

**Instrumentelle Metabolitenanalytik von
insektiziden Organophosphaten
in biologischem Material**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Nikolai Kupfermann
aus Hamburg

Hamburg 2003

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 1999 bis August 2003 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. H. Steinhart und Herrn Prof. Dr. A. Schmoldt am Institut für Rechtsmedizin, Abteilung Toxikologie, der Universität Hamburg angefertigt.

- 1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. H. Steinhart
- 2. Gutachter: Prof. Dr. A. Schmoldt

Tag der mündlichen Prüfung: 28.08.2003

Herrn Professor Dr. Achim Schmoldt danke ich für die Überlassung des Themas dieser Dissertation und für die Unterstützung meiner Tätigkeit am Institut.

Herrn Professor Dr. Dr. Hans Steinhart aus dem Institut für Lebensmittelchemie und Biochemie der Universität Hamburg danke ich für die Betreuung der Arbeit seitens des Fachbereichs Chemie.

Allen Kolleginnen und Kollegen am Institut für Rechtsmedizin der Universität Hamburg danke ich für die erfolgreiche Zusammenarbeit.

Meiner Familie danke ich ganz herzlich für die moralische Unterstützung und die Anregungen, welche zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Abkürzungsverzeichnis

AChE	Acetylcholinesterase
ACN	Acetonitril
AG	Aktiengesellschaft
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionisation
DAD	Dioden-Array-Detektor
DBP	Dibutylphosphat
DC	Dünnschichtchromatographie
DEDTP	Diethyldithiophosphorsäure
DEP	Diethylphosphorsäure
DETP	Diethylthiophosphorsäure
DMDTP	Dimethyldithiophosphorsäure
DMP	Dimethylphosphorsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMTP	Dimethylthiophosphorsäure
DPDTP	Dipropyldithiophosphorsäure
ECD	Elektroneneinfangdetektor
EI	Elektronenstoßionisation
ELCD	Elektrochemischer Detektor
Fa.	Firma
FID	Flammenionisations-Detektor
FPD	Flammenphotometrischer Detektor
GC	Gaschromatograph
GPC	Gelpermeationschromatographie
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IS	Interner Standard
LD ₅₀	Dosis, die bei 50% der behandelten Versuchstiere zum Tode führt
MS	Massenspektrometer
MSD	Massenselektiver Detektor
MSTFA	N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoracetamid
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
NTE	Neuropathy Target Esterase
OPIDN	Organophosphate induced delayed neuropathy
PSA	Mittelstarker Anionenaustauscher
SAX	Starker Anionenaustauscher
SIM	Single ion mode

SFE	Überkritische Flüssigextraktion
SPE	Solid Phase Extraktion
TBAH	Tetrabutylammoniumhydroxid
TCP	3,5,6-Trichlor-2-pyridinol
TEP	Triethylphosphat
TEPP	Tetraethylpyrophosphat
TFA	Trifluoressigsäureanhydrid
TMAH	Tetramethylammoniumhydroxid
TMP	Trimethylphosphat
TSP	Thermoionischer Detektor
UKE	Universitätskrankenhaus Eppendorf
UV	Ultraviolett

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Allgemeines.....	1
1.2	Aufbau der Organophosphate.....	2
1.3	Metabolisierung der Organophosphate.....	7
1.4	Toxikologie der Organophosphate.....	10
2	Problemstellung.....	19
3	Material.....	20
3.1	Chemikalien.....	20
3.2	Urin- und Blutproben.....	22
3.3	Instrumente.....	22
4	Methoden.....	23
4.1	Präparative Methoden.....	23
4.1.1	Darstellung der Alkylphosphate.....	23
4.1.2	Darstellung der Thioalkylphosphate.....	24
4.1.3	Darstellung der Dithioalkylphosphate.....	24
4.1.4	Darstellung der Hydrazone.....	25
4.1.5	Darstellung der Diazoarylmethane.....	26
4.1.6	Hydrolytische Spaltung intakter Organophosphate.....	26
4.2	Potentiometrie.....	27
4.3	Methoden zur Derivatisierung.....	27
4.3.1	Schwefelsäurealkylester.....	27
4.3.2	Alkyljodide.....	28
4.3.3	Tetraalkylammoniumhydroxidsalze.....	28
4.3.4	Benzylbromide.....	29
4.3.5	Silylierungsreagenzien.....	29
4.3.6	Diazoarylmethane.....	29
4.3.7	Diazoarylmethane und Benzylbromide.....	31
4.3.8	Trifluoressigsäureanhydrid.....	31

4.4	Methoden zur Isolierung.....	32
4.4.1	Flüssig-Flüssig-Extraktion.....	32
4.4.2	Festphasenextraktion (SPE)/Ionenaustausch.....	32
4.4.3	Phasentransfer.....	33
4.4.4	Azeotrope Trocknung.....	34
4.5	Aufarbeitung biologischer Proben.....	34
4.5.1	Urin.....	34
4.5.2	Blut.....	37
4.6	Chromatographische Analytik.....	37
4.6.1	Methoden mittels HPLC.....	37
4.6.2	Methoden mittels GC.....	38
4.6.3	Methoden mittels DC.....	40
5	Ergebnisse.....	41
5.1	Synthese und Prüfung der Dialkylphosphate.....	42
5.2	Derivatisierung der Dialkylphosphate.....	44
5.2.1	Alkylderivate.....	44
5.2.2	Arylderivate.....	49
5.2.3	Silylderivate.....	52
5.2.4	Chromatogramme und Massenspektren der Derivate.....	53
5.2.5	Kombination von Derivatisierungsreagenzien.....	62
5.3	Isolierung der Dialkylphosphate.....	66
5.3.1	Vergleich unterschiedlicher Flüssig-Flüssig-Extraktionen.....	66
5.3.2	Vergleich unterschiedlicher Festphasenextraktionen (SPE)..	67
5.3.3	Vergleich unterschiedlicher Phasentransfer-Extraktionen.....	72
5.3.4	Vergleich unterschiedlicher azeotroper Trocknungen.....	73
5.4	Bestimmung der Dialkylphosphate im Urin.....	75
5.4.1	Probenaufarbeitung.....	75
5.4.2	Mittels GC/MS (Full-Scan).....	76
5.4.3	Mittels GC/MS (SIM).....	79
5.4.4	Quantifizierung von Dialkylphosphaten in asservierten Urinproben	83
5.5	Bestimmung von intakten Organophosphaten im Blut.....	85
5.6	Bestimmung alkoholischer und phenolischer Hydrolyseprodukte der Organophosphate.....	85

5.6.1	Analyse der Organophosphat-Hydrolyseprodukte mittels LC/MS.....	86
5.6.2	Analyse der Organophosphat-Hydrolyseprodukte mittels LC/DAD.....	94
5.6.3	Analyse der Organophosphat-Hydrolyseprodukte mittels GC/MS.....	100
5.6.4	Quantifizierung von p-Nitrophenol im Blut.....	109
5.6.5	Nachweis von Organophosphat-Hydrolyseprodukten im Leichenblut.....	111
6	Diskussion.....	115
6.1	Präparative Methoden.....	115
6.1.1	Dialkylphosphate.....	115
6.1.2	Thiodialkylphosphate.....	120
6.1.3	Dithiodialkylphosphate.....	121
6.2	Analytik der Dialkylphosphate.....	121
6.2.1	Derivatisierung der Dialkylphosphate.....	121
6.2.2	Isolierung der Dialkylphosphate.....	126
6.2.3	Auswahl der Chromatographie und Detektion der Dialkylphosphate.....	128
6.2.4	Bestimmung der Dialkylphosphate im Urin mittels GC/MS....	132
6.3	Bestimmung der intakten Organophosphate im Blut.....	133
6.4	Aryldiazomethane.....	135
6.5	Analytik der phenolischen und alkoholischen Hydrolyseprodukte der Organophosphate.....	138
6.5.1	Quantitative Bestimmung von p-Nitrophenol und entsprechenden Konjugaten im Blut.....	138
6.5.2	Qualitative Bestimmung von Hydrolyseprodukten.....	140
7	Zusammenfassung.....	143
8	Literatur.....	147

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Phosphorige Säure aus Phosphortrioxid.....	2
Abb. 2:	Orthophosphorsäure und Pyrophosphorsäure aus Phosphor- pentoxid.....	2
Abb. 3:	Tetraethylpyrophosphat (TEPP).....	2
Abb. 4:	Phosphonate über Dialkylphosphite.....	2
Abb. 5:	Nervenkampfstoffe.....	3
Abb. 6:	Synthese von Parathion nach Schrader.....	3
Abb. 7:	Chemische Struktur der Phosphorsäureester nach Schrader.....	3
Abb. 8:	Grenzformeln des Nitrobenzols (-M-Effekt).....	5
Abb. 9:	Beziehung zwischen der Acetylcholinesteraseaktivität und Hammett-Konstanten der substituierten Diethylphenylphosphate..	5
Abb. 10:	Metabolische Aktivierung des Parathions zum Paraoxon.....	7
Abb. 11:	Hydrolytische Spaltung des Parathions/Paraoxons.....	8
Abb. 12:	Konjugatbildung von p-Nitrophenol und p-Aminophenol.....	8
Abb. 13:	Sechs mögliche Dialkylphosphate nach hydrolytischer Spaltung von Phosphorsäureestern (Hardt, 1999).....	9
Abb. 14:	Ester- und anionenaktive Zentren der Acetylcholinesterase (Matsumaro, 1985).....	11
Abb. 15:	Bindung von Acetylcholin und Phosphorsäureestern an die Cholinesterase (Matsumaro, 1985).....	11
Abb. 16:	Acetylierung und Phosphorylierung der Cholinesterase (Matsumaro, 1985).....	12
Abb. 17:	Deacetylierung und Dephosphorylierung der Cholinesterase (Matsumaro, 1985).....	12
Abb. 18:	Atropin.....	14
Abb. 19:	Toxogonin.....	15
Abb. 20:	Nucleophiler Angriff eines Oxims auf die phosphorylierte Esterase und anschließender Zerfall des phosphorylierten Oxims in Dialkylphosphat und Nitril.....	15
Abb. 21:	Hydrolytische Reaktivierung bzw. „Alterung“ der AChE bei einer Paraoxon- und Soman-Vergiftung.....	16
Abb. 22:	Elektronenschiebende Alkoxygruppen beim Phosphoryloxim und Phosphonyloxim.....	17
Abb. 23:	Darstellung der Hydrazone.....	25

Abb. 24:	Darstellung der Diazoarylmethane (Beispiel: Diazotoluol).....	26
Abb. 25:	Fließschema der Urinaufarbeitung.....	36
Abb. 26:	Alkylierung der Dialkylphosphate mit Schwefelsäurealkylestern....	45
Abb. 27:	Signalintensitäten der Dialkylphosphate nach Derivatisierung mit Dimethylsulfat mittels GC/MS.....	45
Abb. 28:	Signalintensitäten der Dialkylphosphate nach Derivatisierung mit Diethylsulfat mittels GC/MS.....	46
Abb. 29:	Methylierung der Dialkylphosphate mit TBAH und Jodmethan.....	47
Abb. 30:	Signalintensitäten der Dialkylphosphate nach Derivatisierung mit Jodmethan mittels GC/MS.....	47
Abb. 31:	Signalintensitäten der Dialkylphosphate nach Derivatisierung mit Jodethan mittels GC/MS.....	48
Abb. 32:	Alkylierung der Dialkylphosphate mit Tetraalkylammoniumsalzen.	49
Abb. 33:	Reaktion der Alkylphosphate mit Benzylbromid.....	49
Abb. 34:	Signalintensitäten der Dialkylphosphate nach Derivatisierung mit Benzylbromid mittels GC/MS.....	50
Abb. 35:	Reaktion der Dialkylphosphate mit Diazotoluol.....	50
Abb. 36:	Signalintensitäten der Dialkylphosphate nach Derivatisierung mit Diazoarylmethanen mittels GC/MS.....	51
Abb. 37:	Silylierung der Dialkylphosphorsäuren.....	52
Abb. 38:	Chromatogramm methylierter Dialkylphosphate mit Massenspektrum von DMDTP mittels GC/MS.....	54
Abb. 39:	Chromatogramm ethylierter Dialkylphosphate mit Massenspektrum von DMTP mittels GC/MS.....	55
Abb. 40:	Chromatogramm benzylierter Dialkylphosphate mit Massenspektrum von DMP mittels GC/MS.....	56
Abb. 41:	Chromatogramm pentafluorbenzylierter Dialkylphosphate mit Massenspektrum von DEDTP mittels GC/MS.....	57
Abb. 42:	Chromatogramm von 4-Brombenzylderivaten und Massenspektrum von DEP mittels GC/MS.....	58
Abb. 43:	Chromatogramm von 2-Naphthylmethylderivaten und Massenspektrum von DEDTP mittels GC/MS.....	59
Abb. 44:	Chromatogramm von 2-Chlorbenzylderivaten und Massenspektrum von DMP mittels GC/MS.....	60
Abb. 45:	Chromatogramm von 4-Trifluormethylderivaten und Massenspektrum von DMP mittels GC/MS.....	61

Abb. 46:	Isomerisierung der Thiodialkylphosphate mit Diazoverbindungen.	62
Abb. 47:	Unterschiedliche Benzylierungen der Dialkylphosphate.....	63
Abb. 48:	Unterschiedliche Pentafluorbenzylierungen der Dialkylphosphate	65
Abb. 49:	Wiederfindungsraten für die Dialkylphosphate bei der Flüssig- Flüssig-Extraktion.....	67
Abb. 50:	Wiederfindungsraten der Dialkylphosphate bei der Extraktion mittels SPE/Ionenaustausch.....	72
Abb. 51:	Wiederfindungsrate der Dialkylphosphate bei Extraktion mittels Phasentransfer.....	73
Abb. 52:	Wiederfindungsrate bei der Isolierung der Dialkylphosphate durch azeotrope Trocknung.....	74
Abb. 53:	Chromatogramm vom Extrakt einer dotierten Urinprobe (1 µg/ml) mittels GC/MS (Full-Scan).....	78
Abb. 54:	Chromatogramm vom Extrakt einer dotierten Urinprobe mit 45ng/mL mittels GC/MS im SIM-Mode (interassay).....	81
Abb. 55:	Chromatogramm vom Extrakt einer dotierten Urinprobe mit 450ng/mL im SIM-Mode (intraassay).....	82
Abb. 56:	Hydrolyselösung von Parathion mittels LC/MS (APCI).....	88
Abb. 57:	Hydrolyselösung von Bromophos mittels LC/MS (APCI).....	90
Abb. 58:	Hydrolyselösung von Fenthion mittels LC/MS (APCI).....	91
Abb. 59:	Hydrolyselösung von Chlorpyrifos mittels LC/MS (APCI)	92
Abb. 60:	Hydrolyselösung von Chlorfenvinphos mittels LC/MS (APCI).....	93
Abb. 61:	Hydrolyselösung von Parathion mittels LC/DAD.....	95
Abb. 62:	Hydrolyselösung von Bromophos mittels LC/DAD.....	96
Abb. 63:	Hydrolyselösung von Fenthion mittels LC/DAD.....	97
Abb. 64:	Hydrolyselösung von Chlorpyrifos mittels LC/DAD.....	98
Abb. 65:	Hydrolyselösung von Chlorfenvinphos mittels LC/DAD.....	99
Abb. 66:	Hydrolyselösung von Parathion mittels GC/MS.....	101
Abb. 67:	Hydrolyselösung des Parathions nach Trifluoracetylierung.....	102
Abb. 68:	Hydrolyselösung des Parathions nach Pentafluorbenzylierung.....	103
Abb. 69:	Hydrolyselösung von Bromophos mittels GC/MS.....	104
Abb. 70:	Hydrolyselösung von Bromophos nach Trifluoracetylierung.....	105
Abb. 71:	Hydrolyselösung des Fenthions mittels GC/MS.....	106
Abb. 72:	Hydrolyselösung von Fenthion nach Trifluoracetylierung.....	107
Abb. 73:	Hydrolyselösung von Chlorfenvinphos mittels GC/MS.....	108
Abb. 74:	p-Nitrophenol aus Urin mittels LC/MS/DAD.....	110

Abb. 75: Analyse des mit Organophosphaten dotierten Leichenblutes nach 7 Tagen mittels LC/MS/DAD.....	112
Abb. 76: Nachweis von 2,5-Dichlor-4-bromphenol (241m/z) mittels LC/MS/MS im Leichenblut.....	113
Abb. 77: Chromatogramm vom Extrakt des mit Organophosphaten dotierten Leichenblutes mittels GC/MS.....	114
Abb. 78: Hydrolytische Spaltung von TEPP.....	116
Abb. 79: Alkylierung von Monoalkylphosphaten zu Dialkylphosphaten mit Schwefelsäuredialkylestern.....	116
Abb. 80: Dialkylphosphatbildung durch Hydrolyse von Phosphorsäurediesterchloriden.....	117
Abb. 81: Phosphorsäurediesterchloride über Phosphoroxchlorid.....	117
Abb. 82: Phosphorsäurediesterchloride über Phosphortrichlorid.....	118
Abb. 83: Alkalische Spaltung von Phosphorsäuretriestern zu Diestern.....	118
Abb. 84: Phosphorsäurediester über Triester und Natriumjodid.....	119
Abb. 85: Phosphorsäurediester über Triester und Trimethylamin.....	119
Abb. 86: Phosphorsäurediester über Triester und Thioharnstoff.....	119
Abb. 87: Thiodialkylphosphate über Alkalidialkylphosphite und Schwefel....	120
Abb. 88: Darstellung der Phosphite über Phosphortrichlorid.....	120
Abb. 89: Darstellung freier Thiophosphorsäuren über Thiophosphorsäurechloride.....	120
Abb. 90: Dithioalkylphosphate durch Einwirkung von Alkohol auf di-Phosphorpentasulfid.....	121
Abb. 91: Benzylierte Dialkylphosphate mittels LC/MS.....	131
Abb. 92: Hydrazondarstellung über Hydrazin und Aldehyd.....	135
Abb. 93: Oxidation des Hydrazons zum Diazotoluol.....	136
Abb. 94: Hydrazondarstellung mit Toluolsulfonsäurehydrazid und Aldehyd.....	136
Abb. 95: Aldazinbildung bei der Hydrazondarstellung mit Hydrazin	136
Abb. 96: Azinbildung aus Diazoverbindungen	137
Abb. 97: Fenthion (I) und die Metaboliten (II-VI) und Hydrolyseprodukte (H-I – H-III).....	141

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Organophosphate.....	6
Tab. 2: Toxizität von Organophosphaten.....	10
Tab. 3: Normbereiche für die Aktivität [kU/l] der Serumcholinesterasen mit Butyrylthiocholinjodid als Substrat.....	14
Tab. 4: Lösungsmittel zur Umkristallisation der Hydrazone.....	26
Tab. 5: Reaktionsbedingungen mit Dimethylsulfat.....	27
Tab. 6: Reaktionsbedingungen mit Diethylsulfat.....	28
Tab. 7: Derivatisierungen mit Jodmethan.....	28
Tab. 8: Derivatisierungen mit Jodethan.....	28
Tab. 9: Fraktionierung der p-Brombenzylderivate auf Kieselgel („aktiviert“).....	30
Tab. 10: Fraktionierung der 2-Chlorbenzylderivate auf Kieselgel („aktiviert“).....	30
Tab. 11: Fraktionierung der p-Trifluormethylbenzylderivate auf Kieselgel.....	30
Tab. 12: Fraktionierung der 2-Naphthylmethylderivate auf Kieselgel.....	30
Tab. 13: Fraktionierung der Pentafluorbenzylderivate auf Kieselgel.....	30
Tab. 14: Fraktionierung der Benzylderivate auf Kieselgel.....	30
Tab. 15: Fraktionierung auf Kieselgelsäulen (1g Kieselgel) bei der kombinierten Derivatisierung.....	31
Tab. 16: Sorbentien für die Extraktion der Dialkylphosphate.....	33
Tab. 17: Temperaturprogramme für die Trennung derivatisierter Dialkylphosphate (GC/MS).....	39
Tab. 18: Molekül- und Fragmentationen benzylierter Dialkylphosphate.....	42
Tab. 19: Ausbeuten und Reinheiten der synthetisierten Dialkylphosphate..	44
Tab. 20: Molekül- und Fragmentationen der Methyl- und Ethylderivate.....	48
Tab. 21: Molekül- und Fragmentationen der Arylderivate.....	52
Tab. 22: Silylierungsreagenzien in aufsteigender Stärke.....	53
Tab. 23: Azeotrope Gemische aus Wasser und organischen Lösungsmitteln.....	74
Tab. 24: Analytische Daten zur Full-Scan-Methode.....	77
Tab. 25: Retentionszeiten und gemessene Ionen (m/z).....	79
Tab. 26: Korrelationskoeffizienten und Daten zur Präzision (SIM-Methode)	80
Tab. 27: Dialkylphosphate in Urinproben und Qualitätskontrollen.....	84

Tab. 28: Organophosphate und ihre Hydrolyseprodukte.....	86
Tab. 29: Detektierte Massen in den Hydrolyselösungen der Organophosphate.....	87
Tab. 30: UV-Maxima der Organophosphat-Restgruppen.....	94
Tab. 31: Nachweis von Hydrolyseprodukten mittels GC/MS.....	100
Tab. 32: Zerfall von intakten Organophosphaten in post mortem Material ...	111

1 Einleitung

1.1 Allgemeines

Der Begriff Organophosphate steht für eine Vielzahl von Phosphor-Kohlenstoffverbindungen (P-C), welche mit unterschiedlichen Zielsetzungen verwendet werden. Sie kommen unter anderem als Pflanzenschutzmittel, Weichmacher oder Flammenschutzmittel zur Anwendung. Organophosphate werden häufig als Insektizide in der Landwirtschaft eingesetzt. Zu der Gruppe der insektiziden Organophosphate gehören vor allem die Phosphorsäureester, die sich in der Regel aus einer Dialkylphosphorsäure und einer aciden Estergruppe zusammensetzen. In der Öffentlichkeit sind die Organophosphate durch das Insektizid Parathion mit der Kurzbezeichnung E 605 bekannt geworden. Diese Kennzeichnung stammt aus dem Laborjournal des Erfinders Dr. G. Schrader.

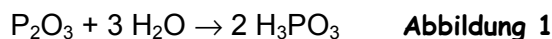
Die insektizide Wirkung verdanken sie ihrer Esterstruktur. Gleichzeitig hat diese Struktur eine geringe Beständigkeit in der Umwelt zur Folge. Phosphorsäureester zerfallen deutlich leichter als die Chlorkohlenwasserstoffe, wie z. B. Dieldrin oder DDT (**Harris, 1969**). Eine Anreicherung und damit verbundene ubiquitäre Verteilung in der Umwelt findet deshalb nicht statt. Ökologisch sind die Organophosphate deshalb gegenüber anderen Insektiziden günstiger.

Die Organophosphate besitzen neben der gewünschten insektiziden Wirkung leider auch eine Toxizität bei Warmblütern. Im menschlichen Organismus wirken sie als Enzymgifte. Die weite Verbreitung der Organophosphate führt deshalb immer wieder zu Intoxikationen. Die Ursachen sind häufig berufliche Expositionen oder suizidale Absichten.

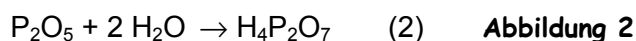
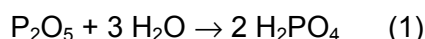
In der analytischen Toxikologie ist es schwierig, eine Organophosphat-Intoxikation zu erkennen, weil die intakten Organophosphate leicht hydrolysieren und im biologischen Material nicht mehr nachweisbar sind. Eine herabgesetzte Cholinesteraseaktivität ist ein Indikator für eine Organophosphat-Intoxikation, kann aber auch durch Carbamate oder eine Leberschädigung hervorgerufen werden. In klinischen Fällen ist deshalb die Analytik der Phosphorsäureester angezeigt, um die therapeutischen Maßnahmen bei einem positiven Befund einzuleiten. Auch im forensischen Bereich ist die eindeutige Aufklärung einer Intoxikation erforderlich. Mit dem Nachweis der Dialkylphosphorsäuren sind die Organophosphate als verantwortliche Insektizidgruppe für eine Intoxikation identifiziert, weil physiologische Quellen für die Dialkylphosphorsäuren bisher nicht bekannt sind.

1.2 Aufbau der Organophosphate

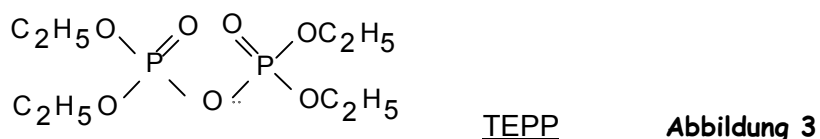
Grundlage für die Synthese von Organophosphorverbindungen sind die Säuren des Phosphors. Eine wichtige Säure ist die phosphorige Säure, welche sich vom Phosphortrioxid P_2O_3 ableitet:



Daneben sind noch die Orthophosphorsäure (1) und die Pyrophosphorsäure (2) von Bedeutung. Sie leiten sich vom Phosphorpentoxid ab:



Der Ester Tetraethylpyrophosphat (TEPP) steht zwischen anorganischer und organischer Chemie.



Clermont (1854) synthetisierte ihn, indem er das Silbersalz der Pyrophosphorsäure mit Ethyljodid umsetzte. Über die physiologischen Eigenschaften der Verbindung war damals noch nichts bekannt. Ein Verwandter des TEPP, das Sulfotepp, ist nach wie vor unter dem Handelsnamen Bladafum® als Insektizid verfügbar. Es handelt sich um den 1,2-Dithiodiphosphorsäure-tetra-O-ethylester, bei welchem die doppelt gebundenen Sauerstoffatome im TEPP durch Schwefel ersetzt wurden.

Michaelis und Becker (1897) synthetisierten ein Phosponat über die Reaktion eines Natriumdialkylphosphits mit Ethyljodid:

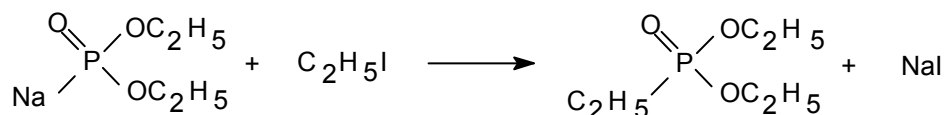


Abbildung 4

Phosphonsäureester gehören wie die Phosphorsäureester zu den Organophosphaten und werden noch heute, wie zum Beispiel das Trichlorfon, als Insektizide eingesetzt.

Lange und Krüger (1932) synthetisierten mit den Silbersalzen der Monofluorphosphorsäure und Ethyljodid die korrespondierenden Ester und wiesen auf die Toxizität dieser Verbindungen hin. Die später entwickelten Organophosphate Sarin und Soman werden aufgrund ihrer extremen Toxizität gegenüber Warmblütern nicht als Insektizide eingesetzt. Die Möglichkeit, sie als chemische Kampfstoffe einzusetzen, gibt ihnen nur aus militärischer Sicht Bedeutung:

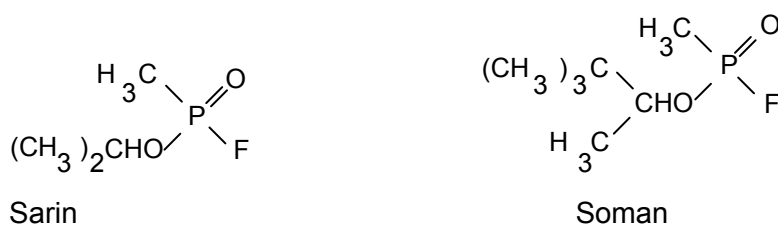


Abbildung 5: Nervenkampfstoffe

Im Jahr 1948 wurde **Schrader** die Synthese des für Warmblüter weit weniger toxischen Parathions (E 605) in der Bundesrepublik Deutschland patentiert. Für die Synthese verwendete Schrader entweder Natriumphenolat und Diethylthiophosphorsäurechlorid, oder die Umsetzung erfolgte mit freiem Phenol in Gegenwart von Triethanolamin.

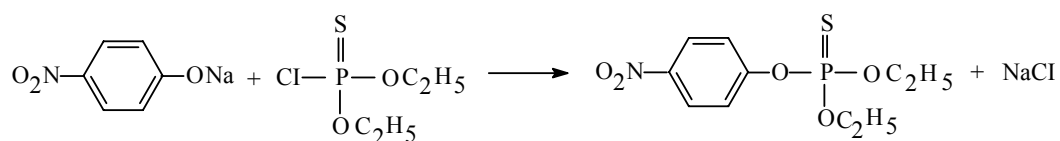


Abbildung 6: Synthese von Parathion nach Schrader

Ähnlich dem Parathion -dem Diethylthiophosphorsäureester des p-Nitrophenols- wurde eine Vielzahl von insektiziden Phosphorsäureestern mit anderen aciden Gruppen hergestellt. Schrader formulierte einen Zusammenhang zwischen der chemischen Struktur eines Phosphorsäureesters (Abbildung 7) und seiner biologischen Wirksamkeit (**Schrader , 1963**):

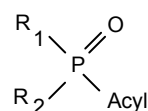


Abbildung 7

Danach müssen folgende Bedingungen für biologisch aktive Phosphorsäureester erfüllt werden:

-Sauerstoff oder Schwefel sind doppelt an den fünfbindigen Phosphor gebunden

-R¹ und R² sind Alkoxy-, Alkyl-, oder Aminogruppen

-Acyl steht in der Regel für O-Aryl, O-Heteroaryl, Enol-, oder S-Alkylgruppen (Tabelle 1). Bei Kampfstoffen steht sie auch für Fluorid und Cyanid.

In dieses Schema passen viele Ester der Phosphor-, Thiophosphor- und Dithiophosphorsäure. Die Hydrolysierbarkeit der Phosphorsäureester bestimmt entscheidend die biologische Aktivität. Abhängig ist die Hydrolyse der Organophosphate vor allem vom Estertyp. Die Ester der Phosphorsäure hydrolysieren leichter als die Ester der Thio- und Dithiophosphorsäure, weil der doppelt gebundene Sauerstoff mit der höheren Elektronegativität das Phosphoratom stärker polarisiert. Deshalb hydrolysieren im alkalischen Milieu P=O-Derivate leichter als die Thionate (P=S). Die insektizide Wirkung der Organophosphate wird bestimmt durch ihre Hydrolysierbarkeit bei physiologischem pH-Wert. Dadurch entfalten die Thionophosphate ihre Wirkung erst nach der Umwandlung in die entsprechenden Phosphate (z.B. Parathion → Paraoxon). Die aciden Arylgruppen prägen ebenfalls die Hydrolysierbarkeit der Phosphorsäureester. Durch einen am Benzolkern gebundenen Substituenten werden sowohl der induktive als auch der mesomere Effekt wirksam. Je höher die Elektronegativität eines Substituenten am Benzolkern ist, desto leichter lässt sich der Phosphorsäureester hydrolysieren. Gleichzeitig erhöht sich damit die Fähigkeit des Organophosphates, die Acetylcholinesterase zu hemmen. **Fukoto** und **Metcalf (1956)** beschrieben die Beziehung zwischen der Acetylcholinesterase-Aktivität und substituierten Diethylphenylphosphaten mit den Hammett-Konstanten (Abbildung 9). Demnach ist ein p-nitrosubstituiertes Organophosphat biologisch aktiver als ein p-methylsubstituiertes Organophosphat. Die Nitrogruppe enthält zum Bindungssystem des Ringes eine in Konjugation stehende Doppelbindung mit einem stark elektronegativen Atom am äußeren Ende (Abbildung 8). So werden dem aromatischen Kern Elektronen entzogen, d.h. die Elektronendichte wird vermindert (-M-Effekt) und die Hydrolyse des Organophosphats erleichtert.

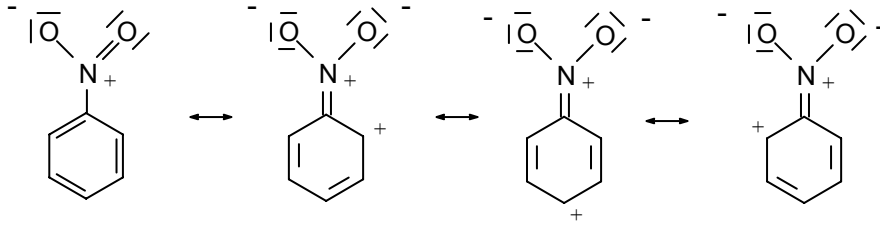


Abbildung 8: Grenzformeln des Nitrobenzols (-M-Effekt)

Alkylgruppen dagegen erhöhen die Elektronendichte im Benzolkern (+I-Effekt) und erschweren somit die Hydrolyse des Organophosphats mit p-Methylphenol als acider Gruppe.

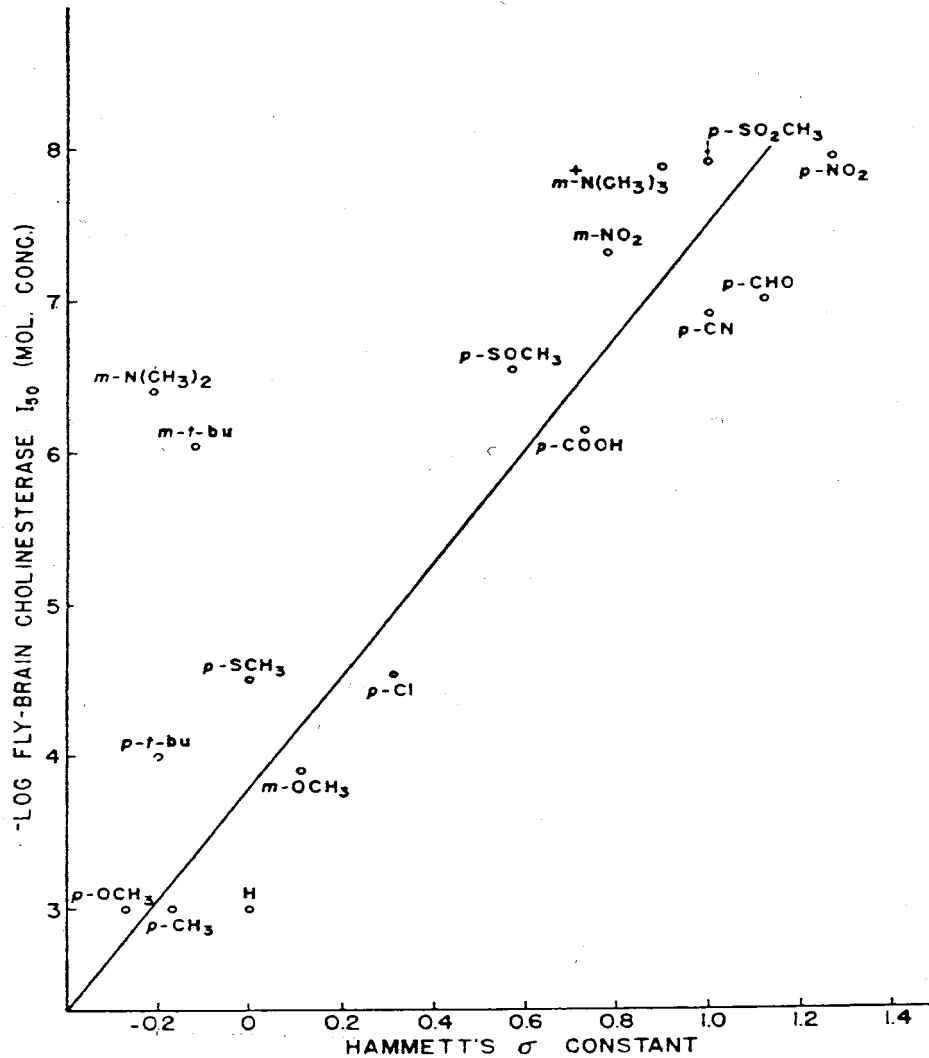
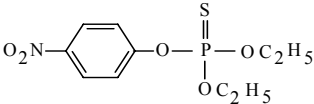
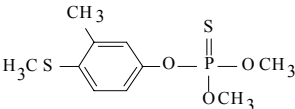
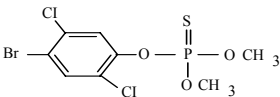
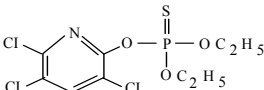
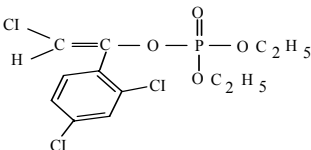
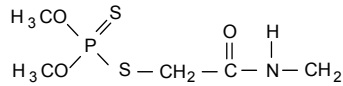


Abbildung 9: Beziehung zwischen der Acetylcholinesteraseaktivität und Hammett-Konstanten der substituierten Diethylphenylphosphate (Fukoto und Metcalf, 1956)

Tabelle 1: Organophosphate

Oganophosphat	Produktinformationen
<i>Trivialname</i>	Handelsname
Parathion  <chem>CCOP(=S)(OCC)Oc1ccc([N+](=O)[O-])cc1</chem> Acyl = O-Aryl	<i>Chemische Bezeichnung:</i> O,O-Diethyl-O-4-nitrophenylthiophosphat <i>Handelsprodukt:</i> E 605 forte, Bayer AG <i>Verwendungszweck:</i> Insektizid, Akarizid
Fenthion  <chem>COP(=S)(OC)Oc1cc(C)cc(SC)c1C</chem> Acyl = O-Aryl	<i>Chemische Bezeichnung:</i> O,O-Dimethyl-O-4-methylthio-m-tolylthiophosphat <i>Handelsprodukt:</i> Lebaycid, Bayer AG <i>Verwendungszweck:</i> Insektizid
Bromophos  <chem>COP(=S)(OC)Oc1cc(Br)cc(Cl)c1Cl</chem> Acyl = O-Aryl	<i>Chemische Bezeichnung:</i> O,O-Dimethyl-O-(2,5-dichlor-4-bromphenyl)thiophosphat <i>Handelsprodukt:</i> Nexion, SAG <i>Verwendungszweck:</i> Insektizid
Chlorpyrifos  <chem>CCOP(=S)(OCC)Oc1cc(Cl)c(Cl)c(Cl)n1</chem> Acyl = O-Heteroaryl	<i>Chemische Bezeichnung:</i> O,O-Diethyl-O-(3,5,6-trichlor-2-pyridyl)thiophosphat <i>Handelsprodukt:</i> Dursban, Dow AgroSciences <i>Verwendungszweck:</i> Insektizid
Chlorfenvinphos  <chem>CCOP(=O)(OCC)OC=Cc1cc(Cl)cc(Cl)c1</chem> Acyl = Enol	<i>Chemische Bezeichnung:</i> 2-Chlor-1-(2,4-dichlorphenyl)vinyl-diethylphosphat <i>Handelsprodukt:</i> Birlane, BASF AG <i>Verwendungszweck:</i> Insektizid
Dimethoat  <chem>COP(=S)(OC)SSC(=O)NC</chem> Acyl = S-Alkyl	<i>Chemische Bezeichnung:</i> O,O-Dimethyl-S-(2-methylamino-2-oxoethyl)-dithiophosphat <i>Handelsprodukt:</i> Perfekthion BASF AG <i>Verwendungszweck:</i> Insektizid

1.3 Metabolisierung der Organophosphate

Lipophile Substanzen, welche vom Organismus aufgenommen werden, müssen in hydrophilere und damit leichter ausscheidbare Verbindungen umgewandelt werden. Körpereigene Enzymsysteme wandeln die fettlöslichen Verbindungen entsprechend um. Diese Umwandlungsprozesse finden vor allem in der Leber statt. Die wichtigsten Biotransformationswege, die auf die Organophosphate einwirken, sind Oxidation, Hydrolyse und Konjugation.

Dabei muß die Veränderung der chemischen Struktur nicht immer mit einer Entgiftung verbunden sein. Häufig findet durch die Metabolisierung eine „Aktivierung“ statt, wodurch erst die toxische Wirkung entsteht. Beispiele hierfür sind die Oxidation von Phosphorsäurethioestern (z. B. Parathion) zu Phosphorsäureestern oder die Umwandlung von Thioethern (z. B. Fenthion) zu Sulfoxiden oder Sulfonen.

Am Beispiel des Parathions sollen die wesentlichen Stoffwechselvorgänge gezeigt werden. Eine bedeutende Metabolisierung ist die Oxidation des Thionoesters in die Oxo-Form:

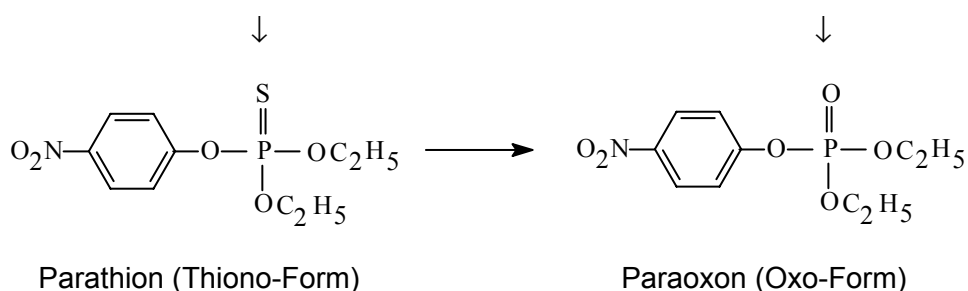


Abbildung 10: Metabolische Aktivierung des Parathions zum Paraoxon

Dieser Oxidationsprozeß dient nicht der Entgiftung. Das Paraoxon ist als Inhibitor der Acetylcholinesterase viel wirksamer als das Parathion. Neben der Oxidation findet auch eine hydrolytische Spaltung der Phosphorsäureester statt. Die Spaltung kann chemisch oder enzymatisch erfolgen. In vivo ist nur die enzymatische Spaltung von Bedeutung. Dabei wird Parathion bzw. Paraoxon in p-Nitrophenol und Diethylthio- bzw- Diethylphosphat gespalten.

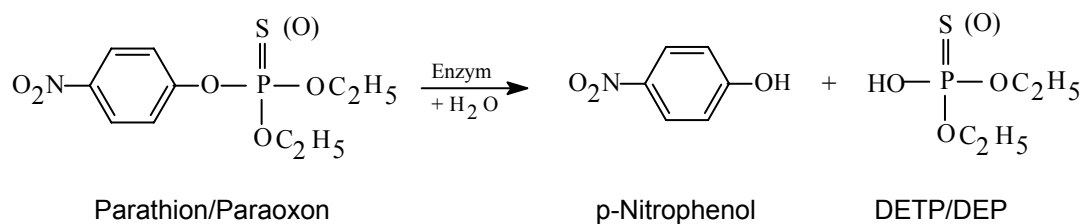


Abbildung 11: Hydrolytische Spaltung des Parathions/Paraoxons

Die Hydroxylgruppe des p-Nitrophenols ermöglicht die Konjugatbildung. Dadurch wird die Wasserlöslichkeit des Phenols erhöht und die Ausscheidung damit erleichtert. Beim p-Nitrophenol besteht noch die Möglichkeit der Reduktion. Das resultierende p-Aminophenol kann, wie das p-Nitrophenol, als Sulfat- oder Glucuronidkonjugat vorliegen:

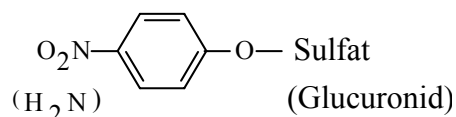


Abbildung 12: Konjugatbildung von p-Nitrophenol und p-Aminophenol

Alle Organophosphate metabolisieren unter Freisetzung von Alkylphosphorsäuren. Physiologische Quellen für diese Verbindungen sind bisher nicht bekannt, deshalb ist ihr Nachweis ein eindeutiger Beweis für die Aufnahme von Organophosphaten. Im intakten Organophosphat können Phosphor-, Thiophosphor- und Dithiophosphorsäurekomponenten enthalten sein. Dementsprechend sind bei einer Organophosphat-Intoxikation eine oder mehrere der in Abbildung 13 abgebildeten Säuren nachweisbar.

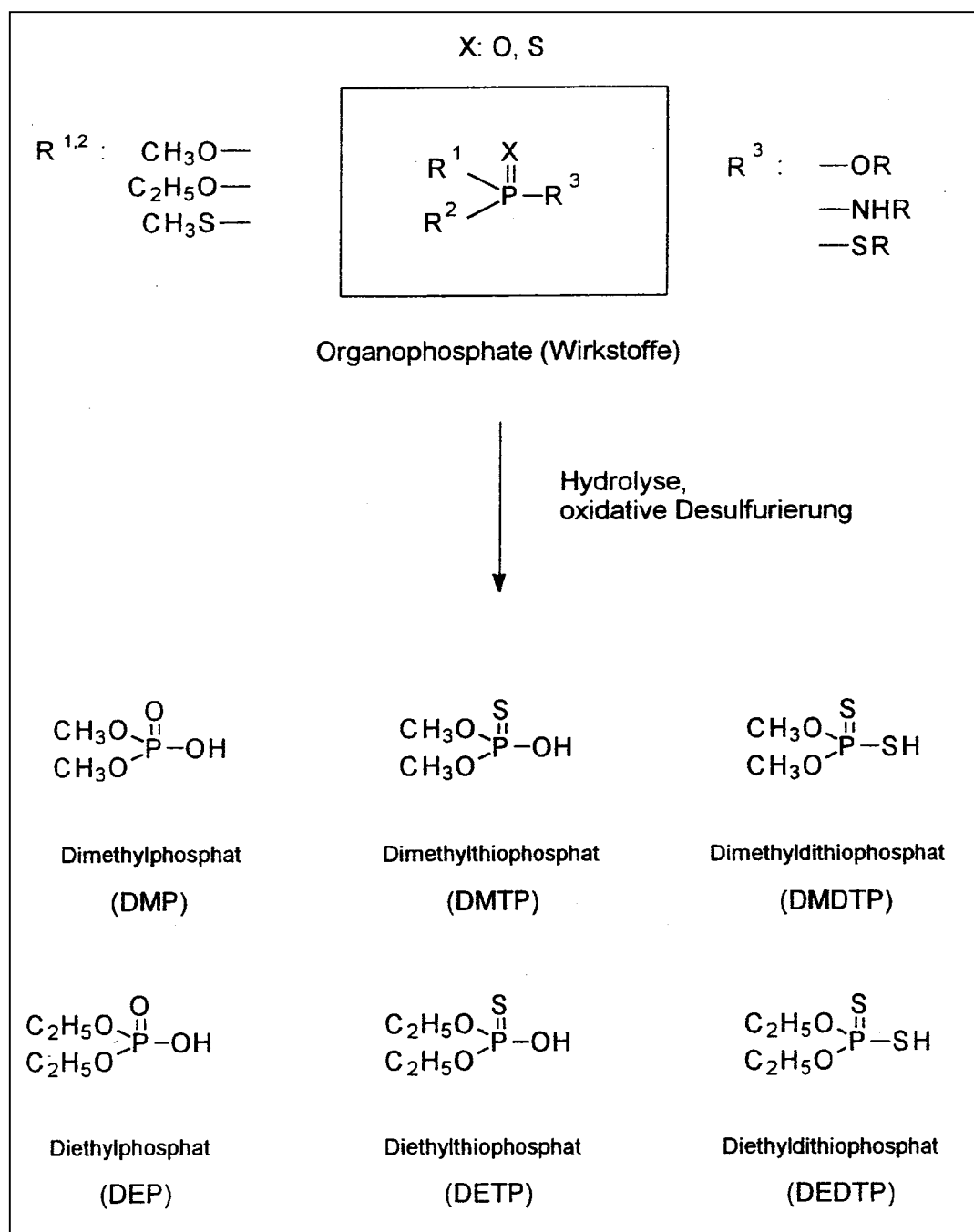


Abbildung 13: Sechs mögliche Dialkylphosphate nach hydrolytischer Spaltung von Organophosphat-Insektiziden (Hardt, 1999)

1.4 Toxikologie der Organophosphate

Organophosphate werden als Kontakt- und Systeminsektizide eingesetzt. Die Toxizität der einzelnen Phosphorsäureester ist sehr unterschiedlich, je nachdem, wie schnell sie verstoffwechselt und damit entgiftet werden können. Tabelle 2 zeigt einige Organophosphate und die LD₅₀-Werte bei Ratten.

Tabelle 2: Toxizität von Organophosphaten (Industrieverband Agrar, 2000 und Stark, 1984)

Organophosphat	LD ₅₀ (Ratte)	Organophosphat	LD ₅₀ (Ratte)
Parathion	12mg/kg (oral)	Chlorfenvinphos	30 mg/kg (oral)
Fenthion	250mg/kg (oral)	Dimethoat	300 mg/kg (oral)
Heptenophos	121mg/kg m (oral) 96mg/kg w (oral)	Fenitrothion	330mg/kg m (oral) 800mg/kg w (oral)
Chlorpyrifos	163 mg/kg m (oral) 135 mg/kg w (oral)	Dichlorvos	56-80 mg/kg (oral)
Sarin (Nervenkampfstoff)	0,1 mg/kg (intramuskulär)	Soman (Nervenkampfstoff)	0,08mg/kg (intramuskulär)

Die Lipophilie der Organophosphate ist im allgemeinen so gut, dass sie sowohl perkutan (durch die Haut) als auch enteral (im Magen-Darmtrakt) gut resorbiert werden können. Organische Lösungsmittel und pflanzliche Öle steigern die Resorptionsgeschwindigkeit beträchtlich. Bereits nach wenigen Minuten (Inhalation), ¼ - 1 Stunde (Verschlucken) oder 2-3 Stunden (Hautresorption) werden toxische Konzentrationen im Blut erreicht. Bei den indirekt wirksamen Organophosphaten (z.B. Parathion), die zunächst metabolisch aktiviert werden müssen, setzen die Vergiftungssymptome entsprechend verzögert ein. Organophosphate gelangen auch in das Gehirn, eine Speicherung in bestimmten Geweben findet nicht statt.

Die Toxizität der Phosphorsäureester beruht auf der Hemmung der Acetylcholinesterase. Acetylcholin ist ein Neurotransmitter und gehört zu den Überträgersubstanzen, die den Nervenreiz chemisch weiterleiten. Am Nervenende werden durch einen elektrischen Reiz Acetylcholin-Moleküle freigesetzt. Diese übertragen als Transmitter die Erregung auf den nächsten Nerven oder ein Organsystem (synaptischer Spalt).

Die Acetylcholin-Moleküle diffundieren durch den Spalt, belegen anschließend Rezeptoren und lösen dadurch einen Reiz am Empfängerorgan aus. Nachdem diese Information abgegeben ist, müssen die reizerregenden Acetylcholinmoleküle aus der Umgebung und von den Rezeptoren wieder entfernt werden. Acetylcholin wird in Cholin und Essigsäure enzymatisch gespalten, und die Rezeptoren sind für neue Signale wieder frei.

Die Cholinesterase besitzt zwei aktive Zentren, um das Substrat Acetylcholin zu binden. Phosphorsäureester ähneln der molekularen Struktur des Acetylcholins und werden deshalb von der Cholinesterase in gleicher Weise gebunden (Abbildung 14).

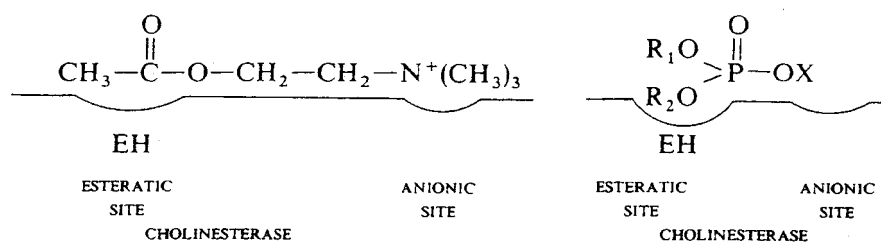


Abbildung 14: Ester- und anionenaktive Zentren der Acetylcholinesterase (Matsumaro, 1985)

Die Reaktion der Cholinesterase mit Organophosphaten verläuft in den ersten Schritten analog der Hydrolyse des Acetylcholins. Dabei bindet das esteraktive Zentrum das Kohlenstoffatom des Acetylrestes vom Acetylcholin oder das Phosphoratom eines Phosphorsäureesters. Das anionische Zentrum bindet das positiv geladene Stickstoffatom des Acetylcholins. In manchen Fällen finden sich auch bei den Organophosphaten vergleichbare kationische Eigenschaften (Abbildung 15).

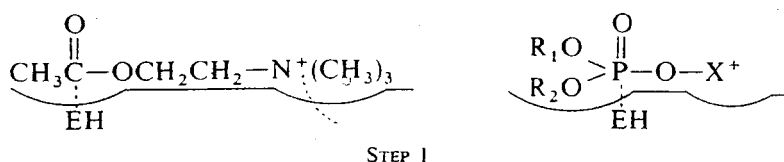


Abbildung 15: Bindung von Acetylcholin und Phosphorsäureestern an die Cholinesterase (Matsumaro, 1985)

Im zweiten Schritt wird ein Wasserstoffatom von der esteraktiven Seite der Cholinesterase auf den Cholin-Teil des Acetylcholins bzw. auf die acide Estergruppe des Phosphorsäureesters übertragen.

Anschließend kommt es zur Abspaltung des Cholins (bei der Spaltung von Acetylcholin) oder der aciden Gruppe eines Organophosphats. Dieser Vorgang wird bei der Spaltung des Acetylcholins als Acetylierung und bei der Hydrolyse des Organophosphats als Phosphorylierung bezeichnet (Abbildung 16).

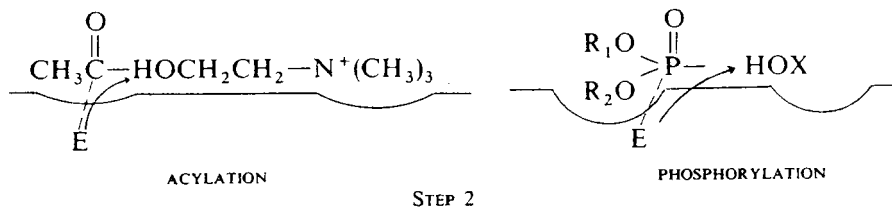


Abbildung 16: Acylierung und Phosphorylierung der Cholinesterase (Matsumaro, 1985)

In einem weiteren Schritt wird das acetylierte oder phosphorylierte Enzym mit Wasser hydroxyliert. Anschließend fehlt die Analogie zwischen der Hydrolyse von Acetylcholin und Phosphorsäureestern. Der Prozeß der Deacetylierung des Enzyms verläuft sehr schnell, wogegen die Dephosphorylierung sehr viel Zeit in Anspruch nimmt. Nach Abspaltung des Acetylrestes ist der Ausgangszustand des Enzyms wieder hergestellt, das phosphorylierte Enzym hingegen ist für längere Zeit gehemmt. Dieser Schritt macht Phosphorsäureester zu sehr effektiven Cholinesterase-Inhibitoren (Abbildung 17).

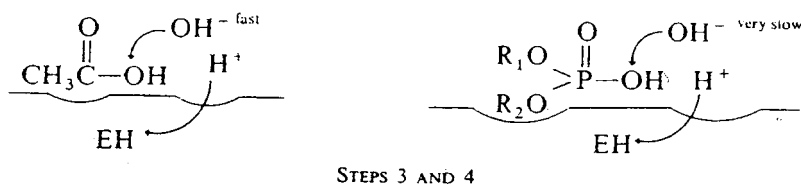


Abbildung 17: Deacetylierung und Dephosphorylierung der Cholinesterase (Matsumaro, 1985)

Wenn durch die Phosphorylierung die Cholinesterase blockiert ist, kann Acetylcholin nicht mehr gespalten werden. Dadurch belegen Acetylcholin-Moleküle die Rezeptoren länger als vorgesehen. Es kommt zu einer fortwährenden Reizung, die unkontrollierte, für den Organismus schädliche oder gefährliche Organreaktionen auslöst.

Dabei ergeben sich muskarinartige Wirkungen an den parasympathischen Nervenendigungen wie z. B. erhöhter Speichelfluß, Koliken, Durchfälle, Erbrechen und Blutdrucksenkung. An den vegetativen Ganglien und an der motorischen Endplatte zeigen sich nikotinartige Wirkungen wie Muskelsteife, Sprach- und Bewußtseinsstörungen.

Die Toxizität eines Organophosphats ergibt sich aus dessen Struktur. Dabei spielen die Lipophilie, die Affinität zum Enzym und die Hydrolysierbarkeit der Verbindung eine entscheidende Rolle. Mit erhöhter Lipophilie steigt auch die Aufnahme durch die Haut und durch die Schleimhaut des Magen-Darmtraktes. Außerdem verbessert die Lipophilie das Eindringen in die Synapsen (Kontaktstellen zwischen Nervenendigung und Rezeptor) sowie in das Zentralnervensystem. Die Affinität zum Enzym steigt durch strukturelle und polare Eigenschaften, welche beispielsweise die Anlagerung an das anionische Zentrum des Enzyms ermöglichen. Die Hydrolysierbarkeit des Organophosphats ist ein weiterer Parameter für die toxische Wirkung. Eine frühzeitige Spaltung vermindert die verfügbare Konzentration der biologisch aktiven Verbindung, weil die gebildeten Spaltprodukte unwirksam sind. Bei den Thionophosphaten (z. B. Parathion) tritt eine Esterspaltung erst ein, nachdem die Thiono- in eine Oxogruppe überführt worden ist. Da diese Verbindungen somit nicht direkt sondern erst nach metabolischer Aktivierung wirksam werden, nennt man sie auch „indirekte“ Inhibitoren. Phosphatester, welche außer der aciden Esterkomponente eine zweite, leicht hydrolysierbare Komponente besitzen, sind extrem toxisch, da nach Abspaltung dieser Gruppe die Enzym-Phosphat-Bindung überhaupt nicht mehr hydrolysiert werden kann und somit das Enzym irreversibel gehemmt ist. Diesen Vorgang nennt man „Alterung“ des Enzyms. Solche Organophosphate dienen als chemische Kampfstoffe (Sarin, Soman).

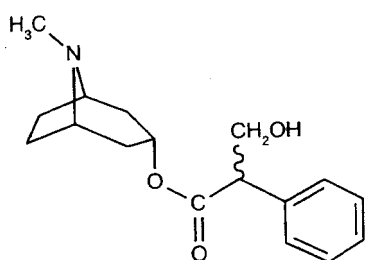
Eine akute Vergiftung liegt vor, wenn die Acetylcholinesterase-Aktivität auf 20% ihres Normalwertes abgefallen ist. Die Aktivität der Acetylcholinesterase kann photometrisch gemessen werden. Dabei wird Butyrylthiocholinjodid katalytisch von der Cholinesterase gespalten. Nach anschließender Reaktion mit einem geeigneten Reagenz wird in Abhängigkeit der Zeit die Extinktionszunahme gemessen und daraus die Aktivität des Enzyms bestimmt. **Prellwitz et al. (1976)** geben folgende Normbereiche für die Serumcholinesterase-Aktivität an:

Tabelle 3: Normbereiche für die Aktivität [kU/I] der Serumcholinesterasen mit Butyrylthiocholinjodid als Substrat

	25°C	30°C	37°C
Frauen	2,0 - 6,7	2,4 - 8,3	3,0 - 10,3
Männer	2,3 - 7,4	2,8 - 9,1	3,5 - 11,4

Bei den Cholinesterasen unterscheidet man zwischen der spezifischen (Acetylcholinesterase, AChE) und der unspezifischen Cholinesterase (Pseudocholinesterase). Letztere befindet sich im Plasma und nicht, wie die AChE, in den Erythrozyten. Die unspezifische Cholinesterase hydrolysiert Acetylcholin wesentlich langsamer als andere Cholinester. Deshalb spielt die Aktivität der Pseudocholinesterase nur eine untergeordnete Rolle bei einer Intoxikation. Phosphorsäureester hemmen, je nach Typ, die unspezifische Cholinesterase stärker oder schwächer als die Acetylcholinesterase. Weil bei der Aktivitätsbestimmung beide Cholinesterasen erfasst werden, kann die gemessene AChE-Aktivität irreführend hinsichtlich der Einschätzung einer Intoxikation sein.

Zur Therapie einer Organophosphat-Vergiftung gehört zunächst die Gewährleistung der Atmung, die Kreislaufstabilisierung und die Behandlung der Symptome mit Atropin (Abbildung 18). Diese Maßnahmen werden durch die Bindung an Aktivkohle und Magenspülungen unterstützt. Atropin lagert sich an die muscarinartigen Cholinrezeptoren, ohne dabei eine Rezeptorerregung auszulösen. Damit die Acetylcholinrezeptoren nicht andauernd Signale aussenden – und das tun sie, solange der Acetylcholinüberschuß nicht abgebaut ist – werden sie durch Atropin blockiert.

**Abbildung 18: Atropin**

Der nächste Schritt der Therapie ist darauf gerichtet, die Acetylcholinesterase zu reaktivieren. Hierfür werden Oxime, vor allem das Toxogonin (Abbildung 19) als Antidot verwendet.

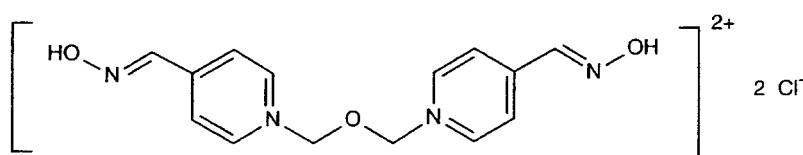


Abbildung 19: Toxogonin

Es ist in der Lage, das phosphorylierte Enzym nucleophil anzugreifen, weil beim physiologischen pH-Wert von 7,4 eine Hydroxygruppe deprotoniert vorliegt. Dadurch wird der störende Phosphorylrest vom Enzym gelöst. Die Reaktivierung durch Oxime beruht zum großen Teil auf deren Fähigkeit, nach Übernahme des Phosphorylrestes anschließend schnell in die ungiftigen Spaltprodukte Dialkylphosphat und Nitril zu zerfallen (Abbildung 20). Zerfällt das phosphorylierte Oxim nicht schnell genug, kann in einer gleichberechtigten Rückreaktion gerade erst reaktivierte Esterase wieder vom Phosphoryloxim angegriffen und so erneut gehemmt werden. Die Reaktivierung des Enzyms ist auch nur möglich, wenn das Enzym noch nicht „gealtert“ ist, deshalb muß die Therapie mit Oximen rechtzeitig erfolgen.

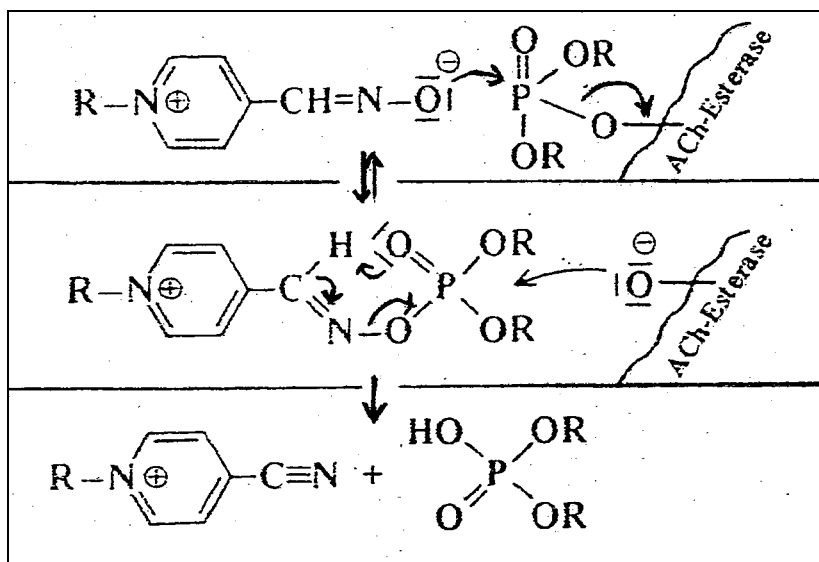


Abbildung 20: Nucleophiler Angriff eines Oxims auf die phosphorylierte Esterase und anschließender Zerfall des phosphorylierten Oxims in Dialkylphosphat und Nitril (Stark, 1984)

Die Enzymreaktivierung mit Toxogonin gelingt allerdings nicht bei allen Organophosphaten. Insbesondere bei den Kampfstoffen, z. B. Soman, versagt die Therapie.

Ursache hierfür ist die schnelle „Alterung“ der Acetylcholinesterase bei einer Soman-Vergiftung im Vergleich zu einer Vergiftung mit Paraoxon. Nach einer Paraoxon-Intoxikation ist das Enzym AChE phosphoryliert. Der Abbau durch Ablösung des Dialkylphosphats vom Enzym ((2) Abbildung 21a) oder die Ablösung einer Ethylgruppe ((1) Abbildung 21a) ist sehr langsam. Bei einer Soman-Vergiftung dagegen kann von dem enzymblockierenden Phosphonylrest in einer schnellen Abbaureaktion Pinakolylalkohol abgespalten werden ((3) Abbildung 21b).

Die in Abbildung 21 aufgeführten Abbauwege (1) und (3) stellen ein „gealtertes“ Enzym dar und können mit Oximen nicht mehr nucleophil reaktiviert werden.

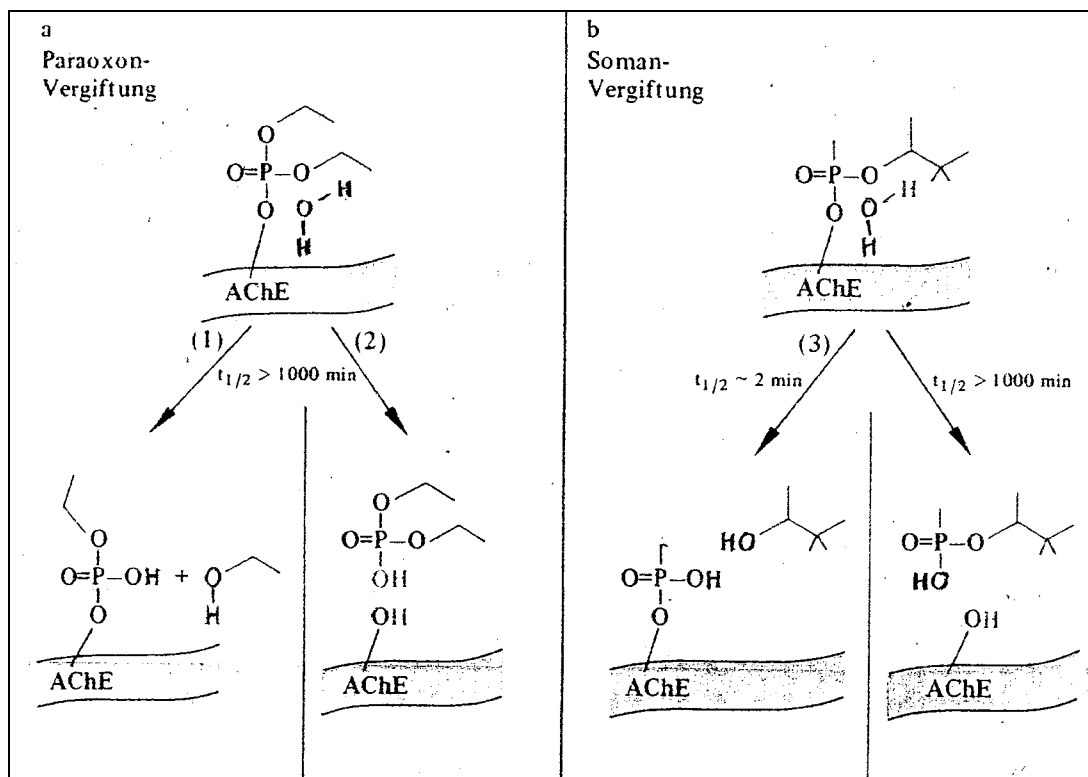


Abbildung 21: Hydrolytische Reaktivierung bzw. „Alterung“ der AChE bei einer Paraoxon- und Soman-Vergiftung (Stark, 1984)

Hinzu kommt, dass Phosphoryloxime (bei einer Paraoxon-Vergiftung) wesentlich schneller zerfallen als Phosphonyloxime (bei einer Soman-Vergiftung). Dadurch wird bei einer Soman-Intoxikation eine Konkurrenzreaktion begünstigt, welche es der Acetylcholinesterase ermöglicht, nucleophil das partial geladene Phosphoratom im Phosphonyloxim anzugreifen. Die Folge ist wieder eine gehemmte Acetylcholinesterase. Zu erklären ist dies mit der unterschiedlichen Elektronendichte des doppelt gebundenen Sauerstoffs in der Phosphorgruppe.

Bei einem Phosphorylrest erhöhen zwei elektronenschiebende Alkoxygruppen die Elektronendichte und erleichtern dem doppelt gebundenen Sauerstoff den Angriff auf aktiven Wasserstoff in einem Phosphoryloxim. Die Folge eines solchen Angriffs ist der schnelle Zerfall des Phosphoryloxims in eine Dialkylphosphorsäure und ein Nitril. In einem Phosphonylrest befindet sich nur eine elektronenschiebende Alkoxygruppe.

Aufgrund der fehlenden Elektronendichte greift der doppelt gebundene Sauerstoff am Wasserstoffatom des Oxims nur zögerlich an und der entgiftende Zerfall läuft nur langsam ab (Abbildung 22).

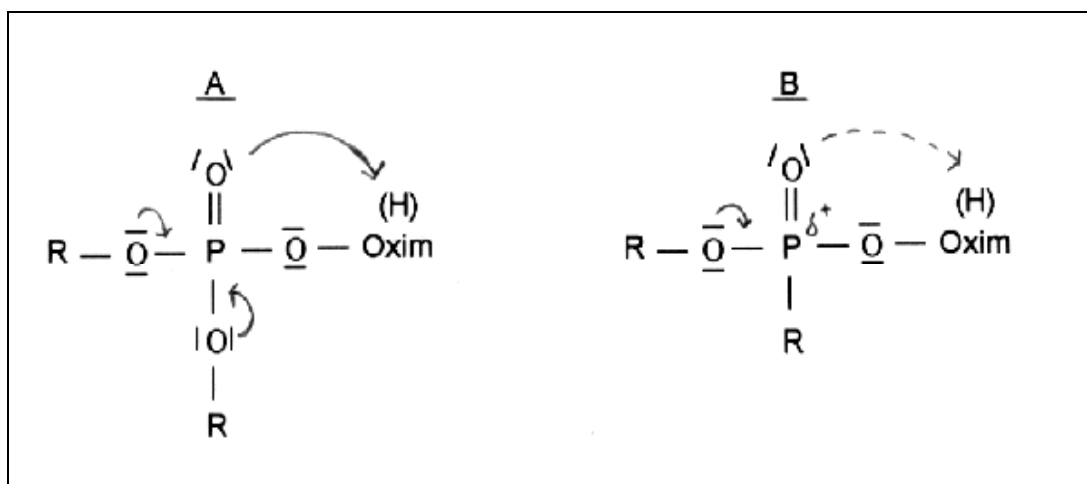


Abbildung 22: Zwei elektronenschiebende Alkoxygruppen beim Phosphoryloxim erleichtern den Angriff des Sauerstoffs auf den Oxim-Wasserstoff (A). Beim Phosphonyloxim wird dieser Angriff durch eine fehlende Alkoxygruppe erschwert (B).

Herkömmliche Oxime reaktivieren zwar die Acetylcholinesterase, welche phosphoryliert wurde (Paraoxon), sind aber fast wirkungslos bei phosphonylierter Esterase (Soman).

Einige Organophosphate hemmen neben der Acetylcholinesterase auch die Neuropathy Target Esterase (NTE). Die Folge ist eine verzögerte Neuropathie (OPIDN = organophosphate induced delayed neuropathy). OPIDN verursachende Organophosphate werden in Typ I und Typ II unterteilt. Beim Typ I handelt es sich um Verbindungen mit einem fünfbindigen Phosphoratom, und bei Typ II ist das Phosphoratom dreifach gebunden. Als Vertreter dieser Stoffe gelten Tri-o-Kresylphosphat (Typ I) und Triphenylphosphit (Typ II). Tri-o-Kresylphosphat wurde als Weichmacher und Flammschutzmittel eingesetzt.

Zu einer Massenvergiftung mit Tri-ortho-kresylphosphat beim Menschen kam es 1930 in den USA durch verunreinigten alkoholischen Ingwerextrakt.

Die auftretenden Lähmungen wurden als „Jamaica Ginger Paralysis“ bekannt. Strukturell lassen sich die meisten insektiziden Organophosphate, sofern sie neurotoxisch sind, dem Typ I zuordnen. Die Neurotoxizität äußert sich in aufsteigenden Lähmungen, welche die Folge von degenerierten Axonen sind. Die Axonopathien treten erst nach Tagen auf und müssen nicht mit einer Hemmung der Acetylcholinesterase einhergehen.

2 Problemstellung

Durch berufliche Exposition, Unfälle oder in suizidaler Absicht kommt es immer wieder zu Intoxikationen mit Organophosphaten. Eine verminderte Acetylcholinesteraseaktivität ist ein Indikator für eine Intoxikation mit Organophosphaten, sie kann aber auch durch Carbamate oder Leberversagen hervorgerufen werden. Der Beweis einer Organophosphat-Intoxikation kann nur durch die Identifizierung der intakten Phosphorsäureester oder der entsprechenden Metaboliten erfolgen. Da die Phosphorsäureester sehr leicht hydrolysieren, können sie häufig im organischen Material nicht mehr nachgewiesen werden. Für die Dialkyl-, Dialkylthio- und Dialkyldithioalkylphosphorsäuren sind physiologische Quellen bisher nicht bekannt, deshalb belegt ihr Nachweis eine Organophosphat-Intoxikation.

Zu den wichtigsten Organophosphat-Metaboliten gehören die Dialkylphosphate DMP, DEP, DMTP, DMDTP, DETP und DEDTP. Der überwiegende Teil dieser Metaboliten befindet sich im Urin.

Als Referenzsubstanzen sind die Alkylphosphate nur teilweise kommerziell erhältlich, so daß eine präparative Darstellung einiger Dialkylphosphorsäuren erforderlich ist.

Zur Bestimmung müssen die Phosphor-, Thiophosphor- und Dithiophosphorsäuren aus der Urinmatrix isoliert werden. Anschließend müssen sie derivatisiert werden, so daß eine gaschromatographische Bestimmung mit anschließender massenselektiver Detektion für die eindeutige Identifizierung möglich ist.

Bisherige Methoden basieren vor allem auf Flüssig-Flüssig-Extraktionen mit anschließender Derivatisierung für die Gaschromatographie. Dabei werden häufig nicht alle Alkylphosphate, vor allem DMP und DEP, zufriedenstellend erfasst. Die bisher beschriebenen Verfahren sind für forensische Untersuchungen geeignet, nehmen aber für klinische Fälle zu viel Zeit in Anspruch.

Ziel dieser Arbeit war es, eine Metabolitenanalytik zu erstellen, welche es ermöglicht, die sechs Dialkylphosphate hinreichend schnell und genügend empfindlich für Intensivstationen zu analysieren. Sind intakte Organophosphate aufgrund fortgeschrittener Hydrolyse nicht mehr nachweisbar, wäre neben der Bestimmung der Alkylphosphorsäuren die Identifizierung des Phosphorsäureesters über den Nachweis der aciden Gruppe hilfreich.

3 Material

3.1 Chemikalien

<u>Sigma-Aldrich (Seelze)</u>	
-Amberlite (IR) 120	-Jodethan
-Benzaldehyd	-Jodmethan
-Benzylbromid	-Papavarin
-Benzyltriethylammoniumchlorid	-Parathion
-4-Brombenzaldehyd	-Pentafluorbenzaldehyd
-Bromophos	-Pentafluorbenzylbromid
-2-Chlorbenzaldehyd	-Phenolphthalein
-3-Chlorbenzaldehyd	-2-Naphthaldehyd
-Chlorfenvinphos	-p-Nitrophenol
-Chlorpyrifos	-p-Nitrophenolglucuronid
-Dichlormethan	-p-Nitrophenolsulfat
-Diethylchlorophosphat	-Schwefel
-Diethyldithiophosphorsäure (NH ₄ -Salz)	-TBAH in Methanol
-Diethylsulfat	-TMAH in Methanol
-Diethylthiophosphorsäure (Kaliumsalz)	-p-Trifluorbenzaldehyd
-Dimethylphosphit	-Toluolsulfonsäurehydrazid
-Dimethylsulfat	-Trifluoressigsäureanhydrid
-Fenthion	
<u>Merck (Darmstadt)</u>	
-Aceton	-Methanol
-Acetonitril	-Natriumchlorid
-Ameisensäure	-NaOH Maßlösung (0,1 molar)
-Ammoniumacetat	-Natriumhydroxid
-Ammoniak (25%ig)	-Natriumsulfat (wasserfrei)
-Chloroform	-Phosphorpentoxid
-1-Chlorbutan	-Phosphorpentasulfid
-Diethylether	-1-Propanol
-Dikaliumpyrophosphat	-2-Propanol
-Dimethylsulfoxid	-Salzsäure (1 molar)
-Dünnschichtfolie (Kieselgel)	-Tetrabutylammoniumchlorid

-Essigsäure	-Tetraethylammoniumchlorid
-Ethylacetat	-Tetrahexylammoniumchlorid
-Hexan	-Thioharnstoff
-Isopropanol	-Toluol
-Isooctan	-Triethylphosphat (TEP)
-Kaliumdihydrogenphosphat	-Trimethylphosphat (TMP)
<u>Varian (Darmstadt)</u>	
SPE C8 Säulen	SPE CN Säulen
SPE C2 Säulen	SPE Bond Elut ENV Säulen
SPE Phenyl Säulen	SPE NEXUS Säulen
<u>Mallinckrodt Baker (Groß-Gerau)</u>	
SPE C18 Säulen	SPE 1,2 Amino Säulen
SPE Si Säulen	SPE SAX Säulen
SPE Amino Säulen	
<u>Hoffmann-LA Roche AG (Grenzach-Wyhlen)</u>	
Arylsulfatase/ β -Glucuronidase	Phenprocoumon
<u>Pierce (Rockford, USA)</u>	
MSTFA	
<u>American Cyanamid Company Princeton, N.J., USA</u>	
-Dimethylphosphat	-Diethylthiophosphat
-Diethylphosphat	-Dimethyldithiophosphat
-Dimethylthiophosphat	-Diethyldithiophosphat

3.2 Urin- und Blutproben

Die Urinproben zur Entwicklung der Methoden wurden von Mitarbeitern des Instituts gesammelt. „Blanc“-Serum wurde von der Abteilung für Transfusionsmedizin (UKE) bezogen. Dabei handelte es sich um gerinnungsaktives, eingefrorenes Human-Frisch-Plasma von Blutspendern mit einem Stabilisator. Leichenkörperflüssigkeiten (Urin und Blut) zur Bestimmung von Organophosphaten und deren Spaltprodukten wurden den Verstorbenen im Rahmen einer rechtsmedizinischen Obduktion entnommen. Nach der Entnahme wurden diese Flüssigkeiten bei -20°C gelagert.

3.3 Instrumente

Photometer:	Varian, Cary 50 Bio, UV-Visible Spectrophotometer
HPLC-Pumpen:	BIO-RAD, 1350 Series HPLC Pump SpectraSystem, P 4000 Thermo Separation Products, 3500 MS
HPLC-Detektoren:	BIO-RAD, Electrochemical Detector Model 1340 c
Gaschromatographen:	Hewlett Packard, 5890 Hewlett Packard, 5890 Series II Plus Varian, Model 3700
GC-Detektoren:	Hewlett Packard, 5972 MSD Hewlett Packard, 5890 MSD Varian, FID
Massenspektrometer:	Thermo Quest, Finnigan LCQ DUO Hewlett Packard, 5989A Mass Spectrometer
Auswertung:	LDC/ Milton Roy (Schreiber) LDC/ Milton Roy C-10 (Integrator) HP ChemStation

4 Methoden

4.1 Präparative Methoden

Sämtliche Reaktionen wurden im Abzug durchgeführt.

4.1.1 Darstellung der Alkylphosphate

Dimethylphosphat (DMP), $C_2H_7O_4P$ (**Teichmann und Hilgetag, 1962**)

14,0 g Trimethylphosphat, 7,6 g Thioharnstoff und 40 ml Methanol wurden 12 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Anschließend wurde das Thiouronium-Salz der Dimethylphosphorsäure über Nacht bei $-20^{\circ}C$ ausgefroren. In Diethylether und Methanol wurde das Produkt umkristallisiert. Das Rohprodukt wurde mit Ether aufgenommen und Methanol wurde in der Siedehitze bis zur vollständigen Auflösung zugegeben.

Das Thiouronium-Salz der Dimethylphosphorsäure fiel in der Kälte mit farblosen Nadeln aus.

Diethylphosphat (DEP), $C_4H_{11}O_4P$ (**Teichmann und Hilgetag, 1962**)

[A] Thiouronium-Salz

18,2 g Triethylphosphat und 7,6 g Thioharnstoff wurden bei $135^{\circ}C$ 10 Minuten erhitzt. Die tiefrote Lösung wurde erst bei Raumtemperatur und anschließend im Kühlschrank abgekühlt. Während der Temperaturabsenkung kristallisierte das Thiouronium-Salz aus. Das Salz wurde abfiltriert, in Aceton aufgenommen und durch Zugabe von Ethanol in der Siedehitze gelöst. Die Ausfällung erfolgte über Nacht bei $-20^{\circ}C$. Es fanden vier weitere Umkristallisationen mit Ethylacetat statt, wobei Ethanol in der Siedehitze bis zur vollständigen Lösung zugegeben wurde. Das Thiouronium-Salz der Diethylphosphorsäure besteht aus feinen, farblosen Nadeln.

[B] Freie Säure

5g Diethylchlorophosphat, 50ml Wasser und 2,5g Natriumhydroxid wurden über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit Salzsäure angesäuert. Mit Diethylether (3 x 50ml) wurde das gebildete Diethylphosphat aus der wässrigen Phase isoliert. Abschließend wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert.

4.1.2 Darstellung von Thioalkylphosphaten

Dimethylthiophosphat (DMTP), $C_2H_7O_3PS$ (**Foss, 1947**)

4,6 g Natrium wurden in 60 ml Methanol gelöst. Anschließend wurden 23,2 g Dimethylphosphit und 60 ml Diethylether hinzugegeben. Unter Erwärmung wurden 6,4 g Schwefel portionsweise zugesetzt. Während der Reaktion verdampfendes Lösungsmittel (Diethylether und Methanol) wurde nachgegeben, um das Reaktionsprodukt in Lösung zu halten. Die Zugabe eines Phenolphthalein-Kristalls ließ das Ende der Reaktion durch einen Farbumschlag von rot nach farblos erkennen. Überschüssiger Schwefel wurde abfiltriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer unter Vakuum abgezogen. Der zurückgebliebene, weiße Rückstand wurde in einem heißen Gemisch aus Ethylacetat und Methanol gelöst und über Nacht bei $-20^{\circ}C$ ausgefällt. Die Umkristallisation wurde wiederholt. Das Endprodukt ist ein weißes, aus feinen Nadeln bestehendes Natriumsalz der Dimethylthiophosphorsäure.

4.1.3 Darstellung der Dithioalkylphosphate (**Hoegberg und Cassaday, 1951**)

Dimethyldithiophosphat (DMDTP), $C_2H_7O_2PS_2$

Dipropyldithiophosphat (DPDTP) $C_6H_{15}O_2PS_2$

25,0 g Phosphorpentasulfid und 40 ml Toluol wurden tropfenweise mit 13,0 ml Methanol (bzw. 24,0ml 1-Propanol für Dipropyldithiophosphat) versetzt. Die Reaktion wurde unter Wasserkühlung bis zur Auflösung des Phosphorpentasulfids weitergeführt. Anschließend wurden 5 ml einer Natriumhydroxidlösung (1mol/l) und portionsweise Natriumhydroxidplättchen hinzugegeben. Die Salzbildung nahm mehrere Stunden in Anspruch. Die Reaktionslösung mußte vor Abbruch der Natriumhydroxidzugabe eine saure Reaktion (pH-Papier + Wasser) zeigen, um einen Überschuß von Natriumhydroxid zu vermeiden.

Die Toluolphase wurde anschließend dekantiert und das gebildete Natriumsalz der Dimethyldithiophosphorsäure noch zweimal mit 20 ml Toluol gewaschen, um überschüssige, freie Dithiophosphorsäuren zu entfernen. Anschließend wurden nochmals 20 ml Toluol zum Salz gegeben und verbliebenes Wasser unter Vakuum am Rotationsverdampfer azeotrop entfernt. Die Umkristallisation erfolgte in Diethylether und Ethylacetat, wobei beide Lösungsmittel in gleichen Anteilen eingesetzt wurden. Vor der Ausfällung bei -20°C über Nacht wurde die Lösung filtriert. Die Endprodukte sind farblose Natriumsalze der Dimethyldithio- und Dipropyldithiophosphorsäure.

4.1.4 Darstellung der Hydrazone (Creary, 1986)

0,02 mol p-Toluolsulfonsäurehydrazid und 0,02 mol Aldehyd (Benzaldehyd, 4-Brombenzaldehyd, 2-Chlorbenzaldehyd, 4-Trifluormethylbenzaldehyd, Pentafluorbenzaldehyd und 2-Naphthaldehyd) wurden mit etwas Methanol (2-5ml), zusammengegeben. Das sich bildende Hydrazone fällt aus der methanolischen Lösung aus. Anschließend erfolgte eine Umkristallisation in einem geeigneten Lösungsmittel (Tabelle 11). Die Reinheit des Hydrazons wurde dünnschichtchromatographisch (4.6.3) überprüft. 10 μl einer 1%igen methanolischen Hydrazonlösung wurden aufgetragen. Die Verunreinigung der Hydrazone mit dem entsprechenden Aldehyd und p-Toluolsulfonsäurehydrazid lag unter 5%.

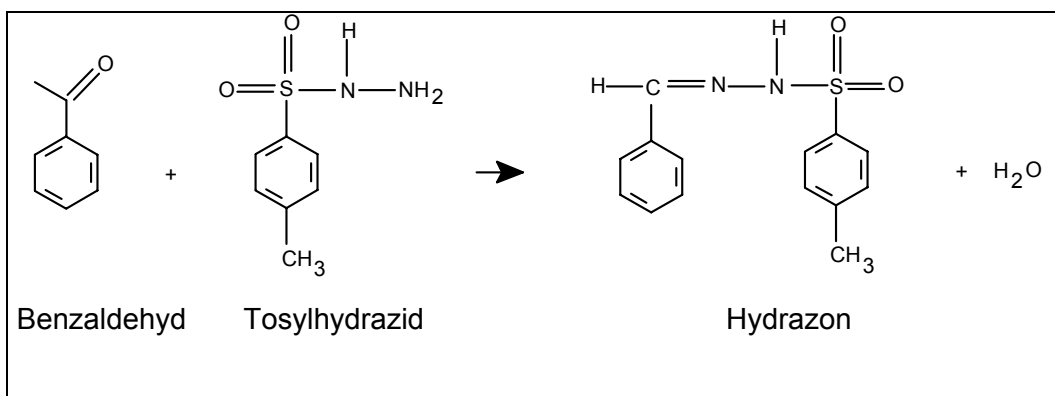


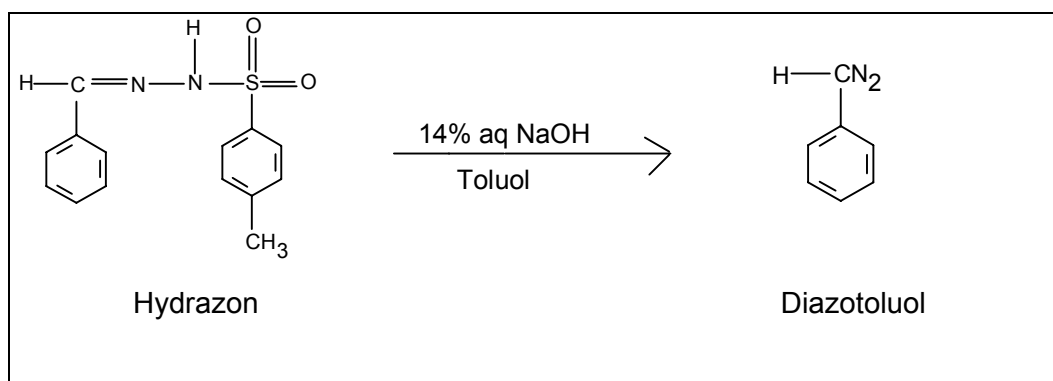
Abbildung 23: Darstellung der Hydrazone

Tabelle 4: Lösungsmittel zur Umkristallisation der Hydrazone

<u>Hydrazon</u>	<u>Lösungsm. zur Umkristallisation</u>
Benzaldehydhydrazon	Methanol
4-Brombenzaldehydhydrazon	Ethanol
2-Chlorbenzaldehydhydrazon	Methanol
4-Trifluormethylbenzaldehydhydrazon	Methanol
Pentafluorbenzaldehydhydrazon	Toluol
2-Naphthaldehydhydrazon	Toluol/Hexan (50%/50%, v/v)

4.1.5 Darstellung der Diazoarylmethane (Wulfman, 1988)

1,5 mmol Tosylhydrazon wurden zusammen mit 0,10 g Benzyltrimethylammoniumchlorid in 25 ml Toluol und 25 ml 14 %ige, wässrige Natriumhydroxidlösung gegeben. Die Lösung wurde auf etwa 60°C erhitzt und stark gerührt. Auch diese Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt. Anschließend wurden die Phasen im Scheidetrichter getrennt und die Toluolphase viermal mit destilliertem Wasser gewaschen. Danach wurde die Toluolphase über Natriumsulfat getrocknet und die Lösung bei - 20°C aufbewahrt. Die Diazolösungen sind mehrere Wochen haltbar.

**Abbildung 24: Darstellung der Diazoarylmethane (Beispiel: Diazotoluol)**

4.1.6 Hydrolytische Spaltung intakter Organophosphate

Jeweils 2,5mg der Phosphorsäureester wurden mit 1ml Natriumhydroxidlösung (1mol/l) versetzt und blieben 24h bei 70°C stehen. Nach Zugabe von 1500µl Salzsäure (1mol/l) wurden die extrahierbaren Spaltprodukte mit 2 ml Diethylether/Ethylacetat (50%/50%, v/v) ausgeschüttelt. Die organischen Phasen wurden abgedampft und die Rückstände in 800µl Acetonitril gelöst.

4.2 Potentiometrie

Ein Parameter zur Reinheitsbestimmung der synthetisierten Dialkylphosphate war die Säure/Base-Titration. Hierfür wurden 20ml wässrige Dialkylphosphatlösungen (0,1mol/l) gegen eine NaOH-Maßlösung (0,1 mol/l) titriert. Dialkylphosphate, welche als Salze vorlagen, wurden mit dem Ionenaustauscher Amberlite (IR) 120 in die freien Säuren überführt. Unmittelbar vor der Titration wurde der Ionenaustauscher entfernt. Als Blindwert diente eine in gleicher Weise behandelte Wasserprobe.

4.3 Methoden zur Derivatisierung

Für die Derivatisierung der Dialkylphosphate wurden unterschiedliche Reagenzien bei unterschiedlichen Bedingungen untersucht. Es wurden jeweils 1,8mg der Alkylphosphate für die einzelnen Versuche verwendet. Um die entsprechenden Derivate von überschüssigem Reagenz zu trennen, wurden sie entweder flüssig-flüssig mit Ethylacetat extrahiert oder mittels SPE isoliert. Bei der Flüssig-flüssig-Extraktion wurde Ethylacetat eingesetzt. Die Ethylacetat-Phasen bzw. SPE-Eluate wurden vor der gaschromatographischen Analyse mit Toluol verdünnt. Die unterschiedlichen Bedingungen mittels SPE sind in Tabelle 16 aufgeführt. Die Fraktionierungen auf Kieselgel sind bei den entsprechenden Derivaten (Tabelle 9-14) angegeben, dabei ist Kieselgel und „aktiviertes“ Kieselgel eingesetzt worden. Die Aktivierung wurde für 1h bei 120°C durchgeführt.

4.3.1 Schwefelsäurealkylester

Die Schwefelsäurealkylester Dimethyl- und Diethylsulfat wurden zur Derivatisierung geprüft, um eine Bestimmung mittels GC zu ermöglichen. Die Dialkylphosphate wurden mit 250µl Lösungsmittel (Tabelle 5+6) und 50µl Schwefelsäurealkylester bei unterschiedlichen Temperaturen umgesetzt:

Tabelle 5: Reaktionsbedingungen mit Dimethylsulfat

Versuch	Lösungsmittel	Temperatur
Versuch 1	Wasser	40°C
Versuch 2	Acetonitril	40°C
Versuch 3	Dimethylsulfoxid	40°C

Tabelle 6: Reaktionsbedingungen mit Diethylsulfat

Versuch	Lösungsmittel	Temperatur	Zusatz
Versuch 1	- Umsetzung ohne Lösungsmittel	60°C	-
Versuch 2	Wasser/ACN (50/50)	60°C	-
Versuch 3	Wasser/DMSO (50/50)	60°C	-
Versuch 4	DMSO	60°C	TBAH
Versuch 5	DMSO	60°C	K ₂ CO ₃

4.3.2 Alkyljodide

Für die Alkylierung der Dialkylphosphate wurden Jodmethan und Jodethan untersucht. Die Dialkylphosphate wurden mit 250µl Lösungsmittel, 25µl Alkyljodid und 5µl TBAH versetzt. Zur Extraktion der Triester mit Ethylacetat wurde 1ml Salzsäure (0,1 mol/l) zugesetzt. Die Umsetzung erfolgte bei unterschiedlichen Temperaturen (Tabellen 7+8):

Tabelle 7: Derivatisierungen mit Jodmethan

Versuch	Lösungsmittel	Temperatur
Versuch 1	DMSO	40°C
Versuch 2	ACN	40°C
Versuch 3	ACN	100°C

Tabelle 8: Derivatisierungen mit Jodethan

Versuch	Lösungsmittel	Temperatur
Versuch 1	DMSO	65°C
Versuch 2	DMSO	100°C
Versuch 3	ACN	65°C
Versuch 4	ACN	100°C

4.3.3 Tetraalkylammoniumhydroxidsalze

Die Dialkylphosphate wurden mit 50µl Ethylacetat und 50µl TMAH, bzw. TBAH versetzt. 1µl dieser Lösung wurde direkt in den Gaschromatographen injiziert.

4.3.4 Benzylbromide

Die Halogenaromaten Benzylbromid und Pentafluorbenzylbromid wurden für die Derivatisierung verwendet. Die Dialkylphosphate wurden in 500µl Acetonitril und 25µl Reagenz aufgenommen. Die Reaktionstemperatur betrug 60°C. Mit 500µl Hexan wurden die Derivate extrahiert. Die Hexan-Phase wurde auf eine mit Hexan konditionierte Kieselgelsäule gegeben. Die Säule wurde mit 1ml Hexan gewaschen und mit 3ml Acetonitril wurden die Derivate eluiert.

4.3.5 Silylierungsmittel

Für die Silylierung wurde MSTFA untersucht. Die Dialkylphosphate wurden mit 50µl Reagenz versetzt. 1µl dieser Lösung wurde in den GC injiziert.

4.3.6 Diazoarylmethane

Für die Umsetzung mit Diazoarylmethanen wurden Hydrazone aus den entsprechenden Aldehyden mit Toluolsulfonsäurehydrazid hergestellt. Nach alkalischer Hydrolyse der Hydrazone wurden die Diazoverbindungen für die Derivatisierung der Alkylphosphate eingesetzt. Folgende Hydrazone fanden für die Darstellung der entsprechenden Diazoarylmethane Verwendung:

- | | |
|---------------------------------------|---------------------------------|
| - Benzaldehydhydrazon | -2-Naphthaldehydhydrazon |
| - p-Trifluormethylbenzaldehydhydrazon | - Pentafluorbenzaldehydhydrazon |
| -2-Chlorbenzaldehydhydrazon | - p-Brombenzaldehydhydrazon |

Für die Umsetzung mit Diazoarylmethanen mußten die Salze der Dialkylphosphate mit einem Ionenaustauscher (Amberlite 120) in Methanol in ihre freien Säuren überführt werden. Die Diazoarylmethanolösungen in Toluol wurden bis zur bleibenden Färbung zu den freien Säuren in Methanol gegeben.

Methanol und Toluol wurden anschließend bei 40°C unter Stickstoff abgeblasen, und die Rekonstitution des Rückstands erfolgte mit 1ml Hexan. Zur Abtrennung von Nebenprodukten diente eine Fraktionierung auf Kieselgel.

Verwendet wurde jeweils 1ml in Hexan aufgeschlämmtes Kieselgel, welches in Glassäulen mit Glaswolle zur Abdichtung gegeben wurde.

Für einige Derivate mußte das Kieselgel 10h bei 120°C „aktiviert“ werden. Folgende Übersicht zeigt, unter welchen Bedingungen die einzelnen Derivate fraktioniert wurden:

Tabelle 9: Fraktionierung der p-Brombenzyllderivate auf Kieselgel („aktiviert“)

Fraktion	Lösungsmittel	Funktion
Fraktion 1	5ml Hexan/Dichlormethan (80/20, v/v)	waschen
Fraktion 2	5ml ACN/Dichlormethan (80/20, v/v)	eluieren

Tabelle 10: Fraktionierung der 2-Chlorbenzyllderivate auf Kieselgel („aktiviert“)

Fraktion	Lösungsmittel	Funktion
Fraktion 1	6ml Hexan/Dichlormethan (80/20, v/v)	waschen
Fraktion 2	5ml Hexan/Dichlormethan (50/50, v/v)	eluieren
Fraktion 3	5ml Dichlormethan/ACN (95/5, v/v)	waschen
Fraktion 4	5ml ACN	eluieren

Tabelle 11: Fraktionierung der p-Trifluormethylbenzyllderivate auf Kieselgel

Fraktion	Lösungsmittel	Funktion
Fraktion 1	8ml Hexan/Dichlormethan (95/5, v/v)	waschen
Fraktion 2	5ml ACN/Dichlormethan (80/20, v/v)	eluieren

Tabelle 12: Fraktionierung der 2-Naphthylmethyllderivate auf Kieselgel

Fraktion	Lösungsmittel	Funktion
Fraktion 1	5ml Hexan/Dichlormethan (80/20, v/v)	waschen
Fraktion 2	3ml ACN	eluieren

Tabelle 13: Fraktionierung der Pentafluorbenzyllderivate auf Kieselgel

Fraktion	Lösungsmittel	Funktion
Fraktion 1	7ml Hexan	waschen
Fraktion 2	5ml Aceton	eluieren

Tabelle 14: Fraktionierung der Benzyllderivate auf Kieselgel

Fraktion 1	5ml Hexan/Dichlormethan (80/20, v/v)	waschen
Fraktion 2	5ml Hexan/Dichlormethan (20/80, v/v)	eluieren
Fraktion 3	5ml Dichlormethan	waschen
Fraktion 4	5ml ACN/Dichlormethan (50/50, v/v)	eluieren

Die bei den Waschschritten anfallenden Lösungsmittel wurden verworfen und die Eluate für die GC eingesetzt.

4.3.7 Diazoarylmethane und Benzylbromide

Es wurden Derivatisierungsmethoden ohne Isomerisierung von DMTP und DETP für Benzyl- und Pentafluorbenzylderivate entwickelt. Die Dialkylphosphate wurden zunächst mit Benzyl- bzw. Pentafluorbenzylbromid derivatisiert. Die umgesetzten Thio- und Dithioalkylphosphate wurden anschließend aus der ACN-Phase mit Hexan extrahiert. In der ACN-Phase verblieben die Alkylphosphorsäuren DMP und DEP. Die Hexanphase wurde unter Stickstoff bei 40°C eingedampft. Zur ACN-Phase wurden Methanol und Amberlite gegeben, um DMP und DEP in ihre freien Säuren zu überführen. Methanol und ACN wurden bei 40°C mit Stickstoff entfernt, anschließend wurde die entsprechende Diazoaryllösung (250µl) hinzugegeben. Toluol wurde abgeblasen und die benzylierten Dialkylphosphorsäuren DMP und DEP abschließend auf Kieselgel fraktioniert.

Tabelle 15: Fraktionierung über Kieselgelsäulen (1g Kieselgel) bei der kombinierten Derivatisierung

Fraktion	Pentafluorbenzylderivate	Funktion
Fraktion 1	7ml Hexan	waschen
Fraktion 2	5ml Aceton	eluieren
Fraktion	Benzylderivate	
Fraktion 1	5ml Dichlormethan	waschen
Fraktion 2	5ml Dichlormethan/ACN (50/50, v/v)	eluieren

Die ersten Fraktionen wurden verworfen und die zweiten mit den Rückständen der Hexanextrakte, welche die Derivate der schwefelhaltigen Dialkylphosphate enthalten, vereinigt.

4.3.8 Trifluoressigsäureanhydrid

Jeweils 25µl von den ACN-Extrakten der Organophosphat-Hydrolysen wurden mit 25µl TFA versetzt. Die Acetylierung vollzog sich in einem geschlossenen Gefäß für 5 Minuten bei 400W in der Mikrowelle.

Nach der Derivatisierung wurden Lösungsmittel und überschüssige Reagenzien mit Stickstoff abgeblasen und der Rückstand in 100µl Ethylacetat aufgenommen. 1µl ist gaschromatographiert worden.

4.4 Methoden zur Isolierung

4.4.1 Flüssig-Flüssig-Extraktion

Jeweils 1,8mg der Dialkylphosphate in 0,5ml 0,1m HCl wurden mit 1ml organischem Lösungsmittel ausgeschüttelt. Folgende Lösungsmittel wurden zur Extraktion eingesetzt:

-Hexan	-1-Chlorbutan	-Chloroform	-ACN (+NaCl)
-Isooctan	-Toluol	-Dichlormethan	
-Cyclohexan	-Diethylether	-Ethylacetat	

Die salzsauren Lösungen wurden 30 Minuten ausgeschüttelt, zentrifugiert und die abgenommene organische Phase unter Stickstoff bei 40°C abgedampft. Zum Rückstand wurden 100µl Methanol und 100µl Diazotoluol-Lösung gegeben. Nach 20 Minuten wurde überschüssiges Diazotoluol mit 10µl einer 2%igen Ameisensäurelösung in Methanol deaktiviert. Die Lösung mit den benzylierten Dialkylphosphaten wurde vor der gaschromatographischen Analyse mit 3ml Toluol verdünnt.

4.4.2 Festphasenextraktion (SPE)/Ionenaustausch

Die Konditionierung der Sorbentien erfolgte nacheinander mit einem organischen und einem wässrigen Lösungsmittel. Die Menge der verwendeten Lösungen entsprach dem dreifachen Bettvolumen des Sorbens. In der Tabelle 16 sind die untersuchten Sorbentien aufgeführt. Schritt 1 und 2 beinhalten die Konditionierung, Schritt 3 ist ein Waschgang, und Schritt 4 ist das Lösungsmittel für die Elution der Dialkylphosphate. Die Probenaufgabe erfolgte zwischen Schritt 2 und 3.

Tabelle 16: Sorbentien für die Extraktion der Dialkylphosphate

Sorbens	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 4
C18e	Methanol	0,1m HCl	0,1m HCl	Methanol
C18	Methanol	0,1m HCl	0,1m HCl	Methanol
C8	Methanol	0,1m HCl	0,1m HCl	Methanol
C2	Methanol	0,1m HCl	0,1m HCl	Methanol
Phenyl	Methanol	0,1m HCl	0,1m HCl	Methanol
Cyano	Methanol	0,1m HCl	0,1m HCl	Methanol
ENV	Methanol	0,1m HCl	0,1m HCl	Methanol
NEXUS	Methanol	0,1m HCl	0,1m HCl	Methanol
Amino	Methanol	0,1m Essigsäure	Wasser	Ammoniak 25%ig, 0,5% in Methanol
1,2-Amino	Methanol	0,1m Essigsäure	Wasser	Ammoniak 25%ig, 0,5% in Methanol
SAX	Methanol	Wasser	Wasser	Ammoniak 25%ig, 0,5% in Methanol

Die methanolischen Eluate wurden unter Stickstoff zur Trockene gebracht und mit Diazotoluol umgesetzt, wie unter 4.4.1 beschrieben.

Die ammoniakalischen Eluate, mit Amberlite (IR) 120 versetzt, wurden nach einem 5-minütigen Schüttelvorgang von diesem wieder getrennt. Methanol wurde abgedampft und der Rückstand wie bei den methanolischen Eluaten mit Diazotoluol benzyliert.

4.4.3 Phasentransfer

Für die Phasentransfer-Extraktion sind die quartären Ammoniumsalze Benzyltriethylammoniumchlorid, Tetraethylammoniumchlorid, Tetrabutylammoniumchlorid und Tetrahexylammoniumchlorid untersucht worden. Die Alkylphosphate wurden zu 500µl einer Phasentransfer-Lösung (10mM/l) gegeben und gegen Toluol 30 Minuten geschüttelt. Die Lösung wurde anschließend zentrifugiert und die Toluol-Phase abgenommen. Zu der organischen Phase wurden 1ml Methanol und Amberlite (IR) 120 gegeben. Dieses Gemisch wurde 5 Minuten geschüttelt, der Ionenaustauscher abgetrennt und die Lösung unter Stickstoff auf ca. 200µl reduziert.

250µl Diazotoluol-Lösung wurden hinzugegeben und das Reaktionsgemisch mit Stickstoff zur Trockene gebracht. Die Aufnahme des Rückstands erfolgte mit 3ml Toluol.

4.4.4 Azeotrope Trocknung

Zur Isolierung der Dialkylphosphate aus wässrigen Medien wurden verschiedene „Schleppmittel“ zur Trocknung untersucht. Die Dialkylphosphatsalze wurden in 250µl Wasser gegeben und mit 1ml folgender Lösungsmittel versetzt:

- | | |
|---------------|-----------|
| - Isopropanol | - Ethanol |
| - 1-Propanol | - ACN |

Die Gemische wurden bei 65°C unter Stickstoff 20 Minuten getrocknet. Der Rückstand wurde mit Methanol und Amberlite (IR) 120 aufgenommen und 5 Minuten geschüttelt. Anschließend erfolgte die Entfernung vom Ionenaustauscher und die Derivatisierung der Dialkylphosphate mit Diazotoluol.

4.5 Aufarbeitung biologischer Proben

4.5.1 Urin

Für die Bestimmung der Dialkylphosphate zur Erkennung einer Organophosphat-Intoxikation diente Urin als biologisches Material. 250µl Urin wurden nach Zusatz von 200ng DBP, 200ng DPDTP (IS) und 750µl Isopropanol bei 65°C unter Stickstoff getrocknet (Dauer: ca 20 Minuten). Zum Rückstand wurden 500µl ACN und 25µl Benzylbromid gegeben. Auf diese Weise wurden innerhalb von 15 Minuten bei 65°C die schwefelhaltigen Dialkylphosphate benzyliert. Die ACN-Phase wurde 2x mit jeweils 2ml Hexan extrahiert, die vereinigten Hexanphasen bei 40°C unter Stickstoff eingedampft und in 250µl Hexan wieder aufgenommen. Die Aufreinigung erfolgte auf einer mit 5ml Hexan konditionierten Kieselgelsäule (1g Kieselgel). Die Säule wurde mit 600µl Hexan gewaschen und die benzylierten Dithioalkylphosphate abschließend mit 1 ml Dichlormethan/Methanol (1+1, v/v) eluiert (Fraktion 1).

Die verbliebene ACN-Phase, welche DMP, DEP und DBP enthielt, wurde bei 40°C unter Stickstoff bis zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde in 500µl Methanol aufgenommen und mit in Methanol gewaschenem Amberlite (IR) 120 versetzt.

Die Lösung wurde 5 Minuten geschüttelt, der Ionenaustauscher abgetrennt und nochmals mit 250µl Methanol gewaschen. Die vereinigten Methanolphasen wurden unter Stickstoff bei 40°C eingedampft und Diazotoluol wurde bis zur bleibenden Rotfärbung zugesetzt (ca. 500µl).

Die Lösung stand 10 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurde sie bis zur Trockene mit Stickstoff eingedampft (40°C).

Der in 250µl aufgenommene Rückstand ist auf eine mit 5ml Hexan konditionierte Kieselgelsäule gegeben worden. Die Säule wurde mit 1ml Dichlormethan/Hexan (7+3, v/v) gewaschen und die Analyten mit 1ml Methanol/Dichlormethan (1+3, v/v) eluiert (Fraktion 2).

Fraktionen 1 und 2 wurden vereinigt, mit Stickstoff zur Trockene gebracht (40°C) und in 100µl Toluol wieder aufgenommen. 1µl wurde gaschromatographisch untersucht. Abbildung 13 gibt die Probenaufarbeitung schematisch wieder.

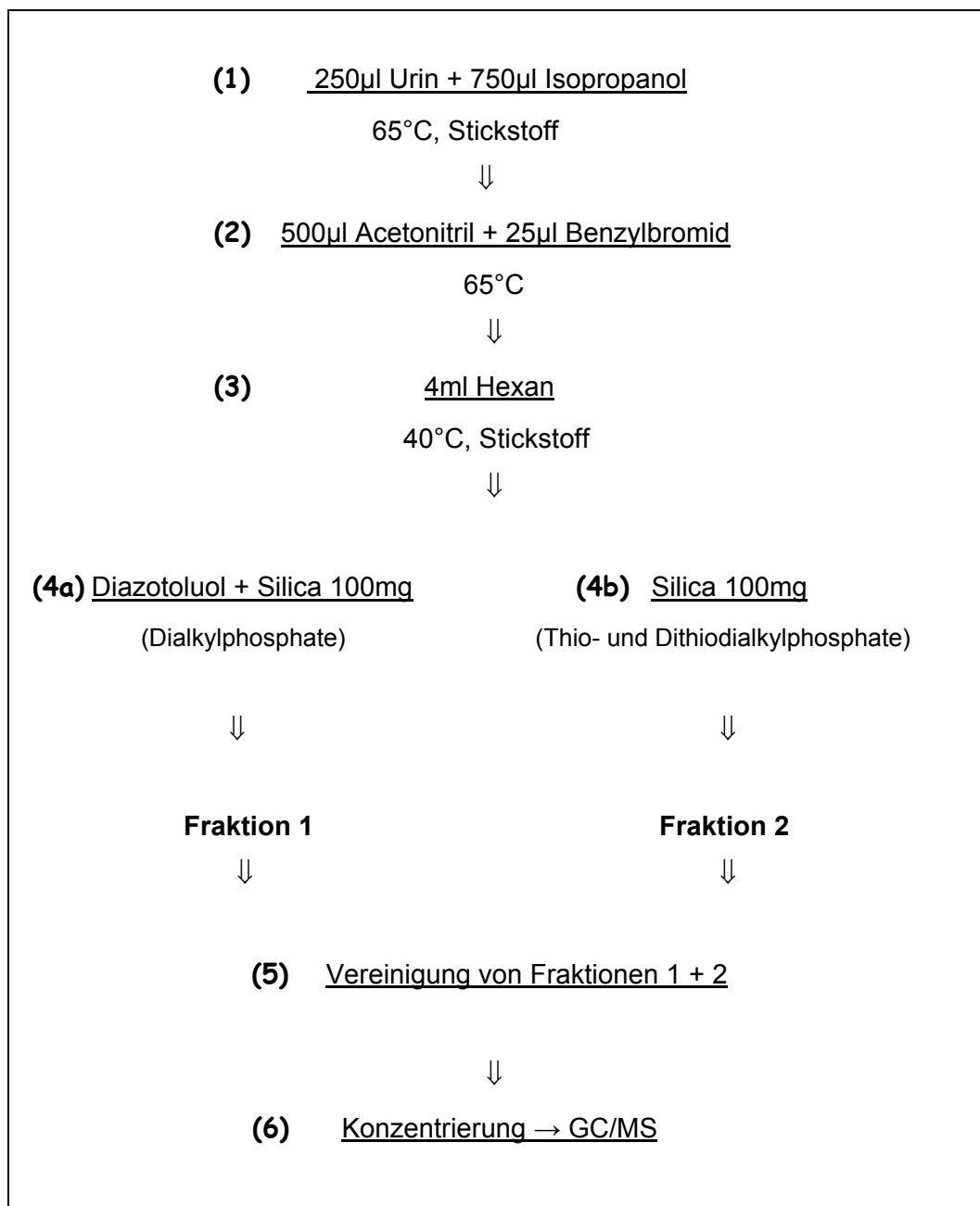


Abbildung 25: Fließschema der Urinaufarbeitung

4.5.2 Blut

p-Nitrophenol (frei) ohne Enzymspaltung im Serum und abspaltbare Gruppen

Zu 500µl Serum wurde 1µg Phenprocoumon (IS) und 500µl Ammoniumacetat-Puffer (pH:5,5) gegeben. Mit 4ml Diethylether/Ethylacetat (1+1, v/v) wurden die Serumproben 20 Minuten ausgeschüttelt, zentrifugiert und abschließend unter Stickstoff bei 30°C eingedampft. Der Rückstand wurde in 100µl ACN aufgenommen und ein Aliquot von 20µl mittels HPLC untersucht.

p-Nitrophenol (gebunden als Sulfat oder Glucuronid) nach Enzymspaltung im Serum

Zu der bereits extrahierten Serumprobe wurden 25µl des Enzymgemisches Arylsulfatase/Glucuronidase gegeben und 24h bei 37°C inkubiert. Die Extraktion und Analyse des freigesetzten p-Nitrophenols erfolgte wie bei der Bestimmung des p-Nitrophenols ohne Enzymspaltung.

Intakte Phosphorsäureester im Serum

Zu 500µl Serum bzw. Leichenblut wurden 2,5µg Papaverin (IS) und 250µl Kaliumdihydrogenphosphatlösung (2 mol/l, pH: 4-5) gegeben. Nach zweimaliger Extraktion mit jeweils 750µl Ethylacetat wurden die organischen Phasen vereinigt, bei 40°C unter Stickstoff eingedampft und der Rückstand wurde in 100µl Toluol aufgenommen.

4.6 Chromatographische Analytik

4.6.1 Methoden mittels HPLC

Benzylderivate der Dialkylphosphate (MS)

Die Trennung der benzylierten Dialkylphosphate erfolgte auf einer RP-18 LiChrosphere 100-Säule (125 x 2,0mm, 5µm) im Gradientensystem mit einer Pumpe des Typs TSP 4000. Die Flussrate betrug 0,15ml/min. Detektiert wurde im APCI-Modus mit einem MS des Typs LCQMS DUO.

Laufmittel	A ⇒ 80% Wasser / 20% Methanol, 0,05% Ameisensäure			
	B ⇒ 80% Methanol / 20% Wasser, 0,05% Ameisensäure			
Zeit (Min.)	Flussrate (ml/Min.)	Laufmittel A (%)		Laufmittel B (%)
00,00	0,15	100	0	
30,00	0,15	0	100	
35,00	0,15	100	0	
37,00	0,15	100	0	

Abgespaltene Gruppen der Organophosphate und p-Nitrophenol (DAD/MS)

Das HPLC-System bestand aus einer Pumpe des Modells TSP 4000, einem DAD TSP UV 6000 und einem MS LCQ DUO von Thermo-Finnigan. Die Trennung der Analyten erfolgte auf einer RP-18 endcapped Säule (25 x 4mm Lichrosphere, 5µm, Merck (Darmstadt)). Der Scan-Bereich des DAD-Detektors betrug 220-600nm und 60-600m/z für das LCQ DUO (im negativen APCI-Modus).

Gradient:

Laufmittel A ⇒ 80% Wasser / 20% Acetonitril, 0,005% Ameisensäure

 B ⇒ 80% Acetonitril / 20% Wasser, 0,005% Ameisensäure

Zeit (Min.)	Flussrate (ml/Min.)	Laufmittel A (%)	Laufmittel B (%)
00,00	0,80	100	0
02,00	0,80	100	0
17,00	0,80	0	100
20,00	0,80	0	100
25,00	0,80	100	0
30,00	0,80	100	0

4.6.2 Methoden mittels GC

GC/MS

Die für die Trennung der unterschiedlichen Derivate erforderlichen Temperaturprogramme sind in Tabelle 17 aufgeführt. Zur Trennung der Analyten wurde eine Säule des Typs HP5-MS mit 30m Länge, 0,25mm Durchmesser und 0,25µm Filmdicke eingesetzt (Agilent Technologies, USA). Helium 5,0 diente als Trägergas mit einer Flussrate von 1ml pro Minute.

Tabelle 17: Temperaturprogramme für die Trennung derivatisierter Dialkylphosphate (GC/MS)

<u>4-Brombenzyl</u>	Start	°C/Minute	°C	Isotherm Min.
	60	25	200	0
	-	5	225	0
	-	20	280	7,65
<u>2-Chlorbenzyl</u>	60	25	150	0
	-	5	200	0
	-	20	280	3,40
<u>3-Chlorbenzyl</u>	60	25	150	0
	-	5	195	0
	-	20	280	4,15
<u>2-Naphthylmethyl</u>	80	15	200	0
	-	10	280	5
<u>Methyl- und Ethyl</u>	40	10	100	0
	-	12	180	0
<u>Pentafluorbenzyl</u>	50	20	100	0
	-	10	250	0
	-	20	280	1,50
<u>Benzyl</u>	60	25	100	0
	-	10	170	4,50
	-	20	280	2,40

GC/FID

Zur Reinheitsbestimmung der präparativ dargestellten Dialkylphosphate wurde eine Derivatisierung mit Pentafluorbenzylbromid durchgeführt. Flüchtige oder ebenfalls mit Pentafluorbenzylbromid derivatisierbare Verunreinigungen konnten mit dem Flammenionisationsdetektor (geringe Selektivität) erfasst werden.

Bedingungen:

Gerät: Varian 3700 Gas Chromatograph

Säule: 3 % OV-17 auf Chrompak Q (200-400 mesh), 2m x 3mm

Trägergas: Stickstoff

Injektortemperatur: 250°C

Detektortemperatur: 270°C

Temperaturprogramm, Ofen: 150°C, 0 min.; 10°C / min.; 290°C, 10 min. isotherm

Injektion: 0,5 µl

Flußrate: 1ml/Minute

HPLC/ELCD

Zur Bestimmung oxidierbarer Verunreinigungen in den dargestellten Thio- und Dithioalkylphosphaten wurde ein elektrochemischer Detektor eingesetzt.

Bedingungen:

Pumpe: Bio-Rad 1350

Detektor: Bio-Rad, Elektrochemischer Detektor 1340

Detektor-Parameter:

Für DMDTP (a), DMTP (b)

Potential: a) +1,05 Volt, b) + 1,30 Volt

Empfindlichkeit: a und b) 50 nA/V

Filter (S): a) 0,5, b) wie bei a

Säule: LiChrospher, 100 RP 18 endc. 5 µm (250mm x 4mm)

Probenschleife: 20 µl

Integrator: LDC/Milton Roy CI-10

Run Time: 10 Minuten

Laufmittel: 480 ml Wasser (bidest.) + 50 ml Methanol + 120 µl Eisessig + 500 µl

5 mM EDTA in Wasser (bidest.), pH-Wert: 3,75

Flußrate: 1,0 ml / Minute für DMDTP, 0,50 ml / Minute für DMTP

4.6.3 Methoden mittels DC (**Dudman und Reese, 1982**)

Für die Reaktionsverfolgung bei der Darstellung der Hydrazone und Diazoarylmethane wurde eine dünnschichtchromatographische Methode mit folgenden Bedingungen angewendet:

Stationäre Phase	Kieselgel
Mobile Phase	CHCl ₃ /MeOH (9:1, v/v)
Detektion	UV, 254 nm

5 Ergebnisse

Eine Vergiftung mit Organophosphat-Insektiziden nachzuweisen setzt voraus, dass die Konzentrationen im Blut so hoch sind, dass sie bei Routineverfahren in der GC/MS zu erfassen sind. Dies ist sehr häufig nicht der Fall, weil Konzentrationen von 0,1 µg Parathion pro ml Blut schon tödlich sein können. Die Thiophosphate sind zudem noch nicht einmal die eigentlich tödlichen Verbindungen, sondern erst ihre metabolisch gebildeten Oxophosphate, statt des Parathions also das Paraoxon. Die Oxophosphate sind sehr labil und spalten sehr schnell die acide Gruppe ab. Außerdem gibt es eine hohe Zahl von Organophosphaten, die nur bei gezielter Untersuchung erfassbar sind. Darum richtet sich die Analyse vor allem auf die Dialkylphosphorsäuren. Sie sind die stabilen Metaboliten und generell im Urin zu finden. Sie entziehen sich aber herkömmlichen Extraktionsverfahren und sind als solche mittels GC/MS nicht zu erfassen.

Für die Experimente zum Nachweis dieser Dialkylphosphorsäuren gab es im Handel lediglich DETP und DEDTP, während DMP, DEP, DMTP und DMDTP zunächst synthetisiert wurden und so aufgereinigt werden mussten, dass sie als Referenzsubstanzen für quantitative Analysen eingesetzt werden konnten. Über die eingesetzten Verfahren zur Synthese und Prüfung der Dialkylphosphate soll zunächst im Abschnitt 5.1 berichtet werden.

Anschließend wird unter 5.2 auf die Versuche der Derivatisierung eingegangen. Hier werden unterschiedliche Derivate der Dialkylphosphorsäuren beschrieben, welche eine Bestimmung durch GC oder HPLC ermöglichen sollen. Dabei werden unterschiedliche Reagenzien vorgestellt, welche auf ihre Effizienz hinsichtlich der Derivatisierung der Dialkylphosphorsäuren untersucht wurden.

Im Kapitel 5.3 wird die Isolierung der Dialkylphosphorsäuren aus wässriger Matrix behandelt. Die Validierung der Methoden und Untersuchung realer Fälle schließt sich in Abschnitt 5.4 an, bevor unter 5.5 auf die Bestimmung intakter Organophosphate im Blut eingegangen wird. Abschließend wird unter 5.6 gezeigt, welche aciden Gruppen bei einer Auswahl von Organophosphaten nach alkalischer Hydrolyse freigesetzt werden. Der Nachweis dieser Esterkomponenten wurde schließlich auch im dotierten Leichenblut durchgeführt. In realen Fällen wäre damit die Identifizierung bereits vollständig hydrolysierter Organophosphate durch den Nachweis der Esterkomponenten möglich.

5.1 Synthese und Prüfung der Dialkylphosphate

Für vier der insgesamt sechs auftretenden Dialkylphosphorsäuren mußten präparative Darstellungsmöglichkeiten gefunden werden. Nur zwei Dialkylphosphate, DEDTP und DETP, waren kommerziell erhältlich.

DMP und DEP wurden als Thiouronium-Salze und freie Säuren dargestellt. Die Thiouronium-Salze wurden durch Dealkylierung der Triester TMP und TEP mit Thioharnstoff erhalten, die freien Säuren mittels Hydrolyse der entsprechenden Phosphorsäurechloride. DMP wurde darüber hinaus als Natriumsalz über die Umsetzung von TMP mit Natriumjodid gewonnen. Das Natriumsalz der Dimethyltiophosphorsäure (DMTP) war über Schwefel und das Natriumdimethylphosphit zugänglich. Die Herstellung von DMDTP gelang über die Einwirkung von Methanol auf di-Phosphorpentasulfid.

Für die zu synthetisierenden Dialkylphosphorsäuren DMP, DEP, DMTP und DMDTP standen Referenzsubstanzen der Fa. American Cyanamid (Princeton, N.J.) zur Verfügung, um die Identität der hergestellten Substanzen zu überprüfen.

Zur Identifizierung wurde ein GC/MS System im standardisiertem EI-Modus (70eV) eingesetzt. Weil die freien Dialkylphosphate nicht flüchtig sind, wurde eine Benzylierung mit Benzylbromid vorgenommen.

Die folgende Tabelle zeigt die ermittelten Molekül- und Fragmentionen der benzylierten Dialkylphosphate. Für die Identifizierung wurden die Verhältnisse der Molekül- und Fragmentionen zueinander im Massenspektrum herangezogen.

Tabelle 18: Molekül- und Fragmentionen benzylierter Dialkylphosphate

Benzylderivate	Molekülionen $[M^+]$ und signifikante Fragmentionen der benzylierten Alkylphosphate
DMP	216 $[M^+]$ 75% , 110 100% , <u>125</u> 1%
DEP	244 $[M^+]$ 50% , 187 50% , <u>153</u> 10%
DMTP	232 $[M^+]$ 85% , 123 40% , <u>141</u> 3%
DMDTP	248 $[M^+]$ 60% , 123 20% , <u>157</u> 10%

Die Molekülionen der Benzylderivate sind in der Tabelle mit einem $[M^+]$ gekennzeichnet. Bei den signifikanten Fragmentionen wurden jeweils zwei ausgewählt. Die kursiv gekennzeichneten Fragmentionen haben einen großen prozentualen Anteil an der Gesamtionisierung.

Alle Spektren, DMP ausgenommen, weisen einen Basepeak (100%) mit der Masse 91 auf. Weil diese Masse dem Benzylrest aus der Derivatisierung zuzuordnen ist, wurde sie als signifikante Fragmentation nicht berücksichtigt. Die unterstrichenen Fragmentationen entsprechen den Massen der Dialkylphosphorsäureionen. Ihr Anteil an der Ionisierung ist gering, weil standardmäßig im positiv-Modus gemessen wurde und Säuren hierbei schlecht erfasst werden.

Die in der Tabelle angegebenen Massen und deren Verhältnisse zueinander fanden sich bei den Syntheseprodukten und den Vergleichssubstanzen von American Cyanamid.

Mit chromatographischen Methoden und einer titrimetrischen Methode wurde die Reinheit der synthetisierten Referenzsubstanzen bestimmt. Für Untersuchungen mittels GC wurden die Alkylphosphorsäuren wie bei der Identitätsuntersuchung mit Benzylbromid derivatisiert. Folgende Verfahren wurden eingesetzt:

GC-FID

Mit Hilfe des unselektiven FID konnten flüchtige Verunreinigungen erfasst werden.

HPLC-ELCD

Die elektrochemische Detektion in Kombination mit der HPLC erlaubt die Bestimmung der Thio- und Dithioalkylphosphate ohne vorangegangene Derivatisierung. Ermöglicht wurde dadurch die Erfassung oxidierbarer Verunreinigungen.

Acidimetrische Titration

Bei der acidimetrischen Titration wurde die freie Säure DEP direkt eingesetzt und die Salze der übrigen Alkylphosphate mit Hilfe eines Ionenaustauschers in die entsprechenden freien Säuren überführt. Anschließend wurde gegen Natronlauge titriert. Der Umschlagspunkt wurde mit einer pH-Elektrode ermittelt.

In der Tabelle 19 sind die Ausbeuten und Reinheiten der synthetisierten Alkylphosphate angegeben. Die Ausbeuten ergaben sich gravimetrisch aus der Menge der eingesetzten Edukte und aus der erhaltenen Produktmenge nach Trocknung. Für die Reinheit mittels chromatographischer Methoden wurden die Flächen aller Signale, mit Ausnahme des Durchbruchpeaks, addiert.

Der prozentuale Anteil der FID-Signalfläche des Analyten an der Gesamtfläche ist in der Tabelle 19 angegeben. Beim titrimetrischen Verfahren wurde der Reinheitsgrad über den Verbrauch an Natronlauge ermittelt.

Tabelle 19: Ausbeuten und Reinheit der synthetisierten Dialkylphosphate

Dialkylphosphat	Ausbeute [%]	Prüfung I	Prüfung II	Prüfung III
		<i>GC-FID</i>	<i>HPLC-ECD</i>	<i>Titration</i>
DMP (Thiouronium-Salz)	41	89%	-	93%
DMP (Natrium-Salz)	54			97%
DEP (Thiouronium-Salz)	21	91%	-	92%
DEP (freie Säure)	55	87%		94%
DMTP (Natrium-Salz)	38	86%	> 99%	93%
DMDTP (Natrium-Salz)	48	93%	> 99%	91%

5.2 Derivatisierung der Dialkylphosphate

Dialkylphosphate sind als solche mittels GC oder HPLC nur schlecht zu bestimmen. Nach einer Alkylierung oder Benzylierung sind sie aber zu verflüchtigen und je nach Derivat mit unterschiedlichen Detektorsystemen zu erfassen.

5.2.1 Alkylderivate

Mit den neutralen Estern der Schwefelsäure und Jodalkanen wurden unter unterschiedlichen Reaktionsbedingungen die Dialkylphosphate derivatisiert. Untersucht wurden die Methyl- und Ethylderivate.

Neutrale Ester der Schwefelsäure

Das acide Wasserstoffatom der Hydroxylgruppen der Dialkylphosphate wird in Gegenwart von Alkali gegen die Alkylgruppe des Schwefelsäureesters ausgetauscht. Abbildung 14 zeigt das Prinzip der Veresterung in Gegenwart von Natriumhydroxid.

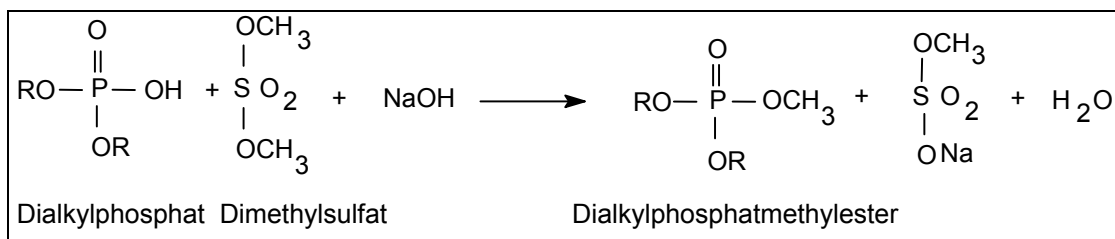


Abbildung 26: Alkylierung der Alkylphosphate mit Schwefelsäuredialkylestern

Die Derivatisierung der Alkylphosphorsäuren wurde mit den Lösungsmitteln Wasser, ACN und Dimethylsulfoxid durchgeführt. Abbildung 27 zeigt die drei Lösungsmittelversuche im Vergleich. Angegeben sind die absoluten Signalintensitäten der einzelnen Dialkylphosphate im GC/MS Full-Scan-Modus. Es zeigt sich, daß beide Lösungsmittel geeignet sind. Wasser ist als Reaktionsmedium nicht geeignet, weil DMP in diesem Medium nicht derivatisiert oder sofort wieder hydrolysiert wird. Grundsätzlich eignen sich für die schwefelhaltigen Dialkylphosphate polare Lösungsmittel, bei den schwefelfreien Dialkylphosphaten verhält es sich umgekehrt.

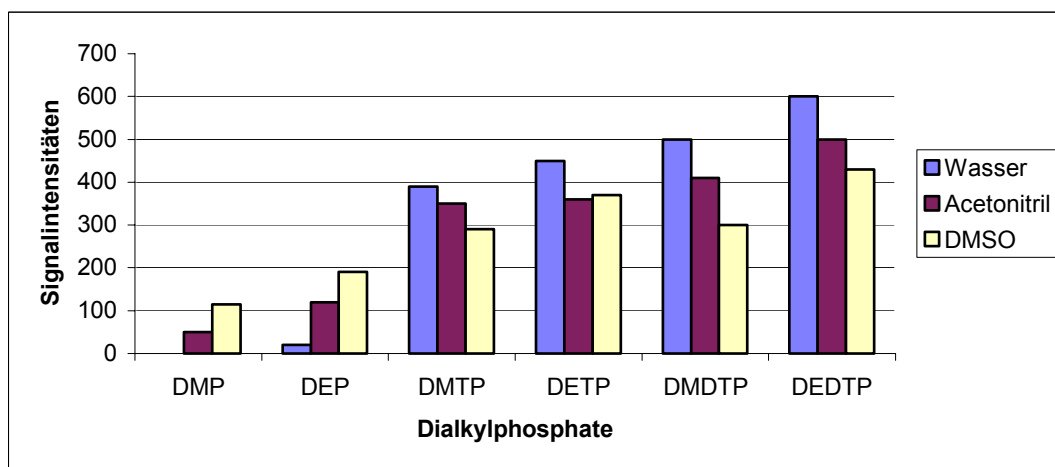


Abbildung 27: Signalintensitäten der Dialkylphosphate nach Derivatisierung mit Dimethylsulfat mittels GC/MS

In Abbildung 28 sind verschiedene Versuche zur Umsetzung mit Diethylsulfat angegeben. Ethylderivate wären den methylierten Dialkylphosphaten aufgrund ihrer geringeren Flüchtigkeit vorzuziehen. Es wurden unterschiedliche Lösungsmittel und Lösungsmittelgemische für die Ethylierung untersucht. Die Alkylierung mit Diethylsulfat verläuft vermutlich schlechter als mit Dimethylsulfat. Deshalb wurden auch basische Zusätze als Säureakzeptoren eingesetzt, um eine möglichst gute Umsetzung zu erzielen.

Im Unterschied zur Reaktion mit Dimethylsulfat findet keine Veresterung von DMP statt. Das Lösungsmittelgemisch Wasser/Acetonitril ergibt das günstigste Ergebnis für die schwefelhaltigen Dialkylphosphate, für DEP verbessert sich die Umsetzung durch die Zugabe einer organischen Base, wie z.B. Tetrabutylammoniumhydroxid. Die Zugabe einer in organischen Lösungsmitteln wenig löslichen Base (Kaliumkarbonat) bringt diese Vorteile nicht. Dennoch bleibt die Umsetzung von DEP im Vergleich zu den Thio- und Dithioalkylphosphaten nicht befriedigend.

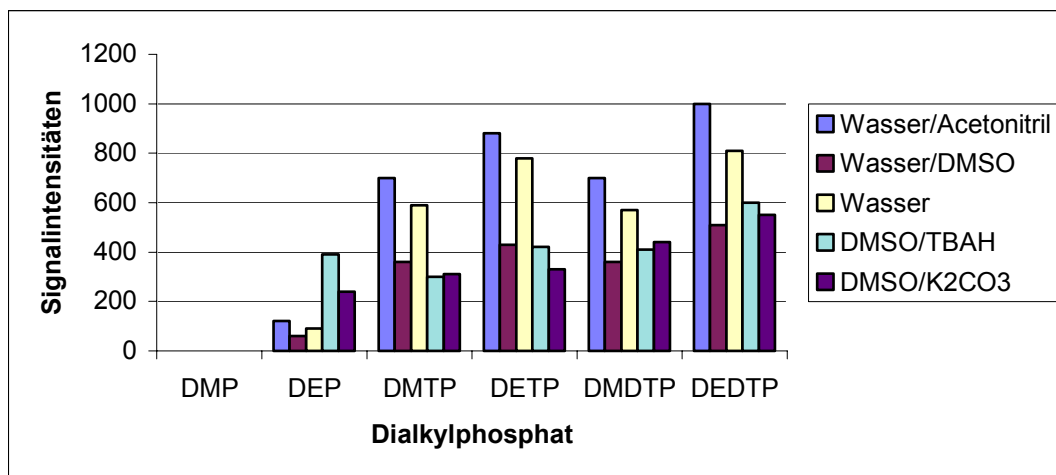


Abbildung 28: Signalintensitäten der Dialkylphosphate nach Derivatisierung mit Diethylsulfat mittels GC/MS

Alkyljodide

Wie die neutralen Schwefelsäureester, so werden auch Alkyljodide für die Veresterung von Carbonsäuren verwendet. Analog dazu sind Jodmethan und Jodethan für die Alkylierung von Dialkylphosphorsäuren untersucht worden. Die Reaktion verläuft nach einem S_N2 Mechanismus, in welchem das gelöste Dialkylphosphorsäureanion nucleophil ein Alkyljodid angreift. Abbildung 17 zeigt die Salzbildung eines Alkylphosphats mit der organischen Base TBAH und die anschließende Methylierung mit Jodmethan.

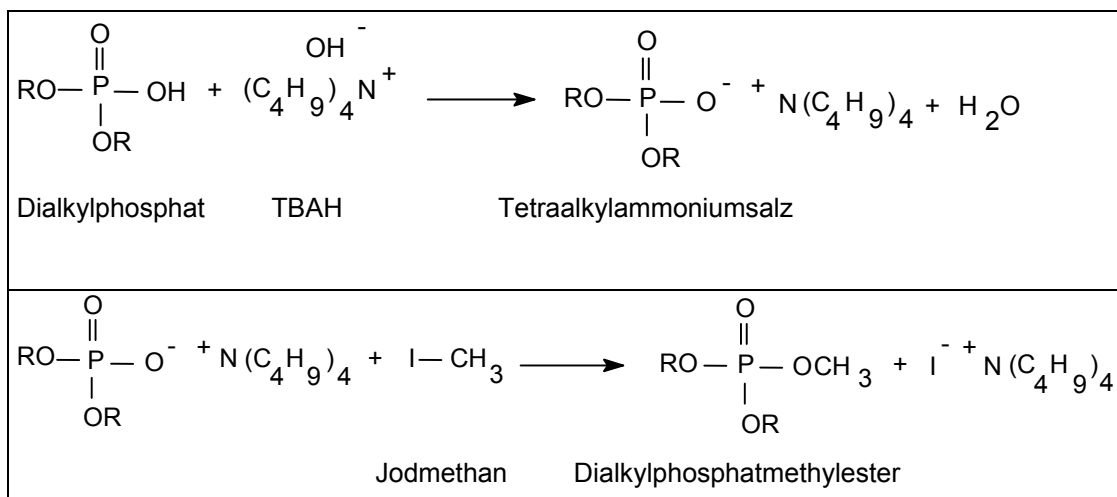


Abbildung 29: Methylierung der Dialkylphosphate mit TBAH und Jodmethan

Die Alkylierung der Dialkylphosphate mit Jodmethan und Jodethan erfolgte in Gegenwart von TBAH in unterschiedlichen Lösungsmitteln und bei veränderter Temperatur. Die Methylierung der Dialkylphosphate unter verschiedenen Bedingungen mit Jodmethan zeigt Abbildung 30.

Die Umsetzung ist in Dimethylsulfoxid bei 40°C am erfolgreichsten. In ACN findet die Derivatisierung von DMP und DEP nur bei höheren Temperaturen statt, wobei die Thiodialkylphosphate bzw. deren Derivate bei höheren Temperaturen offensichtlich nicht mehr stabil sind. Ähnliche Ergebnisse zeigt die Graphik in Abbildung 31, wo die Alkylierung mit Jodethan durchgeführt worden ist. Insgesamt verläuft die Ethylierung erwartungsgemäß schlechter als die Methylierung. Die Ethylderivate von DMTP und DETP bleiben bei höheren Temperaturen in DMSO stabil.

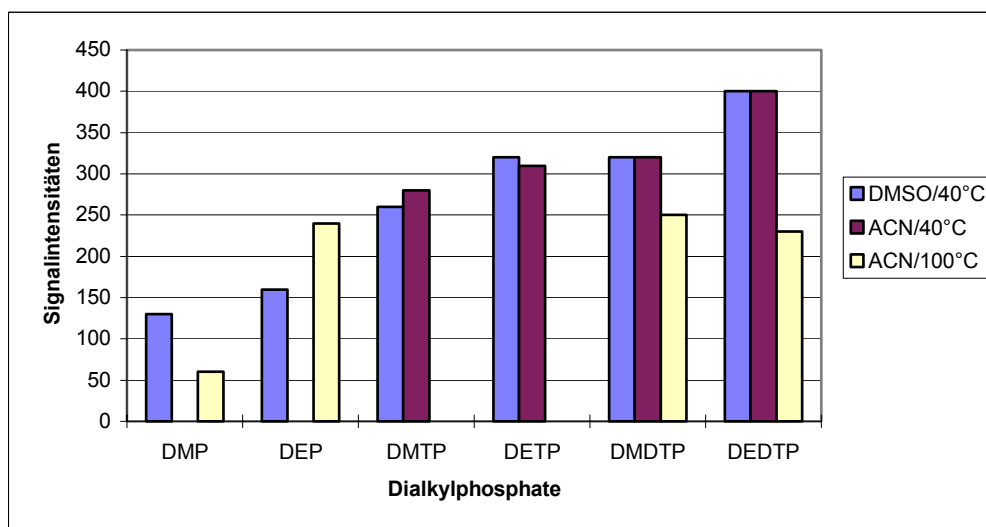


Abbildung 30: Signalintensitäten der Dialkylphosphate nach Derivatisierung mit Jodmethan mittels GC/MS

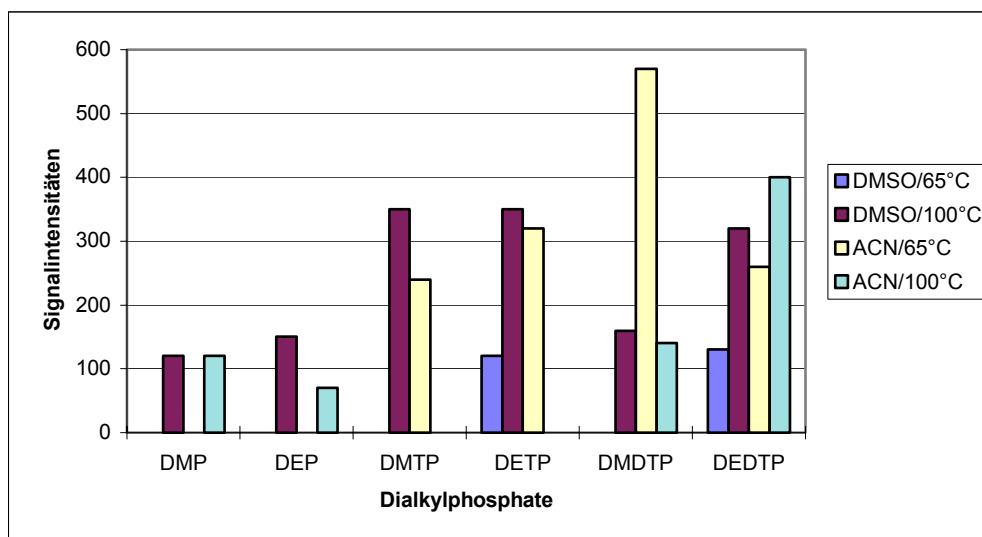


Abbildung 31: Signalintensitäten der Dialkylphosphate nach Derivatisierung mit Jodethan mittels GC/MS

Tabelle 20 zeigt die Molekülionen (unterstrichen) und signifikante Fragmentationen der Methyl- und Ethylderivate.

Tabelle 20: Molekül- und Fragmentationen der Methyl- und Ethylderivate

Dialkylphosphat	Ionen (m/z) Methylderivate	Ionen (m/z) Ethylderivate
DMP	<u>140</u> [M ⁺], 110, 109	<u>153</u> [M ⁺], 127, 109
DEP	<u>168</u> [M ⁺], 153, 141, 113	<u>182</u> [M ⁺], 155, 127
DMTP	<u>136</u> [M ⁺], 141, 126, 110	<u>170</u> [M ⁺], 142, 125, 110
DETP	<u>184</u> [M ⁺], 167, 156, 140	<u>198</u> [M ⁺], 170, 154, 138
DMDTP	<u>172</u> [M ⁺], 142, 125, 109	<u>186</u> [M ⁺], 158, 125
DEDTP	<u>200</u> [M ⁺], 172, 156, 144	<u>214</u> [M ⁺], 186, 121

Tetraalkylammoniumsalze

Tetraalkylammoniumhydroxide zerfallen beim Erhitzen in das entsprechende Trialkylamin und den korrespondierenden Alkohol. Dieses Verhalten macht man sich bereits bei der gaschromatographischen Analyse von Carbonsäuren zunutze. Die Tetraalkylammoniumsalze der Carbonsäuren werden in den Injektor des GC gespritzt. Bei der Injektortemperatur von 250-350°C entsteht der entsprechende Ester der Säure und das Trialkylamin.

Für die Umsetzung der Dialkylphosphorsäuren wurden Tetramethyl- und Tetrabutylammoniumhydroxid für die Alkylierung im „Flash“-Verfahren untersucht. Abbildung 32 zeigt das Prinzip der Umsetzung.

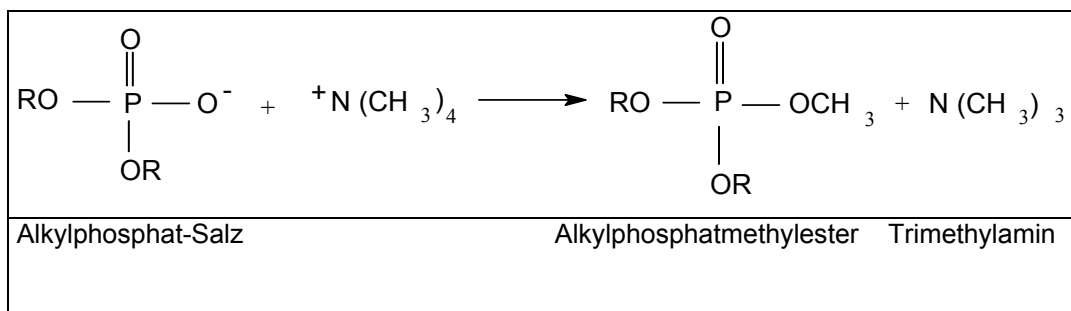


Abbildung 32: Alkylierung der Alkylphosphate mit Tetraalkylammoniumsalzen

Die Umsetzungen der Dialkylphosphate mit TMAH und TBAH verliefen so unzureichend, dass auf eine graphische Abbildung verzichtet wird.

5.2.2 Arylderivate

Für die Umsetzung der Dialkylphosphate sind Benzylbromid und Diazoarylmethane verwendet worden.

Benzylbromid

Für die Derivatisierung mit Benzylbromid sind unterschiedliche Reaktionszeiten untersucht worden. Als Lösungsmittel wurde ACN mit Kaliumkarbonat als Säureakzeptor verwendet. Abbildung 33 zeigt die Umsetzung der Dialkylphosphate mit Benzylbromid, und in Abbildung 34 sind die unterschiedlichen Signalintensitäten bei den unterschiedlichen Reaktionszeiten abgebildet. Wie bei den Alkylierungen ist die Derivatisierung von DMP und DEP auch mit Benzylbromid ungenügend. Die schwefelhaltigen Dialkylphosphate dagegen werden gut benzyliert.

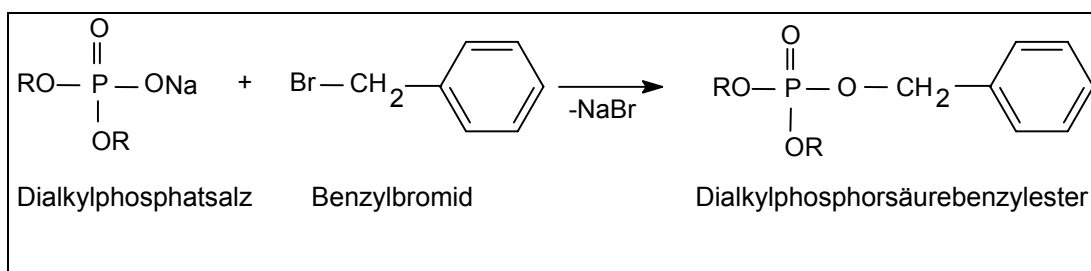


Abbildung 33 : Reaktion der Dialkylphosphate mit Benzylbromid

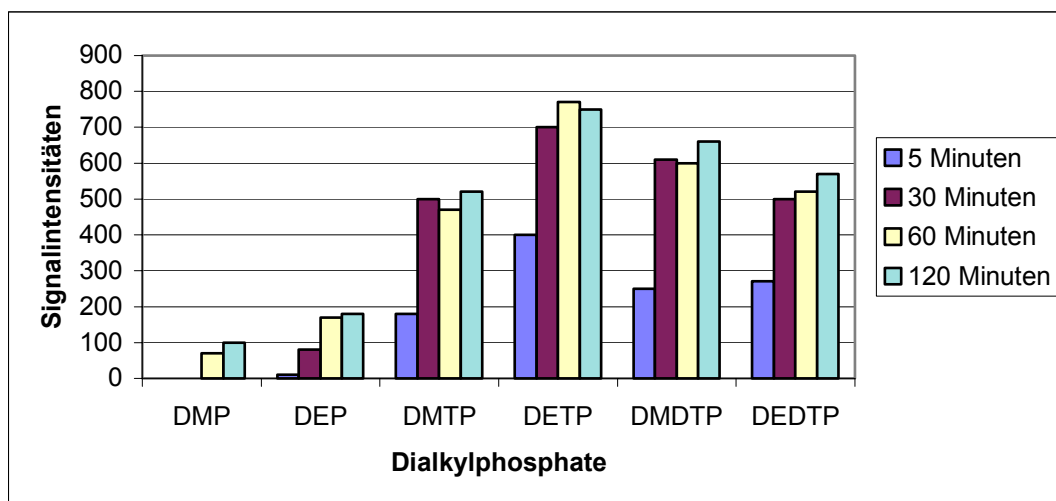


Abbildung 34: Signalintensitäten der Dialkylphosphate nach Derivatisierung mit Benzylbromid mittels GC/MS

Diazoarylmethane

Diazoarylmethane sind in basischer Umgebung mesomeriestabilisiert. Durch die Gegenwart eines Protons wird dieser Zustand aufgehoben. Das Wasserstoffatom der Dialkylphosphorsäure wandert an das Elektronenpaar des Kohlenstoffatoms vom Diazoarylmethan. Nach Abspaltung von Stickstoff verbindet sich die Alkylphosphorsäure mit dem verbleibenden Arylmethanrest. Abbildung 35 zeigt die Benzylierung der Dialkylphosphate mit Diazotoluol.

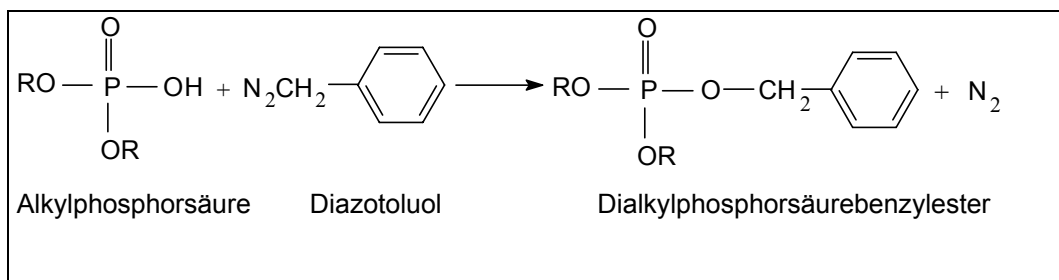


Abbildung 35: Reaktion der Dialkylphosphate mit Diazotoluol

Abbildung 36 zeigt die Signalintensitäten, welche mit den einzelnen Diazoarylmethanen erzielt worden sind. Die Reaktionszeit betrug bei allen Versuchen 5 Minuten. Die Reaktionstemperatur lag bei 40°C. Die Dialkylphosphate DMP und DEP wurden gut derivatisiert. Auch die Thio- und Dithioalkylphosphate wurden gut umgesetzt. Nachteilig bei der Diazoarylmethode war die Bildung von Isomeren der Thioalkylphosphate DMTP und DETP. Im Chromatogramm erscheinen deshalb für einen Analyten zwei Signale. Es handelt sich dabei um die Thionat- und Thiolatisomere.

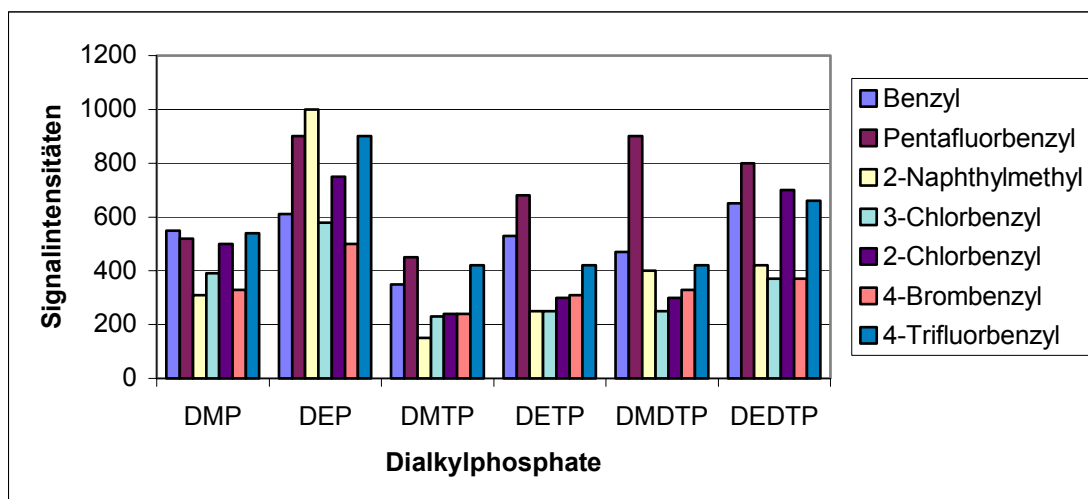


Abbildung 36: Signalintensitäten der Dialkylphosphate nach Derivatisierung mit Diazoarylmethanen mittels GC/MS

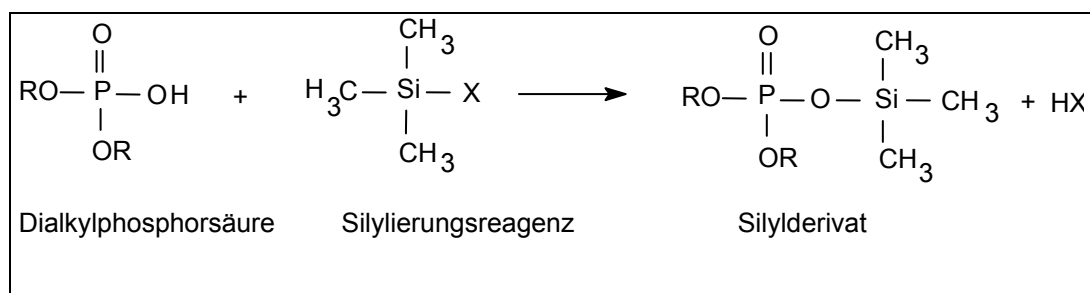
In der Tabelle 21 sind die Molekülionen (unterstrichen) und zwei Fragmentionen der Arylderivate angegeben. Bei den 2-Chlorbenzylderivaten treten keine Molekülionen auf.

Tabelle 21: Molekül- und Fragmentionen der Arylderivate

Dialkyl- phosphat	Ionen (m/z) Benzyl-derivate	Ionen (m/z) 4-Brombenzyl-derivate	Ionen (m/z) 2-Chlorbenzyl-derivate
DMP	<u>216</u> [M ⁺], 110, 104	<u>296</u> [M ⁺], 169, 110	215, 110, 89
DEP	<u>244</u> [M ⁺], 187, 118	<u>322</u> [M ⁺], 293, 267	243, 215, 187
DMTP	<u>232</u> [M ⁺], 123, 110	<u>312</u> [M ⁺], 169, 201	231, 125, 89
DETP	<u>260</u> [M ⁺], 169, 141	<u>340</u> [M ⁺], 169, 138	259, 141, 125
DMDTP	<u>248</u> [M ⁺], 123, 91	<u>328</u> [M ⁺], 169, 125	247, 157, 125
DEDTP	<u>276</u> [M ⁺], 121, 91	<u>356</u> [M ⁺], 169, 121	275, 157, 125
Dialkyl- phosphat	Ionen (m/z) 4-Trifluormethyl-derivate	Ionen (m/z) 2-Naphthylmethyl- derivate	Ionen (m/z) Pentafluor- benzyl-derivate
DMP	<u>284</u> [M ⁺], 172, 159	<u>266</u> [M ⁺], 157, 140	<u>306</u> [M ⁺], 194, 181
DEP	<u>312</u> [M ⁺], 256, 175	<u>294</u> [M ⁺], 265, 237	<u>334</u> [M ⁺], 258, 181
DMTP	<u>300</u> [M ⁺], 159, 110	<u>282</u> [M ⁺], 141, 115	<u>322</u> [M ⁺], 181, 110
DETP	<u>310</u> [M ⁺], 141, 171	<u>310</u> [M ⁺], 173, 141	<u>350</u> [M ⁺], 181, 141
DMDTP	<u>316</u> [M ⁺], 159, 126	<u>298</u> [M ⁺], 141, 115	<u>338</u> [M ⁺], 181, 157
DEDTP	<u>344</u> [M ⁺], 185, 159	<u>326</u> [M ⁺], 141, 115	<u>366</u> [M ⁺], 181, 157

5.2.3 Silylderivate

Die Silylierung erfolgt durch den Austausch eines aktiven Wasserstoffatoms mit einer Trimethylsilylgruppe. Das aktive Wasserstoffatom findet sich in Verbindungen mit OH, SH oder NH-Gruppierungen. Nach einem nukleophilen Angriff auf das Siliciumatom im Silylierungsreagenz entsteht der silylierte Analyt und die protonierte Abspaltung von „HX“ (Abbildung 37).

**Abbildung 37: Silylierung der Dialkylphosphorsäuren**

Es gibt eine Reihe von Silylierungsreagenzien, welche sich in der Struktur der Abgangsgruppe „X“ unterscheiden. Während der Silylierung wird ein Übergangszustand durchlaufen, bei dem die Abgangsgruppe „X“ eine negative Ladung stabilisieren muß (**Knapp, 1979**). Die Abgangsgruppe ist deshalb entscheidend für die Silylierungsstärke des eingesetzten Reagenzes.

Eine Auswahl von üblicherweise eingesetzten Silylierungsreagenzien ist in Tabelle 22 angegeben. Die Silylierungsstärke steigt von oben nach unten in der Tabelle an.

Tabelle 22: Silylierungsreagenzien in aufsteigender Stärke

Silylierungsreagenz	Abkürzung
Hexamethyldisilazan	HMDS
Trimethylchlorsilan	TMCS
N-Methyl-N-trimethylsilylacetamid	MSA
N-Trimethylsilyldiethylamin	TMSDEA
N-Trimethylsilyldimethylamin	TMSDMA
N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoracetamid	MSTFA
N,O-Bis(trimethylsilyl)acetamid	BSA
N,O-Bis(trimethylsilyl)-trifluoracetamid	BSTFA
N-Trimethylsilylimidazole	TMSI

MSTFA wurde eingesetzt, um die Dialkylphosphate zu silylieren. Dabei wurde wie bei den Tetraalkylammoniumhydroxiden das „Flash“-Verfahren verwendet. Die Silylierungen verliefen so schlecht, daß keine weiteren Versuche mit anderen Silylierungsreagenzien mehr unternommen wurden.

5.2.4 Chromatogramme und Massenspektren der Derivate

In diesem Abschnitt werden Chromatogramme und Massenspektren der unterschiedlichen Derivate von Alkylphosphaten gezeigt. Dabei werden die jeweils eingesetzten Reagenzien und Reaktionsbedingungen angegeben.

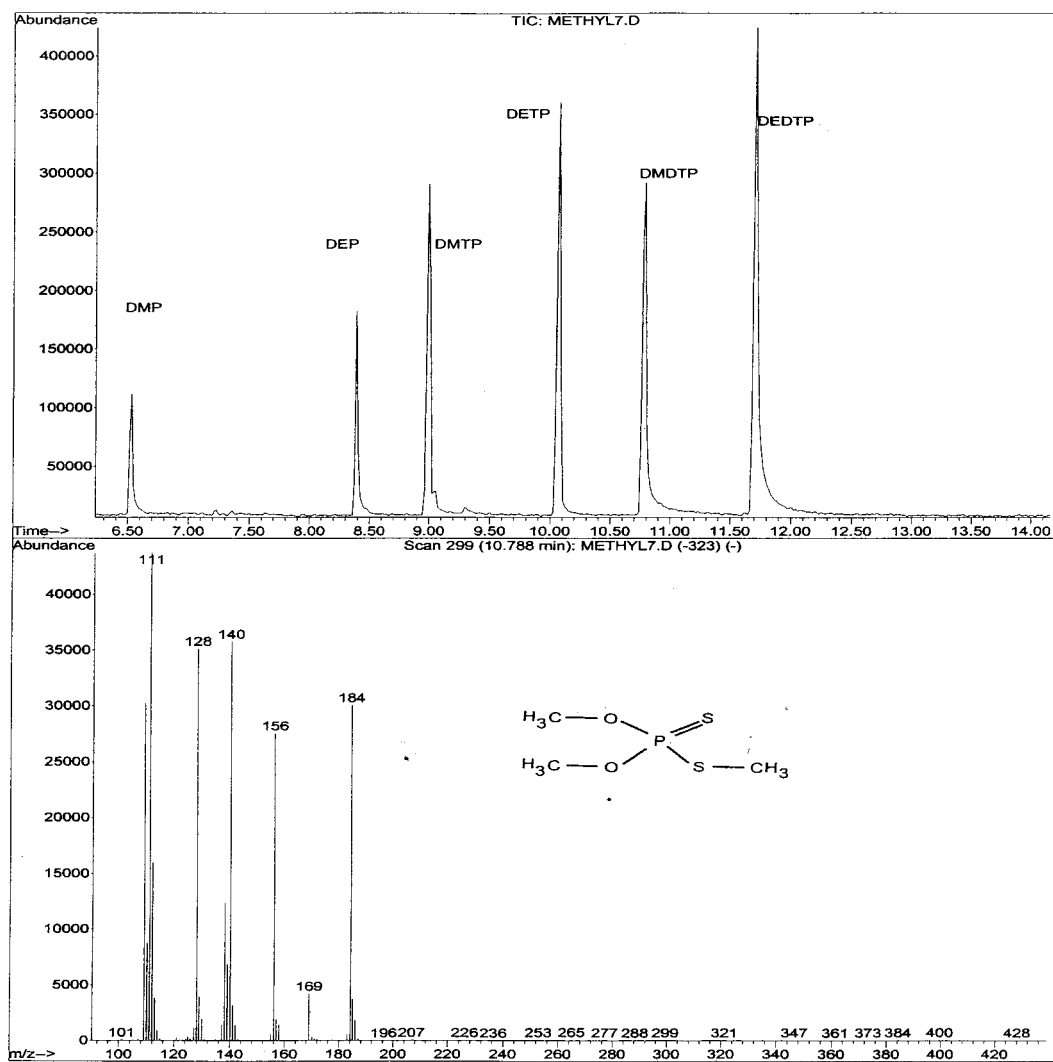


Abbildung 38: Chromatogramm methylierter Dialkylphosphate mit Massenspektrum von DMDTP mittels GC/MS

Reagenz:	Dimethylsulfat	Reaktionsgefäß:	offen
Lösungsmittel:	DMSO	Reaktionszeit:	2 Stunden
Temperatur:	40°C	Säureakzeptoren:	-

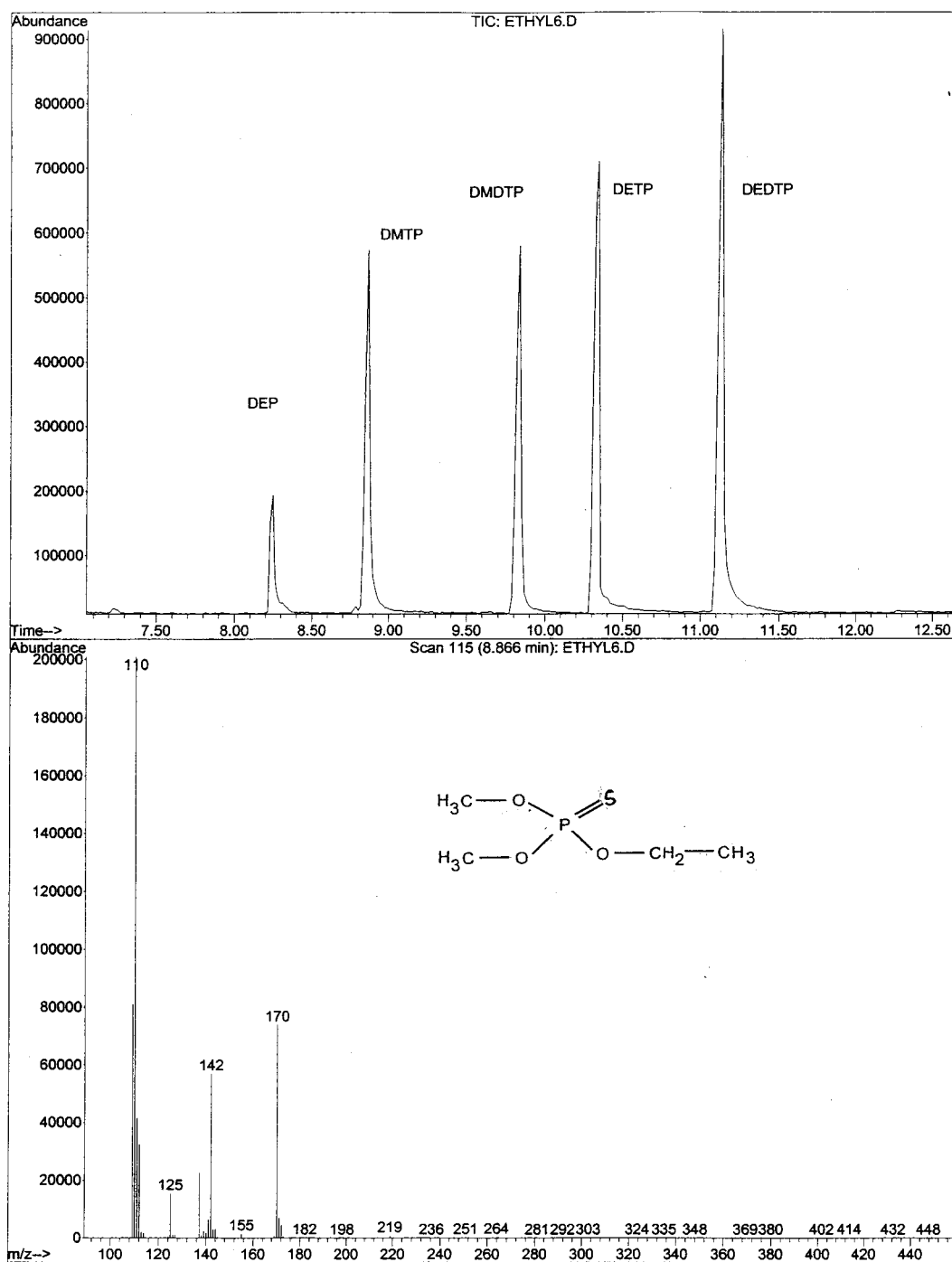


Abbildung 39: Chromatogramm ethylierter Dialkylphosphate mit Massenspektrum von DMTP mittels GC/MS

Reagenz: Diethylsulfat
 Lösungsmittel: DMSO
 Temperatur: 60°C
 Reaktionsgefäß: offen
 Reaktionszeit: 1 Stunde

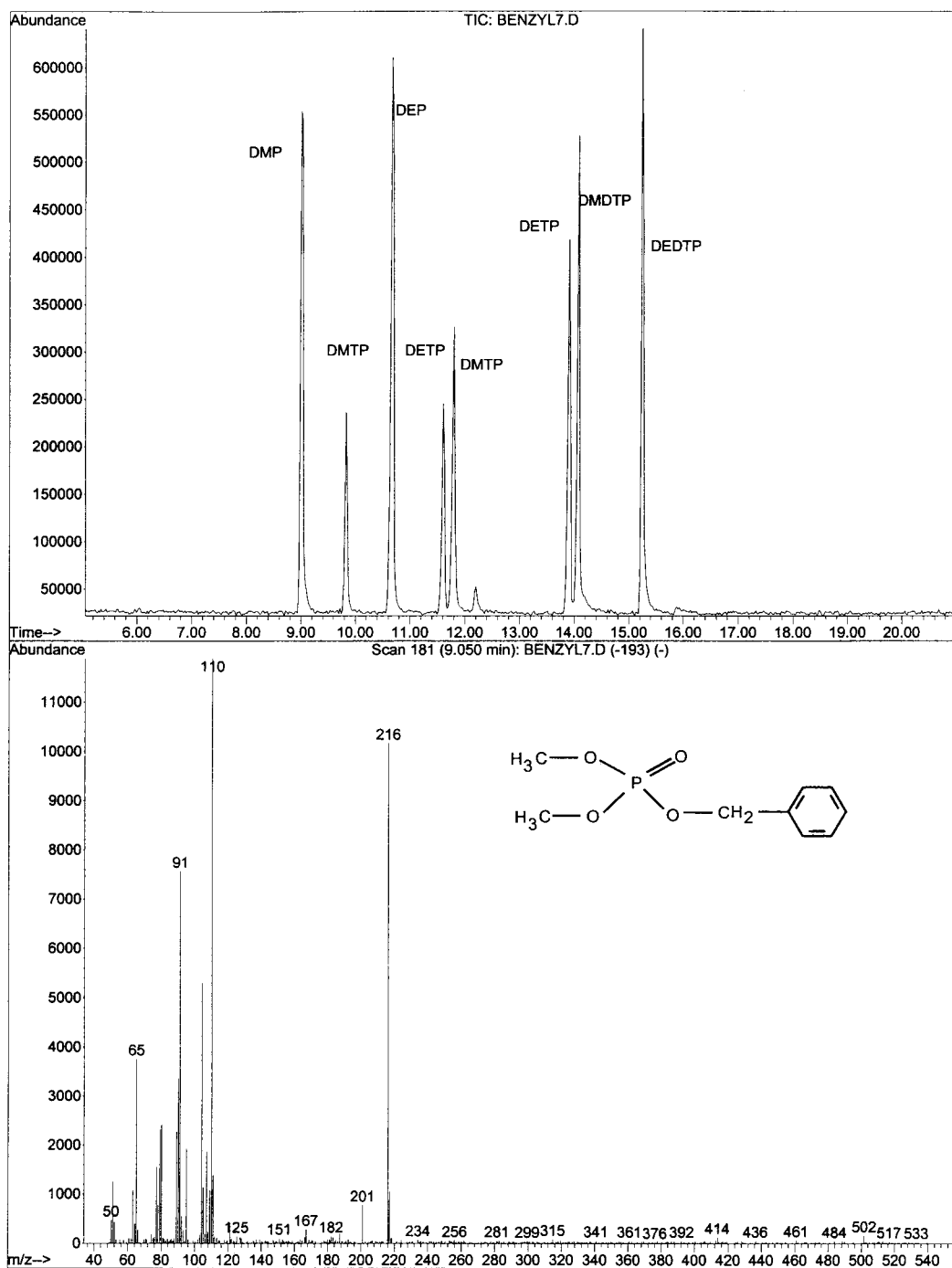


Abbildung 40: Chromatogramm benzylierter Dialkylphosphate mit Massenspektrum von DMP mittels GC/MS

Reagenz: Diazotoluol
 Lösungsmittel: Toluol
 Temperatur: 40°C
 Reaktionsgefäß: offen
 Reaktionszeit: 5 Minuten

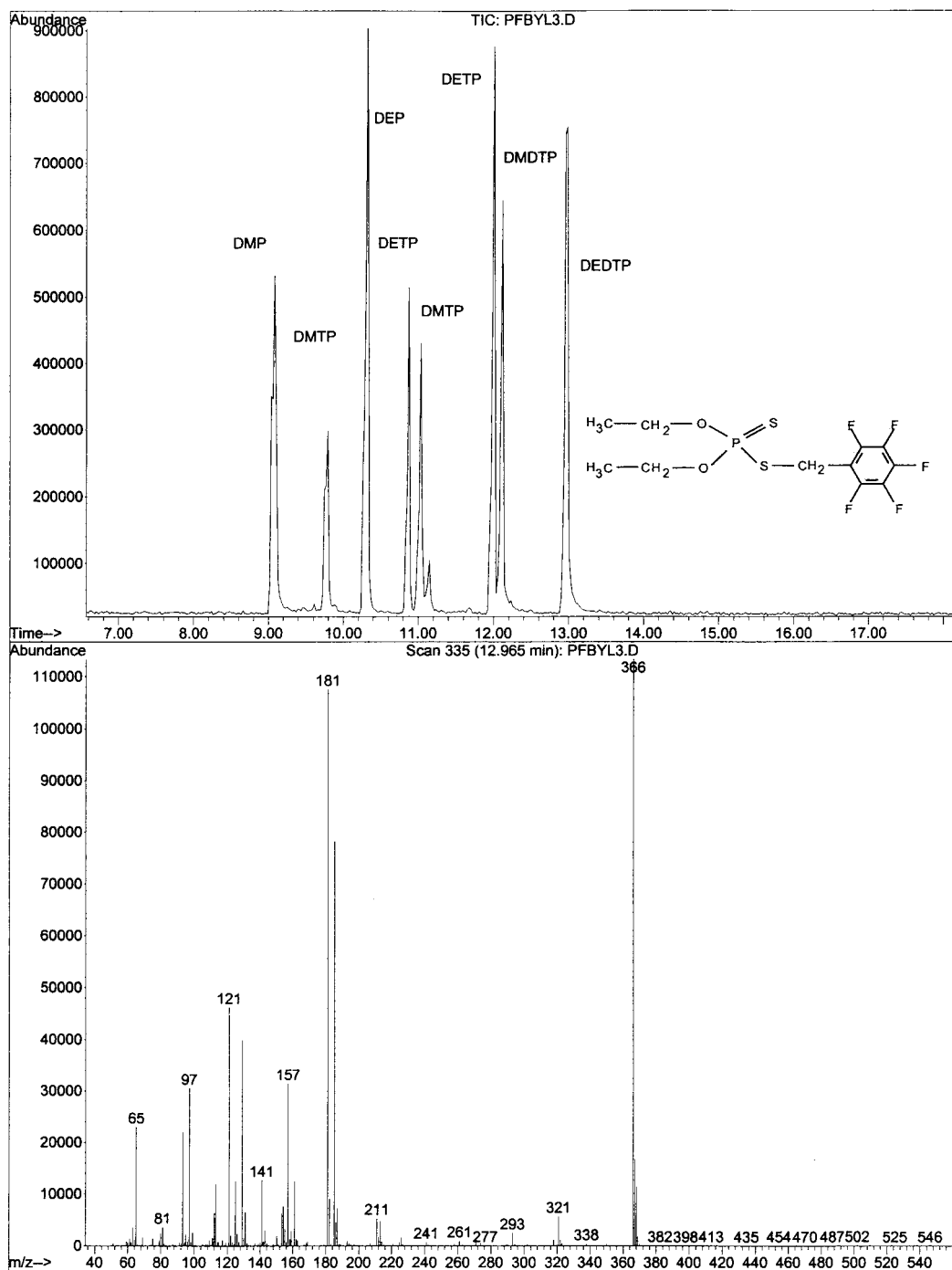


Abbildung 41: Chromatogramm pentafluorbenzylierter Dialkylphosphate mit Massenspektrum von DEDTP mittels GC/MS

Reagenz: Pentafluordiazotoluol
 Lösungsmittel: Toluol
 Temperatur: 40°C
 Reaktionsgefäß: offen
 Reaktionszeit: 5 Minuten

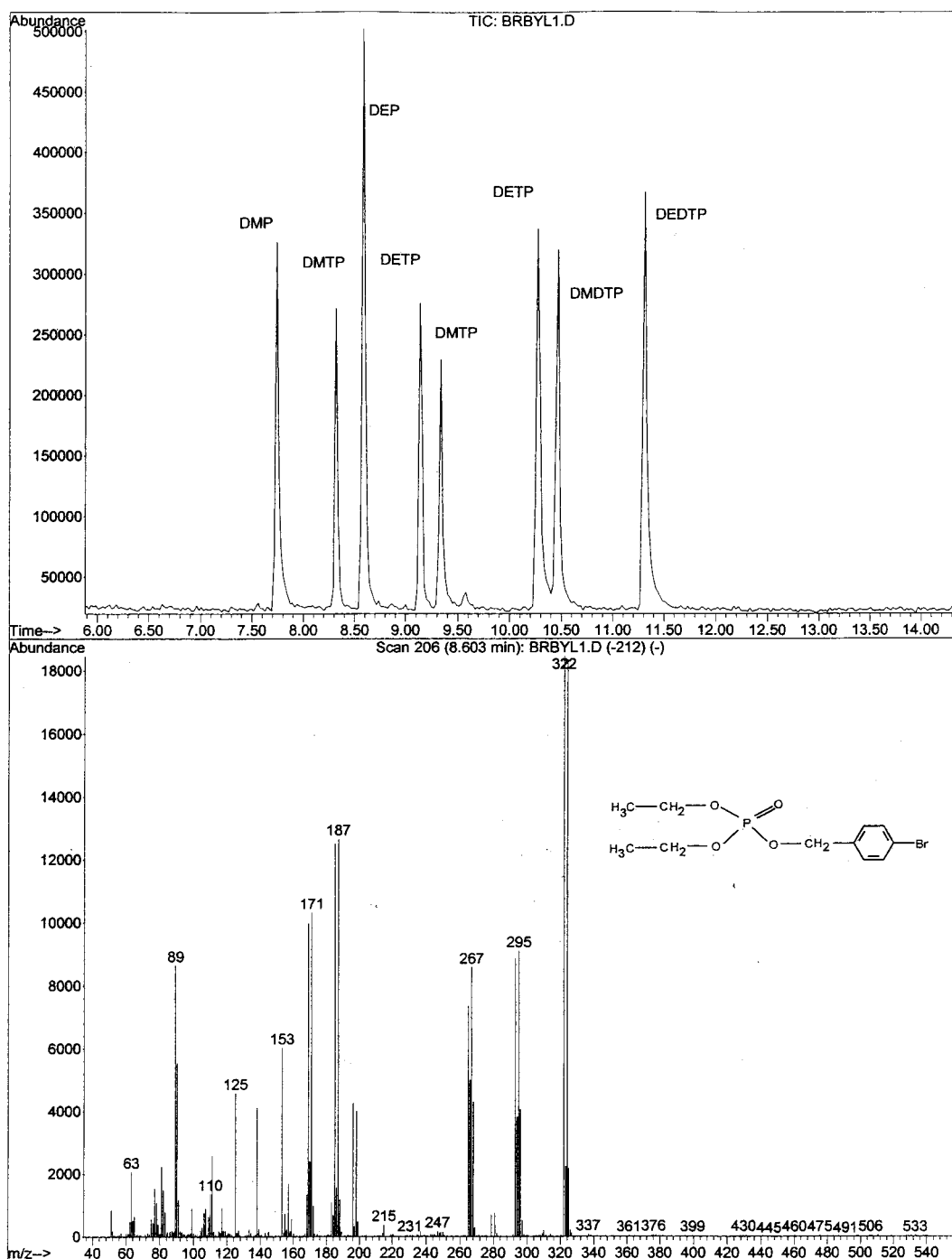


Abbildung 42: Chromatogramm von 4-Brombenzylderivaten und Massenspektrum von DEP mittels GC/MS

Reagenz: 4-Bromdiazotoluol
 Lösungsmittel: Toluol
 Temperatur: 40°C
 Reaktionsgefäß: offen
 Reaktionszeit: 5 Minuten

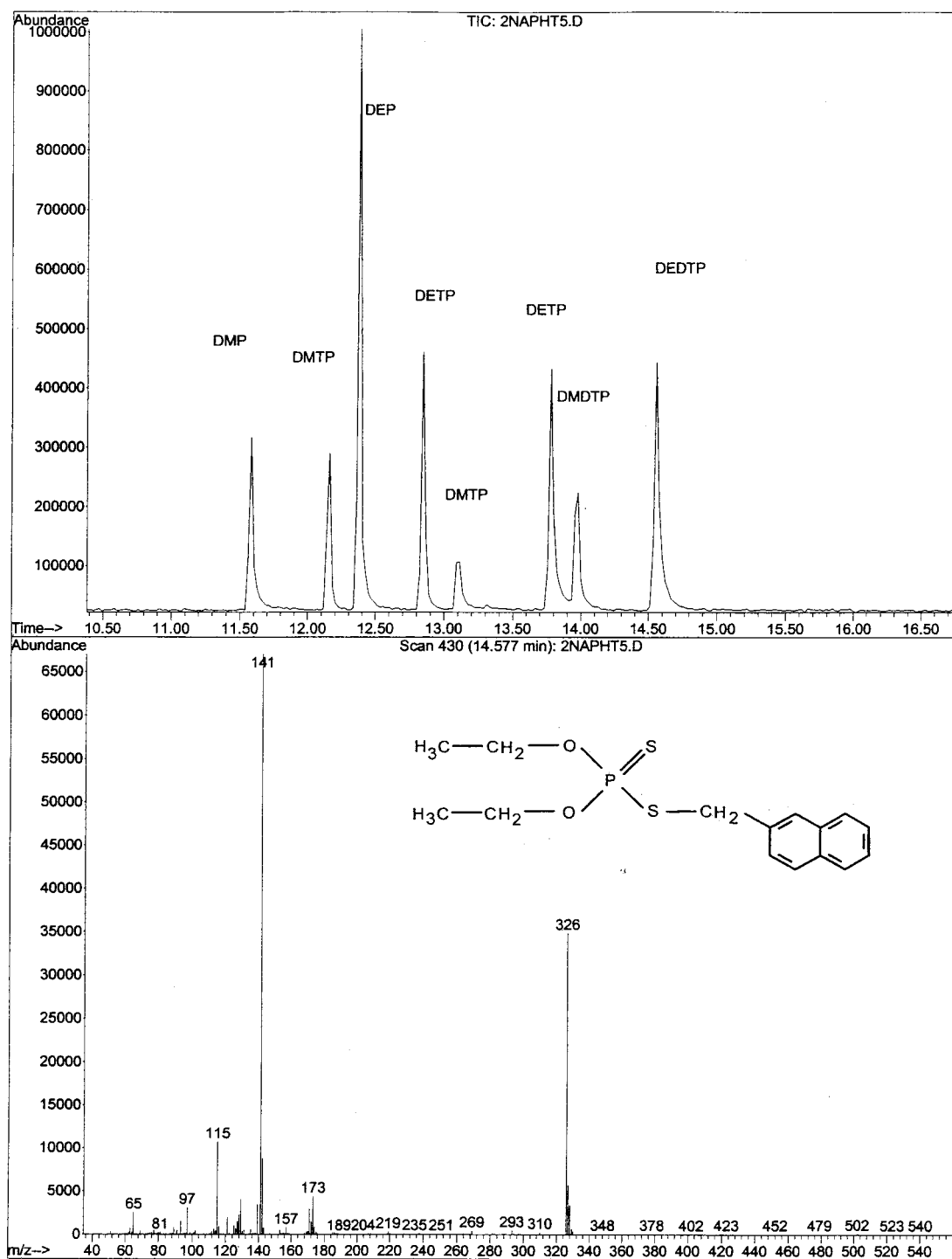


Abbildung 43: Chromatogramm von 2-Naphthylmethylderivaten und Massenspektrum von DEDTP mittels GC/MS

Reagenz:

2-Naphthyl Diazomethan

Lösungsmittel: Toluol

Temperatur: 40°C

Reaktionsgefäß: offen

Reaktionszeit: 5 Minuten

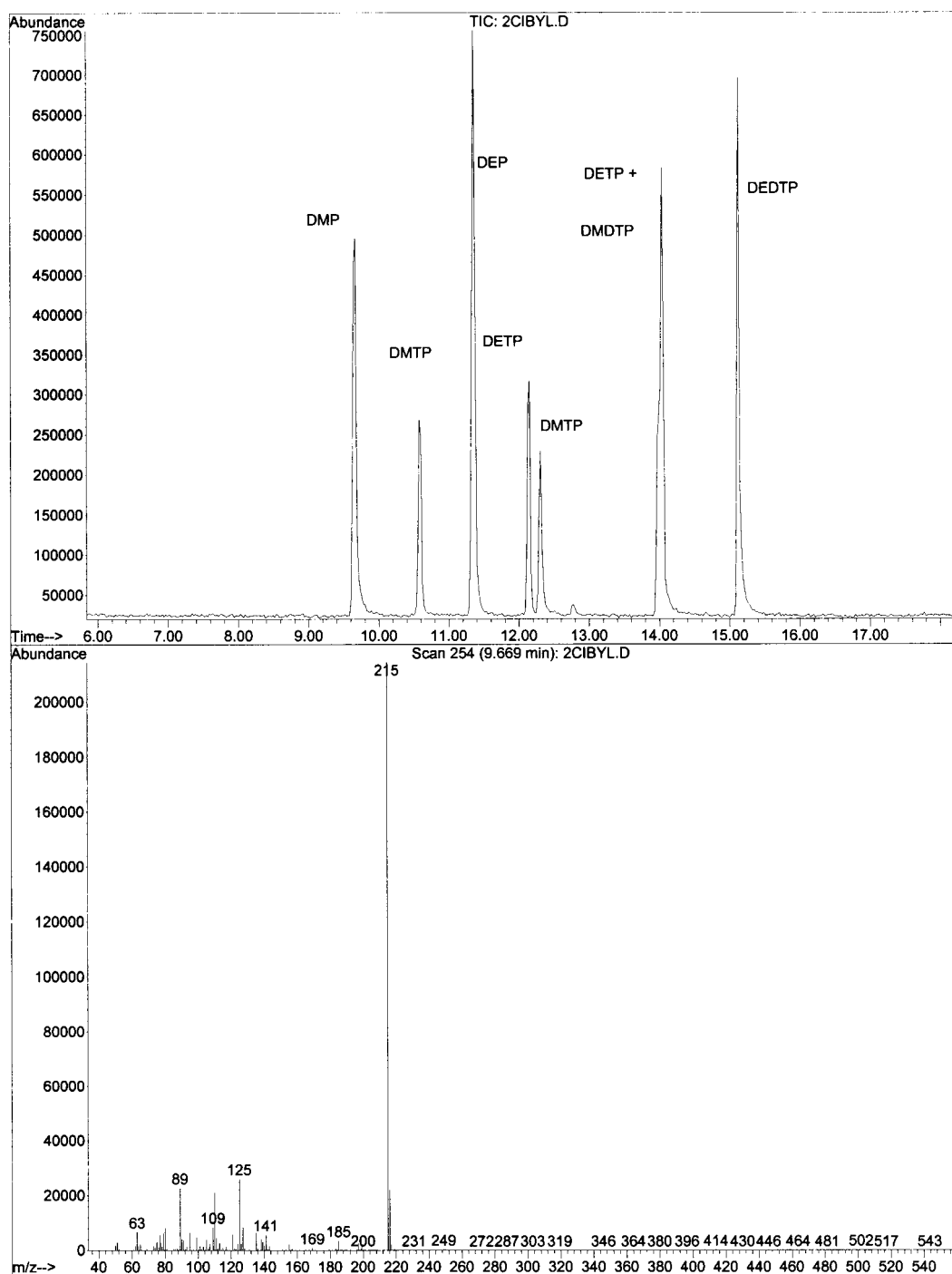


Abbildung 44: Chromatogram von 2-Chlorbenzylderivaten und Massenspektrum von DMP mittels GC/MS

Reagenz: 2-Chlordiazotoluol
 Lösungsmittel: Toluol
 Temperatur: 40°C
 Reaktionsgefäß: offen
 Reaktionszeit: 5 Minuten

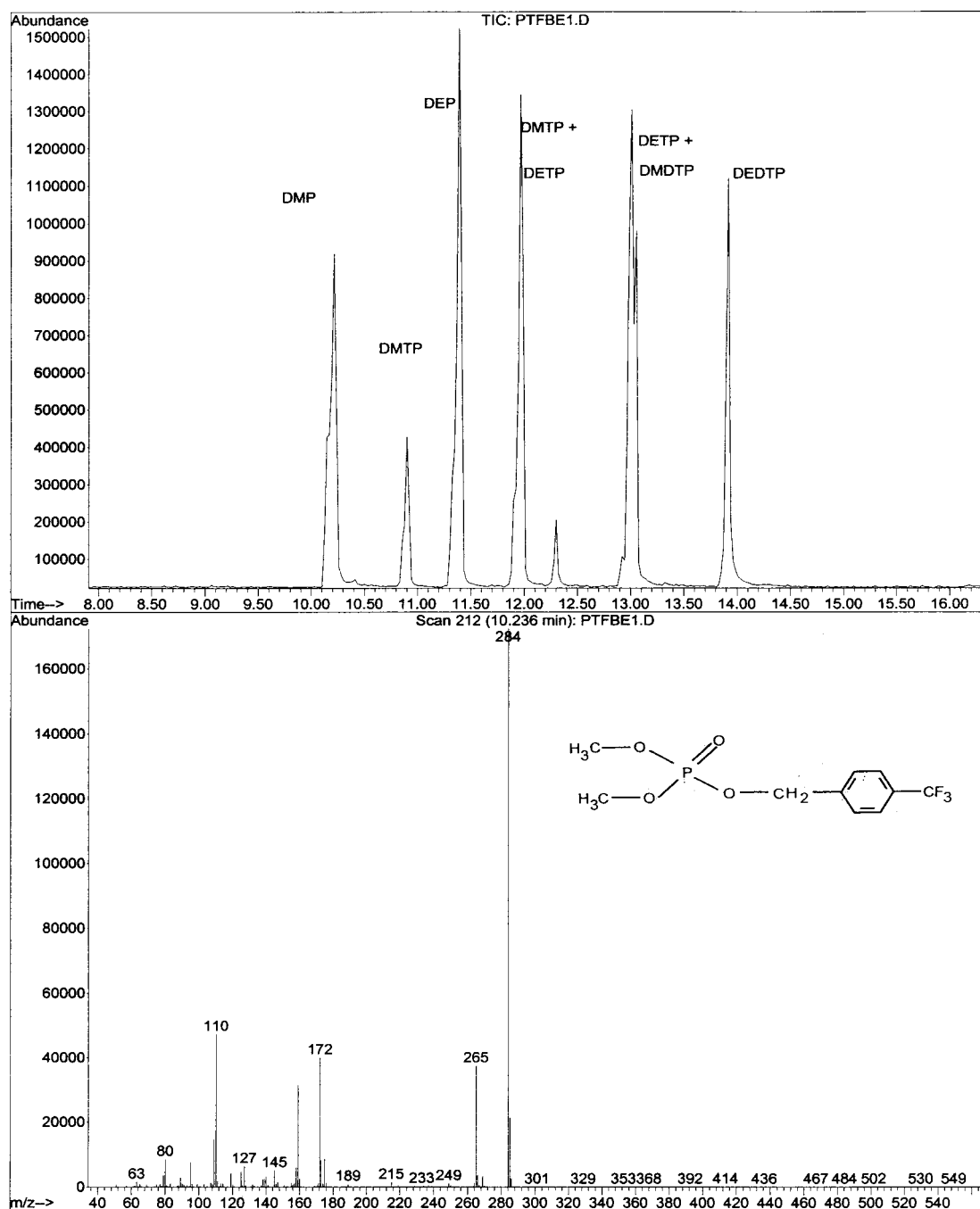


Abbildung 45: Chromatogramm von 4-Trifluormethylderivaten und Massenspektrum von DMP mittels GC/MS

Reagenz: 4-Trifluordiazotoluol
 Lösungsmittel: Toluol
 Temperatur: 40°C
 Reaktionsgefäß: offen
 Reaktionszeit: 5 Minuten

5.2.5 Kombination von Derivatisierungsreagenzien

In diesem Abschnitt wird gezeigt, dass durch die Kombination von Benzylbromiden und Diazoarylmethanen die bestmögliche Derivatisierung erreicht wird.

Bei der Umsetzung mit Benzylbromiden werden DMP und DEP nur unzureichend benzyliert. Diese beiden Dialkylphosphorsäuren lassen sich sehr gut mit Diazoarylmethanen benzylieren. Leider entstehen bei der Reaktion von Diazoverbindungen und Thioalkylphosphorsäuren die Thiolat- und Thionatisomere.

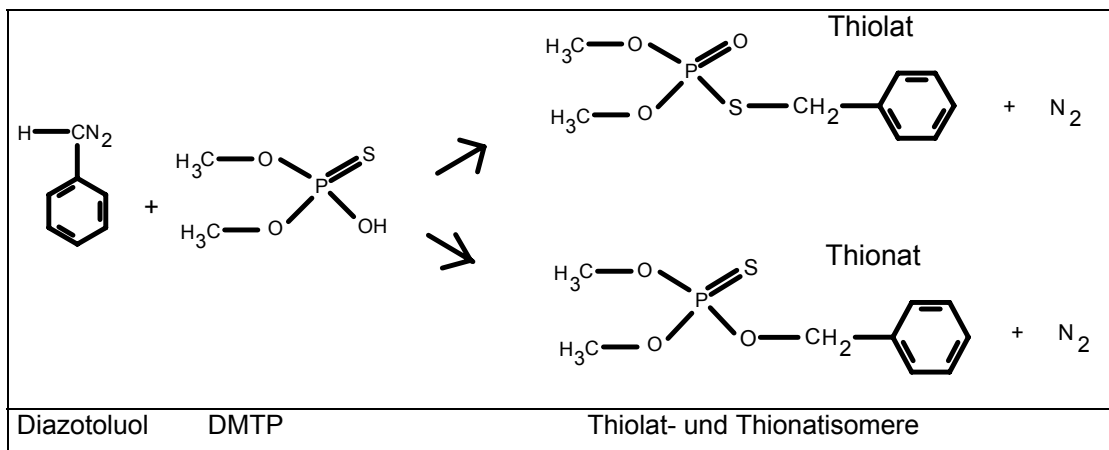


Abbildung 46: Isomerisierung der Thiodialkylphosphate mit Diazoverbindungen

Die Kombination von Benzylbromiden mit Diazoarylmethanen gewährleistet die Derivatisierung von allen Dialkylphosphaten und verhindert gleichzeitig die Isomerisierung von DMTP und DEP.

Für Benzyl- und Pentafluorbenzylderivate wurden Methoden entwickelt, in denen die Thio- und Dithiodialkylphosphate mit Halogenaromaten und DMP und DEP mit der entsprechenden Diazoarylverbindung umgesetzt werden. Dabei wurden die schwefelhaltigen Alkylphosphate zuerst in Acetonitril benzyliert. Die Benzylester wurden anschließend mit Hexan aus der ACN-Phase extrahiert, und die in der ACN-Phase verbleibenden Alkylphosphate DMP und DEP wurden zum Schluß mit einem Diazoarylmethan umgesetzt.

Die Abbildungen 35 und 36 zeigen Benzyl- und Pentafluorbenzylderivate nach Verwendung der Reagenzien einzeln und in Kombination miteinander.

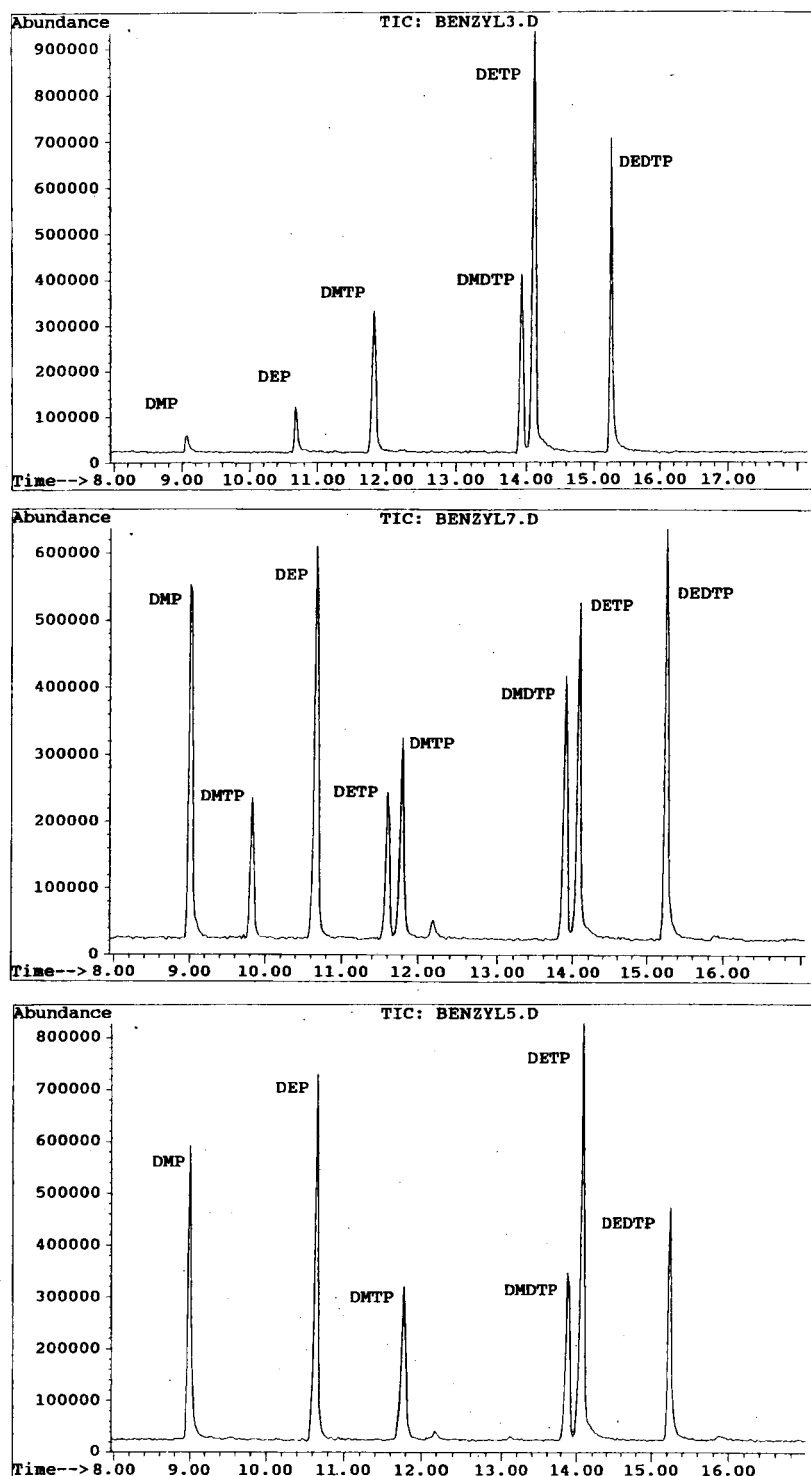


Abbildung 47: Unterschiedliche Benzylierungen der Dialkylphosphate
 Oberes Chromatogramm: Benzylierung mit Benzylbromid
 Mittleres Chromatogramm: Benzylierung mit Diazotoluol
 Unteres Chromatogramm: Benzylierung mit Benzylbromid
 und Diazotoluol

In Abbildung 47 zeigt das obere Chromatogramm die Umsetzung der Dialkylphosphate nur mit Benzylbromid.

Erkennbar ist eine zufriedenstellende Derivatisierung der schwefelhaltigen Dialkylphosphate DMTP, DETP, DMDTP und DEDTP. Die Dialkylphosphate DMP und DEP werden nur schlecht benzyliert.

Das mittlere Chromatogramm zeigt die Reaktionsprodukte nach der Behandlung mit Diazotoluol. Alle Alkylphosphate werden gut umgesetzt. Allerdings finden sich jeweils zwei Signale für DMTP und DETP im Chromatogramm, die Thionat- und Thiolatisomere.

Im unteren Chromatogramm erfolgte die Reaktion erst mit Benzylbromid und anschließend mit Diazotoluol. Es wurden alle Alkylphosphate gut derivatisiert. Es traten keine Isomere von DMTP und DETP auf.

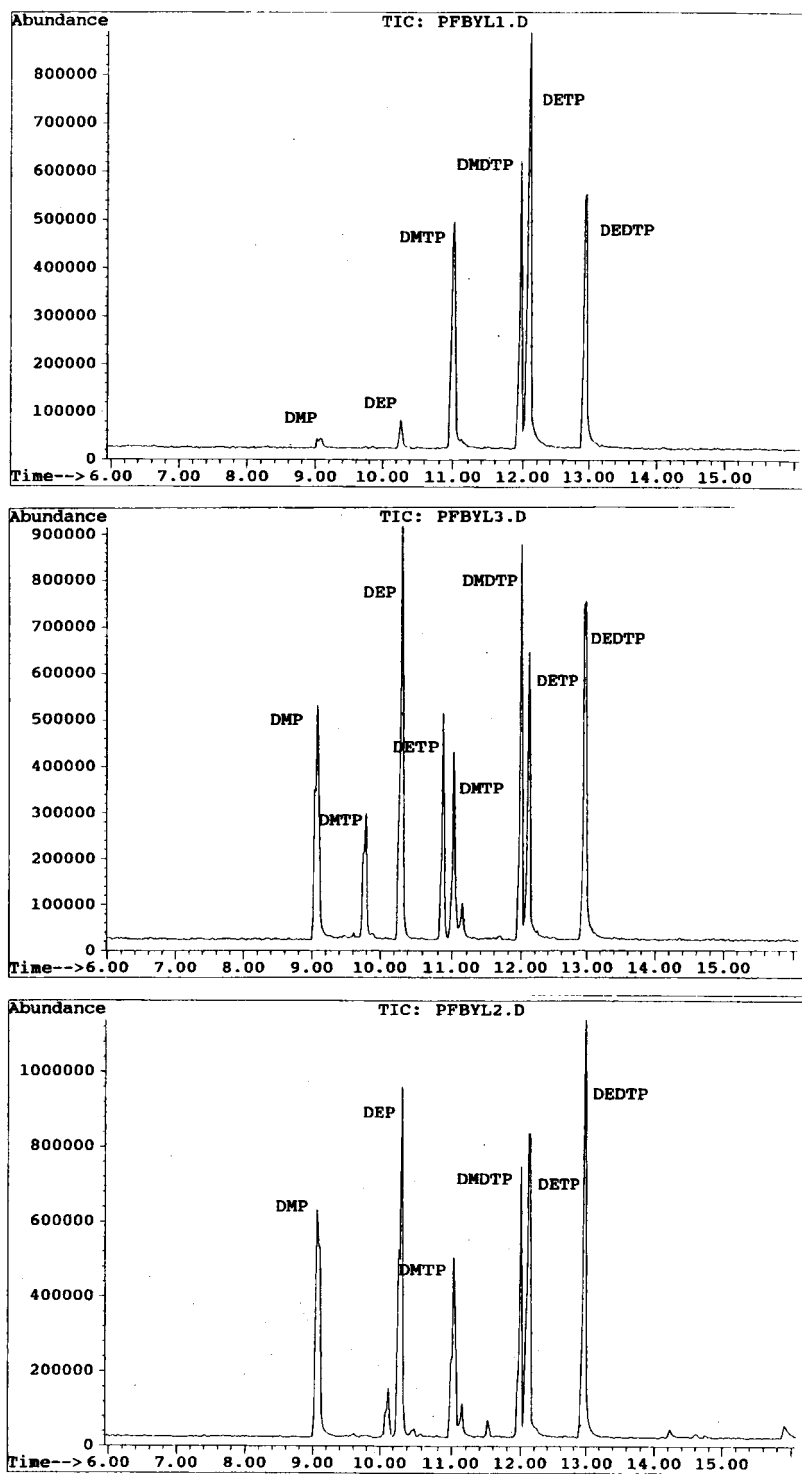


Abbildung 48: Unterschiedliche Pentafluorbenzylierungen der Dialkylphosphate
 Oberes Chromatogramm: Umsetzung mit Pentafluorbenzylbromid
 Mittleres Chromatogramm: Umsetzung mit Pentafluordiazotoluol
 Unteres Chromatogramm: Umsetzung mit Pentafluorbenzylbromid
 und Pentafluordiazotoluol

Das obere Chromatogramm in Abbildung 48 zeigt die Derivatisierung mit Pentafluorbenzylbromid.

Darunter ist die Umsetzung mit Pentafluordiazotoluol abgebildet, und im unteren Chromatogramm wurden beide Reagenzien nacheinander eingesetzt. Auch hier zeigte sich bei der kombinierten Variante eine gute Umsetzung aller Dialkylphosphate und keine Isomerisierung von DMTP und DETP.

5.3 Isolierung der Alkylphosphate

5.3.1 Vergleich unterschiedlicher Flüssig-Flüssig-Extraktionen

Bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion werden Verbindungen, welche in wässrigen Matrices gelöst sind, mit einem organischen Lösungsmittel isoliert.

In der elutropen Reihe sind Lösungsmittel nach steigender Polarität für die Flüssig-Chromatographie geordnet. Für die Extraktion der Dialkylphosphate aus Wasser wurden zehn Lösungsmittel mit steigender Polarität untersucht. Die Extraktion erfolgte einmalig aus wässriger 0,1 molarer HCl-Lösung. Um eine Phasentrennung zwischen Wasser und ACN zu erzielen, wurde die salzsaure, wässrige Phase mit Natriumchlorid gesättigt.

Abbildung 49 zeigt die eingesetzten Lösungsmittel und die entsprechende Wiederfindungsrate der extrahierten Dialkylphosphate. Mit den Lösungsmitteln Hexan, Isooctan und Cyclohexan ließen sich keine der Phosphorsäuren aus der angesäuerten Wasserprobe isolieren. Erst mit Lösungsmitteln höherer Polarität, wie z.B. 1-Chlorbutan und Toluol ließen sich die lipophileren Dialkylphosphate DETP und DEDTP isolieren. Die Ergebnisse blieben aber unzureichend, wenn die Extraktionsmittel mit Wasser nicht mischbar sind. Erst ACN ermöglichte die Extraktion aller Dialkylphosphate, aber auch damit war die Wiederfindungsrate für einige Dialkylphosphate gering.

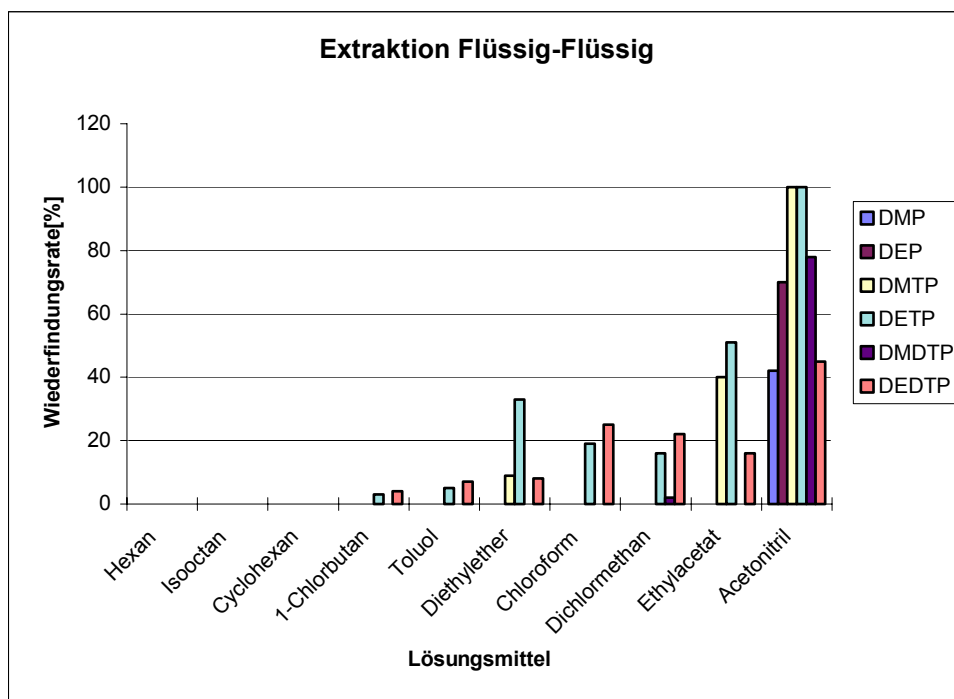


Abbildung 49: Wiederfindungsraten für die Dialkylphosphate bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion

5.3.2 Vergleich unterschiedlicher Festphasenextraktionen (SPE)

Bei der SPE handelt es sich um einen physikalischen Extraktionsprozeß, der zwischen einer flüssigen und einer festen Phase stattfindet. Um einen Analyten aus einer flüssigen Phase zu extrahieren, muß die Wechselwirkung zwischen Analyt und fester Phase größer sein als zwischen dem Analyten und der flüssigen Matrix. Ist dies der Fall, reichert sich beim Durchlaufen der Probelösung durch das Sorbens der Analyt an der festen Phase an. Probenbestandteile mit abweichenden chemisch-physikalischen Eigenschaften passieren ungehindert das Sorbens. Ein anschließender Waschschrift sorgt für die Elimination restlicher Matrixbestandteile. Abschließend wird der Analyt eluiert, indem ein Lösungsmittel verwendet wird, welches mit dem Analyten stärker in Wechselwirkung tritt als das Sorbens.

Bei den verwendeten Festphasen handelt es sich - Bond Elut ENV und NEXUS ausgenommen - um oberflächenmodifizierte Silicamaterialien, welche durch Reaktion von Organosilanen mit aktiviertem Silica gebildet werden. Als Produkt ergibt sich ein Sorbens, bei dem eine funktionelle Gruppe über eine Silyletherbrücke an das Silicasubstrat gebunden ist.

Die primären Wechselwirkungen ergeben sich aus den funktionellen Gruppen, gefolgt von sekundären Wechselwirkungen mit dem Silicasubstrat.

Oberflächenmodifizierte Silicasorbentien sind innerhalb eines pH-Bereiches von ca. 2 bis 7,5 stabil. Oberhalb von pH 7,5 löst sich das Silicasubstrat auf und unterhalb von pH 2 sind die Silylethergruppen nicht stabil. In der Praxis läßt sich jedoch auch in einem weiteren pH-Bereich arbeiten, weil die zerstörenden Vorgänge zeitabhängig sind und viele Extraktionen binnen kurzer Zeit abgeschlossen werden.

Im folgenden werden die Sorbentien kurz beschrieben, welche zur Extraktion von Dialkylphosphaten aus Wasser untersucht worden sind.

C18e, C18, C8, C2, Phenyl, CN

Die funktionelle Gruppe ist eine geradkettige Kohlenwasserstoffkette, eine Cyanogruppe oder ein Phenylrest. Die primären Wechselwirkungen sind unpolar und das Potential für polare sekundäre Wechselwirkungen mit verbleibenden OH-Gruppen nimmt mit längerem Alkylrest ab, weil diese die Silanolgruppen mehr abschirmen.

NH₂ (Aminopropyl)

NH₂ ist eine polare Phase, die unter wässrigen Bedingungen als schwacher Anionenaustauscher fungiert. Die Phase eignet sich besonders für Verbindungen, die irreversibel auf einem starken Anionenaustauscher (SAX) zurückgehalten werden. Der pK_s-Wert des Sorbens beträgt 9,8, so daß bei höheren pH-Werten das Sorbens entladen vorliegt und zurückgehaltene Anionen eluiert werden können.

PSA (N-propyl-ethylendiamin) bzw. 1,2-Amino (WAX)

Diese Phase enthält primäre und sekundäre Aminogruppen und stellt deshalb eine Mischung aus einem schwachen und mittelstarken Anionenaustauscher dar. Der pK_s-Wert liegt für die primären Aminogruppen bei 10,1 und bei 10,9 für die sekundären Aminogruppen. PSA ist ein stärkerer Anionenaustauscher als NH₂ und ist aufgrund seines höheren Kohlenstoffgehaltes ein Sorbens geringerer Polarität. Deshalb ist diese Phase häufig zu empfehlen, wenn ein Isolat aufgrund zu hoher Polarität auf der NH₂-Phase zu stark zurückgehalten wird.

SAX (trimethylaminopropyl)

Die funktionelle Gruppe der SAX-Phase ist ein quarternäres Amin, nicht entladbar und somit der stärkste Anionenaustauscher. Die sekundären unpolaren Wechselwirkungen sind sehr gering, weil das Amin die Kohlenwasserstoffe in der funktionellen Gruppe maskiert.

Die SAX-Phase eignet sich zur Retention wenig affiner Anionen. Hochaffine Anionen sind von diesem Sorbens schlecht zu eluieren. Weil das Sorbens nicht zu entladen ist, sollte die Elution der Analyten mit selektiven Gegenionen erfolgen.

NEXUS

NEXUS vereinigt hydrophile und lipophile Eigenschaften in einem Sorbens. Darüber hinaus ist die Konditionierung der Säule mit einem organischen Lösungsmittel oder/und Puffer nicht erforderlich, die wässrige Probe kann direkt aufgegeben werden. Die funktionellen Gruppen bestehen aus unpolaren Styrolmonomeren und wasserbenetzbaren Methacrylatgruppen. Diese Phase soll es ermöglichen, Substanzen mit unterschiedlichen Eigenschaften mittels einer Extraktion zu erfassen.

Bond Elut ENV

Bond Elut ENV ist ein hochreines Polymer, bestehend aus Styrol-Divinylbenzol und wird für die Extraktion von polaren organischen Verbindungen aus Wasser entwickelt. Diese Phase diente bisher der Isolation von Herbizidmetaboliten und Explosivstoffen im Umweltbereich, mittlerweile findet sie auch Einsatz bei klinischen Applikationen, hier hat sich vor allem ihre gute Durchlässigkeit bei viskösen Proben bewährt.

Die untersuchten Sorbentien ermöglichen unpolare und ionische Wechselwirkungen in unterschiedlicher Ausprägung mit den Analyten.

Unpolare Wechselwirkungen treten zwischen den Kohlenwasserstoffen der funktionellen Gruppen am Sorbens und den Kohlenwasserstoffgruppen des Analyten auf.

Die ionische Wechselwirkung tritt zwischen einem geladenen Analyten und einem Sorbens mit entgegengesetzter Ladung auf. Um eine Retention des Analyten zu ermöglichen, muß das Lösungsmittel oder die Matrix einen pH-Wert haben, bei dem sowohl Analyt als auch Sorbens geladen sind. Darüber hinaus dürfen keine hohen Konzentrationen konkurrierender Ionen der gleichen Ladung anwesend sein. Es ist notwendig, den pKs-Wert der Substanz zu kennen, um einen pH-Wert einstellen zu können, bei dem eine Retention möglich ist. Unter optimalen Bedingungen liegt der pH-Wert der Probenmatrix zwei pH-Einheiten über bzw. unter den pKs-Werten von Analyt und Sorbens. So ist gewährleistet, daß nahezu alle ionischen Gruppen geladen vorliegen.

Bei den zu untersuchenden Dialkylphosphaten sind unpolare und vor allem ionische Wechselwirkungen denkbar.

Die unpolaren Wechselwirkungen ergeben sich aus den Methyl- und Ethylgruppen. Da es sich bei den Dialkylphosphaten um Säuren handelt, ist auch eine ionische Wechselwirkung zu berücksichtigen.

Für die Untersuchung der unpolaren und polaren Eigenschaften zur Extraktion der Dialkylphosphate wurden die Sorbentien C18e, C18, C8, C2, PH, CN, Bond Elut ENV und NEXUS eingesetzt. Die ionischen Wechselwirkungen wurden mit den Phasen NH₂, PSA und SAX untersucht. Da die Bestimmung der Dialkylphosphate im Urin erfolgen soll, wurden dotierte Wasserproben für die Versuche verwendet.

Bei den nichtionischen Phasen erfolgte die Konditionierung der Säulen mit Methanol und Wasser.

Anschließend wurden die dotierten „salzsauren“ Wasserproben auf die Säulen gegeben. Die Ansäuerung ($\text{pH} < 1$) war notwendig, um den Großteil der Säuren undissoziiert zu retendieren, andernfalls würde der ionische Charakter die Löslichkeit im Wasser zu stark erhöhen und die Wechselwirkung mit einem unpolaren Sorbens beeinträchtigen. Der Waschgang wurde mit 0,1 molarer wässriger HCl durchgeführt. Nachdem die Säulen unter Vakuum getrocknet wurden, erfolgte die Elution mit Methanol.

Für die Retention der Dialkylphosphate auf den Sorbentien, die hierbei als Ionenaustauscher arbeiten, sind die Wasserproben nicht angesäuert worden. Der Ionenaustausch ist gewährleistet, da bei einem pH-Wert von ca. 7 die Dialkylphosphate ebenso wie die funktionellen Gruppen der Ionenaustauscher dissoziiert vorliegen. Gewaschen wurde mit Wasser.

Für die Elution der Analyten von einem Ionenaustauscher stehen mehrere Möglichkeiten zur Verfügung.

Es kann ein Puffer eingesetzt werden, der um zwei pH-Einheiten höher liegt als der pks-Wert des Sorbens, dadurch wäre das Sorbens entladen.

Der eingesetzte Puffer kann aber auch zwei pH-Einheiten unterhalb des pks-Wertes des anionischen Analyten liegen, damit würden die Analyten neutralisiert werden. Darüber hinaus kann ein Puffer mit hoher Ionenstärke ($> 0,1\text{m}$) verwendet werden, wodurch die Ionen des Puffers mit den Analytionen um das Sorbens konkurrieren. Als letzte Möglichkeit ergibt sich der Einsatz eines Puffers mit Anionen von hoher Selektivität, welche vom Sorbens bevorzugt zurückgehalten werden.

Die Elution der Dialkylphosphate sollte mit einem organischen Lösungsmittel erfolgen, um anschließend eine wasserfreie Derivatisierung zu ermöglichen.

Die Elution bei der NH_2 -, PSA- und SAX-Phase wurde mit ammoniakalischem Methanol durchgeführt ($\text{pH} > 11$).

Die Extraktion der Dialkylphosphate auf Umkehrphasen wie C18e, C18, C8, C2, Phenyl und CN lag mit Ausnahme der C18 weit unter 40%. Auch auf der C18 wurde nur DETP merklich zurückgehalten.

Die ausgeprägtere Retention von DETP auf C18 gegenüber C18e zeigt, daß die sekundären polaren Wechselwirkungen aufgrund vorhandener Silanolgruppen vorteilhaft sind. DMP und DEP werden von keiner dieser Phasen extrahiert. Die Phasen CN und C2 eignen sich nicht für die Extraktion von Dialkylphosphaten aus wässrigem Medium. Möglicherweise wären sie geeignet, die Phosphorsäuren aus einem unpolaren Medium zu extrahieren, weil dann die polaren Eigenschaften dieser Phasen in den Vordergrund treten würden.

Die nicht auf Silica basierenden Extraktionsphasen ENV und NEXUS bieten mit Wiederfindungsraten unter 30% auch keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Deutliche Verbesserungen hinsichtlich der Isolierung ergeben sich jedoch durch die Anwendung von Ionenaustauschern. Der schwache Anionenaustauscher hält, wenn auch nur mit niedrigen Wiederfindungsraten, alle sechs Dialkylphosphate zurück. Das Ergebnis läßt sich wesentlich verbessern, wenn der schwache Tauscher mit einem stärkeren kombiniert wird (1,2-Amino). Die sekundären unpolaren Wechselwirkungen dieser Phase unterstützen möglicherweise die Retention. Die Wiederfindungsraten liegen für alle Dialkylphosphate über 50%, für DMTP, DETP, DMDTP und DEDTP über 70%. Auf der SAX-Phase, dem stärksten Anionenaustauscher, ist die Wiederfindungsrate deutlich schlechter gegenüber den anderen beiden. Vermutlich werden die Dialkylphosphate auf diesem Sorbens so stark zurückgehalten, daß sie unter den angewendeten Bedingungen nicht eluiert werden. Abbildung 50 zeigt die eingesetzten Festphasen und die erzielten Wiederfindungsraten.

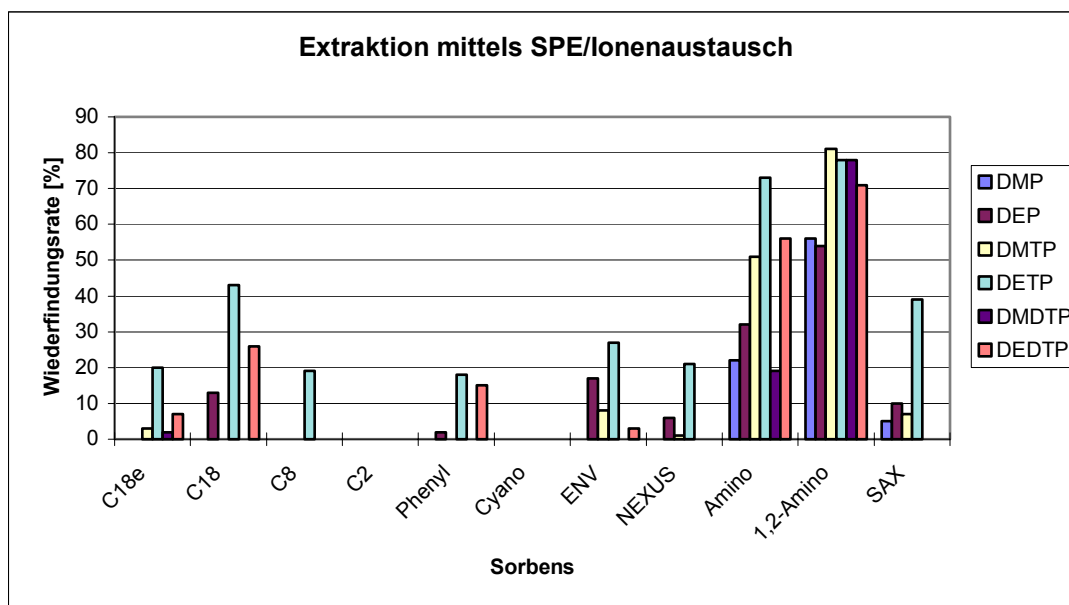


Abbildung 50: Wiederfindungsrate der Dialkylphosphate bei der Extraktion mittels SPE/Ionenaustausch

5.3.3 Vergleich unterschiedlicher Phasentransfer-Extraktionen

Unter einer phasentransfervermittelten Extraktion versteht man den Transport eines Analyten im Zweiphasensystem mit Hilfe eines Gegenions. Für die Extraktion der Dialkylphosphate kommen vor allem quartäre Ammoniumsalze in Frage. Das quartäre Ammoniumsalz transportiert das Anion aus der wässrigen Phase in die organische Phase.

Anders als bei phasentransferkatalysierten Reaktionen, muß die Menge des Transporters mit der Menge des Analyten mindestens äquivalent sein, weil in der organischen Phase nur eine Anreicherung des Analyten und keine Reaktion stattfindet. Der Phasentransfertransporter übernimmt bei einer Extraktion also keine katalytischen Aufgaben. Aus Abbildung 51 wird deutlich, daß die Kohlenstoffkettenlänge des quartären Amins entscheidend für die Extraktion der Dialkylphosphate ist. Während Tetraethyl-, Tetrabutyl-, und Benzyltriethylammoniumchlorid keine Extraktion ermöglichen, lassen sich mit dem Tetrahexylammoniumsalz alle Dialkylphosphate isolieren. DETP und DEDTP lassen sich mit über 60% extrahieren, DMP und DEP jedoch nur mit 10-20%.

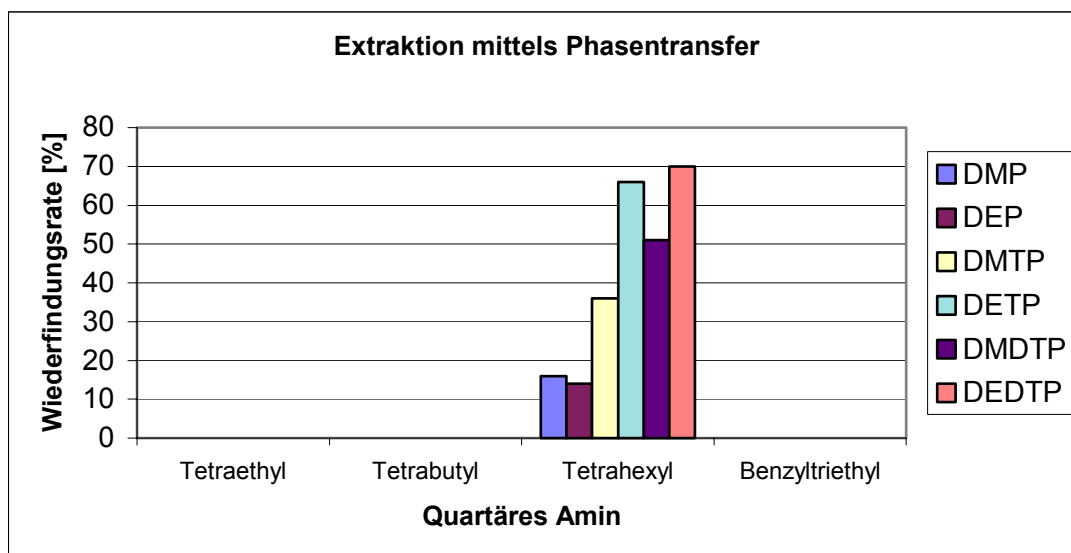


Abbildung 51: Wiederfindungsrate der Dialkylphosphate bei Extraktion mittels Phasentransfer

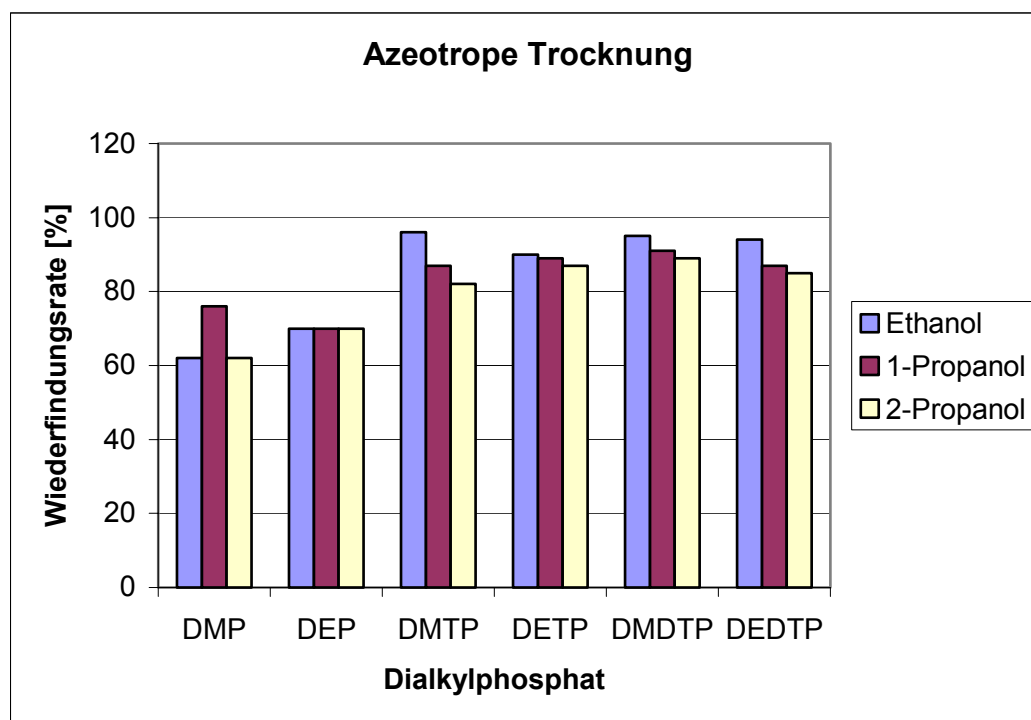
5.3.4 Vergleich unterschiedlicher azeotroper Trocknungen

Azeotropische Gemische werden charakterisiert durch ihre Eigenschaften bezüglich der Siedetemperatur, des Dampfdruckes und der Anzahl der beteiligten Komponenten. Sie siedend in einem bestimmten Mischungsverhältnis bei einem Siedepunkt, welcher sich von den Siedepunkten der Einzelsubstanzen unterscheidet. Destillativ lässt sich also ein azeotropes Gemisch nicht mehr trennen, weil Flüssigkeits- und Dampfphase dieselbe Zusammensetzung besitzen. Die Azeotropbildung kann man sich zunutze machen, um Feststoffe zu trocknen, indem man ein wasserschleppendes Mittel einsetzt und Wasser als Azeotrop abdestilliert. In diesem Fall wurde beabsichtigt, die Dialkylphosphate mittels azeotroper Trocknung aus einer Urinprobe zu isolieren. Es gibt je nach Anzahl der beteiligten Komponenten binäre, tertiäre und quartäre azeotrope Gemische. Zur Trocknung des Urins wurde auf die Untersuchung der tertiären und quartären Systeme verzichtet. Tabelle 23 zeigt die untersuchten Gemische mit ihren Zusammensetzungen und Siedepunkten.

Tabelle 23: Azeotrope Gemische aus Wasser und organischen Lösungsmitteln

Organisches Lösungsmittel	Siedepunkt der Lösungsmittel [C°]	Zusammensetzung [%]		Azeotrop-Siedepunkt [C°]
		Lösungsmittel	Wasser	
Ethanol	78	96	4	78
1-Propanol	97	72	28	80
Isopropanol	82	87	13	80

Bei der azeotropen Trocknung sind die Wiederfindungsraten für die Dialkylphosphate, unabhängig vom eingesetzten Lösungsmittel, gut. Es werden alle schwefelhaltigen Phosphorsäureester mit über 80% wiedergefunden. DMP und DEP liegen zwischen 60 und 80%, entweder aufgrund höherer Flüchtigkeit oder stärkerer Adsorption am Glasgefäß. Abbildung 52 zeigt die als Schleppmittel eingesetzten Lösungsmittel mit den dazugehörigen Wiederfindungsraten der einzelnen Dialkylphosphate.

**Abbildung 52: Wiederfindungsrate bei der Isolierung der Dialkylphosphate durch azeotrope Trocknung**

5.4 Bestimmung von Dialkylphosphaten im Urin

Für die Bestimmung der Dialkylphosphate im Urin mussten die Proben aufgearbeitet werden. Dabei wurden sie zunächst aus dem Urin isoliert. Außerdem waren sie zu derivatisieren, damit ihre Bestimmung mittels GC/MS möglich wurde. Der Probenaufarbeitung schloß sich die Entwicklung einer Screening-Methode mittels GC/MS an. Die Auswertung erfolgte im Scan-Modus mit einem externen Standard und ermöglichte mit einer Nachweisgrenze von etwa 150ng/ml Urin die Erkennung von Intoxikationen. Anschließend wurde ein GC/MS-SIM Verfahren erstellt, der eine Exposition ohne Vergiftungssymptome erkennen läßt. Als interne Standards standen Dibutylphosphat (DBP) und Dipropyldithiophosphat (DPDTP) zur Verfügung.

5.4.1 Probenaufarbeitung

Die Aufarbeitung der Urinproben lässt sich in sukzessive und gleichzeitig ablaufende Schritte aufteilen (siehe auch Abbildung 25 im Kapitel „Methoden“) :

Sukzessiv:

- (1) Azeotrope Trocknung der Urinprobe (250µl)
- (2) Benzylierung der Thio- und Dithiodialkylphosphate mit Benzylbromid in ACN
- (3) Isolierung der Benzylderivate und überschüssigen Benzylbromids mit Hexan aus der ACN-Reaktionslösung

Gleichzeitig:

- (4a) Benzylierung der in der ACN-Phase verbliebenen Dialkylphosphate mit Diazotoluol und Abtrennung von Nebenprodukten auf Kieselgel
- (4b) Entfernung überschüssigen Benzylbromids aus der Hexanphase der benzylierten schwefelhaltigen Dialkylphosphate durch Fraktionierung auf Kieselgel.

Sukzessiv:

- (5) Vereinigung der Eluate aus den Kieselgelfraktionierungen
- (6) Aufkonzentrierung und Analyse durch GC/MS

Zum einzelnen:

Die azeotrope Trocknung (1) wurde mit Isopropanol bei 65°C unter einem Stickstoffstrom durchgeführt und war aufgrund der kleinen Urinmenge bereits nach ca. 15 min abgeschlossen. Zu dem trockenen Rückstand wurde ACN und Benzylbromid gegeben, um die schwefelhaltigen Dialkylphosphate DMTP, DETP, DMDTP und DEDTP zu benzylieren (2). Mit Hexan wurden die Benzylderivate und überschüssiges Reagenz aus der ACN-Phase extrahiert (3), während sich die Dialkylphosphate DMP und DEP nicht derivatisiert im Acetonitril befanden. Diese wurden mit Diazotoluol ebenfalls in Benzylderivate überführt (4a). Der Einsatz zweier Reagenzien verhindert die Isomerisierung von DMTP und DETP. Die gleichzeitige Kieselgelfraktionierung der schwefelhaltigen und schwefelfreien Dialkylphosphate (4b) erlaubte trotz des erhöhten Zeitaufwands durch die zweifache Derivatisierung die Schritte (2) bis (4b) innerhalb von 70 min abzuschließen. Für die Konzentrierung der Eluate (5) und gaschromatographische Analyse (6) wurden weitere 40-50 min benötigt, so dass die gesamte Analyse innerhalb von 2,5h abgeschlossen war.

5.4.2 Mittels GC/MS (Full-Scan)

Für das Screening im Urin wurde die Probe azeotrop getrocknet und anschließend mit Benzylbromid und Diazotoluol derivatisiert. Die entsprechenden Benzylester wurden abschließend gaschromatographisch bestimmt. Tabelle 24 zeigt die Korrelationskoeffizienten der einzelnen Analyten, die Bestimmungs- und Nachweisgrenzen. Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurden aus der Eichgeraden mit dem Software-Programm nach B.E.N. (**Schmitt/Herbold, 1998**), gemäß DIN 32645 bestimmt.

Tabelle 24 : Analytische Daten zur Full-Scan Methode

	DMP	DEP	DMTP	DETP	DMDTP	DEDTP
Korrelationskoeffizient [r] 4 Meßwerte, Urin dotiert 0,14/ 0,28/ 0,56/1,12µg/ml	0,9983	0,9977	0,9973	0,9976	0,9996	0,9992
Nachweisgrenze [ng/ml]	114	90	97	92	77	54
Bestimmungsgrenze [ng/ml]	456	362	387	367	295	224

Abbildung 53 zeigt die Trennung der Dialkyl-, Thiodialkyl- und Dithiodialkylphosphate im Full-Scan-Modus. Zur Detektion diente das MS HP Engine 5989A.

Das Chromatogramm resultiert aus einer aufgearbeiteten Urinprobe, welche jeweils mit 1µg/ml Urin eines Dialkylphosphats dotiert wurde.

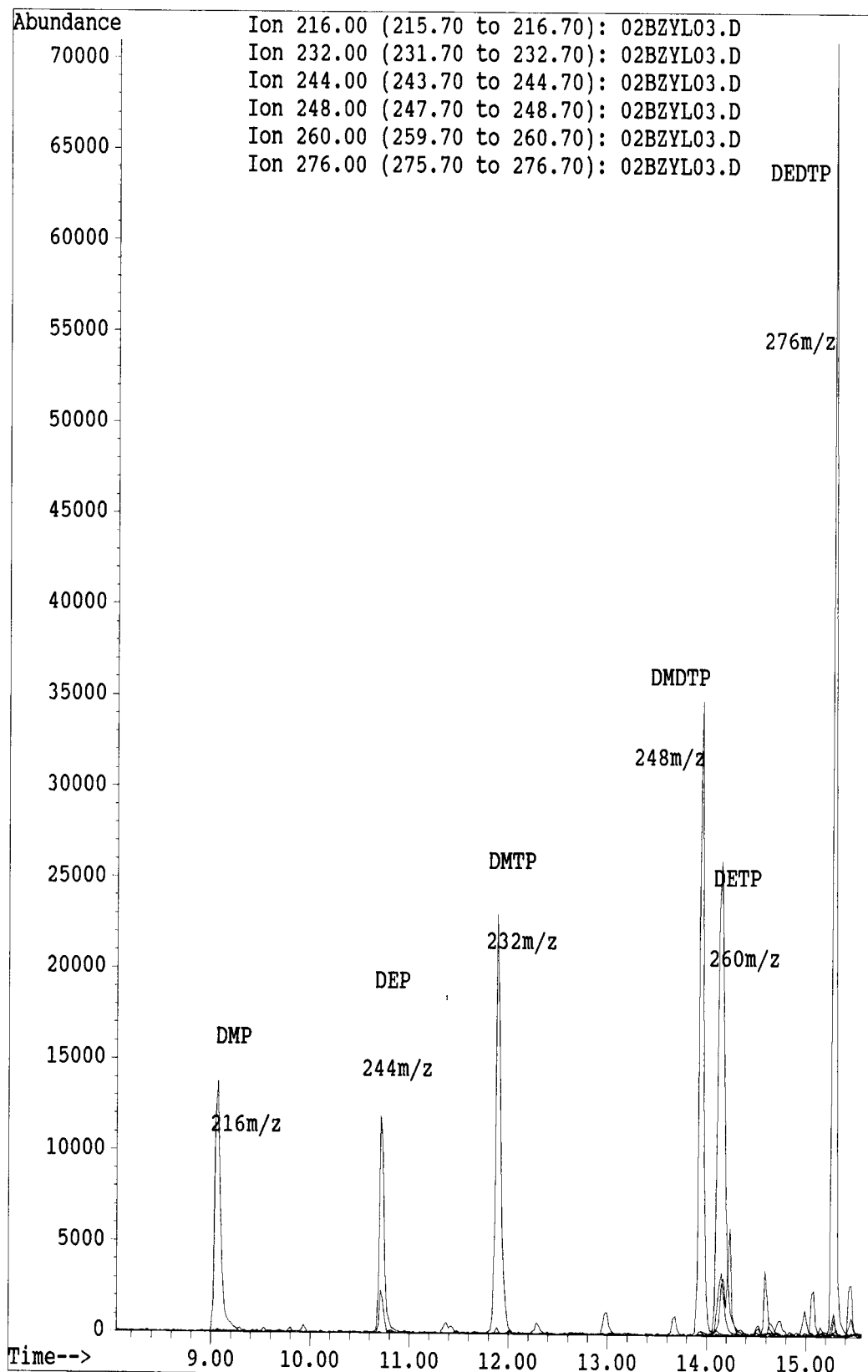


Abbildung 53: Chromatogramm vom Extrakt einer dotierten Urinprobe (1µg/ml) mittels GC/MS (Full-Scan)

5.4.3 Mittels GC/MS (SIM)

Die Probenaufarbeitung und Derivatisierung der Dialkylphosphate bei dieser Methode entsprachen dem Screening-Verfahren. Als Analysator diente ein massenselektiver Detektor 5972 HP im SIM. Das kommerziell erhältliche DBP und das präparativ dargestellte DPDTP dienten auch hier als IS. Über DBP wurden die Dialkylphosphate und über DPDTP die Thio- und Dithiodialkylphosphate quantifiziert.

Aufgrund des SIM-Verfahrens konnten im Vergleich zum Screening deutlich niedrigere Nachweisgrenzen erzielt werden ($< 10\text{ng/ml}$). Der Einsatz der IS ermöglichte eine exakte Quantifizierung. Die Methode wurde, wie im folgenden beschrieben, validiert.

Standardlösungen und dotierte Urinproben

Eine Stammlösung, welche von jedem Analyten (DMP-DEDTP) $18\mu\text{g/ml}$ enthielt, wurde in Methanol angesetzt. Die Stammlösungen der internen Standards DBP und DPDTP enthielten $10\mu\text{g/ml}$ in Methanol.

Von Mitarbeitern gesammelter Urin wurde mit den Analyten (DMP-DEDTP) dotiert. Eine Urin-Stammlösung mit $1,8\mu\text{g/ml}$ wurde mit Urin (blind) zu neun Kalibrierstandards im Konzentrationsbereich von $0\text{--}600\text{ng/ml}$ verdünnt. Den zu untersuchenden Urinproben ($250\mu\text{l}$) wurden vor der Aufarbeitung 200ng DBP und 200ng DPDTP zugesetzt.

Alle Lösungen wurden bei -18°C gelagert. Abbildung 42 zeigt das Chromatogramm eines Extraktes einer mit 45ng/ml dotierten Urinprobe.

Tabelle 25: Retentionszeiten und gemessene Ionen (m/z)

Dialkylphosphate	Retentionszeiten (Min.)	Gemessene Ionen (m/z)
DMP	11.68	216 $[\text{M}^+]$, 110, 201
DEP	13.12	244 $[\text{M}^+]$, 187, 215
DMTP	13.85	232 $[\text{M}^+]$, 123, 141
DETP	15.11	260 $[\text{M}^+]$, 123, 169
DMDTP	15.10	248 $[\text{M}^+]$, 123
DEDTP	16.18	276 $[\text{M}^+]$, 121, 185
DBP	17.16	300 $[\text{M}^+]$, 188, 243
DPDTP	17.93	304 $[\text{M}^+]$, 220, 262

Qualität der analytischen Methode

Linearität: Kalibrationspunkte wurden als Quotienten der Signalintensitäten von Analyt und IS dargestellt. Die Dialkylphosphate DMP und DEP wurden über den IS DBP und die Thio- und Dithioalkylphosphate über den IS DPDTP ausgewertet.

Nachweisgrenze: Die Nachweisgrenze wurde mit einem Signal/Rauschverhältnis von 4:1 definiert, bezogen auf das Molekülion. Die Nachweisgrenze beträgt 3-6ng/ml für die untersuchten Analyten.

Bestimmungsgrenze: Die Bestimmungsgrenze liegt bei 10-20ng/ml, bezogen auf die Molekülonen der Analyten.

Präzision: Die Präzision in der Serie (intraassay) wurde durch die Aufarbeitung von fünf dotierten Urinproben mit einer Konzentration von 45ng/ml ermittelt. Die Präzision zwischen der Serie wurde bestimmt durch die Analyse von fünf dotierten Urinproben mit einer Konzentration von 450ng/ml an fünf aufeinanderfolgenden Tagen (interassay).

Korrelationskoeffizienten und Daten zur Präzision sind in Tabelle 26 zusammengefasst.

Tabelle 26: Korrelationskoeffizienten und Daten zur Präzision (SIM-Methode)

	DMP	DEP	DMTP	DETP	DMDTP	DEDTP
Linearität: 9 dotierte Proben, Korrelationskoeffizienten [r]	0.9963	0.9998	0.9896	0.9882	0.9962	0.9983
Intraassay (n=5), SD	5.2%	3.1%	7.0%	1.2%	4.3%	3.8%
Interassay (n=5), SD	8.9%	11.2%	11.1%	6.8%	9.9%	7.7%

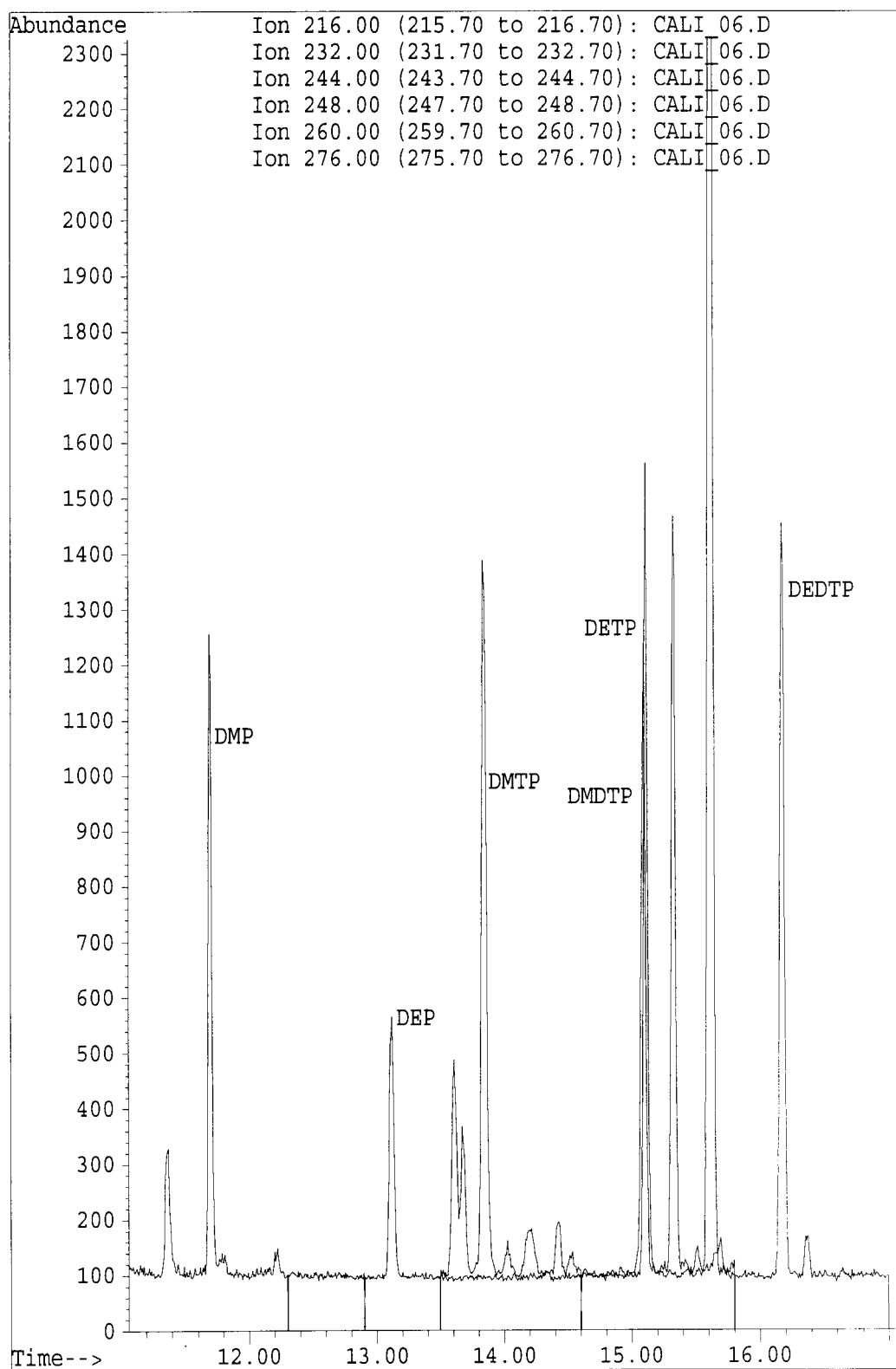


Abbildung 54: Chromatogramm vom Extrakt einer dotierten Urinprobe mit 45ng/ml mittels GC/MS im SIM-Mode (interassay)

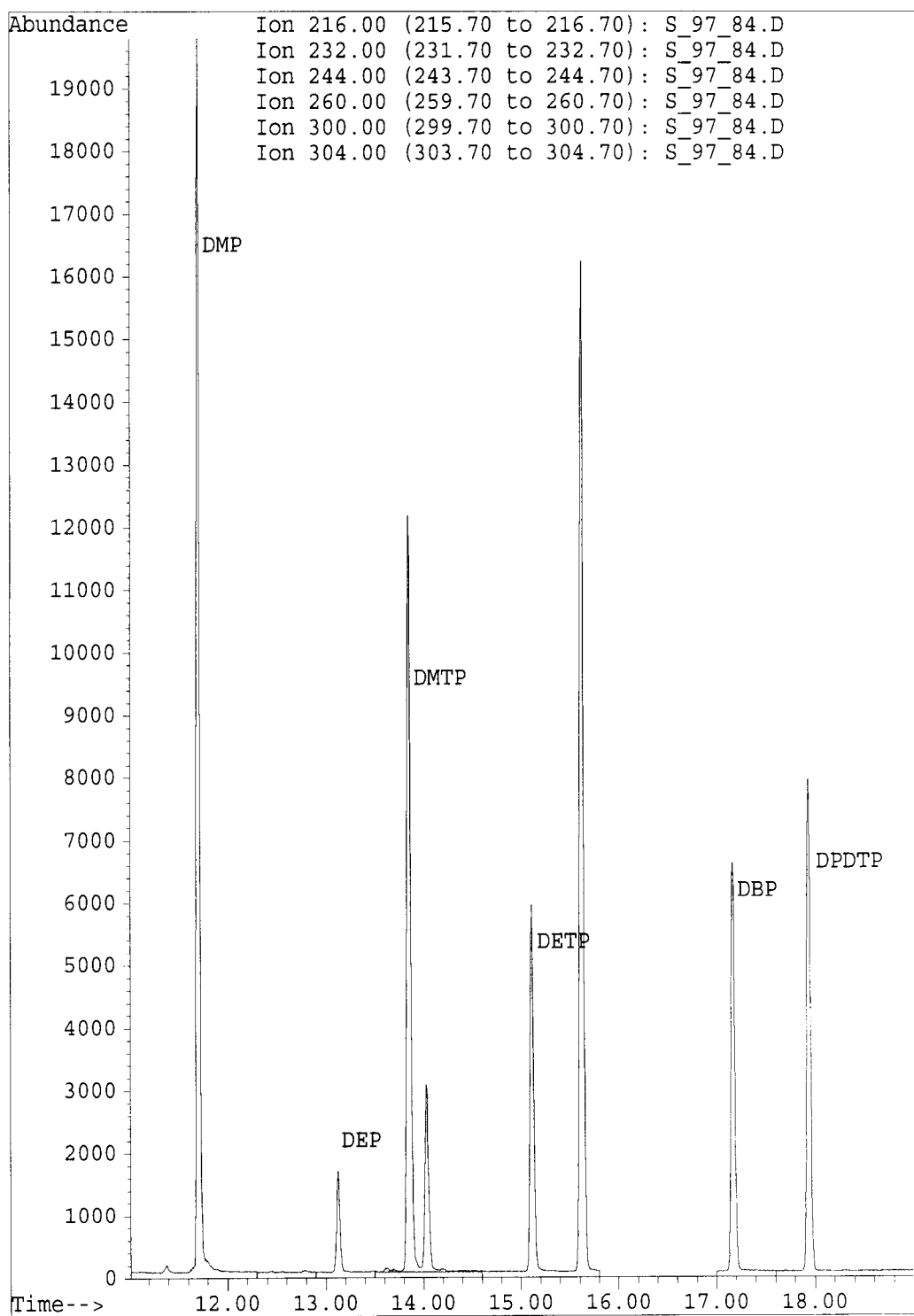


Abbildung 55: Chromatogramm vom Extrakt einer dotierten Urinprobe mit 450ng/ml im SIM-Mode (intraassay)

5.4.4 Quantifizierung von Dialkylphosphaten in asservierten Urinproben

Aus dem Zeitraum von 1982 bis 2001 wurden 15 asservierte Urinproben von Personen mit Hinweisen auf eine Organophosphat-Intoxikation untersucht. In den Urinproben wurden die Dialkylphosphate quantifiziert. Zur Überprüfung der Methode wurden Qualitätskontrollen (dotierte Urinproben) mitgeführt.

Urinproben und Qualitätskontrollen

Die Urinproben wurden bei -18°C gelagert. 250µl Urin wurden für die Untersuchungen eingesetzt. Wenn nötig, wurden Urinproben mit Urin (blind) verdünnt. Den Urinproben wurden die IS DBP und DPDTP dotiert und gemeinsam mit 3 Qualitätskontrollen aufgearbeitet. Die Konzentrationen von DMP, DEP, DMTP, DETP, DMDTP und DEDTP in den Qualitätskontrollen betrugen 900ng/ml, 450ng/ml und 225ng/ml. Die detektierten Alkylphosphate sind in Tabelle 27 zusammengefaßt.

Tabelle 27: Dialkylphosphate in Urinproben und Qualitätskontrollen (ng/ml)

	DMP	DEP	DMTP	DETP	DMDTP	DEDTP
QK 1 900ng/ml	854.7	953.7	968.5	972.3	942.6	953.0
QK 2 450ng/ml	454.2	477.3	464.4	461.0	471.3	469.7
QK 3 225ng/ml	224.5	213.1	220.2	230.2	233.6	233.0
Fall 1	64,4	804,4	87,9	2266,7	-	-
Fall 2	41,8	55,2	71,0	102,2	-	-
Fall 3	80,1	148,0	-	554,9	-	-
Fall 4	175,4	85,6	-	823,4	-	-
Fall 5	25750,0	259,7	4884,0	108,9	-	-
Fall 6	124230,0	1020,2	13370,0	338,1	-	-
Fall 7	50380,0	408,8	206,8	54,5	-	-
Fall 8	62,8	94,0	-	221,9	-	-
Fall 9	43,5	125,0	-	1430,0	-	-
Fall 10	3630,0	157,1	681,1	218,1	-	-
Fall 11	1450,0	207,3	394,1	1160,0	-	-
Fall 12	103,6	540,3	112,8	8840,0	-	-
Fall 13	2500,0	327,9	1510,0	708,5	-	-
Fall 14	27800,0	-	9700,0	-	3900,0	-
Fall 15	-	346,0	-	699,0	-	-

5.5 Bestimmung von intakten Organophosphaten im Blut

Mit intakten Organophosphaten dotiertes Leichenblut ermöglichte die Simulation des Zerfalls der Insektizide in post-mortem-Material. Die Quantifizierung der intakten Phosphorsäureester nach einem und nach sieben Tagen im Leichenblut bestätigte den Zerfall von Phosphorsäureestern, in welchem keine enzymatische Spaltung mehr stattfindet. Für die Quantifizierung der Organophosphate im Serum bzw. Leichenblut sind fünf Kalibratoren gaschromatographisch (GC/MS) untersucht worden.

Als Kalibratoren dienten fünf Verdünnungen (Verdünnungsfaktoren: 2-, 10-, 100-, 200-, 1000-fach) der Serum-Stammlösung. Die Eichpunkte wurden als Quotienten der Signalintensitäten von Analyt und IS dargestellt. Papaverin war der IS. Die Korrelationskoeffizienten (r) lagen für alle untersuchten Organophosphate über 0,99. Für die Auswertung sind die Massen 314 (Chlorpyrifos), 232 (Chlorfenvinphos), 291 (Parathion), 278 (Fenthion) und 331 (Bromophos) herangezogen worden.

Nach sieben Tagen waren 60% Chlorpyrifos, über 99% Bromophos, 34% Chlorfenvinphos, 90% Fenthion und 50% Parathion zerfallen. Weil im post-mortem-Material keine Enzymaktivität mehr vorhanden ist, mußte die Spaltung hydrolytisch erfolgt sein. Aufgrund der fehlenden Enzymaktivität ist auch nicht mit einer Konjugation der phenolischen Gruppen zu rechnen. Die Hydrolyseprodukte mußten also frei im Blut vorliegen.

5.6 Bestimmung alkoholischer und phenolischer Hydrolyseprodukte der Organophosphate

Bei vollständig hydrolysierten Phosphorsäureestern ist die Identität des für die Intoxikation verantwortlichen Organophosphats nur über den Nachweis der abgespaltenen Gruppe neben den Dialkylphosphorsäuren möglich. Nur der aliphatische, aromatische oder heterocyclische Rest ist für die einzelnen Organophosphate typisch. Um Hydrolyseprodukte im Leichenblut nachzuweisen, wurden fünf Organophosphate alkalisch gespalten. Anschließend wurde versucht, mit verschiedenen Methoden (LC/MS/DAD, GC/MS) die Spaltprodukte zu identifizieren.

p-Nitrophenol ist als phenolische Restgruppe von Parathion neben der Diethylthiophosphorsäure bekannt.

Bei den Untersuchungen wurde Parathion, wie Bromophos, Fenthion, Chlorpyrifos und Chlorfenvinphos, unter alkalischen Bedingungen hydrolysiert. Anschließend wurden die Hydrolyseprodukte mittels LC/DAD/MS und GC/MS untersucht.

Tabelle 28 zeigt die experimentell hydrolysierten Phosphorsäureester und die zu erwartenden Spaltprodukte, eine Alkylphosphorsäure und eine abspaltbare Restgruppe.

Tabelle 28: Organophosphate und ihre Hydrolyseprodukte

Phosphorsäureester	Alkylphosphorsäure	Abspaltbare Restgruppe
Parathion	Diethylthiophosphorsäure	p-Nitrophenol
Bromophos	Dimethylthiophosphorsäure	2,5-Dichlor-4-bromphenol
Fenthion	Dimethylthiophosphorsäure	p-Methylthio-m-methylphenol
Chlorpyrifos	Diethylthiophosphorsäure	3,5,6-Trichlor-2-pyridinol
Chlorfenvinphos	Diethylphosphorsäure	2-Chlor-1-(2,4-dichlorphenyl)-vinylalkohol

5.6.1 Analyse der Organophosphat-Hydrolyseprodukte mittels LC/MS

Die intakten Organophosphate wurden in einer Natriumhydroxidlösung gespalten. Aliquote dieser Lösung wurden auf einer RP-C₁₈ Phase im Wasser/ACN (pH: < 4) Gradientensystem getrennt und abschließend mittels Massenspektrometrie (Ion Trap, negativ APCI) detektiert.

Tabelle 29 zeigt die Massen, welche bei den Hydrolysen der Organophosphate ermittelt wurden.

Tabelle 29: Detektierte Massen in den Hydrolyselösungen der Organophosphate

Hydrolysiertes Organophosphat	Detektierte Massen (m/z)
Parathion	DEP (169), p-Nitrophenol (139), Parathion (291)
Bromophos	DMTP (141), 2,5-Dichlor-4-bromphenol (241), Bromophos (366)
Fenthion	DMTP (141), p-Methylthio-m-methylphenol (154), Fenthion (278)
Chlorpyrifos	DETP (169), 3,5,6-Trichlor-2-pyridinol (197), Chlorpyrifos (351)
Chlorfenvinphos	DEP (153), 2-Chlor-1-(2,4-dichlorphenyl)-vinylalkohol (221), Chlorfenvinphos (360)

D:\Xcalibur\1\data\serie03\parathio_hyd

11/05/01 05:06:01 PM

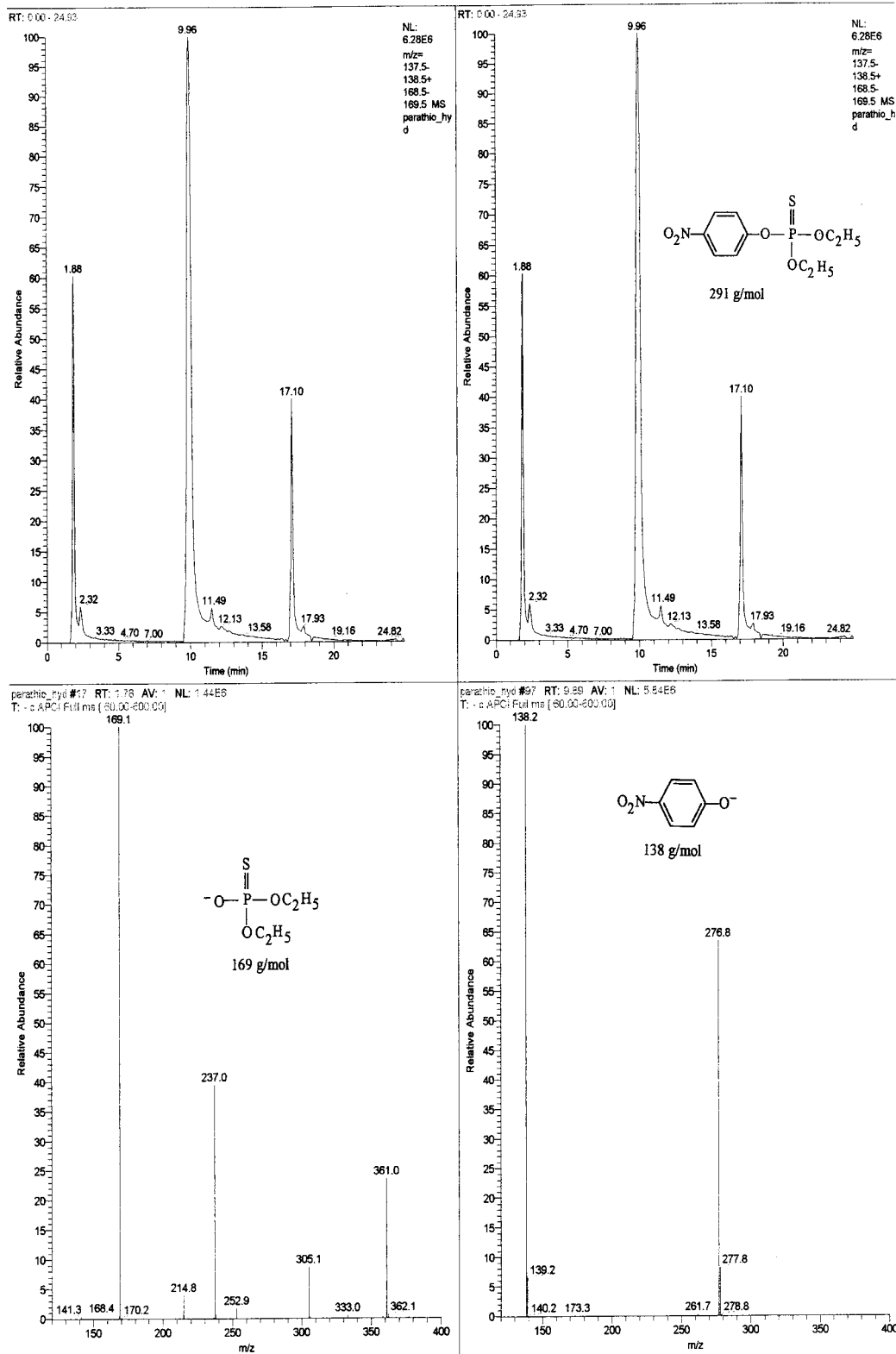


Abbildung 56: Hydrolyselösung von Parathion mittels LC/MS (APCI)

Oben: Chromatogramme von DETP (1,89min.), p-Nitrophenol (9,96min.) und Parathion (17,10min.)

Unten links: Massenspektrum von DEP

Unten rechts: Massenspektrum von p-Nitrophenol

Die beiden oberen Chromatogramme in Abbildung 56 sind identisch und zeigen im rechten Chromatogramm die Strukturformel von Parathion. Es sind drei signifikante Signale erkennbar (1,88/9,96 und 17,10 min). Zu dem Signal bei 1,88 Minuten ist links unten das entsprechende Massenspektrum mit der Hauptmasse 169 abgebildet. Das Signal entspricht der Säurekomponente von Parathion, der Diethylthiophosphorsäure. Rechts unten sieht man das Massenspektrum des Signals bei 9,96 Minuten, es entspricht mit der Hauptmasse 138 p-Nitrophenol. Die Masse 276 ergibt sich aus dem Cluster zwei zusammenhängender p-Nitrophenol-Moleküle, welche im APCI-Modus ionisiert werden. Das Signal bei 17,10 Minuten entspricht Parathion, auf die Abbildung eines Massenspektrums wurde hier verzichtet.

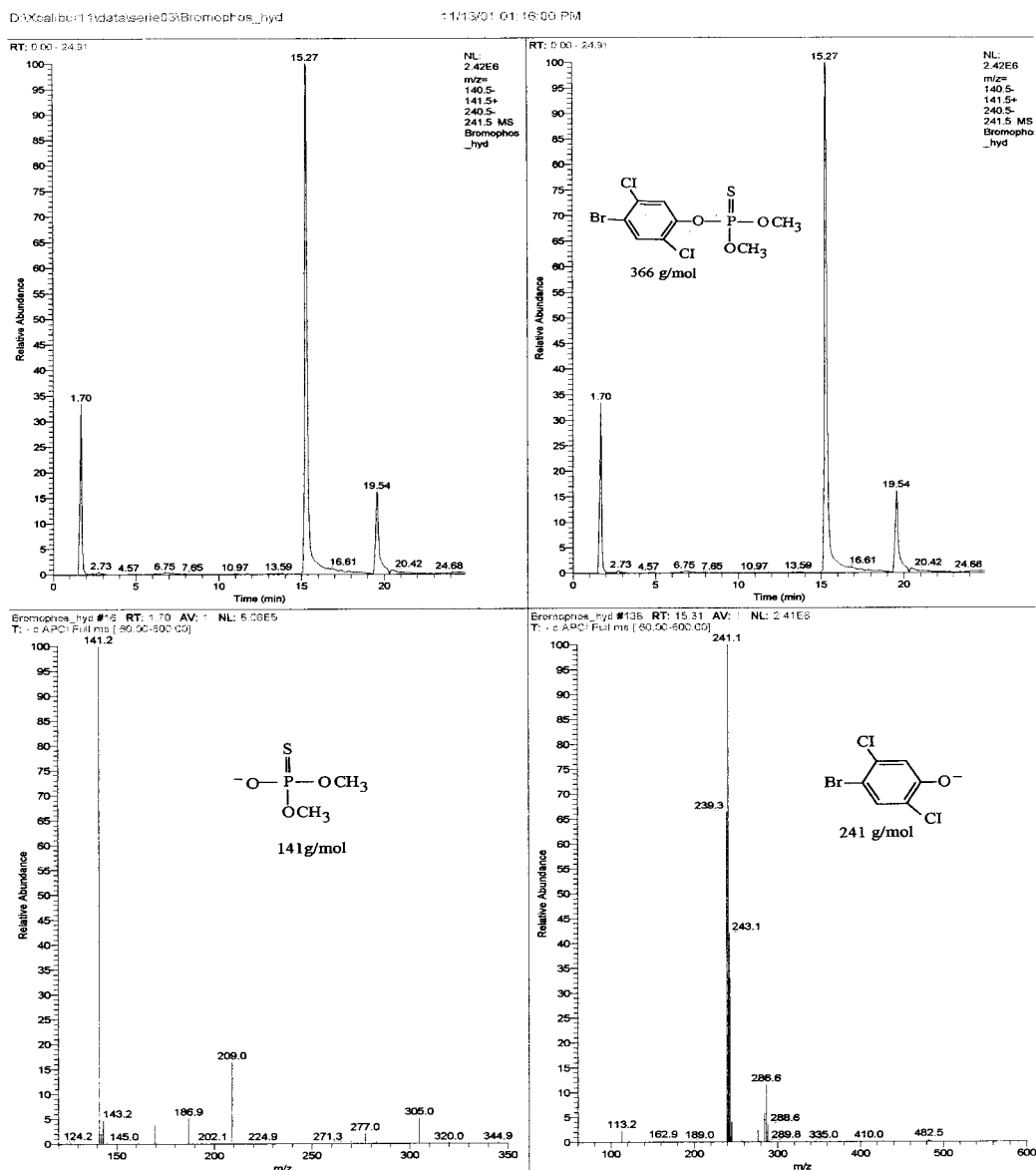


Abbildung 57: Hydrolyselösung von Bromophos mittels LC/MS (APCI)

Oben: Chromatogramme mit DMTP (1.70min.), der Phenolgruppe (15.27min.) und Bromophos (19.54min.)

Unten links: Massenspektrum von DMTP

Unten rechts: Massenspektrum von 2,5-Dichlor-4-bromphenol

Auch hier zeigen die beiden oberen Chromatogramme in Abbildungen 57 das LC/MS-Chromatogramm mit der Molekülstruktur von Bromophos im rechten Chromatogramm. Der Peak bei 1,70 Minuten mit der Hauptmasse 141 resultiert aus der Dimethylthiophosphorsäure (Massenspektrum unten links). Die abgespaltene Restgruppe 2,5-Dichlor-4-bromphenol mit der Masse 241 (Massenspektrum unten rechts) eluiert nach 15,27 Minuten. Nicht hydrolysiertes Bromophos eluiert nach 19,54 Minuten.

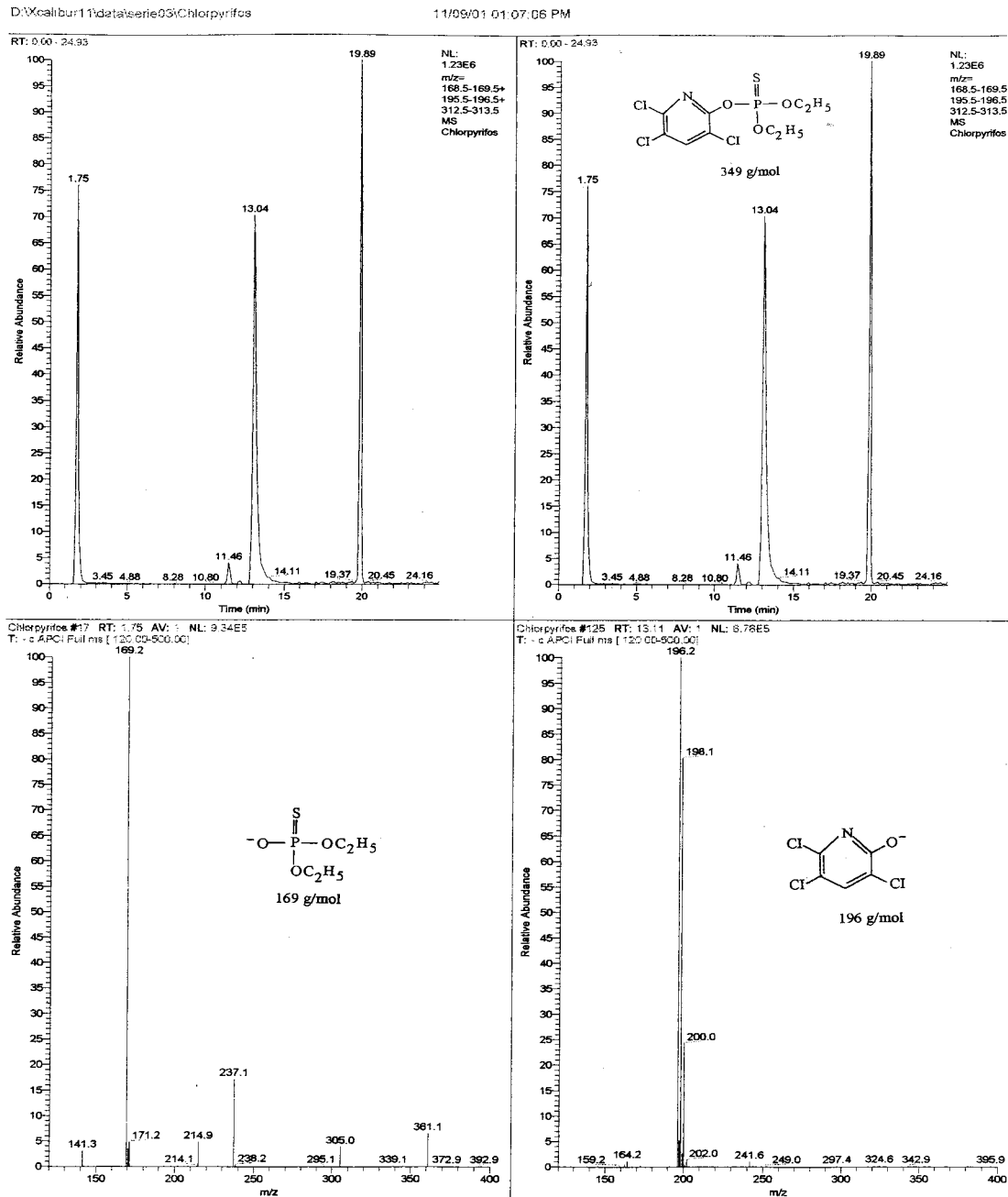


Abbildung 59: Hydrolyselösung von Chlorpyrifos mittels LC/MS (APCI)

Oben: Chromatogramme von DETP (1,75min.), der Phenolgruppe (13.04min.) und Bromophos (19.59min.)

Unten links: Massenspektrum von DETP

Unten rechts: Massenspektrum von 3,5,6-Trichlor-2-pyridinol

In den Chromatogrammen der Abbildung 59 lassen sich eindeutige Signale für die Diethylphosphorsäure (Masse 169 bei 1,75 Minuten) und die heterocyclische Gruppe 3,5,6-Trichlor-2-pyridinol (Masse 196 bei 13,04 Minuten) erkennen. Das Signal bei 19,89 Minuten rührt vom nicht hydrolysierten Chlorpyrifos her. Ein Massenspektrum von Chlorpyrifos ist nicht abgebildet.

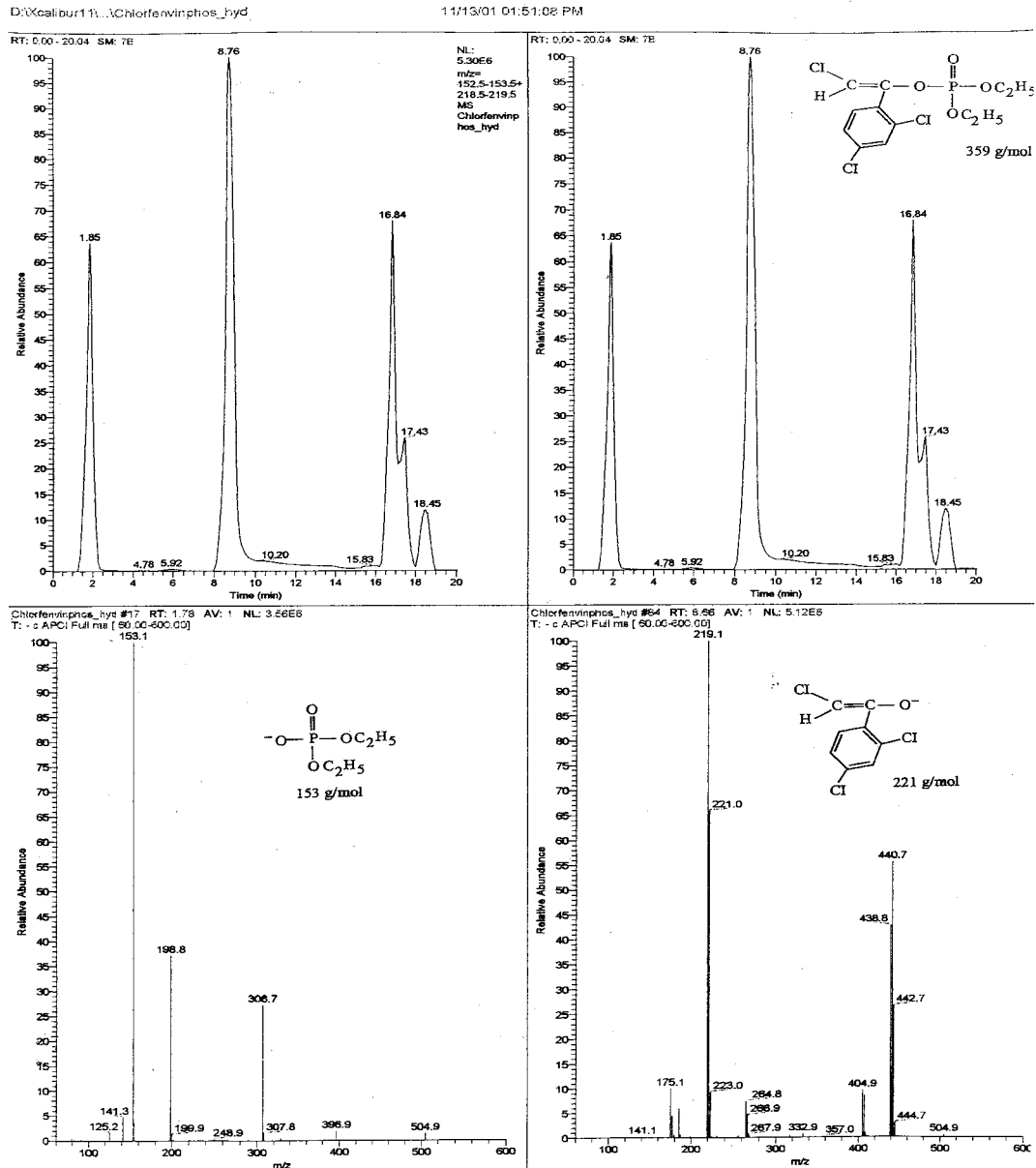


Abbildung 60: Hydrolyselösung von Chlorfenvinphos mittels LC/MS (APCI)
Oben: Chromatogramme von DEP (1,85min.), dem Vinylalkohol (8,76min.) und Chlorfenvinphos (16,84min.)
Unten links: Massenspektrum von DEP
Unten rechts: Massenspektrum vom Vinylalkohol

Die Hydrolyseprodukte von Chlorfenvinphos, die Diethylphosphorsäure (Masse 153) und der 2-Chlor-1-(2,4-dichlorphenyl)-vinylalkohol (Masse 221) ließen sich gut unter den gegebenen Bedingungen ionisieren (Abbildung 60). In beiden Massenspektren wurden zusammenhängende Moleküle ionisiert. Daher sind die detektierte Masse 306 im linken Massenspektrum der Diethylphosphorsäure (1,85 Minuten) und die Masse 442 im rechten Massenspektrum für die alkoholische Gruppe (8,76 Minuten). Das Signal bei 16,84 Minuten im Chromatogramm entspricht Chlorfenvinphos.

5.6.2 Analyse der Organophosphat-Hydrolyseprodukte mittels LC/DAD

Die unter 5.7.1 beschriebenen LC/MS-Versuche wurden gleichzeitig mit einem DAD durchgeführt. Dadurch war es möglich, den massenselektiv identifizierten Restgruppen und den intakten Organophosphaten ein UV-Spektrum zuzuordnen. Die Spektren können dann bei der Untersuchung von Leichenblut zur Identifizierung herangezogen werden.

Tabelle 30 zeigt die UV-Maxima der einzelnen Restgruppen der Organophosphate.

Tabelle 30: UV-Maxima der Organophosphat-Restgruppen

Organophosphat	Restgruppe	UV-Maxima [nm]
Parathion	p-Nitrophenol	317
Bromophos	2,5-Dichlor-4-bromphenol	293
Fenthion	p-Methylthio-m-methylphenol	250, 295
Chlorpyrifos	3,5,6-Trichlor-2-pyridinol	299
Chlorfenvinphos	2-Chlor-1-(2,4-dichlorphenyl)-vinylalkohol	272

In den folgenden Chromatogrammen (Abbildungen 61-65) fehlen die Signale für die Dialkyl- und Thiodialkylphosphorsäuren, welche bei den LC/MS-Versuchen zu sehen sind. Die Säuren weisen kein signifikantes Spektrum oberhalb von 220nm auf und wurden deshalb bei dieser Untersuchung nicht erfaßt.

Die Spektren unter den Chromatogrammen stellen einen Scan von 220 bis 600nm dar.

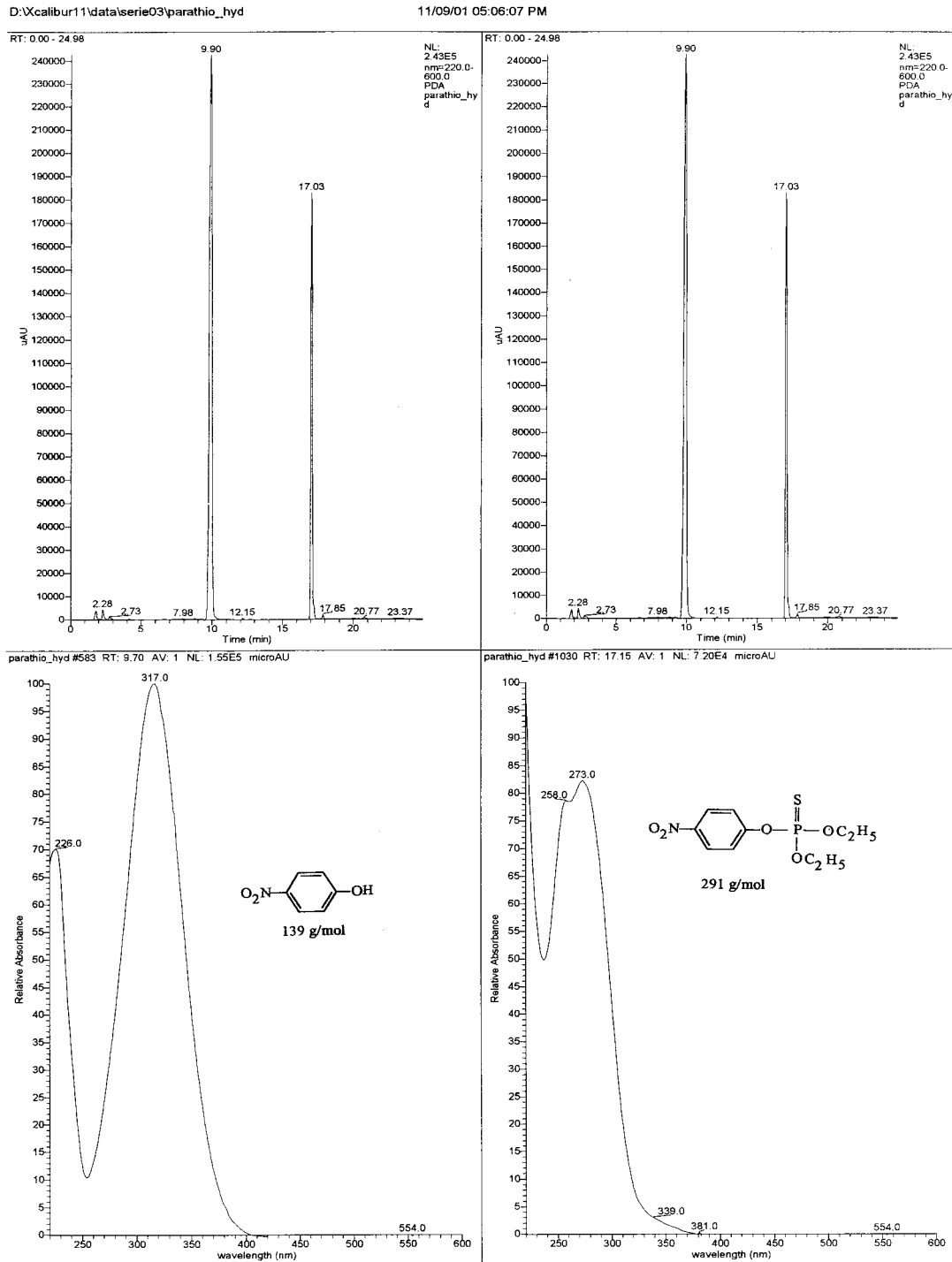


Abbildung 61: Hydrolyselösung von Parathion mittels LC/DAD

Oben: Chromatogramm mit p-Nitrophenol (9.90min.) und Parathion (17,03min.)

Unten links: Spektrum (UV/visible) von p-Nitrophenol

Unten rechts: Spektrum (UV/visible) von Parathion

Das bei 9,90 Minuten eluierende p-Nitrophenol unterscheidet sich im Spektrum deutlich vom später eluierenden Parathion (17,03 Minuten) und lässt sich damit nicht nur anhand der Retentionszeit unterscheiden (Abbildung 61).

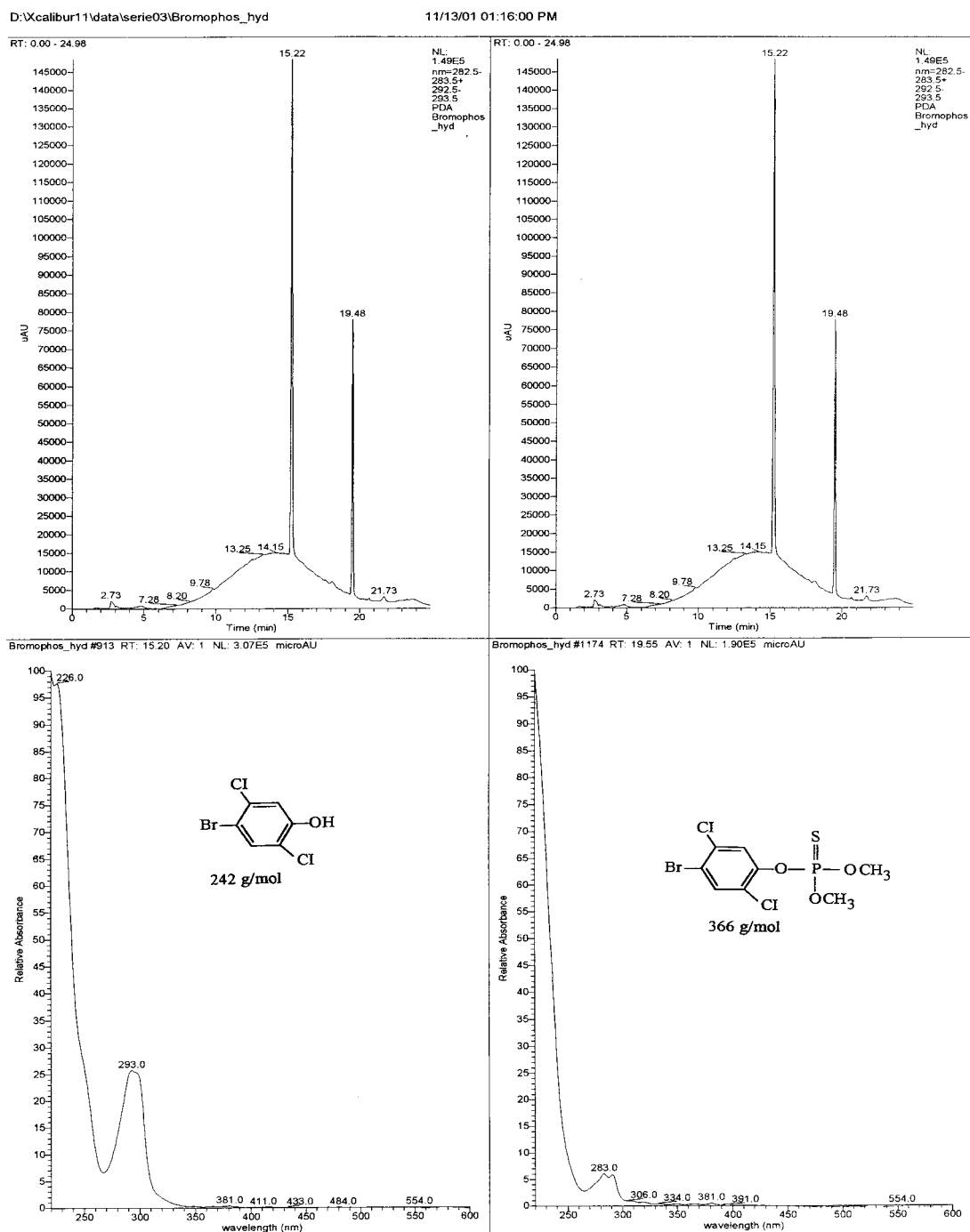


Abbildung 62: Hydrolyselösung von Bromophos mittels LC/DAD

Oben: Chromatogramm von der Phenolgruppe (15,22min.) und Bromophos (19,48min.)

Unten links: Spektrum (UV/visible) von 2,5-Dichlor-4-bromphenol

Unten rechts: Spektrum (UV/visible) von Bromophos

2,5-Dichlor-4-bromphenol (15,22 Minuten) und Bromophos (19,48 Minuten) unterscheiden sich deutlich in den Retentionszeiten. Die Maxima im Spektrum liegen beide bei 290nm und heben sich nicht voneinander ab (Abbildung 62).

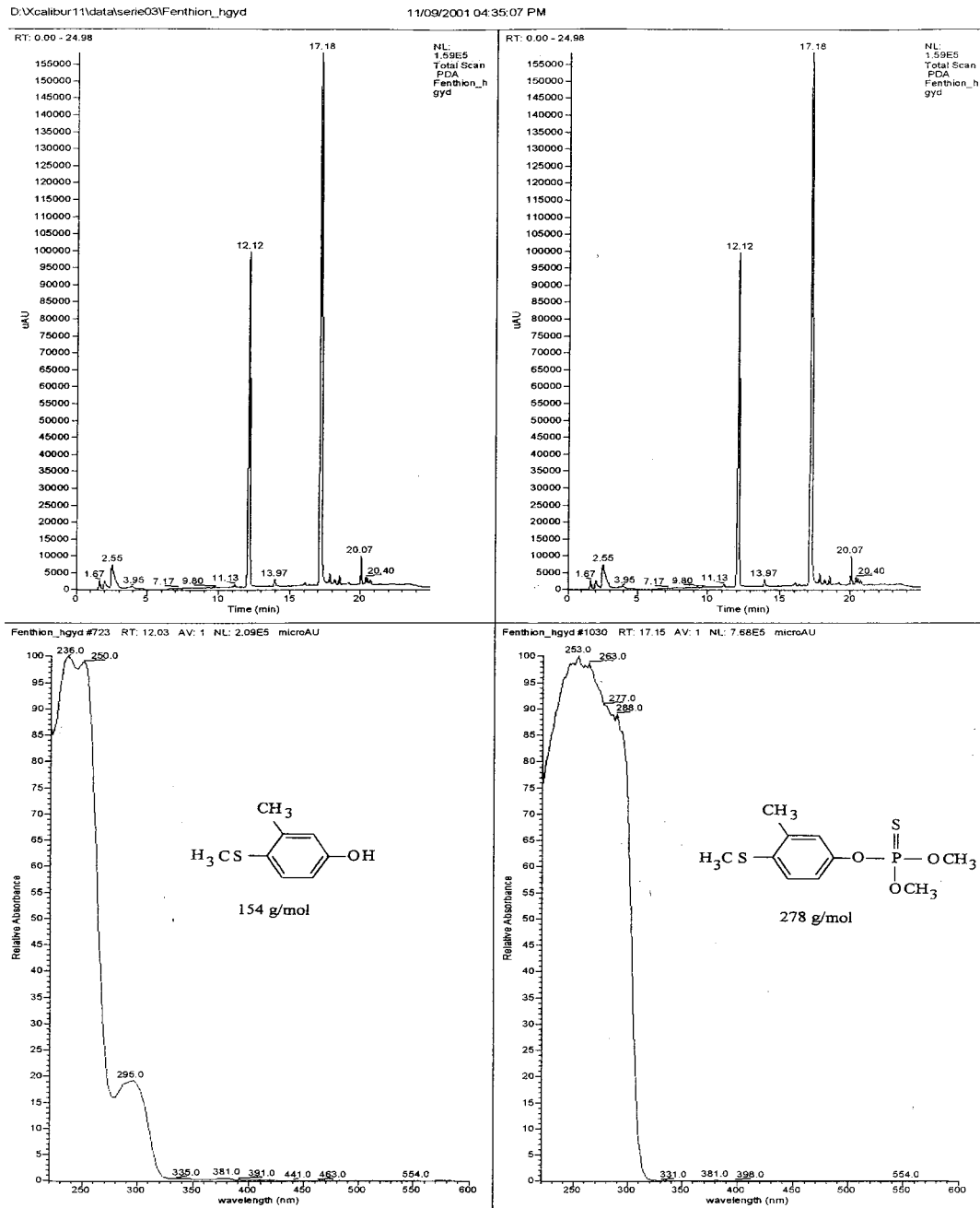


Abbildung 63: Hydrolyselösung von Fenthion mittels LC/DAD
Oben: Chromatogramm mit der Phenolgruppe (12,12min.) und Fenthion (17,18min.)
Unten links: Spektrum (UV/visible) von p-Methylthio-m-methylphenol
Unten rechts: Spektrum (UV/visible) von Fenthion

p-Methylthio-m-methylphenol (12,12 Minuten) und Fenthion (17,18 Minuten) ergeben mit der Dioden-Array-Detektion wesentlich intensivere Signale als mit der massenselektiven Detektion im negativ-Modus. Eine Unterscheidung der Restgruppe vom intakten Organophosphat mit Hilfe der UV-Spektren ist allerdings auch hier nicht möglich (Abbildung 63).

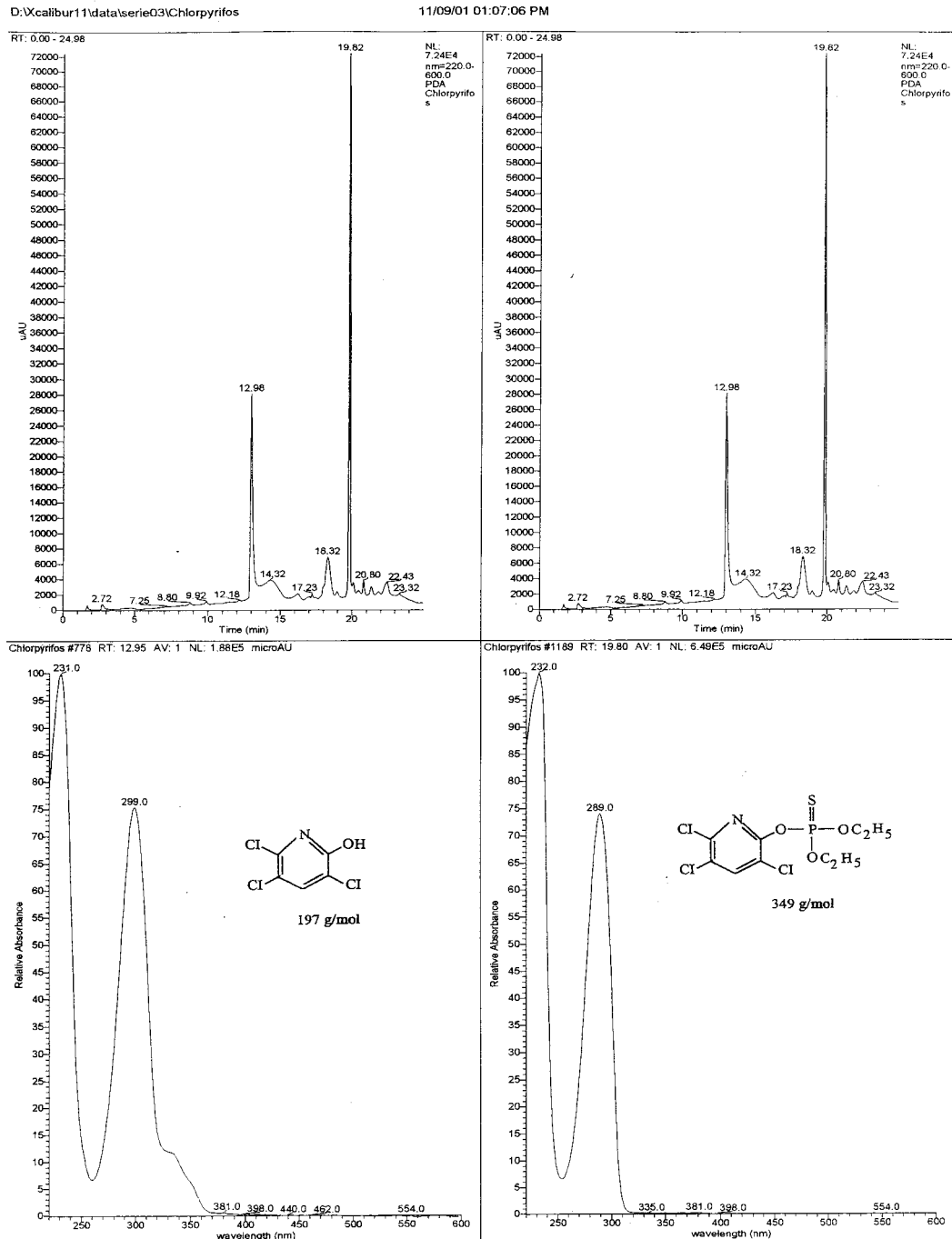


Abbildung 64: Hydrolyselösung von Chlorpyrifos mittels LC/DAD
Oben: Chromatogramme mit Phenolgruppe (12,56min.) und Chlorpyrifos (19,82min.)
Unten links: Spektrum (UV/visible) von 3,5,6-Trichlor-2-pyridinol
Unten rechts: Spektrum (UV/visible) von Chlorpyrifos

3,5,6-Trichlor-2-pyridinol (12,98 Minuten) und Chlorpyrifos (19,82 Minuten) unterscheiden sich im UV-Spektrum. Das Maximum des Pyridinols liegt bei 299nm, und der intakte Phosphorsäureester Chlorpyrifos zeigt ein Maximum bei 289nm (Abbildung 64).

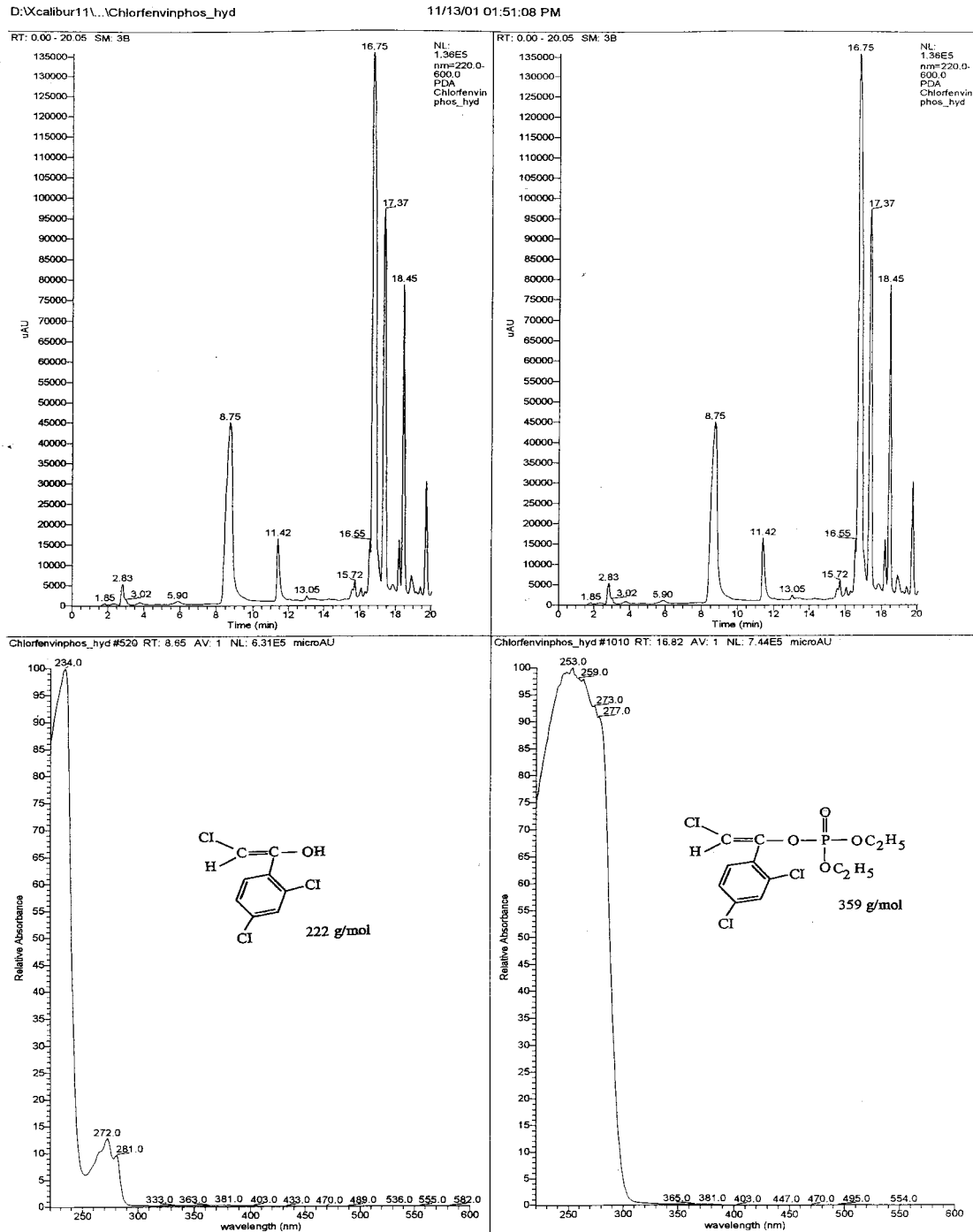


Abbildung 65: Hydrolyselösung von Chlorfenvinphos mittels LC/DAD
Oben: Chromatogramm mit Alkoholgruppe (8,75min.) und
Chlorfenvinphos (15,75min.)
Unten links: Spektrum (UV/visible) vom Vinylalkohol
Unten rechts: Spektrum (UV/visible) von Chlorfenvinphos

Chlorfenvinphos und sein Hydrolyseprodukt lassen sich über das Maximum bei 250nm unterscheiden. Chlorfenvinphos besitzt bei 250nm ein Maximum, der abgespaltene Vinylalkohol nicht (Abbildung 65).

5.6.3 Analyse der Organophosphat-Hydrolyseprodukte mittels GC/MS

Als alternatives Analyseverfahren für den Nachweis der Organophosphat-Spaltprodukte im Leichenblut wurde versucht, die Hydrolyseprodukte auch mit Hilfe der GC nachzuweisen. Hierfür wurden die Hydrolyseprodukte in unveränderter Form und derivatisiert untersucht. Als Derivatisierungsreagenzien wurden Trifluoressigsäureanhydrid und Pentafluorbenzylbromid eingesetzt. Beide Reagenzien sind in der Lage, mit OH-Gruppen zu reagieren. Weil aus den Phosphorsäureestern bei alkalischer Hydrolyse eine Säure- und eine Alkohol- bzw. Phenolkomponente entstehen, bietet sich eine Derivatisierung der alkoholischen oder phenolischen Restgruppen an.

Tabelle 31 gibt eine Übersicht zu den durchgeführten Analysen und zeigt, welche Analyten in welcher Form mittels GC/MS nachgewiesen werden konnten.

Tabelle 31: Nachweis von Hydrolyseprodukten mittels GC/MS

Organophosphat	Alkoholische- bzw. phenolische Restgruppe	Nachweis in unveränderter Form	Nachweis mit TFA	Nachweis mit PFBr
Parathion	p-Nitrophenol	+	+	+
Bromophos	2,5-Dichlor-4-bromphenol	+	+	-
Fenthion	p-Methylthio-m-methylphenol	+	+	-
Chlorpyrifos	3,5,6-Trichlor-2-pyridinol	-	-	-
Chlorfenvinphos	2-Chlor-1-(2,4-dichlorphenyl)-vinylalkohol	+	-	-

Mit Ausnahme des 3,5,6-Trichlor-2-pyridinols war der Nachweis der Restgruppen mit oder ohne Derivatisierung bei den Hydrolyseprodukten möglich. p-Nitrophenol konnte als einzige phenolische Gruppe auch als Pentafluorbenzylderivat nachgewiesen werden. Bei Chlorfenvinphos konnte nur der freie Alkohol nachgewiesen werden.

Im folgenden werden die Chromatogramme und entsprechende Massenspektren gezeigt (Abbildungen 66-73).

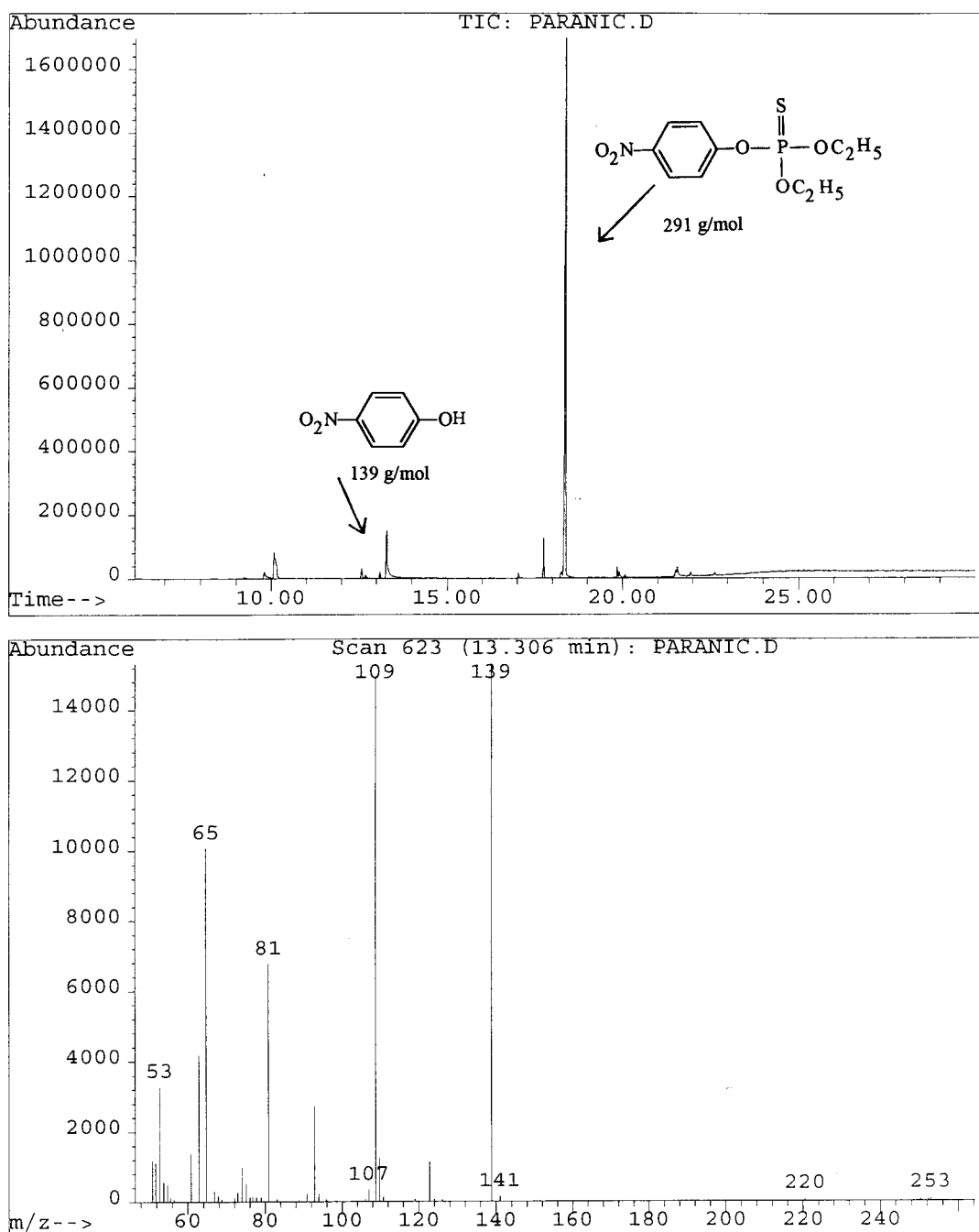


Abbildung 66: Hydrolyselösung von Parathion mittels GC/MS

Oben: Chromatogramm von p-Nitrophenol und nicht
hydrolysiertem Parathion

Unten: Massenspektrum von p-Nitrophenol (Full-Scan)

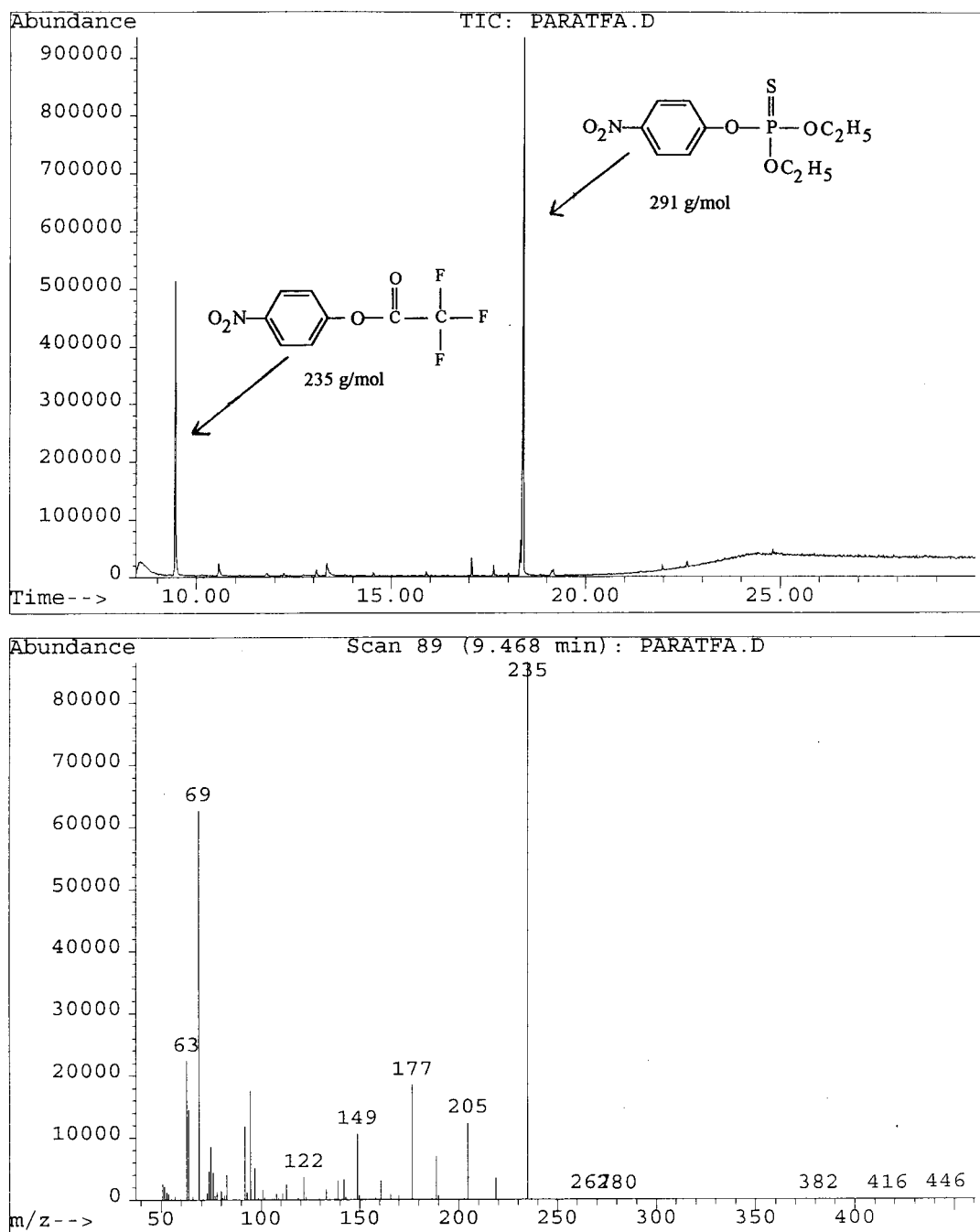


Abbildung 67: Hydrolyselösung des Parathions nach Trifluoracetylierung

Oben: Chromatogramm mit trifluoracetyliertem p-Nitrophenol
und intaktem Parathion

Unten: Massenspektrum vom trifluoracetylierten
p-Nitrophenol (235m/z)

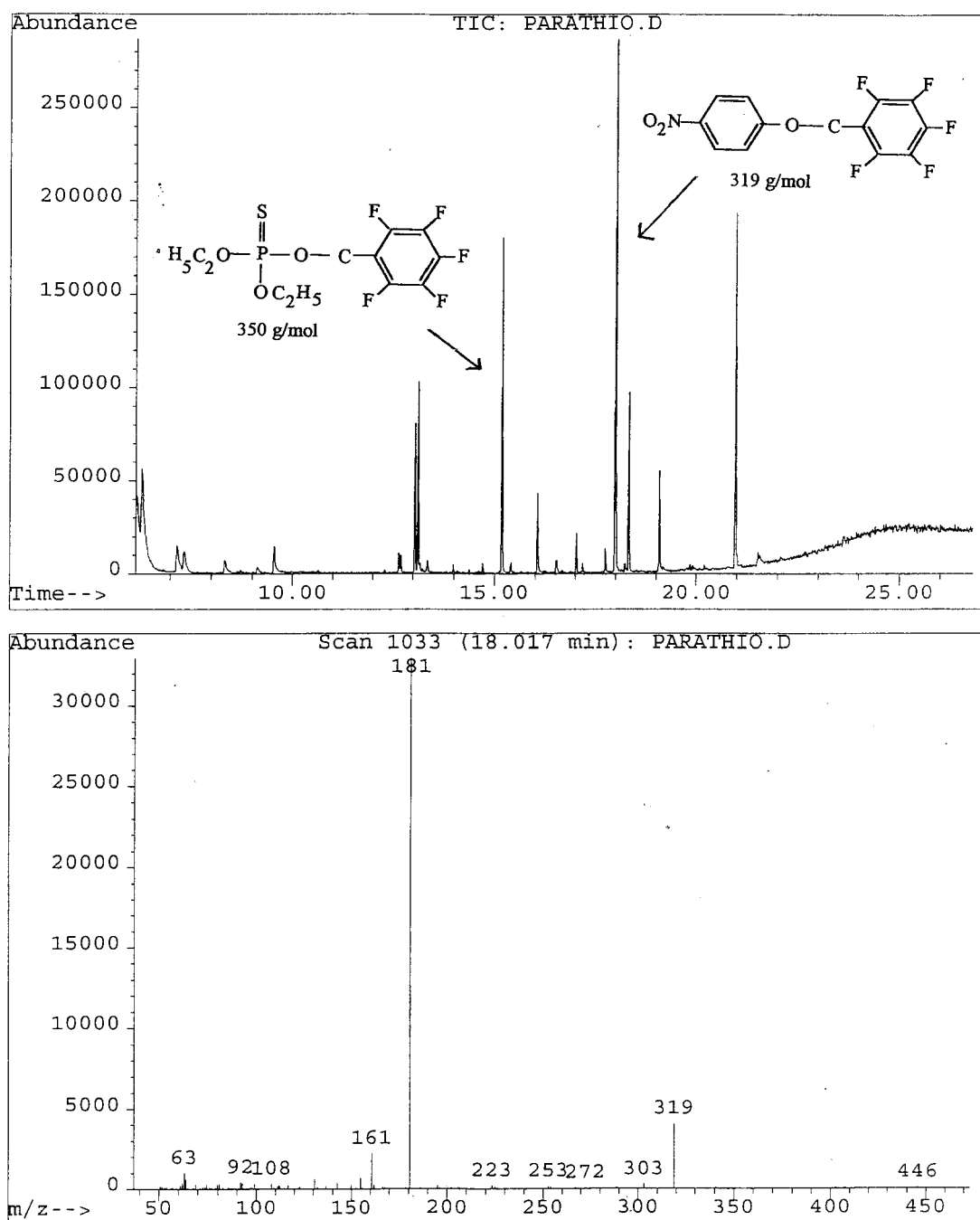


Abbildung 68: Hydrolyselösung des Parathions nach Pentafluorbenzylierung

Oben: Pentafluorbenzyliertes p-Nitrophenol (319 m/z) und
ebenfalls derivatisierte Dimethylthiophosphorsäure
(350m/z)

Unten: Massenspektrum vom derivatisierten p-Nitrophenol

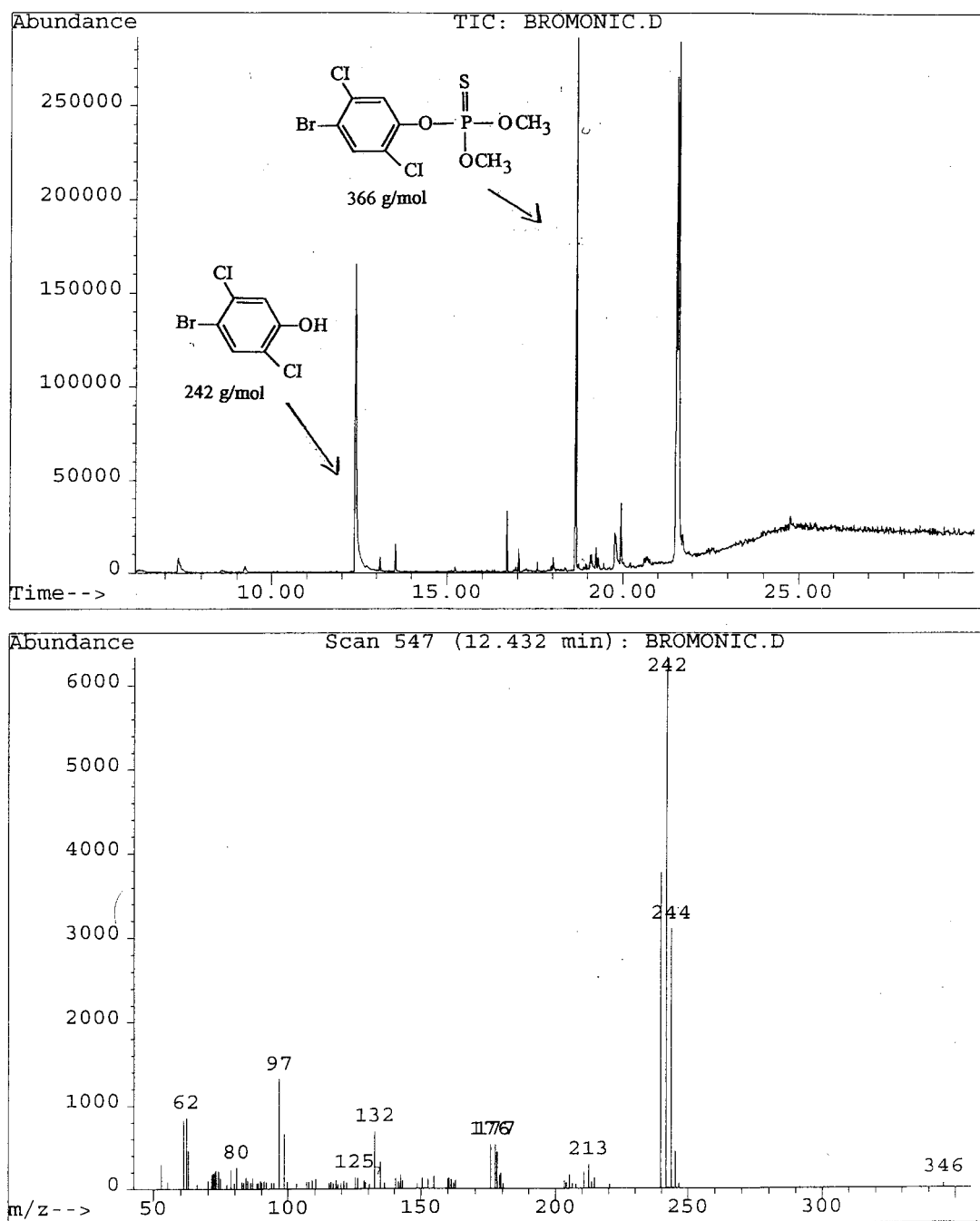


Abbildung 69: Hydrolyselösung von Bromophos mittels GC/MS

Oben: Chromatogramm vom freien 2,5-Dichlor-4-bromphenol und
 nicht hydrolysiertem Bromophos

Unten: Massenspektrum von 2,5-Dichlor-4-bromphenol

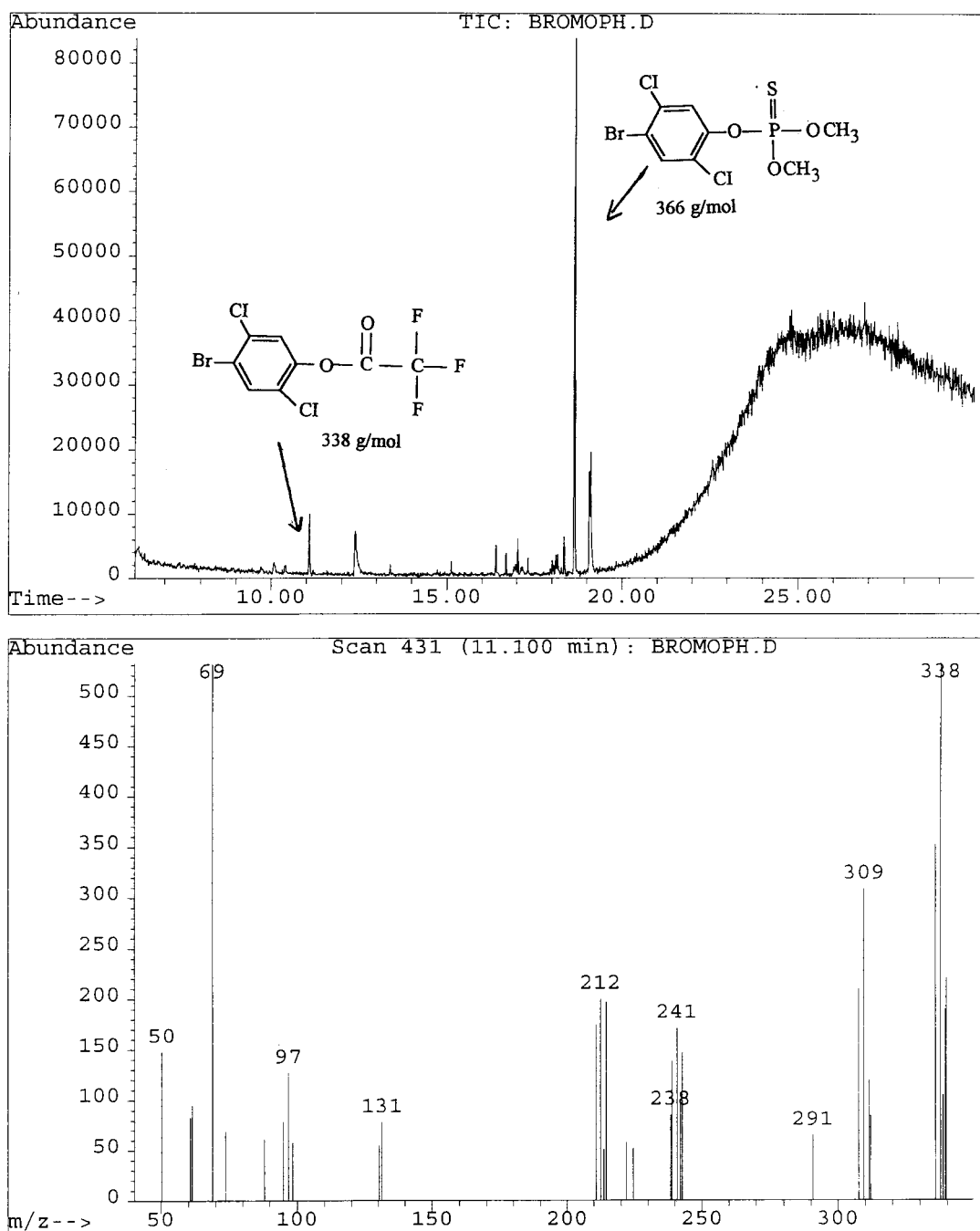


Abbildung 70: Hydrolyselösung von Bromophos nach Trifluoracetylierung

Oben: Chromatogramm von 2,5-Dichlor-4-bromphenol und
und Bromophos

Unten: Massenspektrum von 2,5-Dichlor-4-bromphenol
(trifluoracetyliert, 338m/z)

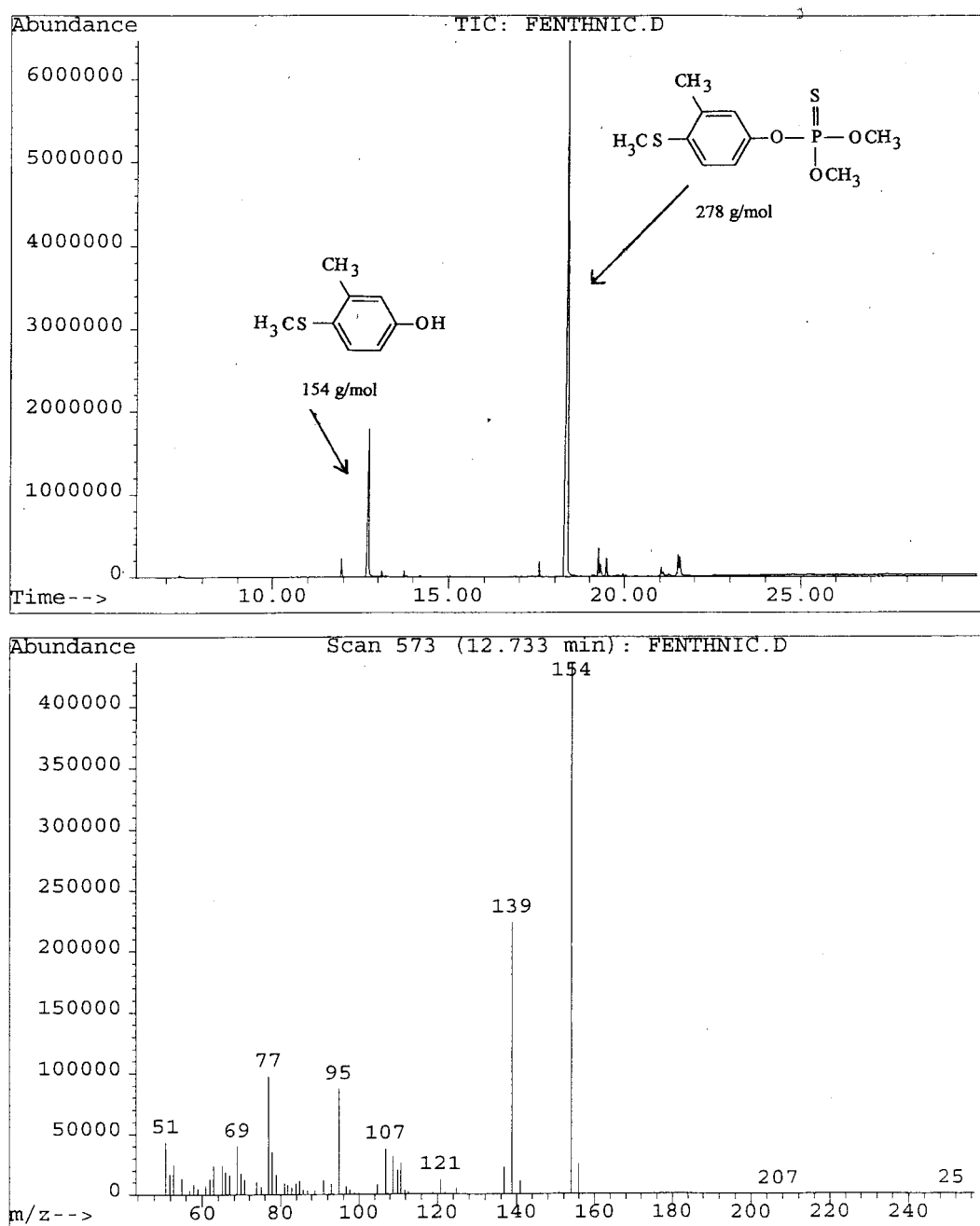


Abbildung 71: Hydrolyselösung des Fenthions mittels GC/MS

Oben: Chromatogramm des freien p-Methylthio-m-methylphenols
und nicht hydrolysierten Fenthion

Unten: Massenspektrum von p-Methylthio-m-methylphenol

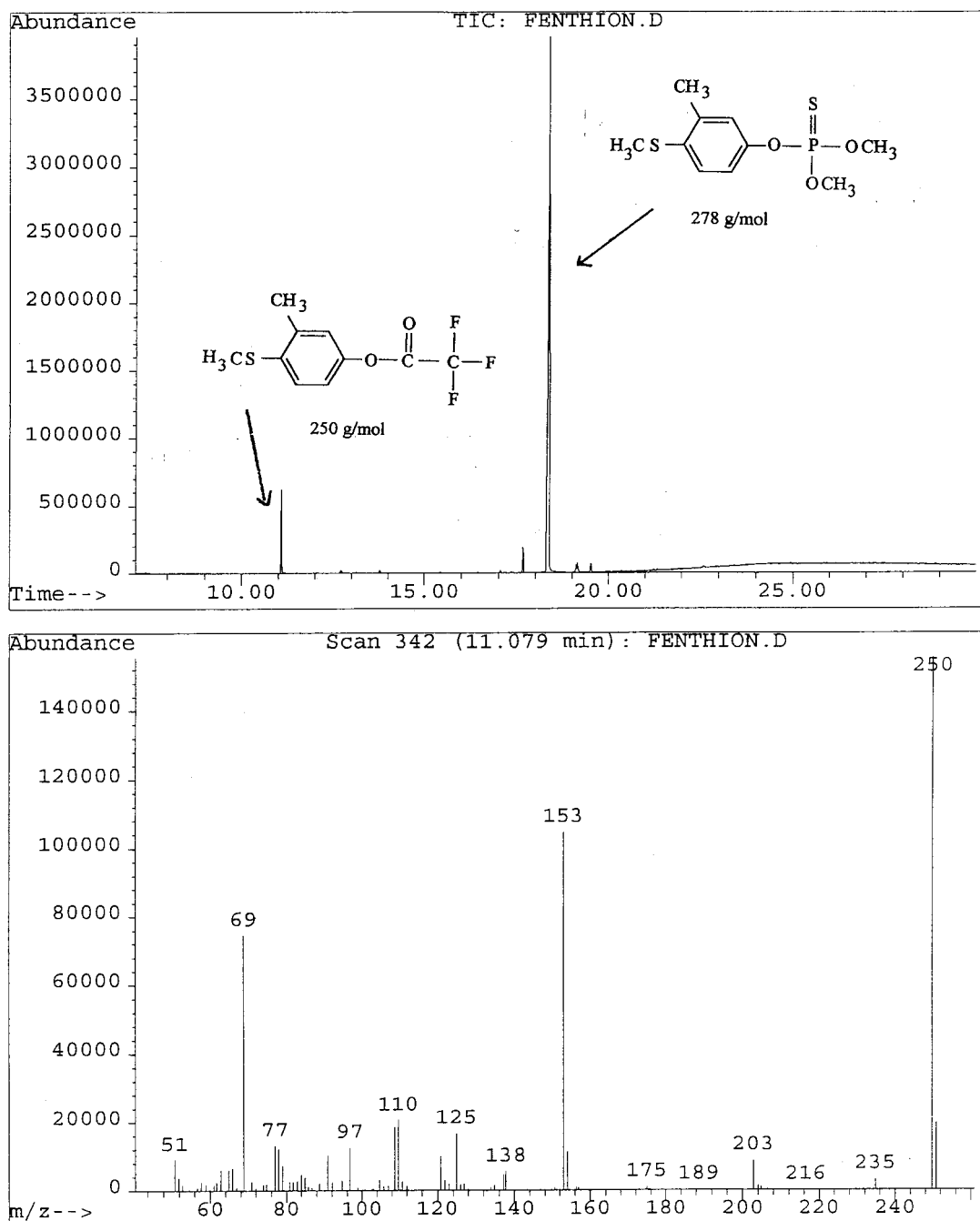


Abbildung 72: Hydrolyselösung von Fenthion nach Trifluoracetylierung

Oben: Chromatogramm von p-Methylthio-m-methylphenol
(trifluoracetyliert, 250g/mol) und intaktem Fenthion
(278g/mol)

Unten: Massenspektrum von p-Methylthio-m-methylphenol
(trifluoracetyliert)

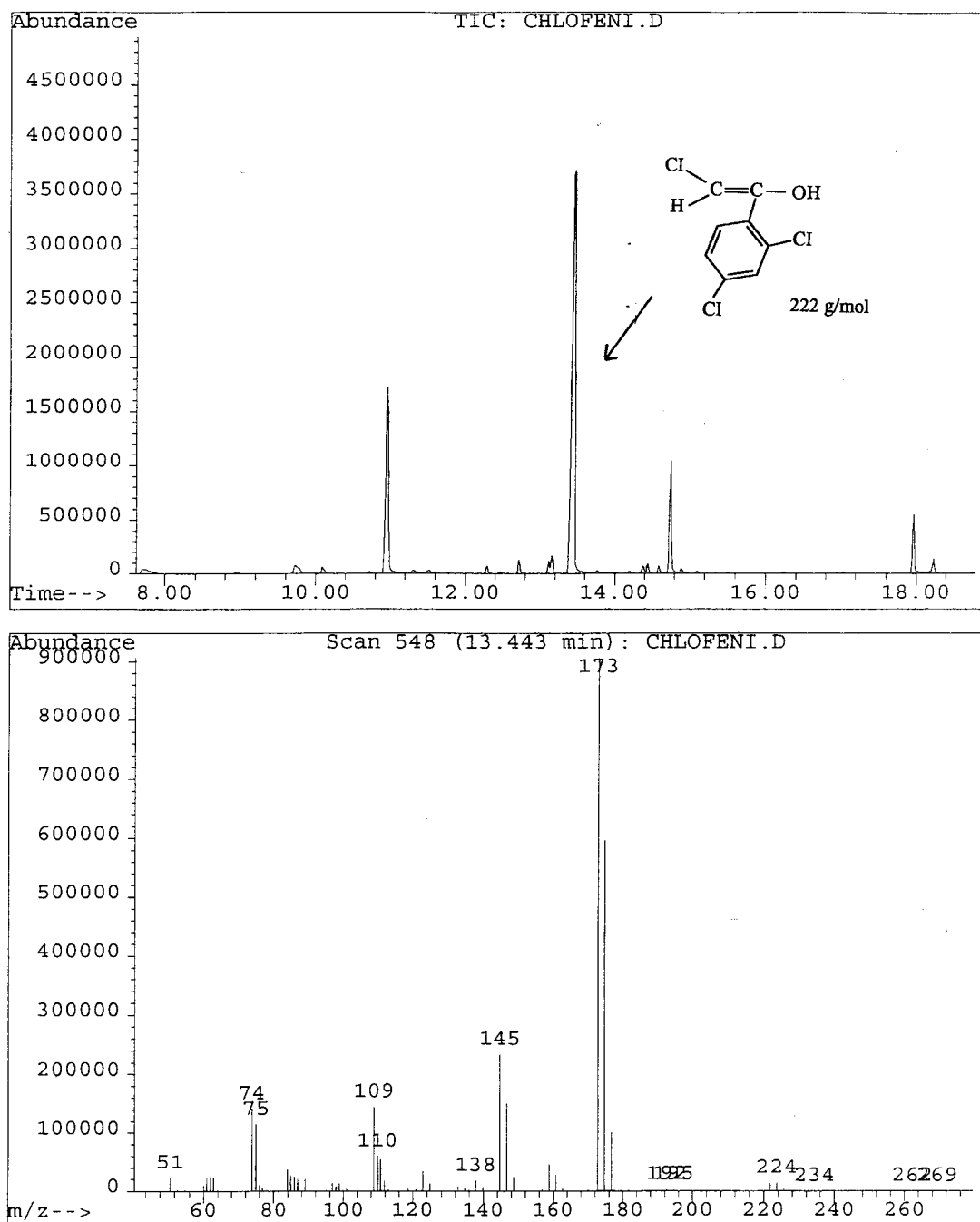


Abbildung 73: Hydrolyselösung von Chlorfenvinphos mittels GC/MS

Oben: Chromatogramm vom freien 2-Chlor-1-(2,4-dichlorphenyl)-vinylalkohol (222g/mol)

Unten: Massenspektrum des Vinylalkohols (Full-Scan)

5.6.4 Quantifizierung von p-Nitrophenol im Blut

p-Nitrophenol – als Metabolit von Parathion bereits seit langem bekannt - wurde hier untersucht, um das analytische Vorgehen auf nicht untersuchte Organophosphate zu übertragen. Für p-Nitrophenol konnte im Gegensatz zu den anderen untersuchten Hydrolyseprodukten eine quantitative Methode entwickelt werden, weil eine Referenzsubstanz zur Verfügung stand.

Für die Quantifizierung von p-Nitrophenol im Blut wurden fünf dotierte Serumproben untersucht. Als IS diente Phenprocoumon. Die Serum-Stammlösung wurde zusammen mit vier weiteren Verdünnungen (Verdünnungsfaktoren: 2, 10, 50, 100) für eine Kalibration eingesetzt. Die Eichpunkte wurden als Quotienten der Signalintensitäten von Analyt und IS ermittelt. Der Korrelationskoeffizient (r) betrug 0,9998.

Bei einer Intoxikation mit Todesfolge ist das im Blut enthaltene p-Nitrophenol vor und nach enzymatischer Spaltung der Sulfat- und Glucuronidkonjugate bestimmt worden. Auf diese Weise sind im Blut des Verstorbenen 1,6µg/ml freies p-Nitrophenol und 2,4µg/ml gebundenes p-Nitrophenol quantifiziert worden.

Abbildung 74 zeigt in der oberen Hälfte der Abbildung die Chromatogramme, welche im LC/MS und LC/DAD Modus aufgenommen wurden. Die Detektion mittels DAD und MS erfolgte fast simultan. Die Probe durchlief zuerst den DAD und anschließend erfolgte die Ionisierung mittels APCI (negativ). Dadurch wurden die Retentionszeiten von p-Nitrophenol und dem IS Phenprocoumon im MS-Modus (9,94/14,86 Minuten) etwas länger als im DAD-Modus (9,88/14,78 Minuten). Im unteren Teil der Abbildung ist das Massenspektrum von p-Nitrophenol mit der Molekülmasse 138 und dem UV-Maximum 316nm angegeben.

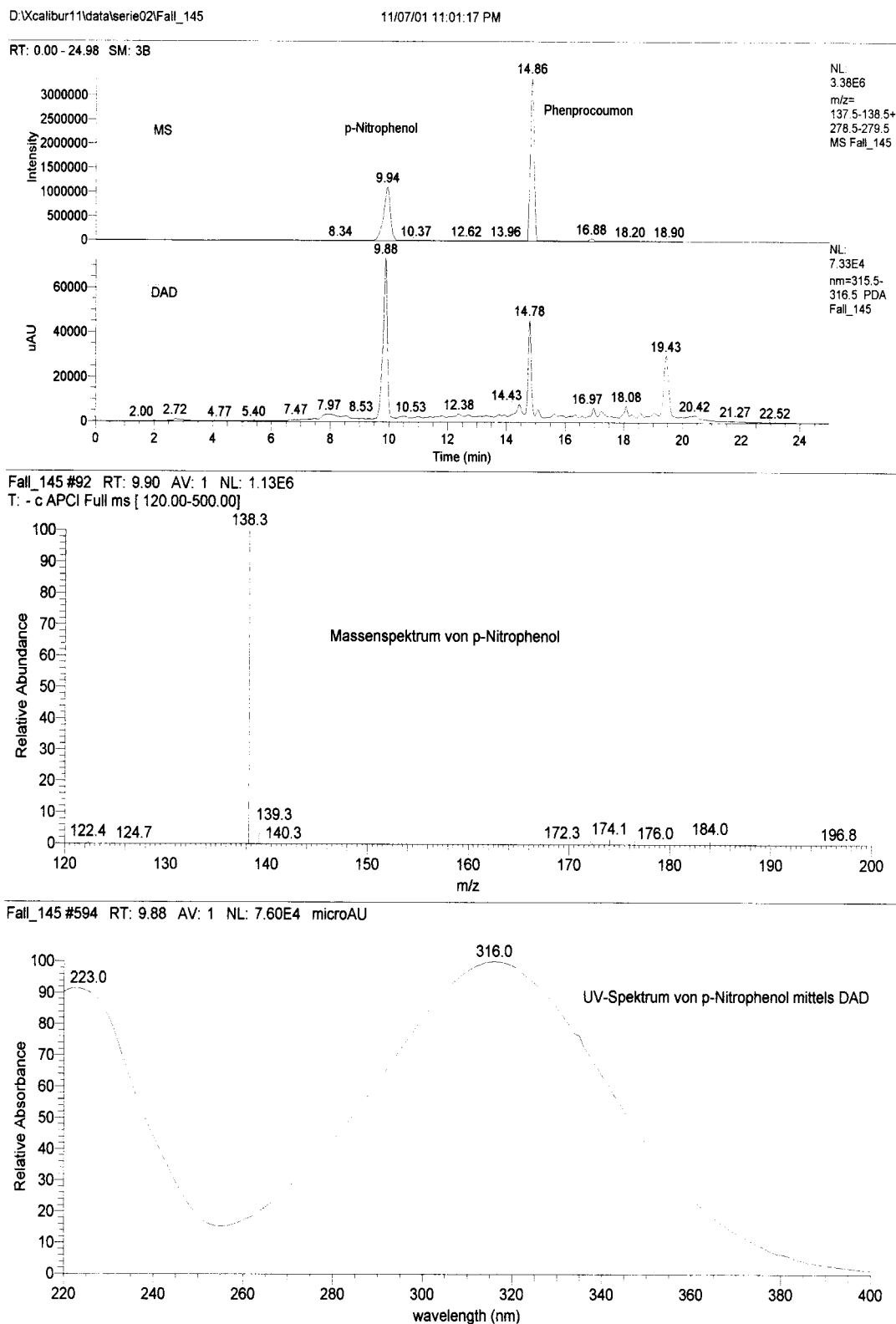


Abbildung 74: p-Nitrophenol aus Urin mittels LC/MS/DAD

Obere Abb.: Chromatogramme im MS- und DAD-Modus mit
p-Nitrophenol und Phenprocoumon als internen Standard

Mittlere Abb.: Massenspektrum von p-Nitrophenol (APCI)

Untere Abb.: Spektrum (UV/visible) von p-Nitrophenol

5.6.5 Nachweis von Organophosphat-Hydrolyseprodukten im Leichenblut

Leichenblut wurde mit Organophosphaten dotiert, um einen Zerfall der Insektizide post mortem im Blut zu simulieren. Die Quantifizierung der intakten Phosphorsäureester nach einem und sieben Tagen im Leichenblut bestätigte den Zerfall von Organophosphaten im post-mortem-Material, wo keine enzymatische Spaltung mehr stattfindet.

Tabelle 32 zeigt den Zerfall von intakten Organophosphaten im post-mortem-Material nach der Quantifizierung mittels GC/MS.

Tabelle 32: Zerfall von intakten Organophosphaten im post mortem Material

Organophosphat	Hydrolysierung nach einem Tag	Hydrolysierung nach sieben Tagen
Parathion	47%	50%
Bromophos	52%	> 99%
Fenthion	52%	90%
Chlorpyrifos	49%	60%
Chlorfenvinphos	40%	Kein weiterer Zerfall

Aufgrund des nachgewiesenen Zerfalls der Organophosphate im Leichenblut, müssen sich entsprechende alkoholische und phenolische Restgruppen im Blut befinden. Um diese Verbindungen im Blut nachzuweisen, wurden die vorangegangenen Versuche mit den Hydrolyselösungen auf das biologische Material übertragen. Hierfür wurde das Blut mit einem Ammoniumacetatpuffer versetzt (pH: 5,5) und mit Diethylether/Ethylacetat (1+1, v/v) extrahiert.

Der Extrakt wurde anschließend wie die alkalisch gespaltenen Organophosphate mit Hilfe der Flüssigkeits- und Gaschromatographie analysiert. Für Bromophos war neben dem Nachweis mittels LC/MS/DAD auch eine LC/MS/MS Bestätigung durch die Abspaltung eines Chloratoms möglich.

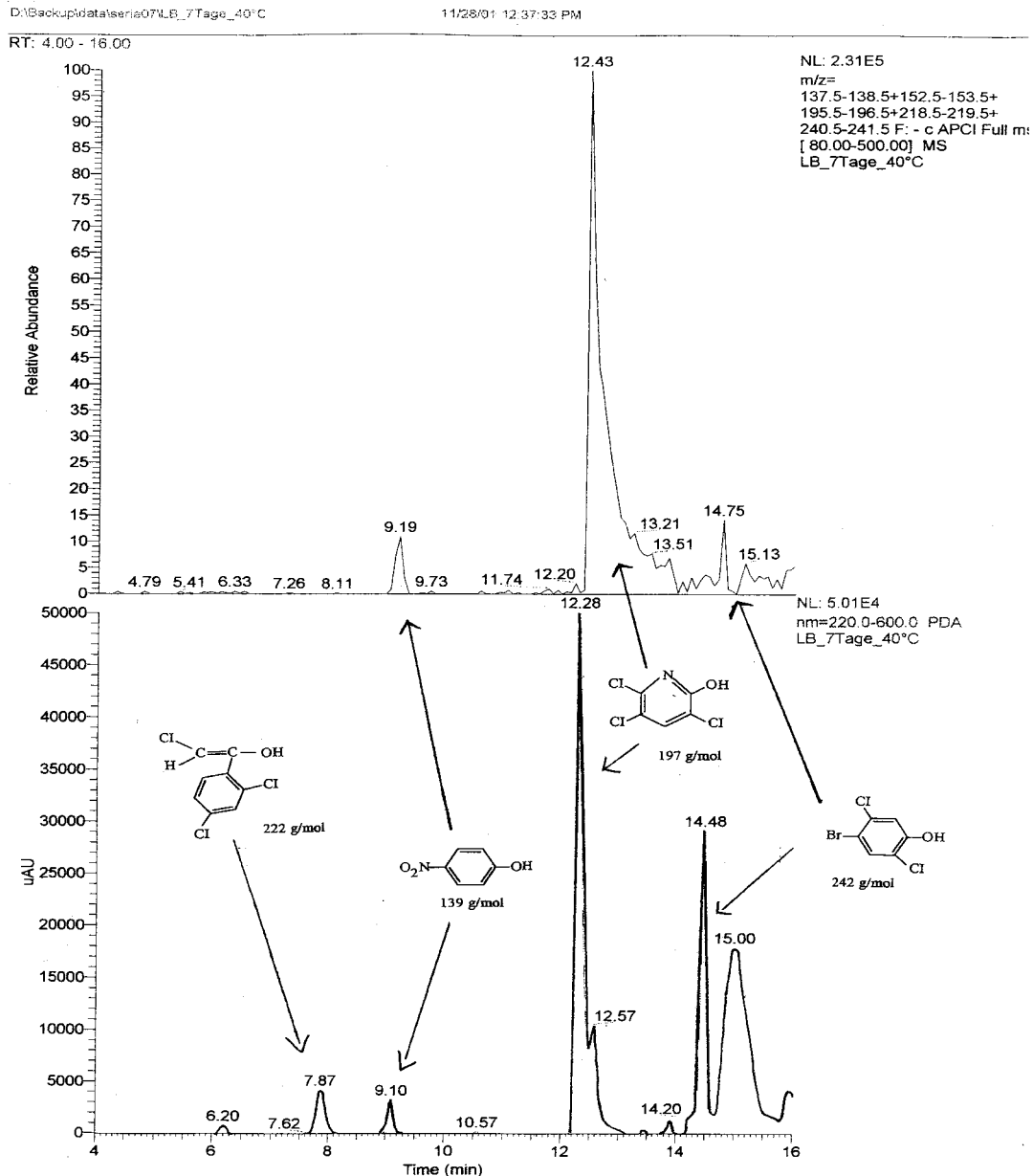


Abbildung 75: Analyse des mit Organophosphaten dotierten Leichenblutes nach 7 Tagen mittels LC/MS/DAD
Oben: Chromatogramm im MS-Modus
Unten: Chromatogramm im DAD-Modus

Die obere Hälfte der Abbildung 75 zeigt das Chromatogramm mit massenselektiver Detektion, die untere Hälfte das Chromatogramm im Dioden-Array-Modus. Fast alle phenolischen Guppen ließen sich mittels LC/MS im Leichenblut nachweisen, nur das p-Methylthio-m-methylphenol - resultierend aus Fenthion - und die alkoholische Komponente des Chlorfenvinphos (2-Chlor-1-(2,4-dichlorphenyl)-vinylalkohol) nicht. Mit dem optischen Detektorsystem (DAD) ließen sich bis auf die abspaltbare Gruppe des Fenthions alle Hydrolyseprodukte nachweisen.

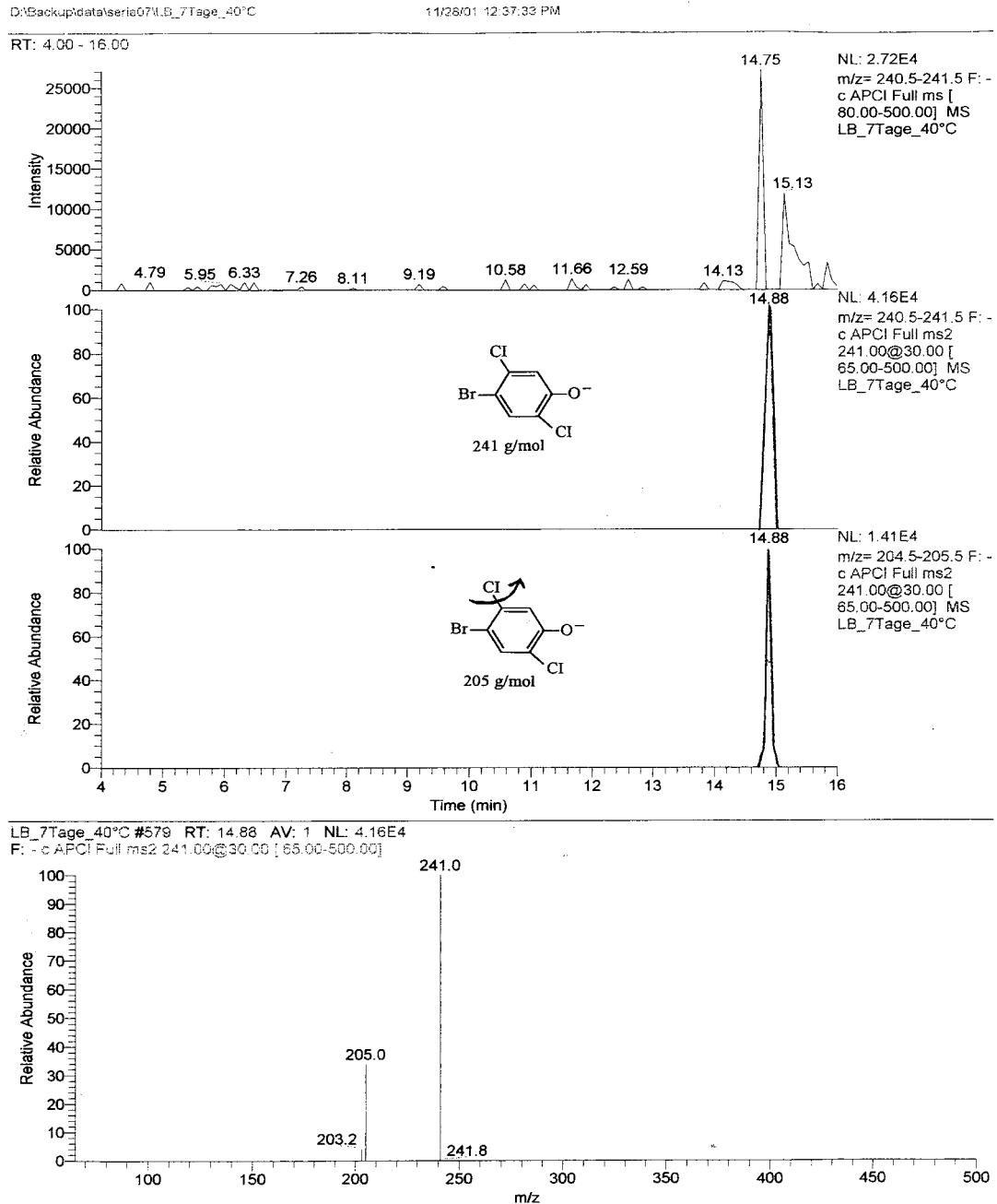


Abbildung 76: Nachweis von 2,5-Dichlor-4-bromphenol (241m/z) mittels LC/MS/MS im Leichenblut

Obere Abb.: Chromatogramm in drei Spuren dargestellt:

(1) Full-Scan (2) 241m/z isoliert (3) 205m/z isoliert

Untere Abb.: Massenspektrum vom 2,5-Dichlor-4-bromphenol mit dem Molekülion 241m/z (MS) und dem Fragmentation 205m/z (MS/MS)

Das oberste Chromatogramm in Abbildung 76 zeigt die Analyse des Leichenblutextraktes im Full-Scan. Parallel zu dem Full-Scan-Experiment wurde ein MS/MS-Versuch mit der Masse 241 (2,5-Dichlor-4-bromphenol) durchgeführt. Nach der Fragmentierung ergab sich die Masse 205 (drittes Chromatogramm von oben).

Das entspricht 2- oder 5-Dichlor-4-bromphenol. Weil diese Verbindung aus dem in der Ionenfalle isolierten 2,5-Dichlor-4-bromphenol resultiert, ist mit dem MS/MS-Experiment ein weiterführender Nachweis für das Hydrolyseprodukt von Bromophos gegeben. Das Massenspektrum (unterste Abbildung) aus dem MS/MS-Versuch zeigt die Masse des Hydrolyseproduktes von Bromophos (241) und das korrespondierende Fragmentation (205).

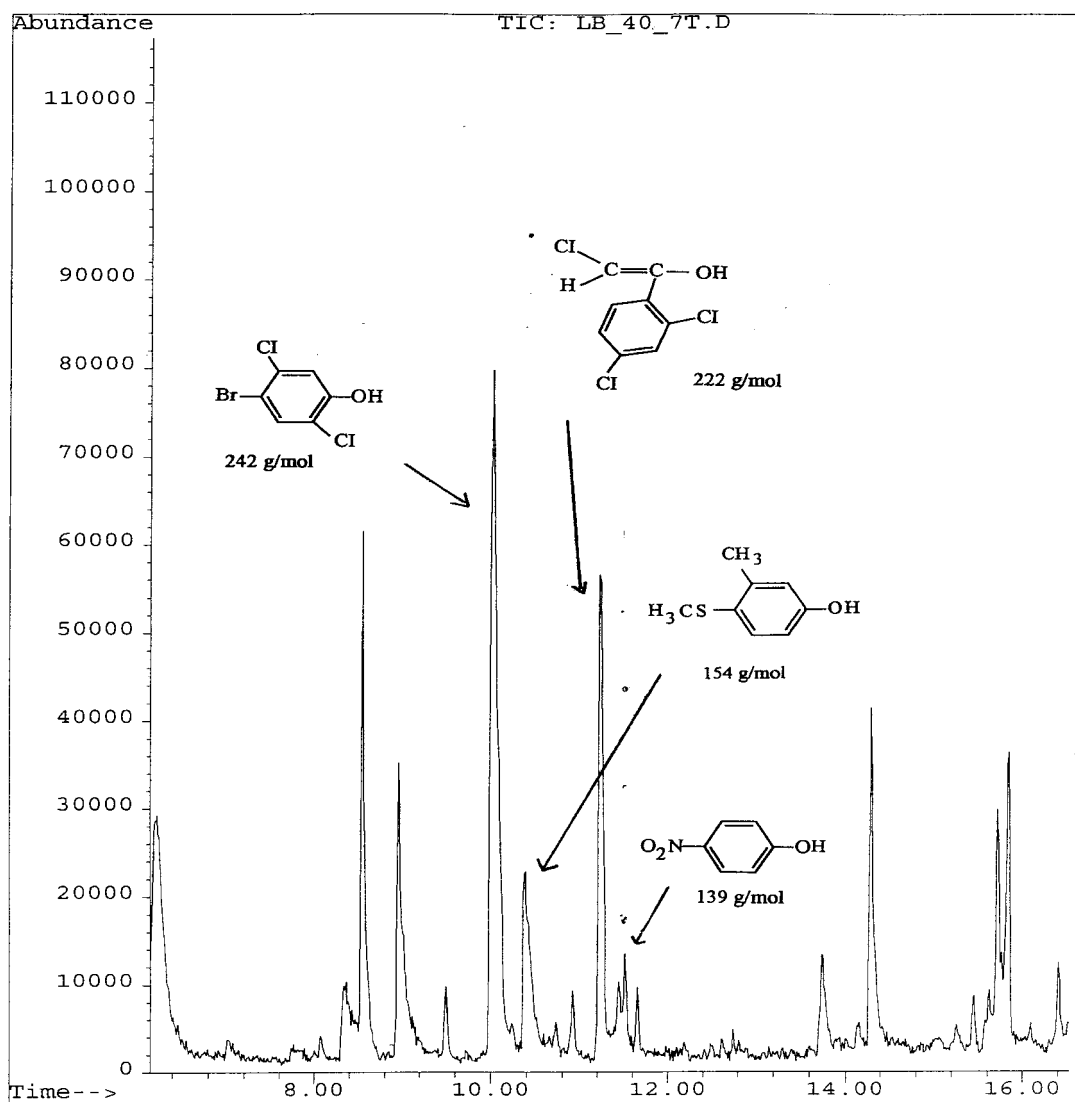


Abbildung 77: Chromatogramm vom Extrakt des mit Organophosphaten dotierten Leichenblutes (ca. 16 µg/ml) mittels GC/MS

Die Abbildung 77 zeigt ein Chromatogramm des Leichenblutes mit den Hydrolyseprodukten von Parathion, Bromophos, Fenthion und Chlorfenvinphos. Das 3,5,6-Trichlor-2-pyridinol von Chlorpyrifos war mittels Gaschromatographie, den Vorversuchen entsprechend nicht nachzuweisen.

6 Diskussion

6.1 Präparative Methoden

6.1.1 Dialkylphosphate

Für die Metabolitenbestimmung der Organophosphate im Urin waren analytische Reinsubstanzen erforderlich. DEDTP und DETP waren bei der Fa. Sigma-Aldrich kommerziell erhältlich. DEP wurde über die „library of rare chemicals“ (Fa. Fluka) bezogen, jedoch handelte es sich hierbei um eine einmalige Lieferung von 100mg. Um die Analytik aller sechs Metaboliten auf Dauer zu ermöglichen, wurden DMP, DEP, DMTP, DMDTP und der IS DPDTP synthetisiert.

In der Literatur werden die unterschiedlichsten Synthesemöglichkeiten diskutiert. Die einfachste Methode, Dialkylphosphate herzustellen, besteht in der Umsetzung von Phosphorsäure und den entsprechenden Alkoholen. Die dabei entstehenden Phosphorsäuredialkylester sind vermutlich auf Polyphosphorsäure zurückzuführen, die in der konzentrierten Phosphorsäure enthalten ist. Die Ausbeute ist hierbei allerdings gering, so dass die Abtrennung großer Mengen anorganischen Phosphats notwendig ist.

Die Veresterung von Alkoholen kann effektiver mit Phosphor(V)-oxid durchgeführt werden. **Cavalier (1898)** und **van Hove (1909)** stellten mit Methanol bzw. Ethanol und Phosphor(V)-oxid die Phosphorsäuredimethyl- und ethylester her. Neben den Phosphorsäuredialkylestern befinden sich im Reaktionsgemisch auch noch Monoalkylester und Phosphorsäure. Durch den Einsatz überschüssigen Alkohols lässt sich die Dialkylesterbildung begünstigen. Die Trennung der Monoalkylester von den Dialkylestern kann nach **Lynen (1940)** über die unterschiedliche Löslichkeit der Bariumsalze erfolgen. Nach abgeschlossener Reaktion des Alkohols mit Phosphor(V)-oxid neutralisierte Lynen die Lösung und filtrierte die nicht löslichen Bariumsalze der Monoalkylester ab. Die löslichen Bariumsalze der Dialkylester wurden darauffolgend aus der wässrigen Lösung nach Abdestillation des Wassers auskristalliert.

In der vorliegenden Arbeit ergab die Veresterung von Methanol und Ethanol mit Phosphor(V)-oxid und anschließender Bariumsalzfällung keine kristallinen Produkte. Nach destillativer Entfernung des Wassers war eine ölige Flüssigkeit zurückgeblieben, die auch nach Tagen und weiterer Temperaturabsenkung nicht auskristallisierte. Vermutlich verlief die Trennung der Mono- und Dialkylester nicht quantitativ.

Der flüssige Aggregatzustand wurde auf eine erhebliche Verunreinigung mit Phosphorsäure zurückgeführt. Weil die Produkte von DMP und DEP offensichtlich stark verunreinigt waren, wurde auf eine Reinheitsbestimmung dieser Syntheseprodukte verzichtet.

Toy (1948) hydrolysierte den TEPP mit Wasser durch Erwärmung. Dabei erhielt er mit einer Ausbeute von über 97% den entsprechenden Phosphorsäuredialkylester (DEP):

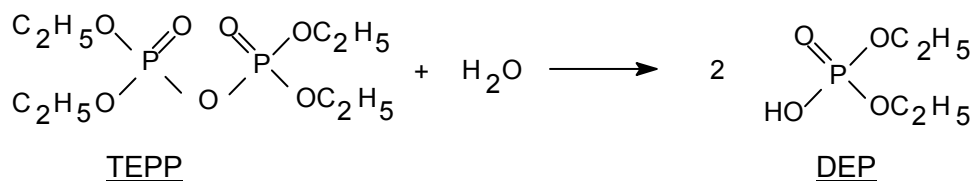


Abbildung 78: Hydrolytische Spaltung von TEPP

Die Darstellung der Alkylphosphate aus Pyrophosphorsäureestern ist eine einfache und deshalb für ein analytisch arbeitendes Labor sehr geeignete Methode. Sie gehört auch zu den Verfahren, welche es erlauben, die freien Dialkylphosphorsäuren herzustellen. Diese Synthese würde sich aber nur für DEP anbieten, weil der Pyrophosphorsäuremethylester (TMPP) in reiner Form für DMP nicht erhältlich ist. TEPP, erforderlich zur Darstellung von DEP, war eine der ersten Organophosphatverbindungen, die auch als Insektizid eingesetzt wurde. Insektizide sind für präparative Zwecke kommerziell nur schlecht in ausreichender Menge erhältlich, so dass die hydrolytische Spaltung von TEPP zur Darstellung von DEP im Rahmen dieser Arbeit keine Alternative darstellte.

Bailly und Gaume (1934) ließen Schwefelsäuredialkylester auf das Dinatriumsalz eines Monoalkylphosphats einwirken und erhielten auf diese Weise das Natriumsalz der entsprechenden Dialkylphosphorsäure:

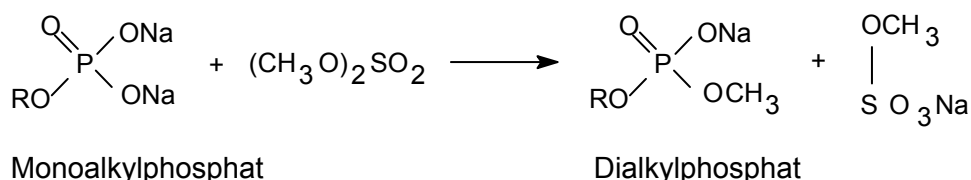


Abbildung 79: Alkylierung von Monoalkylphosphaten zu Dialkylphosphaten mit Schwefelsäuredialkylestern

Die Alkylierung der Phosphorsäuremonoester erscheint einfach in der Durchführung, birgt aber die Gefahr, dass nicht ausschließlich Dialkylphosphate entstehen. Die Verunreinigung mit Trialkylestern oder nicht umgesetzten Monoalkylestern ist möglicherweise so erheblich, dass eine Auftrennung des Reaktionsgemisches erforderlich ist. Es werden von Bailly und Gaume keine Angaben zu den Reinheiten der Dialkylphosphate gemacht.

Trialkylester können auch bei dem Verfahren von **Brown und Osborne (1957)** auftreten. Sie derivatisierten die Phosphorsäuremonoester mit Diazoalkanen, welche abhängig von den Reaktionsbedingungen eine oder beide OH-Gruppen alkylieren. Erschwerend bei dieser Methode ist der präparative Einsatz von Diazoalkanen. In großen Mengen sind Diazomethan und Diazoethan aufgrund ihrer Explosivität und Cancerogenität nicht einfach herzustellen sowie gefährlich im Umgang.

Gezielt und von hoher Reinheit lassen sich Phosphorsäuredialkylester herstellen, wenn das Ausgangsprodukt bereits eine Dialkylphosphorverbindung ist und keine Möglichkeit der Bildung von Mono- oder Triestern besteht. Bei der Hydrolyse von Phosphorsäurediesterchloriden ist dies der Fall:

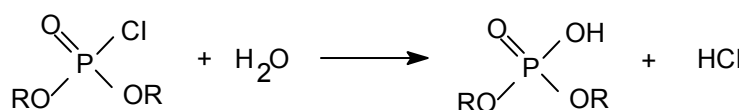


Abbildung 80: Dialkylphosphatbildung durch Hydrolyse von Phosphorsäurediesterchloriden

Die freien Phosphorsäurediethylester DMP und DEP wurden auf diese Weise hergestellt. Zur Herstellung der Phosphorsäurechloride setzt man Phosphoroxychlorid mit den entsprechenden Alkoholen um. Hierbei bilden sich in Abhängigkeit von den Reaktionsbedingungen Phosphorsäuremonoesterdichloride, Phosphorsäurediesterchloride oder Phosphorsäuretriester. Die Phosphorsäuretriester sind gegen den frei werdenden Chlorwasserstoff nicht stabil und gehen in Dialkylphosphatester über:

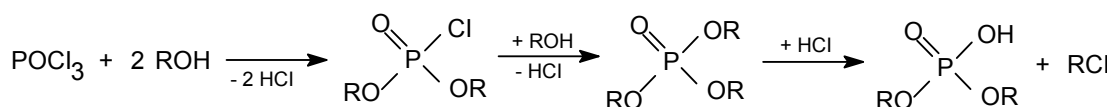


Abbildung 81: Phosphorsäurediesterchloride über Phosphoroxychlorid

Nach **Schiff (1857)** und **Balarew (1917)** ist die Spaltungstendenz besonders bei niederen Phosphorsäuretrialkylestern, wie z. B. Trimethylphosphat oder Triethylphosphat, ausgeprägt. Sie haben DMP und DEP direkt durch die Einwirkung von Methanol bzw. Ethanol auf Phosphoroxychlorid hergestellt.

Eine weitere Möglichkeit, Dialkylphosphorsäurechloride zu erhalten, besteht in der Chlorierung von Phosphinsäureestern und anschließender Hydrolyse. Die bei der Umsetzung von Phosphortrichlorid mit Alkoholen entstehenden Dialkylphosphinsäuren können mit Sulfuryl-, Thionyl- oder Oxalylchlorid in die entsprechenden Dialkylphosphorsäurechloride überführt werden. Nach anschließender Hydrolyse erhält man Dialkylphosphorsäuren:

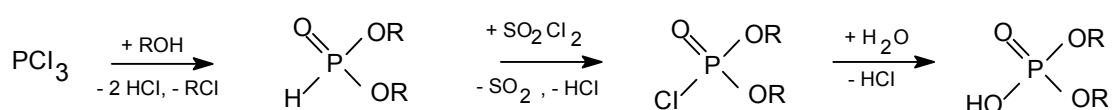


Abbildung 82: Phosphorsäurediesterchloride über Phosphortrichlorid

Die Herstellung des Phosphorsäurechlorids war experimentell für diese Arbeit nicht notwendig, weil das für DMP und DEP erforderliche Phosphorsäurechlorid bei der Fa. Fluka erhältlich ist. Die Methyl- und Ethylphosphorsäurechloride wurden im Rahmen dieser Arbeit hydrolysiert und ergaben die freien Säuren DMP und DEP.

Blumenthal und **Herbert (1945)** und **McIvor et al. (1956)** stellten DMP und DEP aus den Trialkylphosphorsäureestern nach partieller Spaltung dar:

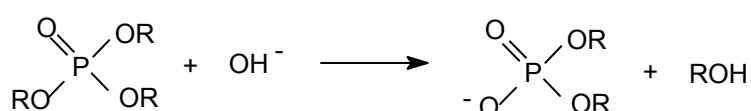


Abbildung 83: Alkalische Spaltung von Phosphorsäuretriestern zu Diestern

Dabei versetzten sie den Trialkylester mit Natronlauge und isolierten anschließend das Natriumsalz der Dialkylphosphorsäure aus der wässrigen Phase. Je nach Reaktionsbedingungen ist mit Monoalkylphosphaten oder nicht hydrolysiertem Trialkylphosphat als Verunreinigung zu rechnen.

Wesentlich reinere Dialkylphosphate lassen sich aus Trialkylphosphaten mit Neutralsalzen nach **Cremlyn et al. (1958)** und **Zervas** und **Dilaris (1955)** herstellen. Als Salz dient z. B. Natriumjodid. Die im Verlaufe der Reaktion ausfallenden Salze der Phosphorsäurediester sind gegenüber dem spaltenden Reagenz stabil:

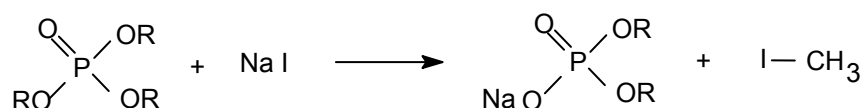


Abbildung 84: Phosphorsäurediester aus Triester und Natriumjodid

Für diese Arbeit konnte aus TMP und Natriumjodid in Aceton als Lösungsmittel das Natriumsalz der DMP hergestellt werden.

Cheymol et al. (1960) verwendeten Trimethylamin, um Dimethylphosphat aus dem Triester unter Bildung eines Tetraalkylammoniumsalzes freizusetzen:

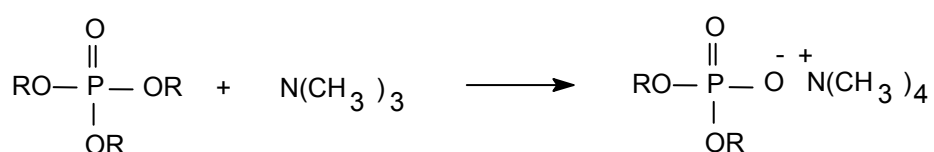


Abbildung 85: Phosphorsäurediester aus Triester und Trimethylamin

Nach **Teichmann und Hilgetag (1962)** ist die Darstellung von DMP und DEP über die Alkylierung des Thioharnstoffs mit den entsprechenden Trialkylphosphaten möglich:

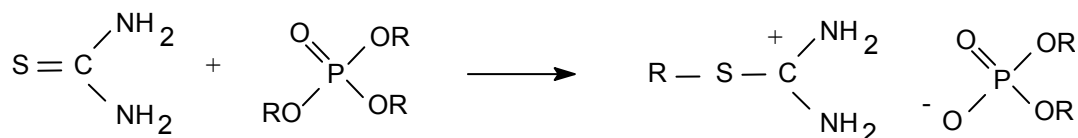


Abbildung 86: Phosphorsäurediester aus Triester und Thioharnstoff

Der Methylester kann weit unterhalb von 100°C alkylierend gespalten werden, wobei die Reaktion auf der Stufe der Monoentalkylierung halt macht. Dagegen sind für die Alkylierung mit Ethylestern erheblich energischere Bedingungen erforderlich (Rückflußkochen ohne Lösungsmittel, Temperaturen um 200°C).

Gemäß der Methode der Autoren sind die Thiouroniumsalze der Dimethyl- und Diethylphosphorsäure für diese Arbeit synthetisiert worden.

6.1.2 Thiodialkylphosphate

Foss (1947) synthetisierte Thiodialkylphosphate über die entsprechenden Natriumdialkylphosphite und Schwefel:



Abbildung 87: Thiodialkylphosphate aus Alkalidialkylphosphite und Schwefel

Auf diese Weise stellte Foss die Natrium- und Kaliumsalze der Dimethyl-, Diethyl-, Dipropyl- und Diisopropylthiophosphorsäure dar. Das erforderliche Natriumsalz des Dialkylphosphits erhielt er durch die Einwirkung von Natriummethanolat in Diethylether auf das Dialkylhydrogenphosphit. Die hierfür notwendigen Dialkylhydrogenphosphite sind nach **Nylén (1924)** leicht über Phosphortrichlorid und Alkohol erhältlich:

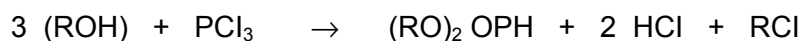


Abbildung 88: Darstellung der Phosphite über Phosphortrichlorid

Die freien Dialkylthiophosphorsäuren können nach **Mastin et al. (1945)** durch Hydrolyse der Dialkylthiophosphorsäurechloride gewonnen werden:

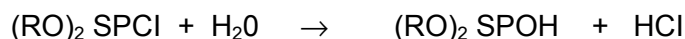


Abbildung 89: Darstellung freier Thiophosphorsäuren aus Thiophosphorsäurechloride

Entsprechend der Methode von Foss wurde für diese Arbeit das Natriumsalz der Diethylthiophosphorsäure dargestellt.

6.1.3 Dithiodialkylphosphate

Nach **Hoegberg** und **Cassaday (1951)** und **Gupalo et al. (1968)** werden die Dithiodialkylphosphate sehr gut über die Einwirkung eines Alkohols auf di-Phosphorpentasulfid gewonnen.



Abbildung 90: Dithiodialkylphosphate durch Einwirkung von Alkohol auf di-Phosphorpentasulfid

Die Natriumsalze erhält man durch anschließende Zugabe von Natriumhydroxid. Für diese Arbeit wurden die Natriumsalze der Dimethyldithiophosphorsäure und Dipropyldithiophosphorsäure synthetisiert.

6.2 Analytik der Dialkylphosphate

6.2.1 Derivatisierung der Dialkylphosphate

Die Analyse der Dialkylphosphate erfordert eine Derivatisierung, um sie der gaschromatographischen Analyse zugänglich zu machen.

Das erste Reagenz, welches zur Derivatisierung von Dialkylphosphaten eingesetzt wurde, war Diazomethan. **John** und **Lisk (1968)** methylierten die Dialkylphosphate für deren Bestimmung im Rinderurin. Damals wurde mit dieser Methode bereits eine Nachweisgrenze für Dialkylphosphate von 200ng/ml Urin erreicht. Schwierigkeiten bereitete das anorganische Phosphat im Urin, welches nach der Methylierung, wie Dimethylphosphat, in Trimethylphosphat resultierte. Dadurch war eine Unterscheidung zwischen Dimethylphosphat und anorganischem Phosphat nicht möglich. **Shafik** und **Enos (1969)** und **Franklin et al. (1981)** konnten durch den Einsatz von Diazoethan diese Problematik einschränken. Massenselektive Detektionsverfahren wurden aber nicht angewendet, so dass eine chromatographische Trennung erforderlich war. Ethyliertes Dimethylphosphat und triethyliertes, anorganisches Phosphat liegen in der Gaschromatographie eng zusammen. Eine Trennung ist nur unter optimalen chromatographischen Bedingungen möglich.

Um diese Schwierigkeit zu umgehen, setzten **Lores et al. (1977)** und **Brokopp et al. (1981)** Diazopentan ein. Auf diese Weise war es möglich, anorganisches Phosphat vom Dimethylphosphat in der Gaschromatographie zu unterscheiden.

Blair und Roderick (1976) versuchten vor der Derivatisierung mit Diazomethan anorganisches Phosphat als Calciumphosphat zu fällen. **Daughton et al. (1976)** verwendeten Ammoniummolybdat zur Fällung. Verlaufen die Fällungen nicht quantitativ, können bei Nachweisgrenzen unter 1 µg/ml für Dimethylphosphat auch geringe anorganische Phosphatrückstände zu einer Fehlinterpretation führen.

Alle Derivatisierungen mit Diazoalkanen haben den Nachteil, dass sich bei der Umsetzung von Dimethylthio- und Diethylthiophosphat Isomere bilden. Weil sich die Isomere in der Chromatographie unterschiedlich verhalten, ergeben sich für die absolute Menge eines Analyten zwei Signale. Die Quantifizierung unter solchen Bedingungen ist außerordentlich schwierig, weil die Verhältnisse zwischen den Thionat- und Thioliatisomeren stark schwanken. **Richardson und Seiber (1993)** geben für die Quantifizierung von DETP über Diazoalkane eine Standardabweichung von 41% an. Dieser Wert zeigt, dass eine Quantifizierung mit Diazoverbindungen als einzigem Reagenz unmöglich ist, auch wenn über die Kieselgelfraktionierung von **Shafik et al. (1971)** die Trennung der Isomere möglich ist.

Aufgrund dieser Probleme und der Toxizität und Explosivität von Diazoverbindungen, wurden andere Reagenzien untersucht. **Takade et al. (1979)** derivatisierten die Dialkylphosphate mit p-Nitrobenzyltolyltriazinen. Diese Methode führte zu p-Nitrobenzylderivaten mit sehr guten gaschromatographischen Eigenschaften. Nachteilig waren allerdings sehr lange Reaktionszeiten (ca. 8 Stunden) und in der Chromatographie störendes, N-alkyliertes Toluidin als Reaktionsnebenprodukt.

Churchill et al. (1978) und **Moody et al. (1985)** verwendeten TMAH für die „on-column“-Derivatisierung. Hierbei wurden DMTP und DMDTP erfolgreich derivatisiert. Eine Isomerisierung von DMTP, wie bei der Umsetzung mit Diazoalkanen, wurde nicht beobachtet. TMAH ist aber als Reagenz nicht effizient genug, um die schwefelfreien Alkylphosphate DMP und DEP zu derivatisieren. Bei Untersuchungen, wo nur Thio- und Dithioalkylphosphate als Analyten zu erwarten sind, stellt dieses Verfahren möglicherweise eine Alternative dar.

Park et al. (1998) silylierten vier der zu untersuchenden Dialkylphosphate mit einem Gemisch aus Hexamethyldisilazan, Trimethylchlorsilan und Pyridin. DMTP und DEDTP wurden nicht untersucht, und DMDTP lag nach der Silylierung als Methylderivat vor. Aufgrund der uneinheitlichen Derivatisierung der Analyten wurde das von Park verwendete Silylierungsgemisch in dieser Arbeit nicht untersucht.

Ein häufig verwendetes Reagenz für die Umsetzung der Dialkylphosphate ist Pentafluorbenzylbromid. **Bardarov und Mitewa (1989)** derivatisierten die Dialkylphosphate mit Pentafluorbenzylbromid in ACN und in Gegenwart von Kaliumkarbonat als Säureakzeptor. Die Reaktionszeiten schwankten, je nach Methode, zwischen 30 Minuten und 24 Stunden. Die verwendeten Reaktionstemperaturen lagen zwischen 40°C und 90°C. Die längeren Reaktionszeiten und höheren Temperaturen waren für DMP und DEP erforderlich. **Fenske und Leffingwell (1989)** untersuchten Humanurin auf DMTP und DMDTP nach einer Malathion-Exposition. Dabei derivatisierten sie die Dialkylphosphate bei einer Temperatur von 40°C. **Aprea et al. (1996)** bestimmten alle sechs Dialkylphosphate im Urin mit Pentafluorbenzylbromid. Weil die schwefelhaltigen Alkylphosphate bei hohen Temperaturen nicht stabil sind, setzten sie die Thio- und Dithioalkylphosphate bei 40°C um, die Dialkylphosphate DMP und DEP hingegen bei 90°C. Denn auch nach zwei Stunden gelang die Derivatisierung dieser Verbindungen bei 40°C nur unzureichend. **Hardt und Angerer (2000)** derivatisierten alle sechs Dialkylphosphate gleichzeitig bei 40°C und erzielten eine gute Umsetzung für die Alkylphosphate. Die benötigte Reaktionszeit von 15 Stunden ist für ein biologisches „monitoring“ und forensische Untersuchungen unproblematisch, jedoch zu lang für klinische Fälle.

Intensivstationen benötigen möglichst schnell Auskunft über die Ursache einer Intoxikation. Eine Derivatisierungsmethode für die Klinik muß deshalb folgende Voraussetzungen erfüllen:

- [1] Es müssen alle sechs Dialkylphosphate erfasst werden.
- [2] Die Reaktionszeit muß möglichst kurz sein.
- [3] Die resultierenden Derivate müssen gute gaschromatographische Eigenschaften aufweisen.
- [4] Die Derivate dürfen nicht zu flüchtig sein, weil sonst Verluste bei der Aufarbeitung zu erwarten sind.

Für diese Arbeit wurden mehrere Dialkylphosphatderivate untersucht. Es wurde geprüft, wie sich verschiedene Reagenzien gegenüber den Dialkylphosphaten verhalten.

Für die Alkylierung wurden keine Diazoalkane eingesetzt. Wie schon erwähnt, sind kurzkettige Diazoverbindungen umständlich herzustellen und aufgrund ihrer Explosivität schlecht zu lagern. Darüber hinaus sind diese Reagenzien nur wenige Tage haltbar.

Für die Darstellung von Methyl- und Ethylestern wurden Schwefelsäurealkylester, Jodalkane und Tetraammoniumhydroxide verwendet. **Martin und Driscoll (1966)** verwendeten Dimethylsulfat zur Methylierung von Barbituraten. Für die Synthese von Methamidophos verwendeten **Schrader et al. (1966)** das Natriumsalz Amino-O-methylthiophosphorsäure und Dimethylsulfat. Jodalkane wurden von **Arthur et al. (1976)** zur Alkylierung von Benzodiazepinen eingesetzt. **Lin et al. (2002)** setzten Methyljodid für die Methylierung schwefelhaltiger Dialkylphosphate ein und **Bravo et al. (2002)** verwendeten 1-Chlor-3-iod-propan für alle sechs Dialkylphosphate. **Greeley (1974)** setzte Carbonsäuren und **Sen et al. (1976)** N-Nitrosamine mit Jodalkanen um. **Lorenz (1955)** setzte N-Halogenmethylbenzamide mit den Salzen der Dialkylthio- und Dialkyldithiophosphorsäure um und erhielt dadurch die entsprechenden Thio- und Dithiophosphorsäureester. **Pianka (1973)** verwendete für die Herstellung von Chlormephos das Kaliumsalz der Dimethyldithiophosphorsäure und Bromchlormethan. Aliphatische Carbonsäuren wurden mit TMAH und dem „on-column“-Verfahren von **Downing (1968)** und **Robb und Westbrook (1963)** methyliert. **Bailey (1967)** konnte diese Möglichkeit auch auf phenolische Carbonsäuren übertragen. Die genannten Reagenzien besitzen, wie die Dialkylphosphate, aktiven Wasserstoff. Deshalb sind diese Reagenzien potentielle Alkylierungsmittel für Dialkylphosphate.

In dieser Arbeit ergab sich, dass die schwefelhaltigen Dialkylphosphate gut mit Schwefelsäurealkylestern und Jodalkanen alkyliert werden können. DMP und DEP hingegen wurden von den eingesetzten Reagenzien nur mäßig umgesetzt. Ein grundlegendes Problem der Dialkylderivate ist ihre Flüchtigkeit. In der Gaschromatographie ließen sich die Dialkylderivate sehr gut trennen, es waren aber Temperaturprogramme mit einer sehr niedrigen Starttemperatur (40°C) erforderlich. Vermutlich ist bei einer Probenaufarbeitung, in der Konzentrierungsschritte unumgänglich sind, mit Analytverlusten zu rechnen. Kurzkettige Alkylderivate sind flüchtig und nur mit Diazoalkanen ausreichend zu derivatisieren. Deshalb wurde hier keine Methode entwickelt, Dialkylphosphate durch Alkylierung in biologischem Material zu identifizieren.

Als weitere Reagenzien wurden Silylierungsmittel untersucht. Das Silylierungsgemisch aus Hexamethyldisilazan, Trimethylchlorsilan und Pyridin führte zu silylierten und methylierten Derivaten. Um einheitliche Derivate zu erhalten, wurde das Silylierungsmittel MSTFA eingesetzt. Insgesamt verliefen die Silylierungen wesentlich schlechter als die Alkylierungen, teilweise fanden überhaupt keine Umsetzungen statt. Die Silylierung wurde deshalb als Derivatisierungsalternative nicht weiter verfolgt.

Für höher flüchtige Dialkylphosphatderivate eignen sich die Benzyllderivate. Hier wurden Benzylbromid und Pentafluorbenzylbromid als Reagenzien untersucht. Sie verhielten sich vergleichbar. Innerhalb von 15 Minuten waren die schwefelhaltigen Dialkylphosphate quantitativ derivatisiert und zeigten gute Eigenschaften in der Gaschromatographie. Problematisch war die erforderliche Reaktionszeit, die benötigt wurde, um alle Dialkylphosphate ausreichend zu derivatisieren. DMP und DEP wurden nur bei einer Reaktionsdauer über Nacht zufriedenstellend umgesetzt.

Der Einsatz von Pentafluorbenzylbromid verkürzte die Reaktionszeit nicht. Aufgrund der langen Umsetzungsphasen waren Benzylbromide als allein verwendete Reagenzien für die Bestimmung von Dialkylphosphaten in klinischen Fällen nicht geeignet.

Als weitere Möglichkeit, schwerflüchtige Arylderivate zu erhalten, bot sich der Einsatz von Diazoarylmethanen an. **Corina und Dunstan (1973)** und **Doms (1977)** verwendeten Diazotoluol für die Benzylierung von kurzkettigen Carbonsäuren, um damit höher flüchtige Derivate zu erhalten. Analog dazu ließen sich in dieser Arbeit auch die Dialkylphosphorsäuren sehr gut mit Diazotoluol benzylieren. Durch Modifizierung der Arylgruppe im Diazomethan konnten auch substituierte Benzyllderivate hergestellt werden. Die Derivatisierung erfolgte bereits bei 40°C innerhalb von 10 Minuten quantitativ. Nachteilig ist die Isomerisierung von DMTP und DETP. Sie wurde bereits bei der Derivatisierung mit Diazoalkanen in der Literatur beschrieben.

Die Untersuchungen der unterschiedlichen Derivatisierungsreagenzien machten deutlich, dass keines der Reagenzien die geforderten Ansprüche für eine klinische Methode erfüllt. Eine Alternative wäre die Kombination verschiedener Reagenzien. Dadurch könnten Vorteile des einen Reagenzes die Nachteile des anderen ausgleichen und umgekehrt.

Für diese Arbeit wurden Methoden entwickelt, bei denen die Dialkylphosphate DMP und DEP mit Diazotoluol bzw. Pentafluordiazotoluol und die Thio- und Dithioalkylphosphate mit Benzylbromid bzw. Pentafluorbenzylbromid umgesetzt wurden. Mit der Kombination beider Reagenzien wurde die Isomerisierung der Thioalkylphosphate (DMTP und DETP) vermieden. Sie trat dann auf, wenn ausschließlich mit Diazoarylmethanen derivatisiert wurde.

Der Einsatz beider Reagenzien führte zu einer schnellen und effektiven Benzylierung aller Dialkylphosphate.

6.2.2 Isolierung der Dialkylphosphate

Bevor die Derivatisierung der Dialkylphosphate durchgeführt werden konnte, mußten sie aus dem Urin isoliert werden. Alkylphosphate sind sehr wasserlösliche Verbindungen und deshalb schwer zu extrahieren.

Moody et al. (1985) verglichen bei der Extraktion des Urins Ethylacetat mit einem Gemisch aus Diethylether und Acetonitril. Beim Lösungsmittelgemisch aus Ether und ACN erhielten sie wesentlich größere Ausbeuten. **Baynes** und **Bowen (1995)** extrahierten einen Milliliter Urin mit sieben Milliliter ACN. Durch Zugabe von Salzen zum Urin ließ sich die Polarität der Probe so erhöhen, dass ACN sich als organische Phase abtrennen ließ. Allerdings blieb immer Wasser in der ACN-Phase zurück. Weil die meisten Derivatisierungen bei Abwesenheit von Wasser ablaufen, wurden Festphasenextraktionen angewendet. **Daughton et al. (1976)** extrahierten die Dialkylphosphate DMP, DEP, DMTP und DETP aus Wasser mit Hilfe eines XAD-4 Harzes. In der Regel findet es Anwendung bei der Entfernung von Phenolen, Detergenzien, Farbstoffen, halogenierten Pestiziden usw. aus wässrigen Medien. Die Wiederfindungsraten der vier untersuchten Dialkylphosphate lagen zwischen 50 und 100%. **Park et al. (1998)** verwendeten eine Cyclohexylphase basierend auf Silicagel (Umkehrphase). Weil der Zusatz von Salzen die Extraktion von Analyten aus Urin mittels Festphase häufig verbessert, wurden unterschiedliche Salze und ihre Auswirkungen auf die Wiederfindungsrate untersucht. Mit einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung und einer pH-Einstellung auf 4 mit Hilfe von Essigsäure wurden die Analyten DMP, DEP, DETP und DMDTP mit 34 bis 100% wiedergefunden. **Fröbe et al. (1990)** nutzten die ionischen Eigenschaften der Alkylphosphate. Sie überführten ein XAD-4 Harz in einen starken Anionenaustauscher und versuchten damit, die Extraktion aus Wasser zu verbessern. Aber auch hier lagen die Wiederfindungsraten für DMP, DEP, DMTP und DETP lediglich zwischen 59% und 95%. **Lores und Bradway (1977)** erzielten mit dem kommerziell erhältlichen, starken Ionenaustauscher Amberlite CG-400 auch keine höheren Wiederfindungsraten. **Miki et al. (1995)** führten eine extractive Derivatisierung durch. Dabei verwendeten sie ein Dreiphasensystem bestehend aus einem Phosphatpuffer (pH: 6,5), Toluol und einen polymergebundenen Anionenaustauscher als Katalysator. Als Derivatisierungsreagenz wurde Pentafluorbenzylbromid verwendet. Bei einem Probeneinsatz von vier Millilitern Urin erreichten sie mit dieser Methode eine relativ hohe Nachweisgrenze von 0,25-0,50 µg/ml Urin mittels GC/MS. **Fenske und Leffingwell (1989)** trockneten die Urinprobe azeotrop mit ACN.

Zur Trocknung von einem Milliliter Urin benötigten sie 21 Milliliter Acetonitril und erreichten für DMTP und DMDTP Wiederfindungsraten von über 70%. **Aprea et al. (1996)** trockneten zwei Milliliter Urin azeotrop mit 16 Millilitern ACN. Aufgrund der unselektiven Isolierung der Dialkylphosphate entstanden bei der Derivatisierung mit Pentafluorbenzylbromid viele in der Gaschromatographie störende Nebenprodukte. Die Autoren lösten das Problem, indem sie nach der Derivatisierung eine Fraktionierung der pentafluorbenzylierten Dialkylphosphate auf einer Cyanopropyl-Umkehrphase durchführten.

Moate et al. (1999) entfernten Störsubstanzen aus dem Urin vor der azeotropen Trocknung mit ACN. Hierfür ließen sie die Urinprobe bei pH 4 eine Octadecyl-Umkehrphase passieren. Das Eluat, in welchem sich die nicht zurückgehaltenen Dialkylphosphate befanden, wurde anschließend mit insgesamt 47 Millilitern Acetonitril azeotrop getrocknet. **Oglobline et al. (2001)** setzten die Gefriertrocknung zur Entfernung von Wasser ein. Die Trocknung dauerte 19,5 Stunden und ist deshalb für klinische Zwecke nicht geeignet.

Zusammenfassend läßt sich sagen, dass die Flüssig-Flüssig-Extraktion mit ACN, die Isolierung mittels Ionenaustausch oder die azeotrope Trocknung einer Urinprobe die besten Ergebnisse in Bezug auf die Wiederfindungsrate liefern.

Bei den bisher beschriebenen Methoden für die Flüssig-Flüssig-Extraktion und der azeotropen Trocknung, sind die eingesetzten Lösungsmittelvolumina viel zu groß. Bei den Verfahren mittels Ionenaustausch sind die Wiederfindungsraten der einzelnen Dialkylphosphate zu unterschiedlich. Um eine optimale Methode zur Extraktion der Dialkylphosphate zu finden, wurden Untersuchungen zur Flüssig-Flüssig-Extraktion, Festphasenextraktion, zum Ionenaustausch, Phasentransfer und zur azeotropen Trocknung durchgeführt.

Bei den Flüssig-Flüssig-Extraktionen erwies sich ACN, wie in der Literatur beschrieben, als einziges Lösungsmittel, das in der Lage war, Dialkylphosphate aus wässrigen Medien zu extrahieren. Die Wiederfindungsraten für DMP und DEP lagen allerdings unter 20%. Außerdem gilt zu beachten, dass eine Extraktion mit ACN nicht wasserfrei ist. ACN läßt sich auch nicht wie stark unpolare Lösungsmittel, wie z.B. Hexan, nachträglich mit Natriumsulfat trocknen. Eine Extraktion mittels Festphase lieferte wasserfreie Extrakte, jedoch ergaben die untersuchten Umkehr- und Polymerphasen Wiederfindungsraten unter 45%. Eine phasentransferkatalysierte Extraktion schien geeignet für die Extraktion der schwefelhaltigen Dialkylphosphate. DETP und DEDTP wurden mit über 60% wiedergefunden. Die Werte der übrigen Dialkylphosphate waren dagegen deutlich schlechter.

Die besten Ergebnisse wurden mittels Ionenaustausch und azeotroper Trocknung erreicht. Vielversprechende Ergebnisse wurden mit dem PSA-Ionenaustauscher erzielt. Die Wiederfindungsraten für die schwefelhaltigen Alkylphosphate lagen über 70%. Die Alkylphosphate DMP und DEP wurden mit über 50% wiedergefunden. Weil DMP und DEP die stärksten Säuren unter den Alkylphosphaten sind, ist davon auszugehen, dass DMP und DEP unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht quantitativ eluiert wurden. Die Erhöhung des Elutionsvolumens oder der Einsatz einer stärkeren Base zur Elutionslösung gewährleisteten sicherlich eine gute Wiederfindung für alle Dialkylphosphate mittels Ionenaustausch.

Alternativ zum Ionenaustausch kann die azeotrope Trocknung eingesetzt werden. Bei allen untersuchten Lösungsmitteln liegt die Wiederfindungsrate aus Wasser über 60%. Dabei ist zu berücksichtigen, dass sich unter Matrixeinfluß, wie z.B. Urin, die Wiederfindung deutlich verbessert.

Für die Entwicklung einer klinischen Methode sind die Extraktionen mittels Ionenaustausch und azeotroper Trocknung als gleichwertig zu betrachten. Wiederfindungsrate und Zeitaufwand sind vergleichbar. Der einzige Unterschied besteht im Materialaufwand und den damit verbundenen Kosten. Die azeotrope Trocknung ist die deutlich günstigere Variante und wurde deshalb für die weitere Methodenentwicklung für Urin eingesetzt. Bei dotierten Wasserproben liegt die Wiederfindungsrate bei der azeotropen Trocknung für DMP und DEP etwas über 60%, bei dotierten Urinproben dagegen deutlich über 80%. Offensichtlich verringert die Urinmatrix die Absorption der Dialkylphosphate an das Glasgefäß.

6.2.3 Auswahl der Chromatographie und Detektion der Dialkylphosphate

Für die Detektion der derivatisierten Dialkylphosphate ergaben sich mehrere Möglichkeiten. Weil die dargestellten Derivate alle flüchtig sind, können die in der Gaschromatographie üblichen Detektionsverfahren verwendet werden. Sofern wenig Interferenzen in der Chromatographie vorliegen, kann die Erfassung mit einem FID vorgenommen werden. Der FID ist ein Detektor mit geringer Selektivität und registriert alle organischen Verbindungen, die in der Wasserstoff/Luft Flamme verbrennen. **Blair und Roderick (1976)** bestimmten DMP aus fünf Millilitern Urin mittels FID und erreichten eine Nachweisgrenze von etwa 5ng/ml. DMP eluierte vor den anderen Dialkylphosphaten in der Gaschromatographie. Auch Störsubstanzen erschienen aus der Urinmatrix später, so dass der FID für die Bestimmung in diesem Fall völlig ausreichend war.

Eine selektivere und empfindliche Detektionsmöglichkeit stellt der Elektroneneinfangdetektor (ECD) dar. Dieser Detektor registriert insbesondere Halogenverbindungen. **Fenske und Leffingwell (1989)** bestimmten DMTP und DMDTP im Urin nach einer Pentafluorbenzylierung. Sie erreichten bei einem Probeneinsatz von einem Milliliter Urin Nachweisgrenzen von 14ng/ml für DMTP und 25ng/ml für DMDTP. Die Nachweisgrenzen konnten offenbar durch die Einführung einer halogenierten Benzylgruppe nicht signifikant herabgesetzt werden. Die Ursachen waren vermutlich ebenfalls derivatisierte Substanzen aus dem Urin, welche vom ECD erfasst wurden. Dadurch wurde das Signal-Rausch-Verhältnis verschlechtert und die Selektivität für die Alkylphosphate ging verloren.

Dieses Problem kann bei den Derivaten der Dialkylphosphate umgangen werden, indem ein flammenphotometrischer Detektor eingesetzt wird. Dieser reagiert spezifisch auf Stickstoff und Phosphor im Molekül. **Aprea et al. (1996)** derivatisierten die Dialkylphosphate ebenfalls mit Pentafluorbenzylbromid. Die Pentafluorbenzylgruppe wurde vom Flammenphotometrischen Detektor (FPD) unterdrückt und das in der Dialkylphosphorsäure enthaltene Phosphat selektiv erfasst. Damit erzielten die Autoren eine Nachweisgrenze für alle Dialkylphosphate im Urin von 2-3ng/ml. Die eingesetzte Urinmenge betrug zwei Milliliter.

Vergleichbare Nachweisgrenzen erreichten auch **Hardt und Angerer (2000)** mittels massenselektiver Detektion. Sie mussten zwar fünf Milliliter Urin für die Aufarbeitung einsetzen, erhielten dafür aber die Molekülonen der Dialkylphosphatderivate zur Identifizierung. Der massenselektive Detektor (MSD) macht es möglich, eine Substanz nicht nur über die Retentionszeit zu ermitteln. Darüber hinaus liefert er ein Massenspektrum, welches (fast) unabhängig von Matrixeinflüssen einen Analyten identifiziert.

Neben der Gaschromatographie besteht auch die Möglichkeit, die Dialkylphosphate mittels HPLC und den entsprechenden Detektorsystemen zu bestimmen. **Bardarov und Mitewa (1989)** zeigten die Möglichkeit einer Bestimmung von pentafluorbenzylisiertem DMP mittels HPLC-UV. Nicht derivatisiert konnten nur die Thio- und -Dithioalkylphosphate mittels HPLC-ECD detektiert werden. Die Oxidation von DMP und DEP war nicht mehr möglich.

Die Abbildung 91 zeigt eine HPLC-Trennung der benzylierten Dialkylphosphate über Benzylbromid und Diazotoluol. Auf einer Umkehrphase (C-18, endcapped) sind die Analyten mit Hilfe eines Gradienten gut voneinander getrennt. Detektiert wurden die Analyten mit einem Massenspektrometer des Typs LCQDuo (Thermo-Finnigan).

Auffällig war die Signalstärke des Dithiodiethylphosphats im Vergleich zu den anderen Dialkylphosphaten. Verantwortlich war die gewählte Ionisierung. Bei der Gradientenanalyse mittels LC nahm der Anteil des organischen Lösungsmittels zeitabhängig zu. Je größer der organische Anteil im Eluenten wurde, desto leichter ließ sich das Laufmittel im APCI verdampfen. Dadurch wiederum verlief die Ionisierung besser, und die Signalintensitäten später eluierender Substanzen nahmen zu. Aufgrund der energiearmen Ionisierung im HPLC-APCI-Modus wurden vor allem Molekülionen gebildet. Eine signifikante Fragmentierung fand nicht statt. Für die Methodenentwicklung zur Bestimmung der Dialkylphosphate im Urin wurde die Gaschromatographie mit MSD ausgewählt. Die klassischen Detektionsverfahren (FID, ECD, FPD) erlauben die Zuordnung von Signalen im Chromatogramm nur über die Retentionszeiten und bleiben damit zu unspezifisch. Das LC/MS Verfahren war eine Alternative, jedoch hätte man auf das Spektrum der Fragmentionen verzichten müssen. Diese wiederum sind sehr typisch für jeden einzelnen Analyten im GC-EI-Modus, weshalb die GC/MS für die Qualifizierung vorteilhafter ist.

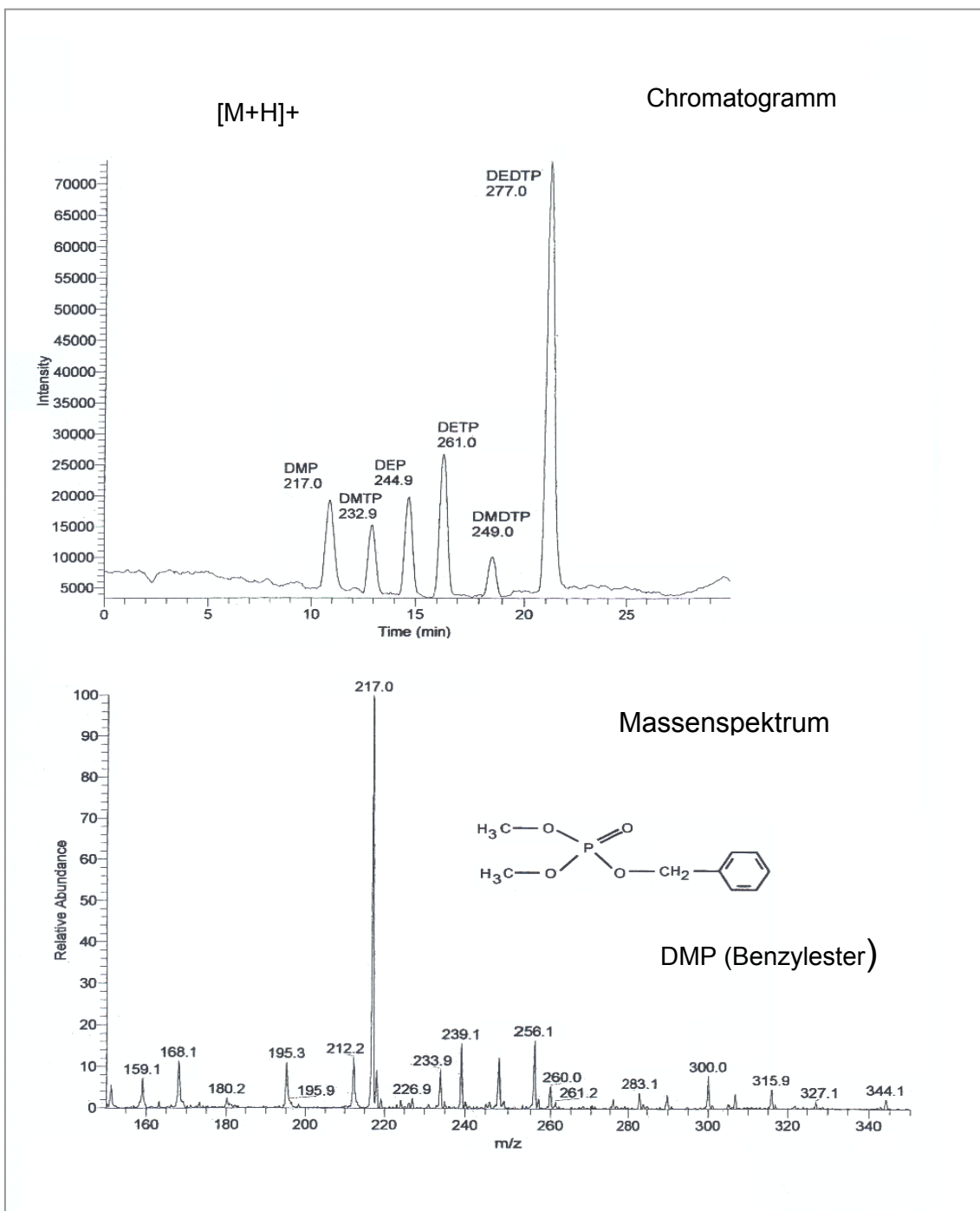


Abbildung 91: Trennung benzylierter Dialkylphosphate mittels LC/MS

6.2.4 Bestimmung der Dialkylphosphate im Urin mittels GC/MS

Ziel dieser Untersuchungen war es, eine Methode zu erstellen, welche eine möglichst schnelle Bestimmung von Dialkylphosphaten im Urin bei Patienten mit Verdacht auf eine Organophosphat-Intoxikation ermöglicht.

Mit der für diese Arbeit entwickelten Methode ist nur ein Probeneinsatz von 250µl Urin erforderlich, welcher mit 750µl Isopropanol bei 65°C unter Stickstoff innerhalb von 15 Minuten trocken ist. Aufgrund der niedrigen pKs-Werte (1-2) ist eine alkalische Einstellung des Urins nicht notwendig. Die Dialkylphosphorsäuren liegen als Salze vor, und signifikante Analytverluste wurden während der azeotropen Trocknung nicht beobachtet. Die Isolierung der Analyten wurde mittels azeotroper Trocknung durchgeführt. Flüssig-Flüssig- und Festphasenextraktionen ergaben unzureichende Wiederfindungsraten für DMP und DEP. Bisher wurden große Lösungsmittel- oder Probenvolumina eingesetzt, die nur mit erheblichem Zeitaufwand reduziert werden konnten.

Diazoalkane sind bekannt als gute Alkylierungsreagenzien für Dialkylphosphate. Diese kurzkettigen Alkylderivate sind aber sehr flüchtig und erschweren somit die verlustfreie Aufarbeitung und gaschromatographische Trennung. Mit Diazoarylmethanen lassen sich schwerer flüchtige Benzylester herstellen.

Für die Umsetzung der schwefelhaltigen Dialkylphosphate eignen sich auch Halogenaromaten, wie z.B. Benzylbromid oder Pentafluorbenzylbromid. Die Reaktion ist innerhalb von 30 Minuten bei geringen Temperaturen (< 70°C) abgeschlossen. Für DMP und DEP sind aber bei gleichbleibender Reaktionszeit höhere Temperaturen erforderlich, bei denen die Thio- und Dithioalkylphosphate nicht stabil bleiben. Die Kombination beider Reagenzien in einer Aufarbeitung ermöglicht eine effiziente Derivatisierung der Analyten. Der Einsatz von 250µl Urin reduziert die Interferenzen in der Chromatographie besonders dann, wenn eine Reinigung des Extraktes durch Kieselgel erfolgte. Trotz des kleinen Probenvolumens konnte auf diese Weise die Nachweisgrenze selbst für die Molekülonen mittels GC/MS von 3 -6 ng/ml Urin gesenkt werden. Die Methode eignet sich für die quantitative Bestimmung von Alkylphosphaten im Urin. Der Zeitbedarf für die gesamte Analyse - Isolierung, Derivatisierung, Aufreinigung mittels Kieselgel und GC/MS-Messung - der Analyten beträgt ca. 2,5 Stunden. Damit ergibt sich die Möglichkeit, eine Organophosphat-Intoxikation bei klinischen Fällen in vertretbarer Zeit zu diagnostizieren.

Von 1982 bis 2001 wurden insgesamt fünfzehn Urinproben asserviert. Sie stammen von Patienten oder Todesfällen mit Verdacht auf eine Organophosphat-Intoxikation. In allen Proben wurde Dimethylphosphat und in 13 Fällen Diethylphosphat nachgewiesen. Damit wird deutlich, wie wichtig der Nachweis der schwefelfreien Dialkylphosphate DMP und DEP ist. Aufgrund der Oxidation der intakten Thio- und Dithiodialkylphosphat-Insektizide zu den korrespondierenden Oxo-Phosphaten ist auch bei einer Exposition mit diesen Organophosphaten mit dem Auftreten von DMP oder DEP zu rechnen.

Ähnlich häufig waren die Thioalkylphosphate in den untersuchten Urinproben vertreten. In zehn Fällen wurden Dimethylthiophosphat und in dreizehn Fällen Diethylthiophosphat nachgewiesen. Nur in einem Fall konnte eine Dithiophosphorsäure, das Dimethyldithiophosphat, nachgewiesen werden. In demselben Urin wurden auch entsprechend DMTP und DMP als Metaboliten gefunden. Die ermittelten Werte reichten in den asservierten Fällen von 41ng/ml bis zu 27,8µg/ml. Die Nachweisgrenze von 3-6ng/ml Urin in der angewendeten Methode erscheint völlig ausreichend für die Bestimmung von Dialkylphosphaten im Urin. Die Möglichkeit Dialkylphosphate auch nach 10 bis 20 Jahren noch im biologischen Material nachweisen zu können, belegt die Stabilität dieser Verbindungen.

6.3 Bestimmung der intakten Organophosphate im Blut

Leichenblut wurde mit den Organophosphaten Parathion, Bromophos, Chlorpyrifos, Chlorfenvinphos und Fenthion dotiert. Anschließend wurde eine Quantifizierung der Phosphorsäureester in zeitlichen Abständen durchgeführt, um einen Zerfall von Organophosphaten im Blut festzustellen. Es wurde eine Methode zur Quantifizierung intakter Organophosphate im Blut entwickelt.

Für die Bestimmung von Phosphorsäureestern existieren Methoden für unterschiedliche Matrices. **Skerritt et al. (1992)**, **King et al. (1993)**, **Poustka et al. (1994)** und **Lagana et. al (1997)** extrahierten die Organophosphate aus Mehl und Getreide. Dabei setzten sie einen Immunoassay, die superkritische Kohlendioxidextraktion (SFE) oder eine modifizierte XAD-Phase (LiChrolut-EN) mit anschließender GC- oder HPLC-Bestimmung ein. Hierbei waren hohe Probeneinsätze erforderlich oder die Nachweisgrenzen lagen für einzelne Organophosphate weit über 50ng/g.

Mallet und Mallet (1989) und **Driss und Bouguerra (1996)** untersuchten die Isolierung aus Wasser mittels Festphasen- und Flüssig-Flüssig-Extraktion.

Als Lösungsmittel wurden Hexan, Dichlormethan und Ethylacetat eingesetzt. Zur Extraktion über die Festphase diente das Polymerharz XAD oder eine C-18 Umkehrphase. Mit Hilfe der thermoionischen Detektion (TSP) konnten Nachweisgrenzen von 7-30ng/ml Wasser erreicht werden.

Im Gegensatz zu den bisher genannten Autoren bestimmten **Vreuls et al. (1996)** und **Cabras et al. (1997)** Organophosphate in reinen Fettproben, wie z. B. Olivenöl. Zur Trennung der Pesticide und Fettsäuren setzten sie die Gelpermeationschromatographie ein oder extrahierten Olivenöl mit ACN.

Hernandez et al. (1996) trockneten homogenisierte Krebstiere mit Natriumsulfat und extrahierten anschließend die Pestizide mit einem Gemisch aus ACN und Aceton. Das Lösungsmittelgemisch wurde verdampft und der fettige Rückstand über Kieselgel fraktioniert. Bei einem Probeneinsatz von 5g betrug die Wiederfindungsrate der Phosphorsäureester deutlich über 80%. Mit Hilfe der aufwendigen Aufarbeitung konnten sehr niedrige Nachweisgrenzen von 0,2-1ng/g erzielt werden.

Blut enthält Proteine und Fette als Matrixbestandteile. Die Proteinmatrix ist ohne Schwierigkeiten über eine Flüssig-Flüssig- oder Festphasenextraktion zu beseitigen. Sollen Fette aus Blut bzw. Serum zu entfernen, so kann man die Probe alkalisch einstellen. Dabei werden die freien Fettsäuren in Form ihrer Carboxylate mittels Flüssig-Flüssig- oder Festphasenextraktion entfernt.

Bei den Phosphorsäureestern besteht bei extremen pH-Werten die Gefahr der Hydrolyse, so daß für die Extraktion für diese Arbeit mit Hilfe eines Phosphatpuffers ein pH-Wert von 6,8-6,9 eingestellt wurde. Für die Extraktion standen keine apparativ aufwendigen Systeme wie SFE oder GPC zur Verfügung. Wie sich zeigte, waren Aufarbeitungen dieser Art für die Bestimmung der Organophosphate im Serum auch nicht notwendig, weil die Detektion mittels GC/MS erfolgte. Die oben genannten Autoren setzten keinen MSD ein und waren deshalb auf eine effizientere Probenaufarbeitung angewiesen.

Im dotierten Leichenblut zerfielen intakte Organophosphate. Weil sich in der Literatur keine erheblichen Unterschiede zwischen Flüssig-Flüssig- und Festphasenextraktion in Bezug auf die Wiederfindungsraten ermitteln ließen, wurden die Serumproben nur mit Diethylether extrahiert. Die Bestimmung mittels GC/MS ermöglicht, zwischen den Insektiziden und Matrixbestandteilen zu unterscheiden.

6.4 Aryldiazomethane

Für die gaschromatographische Analytik der Dialkylphosphate ist eine Derivatisierung erforderlich, um die Verflüchtigung dieser Substanzen zu ermöglichen.

Dialkylphosphorsäuren wurden bisher nur mit kurzkettigen Diazoalkanen derivatisiert. Bei diesen Untersuchungen erwiesen sich Diazoverbindungen als sehr effektive Reagenzien zur Alkylierung der Dialkylphosphorsäuren. Alkylderivate sind aber sehr flüchtig. Daraus ergaben sich hohe Verluste bei der Aufarbeitung und schlechte Trenneigenschaften in der Gaschromatographie.

Aryldiazomethane wurden bisher nicht verwendet. Entsprechende Arylderivate der Dialkylphosphorsäuren sind schwerflüchtig und gaschromatographisch einfach zu trennen.

Hantzsch und **Lehmann (1902)** stellten erstmals Phenyldiazomethan (Diazotoluol) dar, erhielten aber kein reines Produkt. Sie ließen Kaliumhydroxid auf Nitrosobenzylurethan einwirken und erhielten somit ein sehr unbeständiges benzylazosaures Kaliumsalz. **Mc Kay et al. (1950)** erhielten Phenyldiazomethan über alkalische Hydrolyse des 1-Benzyl-1-nitroso-3-nitroguanidins. Alternativ stellten **Yates** und **Shapiro (1958)** Phenyldiazomethan aus Azibenzil her. Hierfür war es erforderlich, Azibenzil herzustellen. Allerdings bereitete die quantitative Entfernung des Quecksilbers aus dem Rohprodukt Schwierigkeiten.

Die am häufigsten eingesetzte Ausgangsverbindung für die Synthese von Phenyldiazomethan ist Benzaldehydhydrazon. Es kann aus Hydrazin und Benzaldehyd gewonnen werden (Abbildung 92).

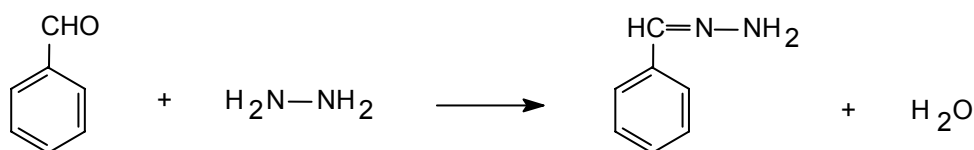


Abbildung 92: Hydrazondarstellung aus Hydrazin und Aldehyd

Staudinger und **Gaule (1916)** und **Gutsche** und **Jason (1956)** oxidierten das Hydrazon mit Hilfe von Quecksilber(II)oxid, um Diazotoluol zu erhalten (Abbildung 93).

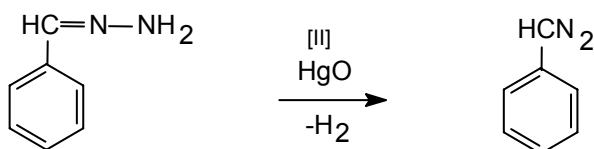


Abbildung 93: Oxidation des Hydrazons zum Diazotoluol

Bamford und **Stevens** (1952), **Farnum** (1963) und **Closs** und **Moss** (1964) verwendeten nicht Hydrazin sondern Toluolsulfonsäurehydrazid für die Darstellung des Benzaldehydhydrazons (Abbildung 94), um es anschließend zum Phenyldiazomethan zu hydrolysieren.

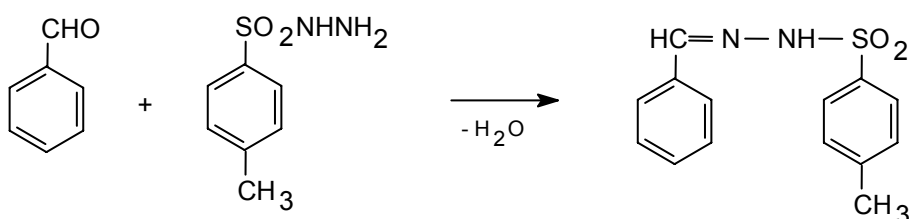


Abbildung 94: Hydrazondarstellung aus Aldehyd und Toluolsulfonsäurehydrazid

p-Toluolsulfonsäurehydrazid hat gegenüber Hydrazin den Vorteil, dass nur eine NH_2 -Gruppe zur Reaktion mit dem Aldehyd zur Verfügung steht. Beim Hydrazin können beide Amino-Gruppen zum Aldazin reagieren und das Hydrazon verunreinigen bzw. die Ausbeute verringern (Abbildung 95).



Abbildung 95: Aldazinbildung bei der Hydrazondarstellung mit Hydrazin

Eine weitere Möglichkeit, Phenyldiazomethan aus dem Hydrazon freizusetzen, liegt in der pyrolytischen Zersetzung. **Kaufmann et al. (1965)** wollten auf diese Weise die Ausbeuten deutlich erhöhen und die schwierige, destillative Trennung von Lösungsmitteln vermeiden. Die Pyrolyse von Phenyldiazomethan ergab allerdings nur eine Ausbeute von 24%.

Jonczyk und Wlostowska (1978) verwendeten erstmalig ein Zweiphasen-System für die Freisetzung der Diazoverbindungen aus ihren Hydrazonen. Sie lösten hierfür das Hydrazon in Dioxan und rührten diese Phase bei 80-90°C gegen eine 50%ige Natronlauge. Phenyldiazomethan konnte so mit 66% Ausbeute isoliert werden.

Wulfman (1988) verminderte die Konzentration der Natronlauge auf 14%, nahm als organisches Lösungsmittel Toluol und führte die Zweiphasenhydrolyse in Gegenwart von Benzyltriethylammoniumhydroxid als Phasentransferkatalysator durch. Der Katalysator ermöglichte die Hydrolyse bereits bei 65°C. Aufgrund der veränderten Bedingungen war es möglich, die Bildung der korrespondierenden Azine (Abbildung 96) erheblich herabzusetzen und die Ausbeute für Phenyldiazomethan auf 96% zu erhöhen.

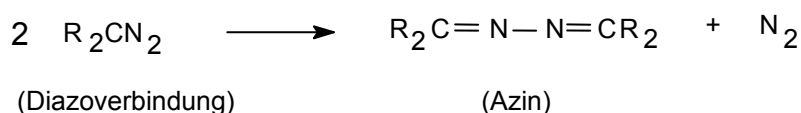


Abbildung 96: Azinbildung aus Diazoverbindungen

Für ein analytisch arbeitendes Labor wurden für diese Arbeit möglichst einfache präparative Schritte ausgewählt. Die Hydrazone wurden durch direkte Umsetzung der Aldehyde mit p-Toluolsulfonsäurehydrazid erhalten. Auf den Einsatz von Hydrazin zur Hydrazondarstellung wurde aufgrund der hohen Toxizität des Hydrazins und der möglichen Verunreinigung mit Azinen im Hydrazon verzichtet. Die Freisetzung der Diazoarylmethane erfolgte nach **Wulfman (1988)** mit dem Phasentransferkatalysator Benzyltriethylammoniumchlorid. Die erwähnten destillativen oder pyrolytischen Verfahren sind für ein analytisches Labor entweder apparativ zu aufwendig oder ergeben zu geringe Ausbeuten.

Darüber hinaus würden die Diazoverbindungen isoliert und nicht in Lösung vorliegen, das wiederum erschwert den Umgang mit diesen explosiven und cancerogenen Verbindungen. Die Zweiphasen-Reaktion war nach ca. 60 Minuten bei einer Temperatur von 65°C abgeschlossen. Nach **Petit et al. (1994)** lässt sich die Freisetzung in noch kürzerer Zeit (15-20 Minuten) und bei geringeren Temperaturen (40-45°C) durchführen, wenn das 2,4,6-Triisopropylbenzolsulfonylhydrazon in Gegenwart von Tetrabutylammoniumsulfat eingesetzt wird. Die 2,4,6-Triisopropylbenzolsulfonylhydrazone lassen sich nach **Cusack et al. (1976)** leicht in Methanol oder Tetrahydrofuran darstellen. Das entsprechende Hydrazid erhielten sie über das Sulfonsäurechlorid und Hydrazin.

Mittlerweile ist das 2,4,6-Triisopropylbenzolsulfonylhydrazid kommerziell erhältlich. Da es aber ein sehr teures Reagenz ist und die Diazoarylmethanolösungen haltbar sind (> 4 Wochen), war es nicht nötig, die alkalische Hydrolyse der Hydrazone häufig durchzuführen. Der zeitliche Gewinn war zu vernachlässigen, und es wurde deshalb auf den Einsatz von 2,4,6-Triisopropylbenzolsulfonsäurehydrazid für diese Arbeit verzichtet.

6.5 Analytik der phenolischen und alkoholischen Hydrolyseprodukte der Organophosphate

6.5.1 Quantitative Bestimmung von p-Nitrophenol und entsprechenden Konjugaten im Blut

p-Nitrophenol und die entsprechenden Glucuronid- und Sulfatkonjugate sind kommerziell als Referenzsubstanzen erhältlich. Deshalb konnte für p-Nitrophenol eine quantitative Methode erstellt werden. Für die abspaltbaren Gruppen der Organophosphate Fenthion, Bromophos, Chlorpyrifos und Chlorfenvinphos sind Standards nicht verfügbar.

p-Nitrophenol tritt als Hydrolyseprodukt bei Parathion-Vergiftungen auf. In vivo wird p-Nitrophenol teilweise zu p-Nitrophenolsulfat und p-Nitrophenolglucuronid konjugiert. Für die Bestimmung des gesamten p-Nitrophenols ist es deshalb erforderlich, die Konjugate direkt neben dem freien p-Nitrophenol zu bestimmen oder die Bestimmung des p-Nitrophenols vor und nach enzymatischer Spaltung der Konjugate vorzunehmen. Die Bestimmung von p-Nitrophenol wurde ursprünglich dünnschichtchromatographisch durchgeführt. **Gessner und Acara (1970)** trennten ortho-, meta- und para-Nitrophenol auf Kieselgel mit einem Gemisch aus Diethylether und Ligroin. Aus Leberhomogenaten isolierten sie die Analyten bei einem pH-Wert von 7,4 mit Diethylether und quantifizierten anschließend die abgetragenen Komponenten einzeln mittels Photometrie.

Auch **Quebbemann und Anders (1973)** trennten Phenol, p-Nitrophenol und die entsprechenden Konjugate dünnschichtchromatographisch. Die so getrennten Verbindungen wurden abgetragen und darauffolgend per HPLC vermessen, wobei die Sulfatkonjugate auf einem schwachen und die Glucuronide auf einem starken Ionenaustauscher analysiert wurden.

Michalke (1983) bestimmte p-Nitrophenol vor und nach enzymatischer Spaltung der Konjugate im Blut und Urin in einem Fall mit überlebter Parathion-Vergiftung mittels HPLC. Dabei stellte er fest, dass im Blut bis über 85% des gesamten p-Nitrophenols als Sulfatkonjugat vorlagen.

Auch im Urin war der Anteil des Sulfatkonjugats höher als der des Glucuronids und des freien p-Nitrophenols. Die Trennung mittels HPLC führte Michalke auf einer C-18 Umkehrphase mit einem ACN-Phosphatpuffer (pH-Wert: 2,3) durch. Die Detektion erfolgte im UV-Bereich bei 315nm.

Aufgrund der hohen Wasserlöslichkeit der Konjugate ist eine Extraktion aus Blut und Urin außerordentlich schwierig. Eine Methode mittels Festphasenextraktion für p-Nitrophenol neben seinen Konjugaten wurde von **Oneto et al. (1995)** aufgestellt.

Sie extrahierten p-Nitrophenol und die Konjugate simultan auf einer C-18 Umkehrphase unter Verwendung eines Phosphatpuffers bei einem pH-Wert von 2,75. Dabei gaben sie eine Wiederfindungsrate von 95% für p-Nitrophenol und 80% für die Konjugate an. Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Extraktion auf einer SPE C-18 Umkehrphase unter den angegebenen Bedingungen zwar für p-Nitrophenol, aber nicht für die korrespondierenden Konjugate bestätigt werden. **Diamond und Quebbemann (1979)** verdünnten lediglich das Serum mit Wasser, um p-Nitrophenol und die Konjugate anschließend mittels HPLC auf einer Umkehrphase zu trennen. **Morris und Hansel (1990)** fällten das Protein mit ACN und analysierten die Probe ebenfalls mittels Umkehrphasen-HPLC.

Die Trennung der Konjugate mittels HPLC war auf einer Umkehrphase, wie z. B. C-18, nur schlecht möglich. Die stark hydrophilen Eigenschaften ließen das Sulfat und auch das Glucuronid sehr früh eluieren, wodurch eine Trennung von Matrixsubstanzen erschwert wurde. Durch Zusatz eines Gegenions in Form von quartären Ammoniumsalzen ließ sich die Retentionszeit des stark sauren Sulfatkonjugats verlängern und die Trennung von Matrixsignalen ermöglichen. Das Glucuronid eluierte aufgrund der fehlenden Affinität zur quartären Ammoniumverbindung auch unter diesen Bedingungen sehr früh.

Trotz günstiger Wellenlängenbereiche (Maxima: 310nm) war es nicht möglich, das Glucuronid ausreichend von Störsignalen aus der Matrix zu Beginn der Chromatographie abzutrennen.

Auch die LC/MS-Detektion konnte dieses Problem nicht beheben. Die gemeinsam mit dem Glucuronid eluierende Matrix beeinflusste die Ionisierung, deshalb war die Bestimmung des p-Nitrophenolglucuronids nicht ausreichend reproduzierbar.

Eine Auflösung des p-Nitrophenols und seiner Konjugate war sehr gut auf Kieselgel möglich. Die Dünnschichtchromatographie der einzelnen Komponenten und die anschließende Bestimmung mittels Photometrie ist aber sehr zeitaufwendig. Weil aber Abtragungen häufig nicht quantitativ ausfallen, ist mit Verlusten zu rechnen.

Aufgrund der Trennungsschwierigkeiten auf Umkehrphasen wurde das freie p-Nitrophenol direkt und das gebundene indirekt nach hydrolytischer Spaltung der Konjugate bestimmt. Die Extraktion erfolgte Flüssig-Flüssig und die Detektion per LC/DAD.

6.5.2 Qualitative Bestimmung von Hydrolyseprodukten

Während der Nachweis der Dialkylphosphorsäuren den Hinweis auf eine Intoxikation erbringt, kann erst die Auffindung des intakten Triesters oder der Nachweis der abgespaltenen aciden Komponente die Grundlage für die toxikologische Bewertung liefern.

Neben Parathion wurden die Hydrolyseprodukte von Fenthion, Bromophos, Chlorpyrifos und Chlorfenvinphos untersucht. Um die phenolischen oder alkoholischen Gruppen zu identifizieren, wurden die intakten Organophosphate hydrolysiert und anschließend mittels GC/MS und LC/MS/DAD analysiert. Wenn möglich, wurden die Hydrolyseprodukte derivatisiert, um ihre Identität weiter zu verifizieren. Mit Organophosphaten dotiertes Leichenblut wurde nach sieben Tagen auf die abgespaltenen Gruppen hin untersucht. Da im post-mortem-Material keine Konjugatbildung stattfindet, entfiel die enzymatische Spaltung, welche bei in vivo Proben erforderlich wäre.

In authentischen Proben können neben den nachgewiesenen phenolischen und alkoholischen Gruppen noch weitere Stoffwechselprodukte auftreten. Bei Parathion ist der Metabolit Paroxon und das Hydrolyseprodukt p-Nitrophenol zu erwarten. Nach Reduktion des p-Nitrophenols ist auch p-Aminophenol als mögliches Nebenprodukt denkbar. p-Aminophenol wiederum kann nach erfolgter Acetylierung als entsprechendes Derivat vorliegen.

Fenthion wird zu Fenoxon und den entsprechenden Sulfoxiden und Sulfonen oxidiert (**Huang und Maburry, 2000**). Die acide Gruppe 3-Methyl-4-Methylthiophenol kann deshalb ebenfalls als Sulfoxid und Sulfon in Erscheinung treten.

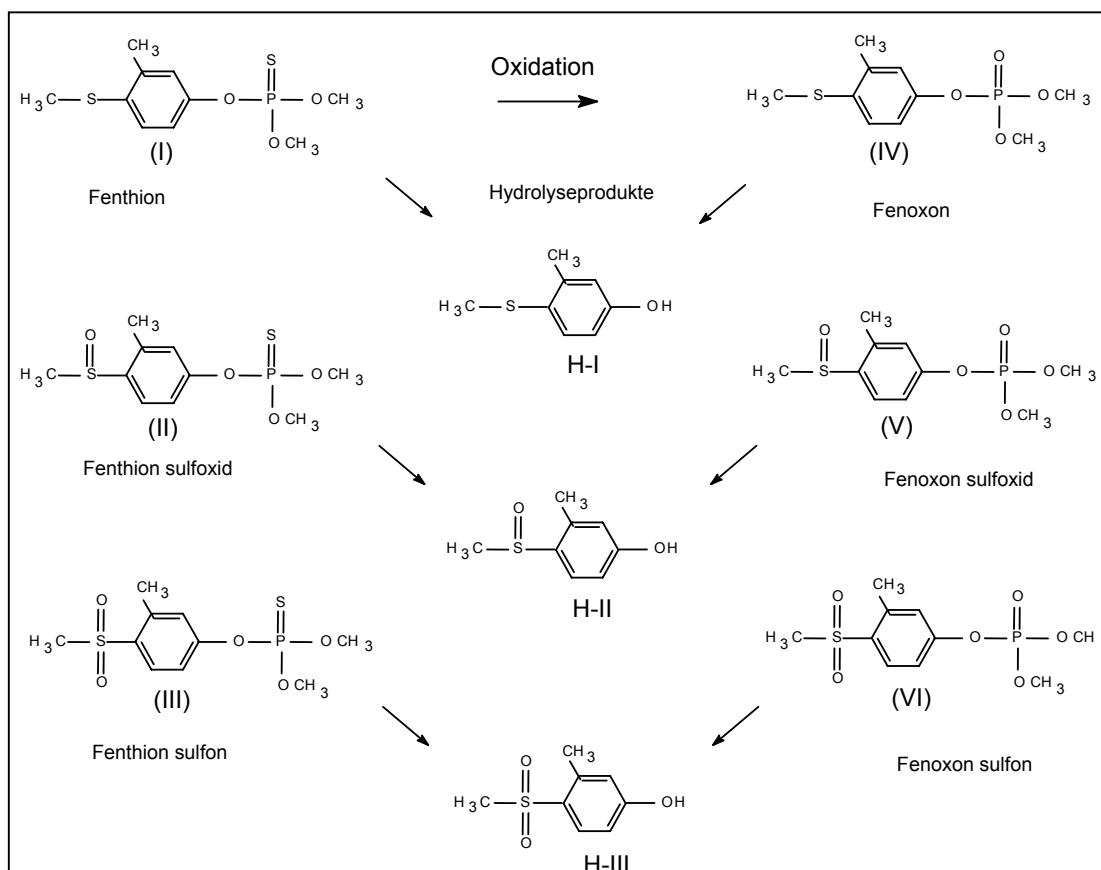


Abbildung 97: Fenthion (I) und die Metaboliten (II-VI) und Hydrolyseprodukte (H-I - H-III), Cabras et al., 1993

Wright und Riner (1979) konnten nach Vergabe von Fenthion an Rinder intaktes Fenthion und die Oxon-, Sulfoxid-, und Sulfonmetaboliten in deren Fettgewebe nachweisen. Nur das Fenoxon-sulfoxid und Fenoxon-sulfon wurden, wahrscheinlich aufgrund der leichten Hydrolysierbarkeit dieser Metaboliten und deshalb fehlender Einlagerung, nicht bestimmt. **Knowles und Arthur (1961)** konnten dagegen im Rindergewebe neben dem Fenthion und Fenoxon das Fenoxon-sulfoxid nachweisen. **Brady und Arthur (1961)** erfassten die Metaboliten II – VI in Ratten und Insekten und **Podhorniak et al. (2001)** auch in Früchten und Gemüse. Deshalb ist bei einer Fenthion-Exposition/Intoxikation im biologischen Material neben dem Hydrolyseprodukt H-I auch mit den sulfoxidierten Phenolen H-II und H-III zu rechnen (Abbildung 97). In den hier durchgeführten Untersuchungen wurde Fenthion und das Hydrolyseprodukt H-I nachgewiesen, weitere Metaboliten wurden wahrscheinlich aufgrund der kurzen Hydrolysezeit im dotierten Leichenblut (7 Tage) nicht erfaßt.

Bei Chlorpyrifos ist, wie bei Parathion und Fenthion, die Oxonverbindung ein Metabolit. Weil das Chlorpyrifos-oxon gegenüber dem Chlorpyrifos viel leichter hydrolysiert, konnten **Abu-Qare** und **Abou-Donia (2001)** das Oxon im Rattenblut nicht nachweisen. Dagegen fand sich das gemeinsame Hydrolyseprodukt 3,5,6-Trichlor-2-pyridinol (TCP) im Urin. **Jitsunari et al. (1989)** wiesen TCP mittels GC im Urin bei Arbeitern nach, welche Chlorpyrifos in der Schädlingsbekämpfung einsetzten. **Aprea et al. (1999)** untersuchten mit einer ähnlichen Methode die Belastung der italienischen Bevölkerung. Dabei lagen bei 88% der untersuchten Fälle die TCP-Konzentrationen über der Nachweisgrenze von 1,2µg/L Urin. **Nolan et al. (1984)** untersuchten mittels TCP die Pharmakokinetik von Chlorpyrifos im Menschen. Metaboliten neben TCP sind bisher nicht diskutiert worden.

Bei den für diese Arbeit durchgeführten Analysen wurden, abgesehen von p-Nitrophenol, Konjugationen und sekundäre Metabolisierungen der aciden Komponente nicht berücksichtigt, weil im post mortem Material mit einer Veränderung der aciden Gruppe nicht zu rechnen ist. Bei in vivo Proben hingegen können Veränderungen der funktionellen Gruppen durch Glucuronidierung, Sulfatierung, Reduktion oder Oxidation auftreten. Bei weiterführenden Untersuchungen zur Auffindung der Esterkomponenten wäre der Blick deshalb nicht nur auf die unveränderte acide Gruppe zu richten.

7 Zusammenfassung

Für die Erkennung einer Organophosphat-Intoxikation gibt es bisher nur eine unspezifische, enzymatische Methode. Diesem Verfahren liegt die verminderte Aktivität der unspezifischen Cholinesterase (ChE) zugrunde. Der Nachweis des Organophosphats selbst ist schwierig, wenn es sich um sehr geringe Konzentrationen handelt und das Organophosphat nicht bekannt ist. Insbesondere die Oxo-Phosphate sind bei physiologischen pH-Werten instabil und häufig nicht quantitativ extrahierbar. In forensischen Fällen muß außerdem bedacht werden, dass die Organophosphate postmortal zerfallen. Deshalb sollte eine Methode entwickelt werden, die es gestattet zu entscheiden, ob überhaupt eine Exposition mit Organophosphaten in Betracht kommt. Dies geschieht durch die Analytik der stabilen Dialkyl-, Dialkylthio- und Dialkyldithiophosphorsäuren. Die Analyse sollte in möglichst kurzer Zeit abgeschlossen sein. Nur dann ist sie auch in der Notfallmedizin einsetzbar. Die vorliegende Arbeit kann in drei aufeinanderfolgende Bereiche gegliedert werden.

Im ersten Teil mußten die nachzuweisenden Metaboliten als Referenzsubstanzen hergestellt werden. Aufgrund fehlender kommerzieller Verfügbarkeit wurden die Salze der Metaboliten DMP, DEP, DETP, DMDTP und der interne Standard DPDTP synthetisiert. Für DMP und DEP konnten alternative Darstellungsmöglichkeiten gezeigt werden, unter anderem die Herstellung der freien Säuren.

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Derivatisierung der Dialkylphosphate, der Extraktion aus Urin und der Aufarbeitung asservierter Proben. Die Probenaufarbeitung darf in klinischen Fällen nur wenige Stunden betragen. Deshalb müssen alle Aufarbeitungsschritte in kürzester Zeit erfolgen. Bei der Derivatisierung der Dialkylphosphate wurden unterschiedliche Reagenzien geprüft, die eine Bestimmung mittels GC oder HPLC ermöglichen. Dabei erwiesen sich Halogenaromaten für die Thio- und Dithiodialkylphosphate und eine Reihe von Diazoverbindungen für alle Dialkylphosphorsäuren als sehr effektiv. Thiodialkylphosphate isomerisieren aber bei der Reaktion mit Diazoverbindungen. Die Folge sind jeweils zwei Signale in der Chromatographie für DMTP und DETP. Durch den aufeinanderfolgenden Einsatz beider Reagenzien wird das Auftreten der Isomere vermieden. Die Reaktionszeit liegt unter 30 Minuten. Als Halogenaromate eignen sich Benzylbromid und Pentafluorbenzylbromid.

Von den möglichen Diazoarylmethanen eignen sich für die GC die 4-Brombenzyl-, p-Trifluormethyl-, Pentafluorbenzyl-, 2-Chlorbenzyl und Benzylderivate und für die HPLC vor allem die Naphthylmethylderivate.

Bei Verwendung der GC/MS im SIM-Mode lassen sich die Dialkylphosphorsäuren hoch empfindlich nachweisen, so dass für die Erfassung von nur 3-6ng/ml Urin lediglich 250µl Urin benötigt werden. Dies ist von großem Vorteil, weil auf aufwendige und schlecht reproduzierbare Extraktionen verzichtet und die Urinprobe schnell durch azeotrope Destillation getrocknet werden kann.

Verunreinigungen durch Matrixbestandteile lassen sich effizient durch die Chromatographie der Derivate auf Kieselgel abtrennen. Die gesamte Analysenzeit beträgt weniger als 3 Stunden.

Zur Bestimmung der Dialkyl-, Dialkylthio- und Dialkyldithiophosphate im Urin wurde eine Screeningmethode und eine Methode zur Quantifizierung mittels GC/MS entwickelt und validiert. Das geringe Probenvolumen und die kurze Derivatisierungszeit ermöglichen die Analytik für klinische Fälle innerhalb von 3 Stunden. In authentischen Urinproben, welche in den letzten zwanzig Jahren asserviert wurden, fanden sich vor allem Di- und Thiodialkylphosphate. Dieser Beleg für die Stabilität im biologischen Material ist forensisch von Bedeutung. So lassen sich Organophosphat-Intoxikationen auch nach Jahren noch nachweisen.

Der dritte Teil dieser Arbeit zeigte anhand dotierter Urinproben für einige Phosphorsäureester, dass sie im post-mortem-Material hydrolysieren und die korrespondierenden phenolischen oder alkoholischen Restgruppen nachweisbar sind. Für p-Nitrophenol, der aciden Gruppe des Parathions, wurde eine quantitative Methode entwickelt. In einer authentischen Blutprobe wurde das freie p-Nitrophenol neben dem sulfat- und glucuronidgebundenen p-Nitrophenol bestimmt. Für die aciden Gruppen der Organophosphate Fenthion, Chlorpyrifos, Chlorfenvinphos und Bromophos wurden qualitative Nachweise durchgeführt. Der Phosphorsäureester kann damit auch bei vollständig metabolisierten Organophosphaten nachgewiesen werden.

Abstract

For the detection of an organophosphate intoxication only a nonspecific enzymatic method exists. This procedure is based on the reduced activity of the nonspecific cholinesterase (ChE). The detection of intact organophosphates is difficult in very low concentrations. The oxo-phosphates are particularly unstable and difficult to extract at physiological pH values. In addition it must be considered that the organophosphates in postmortem forensic cases hydrolyze. Therefore a method should be developed to decide whether an exposition with organophosphates should be considered. This can be done by analysing the stable dialkyl-, thiodialkyl- and dithiodialkyl phosphates. The analysis should be finished as fast as possible. Only then the method is also applicable in emergency cases. This work can be divided into three successive sections.

In the first part the metabolites had to be synthesized as reference substances. As the salts of the metabolites DMP, DEP, DETP, DMDTP and the internal standard DPDTP could not be procured, they had to be prepared.

The second part of this work describes the derivatization of the alkyl phosphates, the extraction from urine and the analysis of stored samples. Sample processing in clinical cases must be finished within few hours. Therefore all clean up steps must be taken in shortest possible time. Due to the derivatization of the alkyl phosphates different reagents were investigated, which allow a detection by means of GC or HPLC. For all dialkyl phosphates diazo compounds and for the thio- and dithiodialkyl phosphates halogen aromatics are very effective reagents. Thiodialkyl phosphates isomerize during the reaction with diazo compounds. The isomerization results in two signals in the chromatography for DMTP and DETP. The occurrence of the isomers is avoided by successive application of both reagents. The reaction time is below 30 minutes. Pentafluorbenzyl -, 2-chlorbenzyl-, p-trifluormethylbenzyl, 4-bromobenzyl and benzyl derivatives are applicable for GC-detection. For HPLC naphthylmethyl derivatives are suitable. When using the GC/MS in the SIM-mode alkyl phosphates can be detected highly sensitively. For the detection of 3-6ng/ml in urine only a sample volume of 250µl is required. This is of great advantage, because without complex and hardly reproducible extraction the urine sample can be dried fast by azeotropic distillation. Contamination by matrix components can be separated efficiently by the chromatography of the derivatives on silica gel.

For the detection of alkyl phosphates in the urine a screening method and a method for quantification with GC/MS was developed and validated.

The small sample volume and the short derivatization time make analysis possible for clinical cases within 3 hours. In authentic urine samples, which were stored in the last twenty years, dialkyl-, thiodialkyl- and dithiodialkyl phosphates were detectable. This evidence for stability in the biological material is of forensic relevance. Thus organophosphat intoxications are still detectable after many years.

The third part of this work showed on the basis of spiked blood samples for some organophosphates that they hydrolyze to the corresponding phenolic or alcoholic groups in postmortem material. For p-nitrophenol a quantitative method was developed. In an authentic blood sample the free p-nitrophenol and its sulfate and glucuronid conjugates were determined. For the acid groups of the organophosphates fenthion, chlorpyrifos, chlorfenvinphos and bromophos qualitative methods were established. The intact organophosphate can thereby be detected after complete hydrolyzation.

8 Literatur

Abu-Qare AW und **Abou-Donia** MB. Quantification of nicotine, chlorpyrifos and their metabolites in rat plasma and urine using high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. B. **2001**; 295-300.

Aprea C, Sciarra G, Orsi D, Boccalon P, Sartorelli P und Sartorelli E. Urinary excretion of alkylphosphates in the general population (Italy). Sci. Total Environ. **1996**; 177: 37-41.

Aprea C, Betta A, Catenacci G, Lotti A, Magnaghi S, Barisano A, Passini V, Pavan I, Sciarpa G, Vitalone V und Minola C. Reference Values of Urinary 3,5,6-Trichloro-2-Pyridinol in the Italian Population- Validation of Analytical Method and Preliminary Results (Multicentric Study). J. of AOAC Int. **1999**; 82 : 305-311.

Arthur J, Silva de F, Bekersky I, Puglisi CV, Brooks MA, Weinfeld RE. Determination of 1,4-benzodiazepines and -diazepin-2-ones in blood by electron-capture gas-liquid chromatography. Anal. Chem. **1976**; 48 : 10-19.

Bailey JJ. Determination of aliphatic and aromatic acids by pyrolysis of their tetramethylammonium salts. Anal. Chem. **1967**; 39 (12): 1485-1489.

Bailly O und **Gaumé** J. Migration du radical phosphorique au cours de l'hydrolyse du diester méthyl- α -glycéro-phosphorique. Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des Sciences. **1934**; 198: 2258-2260.

Balarew D. Die Einwirkung von Phosphoroxychloride auf Methyl- bzw. Ethylalkohol. Z. anorg. Ch. **1917**; 101: 225-228.

Bamford WR und **Stevens** TS. The Decomposition of Toluene-p-sulphonylhydrazones by Alkali. J. Chem. Soc. **1952**; 4: 4735-4740.

Bardarov V und **Mitewa** M. High-performance liquid and gas chromatography of dialkylphosphates, dialkylthiophosphates and dialkyldithiophosphates as their pentafluorobenzyl derivatives. J. Chromatogr. **1989**; 462: 233-241.

Baynes RE und **Bowen** JM. Toxikinetics of Methyl Parathion in Lactating Goats. J. Agric. Food Chem. **1995**; 43: 1598-1604.

Blair D und **Roderick** HR. An improved method for the determination of urinary dimethyl phosphate. J. Agric. Food Chem. **1976**; 24: 1221-1223.

Blumenthal E und **Herbert** JBM. The Mechanism of the Hydrolysis of Trimethyl Orthophosphate. Trans. Faraday Soc. **1945**; 41: 611-617.

Brady UE und **Arthur** BW. Metabolism of O,O-Dimethyl O-[4-(Methylthio)-m-Tolyl] – Phosphorothioate by White Rats. J. Econ Entomol. **1961**; 54: 1232-1236.

Bravo R, Driskell WJ, Whitehead RD, Needham LL und Barr DB. Quantitation of dialkyl phosphate metabolites of organophosphate pesticides in human urine using GC-MS-MS with isotopic internal standards. J. Anal. Toxicol. **2002**; 26: 245-252.

Brokopp CD, Wyatt JL und Gabica J. Dialkyl phosphates in urine samples from pesticide formulators exposed to disulfoton and phorate. Bull. Environm. Contam. Toxicol. **1981**; 26:524-529.

Brown DM und **Osborne** GO. Phospholipids. Part II. The Stability of some Derivatives of 2-Aminoethyl Phosphate. J. Chem. Soc. **1957**: 2590-2593.

Cabras P, Garau VL, Melis M, Pirisi FM und Spanedda L. Persistence and Fate of Fenthion in Olives and Olive Products. J. Agric. Food Chem. **1993**; 41: 2431-2433.

Cabras P, Angioni A, Melis M, Minelli EV und Pirisi FM Simplified multiresidue method for the determination of organophosphorus insecticides in olive oil. J. Chromatogr. A. **1997**; 761: 327-331.

Cavalier J. Sur les diéthers phosphorique. Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des Sciences. **1898**: 1214-1215.

Cheymol J, Chabrier P, Seli M und Leduc P. Nouvelle methode de préparation des triesters mixtes de l'acide orthophosphorique. Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des Sciences. **1960**: 2573-2575.

Churchill FC, Ku DN und Miles JW. Gas-Liquid Chromatographic Inlet Block Derivatization of Organophosphorus Pesticides and Related Dialkyl Phosphorothioates. J. Agric. Food Chem. **1978**; 26: 1108-1112.

Clermont De MP. Note sur la préparation de quelques éthers. Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des Sciences. **1854**; 39: 338-340.

Closs GL und **Moss** RA. Carbenoid Formation of Arylcyclopropanes from Olefins, Benzal Bromides, and Organolithium Compounds and from Photolysis of Aryldiazomethanes. J. Am. Chem. Soc. **1964**; 86: 4042-4035.

Corina DL und **Dunstan** PM. Benzyl esters in the gas-chromatographic purification of radioactive acetic acid from bacteria, and for the possible analysis of other short-chain acids. Anal. Biochem. **1973**; 53: 571-578.

Cusack NJ, Reese CB, Risius AC und Roozpeikar B. 2,4,6-Tri-isopropylbenzenesulphonylhydrazide: A convenient source of di-imide. Tetrahedron. **1976**; 32: 2157-2162.

Creary X. Organic Synthesis. John Wiley and Sons. New York. **1986**; 64: 207-216.

Cremlyn RJW, Kenner GW, Mather J. und Todd A. Studies on Phosphorylation. Part XVI. Iodides as Debenzylation and Dealkylating Agents. J. Chem. Soc. **1958**: 528-530.

Daughton CG, Crosby DG, Garnas RL und Hsieh DPH. Analysis of phosphorus-containing hydrolytic products of organophosphorus insecticides in water. J. Agric. Food Chem. **1976**; 24: 236-241.

Diamond G und **Quebbemann** AJ. Rapid separation of p-nitrophenol and its glucuronide and sulfate conjugates by reversed-phase high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. **1979**; 177: 368-371.

Doms EK. Gaschromatographische Bestimmung der flüchtigen Fettsäuren von C₁ bis C₅ einschließlich der Milchsäure als Benzylester unter Verwendung von Phenyl Diazomethan als Benzylierungsmittel. J. Chromatogr. **1977**; 140: 29-39.

Downing DT. Methylation of fatty acids by pyrolysis of their tetramethylammonium salts in the gas chromatograph. Anal. Chem. **1968**, 40: 827-828.

Dudman CC und **Reese** CB. Preparation of Aryldiazoalkanes from 2,4,6-Triisopropylbenzenesulphonyl Hydrazones. Synthesis **1982**; 419-421.

Driss MR und **Bouguerra** ML. Solid phase extraction of organophosphorus pesticides from water using capillary gas chromatography with thermionic specific detection. J. Environ. Anal. Chem. **1996**; 65: 1-10.

Farnum DG. Preparation of Aryldiazoalkanes by the Bamford-Stevens Reaction. J. Org. Chem., **1963**; 28: 870-872.

Fenske RA und **Leffingwell** JT. Method for the Determination of Dialkyl Phosphate Metabolites in Urine for Studies of Human Exposure to Malathion. J. Agric. Food Chem. **1989**; 37: 995-998.

Foss O. Di-O-alkylmonothiophosphates and di-alkylmonoselenophosphates and the corresponding pseudohalogenes. Acta Chem. Scand. **1947**; 1: 8-31.

Fukuto TR und **Metcalf** RL, Structure and Insecticidal Activity of some Diethyl Substituted Phenyl Phosphates. J. Agric. Food Chem. **1956**; 4: 930-935.

Franklin CA, Fenske RA, Greenhalgh R, Mathieu L, Denley HV, Leffingwell JT und Spear RC. Correlation of urinary pesticide metabolite excretion with estimated dermal contact in the course of occupational exposure to guthion. J. Toxicol. Environ. Health. **1981**; 7: 715-731.

Fröbe Z, Stengl B, Drevenkar V und Deljac A. Accumulation of dialkylphosphorus anions from water by ion exchange on modified XAD-4 resin. J. Chromatogr. Sci. **1990**; 28: 269-273.

Gessner T und **Acara** M. Fast separation and estimation of isomeric mononitrophenols. Anal. Biochem. **1970**; 35: 442-449.

Greeley RH. Rapid esterification for gas chromatography. J. Chromatogr. **1974**; 88: 229-233.

Gutsche CD und **Jason** EF. Ring Enlargements. V. The Preparation of 2-Arylcycloheptanones and 2-Aryl-2-cycloheptenones. J. Am. Chem. Soc. **1956**; 78: 1184-1187.

Hantzsch A und **Lehmann** M. Über Azotate (Diazotate) der Fettreihe. Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft. **1902**; 35: 897-905.

Hardt J, Analytische Verfahren zur Bestimmung von Metaboliten insektizider Carbamate und Organophosphate in Harn: Entwicklung, Validierung und Anwendung im Rahmen arbeits- und umweltmedizinischer Untersuchungen. Dissertation. Universität Erlangen-Nürnberg: **1999**.

Hardt J und **Angerer** J. Determination of Dialkyl Phosphates in Human Urine using Gas Chromatography-Mass Spectrometry. J. Anal. Toxicol. **2000**; 24: 678-684.

Harris CR. Laboratory studies on the persistence of biological activity of some insecticides in soils. J. Econ. Entomol. **1969**; 62: 1437-1441.

Hernandez F. Comparison of cleanup techniques for simple method for analysis of selected organophosphorus pesticide residues in molluscs. J. AOAC Int. **1996**; 79: 123-131.

Hoegberg EI, and **Cassaday** JT. The reaction of O,O-dialkyl thiophosphoric acid salts with some haloacyl derivatives. J. Am. Chem. Soc. **1951**; 73: 557-559.

Huang J und **Mabury** SA. Hydrolysis Kinetics of Fenthion and its Metabolites in Buffered Aqueous Media. J. Agric. Food Chem. **2000**; 48: 2582-2588.

Indusrieverband Agrar. Wirkstoffe in Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmitteln. Physikalisch-chemische und toxikologische Daten. München: BLV Verlagsgesellschaft mbH, **2000**.

Jitsunari F, Asakawa F, Nakajima T, Shimada J und Ogata M. Determination of 3,5,6-Trichloro-2-Pyridinol Levels in the Urine of Termite Control Workers Using Chlorpyrifos. Acta Med Okayama. **1989**; 43: 299-306.

John LEST und **Lisk** DJ. Determination of Hydrolytic Metabolites of Organophosphorus Insecticides in Cow Urine Using an Improved Thermionic Detector. J. Agric. Food Chem. **1968**; 16:48-49.

Jonczyk A und **Wlostowska** J. A Simple Method for Generation of Diazocompounds in an Aqueous Two-Phase System. Synth. Commun. **1978**; 8: 569-572.

Kaufmann GM, Smith JA, Vander Stouw GG und Shechter H. Pyrolysis of Salts of p-Tosylhydrazones. Simple Methods for Preparing Diazo Compounds and Effecting Their Carbenic Decomposition. J. Am. Chem. Soc. **1965**; 87: 935-937.

King JW, Hopper ML, Luchtefeld RG, Taylor SL und Orton WL. Optimization of experimental conditions for the supercritical carbon dioxide extraction of pesticide residues from grains. J. AOAC Int. **1993**; 76: 857-864.

Knapp DR. Analytical Derivatization Reactions. John Wiley & Sons. New York: **1979**.

Knowles CO und **Arthur** BW. Metabolism of and Residues Associated with Dermal and Intramuscular Application of Radiolabeled Fenthion to Dairy Cows. J. Econ. Entomol. **1961**; 59: 1846-1852.

Lagana A, D'Ascenzo G, Fago G und Marino A. Determination of organophosphorus pesticides and metabolites in crops by solid-phase extraction followed by liquid chromatography/diode array detection. Chromatographia. **1997**; 46: 256-264.

Lange W. und **Krüger** G. Über Ester der Monofluorphosphorsäure. Berichte der Chemischen Deutschen Gesellschaft. **1932**; 65: 1598-1601.

Lin WC, Kuei CH, Wu HC, Yang CC und Chang HY. Method for the determination of dialkyl phosphates in urine by strong anion exchange disk extraction and in-vial derivatization. J. Anal. Toxicol. **2002**; 26: 176-180.

Lorenz W, Verfahren zur Herstellung von Thiophosphorsäureestern. Deutsche Patentschrift: Nr. 927 270. **1955**.

Lores EM, Bradway DE und Moseman RF. Organophosphorus Pesticide Poisonings in Humans: Determination of Residues and Metabolites in Tissues and Urine. Arch. Environ. Health. **1977**; 23: 270-276.

Lynen F. Über die gemischten Anhydride aus Phosphorsäure und Essigsäure. Berichte der Deutschen Chemische Gesellschaft. **1940**; 73: 367-375.

Mallet C und **Mallet** VN. Conversion of a conventional packed-column gas chromatograph to accomodate megabore columns. Determination of organophosphorus pesticides in environmental water. J. Chromatogr. **1989**; 481: 37-44.

Martin HF, **Driscoll** JL. Gas chromatographic identification and determination of barbiturates. Anal. Chem. **1966**; 38: 345-346.

Mastin TW, Norman GR und Weilmuenster EA. Chemistry of the aliphatic esters of thiophosphoric acids. J. Am. Soc. **1945**; 67: 1662-1664.

Matsumaro F, Toxicology of Insecticides. Plenum Press. New York und London: **1985**.

McIvor RA, McCarthy GD und Grant GA. Preparation and Toxicity of some Alkyl Thiopyrophosphates. Can. J. Chem. **1956**; 34: 1819-1833.

McKay AF, Ott WL, Taylor GW, Buchanan MN und Crooker JF. Diazohydrocarbons. Can. J. Res Sect. B. **1950**; 28: 638-688.

Michaelis A und **Becker** Th. Über die Konstitution der phosphorigen Säure. Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft. **1897**; 30: 1003-1009.

Michalke P. Quantifizierung von p-Nitroglucuronid und -sulfat in Blut und Urin durch Enzymspaltung und HPLC nach E 605-Intoxikation. Beiträge zur gerichtlichen Medizin. **1983**; 41: 103-107.

Miki A, Tsuchihashi H, Ueda K und Yamashita M. Gas chromatographic determination and gas chromatographic-mass spectrometric determination of dialkyl phosphates via extractive pentafluorobenzylation using a polymeric phasetransfer catalyst. J. Chromatogr. **1995**; 718: 383-389.

Moate TF, Lu C, Fenske RA, Hahne RMA und Kalman DA. Improved Cleanup and Determination of Dialkyl Phosphates in the Urine of Children Exposed to Organophosphorus Insecticides. J. Anal. Toxicol. **1999**; 23: 230-236.

Moody RP, Franklin CA, Riedel D, Muir NI, Greenhalgh R und Hladka A. A New GC On- Column Methylation Procedure for Analysis of DMTP (O,O-Dimethyl Phosphorothioate) in Urine of Workers Exposed to Fenitrothion. J. Agric. Food Chem. **1985**; 33: 464-467.

Morris ME und **Hansel** SB. High-performance liquid chromatographic analysis of p-nitrophenol and its conjugates in biological samples. J. Chromatogr. **1990**; 532: 285-293.

Nolan RJ, Rick DL, Freshour NL und Saunders JH. Chlorpyrifos: Pharmacokinetics in Human Volunteers. Toxicol. and Appl. Pharmacol. **1984**; 73: 8-15.

Nylén P. Beitrag zur Kenntnis der organischen Phosphorverbindungen. Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft/A. **1924**; 57: 1023-1038.

Oglobline AN, O'Donnell GE, Geyer R, Holder GM und Tattam B. Routine Gas Chromatographic Determination of Dialkylphosphate Metabolites in the Urine of Workers Occupationally Exposed to Organophosphorus Insecticides. J. Anal. Toxicol. **2001**; 25: 153-157.

Oneto ML, Basack SB und Kesten EM. Total and conjugated urinary paranitrophenol after an acute parathion ingestion. Science & Justice. **1995**; 35: 207-211.

Park SS, Pyo H, Lee K-J, Park S-J und Park TK. The Analysis of Common Metabolites of Organophosphorus Pesticides in Urine by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. Bull. Korean Chem. Soc. **1998**; 19: 45-50.

Petit M, Linden A, Mloston G und Heimgartner H. Reaktion von Phenyl Diazomethan mit 1,3-Thiazol-5(4H)-thionen: Basenkatalysierte Ring-Öffnung des Primäradduktes. *Helv. Chim. Acta* **1994**; 77:1076-1086.

Pianka M, Sulphur-containing phosphorus compounds and their use in soil treatment. Patent Office London: Nr. 1 258 922. **1973**.

Podhorniak LV, Negron JF und Griffith FD. Gas Chromatography with Pulsed Flame Photometric Detection Multiresidue Method for Organophosphate Pesticide and Metabolite Residues at the Parts-Per-Billion Level in Representative Commodities of Fruit and Vegetable Crop Groups. *J. AOAC Int.* **2001**; 84 (3): 873-890.

Poustka J, Holadova K und Hajslova J. Application of supercritical fluid extraction for analysis of Organophosphates in cereals. *J. Environ. Anal. Chem.* **1994**; 60: 139-144.

Prellwitz W, Kapp S und Müller D. Vergleich von Methoden zur Aktivitätsbestimmung der Serumcholinesterasen (Acylcholin-acylhydrolase E. C. 3.1.1.8) und deren diagnostische Wertigkeit. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **1976**; 14: 93-97.

Quebbemann AJ und **Anders MW**. Renal tubular conjugation and excretion of phenol and p-nitrophenol in the chicken: Differing mechanisms of renal transfer. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1973**; 184: 695-708.

Richardson ER and **Seiber JN**. Gas Chromatographic Determination of Organophosphorus Insecticides and their Dialkyl Phosphate Metabolites in Liver and Kidney Samples. *J. Agric. Food Chem.* **1993**; 41: 416-422.

Robb EW, **Westbrook JJ**. Preparation of methyl esters for gas liquid chromatography of acids by pyrolysis of tetramethylammonium salts. *Anal. Chem.* **1963**; 35: 1644-1647.

Schiff H. Zur Kenntnis der Methylphosphorsäuren. *Annalen de Chemie und Pharmacie.* **1857**; 102: 334-339.

Schmitt und **Herbold**, B.E.N., Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie. Programm zur statistischen Auswertung von Kalibrationsdaten nach DIN 32645. Berechnung von Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze. Version 1.0. Bad Vilbel: **1998**.

Schrader G. Verfahren zur Herstellung von Estern der Phosphorsäure und Thiophosphorsäure. Deutsche Patentschrift: Nr. 814 152. **1948**.

Schrader G. Entwicklung neuer insektizider Phosphorsäure-Ester, Verlag Chemie, Weinheim, **1963**.

Schrader G, Lorenz W, Unterstenhöfer G und Hammann I. Verfahren zur Herstellung von Amidthiolphosphorsäureestern. Deutsche Patentschrift: Nr. 1 210 835. **1966**.

Sen NP, Miles WF, Seaman S und Lawrence JF. Trace analysis of 3-hydroxy-1-nitrosopyrrolidine, a non-volatile N-nitrosamine, by combined gas chromatographic-mass spectrometric method. J. Chromatogr. **1976**; 128: 169-173.

Shafik MT, Bradway D, und Enos HF. A Cleanup Procedure for the Determination of Low Levels of Alkyl Phosphates, Thiophosphates, and Dithiophosphates in Rat and Human Urine. J. Agric. Food Chem. **1971**; 19: 885-889.

Shafik T und **Enos** HF. Determination of Metabolic and Hydrolytic Products of Organophosphorus Pesticide Chemicals in Human Blood and Urine. J. Agr. Food Chem. **1969**; 6: 1186-1189.

Skerritt JH, Hill AS, Beasley HL, Edward SL und Mc Adam DP. Enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of organophosphate pesticides: Fenitrothion, Chlorpyrifos-methyl, and Pirimiphos-methyl in wheat grain and flour-milling fractions. J. AOAC Int. **1992**; 75: 519-528.

Staudinger H und **Gaule** A. Vergleich der Stickstoff-Abspaltung bei verschiedenen aliphatischen Diazoverbindungen. Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft. **1916**; 49: 1897-1918.

Stark I, Insektizide und Nervengase: Vergiftung und Therapie. Chemie in unserer Zeit. **1984**; 18: 96-106.

Takade DY, Reynolds JM und Nelson JH. 1-(4-Nitrobenzyl)-3-(4-tolyl)triazene as a Derivatizing Reagent for the Analysis of Urinary Dialkyl Phosphate Metabolites of Organophosphorus Pesticides by Gas Chromatography. J. Agric. Food Chem. **1979**; 27: 746-753.

Teichmann H und **Hilgetag G**. Zur Alkylierung des Thioharnstoffs mit Phosphorsäureestern. J. für praktische Chemie. **1962**; 16 (4), 16: 45.

Toy ADF. The Preparation of Tetraethyl Pyrophosphate and other Tetraalkyl Pyrophosphates. J. Am. Chem. Soc. **1948**; 70: 3882-3886.

Van Hove T. Étude dynamique de deux dérivés alkylés de l'acide phosphorique. Bl. Acad. Belgique. **1909**; 282-295.

Vreuls JJ, Swen RJJ, Goudriaan VP, Kerkhoff MAT, Jongenotter GA und Brinkmann UATh. Automated on-line gel permeation chromatography-gas chromatography for the determination of organophosphorus pesticides in olive oil. J. Chromatogr. A. **1996**; 750: 275-286.

Wright FC und **Riner JC**. Biotransformation and Deposition of Residues of Fenthion and Oxidative Metabolites in the Fat of Cattle. J. Agric. Food Chem. **1979**; 27: 576-577.

Wulfman DS. The Synthesis of Aryl Diazomethanes, Synth. Commun. **1988**; 18: 2349-2352.

Yates P und **Shapiro BL**. Preparation of Phenyl Diazomethane. J. Org. Chem. **1958**; 23: 759-760.

Zervas L und **Dilaris I**. Dealkylation and Debenzylation of Triesters of Phosphoric Acid. Phosphorylation of Hydroxy and Amino Compounds. J. Am. Chem. Soc. **1955**; 20: 5354-5357.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name Nikolai Kupfermann
geboren 03.05.1968 in Hamburg

Ausbildung

1988 **Abitur**
Gymnasium Hittfeld/ Niedersachsen

07/88 – 09/89 **Wehrdienst** in Lüneburg

02/90 – 01/92 **Kaufmännische Ausbildung** im Groß- & Außenhandel
Müller, Szymczak & Co (GmbH & Co), Hamburg

04/92 – 04/97 **Studium** der Lebensmittelchemie
Chemisches Institut der Universität Hamburg

Praktikum
Gesellschaft für Umwelt- und Naturstoffanalytik (UNA GmbH),
Hamburg (05–10/95)

05/97 – 11/97 **Auslandsaufenthalt** in Norwich/England
Central Science Laboratory (CSL)

Berufstätigkeit

12/97 – 12/00 **Produktentwicklung und -prüfung**
Gesellschaft für Umwelt- und Naturstoffanalytik
(UNA GmbH), Hamburg

seit 01/01 **Wissenschaftlicher Mitarbeiter**
Institut für Rechtsmedizin, Toxikologie
Universitätskrankenhaus Hamburg-Eppendorf