



LC-MS AND LC-MS/MS DETERMINATION OF SIX ANTICOAGULANT RODENTICIDES IN BLOOD

Piotr ADAMOWICZ, Maria KAŁA

Institute of Forensic Research, Krakow, Poland

Abstract

Sensitive and reliable liquid chromatographic-mass spectrometric methods (LC-MS and LC-MS/MS) were developed for the determination of anticoagulants in whole blood. Six coumarin derivative anticoagulant rodenticides – bromadiolone, brodifacoum, difethialone, difenacoum, warfarin, and coumatetralyl – can be detected, identified and quantified simultaneously with this method. The method involves a weak acid (pH 5.5) liquid-liquid extraction with a mixture of chloroform-acetone. It allows separation of anticoagulants from each other and from major background compounds. Selected ion recording (SIR) and multiple-reaction monitoring (MRM) were used for the monitoring of negative ions for the detection of analysed compounds. Nimesulide was used as an internal standard (IS). The method is specific for analysis of post-mortem blood samples and blood samples taken from living persons suspected of having been poisoned by these compounds.

Key words

Anticoagulant rodenticides; Analysis; LC-MS.

Received 19 February 2009; accepted 4 March 2009

1. Introduction

Rodenticides containing compounds that reduce blood clotting called anticoagulants are widely used by both individual customers and specialist companies carrying out pest control. The general availability of commercial preparations has caused an increase in accidental and intentional poisonings of humans and animals by these agents [3]. Rodenticides which reduce blood clotting are a heterogeneous group of compounds that exhibit different toxicity in humans and rodents. Their toxicity is most dependent on repeated exposure to even small doses. When introduced into the bodies of humans and animals, they inhibit the generation of an active form of vitamin K, which leads to haemorrhaging. Larger doses or repeated exposures cause multiorgan haemorrhage and consequently death.

Today, most of the commercial rodenticides available in Poland contain one or more active compounds that are antagonists of vitamin K. Multicomponent preparations have more effective action; therefore, many manufacturers have introduced such formulations onto the market. In Germany, rodent baits containing mixtures of coumatetralyl and cholecalciferol or difethialone and sulfaquinoxaline and also 24 different registered preparations containing bromadiolone as the single active ingredient [6] are freely available on the market. The active compounds which are most frequently present in preparations alone or in a mixture are: bromadiolone, brodifacoum, difethialone, difenacoum, warfarin and coumatetralyl (Figure 1).

Warfarin and coumatetralyl are considered first-generation rodenticides. They were first released onto the market in the 1940s and 1950s. Bromadiolone, brodifacoum, difethialone and difenacoum are refer-

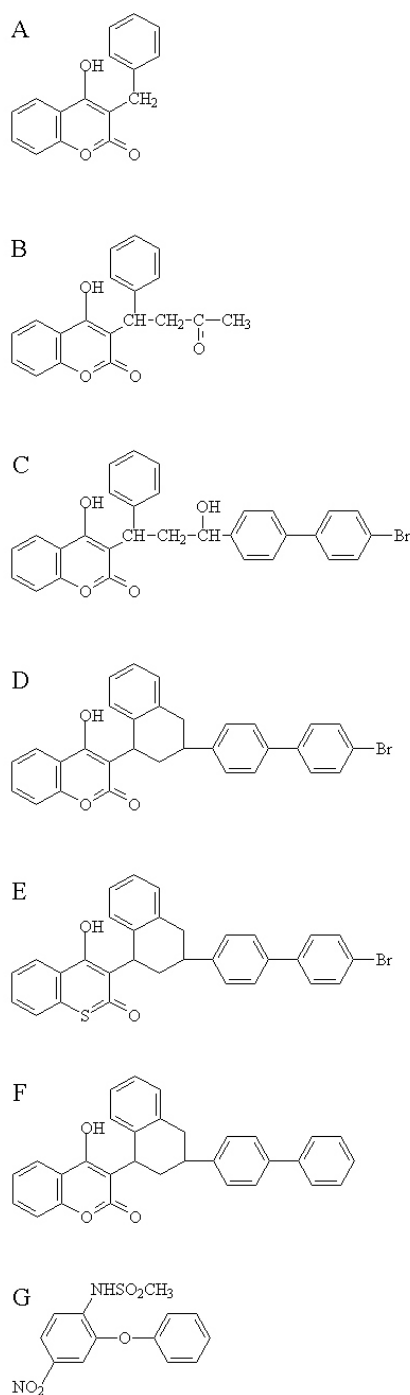


Figure 1. Chemical structures of analysed compounds. A – coumatetralyl; B – warfarin; C – bromadiolone; D – brodifacoum; E – difethialone; F – difenacoum, G – nimesulide (IS).

red to as superwarfarins or second-generation anticoagulants. They act longer and with much greater efficiency. Their concentrations in the preparations are

from 0.0025% to 0.005%, so from 5 to 10 times lower than the concentrations of the active components of the first-generation rodenticides. Some researchers believe that superwarfarins have a hundred times stronger activity than warfarin [12] and can cause health disorders even after a single dose.

The widespread application of these preparations, resulting in an increase in the number of poisonings or suspicions for poisonings by rodenticides, as well as low doses of active ingredients leading to their occurrence in biological material also at very low concentrations, has created a need to use very sensitive analytical methods for their detection in biological material.

In our laboratory, we often deal with samples of various materials that are suspected to contain anticoagulants. These are non-biological materials in the form of residues of commercial preparations (received without the original packaging) and also food products (including samples of drinking water, tea, coffee, sugar, soup), to which addition of these compounds for criminal purposes is suspected. Biological material such as body fluids (blood and/or urine samples) collected from living persons is submitted for diagnostic and judicial purposes, whilst post-mortem material collected during autopsies of humans and animals (dogs, seals, spoonbills) constitutes the basis for confirmation or exclusion of poisoning [1].

The possibility of occurrence of symptoms of poisoning by superwarfarins with a delay of 1–2 days and the rate of elimination of these compounds from living organisms are additional reasons for using highly sensitive, specific and selective methods for their detection and quantitation. These requirements are met only by modern technologies, of which the hyphenated techniques are the best.

Thin-layer chromatography (TLC) techniques are considered to be sufficiently effective for the analysis of commercial preparations. Until recently, most methods for the determination of anticoagulants were based on high-performance liquid chromatography (HPLC) techniques [4, 5, 8, 12]. HPLC methods with spectrophotometric (UV) or fluorescent (FL) detection for analysis of samples of blood, serum, plasma, urine and tissues were developed. Reversed-phase C8 and C18 columns were used. Since most coumarin derivatives 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 a dozen times lower than with UV detection [4, 11].

Techniques using gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS), especially after application of the derivatisation process are satisfactorily

effective methods for determining rodenticides from the group of anticoagulants. This technique allows the determination of active substances and their metabolites [13].

In recent times, screening methods using techniques of liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS), with different types of ionization, especially by electrospray (ESI) and atmospheric pressure chemical ionization (APCI) have been developed. Grobosh et al. [6] developed an LC-ESI-MS method for simultaneous identification of 10 anticoagulants in serum, including 5 rodenticides from the group of superwarfarins (brodifacoum, bromadiolone, difenacoum, difethialone and flocumafen) and 5 other vitamin K antagonists (acenocumarol, coumatetralyl, coumachlor, fenprocoumon and warfarin). Jin et al. [9], on the other hand, described a tandem mass spectrometry LC-MS/MS method for the determination of rodenticides in different biological materials. Methods with MS/MS detection in multiple reaction monitoring (MRM) mode appear to be the best for screening analyses for the presence of pesticides from different groups [7].

Different extraction techniques are described in the literature. Anticoagulants have been extracted from the original [4], acidic [6] and basic [12] media by a liquid-liquid (LLE) technique. Different individual solvents, e.g. diethyl ether [14], hexane [12], acetonitrile [4], or their mixtures, e.g. acetonitrile with ethyl ether [5, 14, 15], have been used. Some of the methods involve a protein precipitation step of the serum by addition of acetonitrile [4]. Solid phase extraction (SPE) columns, particularly with a diol phase, have also been used for cleaning extracts obtained by the LLE technique from urine containing hydroxycoumarin anticoagulants [13]. Recoveries averaged from 55% to 131%, which in some cases can not be explained [4, 11].

The purpose of this study was to develop a sensitive method for the detection in biological material of active ingredients of common superwarfarins in Poland. To this end, LC-MS and LC-MS/MS techniques were selected, because of their sensitivity and specificity.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Standards: warfarin, coumatetralyl, bromadiolone and brodifacoum were obtained from Riedel-de Haën (Seelze, Germany), difethialone and difenacoum were from Dr Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany),

and nimesulide, used as an internal standard, was bought from LGC GmbH (Luckenwalde, Germany). Chloroform and acetone were purchased in Lach-Ner s.r.o. (Neratovice, Czech Republic). Acetate buffer was prepared from anhydrous sodium acetate that was obtained from Polskie Odczynniki Chemiczne S.A. (Gliwice, Poland) and acetic acid from Odczynniki Sp. z o.o. (Lublin, Poland). Acetonitrile (AcCN) and formic acid 98–100% were bought from Merck (Darmstadt, Germany). Distilled water was purchased from Baker (Deventer, The Netherlands). Control blood samples, free from analytes, used for the development and validation of methods were obtained from a blood donation centre.

2.2. Extraction

Nimesulide (IS) solution was added to 1 ml of blood in a 20 ml vial, achieving a concentration of 500 ng/ml of blood. Next, 1 ml of acetate buffer (pH 5.5) and 6 ml of chloroform-acetone (1:1, v/v) mix were added. The sample was shaken for 20 minutes, followed by centrifugation at 6000 g for 5 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 100 μ l of mobile phase consisting of AcCN and distilled water (1:1, v/v) with addition of 1 ml formic acid for each litre of mobile phase, and transferred into inserts for autosampler vials. An aliquot of 20 μ l was injected on a column using the autosampler.

2.3. LC parameters

Analysis was carried out using a Waters 2695 Alliance liquid chromatograph connected to a Quattro Micro Micromass mass spectrometer. Separation was performed on a LiChroCART (125 \times 3 mm) column filled with Purospher RP-18e (Merck) which was thermostated at 25°C. The mobile phase was composed of a mixture of 0.1% (v/v) formic acid in AcCN and water. The flow rate was 0.8 ml/min. All analyses were carried out in gradient mode (shown in relation to content of AcCN): 0 min – 10%, 10 min – 100%, 15 min – 100%, 16 min – 10%, 20 min – 10%. Total analysis time was 20 min. Retention times of analysed compounds are presented in Table I.

2.4. MS and MS/MS parameters

Using MS, samples were analysed in negative electrospray ionisation ESI(–) mode. Parameters of the mass detector, which was recording negative ions, were as follows: capillary voltage – 3 kV, extractor

voltage – 2 V, alternating voltage with radio frequency (RF) – 0.1 V, multiplier voltage – 650 V, source temperature – 100°C, desolvation gas flow (nitrogen) – 540 l/h, desolvation gas temperature – 300°C. Dwell and delay times were 0.2 and 0.05 s, respectively.

In the MS/MS method, high purity argon was used as a collision gas at a pressure of 2.0–2.2 10^{-4} torr. In the MRM method, optimal voltages in the collision zone (henceforth referred to as fragmentor voltage) oscillated in the range of 40–80 V for respective compounds. Maintenance of the apparatus and analysis of the obtained results were carried out using MassLynx software version V4.0 by Waters.

TABLE I. RETENTION TIMES OF 6 RODENTICIDES AND INTERNAL STANDARD

Compound	Retention time [min]	Relative retention time
Warfarin	7.21	0.99
Nimesulide-IS	7.28	1.00
Coumatetralyl	7.90	1.08
Bromadiolone	9.27	1.27
Difenacoum	10.22	1.40
Brodifacoum	10.80	1.48
Difethialone	11.50	1.58

3. Results and discussion

Anticoagulant rodenticides, because of their widespread use, play an important role in clinical and forensic toxicology as a cause of many suicidal, homicidal and accidental poisonings. The toxicity of first generation rodenticides causing reduced blood clotting depends primarily on repeated exposure, even to relatively small doses, while compounds from the second-generation exhibit toxic action after a single dose.

The oral bioavailability of warfarin (first-generation) and superwarfarins (second-generation) is nearly 100%. Warfarin is highly bound (approximately 97%) to plasma protein, mainly albumin. Reduction of blood clotting after a single dose of warfarin usually lasts for 5–7 days; however, this period may extend to weeks or even months.

The toxic doses are highly variable. Generally, a single ingestion of warfarin (at a dose of 10–20 mg) does not cause serious intoxication. In contrast, chronic or repeated ingestion of even smaller amounts (2–5 mg/day) can cause 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 significant symptom. In severe poisoning multiorgan haemorrhaging occurs. Physical evidence of bleeding after an acute poisoning can be seen for at least 24 hours. Peak effects are commonly delayed until at least 1–2 days post-ingestion [2].

Cases of serious poisonings are generally associated with serum concentrations of superwarfarins higher than 5 $\mu\text{g/ml}$ [10], but for some derivatives, e.g. bromadiolone, toxicity appears at much lower concentrations. There are also cases of acute rodenticides poisonings in humans with full recovery, despite ascertainment of high concentrations (expressed in ng/ml) of these compounds in serum, e.g. brodifacoum – 630, 710 and 731, difenacoum – 600 and 970, bromadiolone 40 and 440 [6]. Ingestion of brodifacoum, in the form of 0.005% preparation caused death, with distribution in particular tissues: in blood from the heart ventricles – 2240 ng/ml , in blood from the femoral vein – 3919 ng/ml , in the bile – 4276 ng/ml , in liver – 50 ng/ml , in the spleen – 34 ng/ml and in the lungs 31 ng/ml [16]. The reported concentrations indicate that methods for the determination of superwarfarins in biological materials should be characterized by a high sensitivity and wide range of linearity.

Combined (extraction and detection) methods that have been developed for the simultaneous detection and quantitation of 6 superwarfarins are based on LLE and analysis by LC-MS and LC-MS/MS techniques. Application of chloroform-acetone as an extraction mixture, from a weak acid (pH 5.5) medium, provided reproducible recoveries within the range from 65% to 81%. Good solubility of superwarfarins in acetone means that it is an extraction agent of choice, but unfortunately it is used in combination with toxic chloroform [8, 11, 17].

Deuterated derivatives of superwarfarins are not commercially available. In the present studies, nimesulide was used as an IS. Difficulties with selection of IS resulted from the fact that few compounds undergo negative ionisation providing sufficiently intensive and reproducible analytical signals. Many other more popular compounds were eliminated during optimisation of fragmentation, and satisfactory analytical signals were obtained for paracetamol and furosemide. In turn, these compounds are very popular drugs, making it highly probable for them to be present in the bodies of intoxicated patients or persons suspected of being poisoned by rodenticides, especially during hospitalisation of poisoned patients, when ad-

TABLE II. DATA FOR MS AND MS/MS DETECTION. IONS (m/z) USED FOR QUANTIFICATION IN BOLD

Compound	MS		MS/MS		
	Ion [m/z]	Cone voltage [V]	Transition [m/z m/z]	Cone voltage [V]	Collision energy [eV]
Warfarin	307 , 161, 250	60	307 250 307 161	60	20
Nimesulide-IS	229	31	229 229	31	2
Coumatetralyl	292 , 291	60	291 141 291 247	40	30
Bromadiolone	525 , 527	60	527 250 525 250	80	40
Difenacoum	443 , 444	60	443 135 443 293	60	60
Brodifacoum	523 , 521	60	523 523 521 521	80	2
Difethialone	539 , 537	60	539 540 537 537	60	2

ministration of furosemide as a medicine enforcing diuresis is very common. A literature review shows that the most frequently used internal standards up till now have been coumarin derivatives. Warfarin has been used for the determination of bromadiolone [9], and 7-acetoxy-6-(2,3-dibromopropyl)-4,8-dimethylcoumarin was used in a screening method for 10 anticoagulants [6] and in a method for simultaneous determination of 8 rodenticides from this group [18].

LC-MS/MS and LC-MS techniques were used for the analysis of the anticoagulants covered by the surveys. Detection parameters of 6 compounds, i.e. bromadiolone, brodifacoum, difethialone, difenacoum, warfarin and coumatetralyl were optimised. Satisfactory intensities of analytical signals for analysed compounds, with the exception of difethialone, were obtained using ESI(-) with selected ions monitoring, including parent and daughter ions. The following parameters were taken into account during the optimisation of fragmentation: fragmentor voltage, energy of ions undergoing collision (henceforth referred to as collision energy), and the time of registration of ion and delay of registration of subsequent ions. Negative ions were produced in the selected ion monitoring (SIR) method, from which the two most intensive for each compound were selected. Monitored ions, transitions, fragmentor voltages and collision energies are presented in Table II.

9 point calibration curves (0, 10, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 5000 ng/ml) were prepared. The values of

the linear regression coefficients of the calibration curves (with number of replicates $n = 4$) were not lower than 0.971. The limits of detection (*LOD*) determined by $S/N = 3$ for the MS method ranged from 3 (for coumatetralyl) to 60 ng/ml (for difethialone), and for the MS/MS method ranged also from 3 for coumatetralyl to 84 ng/ml for difethialone. The limits of quantification (*LOQ*) (at $S/N > 10$, expressed in ng/ml) varied within the limits of 10–200 and 10–280, for MS and MS/MS respectively. Both methods were linear from *LOQ* of each analyte up to 5 g/ml.

The accuracy of both methods, i.e. within-day precision (intragroup variability), was calculated on the basis of three repetitions of analyses of anticoagulants in control blood samples spiked with tested compounds to a concentration of 100 and 500 ng/ml for each method. Between-day precision (intergroup variability) was calculated on the basis of the results obtained for a period of 2 weeks from six measuring series. Both within-day and between-day precision were less than 15% *RSD*. Recoveries averaged from 65% (for warfarin) to 81% (for brodifacoum). The worked out validation parameters of the method are summarised in Table III.

The specificity of the method was checked using ten different blood samples free from analytes collected from living persons (from blood bank) and taken during autopsy. No interfering peaks eluting from the column with retention times compatible with

TABLE III. VALIDATION DATA OF SIX ANTICOAGULANTS FOR LC-MS AND LC-MS/MS METHODS

Compound	Extraction recovery [%]	Precision* RSD [%]		MS [ng/ml]		MS/MS [ng/ml]	
		between day	within day	LOD		LOQ	
				(3 S/N)	(10 S/N)	(3 S/N)	(10 S/N)
Warfarin	65	3.6	2.8	5	15	50	150
Coumatetralyl	74	13.6	8.4	3	10	3	10
Bromadiolone	79	7.8	6.7	15	50	60	200
Difenacoum	76	14.9	13.3	18	60	9	30
Brodifacoum	81	14.2	5.3	18	60	5	15
Difethialone	76	11.8	8.6	60	200	84	280

*precision data obtained for: $n = 6$, $c = 500$ ng/ml

the analytes were observed on the obtained chromatograms.

Analytes in dissolved extracts were stable for more than 24 hours during storage at room temperature or 10 days during storage at a temperature of -4°C .

Chromatograms of selected ions (SIR) from the LC-MS method and monitored transitions (MRM) from the LC-MS/MS MRM method for anticoagulants in the blood sample extract, with the addition of analytes to a concentration of 100–400 ng/ml, are shown in Figures 2 and 3.

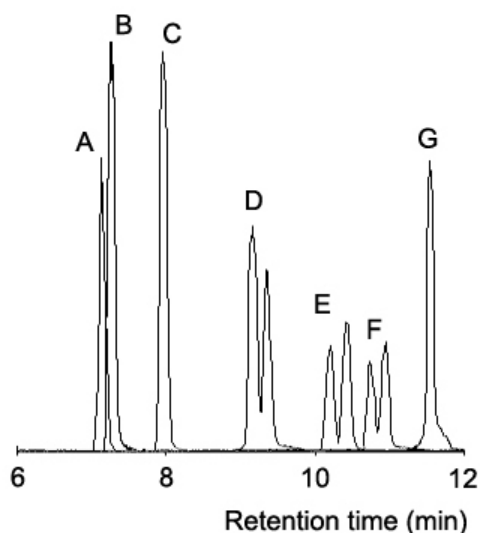


Figure 2. LC-MS chromatogram (mass detector operated in ESI (-) and SIR modes, column Purospher RP-18e). The extract of control blood spiked at the following concentrations (g/l) with: 100 of warfarin (A); 500 of nimesulide (IS) (B); 100 of coumatetralyl (C); 200 of bromadiolone (D); difenacoum (E) and brodifacoum (F); 400 of difethialone (G). Some substances used for method development were mixtures of diastereoisomers, causing the separation of peaks.

From a comparison of LOQ values and intensity of analytical signals, it can be concluded that: both methods are equally sensitive for coumatetralyl, lower concentrations of warfarin and bromadiolone can be de-

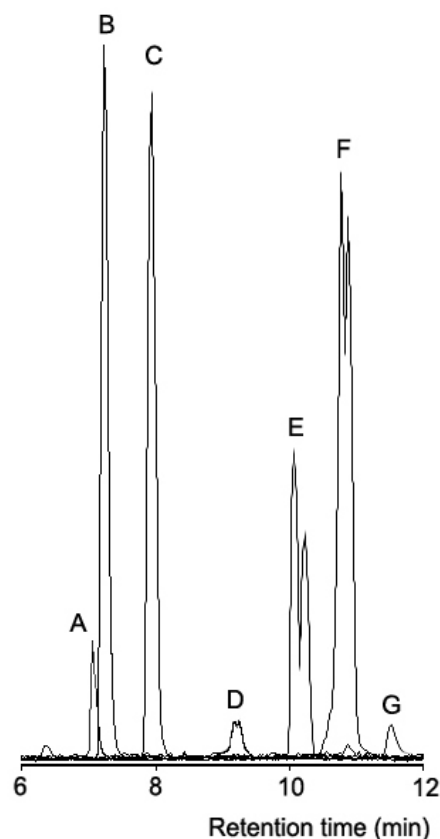


Figure 3. LC-MS/MS chromatogram (mass detector operated in ESI (-) and MRM modes, column Purospher RP-18e). The extract of control blood spiked at the following concentrations (g/l) with: 400 of warfarin (A); 500 of nimesulide (IS) (B); 100 of coumatetralyl (C); 200 of bromadiolone (D); difenacoum (E) and brodifacoum (F); 400 of difethialone (G).

terminated using the MS method, and the MS/MS method is 2 and 4 times more sensitive for difenacoum and brodifacoum, respectively.

4. Summary

Two methods for the simultaneous detection and determination of 6 rodenticides in 1 ml blood samples were developed. Separation of analytes, after a simple liquid-liquid extraction, was carried out using liquid chromatography, and single stage and tandem MS were used for detection with selected ion recording and multiple reaction monitoring of negative ions.

The method proved to be specific for analysis of blood samples collected from living persons and during autopsy.

References:

1. Adamowicz P., Kała M., Simple HPLC method for the identification of the most popular rodenticides used in Poland, *Problems of Forensic Sciences* 2005, 64, 373–381.
2. Anderson I. B., Coumarin and related rodenticides [in:] Poisoning and drug overdose, Olson K. R. [ed.], Appleton & Lang, Stamford 1994.
3. Chua I. D., Friedenber W. R., Superwarfarin poisoning, *Archives of Internal Medicine* 1998, 158, 1929–1932.
4. Felice L. J., Chalermchaikit T., Murphy M. J., Multi-component determination of 4-hydroxicoumarin anticoagulant rodenticides in blood serum by liquid chromatography with fluorescence detection, *Journal of Analytical Toxicology* 1991, 15, 126–129.
5. 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.
6. Grobosch T., Angelow B., Schoenberg L. [et al.], Acute bromadiolone intoxication, *Journal of Analytical Toxicology* 2006, 30, 281–285.
7. Guo-Fang P., Yan-Zhong C., Jin-Jie Z. [et al.], Validation study on 660 pesticide residues in animal tissues by gel permeation chromatography cleanup/gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* 2006, 1125, 1–30.
8. 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.
9. Jin M. C., Ren Y. P., Xu X. M. [et al.], Determination of bromadiolone in whole blood by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Forensic Science International*, 2007, 171, 52–56.
10. Kała M., Pesticides [in:] Clarke's analysis of drugs and poisons, Moffat A. T., Osselton M. D., Widdop B. [eds.], Pharmaceutical Press, London 2004.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. Palmer R. B., Alakija P., de Baca J. E. [et al.], Fatal brodifacoum rodenticide poisoning: autopsy and toxicologic findings, *Journal of Forensic Sciences*, 1999, 44, 851–855.
17. 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.
18. Vandembroucke V., Desmet N., De Backer P. [et al.], Multi-residue analysis of eight anticoagulant rodenticides in animal plasma and liver using liquid chromatography combined with heated electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography B* 2008, 869, 101–110.

Corresponding author

Maria Kała
Instytut Ekspertyz Sądowych
ul. Westerplatte 9
PL 31-033 Kraków
e-mail: mkała@ies.krakow.pl

OZNACZANIE SZEŚCIU RODENTYCYDÓW WE KRWI METODAMI LC-MS I LC-MS/MS

1. Wstęp

Rodentycydy zawierające związki obniżające krzepliwość krwi, zwane antykoagulantami, są w Polsce szeroko stosowane zarówno przez indywidualnych odbiorców, jak i specjalistyczne zakłady przeprowadzające derywację. Ogólna dostępność handlowych preparatów spowodowała wzrost przypadkowych i umyślnych zatrucień ludzi oraz zwierząt tymi środkami [3]. Rodentycydy obniżające krzepliwość krwi są niejednorodną grupą związków, które wykazują różną toksyczność dla ludzi i gryzoni. Toksyczność ich w największym stopniu zależy od powtarzanej ekspozycji nawet na małe dawki. Wprowadzone do organizmu ludzi i zwierząt hamują wytwarzanie aktywnej formy witaminy K, co prowadzi do wystąpienia krwawienia. W większych dawkach lub przy przedłużającej się ekspozycji powodują krwawienie wielonarządowe i w konsekwencji zgon.

Obecnie większość handlowych rodentycydów dostępnych w Polsce zawiera jeden lub kilka składników czynnych będących antagonistami witaminy K. Wieloskładnikowe preparaty charakteryzują się większą skutecznością działania, dlatego wielu producentów wprowadza takie do obrotu. W Niemczech dopuszczono do powszechnego użytku preparaty w postaci przynęty dla gryzoni zawierające mieszaninę kumatetralylu i kolekalciferolu lub difetialonu i sulfachinoksaliny, przy 24 różnych zarejestrowanych preparatach zawierających bromadiolon jako pojedynczy czynny składnik [6]. Związkami czynnymi występującymi w preparatach samodzielnie lub w mieszaninie najczęściej są: bromadiolon, brodifakum, difetialon, difenakum, warfaryna i kumatetralyl (rycina 1).

Warfaryna i kumatetralyl są uważane za rodentycydy pierwszej generacji. Zostały one wprowadzone do obrotu w latach 40. i 50. dwudziestego stulecia. Bromadiolon, brodifakum, difetialon i difenakum nazwano superwarfarynami, czyli antykoagulantami drugiej generacji. Działają one dłużej i ze znacznie większą efektywnością. Ich stężenia w preparatach są rzędu od 0,0025% do 0,005%, czyli od 5 do 10 razy niższe od zawartości składników czynnych rodentycydów pierwszej generacji. Niektórzy badacze uważają, że superwarfaryny charakteryzują się sto razy silniejszym działaniem niż warfaryna [12] oraz mogą wywołać rozstrój zdrowia nawet po jednorazowej dawce.

Powszechność stosowania tych preparatów powodująca wzrost liczby zatrucień lub podejrzeń o zatrucenia rodentycydami oraz niskie dawki aktywne składników czynnych, prowadzące do występowania ich w materiale bio-

logicznym również w bardzo niskich stężeniach, narzucają konieczność stosowania do ich wykrywania w materiale biologicznym bardzo czułych metod analitycznych.

W Instytucie Ekspertyz Sądowych biegli często mają do czynienia z próbkami różnych materiałów, co do których istnieje podejrzenie, że mogą zawierać antykoagulanty. Są nimi materiały niebiologiczne w postaci pozostałości preparatów handlowych (nadesłanych bez oryginalnych opakowań) oraz produktów żywnościowych (wśród nich próbek wody do picia, herbaty, kawy, cukru, zupy), do których podejrzewano dodanie tych związków w celach przestępczych. Materiał biologiczny w postaci płynów ustrojowych (prób krwi i lub moczu) pobrany od osób żywych nadsyłany jest w celach diagnostycznych i sądowych, a sekcyny pobrane w czasie sekcji zwłok ludzi i zwierząt (psów, fok, warzęchy) stanowił podstawę potwierdzenia lub wykluczenia zatrucia [1].

Możliwość wystąpienia objawów zatrucia superwarfarynami z opóźnieniem 1–2 dniowym oraz szybkość eliminacji tych związków z organizmów żywych potwierdza konieczność stosowania bardzo czułych, specyficznych i selektywnych metod do ich wykrywania i oznaczania. Takie wymagania spełniają tylko nowoczesne techniki, najlepiej sprzężone.

Technikę chromatografii cienkowarstwowej (TLC) można uznać za wystarczająco efektywną do analizy preparatów handlowych. Do niedawna większość metod oznaczania antykoagulantów bazowała na technice wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) [4, 5, 8, 12]. Z jej zastosowaniem opracowano metody HPLC z detekcją spektrofotometryczną (UV) lub fluorescencyjną (FL) do analizy prób krwi, surowicy, osocza, moczu, narządów wewnętrznych. Stosowano kolumny C8 i C18 w odwróconym układzie faz. Większość kumarynowych pochodnych charakteryzuje się naturalną zdolnością do fluorescencji, dlatego granice wykrywalności dla antykoagulantów analizowanych w surowicy metodą HPLC-FL wynosiły od kilku do kilkudziesięciu nanogramów na mililitr. Wymieniony zakres wartości jest około kilkanaście razy niższy niż przy detekcji UV [4, 11].

Zadawalająco efektywnymi metodami oznaczania rodentycydów z grupy antykoagulantów charakteryzują się techniki wykorzystujące chromatografię gazową połączoną ze spektrometrią mas (GC-MS), zwłaszcza po zastosowaniu procesu derywatacji. Użycie tej techniki umożliwia oznaczenie – oprócz substancji czynnych – również ich metabolitów [13].

W ostatnim czasie zostały opracowywane metody przesiewowe wykorzystujące technikę chromatografii cie-

czowej połączonej ze spektrometrią mas (LC-MS) z różnymi rodzajami jonizacji, zwłaszcza przez elektrozpylanie (ESI) i jonizacji chemicznej pod ciśnieniem atmosferycznym (APCI). Grobosh i in. [6] opracowali metodę LC-ESI-MS równoczesnej identyfikacji 10 antykoagulantów w surowicy, w tym 5 rodentycydów z grupy superwarfaryn (brodifakum, bromadiolon, difenakum, difetialon i flokumafen) i 5 innych antagonistów witaminy K (acenokumarol, kumateteryl, kumachlor, fenprokumon i warfaryna). Natomiast Jin i in. [9] opisali metodę wykorzystującą tandemową spektrometrię mas LC-MS/MS do oznaczania rodentycydów w różnych materiałach biologicznych. Metody wykorzystujące detekcję MS/MS w trybie monitorowania wielokrotnych reakcji (MRM) wydają się najlepszymi w analizach przesiewowych na obecność pestycydów z różnych grup [7].

W literaturze przedmiotu opisano również różne techniki ekstrakcji. Antykoagulanty były ekstrahowane z naturalnego [4], kwaśnego [6] i zasadowego [12] środowiska techniką ciecz-ciecz (LLE). Używano różnych pojedynczych rozpuszczalników, np. eter dietylowy [14], heksan [12], acetonitryl [4] lub ich mieszanin, np. acetonitryl z eterem etylowym [5, 14, 15]. W niektórych metodach stosowano strącanie białek surowicy przez dodanie acetonitrylu [4]. Kolumny stosowane do ekstrakcji do fazy stałej (SPE), szczególnie z fazą diolową, były również używane w celu oczyszczania ekstraktów otrzymanych techniką LLE z moczu zawierających hydroksykumarynowe antykoagulanty [13]. Wydajności ekstrakcji wahały się w granicach od 55% do 131%, czego w niektórych przypadkach nie da się wyjaśnić [4, 11].

Celem niniejszych badań było opracowanie czułej metody oznaczania w materiale biologicznym składników aktywnych superwarfaryn popularnych w Polsce. Do tego celu wybrano techniki LC-MS oraz LC-MS/MS ze względu na ich czułość i specyficzność.

2. Materiały i metody

2.1. Odczynniki

Substancje wzorcowe: warfarynę, kumateteryl, bromadiolon i brodifakum otrzymano z firmy Riedel-de Haën (Seelze, Niemcy), difetialon i difenakum z firmy Dr Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Niemcy), a nimesulid, zastosowany jako wzorzec wewnętrzny (IS), z firmy LGC GmbH (Luckenwalde, Niemcy). Chloroform i aceton kupiono w firmie Lach-Ner s.r.o. (Neratovice, Czechy). Bufor octanowy sporządzono z bezwodnego octanu sodu pochodzącego z firmy Polskie Odczynniki Chemiczne S.A. (Gliwice, Polska) oraz kwasu octowego firmy Odczynniki Sp. z o.o. (Lublin, Polska). Acetonitryl (AcCN) i kwas mrówkowy 98–100% pochodziły z firmy Merck (Darmstadt, Niemcy). Woda destylowana została kupio-

na w firmie Baker (Deventer, Holandia). Próby krwi kontrolne, wolne od analitów, stosowane do opracowania i walidacji metody pochodziły ze stacji krwiodawstwa.

2.2. Ekstrakcja

W buteleczkach o pojemności 20 ml umieszczano 1 ml krwi, do których dodawano roztwór nimesulidu (IS), osiągając stężenie 500 ng/ml krwi. Następnie dodawano 1 ml buforu octanowego (pH 5,5) i 6 ml mieszaniny chloroform-aceton (1:1, v/v). Całość wytrząsano przez 20 minut, a następnie wirowano przy 6000 g przez 5 min. Pięć ml fazy organicznej po przeniesieniu do czystej buteleczki odparowywano do sucha w bloku grzewczym w temperaturze 50°C w strumieniu azotu. Suchą pozostałość rozpuszczano w 100 μ l fazy ruchomej, czyli mieszaniny AcCN i wody destylowanej (1:1, v/v) z dodatkiem kwasu mrówkowego w ilości 1 ml na 1 l fazy i przenoszono do wkładów odpowiednich dla buteleczek do automatycznego podajnika próbek. Na kolumnę nastrzykiwano 20 μ l próbki przy użyciu podajnika.

2.3. Parametry LC

Analizę analitów prowadzono przy zastosowaniu chromatografu cieczowego Waters 2695 Alliance połączonego ze spektrometrem mas Quattro Micro firmy Micro-mass. Rozdział prowadzono na kolumnie LiChroCART (125 \times 3 mm) z wypełnieniem Purospher RP-18e (Merck) utrzymywanej w temperaturze 25°C. Faza ruchoma składała się z mieszaniny 0,1% (v/v) kwasu mrówkowego w AcCN i wodzie. Przepływ fazy wynosił 0,8 ml/min. Wszystkie analizy prowadzono w trybie gradientu składu fazy (wyrażonego w stosunku do zawartości AcCN): 0 min – 10%, 10 min – 100%, 15 min – 100%, 16 min – 10%, 20 min – 10%. Całkowity czas analizy wynosił 20 min. Czasy retencji badanych związków przedstawiono w tabeli I.

2.4. Parametry MS i MS/MS

Metodą MS próbki były analizowane w trybie ujemnej jonizacji przez elektrozpylanie ESI(-). Detektor mas rejestrujący jony ujemne pracował w następujących warunkach: napięcie kapilary – 3 kV, napięcie ekstraktora – 2 V, napięcie zmienne o częstotliwości radiowej (RF) – 0,1 V, napięcie powielacza – 650 V, temperatura źródła jonów – 100°C, przepływ gazu rozpylającego (azotu) – 540 l/h, temperatura gazu rozpylającego – 300°C. Czas oraz opóźnienie rejestracji wynosiły odpowiednio 0,2 i 0,05 s.

W metodzie MS/MS gazem kolizyjnym był argon wysokiej czystości, którego ciśnienie wynosiło 2,0–2,2 $\times 10^{-4}$ torra. W metodzie MRM optymalne napięcia w strefie zderzeń (zwane dalej napięciem fragmen-

tora) wahały się w zakresie 40–80 V dla poszczególnych związków. Obsługa aparatu oraz analiza otrzymanych wyników odbywała się za pomocą oprogramowania MassLynx w wersji V4.0 firmy Waters.

3. Wyniki i dyskusja

Rodentycydy z grupy związków obniżających krzepliwość krwi ze względu na szerokie rozpowszechnienie odgrywają znaczącą rolę w klinicznej i sądowej toksykologii jako przyczyny wielu samobójstw, zabójstw oraz przypadkowych zatruc. Toksyczność rodentycydów obniżających krzepliwość krwi zaliczanych do pierwszej generacji zależy w głównej mierze od powtarzanej ekspozycji nawet na stosunkowo małe dawki, natomiast związki z drugiej generacji wykazują działanie toksyczne już pojedynczej dawce.

Dostępność biologiczna warfaryny (pierwsza generacja) i superwarfaryn (druga generacja) po doustnym przyjęciu jest bliska 100%. Warfaryna jest w wysokim stopniu (w około 97%) wiązana z białkami osocza, głównie albuminami. Obniżenie krzepliwości krwi utrzymuje się zwykle przez 5–7 dni po jednorazowej dawce warfaryny, chociaż może przedłużyć się nawet do tygodni, a nawet miesięcy.

Dawki toksyczne są zróżnicowane. Z reguły jednorazowe przyjęcie warfaryny (w dawce 10–20 mg) nie powoduje poważnego zatrucia. Z kolei długotrwałe lub powtarzane przyjmowanie nawet mniejszych dawek (2–5 mg/dzień) może powodować znaczącą antykoagulację. Superwarfaryny są związkami silnie działającymi i mogą wywołać długotrwałe efekty po przyjęciu jednorazowej małej dawki. Nawet 1 mg związku z tej grupy może powodować koagulopatię u dorosłych. Krwawienie jest jedynym istotnym objawem. Przy ciężkim zatruciu występuje krwawienie wielonarządowe. Fizykalne 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 [2].

Przypadkom ciężkich zatruc towarzyszy zazwyczaj stężenie superwarfaryn w surowicy wyższe niż 5 g/ml [10], ale dla niektórych pochodnych, np. bromadiolonu, toksyczne efekty mogą pojawić się przy znacznie niższych stężeniach. Znane są także przypadki ostrych zatruc ludzi rodentycydami zakończone całkowitym powrotem do zdrowia pomimo stwierdzenia wysokich stężeń (wyrażonych w ng/ml) tych związków w surowicy, np. brodifakum – 630, 710 i 731, difenakum – 600 i 970, bromadiolon 40 i 440 [6]. Przyjęcie brodifakum w postaci 0,005% preparatu skutkowało zejściem śmiertelnym przy jego dystrybucji w poszczególnych tkanakach: we krwi z komór serca – 2240 ng/ml, we krwi z żyły udowej – 3919 ng/ml, w żółci – 4276 ng/ml, w wątrobie –

50 ng/ml, w śledzionie – 34 ng/ml i w płucach – 31 ng/ml [16]. Przytoczone wartości stężeń wskazują, że metody oznaczania superwarfaryn w materiałach biologicznych powinny charakteryzować się wysoką czułością i szerokim zakresem liniowości.

Opracowane łączone (ekstrakcja i detekcja) metody równoczesnego wykrywania i oznaczania 6 superwarfaryn oparto na metodzie LLE i analizie technikami LC-MS i LC-MS/MS. Zastosowanie do ekstrakcji mieszaniny chloroformu z acetonem ze środowiska słabo kwaśnego (pH 5,5), zapewniło powtarzalne wydajności ekstrakcji mieszczące się w granicach od 65% do 81%. Dobra rozpuszczalność superwarfaryn w acetonie sprawia, że jest on ekstrahentem z wyboru, zwłaszcza w połączeniu z niestety toksycznym chloroformem [8, 11, 17].

Deuterowane pochodne superwarfaryn nie są komercyjnie dostępne. W niniejszych badaniach jako IS zastosowano nimesulid. Trudności w doborze IS wynikały z faktu, że niewiele związków ulega jonizacji ujemnej, dając wystarczająco intensywne i powtarzalne sygnały analityczne. Przy optymalizacji fragmentacji wyeliminowano wiele innych bardziej popularnych związków, a zadawalające sygnały analityczne uzyskano ponadto dla paracetamolu i furosemidu. Te związki z kolei są zbyt popularnymi lekami, co powoduje, że ich współobecność w organizmie osób zatrutych lub podejrzanych o zatrucie rodentycydami jest wysoce prawdopodobna, zwłaszcza przy hospitalizacji zatrutego, kiedy podawanie furosemidu jako leku wymuszającego diurezę spotykane jest bardzo często. Z przeglądu piśmiennictwa wynika, że najczęściej dotychczas stosowanymi wzorcami wewnętrznymi były pochodne kumarany. Do oznaczania bromadiolonu użyto warfaryny [9], a w metodzie przesiewowej dla 10 antykoagulantów [6] i metodzie równoczesnego oznaczania 8 rodentycydów z tej grupy [18] zastosowano 7-acetoksy-6-(2,3-dibromopropyl)-4,8-dimetylokumarę.

Do analizy objętych badaniami związków zmniejszających krzepliwość krwi zastosowano techniki LC-MS oraz LC-MS/MS. Zoptymalizowano parametry detekcji 6 związków, czyli bromadiolonu, brodifakum, difetialonu, difenakum, warfaryny i kumatetralyłu. Zadawalające intensywności sygnałów analitycznych dla badanych związków, z wyjątkiem difetialonu, uzyskano przy zastosowaniu ESI(-), monitorując wybrane jony, w tym jony macierzyste i potomne. Przy optymalizacji fragmentacji uwzględniono następujące parametry: napięcie fragmentora, energia jonów ulegających kolizji (zwana dalej energią kolizji) oraz czas rejestracji danego jonu i opóźnienie rejestracji kolejnych jonów. W metodzie monitorowania wybranych jonów (SIR) tworzone jony ujemne, z których wybrano po dwa najbardziej intensywne dla każdego związku. Monitorowane jony, reakcje oraz napięcia fragmentora i energie kolizji, przedstawiono w tabeli II.

Sporządzono 9-punktowe krzywe kalibracyjne (0, 10, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 5000 ng/ml). Wartości współczynników regresji liniowej krzywych kalibracyjnych (przy liczbie powtórzeń $n = 4$) nie były niższe niż 0,971. Granice detekcji (*LOD*) wyznaczone przy $S/N = 3$ dla metody MS wynosiły od 3 (dla kumatetrarylu) do 60 ng/ml (dla difetialonu), a dla metody MS/MS również od 3 dla kumatetrarylu do 84 ng/ml dla difetialonu. Granice oznaczalności (*LOQ*) (przy $S/N > 10$, wyrażone w ng/ml) wahały się w granicach 10–200 i 10–280 odpowiednio dla MS i MS/MS. Obie metody zachowywały liniowość od *LOQ* poszczególnych analitów do 5 g/ml.

Precyzję obu metod, czyli zmienność w ciągu jednego dnia (precyzja wewnątrzgrupowa) obliczono na podstawie trzech powtórzeń oznaczeń każdą z metod, antykoagulantów w kontrolnych próbkach krwi, do których dodano badane związki w stężeniu 100 i 500 ng/ml. Zmienność międzydniowa (precyzja międzygrupowa) została obliczona na podstawie wyników otrzymanych przez okres 2 tygodni z sześciu serii pomiarowych. Zarówno zmienność wewnątrzgrupowa, jak i międzygrupowa, nie przekraczała 15% *RSD*. Odzysk wahał się w granicach od 65% (dla warfaryny) do 81% (dla brodifakum). Opracowane parametry walidacyjne metody zestawiono w tabeli III.

Specyficzność metody została zweryfikowana przez analizę ekstraktów dziesięciu różnych próbek krwi wolnych od analitów pochodzących od osób żywych (z banku krwi) oraz pobranych podczas sekcji zwłok. Na otrzymanych chromatogramach nie zaobserwowano interferujących pików eluujących się z kolumny o czasie retencji zgodnym z analitami.

Anality znajdujące się w rozpuszczonych ekstraktach były stabilne przez okres dłuższy niż 24 godziny przy przechowywaniu w temperaturze pokojowej lub 10 dni przy przechowywaniu w temperaturze -4°C .

Chromatogramy wybranych jonów (SIR) w metodzie LC/MS i monitorowanych przejść (MRM) w metodzie LC-MS/MS antykoagulantów w ekstrakcie próby krwi z dodatkiem analitów w stężeniu 100–400 ng/ml przedstawiono na rycinach 2 i 3.

Z porównania wartości *LOQ* i intensywności sygnałów analitycznych można stwierdzić, że obie metody są jednakowo czułe dla kumatetrarylu, metodą MS można oznaczyć niższe stężenia warfaryny i bromadiolonu, a metoda MS/MS jest 2 i 4 razy czulsza odpowiednio dla difenakum i brodifakum.

4. Wnioski

Opracowano dwie metody równoczesnego wykrywania i oznaczania 6 rodentycydów w 1 ml próbkach krwi. Rozdział analitów, po prostej ekstrakcji techniką cieciec, prowadzono z zastosowaniem chromatografii cie-

czowej, a do detekcji użyto pojedynczą i tandemową MS, rejestrując wybrane jony i monitorując wybrane reakcje jonów ujemnych. Metoda okazała się specyficzna do badania próbek krwi pochodzących od osób żywych i pobranych w czasie sekcji.