

Nachweis von 4-Hydroxycumarinderivaten mittels Derivativspektroskopie (Ableitungs-Spektroskopie)

P. Weigert

Veterinär-Untersuchungsstelle der Bundeswehr VI, Schleißheimer Str. 416, D-8000 München 45,
Bundesrepublik Deutschland

Identification of 4-Hydroxycoumarin Derivatives by Means of Derivative Spectroscopy

Summary. Presented here is a rapid method of identifying 4-hydroxycoumarins in organs or blood samples.

Using an ultrasonic homogenizer, a complete analysis is obtained in less than 30 min. Coumarin derivatives are identified by means of derivative UV spectroscopy in the normal spectrum and its first derivation at 340 to 240 nm. HPTLC can be employed as supplementary identification method.

Key words: 4-Hydroxycoumarin, identification – Derivative spectroscopy, coumarin

Zusammenfassung. Vorgestellt wird eine schnelle Nachweismethode für 4-Hydroxycumarine aus Organen oder Blutproben.

Bei Verwendung eines Ultraschallhomogenisators ist die Analyse nach spätestens 30 min abgeschlossen. Die Identifizierung der Cumarinderivate erfolgt durch Derivativ-UV-Spektroskopie im Normalspektrum und dessen 1. Ableitung bei 340–240 nm. Als weiteres Nachweisverfahren kann zusätzlich die HPTLC angewendet werden.

Schlüsselwörter: Cumarinderivate, Nachweis – Derivativspektroskopie, Cumarin

Einleitung

Cumarinderivate werden in großem Umfang als Antikoagulantien verwendet. In der Therapie dienen sie zur Praemedikation bei Operationen zur Vermeidung post-

operativer Thrombosen und Embolien und auch zur Rezidivprophylaxe des Herzinfarktes.

Ein weiteres Anwendungsgebiet ist ihr Einsatz als Schädlingsbekämpfungsmittel, speziell als Rodenticid [3]. Hier ist ihr wesentlicher Vorteil, daß erst nach Stunden oder Tagen die ersten Vergiftungssymptome bzw. Todesfälle auftreten. Dadurch haben sie auf Schadnager und hier vor allem auf Ratten keine abschreckende Wirkung, wie sie z. B. bei Strychnin oder anderen sehr schnell wirkenden Substanzen beobachtet wird. Durch ihre weite Verbreitung und die praktisch freie Zugänglichkeit kommen immer wieder unbeabsichtigte, manchmal aber auch vorsätzliche Vergiftungen von Haustieren, vor allem bei Hunden und Katzen, vor. Die wichtigsten als Rodenticide verarbeitete Cumarinderivate sind folgende 4-Hydroxicumarine:

- Warfarin: 3-(α -Phenyl- β -acetylaethyl)-4-Hydroxicumarin
- Cumachlor: 3-(α -Acetonyl-p-chlorbenzyl)-4-Hydroxicumarin
- Cumatetralyl: 3-(1,2,3,4-Tetrahydro-1-naphtyl)-4-Hydroxicumarin
- Coumafuryl: 3-(α -Furyl- β -acetylaethyl)-4-Hydroxicumarin

Wirkungsmechanismus

Die Cumarinderivate hemmen in der Leber das Apoenzym des Vitamin K und somit die Synthese der Gerinnungsfaktoren V, VII, IX, X und Prothrombin. Aus diesem Angriffspunkt ergibt sich, daß Cumarinderivate nur in vivo und nicht in vitro wirksam werden können und die ersten ernstesten Symptome erst nach 2 bis 3 Tagen auftreten [4].

Derivativ-Spektroskopie

Unter Derivativ-Spektroskopie (Ableitungs-Spektroskopie) versteht man die graphische Darstellung des Differentialquotienten $dE/d\lambda$, wobei E die Extinktion und λ die Wellenlänge ist, über einen bestimmten Wellenlängenbereich. Die 1. Ableitung eines Originalspektrums kann auch als die graphische Darstellung der Steigung der Absorptionskurve in jedem beliebigen Punkt des gemessenen Bereichs definiert werden [7].

Im folgenden wird in Fortsetzung früherer Arbeiten [10] eine schnelle Nachweismethode von 4-Hydroxicumarinen vorgestellt.

Material und Methodik

Zur Ausarbeitung der Nachweismethode wurden Organe eines mit Warfarin vergifteten Hundes eingesetzt, da sich bei früheren Arbeiten die Verwendung von mit Cumarinderivaten präparierten Organen als unzureichend erwiesen hat.

Vorbereitung

Ca. 20 g Gewebe (Leber, Blut, o. ä.) werden im Mörser mit wasserfreiem Natriumsulfat bis zum trockenen Pulver verrieben und mit 150 ml Methanol bei pH 2 versetzt.

Extraktion

Man homogenisiert ca. 10 min mit einem Ultraschallhomogenisator mit maximaler Leistung. Eine zu starke Erwärmung des Homogenates sollte vermieden werden.

Steht kein Ultraschallhomogenisator zur Verfügung, kann man ebenso 1 bis 2 h im Rückflußkühler extrahieren.

Reinigung

Die Methanolphase wird über Natriumsulfat abgenutscht. Zur besseren Ausbeute wäscht man den Rückstand erneut mit saurem Methanol. Die vereinigten Filtrate werden mit Hilfe eines Rotationsverdampfers weitestgehend eingengt. Den so erhaltenen Rückstand schüttelt man 2mal mit je 10 ml Chloroform aus und engt die vereinigten Chloroformphasen auf ca. 1 ml ein.

Identifizierung

Zur sicheren forensischen Identifizierung werden gleichzeitig zwei unabhängige Verfahren angewandt:

1. die Dünnschichtchromatographie, in der Form der HPTLC,
2. die UV-Derivativspektroskopie in 0.ter und 1. Ableitung.

HPTLC

Auf handelsübliche HPTLC-Kieselgelplatten (Merck 5628) wird mittels Strichauftrag ein Aliquot des gereinigten Extraktes und einer Vergleichslösung (Warfarin in Chloroform) aufgetragen. Als Laufmittel werden Essigsäureäthylester und n-Hexan im Verhältnis 4:6 verwendet. Die Detektion erfolgt unter UV-Licht bei 254 nm.

Die Nachweisgrenze dieser DC-Methode ermittelten wir mit 0,4 µg Warfarin in Chloroform pro 1 cm Strichauftrag.

UV-Spektroskopie

Zur Aufnahme eines Derivativspektrums wird ein entsprechend ausgerüstetes 2-Strahl-UV-Photometer benötigt (z. B. Fa. Beckman Modell 25 mit Derivativzusatz). Man nimmt dazu gegen Chloroform in der Referenzküvette nacheinander auf demselben Papierabschnitt von 340 nm bis 240 nm das normale UV-Spektrum und dessen 1. Ableitung sowohl des Extraktes als auch einer Vergleichslösung (Warfarin in Chloroform) auf (Abb. 1).

In der Abbildung erkennt man deutlich die 3 typischen Absorptionspeaks des normalen UV-Spektrums des Warfarins bei 308 nm, 283 nm und 270 nm. Diese 3 Peaks sind in der 1. Ableitung noch deutlicher und schärfer.

Andererseits kann man auf Grund des normalen Spektrum des Extraktes nur eine höchst vage Vermutung über die Anwesenheit von Cumarinderivaten äußern. In der 1. Ableitung des UV-Spektrums dagegen kommen 2 der 3 typischen 4-Hydroxycumarin-Peaks deutlich zum Vorschein. Eine Identifizierung der vermuteten Cumarinderivate ist somit mit relativ großer Sicherheit möglich.

Die Nachweisgrenze der Derivativspektroskopie lag in der 1. Ableitung bei 0,2 µg/g CHCl_3 , im Normalspektrum bei 0,3 µg/g CHCl_3 .

Im Vergleich zu anderen Nachweisverfahren wie der HPLC [2, 9, 5] oder der Gaschromatographie [8, 1, 6] ist der apparative Aufwand bei der von uns verwendeten Derivativspektroskopie deutlich geringer, da in den meisten modernen UV-Spektrometern ein Derivateinsatz entweder serienmäßig vorhanden oder mit geringem Aufwand nachrüstbar ist. Als besonderen Vorteil dieser Derivativspektroskopie ist die Tatsache zu sehen, daß nur wenig Aufwand bei der Reinigung

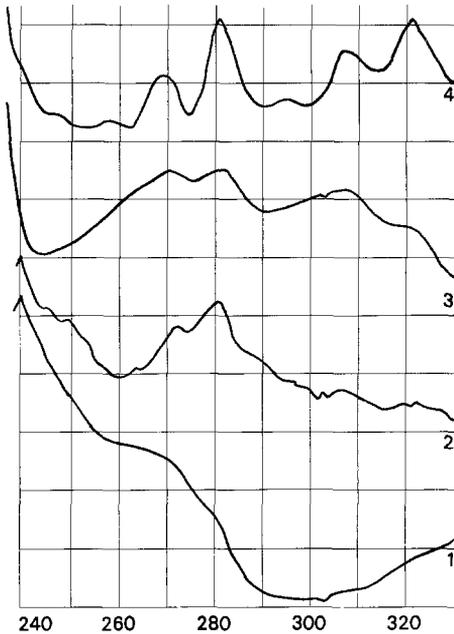


Abb. 1. UV-Spektren von 1 Extrakt Normalspektrum; 2 Extrakt 1. Ableitung; 3 Warfarin Normalspektrum; 4 Warfarin 1. Ableitung

der zu messenden Extrakte getrieben werden muß und dadurch brauchbare Ergebnisse schon nach kurzer Zeit erhalten werden [7]. Bei Verwendung eines Ultraschallhomogenisators dauert der komplette Analysengang maximal 30 min.

Diese kurze Analysenzeit erlaubt den Einsatz der Methode auch in der Klinik zur schnellen Abklärung der Differentialdiagnose „Antikoagulantienvergiftung“ und verhilft damit zu einer schnellen, gezielten Therapie.

Im forensischen Bereich bei der Klärung von Todesfällen nach vermuteter Gifteinwirkung sollte zusätzlich zur Derivativspektroskopie noch ein zweites Verfahren verwendet werden, um eventuelle Störungen durch unbekannte Faktoren ausschließen zu können. Als einfaches, aber trotzdem aussagekräftiges Verfahren bewährt sich hier seit Jahren die Dünnschichtchromatographie in verschiedenen Versionen.

Danksagung. Der Autor dankt Frau Anita Hagemann für die technische Mitarbeit.

Literatur

1. Bianchetti G, Latini R, Morselli PL (1976) Gas chromatographic determination of acenocoumarin in human plasma. *J Chromatogr* 124:331-335
2. Billings TY, Hanks AR, Colvin BM (1976) High-performance liquid chromatographic determination of warfarin. *J AOAC* 59:1104-1108
3. Kammermann-Lüscher B (1978) Cumarinvergiftung bei Hund und Katze. *Schweiz Arch Tierheilkd* 120:231-244
4. Kuschinsky G, Lüllmann H (1967) *Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie*, 3. Aufl. Thieme, Stuttgart

5. Mundy DE, Quick MP, Machin AF (1976) Determination of warfarin in animal relicts and feeding stuffs by high-pressure liquid chromatography with confirmation of identity by mass spectrometry. *J Chromatogr* 121:335-342
6. Odam EM, Townsend MG (1976) The determination of warfarin in animal tissues by electron-capture gas-liquid chromatography. *Analyst* 101:478-484
7. Schmitt A (1977) Derivativ-Spektroskopie. Eine Einführung mit praktischen Beispielen. *Angew UV-Spektrosk*, Heft 1
8. Vande K, de Pooter H, Sumere CF von (1976) Gas chromatographic separation and analysis of trimethylsilyl derivatives of some naturally occurring non-volatile phenolic compounds and related substances. *J Chromatogr* 121:49-63
9. Vanhaelen-Fastré R, Vanhaelen M (1976) High-performance liquid and thin-layer chromatography of coumarin anticoagulants and their degradation products. *J Chromatogr* 129:397-402
10. Weigert P (1979) Toxicological detection of rodenticides and insecticides in asservated organs. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, Suppl 307:23

Eingegangen am 15. Juli 1980