

Massenspektrometrischer und gaschromatographischer Nachweis von Parathion aus Leichenmaterial bei Giftmord*

G. BOHN, G. RÜCKER und K. H. LUCKAS

Institut für Gerichtliche Medizin und Institut für Pharmazeutische Chemie
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster (BRD)

Eingegangen am 15. Juli 1970

Mass Spectrometric and Gaschromatographic Detection of Parathione in Autopsy Material after Murder by Poisoning

Summary. The application of gaschromatography and mass spectrometry on the specific detection of parathione in autopsy material of two cases of murder by poisoning is reported. By thermoionic detector, parathione concentrations in the range of 0.18 to 3.4 mg-% were determined gaschromatographically. The fragmentation process of parathione in the mass spectrometer is discussed.

Key-Words: Parathion—Giftmord—Gaschromatographie (HPD)—Massenspektrometrie.

Zusammenfassung. Es wird über die Anwendung von Gaschromatographie und Massenspektrometrie zum spezifischen Nachweis von Parathion in Leichenmaterial bei 2 Giftmorden berichtet. Gaschromatographisch wurden mittels Halogen-Phosphor-Detektor Parathiongehalte von 0,18—3,4 mg-% bestimmt. Der Zerfallsmechanismus des Parathions im Massenspektrometer wird diskutiert.

Tödliche Vergiftungen mit dem Insecticid Parathion¹ sind in dem vorwiegend ländlichen Einzugsgebiet unseres Institutes nicht selten. Anwendung finden vor allem die Handelspräparate E 605-forte und E 605-Spritzpulver².

In Selbstmordfällen weisen bei der Leichenöffnung bereits sehr häufig der Geruch und die Blaufärbung des Magen-Darm-Inhaltes auf diese Vergiftungsart hin. Erfahrungsgemäß nehmen im allgemeinen Selbstmörder das Gift mehrmals kurz hintereinander und somit in größerer Menge auf, da die Wirkung des Parathions nicht unmittelbar nach der ersten Einnahme einsetzt.

Eine tödlich verlaufene Vergiftung nach Aufnahme nur geringer Wirkstoffmengen, so beispielsweise bei krimineller Verabreichung, ist dagegen schwieriger zu erkennen, zumal bei der Parathionvergiftung pathologisch-anatomisch keine charakteristischen Befunde zu erheben sind, wenngleich besonders stark ausgeprägte Totenstarre und Überstreckung der Sprunggelenke, kräftige Ausbildung der Leichenflecke, welche oft weit nach vorn reichen, und die Pupillengröße wertvolle Hinweise geben können. Wie die nachfolgenden Beispiele zeigen, ist in diesen Fällen für die Abklärung einer derartigen Vergiftung die chemische Untersuchung des Leichengutes unumgänglich.

* Auszugsweise vorgetragen auf der 48. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin, Berlin, 5.—9. 10. 69.

VIII. Mitt.: Zur Anwendung der Kernresonanz- und Massenspektrometrie in der Pharmazie. [VII. Mitt.: Arch. Pharmaz. **303**, 601 (1970).]

1 0,0-Diäthyl-0-p-nitrophenylthiophosphorsäureester.

2 Hersteller: Farbenfabriken Bayer AG Leverkusen. E 605-forte enthält etwa 50% und E 605-Spritzpulver etwa 5% Parathion.

Kasuistik

Fall 1. Ein 16jähriger soll an seinem Todestage gegen 6.00 Uhr die elterliche Wohnung verlassen und sich mit dem Moped zur Arbeit in einer Schuhfabrik begeben haben; er kam dort aber nicht an. Seine 42jährige Mutter, mit der er während eines Kuraufenthaltes seines Stiefvaters allein in Wohngemeinschaft lebte, war bereits um 5.10 Uhr zur Arbeit in einer nahen Fabrik aus dem Haus gegangen. Gegen 10.30 Uhr hörten Mitbewohner des Hauses ein Geräusch in der verlassenen Wohnung, öffneten diese und fanden den 16jährigen im Wohnzimmer vor einer Couch auf dem Boden liegen. Neben seinem Mund bemerkte man Schleim.

Sektionsbefund³ (gekürzt; Sektion 277/67): Auffallend schwere blutige Lungenwassersucht mit leichter Verdichtung, Blut- und Flüssigkeitsreichtum des Gehirns, mäßig rechts und links erweitertes Herz, ohne Mißbildungen, flüssiges Leichenblut, Blausucht der inneren Organe, besonders der Nieren, aber auch von Milz, Leber und Bauchspeicheldrüse, große Gaumenmandeln, innere Brustdrüse noch verhältnismäßig groß. Im Magen sehr reichlich Speisebrei von stark saurem Geruch.

Die Leichenöffnung erbrachte keine sichere Todesursache. Wegen der Lungen- und Hirnveränderungen wurde in erster Linie an eine hoch akut verlaufene Grippeinfektion gedacht.

Fall 2. Ein 43jähriger Hilfsarbeiter, der als Trinker bekannt war, kam an seinem Todestage nachmittags gegen 16.00 Uhr unter Alkoholeinwirkung nach Hause. Nach Angabe der Ehefrau nahm er anschließend im Badezimmer der ehelichen Wohnung ein Bad. Da er eingeschlafen war, verblieb er etwa 1 Std in der Badewanne, wurde von der Ehefrau geweckt und soll sich nach dem Ankleiden auf die Couch gelegt und Bier getrunken haben. Nach einiger Zeit will dann die Ehefrau wahrgenommen haben, daß er sich an die linke Brustseite faßte und klagte: „mein Herz“. Schweiß brach aus, er hatte rote Flecken an den Wangen. Der Anfall dauerte $\frac{1}{2}$ Std. Gegen 18.45 Uhr lag er leblos da. Während des Anfalls hatte die Ehefrau bereits nach dem Hausarzt geschickt, für den jedoch der diensthabende Arzt erschien. Dieser bescheinigte den Tod, ohne eine Diagnose zu stellen. Die Untersuchung des Leichenblutes erbrachte einen Alkoholgehalt von $1,6 \text{ g-}^0/_{100}$.

Sektionsbefund³ (gekürzt; Sektion 45/68): Starke, etwas blutige Lungenwassersucht. Flüssigkeitsreichtum des Gehirns mit fraglichen Veränderungen in 3. und 4. Kammer (Wernicke?). Frische Blutstauung in den Bauchorganen. Reichlich flüssiges Blut in den großen Gefäßen. Narben nach spez. Rippenfellentzündung; rechts mit Kalkherden in den Narben und in der Lunge. Knochenbrüchigkeit, fleckiger Fettschwund der schmalen Nebennierenrinde. Mäßiger Verdauungszustand im Magen- und Dünndarm.

Nach dem Ergebnis der Leichenöffnung war der Tod die Folge eines Kreislaufversagens, für das an der Leiche kein Grund zu erkennen war.

Bei der histologischen Untersuchung des Gehirns wurden Blut- und Flüssigkeitsreichtum, aber kein Morbus Wernicke, d. h. keine Folgekrankheit einer Vergiftung (etwa mit Alkohol) festgestellt.

Durch die nachfolgend beschriebenen chemischen Untersuchungen wurde in beiden Fällen eindeutig Parathion in den Leichenteilen nachgewiesen. Die hiernach durchgeführten weiteren kriminalpolizeilichen Ermittlungen ergaben, daß es sich um kriminelle Vergiftungen handelte. Im ersten Fall war das Gift von der Mutter dem Sohn mit dem Morgenkaffee verabreicht worden. Vor ihrem Fortgang zur Arbeit hatte sie nach eigenen Angaben etwa $\frac{1}{3}$ Teelöffel wäßrige E 605-forte-Lösung in den hohen Kaffeebecher des Sohnes gegeben, der, wie sie wußte, Kaffee in den Becher hineinzugießen und zu trinken pflegte. Der Tod des Sohnes sollte verhindern, daß das mit ihm bestehende intime Verhältnis bekannt wurde. Im zweiten Fall war von der Ehefrau das Bier, das der Ehemann unmittelbar vor seinem Tode trank, mit E 605-forte präpariert worden.

Chemische Untersuchungen

Die Isolierung des Parathions erfolgte nach Verreiben des homogenisierten Leichenmaterials mit wasserfreiem Natriumsulfat, durch Extraktion der Trocken-

³ Diesen verdanken wir Herrn Prof. Dr. H. W. Sachs, Institut für Gerichtliche Medizin, Münster.

masse mit n-Pentan bzw. Methanol; bei stark fetthaltigen Untersuchungsproben wurde eine weitere Reinigung der Extrakte mit Acetonitril vorgenommen [2, 10].

Die dünn-schichtchromatographische Untersuchung [1] der Extraktionsrückstände im Fall 1 und der positive Ausfall des p-Nitrophenol-Nachweises [21] im Fall 2 wiesen auf Parathion-Vergiftungen hin.

Gaschromatographie

Zum eindeutigen Nachweis, insbesondere auch zur quantitativen Bestimmung des Parathions wurden gaschromatographische Untersuchungen unter Verwendung eines Halogen-Phosphor-Detektors (HPD) durchgeführt [11]. Hierfür wurde ein Gaschromatograph F 20 FE mit HPD-Zusatz (Bodenseewerk Perkin-Elmer) verwendet.

Bei dem benutzten Halogen-Phosphor-Detektor handelt es sich um einen Tandem-Flammenionisationsdetektor, bei dem über einem üblichen Flammenionisationsdetektor (Primär-FID) ein Sekundär-FID, der nach dem thermoionischen Prinzip arbeitet, zum selektiven Nachweis von Phosphor-Halogenverbindungen angebracht ist. Die Signale beider Detektoren lassen sich mittels eines Zweikanalschreibers getrennt voneinander registrieren, wobei aus einer Probeneingabe durch den Primär-FID C-H-Verbindungen und durch den Sekundär-FID die halogen- und phosphorhaltigen Komponenten angezeigt werden. Für phosphororganische Insecticide, wie Parathion, liegt die Nachweisempfindlichkeit dieses HP-Detektors im Nanogramm-bereich, zudem kann eine aufwendige und verlustreiche Reinigung der Untersuchungsproben entfallen. Verunreinigungen, die weder Phosphor noch Halogen enthalten, werden im Primär-FID restlos verbrannt. Da nur die Verbrennungsprodukte zum Sekundär-FID gelangen, können hier keine störenden C-H-Signale entstehen. Dieses bestätigten eigene Untersuchungen, bei denen stark verunreinigte, aus Organmaterial gewonnene Proben in den Gaschromatographen eingegeben wurden.

Abb. 1 zeigt das Gaschromatogramm des Mageninhaltsextraktes aus Fall 2. Von dem Sekundär-FID wurde neben dem Signal des Parathions noch ein schwächeres Signal mit der Retentionszeit des Paraoxons registriert. Beide Signale waren auch in anderen Fällen, bei denen die Untersuchungen bereits 1—2 Tage nach dem Tode an Extrakten des Mageninhalt, des Blutes und der Leber vorgenommen wurden, feststellbar, eine Beobachtung, über die auch Bäumler und Rippstein [2] berichteten. Die gewählten Versuchsbedingungen gestatten einen selektiven Nachweis von Parathion neben Chlorthion, Fenitrothion, Parathionmethyl und Paraoxon.

Die quantitative Auswertung der Gaschromatogramme erfolgte anhand der Peakflächen, die in Beziehung zu denen bekannter Parathionmengen gesetzt wurden. Diese Vergleichschromatogramme wurden jeweils unmittelbar vor bzw. nach der Untersuchungsprobe aufgenommen.

In dem untersuchten Leichenmaterial wurden folgende Parathionkonzentrationen festgestellt:

Fall 1: Mageninhalt 2,1 mg-%; Dick- und Dünndarminhalt 3,4 mg-%.

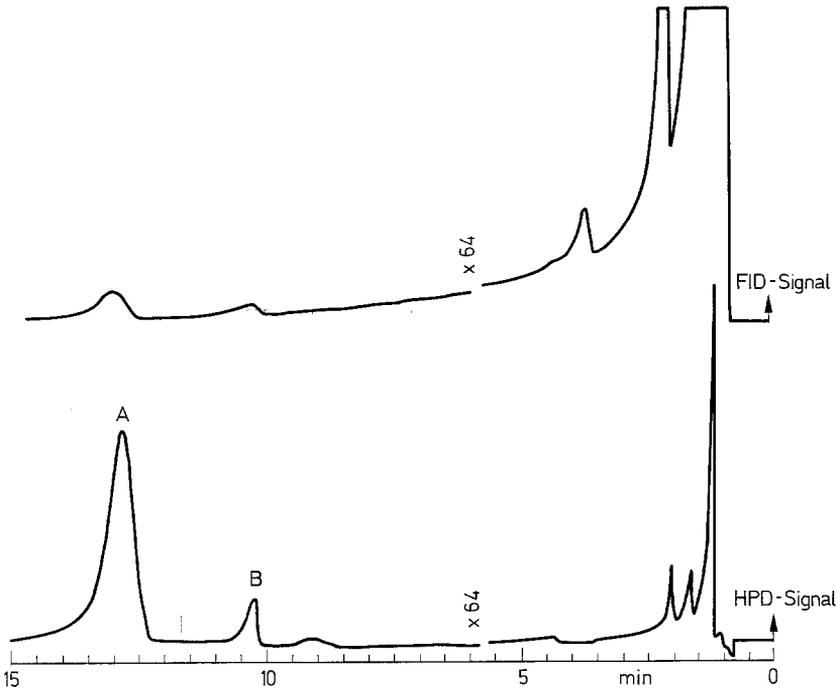


Abb. 1. Gaschromatogramm des Mageninhaltextraktes aus Fall 2. (Probenmenge 0,5 μ l in Methanol; A Parathion, B Paraoxon.) Trennsäule: 2 m Glassäule, innerer Durchmesser 1,7 mm; SE 30 auf Chromosorb G (Typ 78 S 2056 Perkin-Elmer). Ofentemperatur: 180° C. Trägergasstrom: 17 ml N_2 /min. Detektortemperatur: 250° C. Betriebsbedingungen der Detektoren: Luft 350 ml/min; Wasserstoff: primär FID 35 ml/min, sekundär FID 52 ml/min. Temperatur im Einspritzblock: 290° C

Fall 24: Mageninhalt 0,60 mg-%; Dick- und Dünndarminhalt 0,86 mg-%; Blut 0,18 mg-%; Leber 0,35 mg-%; Harn 4,0 mg-% p-Nitrophenol [7].

Massenspektrometrie

Für einen spezifischen Nachweis von Pflanzenschutzmittelwirkstoffen bietet sich die Massenspektrometrie an. Das Prinzip dieses Analysenverfahrens besteht darin, daß die zu untersuchende Substanz im Massenspektrometer verdampft und durch Elektronen einer Energie von 70 eV zunächst in positiv geladene Molekülionen überführt wird. In einer Folge von Einzelreaktionen zerfallen die Molekülionen weiter in positiv geladene Fragmentationen immer kleinerer Massen. Molekül- und Fragmentationen werden im Massenspektrometer entsprechend ihrem Quotienten aus Masse und Ladung m/e getrennt. Durch Registrierung dieser Quotienten wird das Massenspektrum erhalten. Der Fragmentierungsprozeß ist unter festgelegten Meßbedingungen für eine gegebene Substanz charakteristisch, da er von deren chemischer Struktur abhängig ist. Demzufolge kann das Massenspektrum zur Identifizierung einer unbekanntes Substanz dienen. Für die Aufnahme eines Massenspektrums werden nur sehr geringe Substanzmengen benötigt.

4 Etwa 16 Wochen nach der Leichenöffnung an dem bei Kühlschranktemperatur gelagerten Leichenmaterial ausgeführt.

Nach den gaschromatographischen Untersuchungsergebnissen bot sich zum Nachweis des Parathions die Kombination von Gaschromatographie und Massenspektrometrie an. Diesbezügliche Messungen führten jedoch nicht zum Erfolg⁵.

Der massenspektrometrische Nachweis des Parathions erfolgte daher mittels Kombination von Dünnschichtchromatographie und Massenspektrometrie. Zur Messung des Massenspektrums nach dünn-schichtchromatographischer Trennung wurde der auf der Kieselgel GF 254-Platte im UV-Licht sichtbar gemachte Parathionfleck abgekratzt. Das Kieselgel wurde sodann mit Äther extrahiert, der Äther abdekantiert und abgedampft. Auf diese Weise wurde das Parathion in einer geringen Menge Kieselgel angereichert, welches direkt in die Ionenquelle des Massenspektrometers eingebracht wurde.

Abb. 2 zeigt die Massenspektren von Parathion-Reinsubstanz sowie von aus Mageninhalt isolierter Substanz (Fall 1). In den abgebildeten Massenspektren ist deutlich der Parathion-Molpeak bei $m/e = 291$ zu erkennen. Außerdem zeigen die Spektren einen gleichartigen Fragmentierungsprozeß. Die Erfassungsgrenze des Verfahrens liegt bei etwa 20—25 µg Parathion.

Zum Zerfallsmechanismus des Parathions im Massenspektrometer

Das Fragmentierungsverhalten von Diäthylphenylphosphorsäure im Massenspektrometer wurde schon vor längerer Zeit von Quayle [19] untersucht. Spätere Arbeiten von Damico [6] sowie von Spittler u. Mitarb. [9] über die Massenspektrometrie von Pflanzenschutzmitteln aus der Reihe der Phosphorsäureester beziehen auch das Parathion (I) ein. Aufgrund dieser Ergebnisse und von eigenen Untersuchungen läßt sich für I der Zerfallsmechanismus im Massenspektrometer wie folgt, deuten (Abb. 3).

Reaktion 1: Die Fragmentierung von I beginnt mit der Abspaltung von C_2H_4 aus einer der Äthoxyl-Gruppen unter McLafferty-Umlagerung [8, 13, 14]. Das dabei gebildete Bruchstück bei $m/e = 263$ (Ia) erfährt die gleiche Reaktion erneut und geht in Ib ($m/e = 235$) über. Diese Spaltung wurde auch bei Diäthylphosphorsäure [19] und anderen Alkoxy-Derivaten des Phosphors [3, 6, 15, 19] beobachtet.

Reaktion 2: Die Bildung von $m/e = 236$ (Ic) ist aus Ia durch doppelte Wasserstoffumlagerung unter Abspaltung eines C_2H_3 -Radikals denkbar, wie sie auch für Diäthylphenylphosphorsäure und andere Phosphorverbindungen [5, 15, 19] abgeleitet wurde. Wie im Falle der Diäthylphosphorsäure tritt auch bei I diese Reaktion erst nach der C_2H_4 -Eliminierung einer der beiden Äthoxyl-Gruppen zu Ia (Reaktion 1) in Erscheinung.

Reaktion 3: Damico [6] vermutet die Eliminierung von p-Nitrophenol (Id) aus I. Der Autor schließt dieses aus dem Vorliegen von Bruchstücken mit den Massenzahlen $m/e = 123, 109, 93, 81$ und 65 im Massenspektrum von I, die auch im Spektrum von Id mit größerer Intensität vorhanden sind. Die Abspaltung von Id aus I soll nach einer Wasserstoffwanderung von einer der Äthoxyl-Gruppen an das Aryläther-Sauerstoffatom verlaufen. Diese Bildung eines Phenol-Moleküls im Massenspektrometer wurde auch bei dem Triphenylphosphat [16] und dem

⁵ Für diese Messungen danken wir Herrn D. Moster, Fa. Bodenseewerk Perkin-Elmer & Co., Ingenieurbüro Frankfurt (Main). Gaschromatograph 900; Massenspektrometer Modell 270 (Perkin-Elmer).

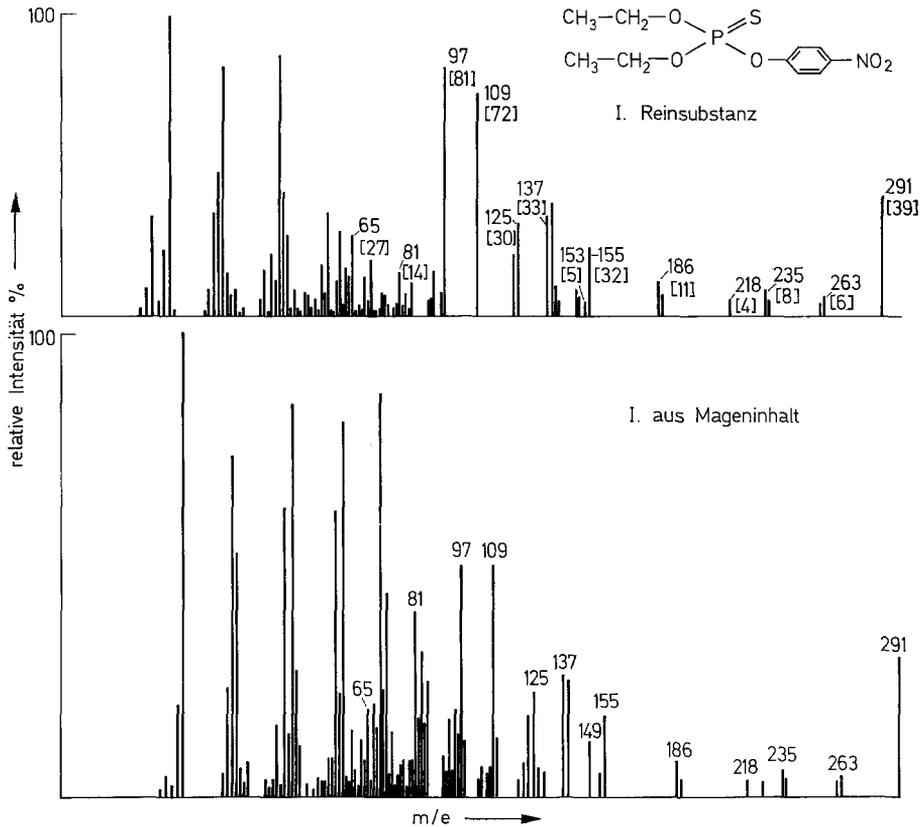


Abb. 2. Massenspektrum von Parathion (I) Reinsubstanz und aus Mageninhalt (Fall I) nach dünnstichtchromatographischer Trennung. (R_f 0,47; Massenspektrometer RMU-6D Hitachi-Perkin-Elmer; Quelle: 250° C)

Diäthylphenylphosphat [19] beobachtet. Über den Mechanismus dieser Umlagerung machen die Autoren keine Angaben. Durch die bei aromatischen Nitroverbindungen schon länger bekannte Eliminierung von NO [5] wird aus I das Ion $C_6H_5O_2$ ($m/e = 109$) gebildet [19].

Reaktion 4: Durch genaue Massenbestimmung ermittelte Damico [6] das Vorliegen eines weiteren Ions im Signal $m/e = 109$ des Massenspektrums von I mit der Summenformel $C_2H_6O_3P$ (Ie), dessen Intensität um das Fünffache größer ist als die des Ions $C_6H_5O_2$. Ie kann aus $m/e = 263$ (Ia) durch Abspaltung eines p-Nitrophenyl-Radikals gebildet werden⁶. Die Entstehung des Brückstücks Ie schließt die vorherige Wanderung des p-Nitrophenyl-Restes an das an den Phosphor gebundene Schwefelatom ein. Auf diese mögliche Isomerisierung durch thermische Einflüsse bzw. beim Abbau von I im Organismus ist schon von mehreren Autoren hingewiesen worden [9, 12, 17, 18, 20]. Unter Einbeziehung dieser Umlagerung ist die Bildung der Ionen mit $m/e = 137$ (If) und 81 (Ig) durch Abspaltung von p-Nitrothiophenyl-Radikalen aus I bzw. Ib zu deuten. Auch

⁶ Damico [6] gibt für Ie eine unrichtige Formulierung: $C_2H_5-O-P = \delta H$.

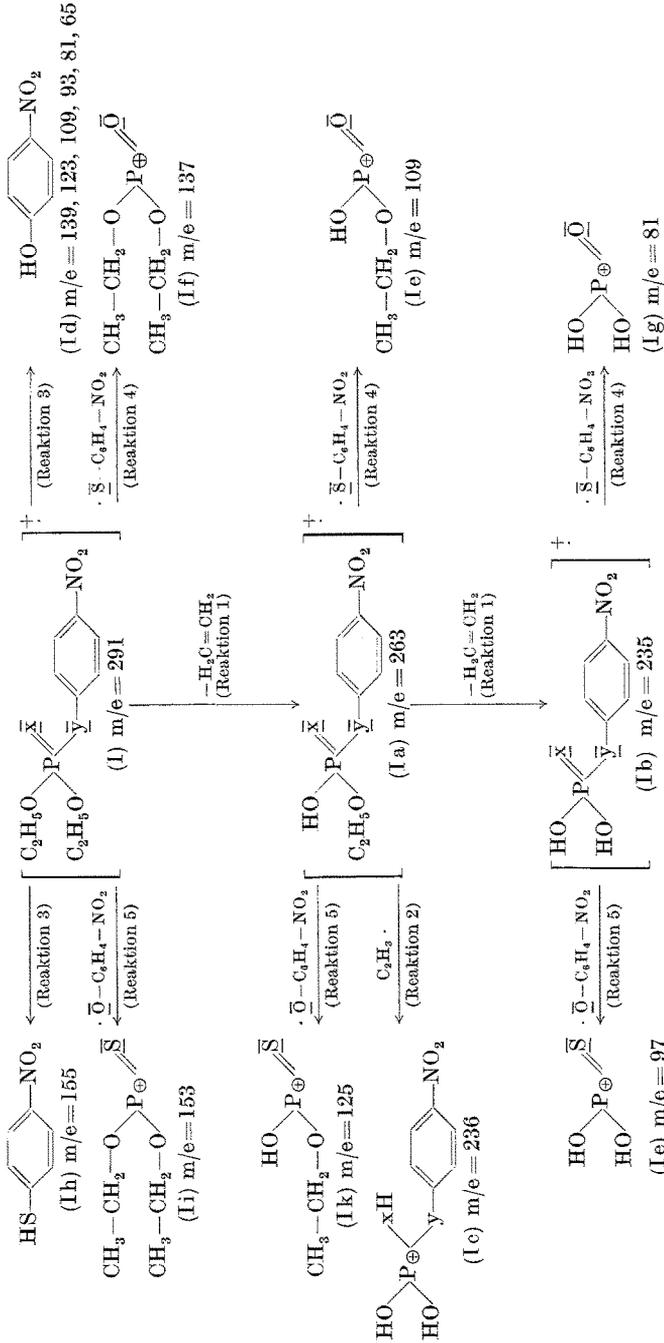


Abb. 3. Zerfallschema von Parathion (I) im Massenspektrometer; X=S (O); Y=O (S)

das Signal bei $m/e = 155$ findet so seine Erklärung; diese Massenzahl entspricht dem Molgewicht des Nitrothiophenols (Ih), dessen Abspaltung aus I analog der von Id (Reaktion 3) denkbar ist.

Reaktion 5: Die Entstehung der Ionen mit $m/e = 153$ (Ii), 125 (Ik) und 97 (Il) kann durch Abspaltung von p-Nitrophenyloxy-Radikalen aus I, Ia bzw. Ib gedeutet werden.

Für die Bildung der Bruchstücke mit den Massenzahlen $m/e = 128$, 188, 186 und 149 scheinen komplizierte Prozesse verantwortlich zu sein. So könnte $m/e = 149$ durch zweifache Spaltung und Rekombination entstehen, wie sie auch bei der Diäthylphenylphosphorsäure beobachtet wurde [19].

Literatur

1. Bäumler, J., Rippstein, S.: Dünnschichtchromatographischer Nachweis von Insektiziden. *Helv. chim. Acta* **44**, 1162 (1961).
2. — — Gaschromatographische Bestimmung von Insektiziden im Blut mit dem Halogen-Phosphor-Detektor. *Arch. Toxikol.* **25**, 57 (1969).
3. Beynon, J. H.: *Mass spectrometry and its application to organic chemistry*, 418. New York: Elsevier 1960.
4. Budzikiewicz, H., Pelah, Z.: Zum massenspektrometrischen Fragmentierungsverhalten von Alkylarylphosphonaten. *Mh. Chem.* **96**, 1739 (1965).
5. — Djerassi, C., Williams, D. H.: *Mass spectrometry of organic compounds*, p. 653. San Francisco: Holden-Day 1967.
6. Damico, J. N.: The mass spectra of some organophosphorus pesticide compounds. *J. Assoc. Off. Agricult. Chemists* **49**, 1027 (1966).
7. Eicken, S. von: Zur Ausscheidung von p-Nitrophenol im Urin nach Einwirkung von Pflanzenschutzmittel „E 605“. *Angew. Chem.* **66**, 551 (1954).
8. Gilpin, J. A., Mc Lafferty, F. W.: *Mass spectrometric Analysis. Aliphatic aldehydes.* *Analyt. Chem.* **29**, 990 (1957).
9. Jörg, J., Houriet, R., Spitteller, G.: *Massenspektren von Pflanzenschutzmitteln.* *Mh. Chem.* **97**, 1064 (1966).
10. Jones, L. R., Riddick, J. A.: Separation of organic Insecticides from plant and animal tissues. *Analyt. Chem.* **24**, 569 (1952).
11. Jentzsch, D. H., Zimmermann, G., Wehling, J.: Über den spezifischen gaschromatographischen Nachweis von halogen- und phosphorhaltigen Verbindungen durch einen 2-Stufen-Flammenionisationsdetektor. *Z. anal. Chem.* **221**, 377 (1966).
12. Maier-Bode, H.: *Pflanzenschutzmittel-Rückstände*, S. 50. Stuttgart: Eugen Ulmer 1965.
13. Mc Lafferty, F. W.: *Mass spectrometric analysis. Broad applicability to chemical research.* *Analyt. Chem.* **28**, 306 (1956).
14. — *Mass spectrometric analysis. Molecular rearrangements.* *Analyt. Chem.* **31**, 82, 2072 (1959).
15. Nishiwaki, T.: The reactions of dialkyl hydrogen phosphites, with alkylvinyl ethers. The mass spectra of the phosphonates. *Tetrahedron* **22**, 1383 (1966).
16. Occolowitz, J. L., White, G. L.: The mass spectrometry of esters of phosphorous and phosphonic acids. *Analyt. Chem.* **35**, 1179 (1963).
17. Perkow, W.: *Die Insektizide*, S. 234. Heidelberg: Dr. Alfred Hüthig 1956.
18. McPherson, J. B., Jr., Johnson, G. A.: Thermal decomposition of sample phosphorothionate insecticides. *J. Agr. Food. Chem.* **4**, 42 (1956).
19. Quayle, A.: The mass spectra of some organic phosphates. *Advanc. Mass Spectrometry* **1**, 365 (1959).
20. Schrader, G.: *Die Entwicklung neuer insektizider Phosphorsäureester*, S. 367. Weinheim: Verlag Chemie 1963.
21. Schwerd, W., Schmidt, Gg.: Einfache Schnellreaktion im Blut zum Nachweis von Vergiftungen mit dem Schädlingsbekämpfungsmittel E605. *Dtsch. med. Wschr.* **77**, 372 (1952).