że tiouracyl był podawany zwierzętom. Również w innych krajach europejskich od kilku lat wykrywa się ten związek w moczu zwierząt rzeźnych. Według raportu EFSA (Report for 2009 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products, www.efsa.europa.eu), w 2009 r. w 27 krajach UE, w badaniach przeprowadzonych w ramach krajowych programów kontrolnych pozostałości (Dyrektywa Rady 96/23/EC), na 10 013 próbek przebadanych w kierunku tyreostatyków obecność tiouracylu wykryto w 46 próbkach (0,46%), w tym w: 27 próbkach pobranych od bydła, 11 od świń, 8 od owiec i kóz. Oznaczone stężenia tiouracylu z reguły nie przekraczają wartości $20 \mu\text{g L}^{-1}$ i są możliwe do wykrycia dzięki znacznemu obniżeniu limitów detekcji metod analitycznych stosowanych obecnie w kontroli tyreostatyków. Jak wynika z danych piśmiennictwa, tiouracyl może występować endogennie u niektórych gatunków zwierząt, między innymi w następstwie stosowania w ich diecie roślin kapustowatych (*Brassicaceae*) (24). Do tej grupy roślin, stosowanych w polskich hodowlach zwierząt rzeźnych zalicza się rzepak. Właściwości tej rośliny, tj. duża zawartość białka, niska cena i dostępność powodują, że jego udział w skarmianiu zwierząt jest znaczący. Zawartość śruty rzepakowej w paszach treściwych, zgodnie z przyjętymi normami, może osiągać wartość do 30%. W rzepaku dopuszczonym do produkcji paszy w krajach UE zawartość glukozynolanów, związków oddziałujących na funkcjonowanie tarczycy, nie powinna przekraczać $25 \mu\text{M g}^{-1}$. Uważa się, że na drodze hydrolizy glukozynolanów obecnych w roślinach krzyżowych w organizmie zwierząt syntetyzowany jest tiouracyl. Mechanizm jego powstawania nie jest w pełni wyjaśniony. Reakcja może być wywołana na skutek zakłóceń komórkowych zwierzęcia. Enzymem katalizującym reakcję jest mirozynaza (β -tioglukozydaza). Po hydrolizie część produktów może być transformowana do biologicznie czynnych związków. Przebieg tych reakcji uzależniony jest od pH środowiska, a produkty reakcji od podstawnika w łańcuchu bocznym. W środowisku kwaśnym (pH $\sim 2-3$) tworzą się nitryle, natomiast w środowisku obojętnym i lekko zasadowym (pH $\sim 5-9$) powstają izotiocyaniany, z których mogą być tworzone naturalne substancje tyreostatyczne (tiocyaniany, oksazolidyna-2-tionu) (10). Według najnowszych doniesień, tioura-

cył może również występować naturalnie w roślinach krzyżowych. Badania prowadzone przez francuskich naukowców wykazały, że stężenie tiouracylu w kalfiorze nie przekracza wartości $1,0 \mu\text{g kg}^{-1}$, natomiast w brokułach $6,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ (9). Prowadzone badania mają też na celu wyznaczenie tzw. wartości granicznych (threshold values) dla endogennego tiouracylu w moczu zwierząt. Naukowcy z Francji na podstawie analizy wyników 5-letnich badań zaproponowali wstępne graniczne wartości stężenia TU w moczu bydła w zależności od płci i wieku zwierząt. Dla bydła w wieku powyżej 6 miesięcy mieszczą się w przedziale 3,1-9,1 $\mu\text{g L}^{-1}$, natomiast dla cieląt poniżej 6. miesiąca w zakresie 7,3-17,7 $\mu\text{g L}^{-1}$ (5).

Badania nad dokładnym ustaleniem mechanizmu powstawania tiouracylu w organizmie zwierząt oraz ewentualnych prekursorów ciągle trwają. Wydaje się, że zagrożenia te będą stanowić istotne wyzwanie dla wielu ośrodków naukowych zajmujących się badaniami pozostałości leków.

Piśmiennictwo

- Abuin S., Companyó R., Centrich F., Rúbies A., Prat M. D.: Analysis of thyrostatic drugs in thyroid samples by liquid chromatography tandem mass spectrometry: Comparison of two sample treatment strategies. *J. Chromatogr. A* 2008, 1207, 17-23.
- Anon.: IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Volume 79. Some thyrotropic agents. IARC Lyon 2001.
- Asea P. E., MacNeil J. D., Boison J. O.: An analytical method to screen for six thyrostatic drug residues in the thyroid gland and muscle tissues of food producing animals by liquid chromatography with absorption detection and liquid chromatography/mass spectrometry. *J. AOAC Int.* 2006, 89, 567-575.
- Batjoens P., De Brabander H. F., De Wasch K.: Rapid and high performance analysis of thyrostatic drug residues in urine using gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1996, 750, 127-132.
- Bizec B. le, Bichon E., Deceuninck Y., Prévost S., Monteau F., Antignac J. F., Dervilly-Pinel G.: Toward a criterion for suspect thiouracil administration in animal husbandry. *Food Addit. Contam. Part A* 2011, 28, 840-847.
- Bizec B. le, Monteau F., Maume D., Montrade M.-P., Gade C., André F.: Detection and identification of thyrostatics in the thyroid gland by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Chem. Acta* 1997, 340, 201-208.
- Brabander H. F. de, Verbeke R.: Detection of antithyroid residues in meat and some organs of slaughtered animals. *J. Chromatogr.* 1975, 108, 141-151.
- Buick R. K., Barry C., Traynor I. M., McCaughey W. J., Elliott Ch. T.: Determination of thyrostatic residues from bovine matrices using high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 1998, 720, 71-79.
- Bussche J. van den, Kiebooms A. J., De Clercq N., Deceuninck Y., Le Bizec B., De Brabander H. F., Vanhaecke L.: Feed or food responsible for the presence of low-level thiouracil in urine of livestock and humans. *J. Agric. Food Chem.* 2011, 59, 5786-5792.
- Bussche J. van den, Noppe H., Verheyden K., Ville K., Pinel G., Le Bizec B., De Brabander H. F.: Analysis of thyrostatics: A history of 35 years. *Anal. Chem. Acta* 2009, 637, 2-12.
- Bussche J. van den, Vanhaecke L., Deceuninck Y., Verheyden K., Wille K., Bekaert K., Le Bizec B., De Brabander H. F.: Development and validation of an ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method for quantifying thyrostatics in urine without derivatisation. *J. Chromatogr. A* 2010, 1217, 4285-4293.
- Bussche J. van den, Vanhaecke L., Deceuninck Y., Wille K., Bekaert K., Le Bizec B., De Brabander H. F.: Ultra-high performance liquid chromatography mass spectrometry detection of natural occurring thiouracil in urine of untreated livestock, domesticated animals and humans. *Food Addit. Contam. A* 2011, 28, 166-172.
- Commission Decision 2002/657/EC, Off. J. Eur. Commun. L.221.
- Cooper D. S.: Antithyroid drugs. *N. Engl. J. Med.* 2005, 352, 905-917.
- Council Directive 81/602/EEC, Off. J. Eur. Commun. L.222.
- Council Directive 85/358/EEC, Off. J. Eur. Commun. L.191.
- Council Directive 96/22/EC, Off. J. Eur. Commun. L.125.
- Council Directive 96/23/EC, Off. J. Eur. Commun. L.125.
- Courtheyn D., Le Bizec B., Brambilla G., De Brabander H. F., Cobbaert E., Van De Wiele M., Vercammen J., De Wasch K.: Recent developments in the use and abuse of growth promoters. *Anal. Chem. Acta* 2002, 473, 71-82.
- Kuśmierk K., Bald E.: Determination of methimazole in urine by liquid chromatography. *Talanta* 2007, 71, 2121-2125.
- Löhmus M., Kallaste K., Le Bizec B.: Determination of thyrostatics in urine and thyroid gland by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 2009, 1216, 8080-8089.
- Momotani N., Noh J. Y., Ishikawa N., Ito K.: Effects of anti-thyroid drugs on fetal thyroid function during the treatment of pregnant hyperthyroid woman. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1997, 82, 3633-3636.
- Pinel G., Bichon E., Poupponeau K., Maume D., André F., Le Bizec B.: Multi-residue method from determination of thyrostatics in urine samples using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry after derivatisation with 3-iodobenzylbromide. *J. Chromatogr. A* 2005, 1085, 247-252.
- Pinel G., Mathieu S., Cesbron N., Maume D., De Brabander H. F., André F., Le Bizec B.: Evidence that urinary excretion of thiouracil in adult bovine submitted to a cruciferous diet can give erroneous indications of the possible illegal use of thyrostatics in meat production. *Food. Addit. Contam.* 2006, 23, 974-980.
- Pottier G.: Verwendbarkeit der histologischen Schilddrüsenuntersuchung bei erwachsenen Rindern zur Ermittlung des Mißbrauches von Thyrostatica. *Fleischwirtsch.* 1979, 59, 248-250.
- Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 28 lipca 2006 r. w sprawie sposobu postępowania z substancjami niedozwolonymi, pozostałościami chemicznymi, biologicznymi, produktami leczniczymi i skażeniami promieniotwórczymi u zwierząt i w produktach pochodzenia zwierzęcego. *Dz. U. Nr 147, poz. 1067 z późn. zm.* 2006.
- Stelipoulos P., Stichel E.: Estimation of performance characteristics of a confirmation method for thyrostatics in plasma by means of a weighted least-squares approach. *Anal. Chem. Acta* 2007, 592, 181-186.
- Vos J. G., Stephany R., Caspers J. W., Van Loon J. Th. G., Metzlar J. W. H., Overhaus H. B. M.: Weight increase of the thyroid gland as a tentative screening parameter to detect the illegal use of thyrostatic compounds in slaughter cattle. *Vet. Quart.* 1982, 4, 1-4.
- Wasch K. de, De Brabander H. F., Impens S., Vandewiele M., Courtheyn D.: Determination of mercaptobenzimidazol and other thyrostatic residues in thyroid tissue and meat using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 2001, 912, 311-317.
- Wasch K. de, De Brabander H. F., Van Ginkel L. A., Spaan A., Sterk S. S., Meiring H. D.: Confirmation of residues of thyrostatic drugs in thyroid glands by multiple mass spectrometry after thin-layer chromatographic screening. *J. Chromatogr. A* 1998, 819, 99-111.
- Wie Y., Zhang Z.-J., Zhang Y.-T., Sun Y.-H.: Determination of propylthiouracil and methylthiouracil in human serum using high-performance liquid chromatography with chemiluminescence detection. *J. Chromatogr.* 2007, 854, 239-244.
- Woźniak B.: Kontrola pozostałości tyrostatyków w tkankach zwierząt rzeźnych. *Gosp. Mięsna* 1994, 11, 28.
- Woźniak B., Matraszek-Zuchowska I., Żmudzki J., Jedziniak P., Korycińska B., Sielska K., Witek S., Kłopot A.: Liquid chromatography tandem mass spectrometry with ion trap and triple quadrupole analyzers for determination of thyrostatic drugs in urine and muscle tissue. *Anal. Chem. Acta* 2011, 700, 155-166.
- Yu G. Y. F., Murby E. J., Wells R. J.: Gas chromatographic determination of residues of thyrostatic drugs in bovine tissue using combined mediated methylation and extraction. *J. Chromatogr. B* 1997, 703, 159-166.
- Zakrzewski R.: Determination of methimazole in urine with the iodine-azide detection system following its separation by reversed-phase high-performance. *J. Chromatogr. B* 2008, 869, 67-74.
- Zakrzewski R.: High performance liquid chromatographic determination of propylthiouracil in human urine by post-column iodine-azide reaction. *J. Pharmacol.* 2008, 48, 145-150.
- Zakrzewski R., Ciesielski W.: Application of improved iodine-azide procedure for the detection of thiouracil in blood serum and urine with planar chromatography. *J. Chromatogr. B* 2003, 784, 283-290.
- Zhang L., Liu Meng-Xia Y., Qiu Y.: Simultaneous determination of thyrostatic residues in animal tissues by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 2005, 1074, 1-7.
- Zou Q.-H., Liu Y., Xie M.-X., Han J., Zhang L.: A rapid method for determination and confirmation of thyrostatics in milk and urine by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Chem. Acta* 2005, 551, 184-191.
- Żmudzki J., Niewiadowska A., Wojtoń B.: Weterynaryjny krajowy program badań kontrolnych pozostałości w tkankach zwierząt i żywności pochodzenia zwierzęcego. *Medycyna Wet.* 2005, 61, 649-653.