

DETERMINATION OF ACTIVE COMPONENTS OF TOXANOX+® IN NON-TYPICAL SAMPLES

Przemysław PIOTROWSKI, Marzena SYKUTERA, Ewa PUFAL, Karol ŚLIWKA
Chair and Department of Forensic Medicine, L. Rydygier Medical Academy, Bydgoszcz

ABSTRACT: A method of determination of warfarin and coumatetralyl – the active components of TOXANOX+® – in non-typical samples such as blood stains on linen cloth and blood mixed with soil is presented. The above substances were isolated by extraction with acetone/chloroform mixture (1:1 v/v). Identification and quantification of warfarin and coumatetralyl were performed using high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry.

KEY WORDS: Warfarin; Coumatetralyl; LC/MS.

Problems of Forensic Sciences, vol. LV, 2003, 109–119
Received 22 September 2003; accepted 18 November 2003

THE AIM OF THE STUDY

The Department of Forensic Medicine, the Medical Academy, Bydgoszcz was informed about a case of fatal poisoning of a dog. From the obtained information, it transpired that the dog had consumed a preparation for combating rodents by the name of TOXANOX+®. The material secured for examinations was blood stains on a linen cloth and blood collected from the soil. No blood samples or fragments of internal organs were collected for toxicological examinations. The secured samples were stored for 7 days at room temperature before being delivered to the Department for examinations. Because the investigated material was non-typical and had been stored as described above, it was necessary to check whether it is possible to determine warfarin and coumatetralyl – the active components of the preparation – in it.

INTRODUCTION

TOXANOX+® is a preparation utilised for combating rodents. The active ingredients of the preparation are two derivatives of coumarin: warfarin and coumatetralyl. The toxic activity of the derivatives of coumarin is connected with a decrease in the coagulability of the blood and damage to capillary ves-

sels. These compounds inhibit the production of prothrombin in the liver and cause an increase in the permeability of vessels. The prothrombin present in the blood after introduction of the poison to the organism is used up in the course of 48 hours.

Single, relatively high doses of derivatives of coumarin engender short-lived prolongation of the time of coagulation. Fatal poisonings are rare in such situations. However, by introducing small doses of the poison to the organism on several consecutive days, cumulative effects occur: hypoprothrombinemia is maintained constantly, the flow of blood is slowed down and permeability increases. Internal and external haemorrhages arise, resulting in a final effect of fatal loss of blood.

The toxicity of derivatives of coumarin depends on many factors, such as the size of the dose, the length of the period of introduction of the poison to the organism, the species, the age, the sex and individual sensitivity. For this reason, the size of the toxic and lethal doses has not been strictly established. Data from literature on the subject indicates that toxic effects in people are observed at a concentration of warfarin in serum above 10 $\mu\text{g/ml}$, which corresponds to consumption of this compound in quantities of 10–30 mg/kg of body mass [12]. In the case of animals, toxic doses of derivatives of coumarin are situated within wider limits, e.g. for rats toxic doses of warfarin vary from 58 to 323 mg/kg of body mass, depending on the sex of the animal [14], whereas the lethal dose of oxycoumarin for dogs is 30 mg/kg of body mass [1].

The literature indicates that extraction with the following organic solvents has been applied most frequently in order to isolate derivatives of coumarin: a mixture of acetone and chloroform [6, 10], a mixture of acetone and diethyl ether [5, 14], ethoxyethane [7], acetonitrile [3], dichloroethane [8] and the material from which these compounds are isolated was mostly serum and fragments of the liver.

Among the analytical methods described in the literature for the determination of warfarin and other derivatives of coumarin, the most frequently used technique is high-performance liquid chromatography coupled with a spectrophotometric detector [3, 4, 5, 14, 15, 16, 17], a fluorescence detector [2, 6, 7, 8, 9, 10] and a mass detector [11, 13].

In the presented work, a mixture of acetone and chloroform (1:1, v/v) was used in order to isolate warfarin and coumatetralyl from blood stains on a linen cloth and from blood mixed with soil, similarly to Fauconnet et al. [6] and Jones [10]. Qualitative and quantitative analysis was carried out by the method of liquid chromatography with mass spectrometry. Separation was performed with an Eclipse XDB C18 column, similarly to Kollroser and Schober [11].

MATERIALS AND METHODS

Standards and reagents were bought from the following firms: coumatetralyl – Fluka, diazepam – Promochem, warfarin and TFA – Sigma-Aldrich. The remaining reagents used in the process of extraction and in the chromatographic analysis were produced by Merck.

Preparation of the model samples

Warfarin and coumatetralyl were added to blood taken from a dog in order to obtain the following concentrations:

- sample A – 3 µg/ml of warfarin and 0.9 µg/ml of coumatetralyl;
- sample B – 15 µg/ml warfarin and 4.5 µg/ml of coumatetralyl.

5 ml of sample A were poured onto a linen cloth in order to create blood stains. One of the stains was left for 7 days at room temperature and another was subjected to extraction on the day of preparation. Sample B was treated in an identical manner.

5 ml of sample A were added to 30 g of soil. Part of the resultant mixture was left for 7 days at room temperature and part was subjected to extraction on the day of preparation. Sample B was treated in an identical manner.

Isolation of warfarin and coumatetralyl

The linen cloth with the blood stains was cut up into small fragments, placed in a cone-shaped flask, and then 100 ml of the mixture of acetone and of chloroform (1:1 v/v) was added. The same quantity of the above mixture of solvents was added to the sample of soil and blood. Extraction was carried out in a supersonic bath for 90 minutes at a temperature of 25°C. The organic phase was separated and evaporated to dryness in an atmosphere of nitrogen. The dry remainder was dissolved in 200 µl of methanol. Extracts were subjected to analysis by the method of liquid chromatography with mass spectrometry.

Analysis by LC/MS method

Analysis was performed with the use of a liquid chromatograph by Agilent Technologies (Waldbronn, Germany), consisting of a binary pump and autosampler (volume of injection 20 µl). Chromatographic separation was carried out on an Eclipse XDB C18 column (150 × 4.6 mm; 5 µm). A mixture of acetonitrile and TFA (80:20 v/v) with a flow of 0.5 ml/min was applied as the mobile phase. Detection was performed using a mass spectrometer by Agilent Technologies (1100 Series) with ionisation by spraying the sample in an electric field at atmospheric pressure under the following mass detector parameters: fragmentor tension – 70 V, capillary tension – 4000 V, gas tem-

perature – 350°C, gas (nitrogen) pressure – 30 psi, flow of drying gas – 13 l/min.

Analysis of warfarin and coumatetralyl was performed in the option of monitoring of chosen ions (SIM) – 293 m/z for warfarin, 309 m/z for coumatetralyl and 285 m/z for diazepam (internal standard).

RESULTS

Isolation of warfarin and coumatetralyl from the model samples (blood stains on linen cloth and blood mixed with soil) was carried out using a mixture of solvents: acetone and chloroform (1:1 v/v). The results obtained for the efficiency of extraction of warfarin and coumatetralyl from model samples are presented in Table I. The performed research showed that in the case of warfarin, recovery values were not less than 91.7%, whereas for coumatetralyl they were above 89.6%. Recovery values of warfarin and coumatetralyl from the blood stains and from the blood mixed with soil after 7 days of storage at room temperature are presented in Table II. The obtained results of the research showed that the conditions of storage of this biological material did not significantly influence the recovery values of both compounds (the recovery value was not less than 91.0% for warfarin and 86.6% for coumatetralyl).

TABLE I. RECOVERY RATES OF WARFARIN AND COUMATETRALYL FROM BLOODY STAINS ON LINEN CLOTH AND BLOOD MIXED WITH SOIL

Material	Warfarin	Coumatetralyl		
	3 µg/ml	15 µg/ml	0.9 µg/ml	4.5 µg/ml
Value of the recovery [%] (<i>n</i> = 3)				
Bloody stains on linen cloth	92.8 ± 2.3	94.8 ± 1.9	90.7 ± 2.3	92.3 ± 2.1
Blood mixed with soil	91.7 ± 2.4	94.6 ± 3.4	89.6 ± 3.0	90.2 ± 2.3

Qualitative analysis of warfarin and coumatetralyl was performed by the method of liquid chromatography with mass spectrometry. An example of a mass chromatogram obtained as a result of the analysis of an extract of blood stains is presented in Figure 1. The applied analytical conditions made it possible to achieve a good separation of the analysed compounds – the retention time of warfarin was 4.04 minutes and of coumatetralyl 4.53 minutes.

TABLE II. THE MEAN VALUES OF RECOVERY OF WARFARIN AND COUMATETRALYL FROM BLOODY STAINS ON LINEN CLOTH AND BLOOD MIXED WITH SOIL WAS OBSERVED AT TEMPERATURE OF +25°C AFTER 7 DAYS

Material	Warfarin	Coumatetralyl		
	3 µg/ml	15 µg/ml	0.9 µg/ml	4.5 µg/ml
Value of the recovery [%] (<i>n</i> = 3)				
Bloody stains on linen cloth	92.3 ± 1.9	94.7 ± 2.0	89.8 ± 2.4	92.1 ± 1.9
Blood mixed with soil	91.0 ± 2.6	93.8 ± 3.6	86.6 ± 3.3	90.0 ± 2.2

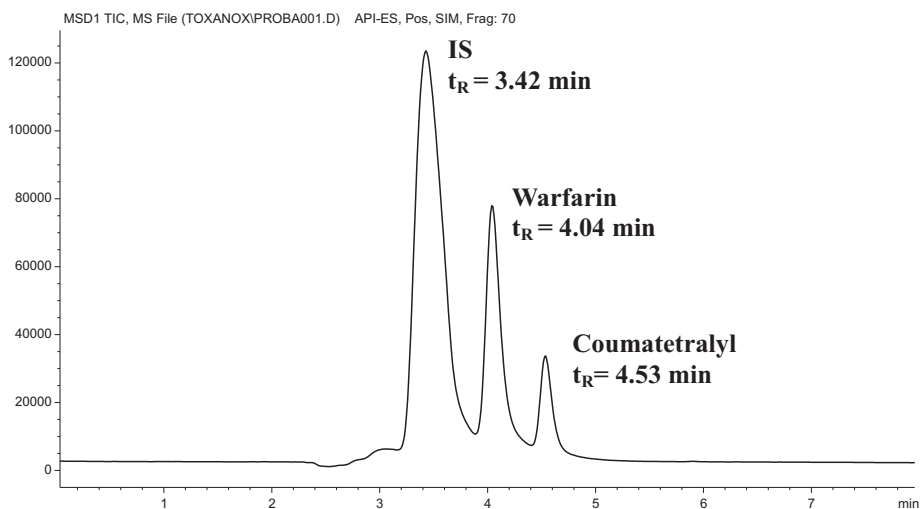


Fig. 1. Mass chromatogram of an extract of blood stain on linen cloth.

Calibration curves for warfarin and coumatetralyl had a linear course in the examined range of concentrations (0.01–20 µg/ml for warfarin and 0.03–18 µg/ml for coumatetralyl). The coefficient of correlation in the case of determination of warfarin in blood was 0.9998 and for coumatetralyl 0.9996. The detection limit was 1 ng/ml for warfarin and 0.3 ng/ml for coumatetralyl.

DISCUSSION

The results obtained in the course of this research (Table I) show that using a mixture of acetone and chloroform (1:1 v/v) for isolation of derivatives of coumarin assured a recovery of above 90% for both compounds. The same

system of solvents was used by Fauconnet et al. [6] and Jones [10] for the isolation of derivatives of coumarin from fragments of the liver, obtaining, however, somewhat lower recovery values, i.e. only 78%. The literature shows that derivatives of coumarin have also been extracted from serum using dichloroethane with an efficiency of 90% [8], acetonitrile with an efficiency of 75% [3] and ethoxyethane with an efficiency of 68% [7]. There are also reports on the isolation of these compounds from food with a mixture of acetone and diethyl ether [5, 14].

In the presented work, the method of liquid chromatography with mass spectrometry was used in order to identify warfarin and coumatetralyl. The applied analytical conditions made it possible to detect warfarin at a level of 1 ng/ml and coumatetralyl at a level of 0.3 ng/ml. Determination of warfarin at a level of 1 ng/ml by means of liquid chromatography with mass spectrometry was also described by Kollroser and Schober [11]. The authors used similar analytical conditions, with the difference, however, that they used a mixture of acetonitrile and formic acid (75:25) as the mobile phase.

CONCLUSIONS

1. The method presented in this work of isolation of warfarin and coumatetralyl from blood stains on a linen cloth and from blood mixed with soil using a system of chloroform and acetone (1:1 v/v) gives satisfactory recovery values.
2. 7 day storage at room temperature of linen cloth with blood stains and of blood mixed with soil, containing warfarin and coumatetralyl, did not cause significant changes in concentrations of these compounds, thus allowing us to obtain reliable results of analysis.
3. The applied conditions of analysis using liquid chromatography with mass spectrometry can be successfully utilised in the qualitative and quantitative analysis of warfarin and coumatetralyl.

References:

1. Bohosiewicz M., Toksykologia weterynaryjna, Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa 1979.
2. Boppana V. K., Schaefer W. H., Cyronak M. J., High-performance liquid chromatographic determination of warfarin enantiomers in plasma with automated on-line sample enrichment, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 2002, vol. 54, pp. 315–326.
3. Chalermchaikit T., Felice L. J., Murphy M. J., Simultaneous determination of eight anticoagulant rodenticides in blood serum and liver, *Journal of Analytical Toxicology* 1993, vol. 17, pp. 56–61.

4. Dalbacke J., Dahlquist I., Persson C., Determination of warfarin in drinking water by high-performance liquid chromatography after solid-phase extraction, *Journal of Chromatography* 1990, vol. 507, pp. 381–387.
5. Dimuccio A., Camoni I., Vergori L. [et al.], Screening for coumatetralyl in soft drinks by solid-matrix extraction and high-performance liquid chromatography with diode-array detection, *Journal of Chromatography* 1991, vol. 553, pp. 305–309.
6. Fauconnet V., Pouliquen H., Pinault L., Reversed-phase HPLC determination of eight anticoagulant rodenticides in animal liver, *Journal of Analytical Toxicology* 1997, vol. 21, pp. 548–553.
7. Felice L. J., Chalermchaikit T., Murphy M. J., Multicomponent determination of 4-hydroxycoumarin in blood serum by liquid chromatography with fluorescence detection, *Journal of Analytical Toxicology* 1991, vol. 15, pp. 126–129.
8. Hunter K., Determination of coumarin anticoagulant rodenticide residues in animal tissue by high-performance liquid chromatography. I. Fluorescence detection using post-column techniques, *Journal of Chromatography* 1983, vol. 270, pp. 267–276.
9. Hunter K., High-performance liquid chromatographic strategies for the determination and confirmation of anticoagulant rodenticide residues in animal tissues, *Journal of Chromatography* 1985, vol. 321, pp. 255–272.
10. Jones A., HPLC determination of anticoagulant rodenticide residues in animal livers, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 1996, vol. 56, pp. 8–15.
11. Kollroser M., Schober C., Determination of coumarin-type anticoagulants in human plasma by HPLC-electrospray ionization tandem mass spectrometry with an ion trap detector, *Clinical Chemistry* 2002, vol. 48, pp. 84–91.
12. Moffat A. C. [ed.], Clarke's isolation and identification of drugs in pharmaceuticals, body fluids, and *post mortem* material, The Pharmaceutical Press, London 1986.
13. Mundy D. E., Quick M. P., Machin A. F., Determination of warfarin in animal relicts and feedingstuffs by high-pressure liquid chromatography with confirmation of identity by mass spectrometry, *Journal of Chromatography* 1976, vol. 121, pp. 335–341.
14. Nikonorow M., Pesticyny w świetle ochrony środowiska, Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa 1979.
15. Pouliquen H., Fauconnet V., Morvan M. L. [et al.], Determination of warfarin in the yolk and the white of hens' eggs by reversed-phase high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B* 1997, vol. 702, pp. 143–148.
16. Ring P., Bostick J.M., Validation of a method for the determination of (R)-warfarin and (S)-warfarin in human plasma using LC with UV detector, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2000, vol. 22, pp. 573–581.

OZNACZANIE SKŁADNIKÓW CZYNNYCH PREPARATU TOXANOX+® W NIETYPOWYM MATERIALE BADAWCZYM

Przemysław PIOTROWSKI, Marzena SYKUTERA, Ewa PUFAL, Karol ŚLIWKA

CEL PRACY

Zakład Medycyny Sądowej Akademii Medycznej w Bydgoszczy został poinformowany o przypadku śmiertelnego zatrucia psa. Z uzyskanych informacji wynikało, że pies spożył preparat do zwalczania gryzoni o nazwie TOXANOX+®. Materiałem, który zabezpieczono do badań, były krwawe plamy na płótnie oraz krew zebrana z ziemi. Do badań toksykologicznych nie pobrano próby krwi ani wycinków narządów wewnętrznych. Zabezpieczone do badań próby przed dostarczeniem do tutejszego Zakładu były przechowywane przez 7 dni w temperaturze pokojowej. W związku z powyższym (nietypowy materiał badawczy oraz warunki przechowywania tego materiału) konieczne było sprawdzenie, czy możliwe jest oznaczenie warfaryny i kumatetralyłu – składników czynnych preparatu – w zabezpieczonym do badań toksykologicznych materiale.

WPROWADZENIE

TOXANOX+® jest preparatem stosowanym do zwalczania gryzoni. Składnikami czynnymi preparatu są dwie pochodne kumaryny: warfaryna i kumatetralyl. Działanie toksyczne pochodnych kumaryny związane jest z obniżeniem krzepliwości krwi i uszkodzeniem naczyń włosowatych. Związki te hamują wytwarzanie protrombiny w wątrobie oraz powodują wzrost przepuszczalności naczyń. Protrombina znajdująca się we krwi po dostaniu się trucizny do organizmu zostaje zużyta w ciągu 48 godzin.

Jednorazowe stosunkowo wysokie dawki pochodnych kumaryny wywołują przemijające przedłużenie czasu krzepnięcia. W takich sytuacjach rzadko występują śmiertelne zatrucia. Natomiast przy dostawaniu się małych dawek trucizny do organizmu przez kilka kolejnych dni występuje działanie kumulacyjne, hipoprotrombinemia utrzymuje się stale, przepływ krwi jest zwolniony, a przepuszczalność wzrasta. Pojawiają się krwotoki wewnętrzne i zewnętrzne wywołujące w końcowym efekcie śmiertelne wykrwawienie.

Toksyczność pochodnych kumaryny zależy od wielu czynników, takich jak np. wysokość dawki, okres dostawania się trucizny do organizmu, przynależność gatunkowa, wiek, płeć i wrażliwość osobnicza. Z tego też względu wysokość dawek toksycznych i śmiertelnych nie jest ściśle ustalona. Jak wynika z danych zawartych w literaturze przedmiotu, efekt toksyczny u ludzi obserwuje się przy stężeniu warfaryny w surowicy powyżej 10 µg/ml, co odpowiada spożyciu tego związku w ilości 10–30 mg/kg m.c. [12]. W przypadku zwierząt dawki toksyczne pochodnych kumaryny mieszczą się w szerszych granicach i tak na przykład dla szczurów dawki toksyczne warfaryny wynoszą od 58 do 323 mg/kg m.c. w zależności od płci zwierzęcia [14], natomiast dawka śmiertelna oksykumaryny dla psów wynosi 30 mg/kg m.c. [1].

Z piśmiennictwa wynika, że w celu izolacji pochodnych kumaryny najczęściej stosowano ekstrakcję rozpuszczalnikami organicznymi takimi jak mieszanina acetonu i chloroformu [6, 10], mieszanina acetonu i eteru dietylowego [5, 14], eter etylowy [7], acetonitryl [3], dichloroetan [8], a materiałem z którego wyosabniano te związki, była głównie surowica oraz wycinki wątroby.

Wśród metod analitycznych opisanych w literaturze w celu oznaczania warfaryny i innych pochodnych kumaryny, najczęściej stosowaną techniką jest wysokosprawna chromatografia cieczowa w połączeniu z detektorem spektrofotometrycznym [3, 4, 5, 14, 15, 16, 17], detektorem fluorescencyjnym [2, 6, 7, 8, 9, 10] oraz detektorem masowym [11, 13].

W niniejszej pracy w celu izolacji warfaryny i kumatetralylu z krwawych plam na płótnie oraz krwi zmieszanej z ziemią zastosowano, podobnie jak Fauconnet i in. [6] oraz Jones [10], mieszaninę acetonu i chloroformu (1:1, v/v). Analizę jakościową i ilościową przeprowadzono metodą chromatografii cieczowej z detektorem masowym. Rozdziału dokonano na kolumnie Eclipse XDB C18, podobnie jak zrobili to Kollroser i Schober [11].

MATERIAŁY I METODY

Wzorce i odczynniki zakupiono w następujących firmach: Kumatetralyl – Fluka, Diazepam – Promochem, Warfaryna i TFA – Sigma-Aldrich. Pozostałe odczynniki użyte w procesie ekstrakcji i w analizie chromatograficznej zostały wyprodukowane przez firmę Merck.

Przygotowanie prób modelowych

Do krwi pobranej od psa dodano warfarynę i kumatetralyl, tak, by otrzymać stężenia:

- próba A – 3 µg/ml warfaryny i 0,9 µg/ml kumatetralylu;
- próba B – 15 µg/ml warfaryny i 4,5 µg/ml kumatetralylu.

5 ml próby A wylano na płótno tak, by otrzymać krwawe plamy. Jedną plamę pozostawiono na 7 dni w temperaturze pokojowej, a drugą plamę poddano ekstrakcji w dniu przygotowania. Identyczne postąpiono z próbą B.

5 ml próby A dodano do 30 g ziemi. Pierwszą partię pozostawiono na 7 dni w temperaturze pokojowej, drugą poddano ekstrakcji w dniu przygotowania. Identyczne postępowanie przeprowadzono z próbą B.

Izolacja warfaryny i kumatetralylu

Płótno z plamami krwawymi pocięto na drobne fragmenty, umieszczono w kolbie stożkowej, a następnie dodano 100 ml mieszaniny acetonu i chloroformu (1:1 v/v). Do ziemi zawierającej krew dodano taką samą ilość powyższej mieszaniny rozpuszczalników. Ekstrakcję prowadzono w łaźni ultradźwiękowej przez 90 min w temperaturze 25°C. Fazę organiczną oddzielono i odparowano do sucha w atmosferze azotu. Suchą pozostałość rozpuszczono w 200 µl metanolu. Ekstrakty poddano analizie metodą chromatografii cieczowej z detektorem masowym.

Analiza metodą LC/MS

Analizę przeprowadzono z użyciem chromatografu cieczowego firmy Agilent Technologies (Waldbronn, Niemcy) składającego się z pompy binarnej i autosamplera (objętość nastrzyku 20 μ l). Rozdział chromatograficzny przeprowadzono na kolumnie Eclipse XDB C18 (150 \times 4,6 mm; 5 μ m).

Jako fazę ruchomą zastosowano mieszaninę acetonitryl-TFA (80:20 v/v) z przepływem 0,5 ml/min. Detekcję przeprowadzono przy użyciu spektrometru masowego firmy Agilent Technologies (1100 Series) z jonizacją przez rozpylenie w polu elektrycznym pod ciśnieniem atmosferycznym przy następujących parametrach detektora masowego: napięcie fragmentora – 70 V, napięcie kapilary – 4000 V, temperatura gazu: – 350°C, ciśnienie gazu (azot) – 30 psi, przepływ gazu suszającego – 13 l/min.

Analizę warfaryny i kumatetralyłu prowadzono w opcji monitorowania wybranych jonów (SIM) – 293 m/z dla warfaryny, 309 m/z dla kumatetralyłu i 285 m/z dla diazepamu (standard wewnętrzny).

WYNIKI

Izolację warfaryny i kumatetralyłu z prób modelowych (plamy krwawe na płótnie oraz krew zmieszana z ziemią) przeprowadzono, używając mieszaniny rozpuszczalników acetonu i chloroformu (1:1 v/v). Uzyskane wyniki wydajności ekstrakcji warfaryny i kumatetralyłu z prób modelowych przedstawiono w tabeli I. Badania wykazały, iż w przypadku warfaryny wartości odzysku były nie mniejsze niż 91,7%, natomiast dla kumatetralyłu kształtowały się powyżej 89,6%. W tabeli II przedstawiono wartości odzysku warfaryny i kumatetralyłu z plam krwawych i z krwi zmieszanej z ziemią po 7 dniach przechowywania w temperaturze pokojowej. Uzyskane wyniki badań wykazały, że warunki przechowywania materiału biologicznego nie wpłynęły znacząco na wartości odzysku obu związków (wartość odzysku była nie mniejsza niż 91,0% dla warfaryny i 86,6% dla kumatetralyłu).

Analizę jakościową warfaryny i kumatetralyłu przeprowadzono metodą chromatografii cieczowej z detektorem masowym. Przykładowy chromatogram masowy uzyskany w wyniku analizy ekstraktu plam krwawych przedstawiono na rycinie 1. Zastosowane warunki analityczne umożliwiły dobry rozdział analizowanych związków – czas retencji warfaryny wynosił 4,04 min, a czas retencji kumatetralyłu 4,53 min.

Krzywe kalibracyjne dla warfaryny i kumatetralyłu wykazywały liniowy przebieg w badanym zakresie stężeń (0,01–20 μ g/ml dla warfaryny i 0,03–18 μ g/ml dla kumatetralyłu). Współczynnik korelacji w przypadku oznaczania warfaryny we krwi wynosił 0,9998, natomiast dla kumatetralyłu 0,9996. Poziom wykrywalność wynosił 1 ng/ml dla warfaryny i 0,3 ng/ml dla kumatetralyłu.

DYSKUSJA WYNIKÓW

Uzyskane w toku realizacji niniejszej pracy wyniki badań (tabela I) dowodzą, iż zastosowana w celu izolacji pochodnych kumaryny mieszanina acetonu i chloroformu (1:1 v/v) zapewniła odzysk obu związków powyżej 90%. Taki sam układ

rozpuszczalników zastosował Fauconnet i in. [6] oraz Jones [10] w celu izolacji pochodnych kumaryny z wycinków wątroby, uzyskując jednak nieco niższe wartości odzysku, bo tylko 78%. Jak wynika z danych zawartych w literaturze przedmiotu, pochodne kumaryny ekstrahowano również z surowicy z użyciem dichloroetanu z wydajnością 90% [8], acetonitrylu z wydajnością 75% [3] oraz eteru etylowego z wydajnością 68% [7]. Istnieją również doniesienia na temat izolacji tych związków z żywności mieszaniną acetonu i eteru dietylowego [5, 14].

W niniejszej pracy w celu identyfikacji warfaryny i kumatetralyłu zastosowano metodę chromatografii cieczowej z detektorem masowym. Zastosowane warunki analityczne umożliwiły wykrycie warfaryny na poziomie 1 ng/ml, a kumatetralyłu 0,3 ng/ml. Oznaczanie warfaryny na poziomie 1 ng/ml za pomocą chromatografii cieczowej z detektorem masowym opisali również Kollroser i Schober [11]. Autorzy zastosowali podobne warunki analityczne z tą jednak różnicą, że jako fazę ruchomą zastosowali mieszaninę acetonitrylu i kwasu mrówkowego (75:25).

WNIOSKI

- 1 Przedstawiona w niniejszej pracy metoda izolacji warfaryny i kumatetralyłu z plam krwawych na płótnie oraz krwi zmieszanej z ziemią – za pomocą mieszaniny chloroform-aceton – (1:1 v/v) daje zadowalające wartości odzysku.
- 2 Przechowywanie przez 7 dni w temperaturze pokojowej płótna z plamami krwawymi oraz krwi zmieszanej z ziemią, a zawierających warfarynę i kumatetralyl, nie wpłynęło w sposób znaczący na zmianę stężeń tych związków i pozwoliło na uzyskanie wiarygodnych wyników analizy.
- 3 Zastosowane warunki analizy metodą chromatografii cieczowej z detektorem masowym mogą być z powodzeniem wykorzystane w analizie jakościowej i ilościowej warfaryny i kumatetralyłu.