

*Kasuistik aus dem Arbeitskreis Klinische Toxikologie***Akute Intoxikation mit Coumatetralyl****Simultane Bestimmung von 5 Superwarfarinen und 5 weiteren Vitamin K-Antagonisten in Humanserum mittels LC-ESI-MS**

T. Grobosch*, B. Angelow, D. Lampe*,

* *Berliner Betrieb für Zentrale Gesundheitliche Aufgaben (BBGes), Institut für Toxikologie – Klinische Toxikologie und Giftnotruf Berlin, Klinische Toxikologie und Pharmakologie, Oranienburger Str. 285, 13437 Berlin. (Email: toxikologie@bbges.de)*

Zusammenfassung

Ein 62-jähriger männlicher Patient erschien mit Symptomen wie Übelkeit und Erbrechen in einer Rettungsstelle, der nach eigenen Angaben in suizidaler Absicht einen Rattengiftköder eingenommen hatte. Eine Blutprobe des Patienten sowie ein Köderpräparat wurden zur Analyse in unser Labor geschickt.

Die Analyse mittels LC-ESI-MS ergab eine Intoxikation mit Coumatetralyl. Die Konzentration im Plasma bei Krankenhausaufnahme lag bei 120 µg/L. In der vom Krankenhaus mitgelieferten Substanzprobe (Köder) wurde ebenfalls Coumatetralyl identifiziert.

Für den Nachweis und die Quantifizierung von Coumatetralyl wurde eine in unserem Labor erarbeitete LC-MS Methode verwendet. Dieses Analysenverfahren eignet sich zur simultanen Identifizierung und Quantifizierung von zehn indirekten Antikoagulantien in Humanserum. Erfasst werden fünf der z. Zt. in Deutschland als Rodentizide zugelassene Superwarfarine (Brodifacoum, Bromadiolon, Difenacoum, Difetialon, Flocoumafen) sowie fünf weitere in der Nagetierbekämpfung eingesetzte Vitamin K-Antagonisten (Acenocoumarol, Coumatetralyl, Cumachlor, Phenprocoumon, Warfarin). Das Verfahren basiert auf einer sauren (pH= 4,2) Flüssig-Flüssig-Extraktion mit 1-Chlorbutan und anschließender Detektion mittels LC-ESI-MS. Die Trennung erfolgt auf einer Waters Atlantis dC18 Säule (2,0 x 20 mm, 3 µm) mit einem Gradientengemisch aus Methanol/0,1 % Ameisensäure die Flußrate beträgt 0,6 ml/min, die Analysenzeit 5 Minuten. Die Bestimmungsgrenze liegt bei 10 µg/l (S/N: >10).

Einleitung

4-Hydroxycoumarine, abgeleitet vom Waldmeisteraromastoff Coumarin, und 1,3-Indandione bilden die Gruppe der indirekten Antikoagulantien (Abb. 1). Sie werden auch als Vitamin K-Antagonisten bezeichnet, da ihre Wirkung auf einer funktionellen Störung der Synthese von Vitamin K abhängigen Gerinnungsfaktoren beruht. Die Bildung der Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X sowie der Proteine C und S ist beeinträchtigt. Auf Grund der Halbwertszeit der bereits zirkulierenden Gerinnungsfaktoren tritt der gerinnungshemmende Effekt erst mit einer mehrtägigen Latenz nach Ingestion ein [1]. Coumarinderivate werden im Intestinaltrakt resorbiert, haben relativ lange Halbwertszeiten und weisen, soweit bekannt, eine hohe Plasma-eiweißbindung auf [3].

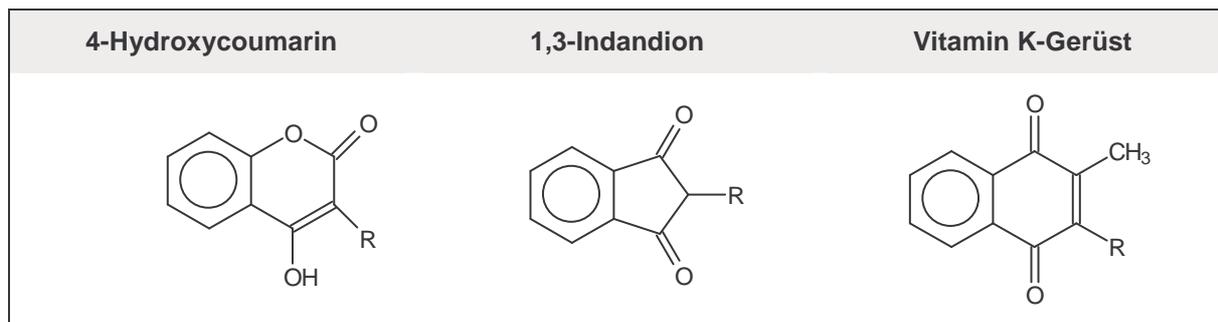


Abb. 1: Strukturverwandschaft zwischen Vitamin K und seinen Antagonisten

Einige Coumarinderivate gehen in die Muttermilch über [2]. Sie werden überwiegend als Metabolite (Glucuronide, Sulfate) mit dem Urin und den Faeces ausgeschieden [3].

Eine Reihe von Vitamin-K-Antagonisten werden therapeutisch als Antikoagulantien eingesetzt (Acecumarol, Phenprocoumon, Warfarin, s. Tab. 1). Der gleiche gerinnungshemmende Effekt wird zur Bekämpfung von Nagetieren genutzt [4, 5, 6]. Aufgrund zunehmender Resistenzausbildung verschiedener Rattenstämme gegenüber dieser Substanzgruppe, wurden die auch als "Antikoagulanzen der 2. Generation" (*second-generation anticoagulants*) bezeichneten Superwarfarine entwickelt. Sie zeichnen sich durch hohe Wirksamkeit (Tab. 1, Spalte 3) bei geringen Dosen aus, sie haben lange Halbwertszeiten (Tab.1) und damit verbunden eine lange Wirkungsdauer [7, 8, 9, 10]. Mit wachsender kommerzieller Verbreitung der Superwarfarine stieg auch die Zahl der Intoxikationen bei Mensch und Tier [11]. Im Jahr 2004 wurden allein im Giftnotruf Berlin 110 Fälle mit Verdacht auf Antikoagulationseinnahme registriert.

Tab. 1: Pharmakologisch-chemische Kenndaten der Analyten nach [4, 13, 14]. m = männlich.

Name	Therapeutischer Bereich (µg/l)	Eliminations-Halbwertszeit	LD ₅₀ Ratte, oral (mg/kg KG)
Acenocoumarol	30 - 90	10 h	-
Cumachlor	-	-	-
Coumatetralyl	-	-	ca. 30 (m)
Phenprocoumon	1000 - 3000	120 –150 h	-
Warfarin	300 - 3000	37 – 50 h	ca. 60-320 (m)
Brodifacoum	-	-	0,4 – 0,75 (m)
Bromadiolon	-	26 – 58 h	ca. 1 (?)
Difenacoum	-	28 Tage	ca. 2 (?)
Difethialon	-	2 – 3 Tage	0,6 (?)
Flocoumafen	-	158 – 261 Tage	ca. 0,25 (?)

Die in Deutschland zugelassenen Fertigköderkonzentrationen liegen, je nach Substanz, zwischen 0,0025 und 0,79 %. Einige Köderpräparat-Beispiele mit dem Inhaltsstoff Coumatetralyl sind in Abbildung 2 dargestellt.



Abb. 2: Coumatetralyl - Köderpräparat-Beispiele: Haferflocken, Paste, Pulver, Schaum (Fa. BAYER)

Es werden auch Kombinationspräparate, z. B. Racumin Plus Haferflockenköder (Coumatetralyl und Colecalciferol) oder Celaflor bzw. Brumolin (Difethialon und Sulfachinoxalin) angeboten [12]. Die 1,3-Indandione wie Diphacinon, Pindon und Valon sind in Deutschland nicht zugelassen [12]. Mit dem Inhaltsstoff Coumatetralyl werden in Deutschland 18 Präparate angeboten [13].

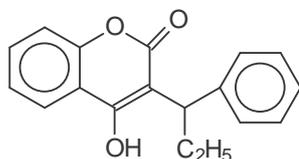
Das Vergiftungsbild ergibt sich, dem Wirkungsmechanismus entsprechend, bei Menschen und Tieren analog aus der gesteigerten Blutungsneigung, der Tod tritt durch Verbluten bzw. haemorrhagischen Schock ein [1, 4, 15, 16]. Gemäß Gefahrstoffverordnung ist der Wirkstoff als sehr giftig (T+) einzustufen [4, 17]. Die Toxizitätsdaten von Coumatetralyl bzw. Coumatetralyl-haltigen Ködern bei verschiedenen Applikationen für die Ratte sind in Tab 2 zusammengefaßt.

Tab. 2: Toxizitätsdaten von Coumatetralyl [4]

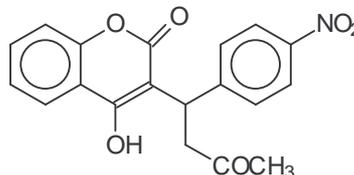
Name	LD ₅₀ Ratte (m) oral (mg/kg KG)	LD ₅₀ Ratte (m) dermal (mg/kg KG)	LD ₅₀ Ratte (m) inhalativ (mg/l)
Coumatetralyl	30, 15 (w)	> 100 < 500, 250 (w)	0,05 (Staub)
Racumin Pulver	5000	> 5000	> 3,3
Racumin Fertigköder	> 5000	> 5000	-

m = männlich, w = weiblich

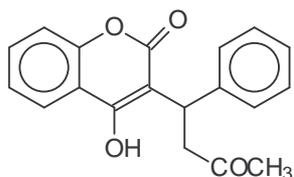
Phenprocoumon



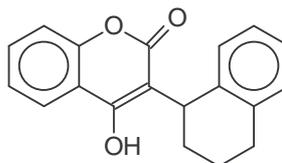
Acenocoumarol



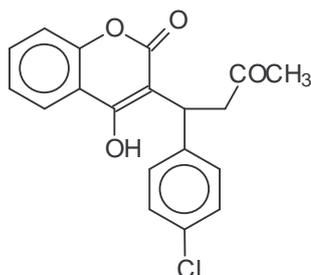
Warfarin



Coumatetralyl



Cumachlor



Interner Standard (IS)

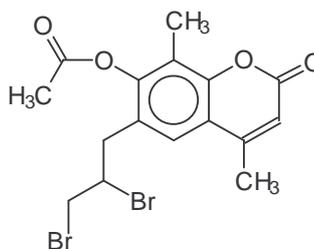


Abb. 3: Vitamin K-Antagonisten, interner Standard

Wichtigster diagnostischer Parameter ist die INR (INR = International Normalized Ratio). Die INR ist, im Vergleich zum Quick-Wert, unabhängig von der wechselnden Empfindlichkeit der diagnostisch verwendeten Thromboplastin-Präparate. Zu den Sofortmaßnahmen bei Intoxikationen gehören Dekontamination und gegebenenfalls Antidotgabe (Vitamin K₁). Bei akuten, lebensbedrohlichen Blutungen müssen die defizitären Gerinnungsfaktoren substituiert werden [1, 3].

Eine Reihe von Methoden zur Bestimmung von Vitamin K-Antagonisten in Tieren werden in der Literatur beschrieben [18-25]. Einige Arbeiten beschäftigen sich mit der Bestimmung von Einzelstanzen im menschlichen Material mittels HPLC-FL (26) sowie deren Metaboliten [2, 27] oder mit der Trennung und Detektion von Enantiomeren [27, 28]. Multikomponentenanalysen in Humanmaterial (Anzahl der Wirkstoffe) basieren auf HPLC (4, 5) [29, 30], -FL [31], -UV/FL (5, 8) [32, 33], -DAD (13) [34], -APCI-MS (5) [35] sowie -ESI-MS-MS/IonTrap (3) [36], LC-TSP-MS (4) [37] oder GC-MS (4) [38].

Die von uns entwickelte Methode zur Bestimmung von Vitamin K-Antagonisten realisiert bei einfacher Extraktion und kurzer Analysenzeit ein breites Substanzscreening und hohe Selektivität durch die Verwendungen zweier Massen zur Identifizierung/Quantifizierung ohne vorherige Derivatisierung. Die mit der Methode z.Zt. erfaßten Substanzen finden sich in Abb. 3 und Abb. 4.

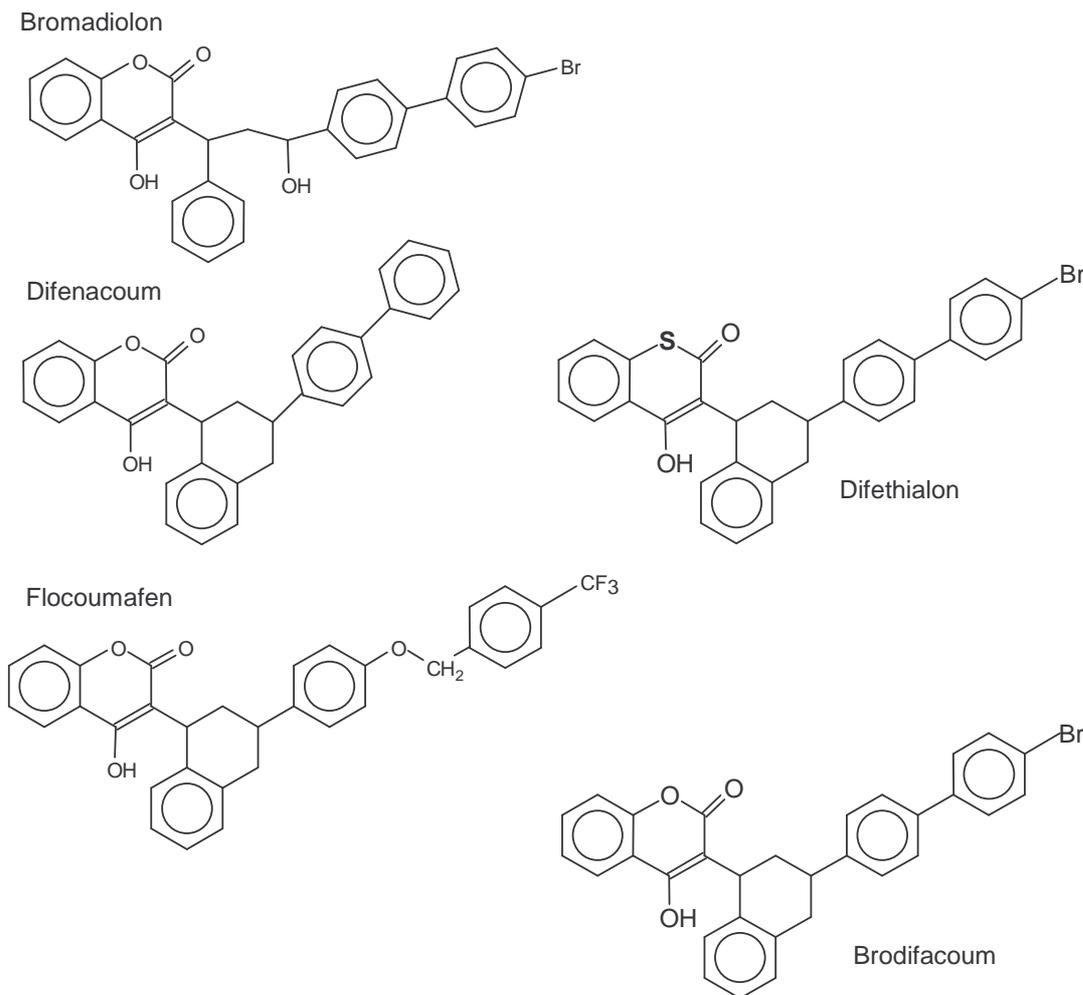


Abb. 4: Vitamin K-Antagonisten (Superwarfarine)

Kasuistik

Ein 62-jähriger männlicher Patient erschien mit Symptomen wie Übelkeit und Erbrechen in einer Rettungsstelle. Nach eigenen Angaben hatte der Patient in suizidaler Absicht einen Rattengiftköder eingenommen. Die Anamnese ergab einen früheren Selbstmordversuch im Jahr 2003 ohne psychiatrische Weiterbehandlung. Eine Blutprobe des Patienten wurde zusammen mit einem blauen Köderpräparat (Abb.5) zur Analyse in unser Labor geschickt.

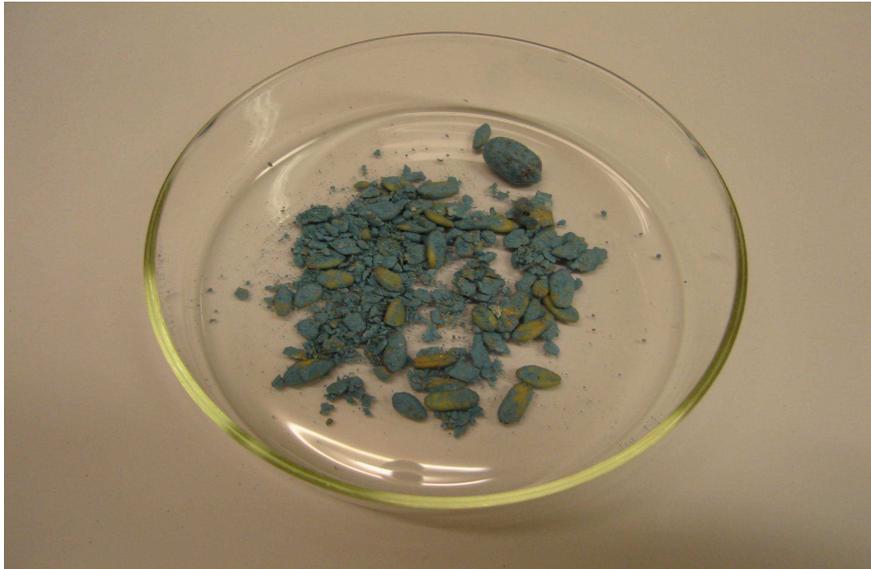


Abb. 5: Köderpräparat des Patienten

Material und Methoden

Aufgrund der vermuteten Intoxikation mit einem Coumarinderivat wurden die Serumprobe sowie die Köderprobe mit der im folgenden dargestellten LC-MS Methode nach Flüssig-Flüssig-Extraktion (1-Chlorbutan, Puffer pH = 4,2) analysiert. Zusätzlich wurde eine systematischen toxikologischen Analyse (STA) mittels HPLC-DAD durchgeführt [11].

Chemikalien

Kaliumdihydrogenphosphat (p.A.) und 1-Chlorbutan (p.A.) von FLUKA (Darmstadt), Aceton, Methanol (LC-MS-Chromasolv) und Ameisensäure (p.A.) von Riedel de Haen (Seelze), Acenocoumarol von Novartis, Brodifacoum, Cumachlor von Sigma-Aldrich (Seelze), Flocoumafen von BASF (Ludwigshafen), Phenprocoumon von Salutas (Magdeburg), Bromadiolon, Coumatetralyl, Difenacoum Difethialon und Warfarin von Ehrenstorfer (Augsburg). Der Interne Standard (IS) 7-Acetoxy-6-(2,3-dibromopropyl)-4,8-dimethylcumarin wurde von der Firma Sigma-Aldrich bezogen.

Puffer-Extraktionsgemisch

Für den Puffer wurden 25 g wasserfreies KH_2PO_4 in 250 ml Wasser gelöst und durch ein $0,45 \mu\text{m}$ Filter filtriert (pH = 4,2). Das Extraktionsgemisch bestand aus 50 ml 1-Chlorbutan und 50 μl internem Standard ($c=1 \text{ mg/ml}$ in Aceton).

Probenaufarbeitung (Serum)

In einem 1,5 ml-Eppendorf-Gefäß, wurden 0,5 ml Plasma mit 0,1 ml KH_2PO_4 -Puffer (pH=4,2) versetzt, 0,4 ml Extraktionsgemisch (1-Chlorbutan inkl. IS) hinzugefügt, 2 min geschüttelt und 2 min bei 10.000 g zentrifugiert. Vom Überstand wurden 0,2 ml in ein weiteres 1,5 ml-Eppendorf-Gefäß überführt und bei 30 °C im Stickstoffstrom eingedampft. Der trockene Rückstand wurde mit 0,12 ml Methanol aufgenommen und 50 μl in das LC-MS System injiziert.

Probenaufarbeitung (Köder)

In einem 1,5 ml-Eppendorf-Gefäß, wurden ca. 10 mg Köderpulver eingewogen (auf die Einwaage von Haferflocken und Nüssen wurde bewußt verzichtet), mit 1 ml Methanol versetzt, das Gemisch 10 min geschüttelt, 2 min bei 10.000 g zentrifugiert und ein Teil des Überstandes durch eine Cellulosenitratmembran (0,45 µm) filtriert und 5 µl in das LC-MS System injiziert.

Kalibrierung:

Für die Quantifizierung wurde eine 7-Punkt Kalibration (0, 5, 15, 25, 50, 150, 250 µg/l) durchgeführt. Alle Kalibrationen waren im geprüften Bereich linear ($r > 0,99$). Alle Kalibratoren lagern bis zur Verwendung bei -18 °C.

Für die Präzision wurden anhand von in-house Qualitätskontrollproben folgende VK-Werte bestimmt (Tag zu Tag, n=6, 100 µg/l): Acenocoumarol (5,2 %), Cumachlor (5,9 %), Coumatetralyl (4,8 %), Phenprocoumon (6,0 %), Warfarin (6,0 %), Brodifacoum (14,9 %), Bromadiolon (8,2 %), Difenacoum (8,4 %), Difethialon (11,7 %), Flocoumafen (14,2 %). Die Bestimmungsgrenze lag bei 10 µg/l; S/N 10).

LC-MS-Bedingungen

LC-Parameter:

HPLC: binäres Pumpensystem (LC-10 ADVp), System Controller (SCL- 10 A), Lösungsmitteldegasser (DGU-14 A), Autosampler (SIL-10 ADVp), Ofen (CTO-10 ASVp), UV-Detektor (SPD-6 A) (alles Shimadzu, Duisburg). Als analytische Trennsäule wurde eine Atlantis C18 (2,1 x 20 mm, 3 µm, Firma: Waters) verwendet. Die Ofentemperatur betrug 40 °C. Mobile Phase: Laufmittel A: Methanol, Laufmittel B: Methanol/ 0,1 % HCOOH (10/90, v/v). Die Laufzeit des Gradienten betrug 5 min: 0 – 0,7 min: 95 % B, 0,7 – 1,1 min: 50 % B linear, 1,1 – 3,2 min: 6 % B linear, 3,2 – 3,8 min: 6 % B, 3,8 – 4,2 min: 95 % linear. Die Flussrate der mobilen Phase lag bei 0,60 mL/min.

Für die Bestimmung von Colecaliferol (Vitamin D3) wurde folgender Gradient verwendet: Laufmittel A: Methanol, Laufmittel B: Methanol/ 0,1 % HCOOH (10/90, v/v). Die Laufzeit des Gradienten betrug 5 min: 0 – 0,7 min: 20 % B, 0,7 – 3,5 min: 6 % B linear, 3,5 – 3,7 min: 6 % B, 3,7 – 4,1 min: 20 % B linear, 4,1 – 4,2 min: 20 %. Die Flussrate der mobilen Phase lag bei 0,60 mL/min.

MS-Parameter:

Für die Massenspektrometrie diente ein MS-2010-System (Shimadzu). Die Messungen erfolgten mit dem ESI-Interface im positiven und negativen Modus. Als Nebulizer Gas wurde Stickstoff mit einer Flussrate von 4,5 l/min verwendet. Die Block- und CDL-Temperatur lag bei 300 °C. Alle anderen Einstellungen resultierten aus dem Standard-Tuning. Die Detektorspannung betrug 1,9 kV. Der Massendetektor arbeitete im SIM-Modus auf folgende Massen: (m/z(1)=(-)ESI, m/z(2)=(-)ESI: Acenocoumarol (353, 352), Brodifacoum (523, 521), Bromadiolon (527, 525), Cumachlor (343, 341), Coumatetralyl (292, 291), Difenacoum (445, 443), Difethialon (539, 537), Flocoumafen (543, 542), Phenprocoumon (280, 279), Warfarin (308, 307), IS (ESI(+):432).

Die Bestimmung von Colecaliferol (Vitamin D3) erfolgte mittels APCI-Interface. Die Stickstoff-Flußrate lag bei 2,5 l/min, die Temperaturen bei 400°C (APCI) bzw. 300°C (CDL, Block) und die Detektorspannung bei 1,9 kV. Der Massendetektor arbeitete im positiven SIM-Modus (m/z= 385).

Ergebnisse und Diskussion

Die gewählten Analysenbedingungen erlauben eine schnelle Elution der angegebenen Substanzen innerhalb von 5 min mit einer Nachweisgrenze von 10 µg/l. Die Rahmenbedingungen (Mobile Phase, Analytische Säule, ESI-Interface) entsprechen der üblichen LC-MS Konfiguration in unserem Labor und erfordern daher keine längeren Umrüstzeiten.

Die Abb. 6 zeigt Beispiel-Chromatogramme der 10 etablierten Vitamin-K-Antagonisten (SIM-Modus, Standard, jeweils c = 100 µg/l). Um eine mögliche Misidentifikation zu vermeiden, werden 2 Massen verwendet. Im Unterschied der Identifikation durch Fragmentierung in einem ersten Lauf und der Quantifizierung durch einen zweiten Lauf, wird durch unsere Vorgehensweise eine hohe Empfindlichkeit bei gleichzeitiger Identifizierung in einem Lauf realisiert, wobei die Masse [M-1 amu] eine höhere Empfindlichkeit aufweist.

Wie aus den Chromatogrammen zu erkennen, beträgt die Analysenzeit 5 min und die Peaks weisen eine akzeptable Symmetrie auf. Im Rahmen der Methodvalidierung waren 12 getestete Leerplasmen von 6 unterschiedlichen Abnahmensystemen frei von den o.g. Coumarinen.

Die obere Bestimmungsgrenze von 250 µg/l (3 Dekaden) reicht aber für die Bestimmung von Phenprocoumon und Warfarin (therapeutischer Bereich bis 3000 µg/l) nicht aus, so dass für die Untersuchung dieser Substanzen entsprechend weniger Material eingesetzt bzw. mit Coumarin-freiem Leerplasma/-serum verdünnt werden muss. Die Präzision des Verfahrens ist geeignet, um bei geringer Analysenfrequenz zeitkritisch akzeptable Ergebnisse zu erzielen.

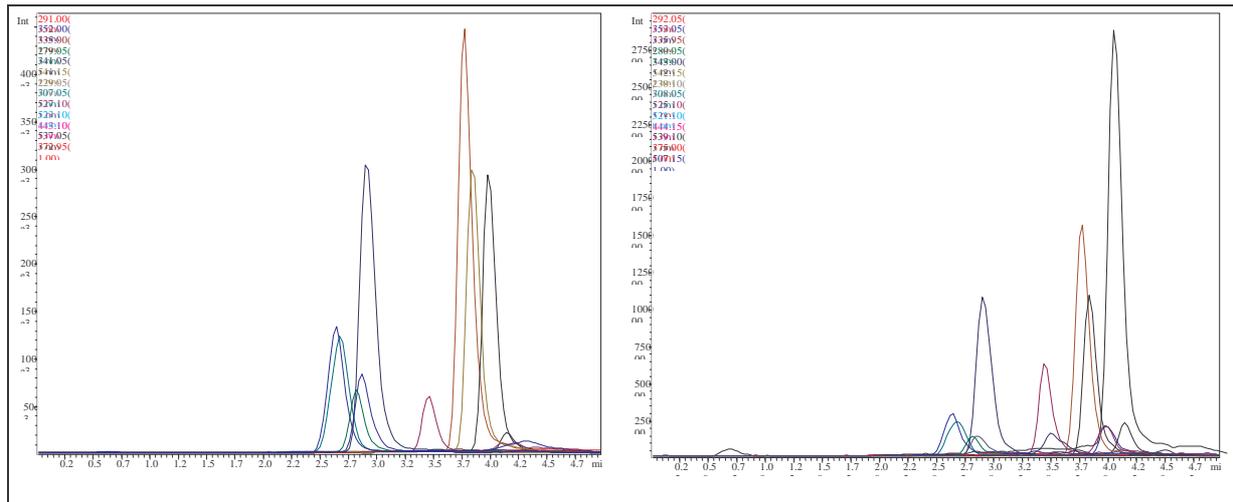


Abb. 6: SIM-Chromatogramme der 10 Vitamin K-Antagonisten (c=100 µg/l); Spur 1 und 2:(-)ESI

Serumprobe:

Der vermuteten Coumarinintoxikation entsprechend wurde die Patientenprobe mit dem beschriebenen Analyseverfahren untersucht. Wie aus dem Chromatogramm (Abb. 7) zu erkennen, wird der Wirkstoff sowohl über die Retentionszeit (2,0 min) als auch über die zwei Massen (m/z: 292 und 291) eindeutig identifiziert. Die aktuelle Kalibrierungen waren für alle Analyten in dem Bereich 3(5) - 250 µg/l linear ($r > 0,998$). Die Quantifizierung ergab eine Coumatetralyl-Konzentration von 120 µg/l. Die Kontrolle (Sollwert: 100 µg/l) ergab eine Konzentration von 94,7 µg/l und lag im geforderten Zielbereich von 80-120 µg/l ($\pm 20\%$ vom Sollwert).

Zusätzlich wurde die Probe einem Screening auf basische Substanzen (HPLC_DAD) [39] unterzogen, wobei keine weiteren Substanzen identifiziert worden sind.

Köderprobe:

In der Köderprobe wurde über die Retentionszeit (2,0 min) und die zwei Massen (m/z: 291/292) der Wirkstoff Coumatetralyl ebenfalls identifiziert (Abb. 8). Es traten keine Störpeaks auf. Beide Ergebnisse lassen auf einen coumatetralylhaltigen Rodentizidköder schließen.

Um zu prüfen, ob es sich bei der Köderprobe um das Kombinationspräparat Racumin Plus Haferflockenköder handeln könnte, wurde eine methanolische Lösung der Rodetizid-Probe mittels LC-APCI-MS untersucht. Es ergab sich keinen Hinweis auf Chlolecaliferol.

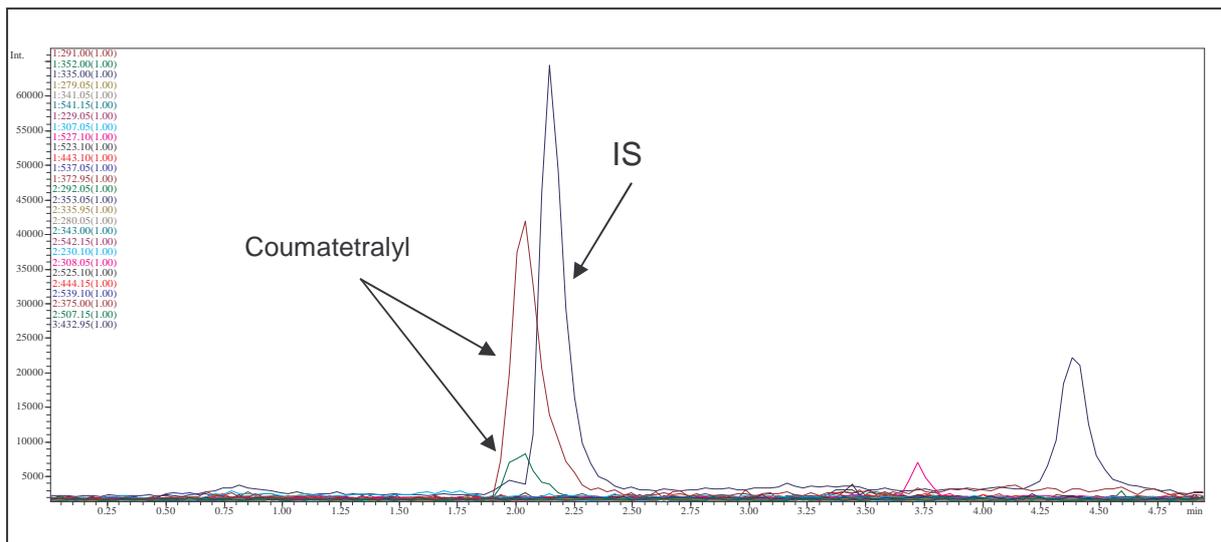


Abb. 7: Serumprobe des Patienten mit IS (SIM-Chromatogramm)

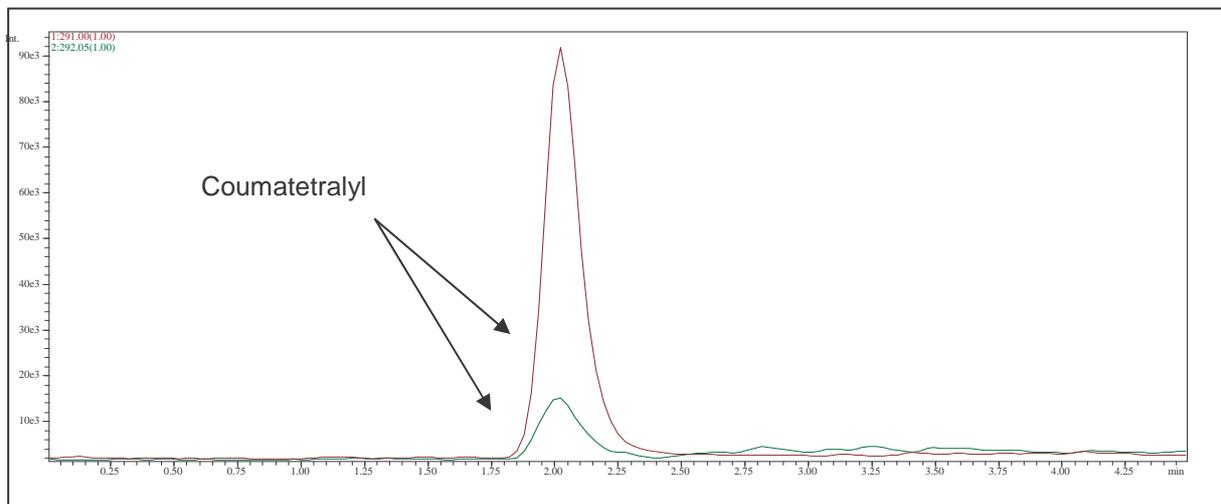


Abb. 8: Köderprobe ohne IS (SIM-Chromatogramm)

Die Untersuchung der Gerinnungsparameter ergaben einen INR-Wert von 1,07 (Quick-Wert: 87 %), 20 h nach Aufnahme: INR 1,15 (Quick-Wert: 77 %), 33 h nach Aufnahme INR 1,02 (Quick-Wert: 96 %).

Bei einer gemessenen Coumatetralyl-Konzentration von 120 µg/l konnte in der Kontrollprobe 11 Tage nach Krankenhausaufnahme kein Coumatetralyl mehr nachgewiesen werden (LOQ: $c < 10$ µg/l). Dies weist entweder auf eine ausgeprägte Verteilungsphase oder eine Halbwertszeit $< 2 - 3$ Tage hin.

In der Literatur finden sich wenige Angaben zu Serumkonzentrationen bei Vergiftungen mit Rodentiziden auf Basis von Vitamin K-Antagonisten (µg/l): Coumatetralyl (-), Brodifacoum (630) [40], (731) [41], (710) [42], Bromadiolon (40) [43], Difenacoum (600) [44], (970,110) [15]. Mit einer Ausnahme haben alle Patienten überlebt. Bei dem verstorbenen Patienten lag eine Mischintoxikation mit Cyanid, Kohlenmonoxid, Methanol, Benzodiazepinen, Trizyklischen Antidepressiva und Brodifacoum vor (163) [63].

Danksagung

Die Autoren bedanken sich bei Frau Dr. Flother für die Bereitstellung der Epikrise.

Literatur

- [1] H. Lüllmann, K. Mohr. *Pharmakologie und Toxikologie - Arzneimittelwirkungen verstehen - Medikamente gezielt einsetzen*. 14. Aufl. Thieme, Stuttgart, 1999, pp 177-180 .
- [2] de Vries JX, Schmitz-Kummer E. Determination of the coumarin anticoagulant phenprocoumon and metabolites in human plasma, urine and breast milk by high-performance liquid chromatography after solid-phase extraction. *J Chromatogr B Biomed Appl*. 1994 Apr 22;655(1):63-71.
- [3] .W. Forth, D. Henschler, W. Hummel. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 5th ed., Mannheim, Bibliographisches Institut u. F. A. Brockhaus AG, 1987, pp 322-323.
- [4] *Wirkstoffe in Pflanzenschutz und Schädlingsbekämpfungsmitteln: physikalisch-chemische und toxikologische Daten*, 3. Aufl., Industrieverband Agrar e.V., BLV, München, 2000.
- [5] K. K. Burkhart. Anticoagulant rodentices. *Clinical Toxicology*, 1st ed. WB Saunders (2000).
- [6] Shore RF, Birks JD, Afsar A, Wienburg CL, Kitchener AC. Spatial and temporal analysis of second-generation anticoagulant rodenticide residues in polecats (*Mustela putorius*) from throughout their range in Britain, 1992-1999. *Environ Pollut*. 2003;122(2):183-93.
- [7] Sullivan, M.P., et al: Long-acting anticoagulant rodenticides: an evaluation of 88 cases. *Vet Hum Toxicol* 1989; 31: 361.
- [8] Poovalingam V, Kenoyer DG, Mahomed R, Rapiti N, Bassa F, Govender P. Superwarfarin poisoning - A report of 4 cases, *S Afr Med J*. 2002, 92(11):874-6.
- [9] Palmer RB u.a., Fatal brodifacoum rodenticide poisoning: autopsy and toxicologic findings, *J Forensic Sci* 1999, 44(4):851-855
- [10] Litovitz TL, Felberg L, White S, Klein-Schwartz W, 1995 Annual Report of the American Association of Poison Control Centers Toxic Exposure Surveillance System. *Am J Emerg Med* 1996;14 487-537
- [11] Mühlendahl KE v, Oberdisse U, Bunjes R, Brockstedt M. *Vergiftungen im Kindesalter*, 4. Aufl. Thieme, Stuttgart (2003) 353-354
- [12] http://www.bvl.bund.de/infektionsschutz/dl/und_anerkannten_Mittel_und_Verfahren_zur_Bekaempfung_von_tierischen.pdf
- [13] Datenbank Marabu - Pegasos - Version Giftberater: Institut für Toxikologie, Klinische Toxikologie und Giftnotruf Berlin, Giftnotruf, 2004.
- [14] Toxikologische Datenbank, Institut für klinische Toxikologie, Berliner Betriebe für Zentrale Gesundheitliche Aufgaben (BBGes), 2003
- [15] McCarthy PT, Cox AD, Harrington DJ, Evely RS, Hampton E, al-Sabah AI, Massey E, Jackson H, Ferguson T. Covert poisoning with difenacoum: clinical and toxicological observations. *Hum Exp Toxicol*. 1997 Mar;16(3):166-70.
- [16] Palmer RB, Alakija P, de Baca JE, Nolte KB. Fatal brodifacoum rodenticide poisoning: autopsy and toxicologic findings. *J Forensic Sci*. 1999 Jul;44(4):851-5. Related Articles, Links
- [17] Gefahrstoffverordnung (GefStoffV), Verordnung zum Schutz vor gefährlichen Stoffen (1999).
- [18] Kieboom AJ, Rammell CG. Determination of brodifacoum in animal tissues by HPLC. *Bull Environ Contam Toxicol*. 1981 May;26(5):674-8.
- [19] Hunter K, Sharp EA, Newton A. Determination of diastereoisomers of bromadiolone, an anticoagulant rodenticide, in animal tissues by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr*. 1988 Jan 1;435(1):83-95.
- [20] Ray AC, Murphy MJ, DuVall MD, Reagor JC. Determination of brodifacoum and bromadiolone residues in rodent and canine liver. *Am J Vet Res*. 1989 Apr;50(4):546-50.
- [21] Braselton WE Jr, Neiger RD, Poppenga RH. Confirmation of indandione rodenticide toxicoses by mass spectrometry/mass spectrometry. *J Vet Diagn Invest*. 1992 Oct;4(4):441-6.
- [22] Berny PJ, Buronfosse T, Lorgue G., Anticoagulant poisoning in animals: a simple new high-performance thin-layer chromatographic (HPTLC) method for the simultaneous determination of eight anticoagulant rodenticides in liver samples, *J Anal Toxicol*. 1995 Nov-Dec;19(7):576-80.
- [23] Jones A. HPLC determination of anticoagulant rodenticide residues in animal livers. *Bull Environ Contam Toxicol*. 1996 Jan;56(1):8-15.
- [24] Robben JH, Kuijpers EA, Mout HC. Plasma superwarfarin levels and vitamin K1 treatment in dogs with anticoagulant rodenticide poisoning. *Vet Q*. 1998 Jan;20(1):24-7.
- [25] Fauconnet V, Pouliquen H, Pinault L., Reversed-phase HPLC determination of eight anticoagulant rodenticides in animal liver, *J Anal Toxicol*. 1997 Nov-Dec;21(7):548-53

- [26] O'Bryan SM, Constable DJ. Quantification of brodifacoum in plasma and liver tissue by HPLC. *J Anal Toxicol.* 1991 May-Jun;15(3):144-7.
- [27] Kelly MJ, Chambers J, MacNicol AD. Simple and rapid method for the determination of the diastereomers of difenacoum in blood and liver using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr.* 1993 Oct 22;620(1):105-12.
- [28] Naidong W, Ring PR, Middlien C, Jiang X. Development and validation of a sensitive and robust LC-tandem MS method for the analysis of warfarin enantiomers in human plasma. *J Pharm Biomed Anal.* 2001 May;25(2):219-26.
- [29] Feng SZ, Zhou HZ, Li YL, Wang FL, Sun J, Liu Y. SPE analysis of 4 rodenticides in whole blood and liver by HPLC. *Fa Yi Xue Za Zhi.* 1999 Feb;15(1):21-2.
- [30] Guan F, Ishii A, Seno H, Watanabe K, Kumazawa T, Suzuki O. A method for simultaneous determination of five anticoagulant rodenticides in whole blood by high-performance liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal.* 1999 Oct;21(1):179-85.
- [31] Felice LJ, Chalermchaikit T, Murphy MJ., Multicomponent determination of 4-hydroxycoumarin anticoagulant rodenticides in blood serum by liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Anal Toxicol.* 15: 126-29 (1991)
- [32] Kuijpers EA, den Hartigh J, Savelkoul TJ, de Wolff FA. A method for the simultaneous identification and quantitation of five superwarfarin rodenticides in human serum. *J Anal Toxicol.* 1995 Nov-Dec;19(7):557-62.
- [33] Chalermchaikit T, Felice LJ, Murphy MJ., Simultaneous determination of eight anticoagulant rodenticides in blood serum and liver, *J. Anal Toxicol.* 1993 Jan-Feb;17(1):56-61
- [34] Lotfi H, Dreyfuss MF, Marquet P, Debord J, Merle L, Lachatre G. A screening procedure for the determination of 13 oral anticoagulants and rodenticides. *J Anal Toxicol.* 1996 Mar-Apr;20(2):93-100.
- [35] Guan F, Ishii A, Seno H, Watanabe-Suzuki K, Kumazawa T, Suzuki O. Use of an ion-pairing reagent for high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry determination of anionic anticoagulant rodenticides in body fluids. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1999 Aug 6;731(1):155-65
- [36] Kollroser M., Schober C., Determination of coumarin-type anticoagulants in human plasma by HPLC-electrospray ionisation tandem mass spectrometry with an ion trap detector, *Clinical Chem.* 48:1, 84-91, (2002)
- [37] de Vries JX, Kymber KA. Thermospray and particle beam liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of coumarin anticoagulants. *J Chromatogr.* 1991 Jan 2;562(1-2):31-8.
- [38] Maurer HH, Arlt JW. 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. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1998 Sep 4;714(2):181-95.
- [39] F. Degel, W. Steimer, H.J. Birkhahn, D. Lampe, U. Demme. Neuroleptika und Antidepressiva, in W. R. Külpmann (Hrsg.): *Handbuch für Labor und Klinik, Klinisch-toxikologische Analytik, Verfahren, Befunde, Interpretationen*, Wiley-VCH, Weinheim, 2002, S. 319-363.
- [40] Wallace S, Worsnop C, Paull P, Mashford ML. Covert self poisoning with brodifacoum, a 'superwarfarin'. *Aust N Z J Med.* 1990 Oct;20(5):713-5.
- [41] Hollinger BR, Pastoor TP. Case management and plasma half-life in a case of brodifacoum poisoning. *Arch Intern Med.* 1993 Aug 23;153(16):1925-8.
- [42] Tecimer C, Yam LT. Surreptitious superwarfarin poisoning with brodifacoum. *South Med J.* 1997 Oct;90(10):1053-5.
- [43] Chow EY, Haley LP, Vickars LM, Murphy MJ. A case of bromadiolone (superwarfarin) ingestion. *CMAJ.* 1992 Jul 1;147(1):60-2.
- [44] Butcher GP, Shearer MJ, MacNicol AD, Kelly MJ, Ind PW. Difenacoum poisoning as a cause of haematuria. *Hum Exp Toxicol.* 1992 Nov;11(6):553-4.

Um die Methode weiter auf Ihre Praxistauglichkeit zu testen, bitten wir um Zusendung von Proben bei Verdacht auf Ingestion der o. a. Vitamin K - Antagonisten.

Für die Analyse werden 0,5 ml Serum/Plasma benötigt.