

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 dectable 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.