



SIMPLE HPLC METHOD FOR THE IDENTIFICATION OF THE MOST COMMONLY USED RODENTICIDES IN POLAND

Piotr ADAMOWICZ, Maria KAŁA

Institute of Forensic Research, Krakow

Abstract

A simple and reliable high-performance liquid chromatographic method with diode array detection (HPLC-DAD) was developed for the identification of anticoagulants in the most commonly used commercial rodenticide preparations in Poland. Six coumarin derivative anticoagulant rodenticides – bromadiolone, brodifacoum, difethialone, difenacoum, warfarin, and coumatetralyl – can be identified simultaneously with this method. The method involves weakly acid (pH 5.5) liquid-liquid extraction with a mixture of chloroform-acetone. This allows separation of anticoagulants from each other and from major background compounds. The procedure was applied to the identification of active anticoagulant components in rodenticide preparations and foodstuffs (soups, sausages and ground coffee) to which a rodenticide had been added for criminal purposes. Although the procedure was not developed for biological materials, it was also successfully utilised to analyse stomach content taken from animals (dogs, seals, and spoonbills) suspected of having been poisoned by these compounds.

Key words

Anticoagulant rodenticides; Analysis; HPLC-DAD.

Received 15 December 2005; accepted 30 December 2005

1. Introduction

Anticoagulants are widely used as over-the-counter and professional rodenticides in Poland. Commercial formulations are easy to use and readily available. Many people put out rodenticide baits to combat mice and rats. Their wide availability has resulted in an increase in accidental and intentional poisonings in animals and humans. Police often collect residues and traces at the site of the incident. These remnants (of commercial preparations and also waters, drinks and foodstuffs to which pesticide has been added for criminal purposes or accidentally) are sent to the Institute of Forensic Research as evidence materials for analysis. The identification of active component(s) in these materials is very important for further analysis of biological

material and may help in ascertaining which products have been added or taken. Sometimes, this is not easy because anticoagulant rodenticides are available as grain-based pellets, wax blocks, bars, dusts, liquid concentrates and tracking powders, and usually look similar. The main problem in determining anticoagulants is their low amount in commercial products. Today many preparations are available in Poland, most of which contain one (or more) of the following active compounds: bromadiolone, brodifacoum, difethialone, difenacoum, warfarin and coumatetralyl. Warfarin and coumatetralyl are first-generation anticoagulant rodenticides developed during the 1940s and 1950s. When, over the next few decades, rodents became resistant to the first-generation compounds, second-generation anticoagulant rodenticides (superwarfarins) were

produced. These included: brodifacoum, bromadiolone, difethialone and difenacoum. The second-generation anticoagulants are extremely long acting and are significantly more effective. They are most commonly found at concentrations of 0.005 or 0.0025%, whereas first-generation usually contained 0.025% of active compound; this is because superwarfarins are 100 times more potent than warfarin [9].

A number of techniques have been described for detection of coumarin derivatives. Initially, conventional thin-layer chromatography methods were applied, but these methods require high specimen volume and often lack the required sensitivity. Most of the procedures for the determination of anticoagulant rodenticides are based on HPLC [3, 4, 6, 9]. Many authors have developed methods of analysis of hydroxycoumarin anticoagulants in biological materials (blood, serum, plasma, urine and tissues). These authors used HPLC with UV-spectrometric and fluorescence (FL) detection. Reversed-phase C8 and C18 columns were applied. Since most coumarins are characterised by natural fluorescence, the detection limits of anticoagulants analysed by HPLC-FL in serum are from several to several dozen nanograms per millilitre. These values are approximately 10–20 times lower than with UV detection [3, 8]. Some investigators state that the use of FL detection for determining coumarin by the HPLC method is limited by the need to use an acidified mobile phase. They recommend a post-column pH-switching technique to increase pH [8]. A procedure using gas chromatography with mass spectrometry (GC-MS) has also been described. It is sensitive but more complicated and needs a derivatisation step. This GC-MS method was developed as part of a systematic toxicological analysis procedure for acidic drugs and poisons after extractive methylation. By using MS, not only the presence of 4-hydroxycoumarin anticoagulants, but also hydroxy metabolites can be indicated [10]. High performance liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry (LC-ESI-MS) seems to be very simple and effective [5]. There are also many extraction techniques described in the literature. Anticoagulants have been extracted from original [4], acidic [5] and basic [9] media. Different solvents (e.g. diethyl ether [12], hexane [9], acetonitrile [3]) or solvent mixtures (e.g. acetonitrile-ethyl ether [4, 12, 13]) were used. Some of the methods involve a protein precipitation step of the serum samples by addition of acetonitrile [3]. SPE columns (with a diol phase) have also been used for cleaning urine extracts containing hydroxycoumarin anticoagulants [10]. Recoveries average from 55% to 131% [3, 8].

For simple and rapid detection and identification of anticoagulants in rodenticide preparations and other non-biological samples, HPLC seems to be the most appropriate method. Therefore the aim of this study was to develop such a method.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Preparations containing rodenticide: Rat Killer Super – bromadiolone; Rat Killer Perfect – brodifacoum; Baraki Granulat – difethialone; Murin Dife (paste) – difenacoum; Toxan Dusty – coumatetralyl; Mice Killer – warfarin were bought in shops. A bromadiolone standard was obtained from Riedel-de Haën, and warfarin from Aldrich. All other chemicals used for analysis were HPLC or analytical grade.

2.2. Sample preparation

The rodenticide sample (2 g) was crushed, placed in a test tube and dissolved in 4 ml of deionised water. Then 0.5 ml of acetate buffer (pH 5.5) and 6 ml of chloroform-acetone (1:1, v/v) mix was added. The mixture was shaken for 10 minutes. After centrifugation at 6000 rpm for 3 min, 5 ml of organic layer was transferred to a clean tube and evaporated to dryness under a stream of nitrogen on a heating block at 50°C. The dry residue was reconstituted in 200 ml of mobile phase acetonitrile-water (1:1, v/v).

2.3. HPLC-DAD analysis

The samples were analysed by high performance liquid chromatography (HPLC). Identification of components was carried out using a LaChrom D-7000 Merck-Hitachi liquid chromatograph with an L-7455 diode array detector (DAD). Separation of analytes was performed on a LiChroCART (125 × 4 mm) column filled with LiChrospher RP select B (Merck) and thermostated at 25 °C. The mobile phase consisted of a mixture of acetonitrile (AcCN) and 0.01% (v/v) phosphoric acid in water. The flow rate was 1 ml/min. All analyses were carried out in gradient mode: 0 min – 40% AcCN, 20 min – 80% AcCN, 21 min – 40% AcCN, 26 min – 40% AcCN. The spectrophotometric spectrum was registered in the range of 200–400 nm. An aliquot of 20 µl was injected by autosampler into the HPLC-DAD system. Identification was carried out on the basis of retention time and UV spectra, which were compared with standards.

3. Forensic case reports

Case 1: a woman found strange granules in her ground coffee powder. She suspected that her husband had poisoned the coffee. 5 g of reddish granules were separated out from 85 g of the coffee. The granules were identified as bromadiolone.

Case 2: the owner of a dog noticed that the dog was not well. Three slices of a sausage (about 200 g) were found in the garden. The sausage was sent for analysis. A macroscopic examination revealed reddish granules in each slice of the sausage. The granules were identified as brodifacoum.

Case 3: On a chicken farm it was noticed that the drinking water for poultry was pinkish. 0.5 l of water was sent for examination. It was ascertained that the water was contaminated by difethialone.

4. Results and discussion

Anticoagulant rodenticides are probably the most frequently used rodenticides in Poland today. This group of pesticides is readily available over-the-counter and plays an important role in clinical and forensic toxicology as a cause of suicidal, homicidal and accidental poisonings. Due to the low content of active components in rodenticide baits (in superwarfarins this ranges from 0.005–0.0025%) analysis of these products can be problematic. The developed procedure for the detection and identification of hydroxycoumarins is not complicated and can be easily applied in any laboratory.

The developed method involves a single-step liquid-liquid extraction of the acidified (pH 5.5) sample. Application of chloroform-acetone as a solvent mixture for extraction resulted in sufficient recoveries. The fact that anticoagulant rodenticides are readily soluble in acetone has led to this solvent being the most frequently used in extractive mixtures (e.g. chloroform-acetone [6, 8, 14]). The use of cold and hot methanol for extraction was not successful.

The described HPLC-DAD method enabled separation of all anticoagulants from each other and from major background components (Figure 1). Anticoagulants were separated into single symmetrical peaks. The six analysed compounds were easy to identify on the basis of retention time and UV spectrum. Bromadiolone, brodifacoum and difenacoum have similar UV spectra, but different retention times. Their retention times are presented in Table I. Figure 2 shows the spectra and chemical structures of the analysed compounds. The HPLC-DAD chromatogram of an ex-

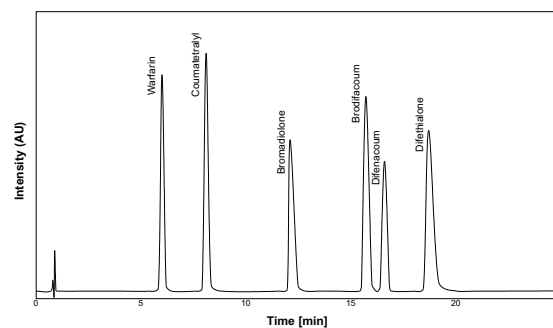


Fig. 1. HPLC-DAD chromatogram of the six anticoagulant rodenticides.

tracted preparation from material collected as evidence in one case is presented in Figure 3.

TABLE I. RETENTION TIMES OF SIX ANTICOAGULANTS

Anticoagulant	Retention time [min]
Warfarin	6.0
Coumatetralyl	8.1
Bromadiolone	12.1
Brodifacoum	15.8
Difenacoum	16.6
Difethialone	18.7

Anticoagulant rodenticides are a heterogeneous group of compounds that exhibit markedly different toxicity to humans and rodents. They are among the most toxic substances regularly found in homes. Technically, these may be divided into two types: hydroxycoumarin compounds include warfarin, difenacoum, bromadiolone and brodifacoum, while the indandiones encompass a wide range of chemicals including diphacinone, pindone and chlorphacinone. The toxicity of anticoagulant rodenticides depends entirely on repeated exposure to relatively small doses. This is true for both rodents and humans.

Anticoagulants work by inhibiting the generation of an active form of vitamin K1 via inhibition of vitamin K1 reductases. Vitamin K is required as a cofactor for activation of clotting factors II, VII, IX and X. When vitamin K cannot be regenerated, clotting factors cannot be activated, which results in a coagulopathy. This leads to uncontrollable hemorrhage and death [2].

The oral bioavailability of warfarin and the superwarfarins is nearly 100%. Warfarin is highly bound (approximately 97%) to plasma protein, mainly albu-

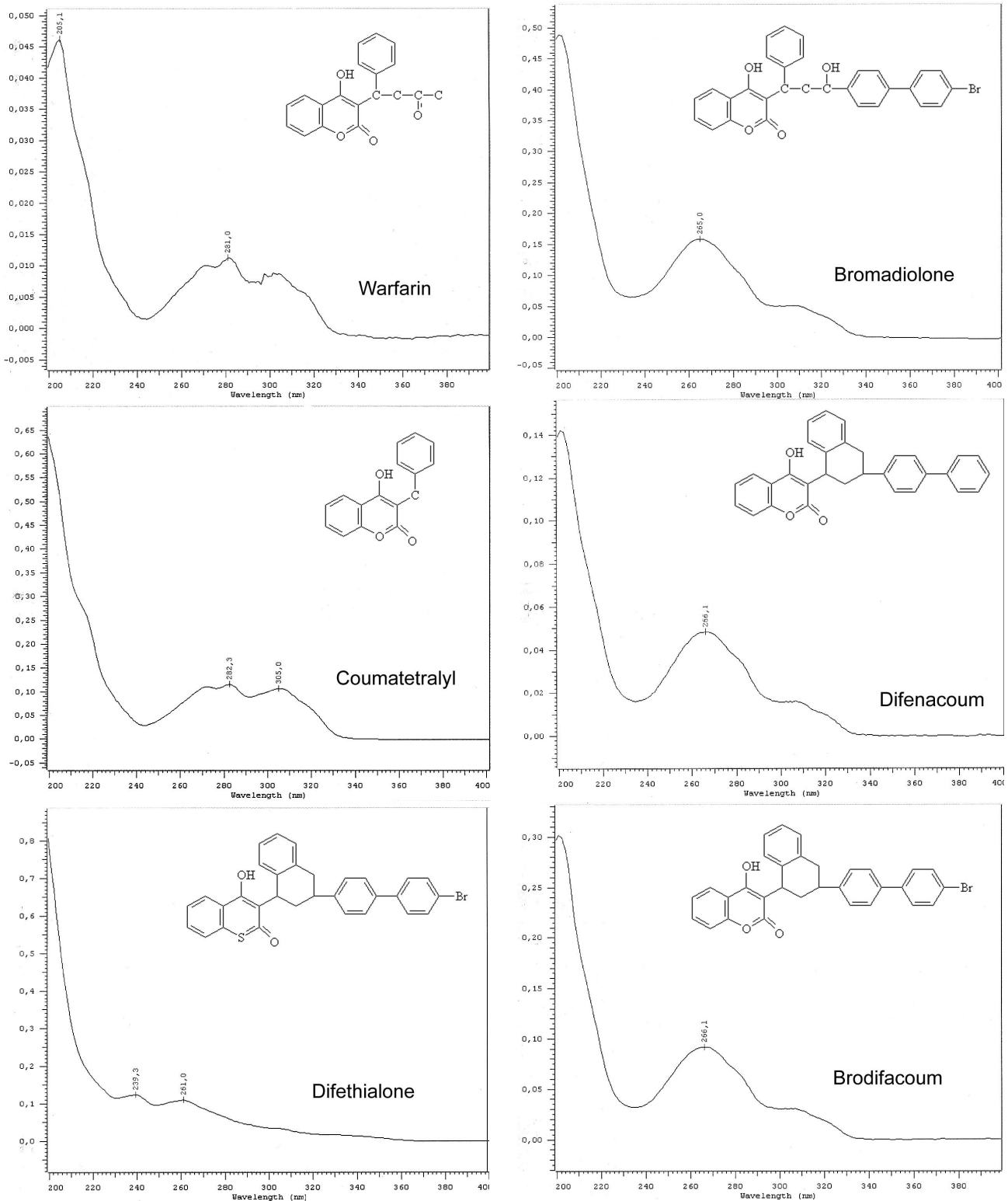


Fig. 2. UV spectra and chemical structures of analysed anticoagulant rodenticides.

min. The duration of the anticoagulant effect after a single dose of warfarin is usually 5–7 days. However, superwarfarin products may continue to produce

significant anticoagulation for weeks to months after a single ingestion.

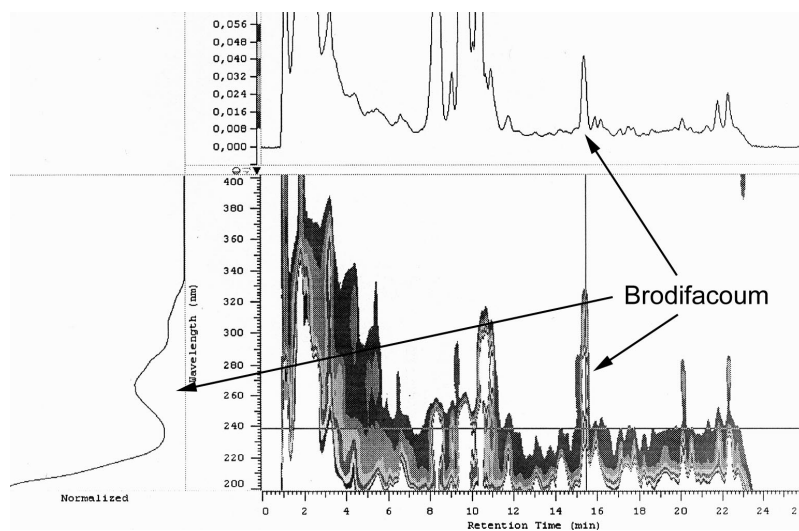


Fig. 3. Extracted reddish granules of preparation from sausages in which brodifacoum was found.

The toxic dose is highly variable. Generally, a single ingestion of warfarin (10–20 mg) does not cause serious intoxication. In contrast, chronic or repeated ingestion of even small amounts (2–5 mg/day) can eventually lead to significant anticoagulation. Superwarfarins are extremely potent and can produce prolonged effects even after ingestion of a small single dose. As little as 1 mg in an adult can cause coagulopathy. Bleeding is the only expected significant symptom in the subject's history. Serious poisoning manifests itself in bleeding at multiple organ sites. Physical evidence of bleeding after an acute ingestion can be seen for at least 24 hours. Peak effects are commonly delayed until at least 1–2 days post-ingestion [1]. Cases of serious poisoning are generally associated with serum concentrations greater than 5 g/ml [7], but for some derivatives (e.g. bromadiolone) toxicity appears at much lower concentrations, ranging from 0.04–0.44 g/ml [5].

The method described in this paper has turned out to be useful in the identification of anticoagulants in preparations that have been sent to the Institute as evidence materials. Usually these materials have been secured without the original packing, mixed with solid products (ground coffee, sugar) or liquids (soup, tea, drinking water), so it has not been possible to know (through macroscopic examination) what kind of rodenticide was present. Often sausages filled with granules of preparation have been sent for identification. Such materials were prepared for poisoning a dog.

5. Summary

The developed method can be used for simultaneous identification of six anticoagulants. The procedure is successfully being used in the Toxicological Analyses Section of the Institute of Forensic Research for the identification of active anticoagulant components in commercial rodenticide preparations and waters, drinks and foodstuffs (soups, sausages, ground coffee) to which a rodenticide has been added for criminal purposes. Although the method was not developed for biological materials, it has been successfully applied to analysis of stomach contents taken from animals (dogs, seals, spoonbills) suspected of having been poisoned by this group of compounds or stomach washings in emergency cases of severe poisoning.

References

1. Anderson I. B., Coumarin and related rodenticides, [in:] Poisoning and drug overdose, Olson K. R. [ed.], Appleton & Lang, Stamford 1994.
2. Chua I. D., Friedenber W. R., Superwarfarin poisoning, *Archives of Internal Medicine* 1998, 158, 1929–1932.
3. Felice L. J., Chalermchaikit T., Murphy M. J., Multi-component determination of 4-hydroxycoumarin anticoagulant rodenticides in blood serum by liquid chromatography with fluorescence detection, *Journal of Analytical Toxicology* 1991, 15, 126–129.
4. Felice L. J., Murphy M. H., The determination of the anticoagulant rodenticide brodifacoum in blood serum by liquid chromatography with fluorescence detection, *Journal of Analytical Toxicology* 1989, 13, 229–231.

5. Grobosch T., Angelow B., Schoenberg L. [et al.], Acute bromadiolone intoxication, *Journal of Analytical Toxicology* 2006, 30, 281–285.
6. Hunter K., Determination of coumarin anticoagulant rodenticide residues in animal tissues by high-performance liquid chromatography: Fluorescence detection using post-column techniques, *Journal of Chromatography* 1983, 270, 267–276.
7. Kała M., Pesticides, [in:] Clarke's analysis of drugs and poisons, Moffat A. T., Osselton M. D., Widdop B. [eds.], Pharmaceutical Press, London 2004.
8. Kujipers E. A. P., den Hartigh J., Savelkoul T. J. F. [et al.], A method for the simultaneous identification and quantification of five superwarfarin rodenticides in human serum, *Journal of Analytical Toxicology* 1995, 19, 557–562.
9. Lamiable D., Vistelle R., Trenque T. [et al.], Sensitive high-performance liquid chromatographic method for the determination of coumarin in plasma, *Journal of Chromatography* 1993, 620, 273–277.
10. Maurer H. H., Arlt J. W., Detection of 4-hydroxycoumarin anticoagulants and their metabolites in urine as part of a systematic toxicological analysis procedure for acidic drugs and poisons by gas-chromatography mass spectrometry after extractive methylation, *Journal of Chromatography B* 1998, 714, 181–195.
11. Merola V., Anticoagulant rodenticides: deadly for pests, dangerous for pets, *Veterinary Medicine* 2002, 10, 716–722.
12. Murphy M. J., Ray A. C., Bailey E. M., A high performance liquid chromatography method for the detection of brodifacoum in serum, *Veterinary and Human Toxicology* 1989, 31, 228–231.
13. O'Bryan S. M., Constable D. J. C., Quantification of brodifacoum in plasma and liver tissue by HPLC, *Journal of Analytical Toxicology* 1991, 15, 144–147.
14. Ray A. C., Murphy M. J., DuVall M. D. [et al.], Determination of brodifacoum and bromadiolone residues in rodent and canine liver, *American Journal of Veterinary Research* 1989, 50, 546–550.

Corresponding author

Piotr Adamowicz
Instytut Ekspertyz Sądowych
ul. Westerplatte 9
PL 31-033 Kraków
e-mail: padamowicz@ies.krakow.pl

PROSTA METODA IDENTYFIKACJI NAJBARDZIEJ POPULARNYCH RODENTOCYDÓW UŻYWANYCH W POLSCE Z ZASTOSOWANIEM WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ

1. Wstęp

Antykoagulanty są w Polsce używane jako ogólnodostępne i profesjonalne rodentocydy. Ich preparaty handlowe są proste w użyciu i łatwo dostępne. Najczęściej stosuje się je w tępieniu myszy oraz szczurów. Powszeczne zastosowanie rodentocydów spowodowało wzrost przypadkowych i umyślnych zatruc zwierząt i ludzi tymi środkami. Policja często zabezpiecza ich pozostałości na miejscu zdarzenia. Ślady te (handlowe preparaty oraz wody, napoje i artykuły żywnościowe, do których dodano pestycydy przypadkowo lub też w celach przestępczych) są nadsyłane do Instytutu Ekspertyz Sądowych w Krakowie jako materiał dowodowy. Identyfikacja składników czynnych w tych materiałach jest bardzo istotna dla dalszej analizy materiału biologicznego i może pomóc w stwierdzeniu, jakie środki zostały podane lub przyjęte. Czasem jednak nie jest to proste, ponieważ rodentocydy są sprzedawane jako zatrute ziarno, kostki (błoczki) i laseczki (pałeczki) woskowe, pudry, płynne koncentraty oraz granulaty, które zwykle wyglądają podobnie. Głównym problemem w oznaczeniu antykoagulantów jest ich niska zawartość w preparatach handlowych. Obecnie większość preparatów dostępnych w Polsce zawiera jeden (lub więcej) następujących składników czynnych: bromadiolon, brodifakum, difetialon, difenakum, warfarynę i kumatetralyl. Warfaryna i kumatetralyl są pierwszej generacji rodentocydami z grupy środków obniżających krzepliwość krwi (antykoagulantów) wprowadzonymi do obrotu w latach 40. i 50. dwudziestego stulecia. Gdy w ciągu następnych kilku dekad gryzonie uodporniły się na antykoagulanty pierwszej generacji, wyprodukowano rodentocydy z grupy antykoagulantów drugiej generacji (zwane superwarfarynami). Należą do nich: brodifakum, bromadiolon, difetialon i difenakum. Antykoagulanty drugiej generacji działają bardzo długo i ze znacznie większą efektywnością. Ich stężenia w preparatach wynoszą najczęściej 0,005% lub 0,0025%, podczas gdy preparaty zawierające rodentocydy pierwszej generacji zawierały najczęściej 0,025% substancji czynnej. Wynika to z faktu, że superwarfaryny charakteryzują się sto razy silniejszym działaniem niż warfaryna [9].

Opisano już wiele technik wykrywania pochodnych kumaryny. Początkowo stosowano konwencjonalne metody chromatografii cienkowarstwowej, ale tego typu metody wymagają dużej objętości próbki i często charakteryzują się niezadowalającą czułością. Większość

procedur oznaczania rodentocydów z grupy antykoagulantów jest oparta na technice HPLC [3, 4, 6, 9]. Wielu autorów opracowało metody analizy hydroksykumarynowych antykoagulantów w materiałach biologicznych (krew, surowica, osocze, mocz, wycinki narządów wewnętrznych). Autorzy ci stosowali metodę HPLC z detekcją spektrofotometryczną (UV) lub fluoroscencyjną (FL). Stosowano kolumny C8 i C18 w odwróconym układzie faz. Ponieważ większość kumarynowych pochodnych charakteryzuje się naturalną zdolnością do fluorescencji, to granice wykrywalności dla antykoagulantów analizowanych w surowicy metodą HPLC-FL wynosiły od kilku do kilkudziesięciu nanogramów na mililitr. Wartości te były około kilkanaście razy niższe niż przy detekcji UV [3, 8]. Niektórzy badacze uważają, że używanie detekcji FL do wykrywania kumarynowców metodą HPLC jest ograniczone przez konieczność stosowania kwaśnej fazy ruchomej. Zalecają oni stosowanie techniki zmiany pH po wyjściu z kolumny w celu zwiększenia pH [8]. Opisano również procedurę wykorzystującą technikę chromatografii gazowej połączonej ze spektrometrią mas (GC-MS). Zapewnia ona odpowiednią czułość, ale jest bardziej skomplikowana i wymaga zastosowania procesu derywatywacji. Metoda ta została opracowana jako część procedury stosowanej do systematycznej analizy toksykologicznej dla leków i trucizn o charakterze kwaśnym po przeprowadzeniu ich w metylowe pochodne podczas ekstrakcji. Zastosowanie metody MS pozwala na wykrywanie nie tylko 4-hydroksykumarynowych antykoagulantów, ale również ich hydroksymetabolitów [10].

Bardzo łatwa i efektywna wydaje się metoda wykorzystująca technikę chromatografii cieczowej połączonej ze spektrometrią mas z jonizacją przez elektrorozpylanie (LC-ESI-MS) [5]. W literaturze przedmiotu opisano również wiele technik ekstrakcji. Antykoagulanty były ekstrahowane z naturalnego [4], kwaśnego [5] i zasadowego [9] środowiska. Używano różnych rozpuszczalników (np. eter dietylowy [12], heksan [9], acetonitryl [3]) lub ich mieszanin (np. acetonitryl-eter etylowy [4, 12, 13]). W niektórych metodach stosowane jest strącanie białek surowicy przez dodanie acetonitrylu [3]. Kolumny SPE (z fazą diolową) były również używane w celu oczyszczania ekstraktów z moczu zawierających hydroksykumarynowe antykoagulanty [10]. Wydajności ekstrakcji wahały się w granicach od 55% do 131% [3, 8].

Metoda HPLC wydaje się najodpowiedniejsza do prostego i szybkiego wykrywania i identyfikacji anty-

koagulantów w preparatach przeciwko gryzoniom i innych niebiologicznych próbkach. Dlatego też celem tej pracy było opracowanie takiej metody.

2. Materiały i metody

2.1. Odczynniki

Preparaty zawierające rodentycydy: Rat Killer Super – bromadiolon; Rat Killer Perfect – brodifakum; Baraki Granulat – difetialon; Murin Dife (pasta) – difenakum; Toxan pylisty – kumatetralyl; Mice Killer – warfarynę zostały zakupione w sklepie. Wzorec bromadiolonu otrzymano z firmy Riedel-de Haën. Warfaryna pochodziła z firmy Aldrich. Wszystkie pozostałe używane odczynniki były czystości analitycznej albo do HPLC.

2.2. Przygotowanie próbki

Próbkę rodentycydu (2 g) rozdrobniono, umieszczano w buteleczce i rozpuszczano w 4 ml wody demineralizowanej. Następnie dodano 0,5 ml buforu octanowego (pH 5,5) i 6 ml mieszaniny chloroform-aceton (1:1, v/v). Całość mieszano przez 10 min, a następnie wirowano przy 6000 obr/min przez 3 min. 5 ml fazy organicznej przenoszono do czystej buteleczki i odparowano do sucha w bloku grzewczym w temperaturze 50°C w strumieniu azotu. Suchą pozostałość rozpuszczono w 200 ml fazy ruchomej acetonitryl-woda (1:1, v/v).

2.3. Analiza HPLC-DAD

Próbki były analizowane metodą HPLC. Identyfikację składników prowadzono przy zastosowaniu chromatografu cieczowego LaChrom D-7000 Merck-Hitachi z detektorem szeregu diod (DAD) L-7455. Rozdział uzyskano na kolumnie LiChroCART (125 × 4 mm) z wypełnieniem LiChrospher RP Select B (Merck) utrzymywanej w temperaturze 25°C. Faza ruchoma składała się z mieszaniny acetonitrylu (AcCN) i 0,01% (v/v) kwasu fosforowego w wodzie. Przepływ fazy wynosił 1 ml/min. Wszystkie analizy prowadzono w trybie gradientu składu fazy: 0 min – 40% AcCN, 20 min – 80% AcCN, 21 min – 40% AcCN, 26 min – 40% AcCN. Widmo spektrofotometryczne rejestrowano w zakresie 200–400 nm. 20 µl próbki było nastrzykiwane przy zastosowaniu automatycznego podajnika próbek. Identyfikację prowadzono na podstawie czasu retencji oraz widma UV, które porównywano z takimi samymi wartościami odpowiednich wzorców.

3. Historie przypadków sądowych

Przypadek 1: kobieta znalazła obce granulki w zmielonej kawie. Podejrzała swojego męża o zatrucie kawy. 5 g czerwonych granulek zostało wyodrębnionych z 85 g kawy. W granulkach zidentyfikowano bromadiolon.

Przypadek 2: właściciel zauważył, że jego pies zachowuje się nieswojo. Trzy plasterki kiełbasy (około 200 g) znaleziono w ogrodzie. Kiełbasę przekazano do badań. Makroskopowa analiza ujawniła czerwone granulki w każdym kawałku kiełbasy. W granulkach zidentyfikowano brodifakum.

Przypadek 3: na farmie drobiu zauważono, że woda przeznaczona do pojenia drobiu była barwy różowej. 0,5 l wody przesłano do analizy. Stwierdzono, że woda jest zanieczyszczona difetialonem.

4. Wyniki i dyskusja

Rodentycydy z grupy antykoagulantów są obecnie prawdopodobnie najczęściej stosowanymi rodentycydami w Polsce. Ta grupa pestycydów jest łatwo dostępna i odgrywa znaczącą rolę w klinicznej i sądowej toksykologii, ponieważ środki te są często używane przy dokonywaniu samobójstw, zabójstw oraz stanowią przyczynę przypadkowych zatruc. Analiza trutek przeciwko gryzoniom może sprawiać kłopoty ze względu na niską zawartość składników aktywnych w tych produktach (dla superwarfaryn zakres ten wynosi od 0,005% do 0,0025%). Opracowana procedura oznaczania i identyfikacji hydroksykumarynowych pochodnych nie jest skomplikowana i może być stosowana w każdym laboratorium.

Metoda ta oparta została na ekstrakcji cieczy-ciecz ze środowiska kwaśnego (pH 5,5). Zastosowanie do ekstrakcji mieszaniny chloroformu z acetonem zapewniło wystarczające wydajności ekstrakcji. Fakt, że rodentycydy z grupy związków obniżających krzepliwość krwi są bardzo dobrze rozpuszczalne w acetonie powoduje, że jest on rozpuszczalnikiem najczęściej stosowanym w mieszaninach ekstrakcyjnych (np. chloroform-aceton [6, 8, 14]). Zastosowanie zimnego i gorącego metanolu do ekstrakcji nie dało zadowalających wyników.

Opisana metoda HPLC-DAD zapewnia rozdział wszystkich antykoagulantów pomiędzy sobą oraz od głównych składników matrycy (nośników) (rycina 1). Antykoagulanty zostały rozdzielone do pojedynczych symetrycznych pików. Identyfikacja sześciu analizowanych składników była łatwa na podstawie czasu retencji i widma UV. Bromadiolon, brodifakum i difenakum charakteryzują się podobnymi widmami UV, ale różnymi czasami retencji. Czasy retencji zamieszczono w tabeli I. Chromatogram HPLC-DAD ekstraktu z materiału dowodowego zabezpieczonego w jednym z przypadków przedstawiono na rysunku 3.

Rodentocydy obniżające krzepliwość krwi są niejednorodną grupą związków, które wykazują różną toksyczność dla ludzi i gryzoni. Są one najbardziej toksycznymi substancjami znajdującymi się w legalnie domach. Technicznie można je podzielić na dwa rodzaje: hydroksykumarynowe pochodne, na które składają się warfaryna, difenakum, bromadiolon i brodifakum, podczas gdy pochodne indandionowe obejmują szeroki zakres związków łącznie z difacinonem, pindonem i chlorfacinonem. Toksyczność rodentocydów obniżających krzepliwość krwi zależy wyłącznie od powtarzanej ekspozycji na stosunkowo małe dawki. Jest to regułą zarówno dla gryzoni, jak i ludzi.

Działanie antykoagulantów polega na hamowaniu wytwarzania aktywnej formy witaminy K1 poprzez inhibicję enzymu reduktazy witaminy K1. Witamina K jest potrzebna jako kofaktor aktywacji czynników krzepliwości II, VII, IX i X. Kiedy witamina K nie może być regenerowana, czynniki krzepliwości nie mogą być aktywowane, co powoduje koagulopatię. Prowadzi to do niekontrolowanego krwotoku i śmierci [2].

Dostępność biologiczna warfaryny i superwarfaryny po doustnym przyjęciu jest bliska 100%. Warfaryna jest w wysokim stopniu (około 97%) wiązana z białkami osocza, głównie albuminami. Obniżenie krzepliwości krwi utrzymuje się zwykle przez 5–7 dni po jednorazowej dawce warfaryny. Jednakże produkty zawierające superwarfaryny mogą powodować znaczną antykoagulację przez tydzień, a nawet miesiąc po jednorazowym przyjęciu.

Dawki toksyczne są wysoce zróżnicowane. Z reguły jednorazowe przyjęcie warfaryny (10–20 mg) nie powoduje poważnego zatrucia. Z kolei długotrwałe lub powtarzane przyjmowanie nawet małych dawek (2–5 mg/dzień) może powodować znaczącą antykoagulację. Superwarfaryny są związkami silnie działającymi i mogą wywołać długotrwałe efekty nawet po przyjęciu jednorazowej małej dawki. Nawet 1 mg może powodować koagulopatię u dorosłych. Krwawienie jest jedynym istotnym objawem. Przy ciężkim zatruciu występuje krwawienie wielonarządowe. Fizyczne objawy krwawienia po ostrym zatruciu mogą być widoczne przez przynajmniej 24 godziny. Wystąpienie najgroźniejszych objawów jest zwykle opóźnione do co najmniej 1–2 dni po przyjęciu [1]. Przypadkom ciężkich zatruc towarzyszy zazwyczaj stężenie substancji toksycznej w surowicy wyższe niż 5 g/ml [7], ale dla niektórych pochodnych (np. bromadiolonu) toksyczne efekty pojawiają się przy znacznie niższych stężeniach mieszczących się w zakresie 0,04–0,44 g/ml [5].

Opisana metoda okazała się użyteczna w identyfikacji antykoagulantów w preparatach, które były nadesłane do Instytutu Ekspertyz Sądowych jako materiał dowodowy. Materiały te były przeważnie zabezpieczane bez oryginalnych opakowań, wymieszane z ciałami stałymi (zmie-

lona kawa, cukier) lub płynami (zupa, herbata, woda do picia). Nie było więc możliwości makroskopowego rozpoznania, jaki rodzaj rodentocydu stanowił materiał dowodowy. Często jako materiał dowodowy nadsyłano kiełbasę nafaszerowaną granulkami. Tak spreparowana żywność była przygotowywana w celu otrucia psów.

5. Podsumowanie

Opracowana metoda może być stosowana do jednoczesnej identyfikacji sześciu antykoagulantów. Procedura jest z powodzeniem stosowana w Pracowni Analiz Toksykologicznych Instytutu Ekspertyz Sądowych do identyfikacji składników czynnych w preparatach handlowych oraz wodach, napojach i żywności (zupach, kiełbasie, zmielonej kawie), do których rodentocydy zostały dodane w celach przestępczych. Chociaż metoda nie została opracowana do identyfikacji składników czynnych tych preparatów w materiałach biologicznych, z powodzeniem była zastosowana do analizy zawartości żołądków pobranych od zwierząt (psów, fok, warzęch), w stosunku do których istniało podejrzenie, że zostały otrute tą grupą związków lub popłuczyn żołądka osób w nagłych przypadkach ostrych zatruc.