

**Succinylcholin und Succinylmonocholin – Methodik und  
Qualitätssicherung der Analyse instabiler Zielsubstanzen im Rahmen der  
forensisch-toxikologischen Fallarbeit sowie wissenschaftlicher Studien**

**Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Uta Küpper

aus

Duisburg

Bonn 2010



Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. F. Mußhoff
2. Gutachter: Prof. Dr. K.-J. Steffens

Tag der Promotion: 26.10.2010

Erscheinungsjahr: 2010

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von März 2005 bis Juni 2010 am Institut für Rechtsmedizin der Universität Bonn unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Burkhard Madea durchgeführt.

## Zusammenfassung

Trotz großer Fortschritte insbesondere der apparativen Analytik bleiben einige ungelöste Probleme in der forensischen Toxikologie weiterhin bestehen. Der verlässliche Nachweis von Succinylcholin (SUX), einer bisquaternären Ammoniumverbindung die als depolarisierendes Muskelrelaxans sowohl in der Routine-Anästhesie als auch bei (versuchten) Tötungsdelikten sowie Suiziden Anwendung findet, stellt dabei eine solche noch zu lösende Aufgabe dar. Der analytische Anspruch ergibt sich hierbei einerseits aus der im Sekunden- bis Minutenbereich liegenden, d.h. sehr kurzen Halbwertszeit der Muttersubstanz bei einer Metabolisierung über Succinylmonocholin (SMC) in letztlich endogene Stoffe, andererseits auch durch die strukturellen Besonderheiten der beiden Analyten SUX und SMC: eine Extraktion dieser Substanzen aus einer wässrigen Probenmatrix in ein organisches Lösemittel ist aufgrund ihrer ausgeprägten Hydrophilie durch eine bzw. zwei pH-unabhängige positive Ladungen sowie fehlende, für die Extraktion nutzbare, hydrophobe Gruppen nur schwer zu realisieren.

Die gegenständliche Arbeit präsentiert einen hochsensitiven HPLC-MS/MS-Ansatz zum ersten parallelen Nachweis von SUX sowie seinem Metaboliten SMC. Die hochpräzise Quantifizierung der Analyten erfolgte mittels Isotopenmassenspektrometrie unter Verwendung von erstmals nicht interferierenden, weil nicht ineinander konvertierbaren, internen Standards aus Eigensynthese. Die Probenstabilisierung sowie –asservierung wurde systematisch optimiert und in allgemeingültige Empfehlungen umgesetzt.

Entgegen der bisher veröffentlichten Nachweismethoden für SUX bzw. SMC wurde die so entwickelte Methode sowohl für Serum als auch Urin komplett nach internationalen Richtlinien validiert. Die methodischen Kenndaten sind mit Nachweis- und Bestimmungsgrenzen von immer deutlich unter 10 ng/ml für beide Analyten und Matrices, sowie mit einer Präzision und Richtigkeit stets innerhalb der erlaubten Grenzen ausgesprochen gut. Die Anwendbarkeit des Verfahrens wurde in der Folge anhand forensischer Routinefälle sowie einer klinischen Studie eindeutig belegt.

Bei zwei vermuteten, einer tödlichen und einer überlebten SUX-Intoxikation, konnte basierend auf den durch diese Methode gewonnenen Analyseergebnissen eine unumstößliche Diagnose gestellt werden, die sich darüber hinaus als rechtsverwertbar erwies.

---

Im Rahmen der klinischen Studie wurde der *in vivo*-Abbau von SUX und SMC beschrieben, und ein detailliertes pharmakokinetisches Modell für den Metaboliten erstellt. Darauf aufbauend wurden forensisch relevante Nachweisfenster für beide Analyten im Blutkreislauf sowie im Urin definiert. Mit einem Nachweisfenster von 8-24 h im Blut (gegenüber meist unter 10 min für SUX) konnte SMC dadurch als der einzig aussichtsreiche, forensische SUX-Marker in Blutproben etabliert werden. Sowohl SUX als auch SMC werden über mehrere Stunden (SUX:  $\geq 2$  h, SMC:  $\geq 8$  h) in den Urin sezerniert, in Zusammenschau mit den Ergebnissen der Realfälle konnte Urin daher als optimale Matrix für den forensischen Nachweis einer SUX-Beibringung ermittelt werden. Die Ergebnisse der Studie erlauben eine Abschätzung zu erwartender Analytgehalte in den jeweiligen Probenmatrices, und bilden somit die Basis für eine fundierte Plausibilitätskontrolle bereits durchgeführter aber auch zukünftiger Analysen von forensischen Realproben.

Anhand der vorgestellten Methode wird weiterhin auf mögliche Selektivitätsprobleme in der HPLC-MS/MS, ein bislang zuwenig beachtetes Thema, eingegangen: der Einsatz untergeordneter Ionenübergänge unter Ausschluss des interferenz-belasteten Haupt-MRM stellt eine in diesem Zusammenhang neuartige, aber zugleich elegante und absolut befriedigende Lösung zur zweifelsfreien Identifikation und sensitiven Quantifizierung eines problematischen Analyten – in diesem Fall SMC – dar.

Die Methode wurde schließlich noch auf die Analyse von Gewebeproben sowie Glaskörperflüssigkeit adaptiert. Dies ermöglichte die erfolgreiche Durchführung einer Studie, in deren Verlauf die kürzlich berichtete Existenz von nativem SMC eingehend untersucht und generell widerlegt werden konnte. Im Hinblick auf die geschilderten Selektivitätsprobleme bei der Detektion von SMC erscheint eine frühere Fehlinterpretation basierend auf interferenzbelasteten MRM-Daten möglich. SMC konnte somit weitgehend, mit Einschränkungen bei stark verwesteten Gewebeproben, als aussagekräftiger SUX-Marker bestätigt werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit geben insgesamt nicht nur neue, anwendungsorientierte Impulse für die SUX-Analytik in der forensischen Routine, sondern erweitern darüber hinaus – durch eine systematische Behandlung von Themen wie der Existenz von nativem SMC, den Nachweisfenstern von SUX und SMC sowie möglichen Selektivitätsproblemen in der Tandem-MS – auch das forensische sowie methodische Grundlagenwissen.

---

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. F. Mußhoff, Toxikologische Abteilung des Instituts für Rechtsmedizin der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn, danke ich für die Bereitstellung des Promotionsthemas, sowie die wissenschaftliche Betreuung während seiner Bearbeitung.

Herzlichen Dank an Herrn Prof. Dr. K.-J. Steffens, Institut für Pharmazeutische Technologie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn, für die freundliche Übernahme der Zweitbetreuung der vorliegenden Arbeit.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. B. Madea, Institut für Rechtsmedizin der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn, für die erfahrene Förderung und Hilfe sowie die wohlwollende Begleitung dieser Arbeit.

Herrn Dr. S. Fusz, Chemische Institute der Universität zu Bonn, danke ich für die Anleitung bei der Synthese der Referenzsubstanzen.

Weiteren Dank schulde ich den Mitarbeitern der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin des Universitätsklinikums Essen, insbesondere Herrn Dr. F. Herbstreit, die im Rahmen einer Kooperation sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Dr. R. Hilger aus dem westdeutschen Tumorzentrum am Universitätsklinikums Essen danke ich für die Durchführung der pharmakokinetischen Berechnungen.

Für die mir entgegengebrachte Kollegialität sowie Hilfsbereitschaft und angenehme Arbeitsatmosphäre bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern, insbesondere denen der toxikologischen Abteilung, des Bonner Instituts für Rechtsmedizin.

Schließlich möchte ich meinen Eltern, meinen Freunden und insbesondere Matthias für die fortwährende Unterstützung und Hilfsbereitschaft sowie das entgegengebrachte Verständnis während der letzten Jahre herzlich danken.

---

## Publikationen

### Veröffentlichung von Dissertationsteilen:

Kuepper, U.; Musshoff, F.; Madea, B.: Synthesis and characterization of succinylcholine-d<sub>18</sub> and succinylmonocholine-d<sub>3</sub> designed for simultaneous use as internal standards in mass spectrometric analyses. *Journal of Mass Spectrometry*. 42(7), 2007, 929-939.

Kuepper, U.; Musshoff, F.; Madea, B.: A fully validated isotope dilution HPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of succinylcholine and succinylmonocholine in serum and urine samples. *Journal of Mass Spectrometry*. 43(10), 2008, 1344-1352.

Kuepper, U.; Musshoff, F.; Madea, B.: Succinylmonocholine analytics as an example for selectivity problems in HPLC-MS/MS and resulting implications for analytical toxicology. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 22(12), 2008, 1965-70

Kuepper, U.; Musshoff, F.; Madea, B.: Applicability of succinylmonocholine as a marker for succinylcholine administration - Comparative analysis of samples from a fatal succinylcholine-intoxication versus postmortem control specimens. *Forensic Science International* (2010). DOI:10.1016/j.forsciint.2010.09.007.

Kuepper, U.; Musshoff, F.; Hilger, R. A.; Herbstreit, F.; Madea, B.: Pharmacokinetic properties of succinylmonocholine in surgical patients. *Journal of Analytical Toxicology*. Angenommen.

Kuepper, U.; Musshoff, F.; Herbstreit, R. A.; Madea, B.: Degradation and elimination of succinylcholine and succinylmonocholine and definition of their respective detection windows in blood and urine for forensic purposes. *International Journal of Legal Medicine*. In Vorbereitung.

---

**Weitere Publikationen:**

Musshoff, F.; Trafkowski, J.; Kuepper, U.; Madea, B.: An automated and fully validated LC-MS/MS procedure for the simultaneous determination of 11 opioids used in palliative care, with 5 of their metabolites. *Journal of Mass Spectrometry*. 41(5), 2006, 633-640.

Lachenmeier, K.; Kuepper, U.; Musshoff, F.; Madea, B.; Reusch, H.; Lachenmeier, D.W.: Quality control of Aloe vera beverages. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*. 4(4), 2005, 1033-1042

**Vorträge:**

9. - 10. Juni 2006: 15. Frühjahrstagung, Region Nord, der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin; U. Kuepper, A. Birgel, F. Musshoff, B. Madea: *Anwendung eines experimentellen Versuchsdesigns zur Methodenoptimierung (HS-SPME-GC/MS) zum Nachweis von Benzodiazepinen und Barbituraten im Rahmen der Hirntoddiagnostik*, Dresden

30. - 31. Mai 2008: 17. Frühjahrstagung Region Nord der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin; U. Kuepper, F. Musshoff, B. Madea: *Vergleichende toxikologische Analyse von fötalen und maternalen Obduktionsasservaten eines opiat-assoziierten Todesfalls im 7. Schwangerschaftsmonat*, Essen

24. - 27. September 2008: 87. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin; U. Kuepper, F. Musshoff, B. Madea: *Abbaukinetiken und Nachweisfenster von Succinylcholin und Succinylmonocholin in Serum und Urin für forensische Anwendungen*, Dresden

22. - 26. September 2009: 88. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin; F. Musshoff, U. Kuepper, J. Nadstawek, B. Madea: *Nichtindizierte Verabreichung von Succinylcholin durch eine Krankenschwester – eine Serie von gefährlicher Körperverletzung in einem Klinikum?*, Basel

---

29. August - 02. September 2010: 48th Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT); U. Küpper; F. Musshoff; F. Herbstreit; R. A. Hilger; B. Madea: *Degradation Kinetics and Detection Windows of Succinylcholine and Succinylmonocholine in Serum and Urine for forensic-toxicological applications*, Bonn.

22. - 25. September 2010: 89. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin; U. Küpper; F. Musshoff; F. Herbstreit; R. A. Hilger; B. Madea: *Pharmakokinetik und Nachweisfenster von Succinylcholin und Succinylmonocholin in Serum sowie Urin zur Anwendung in der forensisch-toxikologischen Fallarbeit*, Berlin.

**Poster:**

19. - 24. September 2005: Sixth International Symposium on Advances in Legal Medicine (ISALM); U. Kuepper, F. Musshoff, H. Wollersen, B. Madea: *Extraction of succinylcholine and succinylmonocholine from paraoxonized blood and subsequent quantitation using a validated HPLC-MS/MS method*, Hamburg

23. - 26. August 2006: XX<sup>th</sup> Congress of the International Academy of Legal Medicine; Symposium der Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie (GTFCh); U. Kuepper, A. Birgel, F. Musshoff, B. Madea: *Experimental design in the optimisation of a HS-SPME-GC/MS method for the detection of centrally acting drugs in brain death diagnosis*, Budapest

26. - 30. September 2006: 85. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin; U. Kuepper, F. Musshoff, B. Madea: *Entwicklung einer LC-MS/MS Methode zur Detektion von Succinylcholin und seinem Hauptmetaboliten Succinylmonocholin in stabilisierten Serumproben*, Innsbruck

18. - 21. April 2007: XV. Symposium der Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie (GTFCh); U. Kuepper, A. Birgel, F. Musshoff, B. Madea: *Detection of benzodiazepines and barbiturates using a validated HS-SPME/GC-MS method*, Mosbach

---

24. - 29. September 2007: 86. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin; U. Kuepper, F. Musshoff, B. Madea: *Zur Anwendbarkeit von Succinylmonocholin als Markersubstanz*, Mainz

24. - 27. September 2008: 87. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin; U. Kuepper, F. Musshoff, B. Madea: *Selektivitätsprobleme in der HPLC-MS/MS and resultierende Konsequenzen für die analytische Toxikologie*, Dresden

03. - 05. September 2008: 7<sup>th</sup> International Symposium Advances in Legal Medicine (ISALM); U. Kuepper, F. Musshoff, B. Madea: *Selectivity problems in HPLC-MS/MS and implications for analytical toxicology*, Osaka

### **Preise und Auszeichnungen:**

24. Sept. 2005: Posterpreis der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin auf dem Sixth International Symposium on Advances in Legal Medicine (ISALM), Hamburg

30. Aug. 2007 : Young Scientists Award in der Kategorie „Best Published Paper 2006/07“ auf der Jahrestagung der International Association of Forensic Toxicologists, Seattle

## **Hinweise**

Um Verwechslungen mit Kommata im fortlaufenden Text zu vermeiden, werden Dezimalzahlen nach angelsächsischer Konvention mit Dezimalpunkten geschrieben.

---

---

## Inhalt

Zusammenfassung.....	I
Danksagung.....	III
Publikationen .....	IV
Hinweise .....	VII
Inhalt .....	VIII
Abkürzungsverzeichnis.....	XIII
1 Einleitung.....	1
1.1 Problemstellung .....	1
1.2 Ziele der Arbeit .....	2
2 Grundlagen und Stand der Technik .....	3
2.1 Succinylcholin.....	3
2.2 Stand der Succinylcholin-Analytik .....	5
2.3 Entwicklung der Extraktionsmethodik.....	9
2.4 Stabilität der Analyten .....	10
2.4.1 <i>In vitro</i> -Stabilität der Analyten – Probenasservierung.....	10
2.4.2 <i>In vivo</i> -Stabilität der Analyten – Abbaukinetiken und Ausscheidung.....	13
2.5 Endogenes SMC.....	21
2.6 Alternative Probenmatrices.....	22
2.7 Methodische Grundlagen .....	22
2.7.1 Einführung in die HPLC-MS/MS .....	22
2.7.2 Interne Standardisierung mittels Isotopenmassenspektrometrie.....	27
2.7.3 Design der internen Standards .....	28
2.7.4 Einführung in die Qualitätskontrolle.....	29
2.7.5 Selektivitätsprobleme in der HPLC-MS/MS-Analytik.....	33
2.7.6 Einführung in die NMR .....	34
2.7.7 Einführung in die FAB-MS.....	41
2.7.8 Kreatinin-Bestimmung.....	43
3 Material und Methoden.....	44
3.1 Chemikalien .....	44
3.2 Puffer und Laufmittel.....	44

---

---

3.3	Geräte und Materialien .....	44
3.4	Synthese der internen Standards.....	47
3.4.1	Synthese von SMC und SMC-d <sub>3</sub> .....	47
3.4.2	Synthese von SUX-d <sub>18</sub> .....	48
3.5	Optimierung der Extraktionsmethode .....	50
3.5.1	Acetonitril-Fällung .....	50
3.5.2	Enzymabhängige Degradation und Stabilisierung der Analyten.....	51
3.5.3	Extraktionsversuche nach Literaturangaben.....	51
3.5.4	Optimierte Festphasenextraktion.....	52
3.6	Optimierung der Probenasservierung .....	53
3.6.1	Glasadsorption .....	53
3.6.2	Frier-Tau-Stabilität .....	54
3.7	Methodenvalidierung.....	54
3.8	SMC-Interferenz.....	55
3.8.1	Probandenkollektiv .....	55
3.8.2	Alkalische Hydrolyse .....	56
3.9	Forensische Realproben (Serum und Urin) .....	56
3.10	Studie zu nativem SMC in Organen und Glaskörperflüssigkeit.....	57
3.10.1	Probenvorbereitung der Gewebsasservate.....	58
3.10.2	Probenvorbereitung der Glaskörperflüssigkeit.....	59
3.11	<i>In vitro</i> -Untersuchungen und Vorversuche .....	59
3.11.1	Stabilisierung von Vollblutproben.....	60
3.11.2	Materialvergleich - EDTA/Heparin-Monovetten .....	60
3.11.3	<i>In vitro</i> -Distribution von SUX und SMC .....	61
3.11.4	<i>In vitro</i> -Degradation von SMC.....	61
3.12	<i>In vivo</i> -Untersuchungen - Probandenstudie.....	62
3.12.1	Allgemeines .....	62
3.12.2	Kollektiv .....	62
3.12.3	Prämedikation und Narkose.....	63
3.12.4	Co-Medikation.....	63
3.12.5	Ausschlusskriterien.....	64
3.12.6	Probennahmeschema .....	65
3.12.7	Pharmakokinetisches Modelling mittels TopFit®.....	66

---

---

3.13	Software .....	69
4	Ergebnisse .....	70
4.1	Standardsynthese.....	70
4.1.1	Ausbeuten.....	70
4.1.2	Synthese von SUX-d <sub>18</sub> .....	70
4.1.3	Synthese von SMC-d <sub>3</sub> .....	75
4.1.4	Synthese von SMC.....	80
4.2	Methodenoptimierung .....	86
4.2.1	Acetonitril-Fällung.....	86
4.2.2	Enzymatische Degradation .....	87
4.2.3	Extraktionsversuche nach Literaturangaben .....	89
4.2.4	Optimierte Festphasenextraktion .....	90
4.3	Probenasservierung .....	90
4.3.1	Glasadsorption .....	90
4.3.2	Frier-Tau-Stabilität.....	91
4.4	Methodenvalidierung .....	91
4.4.1	Selektivität .....	91
4.4.2	Linearität .....	93
4.4.3	Grenzen der Methode.....	93
4.4.4	Extraktionsausbeute .....	93
4.4.5	Präzision und Richtigkeit.....	93
4.4.6	Matrixeffekte.....	94
4.5	SMC-Interferenz .....	97
4.5.1	Serum .....	97
4.5.2	Urin .....	98
4.6	Forensische Realproben (Serum und Urin).....	101
4.7	<i>In vitro</i> -Untersuchungen und Vorversuche.....	103
4.7.1	Paraoxon-vermittelte Analyt-Stabilisierung im Vollblut.....	103
4.7.2	Methodenvergleich – EDTA/Heparin-Monovetten .....	105
4.7.3	<i>In vitro</i> -Distribution von SUX und SMC.....	107
4.7.4	<i>In vitro</i> -Abbau von SMC .....	108
4.8	<i>In vivo</i> -Untersuchungen - Probandenstudie .....	109
4.8.1	Plasma .....	109

---

---

4.8.2	Urin.....	128
4.9	Studie zu nativem SMC in verschiedenen Probenmatrices.....	134
4.9.1	Gewebeproben.....	134
4.9.2	Glaskörperflüssigkeit.....	138
5	Diskussion.....	140
5.1	Methodenoptimierung.....	140
5.2	Probenlagerung und -handhabung.....	141
5.2.1	Glasadsorption.....	141
5.2.2	Frier-Tau-Stabilität.....	141
5.3	Methodenvalidierung.....	142
5.4	SMC-Interferenz.....	143
5.5	SMC als SUX-Marker.....	146
5.5.1	Blut und Urin.....	146
5.5.2	Gewebe.....	146
5.5.3	Glaskörperflüssigkeit als alternatives Probenmaterial.....	148
5.6	Voruntersuchungen.....	149
5.7	Studiendesign.....	149
5.8	<i>In vivo</i> -Stabilität und Nachweisfenster.....	151
5.8.1	SUX im Plasma.....	151
5.8.2	SMC im Plasma.....	153
5.8.3	SUX und SMC im Urin.....	158
5.8.4	Nachweisfenster.....	160
5.9	<i>In vitro</i> -Stabilität von SUX und SMC.....	161
5.9.1	SMC-Stabilität - Weiterführende Überlegungen.....	162
5.10	Forensische Realproben.....	164
5.11	Empfehlungen und Hinweise zur SUX-Analytik.....	165
5.11.1	Allgemeines.....	165
5.11.2	Asservierung von Blut.....	165
5.11.3	Asservierung von Gewebeproben.....	167
5.11.4	Asservierung von Urin.....	168
5.11.5	Hinweise zur Begutachtung.....	169
6	Schlussfolgerung.....	170
7	Ausblick.....	174

---

8	Abbildungsverzeichnis.....	176
9	Tabellenverzeichnis .....	179
10	Formelverzeichnis.....	180
11	Literatur.....	181

---

## Abkürzungsverzeichnis

ID	eindimensional
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterase, echte Cholinesterase
AcN	Acetonitril
Äq.	SMC-Äquivalent (Konzentration in ng/ml)
ASA	Patienten-Klassifikationssystem der American Society of Anesthesiologists
AUC	Flächenintegral einer Kurve (area under the curve)
BChE	Serum-Butyrylcholinesterase, Pseudocholinesterase
C <sub>max</sub>	Peakplasmakonzentration
CAD	kollisionsaktivierte Dissoziation
CBA	Carboxylsäure
CL	Clearance
d	Distanz zur Normalverteilung
δ	chemische Verschiebung
Δ	Differenz
DF	Deflektorspannung
DI	Direktinjektion
dl	Deziliter
DP	Declustering Potential
DPA	Hexanitrodiphenylamin
ECD	elektrochemische Detektion
EI	Elektronenstoß-Ionisation
eq	Moläquivalent
ESI	Elektronenspray-Ionisation
FAB	Schnell-Atom-Beschuss (fast atom bombardment)
FD	Fluoreszenz-Detektion
FID ( <i>NMR</i> )	Resonanzsignal (free induction decay)
FID ( <i>Gaschromatographie</i> )	Flammenionisationsdetektion
FP	Fokussierpotential

---

GC	Gaschromatographie
GTfCh	Gesellschaft für toxikologische und forensische Chemie
h ( <i>NMR</i> )	Heptett
h ( <i>Zeitangabe</i> )	Stunde
H3G	Hydromorphon-3-Glucoronid
HFBA	Heptafluorbuttersäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HWZ	Halbwertszeit
HYD	Hydromorphon
Hz	Hertz
IQ1-IQ3	Interquad-Linsen 1-3
ISTD	interner Standard
k	Geschwindigkeitskonstante
KG	Körpergewicht
LLE	Flüssig-flüssig-Extraktion (liquid-liquid extraction)
LOD	Nachweisgrenze (limit of detection)
LOQ	Bestimmungsgrenze (limit of quantitation)
m	Multiplett
m/z	Masse-Ladungsverhältnis
MCA	Mehrkanal-Datenaufnahme (multiple channel acquisition)
min	Minute
mNBA	meta-Nitrobenzylalkohol
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MRT	mittlere systemische Verweilzeit (mean residence time)
MS	Massenspektrometrie
MS/MS(MS)	Tandem-Massenspektrometrie
MW	Mittelwert
NMR	Kernresonanzspektroskopie (nuclear magnetic resonance)
PDA	Periduralanästhesie
PI	Produktion
pK <sub>a</sub>	Dissoziationskonstante
PP	Polypropylen
ppm	Millionstel (parts per million)

---

---

Q0-Q3	Quadrupole 0-3
QC	Qualitätskontrolle (quality control)
$r^2$	Regressionskoeffizient
RF	eingestrahlten Frequenz in der NMR (radiation frequency)
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
s ( <i>NMR</i> )	Singulett
s ( <i>Zeitangabe</i> )	Sekunde
SMC	Succinylmonocholin
SPE	Festphasenextraktion (solid phase extraction)
ST	Stubbies, Quadrupol-Vorfilter
SUX	Succinylcholin
$T_{\max}$	Zeitpunkt des Erreichens der Peakplasmakonzentration
t ( <i>NMR</i> )	Triplett
t ( <i>Zeitangabe</i> )	Zeitpunkt oder -raum
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
$t_{1/2\alpha,\beta}$	initiale Halbwertszeiten
$t_{1/2\gamma}$	terminale Halbwertszeit, Eliminationshalbwertszeit
V	Verteilungsvolumen
$V_C$	zentrales Verteilungsvolumen
$V_{3,4}$	periphere Verteilungsvolumina
$V_{ss}$	Verteilungsvolumen unter Gleichgewichtsbedingungen

---



---

# 1 Einleitung

## 1.1 *Problemstellung*

Die allgemeine Toxikologie befasst sich mit der Erforschung (potentiell) giftiger Substanzen, darunter ihre Resorption, Wirkung und Metabolisierung im Körper, sowie mit der Diagnostik und Therapie von Vergiftungen, und vereinigt so auf einzigartige Weise (bio-)chemische, pharmakologische und medizinische Aspekte.

Die forensische Toxikologie betrachtet darüber hinaus insbesondere die Vergiftungslehre in ihrem Bezug zur geltenden Rechtsordnung, dazu zählt u.a. der Nachweis von Drogen oder Alkohol bei Straßenverkehrsteilnehmern, die Feststellung vorsätzlicher Vergiftungen oder Betäubungen (z.B. zur Ermöglichung weiterer Straftaten) aber auch akzidentelle Vergiftungen mit juristischen Konsequenzen.

Die geeignete Probenasservierung und -analytik bei einem bestehenden Intoxikationsverdacht stellt eine vordringliche Aufgabe dieses Wissenschaftszweiges dar: alle biologischen Matrices, welche für eine Untersuchung relevant sein könnten, müssen – individuell angepasst an die besonderen Anforderungen des jeweiligen Probenmaterials sowie des zu bestimmenden Analyten – bestmöglich gelagert und aufgearbeitet werden. Schon kleine Abweichungen vom Optimum können hierbei bereits einen ausgeprägt negativen Einfluss auf die Sensitivität der Untersuchung haben.

Insbesondere labile Analyten stellen oft besondere Anforderungen an die Präanalytik sowie die experimentelle Analytik: so kann es z.B. nötig sein durch eine spezielle Behandlung zu Beginn der Probenasservierung einen enzymatischen Abbau des Analyten zu verhindern, eng umschriebene Lagerungsbedingungen einzuhalten oder auch „extreme“ Extraktionsbedingungen (hoher/niedriger pH, Hitze etc.) zu vermeiden.

Selbst wenn eine ausreichende Stabilität der Analyten erzielt werden kann, so führen weitergehende physikochemische Besonderheiten der Analyten (z.B. pH-unabhängige Ladungen, zwitterionischer Charakter, mangelnde Lipophilie etc.) in einigen Fällen zu einer erschwerten Extraktion und Detektion der Moleküle.

Succinylcholin (SUX) und sein Metabolit Succinylmonocholin (SMC) vereinigen auf einzigartige Weise strukturelle Merkmale, welche sowohl zu einer geringen Matrixstabilität

---

als auch zu einer extrem erschwerten Extraktion und somit Analyse führen. Die Analytik dieser Substanzen und somit die Detektion einer SUX-Intoxikation stellt daher ein bis dato unzureichend gelöstes Problem in der forensischen Toxikologie dar.

## **1.2 Ziele der Arbeit**

Ziel der Arbeit ist die systematische Entwicklung einer neuen Analysenmethode zur parallelen Detektion von Succinylcholin und seinem Metaboliten Succinylmonocholin. In diesem Zusammenhang werden insbesondere niedrigste Nachweis- und Bestimmungsgrenzen bei höchstmöglichen Wiederfindungsraten und somit maximierte Nachweisfenster bei gleichzeitig minimalem Zeit- und Kostenaufwand angestrebt. Dies setzt die Entwicklung und den erfolgreichen Einsatz neuer Strategien zur Stabilisierung, Extraktion und Konzentration der Substanzen, sowie die Verwendung einer optimierten apparativen Analysenmethode voraus. Die entwickelte Methode ist nach wissenschaftlich anerkannten Richtlinien zu validieren, um die Gerichtsverwertbarkeit der Ergebnisse sicherzustellen. Forensische Realfälle von vermuteten tödlichen bzw. überlebten SUX-Intoxikationen sollen mit der entwickelten Methode untersucht werden, um ihre Eignung zur Bearbeitung forensischer Fragestellungen zu belegen. Darüber hinaus bedarf es einer klinischen Studie, um die Anwendbarkeit der Methode auch in diesem Sektor nachweisen, und das vorhandene Wissen über die Kinetik von Succinylcholin sowie Succinylmonocholin zu erweitern. Die forensisch relevanten Nachweisfenster von SUX und SMC sollen sowohl im Blut als auch im Urin definiert werden. Im Rahmen einer forensischen Studie ist die kürzlich in Frage gestellte Anwendbarkeit von SMC als Markersubstanz für eine SUX-Gabe umfassend zu untersuchen, und mit besonderem Hinblick auf bislang zu wenig beachtete Selektivitätsprobleme in der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (HPLC-MS/MS) zu diskutieren. In diesem Zusammenhang notwendige Qualitätssicherungsmaßnahmen sollen vorgeschlagen, und ihre Wirksamkeit eindrücklich belegt werden. Die Summe der durch die Studien ermittelten Daten soll schließlich in allgemeingültige Empfehlungen für die forensisch-toxikologische Fallarbeit bei vermuteter SUX-Intoxikation umgesetzt werden.

---

---

## 2 Grundlagen und Stand der Technik

### 2.1 Succinylcholin

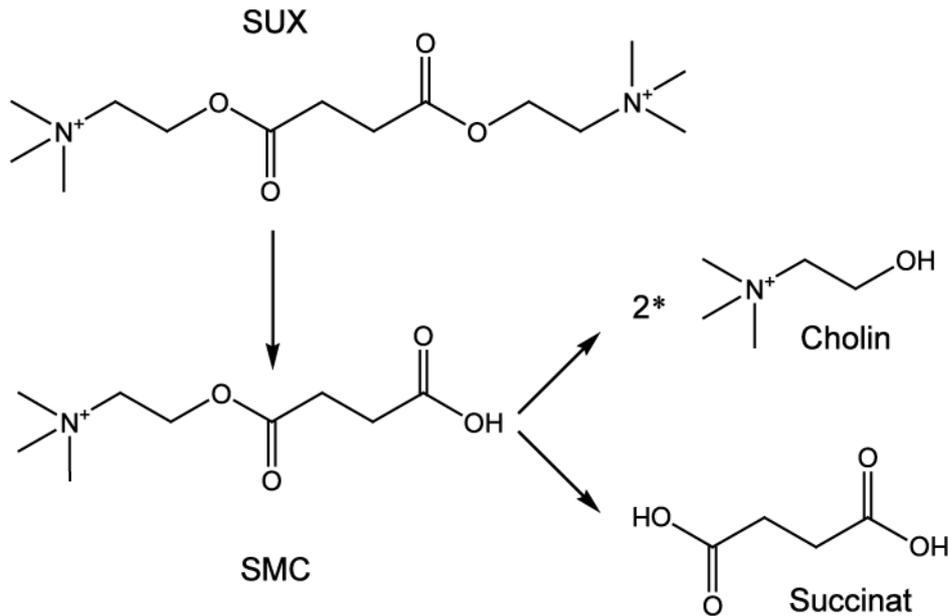
Succinylcholin (SUX) ist ein bisquaternäres Amin und strukturell mit dem endogenen Transmitter Acetylcholin (ACh) verwandt. Wie dieser ist SUX in der Lage, post-synaptische ACh-Rezeptoren zu aktivieren: SUX wird dabei von den ACh-Rezeptoren der Synapsen schnell wieder freigesetzt, kann daraufhin jedoch nur verhältnismäßig langsam (im Vergleich zum nativen Substrat ACh) von der spezifischen Acetylcholinesterase (AChE, echte Cholinesterase, EC 3.1.1.7) abgebaut werden [1]. Dies führt zu einer Dauer-Depolarisation und letztendlichen Desensibilisierung der post-synaptischen Membran, weshalb Succinylcholin routinemäßig als Muskelrelaxans in der klinischen Anästhesie Anwendung findet. Im klinischen Umfeld ist es problemlos möglich, die mit der Muskeler schlaffung einhergehende Atemlähmung durch künstliche Beatmung zu kompensieren, und so eine Sauerstoffunterversorgung des Patienten zu vermeiden.

Die Substanz wird durch die unspezifische Serum-Butyrylcholinesterase (BChE, Pseudocholinesterase, EC 3.1.1.8) innerhalb weniger Minuten nach Applikation zunächst zu Succinylmonocholin (SMC) hydrolysiert [2-5], der weitere hydrolytische Abbau führt zur Entstehung der körpereigenen Substanzen Succinat und Cholin ([6-9]; Abbildung 1).

Der zweite Schritt des hydrolytischen SUX-Abbaus, d.h. die Degradation von SMC, kann zumindest *in vitro* nicht nur von Pseudocholinesterasen allein, sondern auch von echten, membranständigen Cholinesterasen (z.B. denen der roten Blutkörperchen) katalysiert werden [7].

Für hohe Dosen von SMC (> 7.5 mg/kg) wurden im Rahmen eines Tierversuchs an Kaninchen [7] sowie in menschlichen Probanden [10] relaxierende und kreislaufaktive Wirkungen beobachtet. Die Potenz von SMC ist allerdings ca. 20- bis 50-fach geringer als die von SUX [8], es ist daher anzunehmen, dass der Beitrag von SMC an der pharmakologischen Wirkung von SUX nach Gabe einer therapeutischen Dosis vernachlässigbar ist [8,10].

---



**Abbildung 1: Succinylcholin-Abbau durch Cholinesterasen**

Aufgrund der wegen des schnellen Abbaus nur kurzen Wirkdauer [11] ist Succinylcholin in seiner klinischen Anwendung zumeist gut steuerbar, und daher in der Anästhesie geschätzt. Die beschriebenen, aber nur selten auftretenden Fälle einer verlängerten Apnoe durch einen BChE-Mangel [12] oder genetische BChE-Varianten [13] sind in einem klinischen Umfeld gut beherrschbar.

In seiner Eigenschaft als Asphyxiant wird Succinylcholin allerdings auch bei Tötungsdelikten sowie Suiziden eingesetzt, wobei in diesen Fällen die SUX-induzierte und nicht kompensierte Atemlähmung zu einer Sauerstoffunterversorgung des Gehirns, und somit letztlich zum Tod führt.

Der Nachweis einer Succinylcholin-Gabe stellt ein erhebliches Problem für die forensische Toxikologie dar: das Zeitfenster zur zweifelsfreien Detektion der Muttersubstanz ist aufgrund der bereits erwähnten, extrem kurzen Halbwertszeit von SUX äußerst beschränkt, darüber hinaus erschweren auch seine physiko-chemischen Eigenschaften wie z.B. starke Hydrophilie, Hitzeinstabilität und Hydrolyseanfälligkeit die SUX-Extraktion und Analytik [14].

## 2.2 Stand der Succinylcholin-Analytik

Verschiedene Techniken zur SUX-Analytik, angefangen von dünn-schichtchromatographischen Verfahren [15,16] und Gaschromatographie (GC) von umgeestertem SUX [15], über Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) gekoppelt mit elektrochemischer (ECD; [3,17]) oder Fluoreszenz-Detektion (FD; [5]), bis hin zu massenspektrometrischen (MS) Ansätzen wie z.B. GC-MS von derivatisierten Extrakten [18-21], MS nach Direktinjektion mit Elektronenstoß-Ionisation (DI-EI-MS; [22]) sowie MS nach HPLC mit Elektronenspray-Ionisation (HPLC-ESI-MS; [23]) sind bereits publiziert worden. Erst seit kurzen werden auch Tandem-MS-Ansätze (MS/MS) wie DI-ESI-MS/MS [2,4,14] oder auch HPLC-MS/MS [24,25] verfolgt.

Vor allem der letztgenannte Ansatz kombiniert einen Hauptvorteil der HPLC-Technik, d.h. die entfallende Derivatisierung, mit der hohen Spezifität und Selektivität der Tandem-MS-Detektion.

Der Metabolit SMC ist aufgrund seiner immerhin noch monoquaternären Struktur ähnlich schlecht extrahierbar wie die Muttersubstanz.

Bis heute stand SMC nur selten im Fokus des Forschungsinteresses, und nur wenige Publikationen berichten über erfolgreiche Detektionsmethoden für diesen Metaboliten, die von dünn-schichtchromatographischen oder Elektrophorese-Verfahren [26-29] zu modernen massenspektrometrischen Methoden wie HPLC-ESI-MS [30] und HPLC-MS/MS [24,25] reichen. Bereits 1968 verfolgten Dal Santo et al. [27] darüber hinaus  $^{14}\text{C}$ -markiertes SMC im Rahmen einer kinetischen sowie Distributions-Studie. Da der über weite pH-Bereiche bestehende zwitterionische Charakter des SMC eine parallele Extraktion zusammen mit SUX sehr erschwert, konnte ein simultaner Nachweis beider Substanzen bislang noch nicht berichtet werden.

Auch Cholin als einer der Endmetabolite der Succinylcholin-Degradation kann unter *in vitro* Bedingungen zur Quantifizierung von SUX herangezogen werden [6,31]: die Bestimmung der Plasma-Konzentration von Succinylcholin ist dabei abhängig von der exakten Bestimmung der Cholinkonzentration zwischen einem komplett hydrolysierten und einem Esterase-inhibierten Probenaliquot. Die Einsatzmöglichkeiten dieser Methode sind jedoch beschränkt, da es aufgrund des o.g. Prozederes notwendig ist, den nativen Cholingehalt der Probe zu kennen. Eine derartige Methode ist daher nicht für Fragestellungen der forensischen

Toxikologie geeignet, da eine notwendige Vergleichsprobe (entnommen vor der eventuellen SUX-Zugabe) generell nicht verfügbar ist.

Ebenfalls ist ein Einsatz von Succinat, dem anderen Endmetaboliten der Succinylcholin-Degradation, als SUX-Marker erwogen bzw. sogar praktiziert worden: 1965 wurde in Florida (USA) der Angeklagte Dr. Carl Coppolino auf Basis von erhöhten Cholin- und Succinat-Konzentrationen in der exhumierten Leiche seiner Frau wegen Totschlags („second degree murder“) verurteilt [32]. Nachfolgende Studien belegten jedoch, dass Succinat in postmortalen Proben häufig erhöht und in höchst unterschiedlichen Konzentrationen nachweisbar ist [33], und ein Einsatz auch dieser Substanz als SUX-Marker in einem forensischen Kontext daher abgelehnt werden muss.

Die folgende Tabelle 1 gibt einen Überblick über die oben beschriebenen, bereits publizierten Verfahren zur SUX-Analytik:

---

Tabelle 1: Übersicht bereits publizierter Arbeiten zur SUX-Analytik

Analyt(en)	ISTD	Matrix, Stabilisator	Extraktion	Derivatisierung	Detektiionsmethode	Methodenkenndaten	Referenz
SUX	-	Urin, Blut/Plasma	Ionenpaar-LLE (Promothymolblau)	(Hydrolyse und Umesterung von Succinat)	DC mit Iodplatinat-Färbung; GC-FID	LOD: 1-2 µg abs. (DC) LOD: 10 µg abs. (GC) Wiederfindung: 40-50 % (Urin)	[15]
SUX	-	Urin, Blut, Gewebe	Ionenaustausch-Purifikation (Amberlite IRC 50)	-	Papierchromatographie und DC mit Iodplatinat-Färbung; bio. Test (Maus)	Wiederfindung: 85-90 %	[16]
SUX, SMC (Summe)	-	Urin	-	-	bio. Test ( <i>Rana pipiens</i> )	-	[34]
<sup>14</sup> C-SUX, <sup>14</sup> C-SMC	-	-	-	-	DC mit Radio-DC-Scanner	LOD: < 10 <sup>-6</sup> M	[26]
<sup>14</sup> C-SUX, <sup>14</sup> C-SMC	-	Plasma (Mensch, Hund), Urin u. Liquor (Hund)	-	-	Papierelktrophorese Flüssigszintillationszähler	LOD: ~ 10 <sup>-5</sup> µmol	[27-29]
SUX	Butyrylcholin	Plasma	Proteinfällung (Perchlorsäure), Verdünnung, Filtration	-	HPLC-ECD	LOD: 0.2 - 2 µg/ml	[3,17]
Cholin nach SUX-Hydrolyse	-	Plasma (cave Referenz für endogenes Cholin); Physostigmin	Proteinfällung (Perchlorsäure), Zentrifugation	-	HPLC-ECD mit Cholin-Oxidase-Enzymreaktor	Wiederfindung: 95 % Wiederhol-/Laborpräzision: je < 5 %	[6,31]
SUX	-	Plasma, Echothiopat	Proteinfällung (Trichloracetat)	-	HPLC-FD	LOD: 100 ng/ml	[5]
SUX	-	Vollblut	LLE	(therm. Dealkylierung)	GC-MS	-	[35]
SUX	-	versch. humane Matrices	Ionenpaar-LLE (K1 <sub>3</sub> )	(Pyrolyse)	GC-MS	-	[36]
SUX	“deuteriertes SUX”	Plasma (Hund, teils einbalsamiert), humane Matrices	Ionenpaar-LLE (Hexanitrodiphenylamin)	Demethylierung	GC-MS	LOD: 5 ng/g	[20,21]

SUX	Deca- methonium	Gewebe, Plasma (Hund, Ratte); teils einbalsamiert, teils mit Physostigmin	Ionenpaar-LLE (Hexanitro- diphenylamin)	Demethylierung	GC-NPD	Wiederfindung: 75 %	[37,38]
SUX	SUX-d <sub>12</sub>	Muskel, Niere, Auge, Urin (Meerschwein), einbalsamierte Gewebe (Ratte)	Ionenpaar-LLE (Hexanitro- diphenylamin)	Demethylierung	GC-MS	LOD: 3,5 pmol/g Wiederfindung: 75 %	[18,19]
SUX	-	Urin	Ionenpaar-LLE (K1 <sub>5</sub> )	-	DI-EI-MS	LOD: 100 ng/ml	[22]
SUX	-	Serum, Urin	SPE (BondElut® C <sub>18</sub> )	-	HPLC-ESI-MS	-	[23]
SUX, SMC	-	Urin	SPE (BondElut® CBA; SUX), Verdünnung (SMC)	-	HPLC-ESI-MS	-	[30]
SUX	SUX-d <sub>6</sub>	Plasma; Echthiopat	SPE (BondElut® C1)	-	DI-ESI-MS/MS	LOQ: 25 ng/ml Wiederfindung: 50-60 % Wiederhol-/ Laborpräzision: je < 12 %	[2,4,14]
SUX, SMC (nicht simultan)	SUX-d <sub>6</sub> , SMC-d <sub>4</sub> (konvertiert- bar)	versch. humane Matrices; Paraoxon	LLE und Ionenpaar- SPE (BondElut® C <sub>18</sub> )	-	HPLC-MS/MS	Wiederfindung: 80-95 % LOD: 2-10 ng/g	[24,25]

LOD = Nachweisgrenze; LOQ = Bestimmungsgrenze; SPE = Festphasenextraktion, LLE = Flüssig/Flüssig-Extraktion

Weitere Abkürzungen sind dem Verzeichnis (S. XIII-XV) zu entnehmen.

### 2.3 *Entwicklung der Extraktionsmethodik*

In die Überlegungen zur Entwicklung einer geeigneten Kombi-Extraktionsmethodik für SUX und SMC aus wässrigem Medium ist mit eingegangen, dass SMC nur bei saurem pH nicht zwitterionisch vorliegt: unter diesen Bedingungen ist die Säuregruppe am Succinatrest des SMC vollständig protoniert, sodass nur eine einfach positive Restladung durch das quaternäre Amin verbleibt. Erst bei einem pH-Wert von ca. zwei Einheiten unterhalb des  $pK_a$ -Wertes (Dissoziationskonstante) einer Säure kann davon ausgegangen werden, dass ihre Carboxylgruppe vollständig protoniert ist, für den vorliegenden Fall ( $pK_a \text{ Succinat} = 4.19$ ) musste also ein entsprechend saurer Extraktions-pH angestrebt werden. Die Entwicklung der gewünschten Kombi-Extraktionsmethodik gestaltete sich aufbauend auf diese Überlegungen jedoch insofern schwierig, als dass die gängigen Extraktionsstrategien für quaternäre Amine genau entgegengesetzte Anforderungen an den pH-Wert stellen. So erklärt es sich, dass viele bereits publizierte (SUX)-Monomethoden als Grundlage für eine parallele Extraktion, z.B. über Carboxylsäure(CBA)-Matrices [30] oder  $C_{18}$ -Festphasen [2] bzw. mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) mit  $KI_3$  [22], eher ungeeignet schienen. Zwei Arbeiten waren darüber hinaus noch nicht einmal für den postulierten Verwendungszweck des SUX-Nachweises durch Extraktion über eine  $C_{18}$ -Phase [23], bzw. Chloroform-LLE bei pH 7.5 [35] nachvollziehbar. Weitere, theoretisch vielversprechende Extraktionsansätze [18-21,37,38] mussten verworfen werden, da das verwendete Hexanitrodiphenylamin (DPA) einen Sprengstoff darstellt, der nicht frei erhältlich ist.

Als einzig erfolgversprechende Extraktionsstrategie wurde der generelle Ansatz einer sauren Extraktion in Anwesenheit eines Ionenpaarreagenz über eine Festphasen-Säulenmatrix verfolgt: bei diesem Ansatz ist sichergestellt, dass die durch Ansäuerung des wässrigen Mediums einfach (SMC) bzw. zweifach (SUX) positiv geladenen Analyten durch Anbindung an das (pH-unabhängig) negativ geladene Ionenpaarreagenz indirekt von der Festphasenmatrix reteniert werden. Ballard et al. [24] haben kürzlich eine auf diesem Prinzip basierende, allerdings höchst aufwändige und nicht validierte Methode vorgestellt.

---

## **2.4 Stabilität der Analyten**

Die bislang sehr begrenzte Anzahl an publizierten Nachweismethoden für SUX bzw. SMC liegt jedoch nicht nur wie oben beschrieben in der komplizierten Extraktion, sondern auch der enormen Instabilität der Analyten begründet: Der folgende Paragraph gibt einen Überblick über die bekannten Stabilitätsprobleme von SUX, und legt mögliche Lösungsansätze für die Überwindung dieser Probleme zur erfolgreichen Entwicklung einer Detektionsmethode für diese Substanz dar.

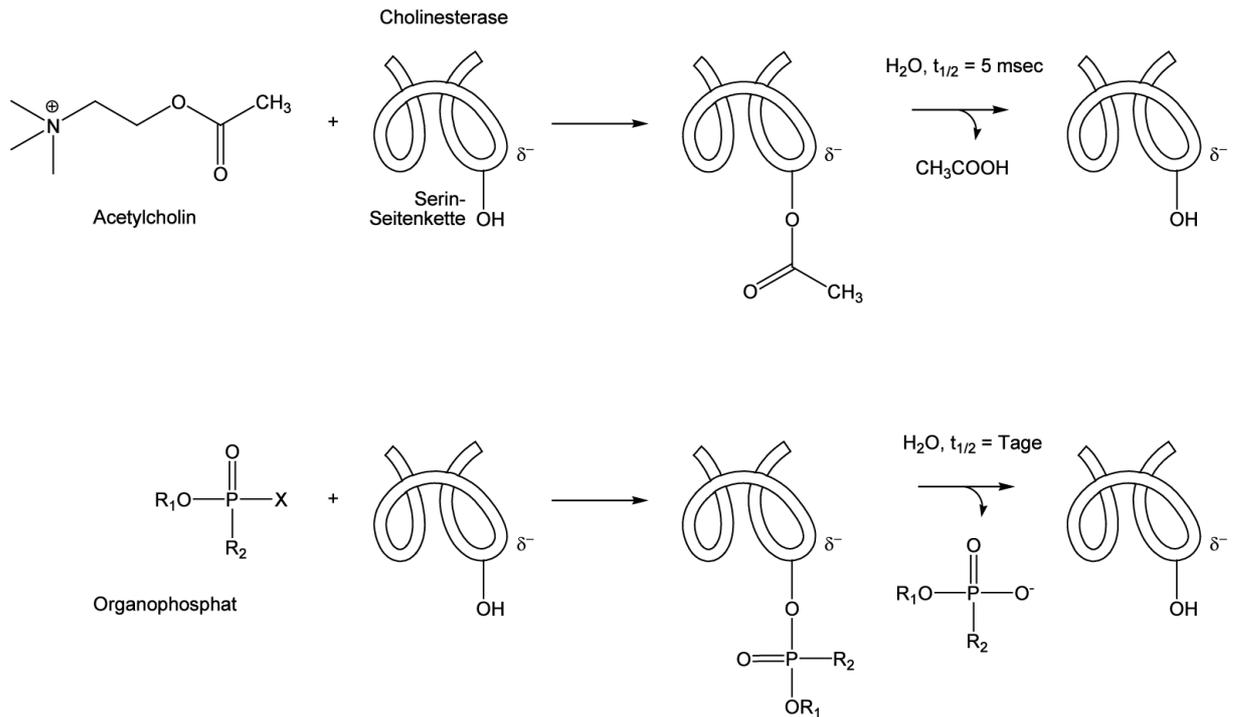
### **2.4.1 *In vitro*-Stabilität der Analyten – Probenasservierung**

#### *2.4.1.1 Enzymatische Degradation*

Sowohl Succinylcholin als auch Succinylmonocholin sind als Di- bzw. Monoester einem enzymatischen Abbau durch Esterasen ausgesetzt. Bereits im Körper führt diese Instabilität zu einem raschen Abbau der Ausgangssubstanz durch Cholinesterasen, welcher sich auch *in vitro*, d.h. nach Probennahme, weiter fortsetzt. Zu der Problematik eines schon *in vivo* stark verkürzten Nachweisfensters kommt also noch das Problem hinzu, den Analytgehalt einer einmal asservierten Probe zu erhalten.

Zur Stabilisierung von SUX und seinem Metaboliten SMC wurde, in Anlehnung an vorherige Arbeiten [2,4-6,14,24,37,38], die Hemmung der BChE durch ein Organophosphat erwogen. Organophosphate hemmen Cholinesterasen irreversibel durch ihre Anbindung an das esteratische Zentrum des Enzyms (Abbildung 2).

---



**Abbildung 2: Irreversible Hemmung von Cholinesterasen durch Organophosphate**

In dieser Abbildung ist das natürliche Substrat Acetylcholin dargestellt.

Die kovalente Komplexierung von Organophosphat und Esterase führt *in vivo* zu einem Überangebot von ACh im synaptischen Spalt und somit zu einer dauerhaften Depolarisation der postsynaptischen Zelle mit sowohl muskarinartigen (Miosis, vermehrte Speichel- und Schweißsekretion, Bronchospasmen, Koliken, Durchfall, Bradykardie) als auch nikotinartigen (Muskelschwäche/-zittern, Krämpfe) Wirkungen. Letztlich kann die Dauerreregung in eine komplette Unterbrechung der Reizweiterleitung mit generalisierten Krampfanfällen, Koma, Atem- sowie Kreislaufdepression münden, und schließlich zum Tod führen.

Für dieses Projekt soll das im Rahmen der Asservierung zuzugebende Organophosphat die in den Realproben vorhandenen Esterasen *in vitro* hemmen. Eine hydrolytische Spaltung der Analyten soll so unterbunden, und ihre Nachweisbarkeit folglich verlängert werden. Nach eingehender Evaluation der o.g. vorhergehenden Ansätze wurde das Organophosphat Paraoxon als bester Kandidat ausgewählt [24]. Paraoxon entsteht nach Aufnahme von Parathion (E 605) durch eine metabolische Giftung, und stellt die eigentlich wirksame Komponente dieses Pestizids dar (Abbildung 3).



#### **2.4.1.2.3 Frier-Tau-Stabilität**

Insbesondere im forensisch-toxikologischen Bereich kann es notwendig sein, eine Probe wiederholt einzufrieren und aufzutauen. Der Einfluss einer solchen Behandlung auf SUX bzw. SMC ist bislang noch nicht eingehend untersucht worden, wird aber in dieser Arbeit thematisiert werden (Kapitel 4.3.2). Bei allen untersuchten forensischen sowie klinischen Realproben wurde auf eine Minimierung der Frier-Tau-Zyklen geachtet.

#### **2.4.1.2.4 Glasadsorption**

Neben dem eigentlichen Abbau der beiden nachzuweisenden Esterverbindungen ist weiterhin zu beachten, dass (bis-)quaternäre Amine an die freien Silanol-Gruppen von Glas anbinden. Für die SUX- und SMC-Analytik hat dieses Verhalten eine Verringerung der apparenten Analytkonzentration in der jeweiligen Probe zur Folge, sobald Glasgefäße zur Asservierung oder während der Aufarbeitung benutzt werden [2,30]. Insbesondere bei niedrigen Konzentrationen, welche gerade in einem forensischen Kontext zu erwarten sind, kann dies zu einem Verlust von bis zu 50 % des nachweisbaren SUX führen [30].

Durch die ausschließliche Verwendung von Plastikgefäßen während der Probenlagerung sowie -aufarbeitung kann dieser Einflussfaktor ausgeschlossen werden [30]. Nach einer eigenen, diesbezüglichen Untersuchung (Kapitel 4.3.1) wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit ausschließlich Kunststoff-Materialien verwendet.

### **2.4.2 In vivo-Stabilität der Analyten – Abbaukinetiken und Ausscheidung**

Der bereits diskutierte, enzymatische Abbau von Succinylcholin sowie Succinylmonocholin durch Esterasen führt zu einem raschen Abbau der Zielsubstanzen im Organismus. Zu diesem Zeitpunkt herrscht Unklarheit darüber, wie lange SUX bzw. SMC in den verschiedenen Probenmatrices nachweisbar ist. Um Analyseergebnisse forensischer Realproben evaluieren und einer Plausibilitätskontrolle unterziehen zu können, sind aussagekräftige pharmakokinetische Modelle notwendig, welche bislang allerdings nur sehr begrenzt und ausschließlich für SUX vorhanden sind [2-4,17]. Der Begriff der Pharmakokinetik soll im Folgenden genauer erklärt, und relevante Termini sollen erläutert werden.

### *2.4.2.1 Allgemeine Pharmakokinetik*

Unter dem Begriff der Pharmakokinetik werden sämtliche Prozesse zusammengefasst, die ein Arzneistoff nach Applikation im (menschlichen) Organismus durchläuft. Die Pharmakokinetik umfasst somit die Freisetzung von Arzneistoffen aus pharmazeutischen Präparaten, ihre Aufnahme in den Blutkreislauf und die damit verbundene Verteilung im Körper, sowie schließlich auch Metabolisierungs- sowie Ausscheidungsprozesse, die zur vollständigen Elimination des Arzneistoffes aus dem Organismus führen. Im Folgenden sollen die pharmakokinetischen Grundlagen, welche für das weitere Verständnis der vorliegenden Arbeit notwendig sind, kurz erläutert werden. Weitergehende Informationen sind z.B. entsprechenden Review-Artikeln [39] oder auch Standardwerken [40] zu entnehmen.

#### *2.4.2.1.1 Wirkstofffreisetzung*

Falls ein Wirkstoff nicht bereits in Lösung appliziert wird, so kann seine Freisetzung ein geschwindigkeitsbegrenzender und folglich wirkungsverzögernder Faktor sein. Dies muss kein unerwünschter Effekt sein, sondern wird (z.B. bei Retardpräparaten, transdermalen therapeutischen Systemen etc.) gezielt genutzt, um die Wirkstärke und/oder die Wirkdauer eines gegebenen Präparates zu steuern.

#### *2.4.2.1.2 Wirkstoffresorption/-absorption*

Resorptive Prozesse bedingen die Aufnahme eines Wirkstoffs in den Blutkreislauf. Ausgehend vom Applikationsort können hierbei (passive oder aktive) Diffusions- sowie aktive Transportvorgänge einen Übertritt des Wirkstoffs in die Blutbahn bewirken. Insbesondere Schleimhäute (z.B. Dünndarm, Nasenschleimhaut etc.) aber auch Lungenepithel und sogar verhornte Haut stellen mögliche Resorptionsflächen dar. Die Resorptionsgeschwindigkeit ist abhängig u.a. von der Größe sowie Durchblutung der resorbierenden Oberflächen. Wenn ein Wirkstoff direkt, z.B. via intravenöser oder intraarterieller Injektion, in die Blutbahn eingebracht wird, so kann ein Einfluss resorptiver Prozesse auf die Wirkstoffkinetik ausgeschlossen werden.

---

### ***2.4.2.1.3 Wirkstoffverteilung***

Unter der Distribution eines Wirkstoffs versteht man seinen Transport zwischen verschiedenen Kompartimenten des Körpers. Die Verteilung schließt selbstverständlich den Transport eines Wirkstoffs vom Blutkreislauf zu seinem Wirkort in einem bestimmten Gewebe ein, sie verläuft allerdings nicht unidirektional sondern ist reversibel (Rückverteilung). Die Verteilung einer Substanz in die verschiedenen Kompartimente des Körpers wird u.a. durch ihre Molekularstruktur, Größe und chemisch-physikalischen Eigenschaften beeinflusst, ist aber auch abhängig von physiologischen Parametern wie z.B. dem pH-Wert oder der Perfusion eines bestimmten Gewebes.

### ***2.4.2.1.4 Metabolisierung***

An verschiedenen Orten des Körpers, insbesondere jedoch in der Leber, führen vielfältige Abbauprozesse zu einem Wirkverlust körperfremder Stoffe, und ermöglichen ihre spätere Ausscheidung. Man unterscheidet in diesem Zusammenhang Phase-I und Phase-II-Reaktionen: Der Phase-1-Metabolismus beinhaltet z.B. Oxidations- und Reduktionsreaktionen, die häufig von Oxidoreduktasen aus der Familie der Cytochrom-P450-Enzyme katalysiert werden. Auch hydrolytische Spaltungen, wie sie für SUX und SMC relevant sind, werden zum Phase-1-Metabolismus gezählt. Durch die Phase-1-Metabolisierung wird üblicherweise eine Abnahme der Wirksamkeit von Xenobiotika erreicht, aber auch eine Aktivierung sog. „Prodrugs“ (z.B. L-Dopa, Heroin etc.) bzw. Giftung vormals inaktiver Komponenten (s. Parathion, Abbildung 3) ist möglich.

Dem Phase-2-Metabolismus werden Kopplungsreaktionen, z.B. die forensisch höchst relevante Glucuronidierung zugerechnet, welche zur Steigerung der Hydrophilie und somit leichteren Ausscheidung körperfremder Stoffen führen. Die Gesamtheit der Abbauprozesse wird auch als Biotransformation bezeichnet, ihre (Zwischen-)Produkte heißen Metabolite.

#### **2.4.2.1.5 Ausscheidung**

Die Elimination von Fremdstoffen oder ihrer Metaboliten aus dem Körper findet meist über Niere und Urin (renal) statt, aber auch eine Ausscheidung über Galle und Fäzes (biliär) ist möglich. Eine (ausbleibende) Rückresorption von Stoffen aus dem Primärurin bzw. im Rahmen eines sog. enterohepatischen Kreislaufes kann für Wirkungen (z.B. orale Kontrazeptiva) sowie Neben- oder Wechselwirkungen (z.B. Diuretika) relevant werden.

#### **2.4.2.1.6 Pharmakokinetische Parameter**

Die oben ausgeführten Prozesse können je nach Substanz und/oder Darreichungsform sehr unterschiedlich ablaufen. Zur Beschreibung einer entsprechenden substanz- oder darreichungsspezifischen Kinetik können aus geeigneten Rohdaten Geschwindigkeitskonstanten für die verschiedenen beteiligten Prozesse abgeleitet werden: ermittelte Plasmakonzentrations-Zeit-Profile können so z.B. zur Berechnung von Absorptions-, Distributions-, Metabolisierungs- sowie Eliminationskonstanten etc. verwendet werden. Auch forensisch relevante Kenndaten wie z.B. Distributions- und Eliminationshalbwertszeiten, die Volumina ggf. verschiedener Verteilungsräume eines Wirkstoffs, seine mittlere systemische Verweilzeit sowie seine Clearance etc. können anhand von Plasmakonzentrationsverläufen berechnet werden.

Nach Erläuterung der generellen Prinzipien der Pharmakokinetik sind diese Vorgänge mit ihrer Bedeutung für SUX sowie SMC, den Zielsubstanzen der gegenständlichen Arbeit, im Folgenden nachvollziehbar.

#### **2.4.2.2 Theoretische Grundlagen der SUX-Kinetik**

Wenn SUX im Rahmen seiner klinischen Anwendung durch eine intravenöse Bolusinjektion appliziert wird, sind Freisetzungs- sowie Aufnahmeeffekte für die Kinetik dieser Substanz irrelevant, vielmehr stellt nach erfolgter intravenöser Applikation die Verteilung des Wirkstoffs im Körper den ersten fassbaren pharmakokinetischen Parameter dar. In Fällen aus der forensischen Praxis kann es dagegen durchaus zu Applikationsarten des Wirkstoffs kommen, für die zumindest Aufnahmeeffekte angenommen werden müssen – zu nennen sind in diesem Zusammenhang z.B. intramuskuläre Injektionen [19,20,32,37]. In derartigen Fällen

---

---

ist ein verlangsamter Wirkungseintritt wahrscheinlich, der für die Begutachtung relevant sein kann.

Für SUX ist eine extensive Umverteilung beschrieben worden, welche neben dem enzymatischen Abbau als dominierender Faktor für den schnellen Konzentrationsabfall im Blut gewertet werden kann [3,17,27]. Aufgrund des schnellen Abbaus von SUX ist eine genaue Berechnung des Verteilungsvolumens allerdings äußerst schwierig, und seine Unterschätzung wahrscheinlich [4]. Literaturwerte für diesen Parameter sind daher sehr unterschiedlich [3,4,17], und konnten bislang maximal den Intravasalraum als Verteilungsraum bestätigen [4].

Daten zum kinetischen Abbau von SUX führten in der aktuellsten Arbeit zur Postulierung eines Zwei-Kompartimentmodells [4], wobei in forensischen Arbeiten eine dosisabhängige Anreicherung von SUX in Geweben, z.B. Muskelgewebe, mit nur sehr langsamer Rückverteilung aus diesem Kompartiment beschrieben wird [20,37].

SUX wird bereits während seiner Verteilung im Körper durch die unspezifische Serum-Butyrylcholinesterase (BChE, EC 3.1.1.8) über SMC zu Succinat und Cholin abgebaut ([2-5,8,11]; s. auch Kapitel 2.1), und ist nur über wenige Minuten nachweisbar [3-5,17]. Neben den Abbauprodukten wird auch die unveränderte Muttersubstanz, allerdings nur in Absolutmengen von wenigen Prozent der Initialdosis, renal ausgeschieden [8,15,34].

#### *2.4.2.3 Theoretische Grundlagen der SMC-Kinetik*

Erst mit der Metabolisierung von SUX und der damit verbundenen Entstehung von SMC beginnt die Pharmakokinetik des Metaboliten, seine „Freisetzung“ aus der Ausgangssubstanz stellt den ersten Schritt der Pharmakokinetik dieser Substanz dar. Nach intravenöser Applikation von SUX kann angenommen werden, dass ein signifikanter Anteil von SMC direkt im Blutkreislauf freigesetzt wird, so dass also auch in diesem Fall keine Aufnahmeprozesse im üblichen Sinne kalkuliert werden müssen. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass SUX nach einer schnellen Verteilung in die Gewebe auch dort durch gewebebeständige Esterasen in relevantem Maße metabolisiert wird, und somit eine Absorption von im Gewebe freigesetztem SMC in die Gefäße ein geschwindigkeitsbestimmender Schritt für die Kinetik des Metaboliten sein könnte. Über das Distributionsverhalten von SMC im menschlichen Körper liegen keine Daten vor, im Tiermodell verlief die Umverteilung allerdings langsamer als die von SUX [27].

---

Metabolisierung von SMC führt zur Entstehung der körpereigenen Substanzen Succinat und Cholin (s. auch Kapitel 2.1), wobei die geltende Einschätzung, dass der hydrolytische Abbau von SMC langsamer stattfindet als der von SUX, bislang nur auf *in vitro* Untersuchungen basiert [3,6-9,28]. *In vivo*-Nachweisfenster für SMC sind bislang noch nicht publiziert. Eine Eliminierung von SMC aus dem Körper findet nicht nur durch besagte Metabolisierung, sondern auch durch eine vorwiegend renale Ausscheidung von unverändertem SMC statt [8,15,34].

#### 2.4.2.4 Studiendesign

Abhängig von der zu klärenden Fragestellung muss eine klinische Studie nach unterschiedlichsten Vorgaben konzipiert werden, wobei das Studiendesign maßgeblich die Aussagekraft der erhaltenen Daten beeinflusst.

Das Studiendesign umfasst eine Vielzahl experimenteller sowie logistischer Gesichtspunkte, die bereits vor Studienbeginn klar festgelegt sein müssen. In diesem Kontext ist u.a. die Auswahl der Probanden, ihre Behandlung (z.B. applizierte Medikamentendosis etc.), die Art und Anzahl der zu entnehmenden Probe(n), jeder zu messende Parameter, die genaue Versuchsdurchführung sowie alle verwendeten Materialien exakt zu definieren, und die Konzeption abschließend auf Durchführbarkeit sowie Sinnhaftigkeit zu überprüfen.

Für die vorliegende Arbeit wird ein bezüglich Geschlecht, Gewicht, Alter, Begleiterkrankungen etc. möglichst heterogenes Kollektiv von Probanden rekrutiert, um eine Vielzahl potentiell forensisch relevanter Eigenschaften einzubinden. Kinetische Daten werden nach einmaliger, intravenöser Bolusinjektion von SUX anhand von Plasmaproben erhoben. Die Ausscheidung beider Zielanalyten wird anhand von Urinproben der Probanden systematisch untersucht.

Grundsätzliche Überlegungen zum experimentellen Vorgehen bei dieser Studie sind in den folgenden Abschnitten kurz erläutert, auf die Zusammensetzung des Kollektivs, geltende Ausschlusskriterien und andere Einzelheiten soll jedoch erst in 3.12 detailliert eingegangen werden.

---

#### 2.4.2.5 *Plasmagewinnung*

Für die geplante kinetische Studie muss Plasma und nicht etwa Serum als Untersuchungsmatrix gewonnen werden: ein Gerinnen der Vollblutprobe für die anschließende Gewinnung von Serum würde 20-30 min dauern, die Probenvorbereitung muss allerdings möglichst kurz gehalten werden, um Analytverluste bzw. insbesondere eine Konvertierung von SUX in SMC, und somit eine mögliche Verfälschung der kinetischen Daten, weitgehend zu vermeiden.

Zur Gewinnung von Plasma wird in der klinischen Routine Heparin sowie EDTA verwendet, standardisierte Probennahmesysteme sind daher für beide Zusätze erhältlich. Um in dieser Studie das für die nachfolgende Analytik notwendige Minimum von 1-2 ml Plasma je Probennahme gewinnen zu können, müssen jeweils ca. 3-4 ml Vollblut entnommen werden. EDTA-Röhrchen sind im Vergleich zu Heparin-Monovetten in Größen von 4 ml gegenüber 5.5 ml Füllvolumen zu beziehen, aufgrund der geringeren Probandenbelastung wäre eine Entnahme mittels der etwas kleineren EDTA-Röhrchen erstrebenswert.

Insbesondere Heparin [2,3,5,8] aber auch EDTA [2] wurde bereits erfolgreich für Arbeiten zur Erforschung der Pharmakokinetik von SUX eingesetzt, Erfahrungen für SMC liegen nur sehr begrenzt vor [9].

Da eine Ionenpaarbildung von EDTA mit verschiedenen Alkylammoniumionen beobachtet, und veränderte Extraktionseigenschaften des resultierenden Komplexes beschrieben wurden [41], muss ein Einsatz von EDTA in der geplanten Studie jedoch als potentiell problematisch gewertet werden. Die Eignung von EDTA- gegenüber Heparin-Entnahmesystemen für die gegenständliche Fragestellung ist daher vor Studienbeginn zu prüfen.

#### 2.4.2.6 *Stabilisierung*

Es ist aus Vorarbeiten bekannt, dass SMC nur verhältnismäßig langsam von der unspezifischen Serum-Cholinesterase abgebaut wird [6,9,28,29], eine Stabilisierung dieses Analyten in Blutproben könnte daher überflüssig erscheinen. Im Gegensatz zu SUX stellt SMC jedoch ein Substrat für echte Cholinesterasen dar [7], wobei die Existenz von spezifischen, membranständigen Esterasen in roten Blutkörperchen und Lymphozyten [7,42,43] in diesem Zusammenhang die Möglichkeit zulässt, dass SMC im Vollblut nicht weniger hydrolyse-anfällig ist als SUX, sondern ebenfalls einer Stabilisierung bedarf.

Da sich folglich die Erfordernisse für eine ausreichende Analytstabilisierung in Vollblut von den bisher ausschließlich anhand von Serum oder Plasma optimierten Bedingungen unterscheiden könnten, ist im Hinblick auf die Studienbedingungen zu prüfen, bei welcher Paraoxon-Konzentration im Vollblut (37°C) die Stabilisierung von sowohl SUX als auch SMC optimal ist.

#### *2.4.2.7 Probennahmeplan*

Um sowohl den SUX- als auch den SMC-Abbau im Blutkreislauf abbilden zu können, müssten kurz nach SUX-Einleitung sehr engmaschige Probennahmen erfolgen (zur Erfassung des SUX-Abbaus, [2,4]), die sich unter Vergrößerung der Probenabstände bis mehrere Stunden nach SUX-Gabe hinziehen sollten (für die SMC-Kinetik). Als limitierender Faktor ist bei der Planung des Probenentnahmeschemas allerdings zu beachten, dass nur eine begrenzte Anzahl von Blutabnahmen je Patient ohne körperlichen Schaden für diesen durchgeführt werden können: da für die Ausgangssubstanz SUX im Gegensatz zu SMC bereits pharmakokinetische Datensätze existieren [2-4,17], wird in der vorliegenden Arbeit daher besonderes Augenmerk auf die Erstellung einer SMC-Kinetik gelegt. Das Probenabnahmeschema wird entsprechend konzipiert: zugunsten eines Probennahmeintervalls von insgesamt ca. 6 Stunden je Patient wird akzeptiert, dass in den ersten Minuten statt 5-sekündlich (wie für eine komplette SUX-Kinetik nötig wäre) nur höchstens ca. 20-sekündlich eine Blutprobe entnommen wird. Diese Vorgehensweise soll die Überprüfung der bereits publizierten Daten zum SUX-Abbau und somit die Fixierung eines forensischen Nachweisfensters für diese Substanz im Plasma zulassen, und zugleich einen klaren Fokus auf die erstmalige Erhebung aussagekräftiger pharmakokinetischer Daten ihres Metaboliten setzen.

Frisch sezernierter Urin wird in Abständen von 1-2 Stunden über das gesamte Probennahmeintervall gewonnen, um den zeitlichen Verlauf der Elimination verfolgen und forensische Nachweisfenster formulieren zu können. Zur Abbildung der Analytausscheidung in der Anfangsphase der Narkose wird, insbesondere um ein eventuelles „Verpassen“ von SUX auszuschließen [15], bei Teilen des Kollektivs zusätzlich der gesammelte (gepoolte) Urin der ersten Stunde nach SUX-Einleitung analysiert.

---

---

Die erhaltenen Plasma-Konzentrationsdaten werden in ein kinetisches Modell für den Abbau von SMC umgesetzt. Aus der Summe der gesammelten Daten werden die zu erwartenden forensisch relevanten Nachweisfenster beider Analyten in den untersuchten Probenmatrices abgeleitet. Auf Basis des entwickelten Modells werden Empfehlungen zur Probennahme in SUX-Verdachtsfällen formuliert, die bei korrekter Umsetzung eine maximale Nachweiswahrscheinlichkeit sicherstellen können.

## **2.5 Endogenes SMC**

Anspruchsvolle Analytik und mangelnde Stabilität stellen nicht die einzigen Probleme auf dem Weg zu einem zweifelsfreien SUX-Nachweis dar. Die verlässliche Diagnose einer Intoxikation mit dieser Substanz wurde darüber hinaus durch den kürzlich berichteten Nachweis von SMC in garantiert SUX-negativen Kontrollgeweben erschwert: durch diesen Befund wird die Anwendbarkeit des als stabiler geltenden SUX-Metaboliten als definitiver Marker für eine Verabreichung der Muttersubstanz erheblich in Frage gestellt [24,25].

Gerade Gewebe wie frisch-postmortale Leber, Niere und Gehirn, welche sich zuvor durch verhältnismäßig hohe Analytgehalte als nützlich für Untersuchungen auf eine etwaige prä-mortale SUX-Gabe erwiesen haben [18,19,24], wurden gleichzeitig als fast ausschließlich positiv für natives SMC beschrieben [24,25].

Eine systematische forensische Studie, die sich auf exakt diese diskutierten Gewebetypen bezieht, wird im Rahmen der vorliegenden Arbeit nach signifikanten Unterschieden in den Analytgehalten von SUX- gegenüber nicht-SUX-assoziierten Todesfällen suchen, und so die Anwendbarkeit von SMC als SUX-Marker abschließend bewerten. Um mögliche Lagerungsartefakte ausschließen und eine Vergleichbarkeit der Proben gewährleisten zu können, werden nicht nur frische SUX-negative Obduktionsproben in die Studie eingeschlossen, sondern auch solche Kontrollproben analysiert welche für ca. 2 Jahre bei -20°C eingefroren waren, d.h. etwa so lange wie die Proben des SUX-Intoxikationsfalls mit denen sie verglichen werden sollen.

---

## **2.6 *Alternative Probenmatrices***

Wie schon berichtet haben sich vor allem Leber, Niere und Gehirn als gute Ausgangsgewebe für den Nachweis einer vorangegangenen SUX-Gabe erwiesen [18,19,24], darüber hinaus wurden jedoch auch andere Gewebe erfolgreich auf eine Eignung für die SUX-Analytik hin getestet (Milz [24], tierisches Muskelgewebe von der Injektionsstelle [19]). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird auch die Eignung von Glaskörperflüssigkeit als neue und vielversprechende Zielmatrix für einen SUX-Nachweis untersucht: der wässrige Probencharakter sowie der relativ geringe Cholinesterase- [44] und insbesondere BChE-Gehalt [45] von Glaskörperflüssigkeit erscheinen vorteilhaft für die SUX-Analytik. Im Tierversuch hat sich darüber hinaus das Auge als gute Gewebeprobe für eine SUX-Untersuchung erwiesen [18]. Auch für diese Matrix ist natürlich eine Aussagekraft der erhaltenen Daten nur gegeben, wenn das Vorhandensein von endogenem SMC ausgeschlossen werden kann. Entsprechende Untersuchungen auf natives SMC werden daher analog zu den anderen Gewebeproben durchgeführt und ausgewertet. Um Lagerungsartefakte ausschließen zu können und eine Vergleichbarkeit mit den forensischen Realproben der SUX-Intoxikation zu gewährleisten, werden archivierte Glaskörperflüssigkeitsproben (ca. 2-jährige Lagerung bei -20°C) für diesen Teil der Arbeit analysiert.

## **2.7 *Methodische Grundlagen***

### **2.7.1 Einführung in die HPLC-MS/MS**

Die HPLC-MS/MS-Technologie hat in den letzten Jahren zunehmend Einzug sowohl in die analytische Chemie als auch insbesondere in die forensische Toxikologie gehalten, wo sie vor allem für die hoch sensitive Detektion insbesondere von polaren und hitze-labilen Analyten geschätzt wird [46-48]. Aufgrund eben dieser Charakteristika kann sie auch als ideales Verfahren für die SUX-Analytik angesehen, und zur Bearbeitung der bisher genannten Fragestellungen herangezogen werden. Im Folgenden sollen die physikalischen sowie technischen Grundlagen der für die vorliegende Arbeit verwendeten Techniken kurz umrissen werden.

---

### 2.7.1.1 Ionenquelle (Interface) - Elektronensprayionisation

Bei der Elektrosprayionisation (ESI) wird das HPLC-Laufmittel mit den darin gelösten und flüssigkeitschromatographisch aufgetrennten Analyten bei Atmosphärendruck fein versprüht, und in das Hochvakuum des Massenspektrometers geleitet [49]. Dies geschieht, indem das HPLC-Effluent durch eine Kapillare geleitet wird, an die eine Hochspannung ( $\pm 5$  kV) angelegt ist. Dadurch entsteht ein Nebel kleinster ( $0.5 - 1 \mu\text{m}$ ) aber stark geladener Lösemitteltröpfchen. Bei den Geräten der neuen Generation wird dieser Prozess durch Zuleitung eines Vernebelungsgases ( $\text{N}_2$ ) noch unterstützt, um ein konstantes Spray zu erzeugen. Die vorwiegende Ladung der entstehenden Ionen wird durch die Polarität der angelegten Hochspannung bestimmt, wodurch gezielt ein Überschuss positiver oder auch negativer Teilchen erzeugt werden kann.

Es werden zwei mögliche Theorien diskutiert, wie im Folgenden die Ionen von der flüssigen in die Gasphase übertreten: im Rahmen des „Ion-Desorption-Model“ gehen Iribarne und Thomson [50] davon aus, dass mit der Evaporation des Lösemittels eine Erhöhung der Ladungsdichte in den Tröpfchen des Sprays einhergeht. Übersteigt die Ladungsdichte den kritischen Punkt, an dem sich die Abstoßung der Ladungen und die Oberflächenspannung innerhalb der Tröpfchen die Waage halten, findet eine sog. Coulomb-Explosion statt, welche das Lösemitteltröpfchen in kleinere Aggregate zerreißt. Es folgen weitere Zyklen aus Evaporation und Coulomb-Explosion, bis schließlich das anliegende elektrische Feld stark genug ist, Ionen aus den verbliebenen Lösemitteltröpfchen zu desorbieren und somit zu isolieren.

Röllgen et al. [51] gehen demhingegen bei ihrer Theorie des „Charge Residue Model“ von einer einfachen Verdampfung aus, bei der die Ionen enthaltenden Lösemitteltröpfchen durch Evaporation fortwährend geschrumpft werden, bis schließlich isolierte Ionen freigesetzt werden.

Die entstandenen Analytionen werden im oben schon erwähnten elektrischen Feld in Richtung des Massenanalysators beschleunigt und durch die zunehmend kleineren Öffnungen zweier Lochblenden (der „Curtain Plate“ vorne und dem dahinterliegenden „Orifice“) in den Hochvakuumbereich des Spektrometers geleitet. Zwischen diesen beiden Platten sorgt ein Gasstrom („Curtain gas“) für eine weitere Zerschlagung von potentiell vorhandenen Clustern aus Ionen und angelagerten, ungeladenen Teilchen. Das Prinzip der Elektrosprayionisation ist in Abbildung 4 visualisiert.

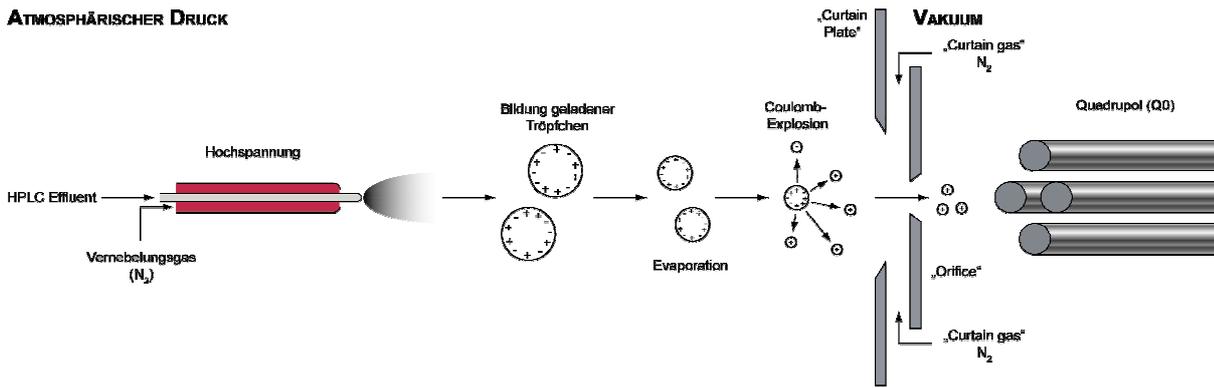


Abbildung 4: Prinzip der Elektrosprayionisation (ESI)

### 2.7.1.2 Das Triple-Quadrupol-Massenspektrometer

Die durch die Curtain Plate gelangten Ionen werden am Orifice einer Spannung, dem „declustering potential“ (DP) ausgesetzt, wodurch die abschließende Zerstörung von Lösemittelclustern in diesem Bereich maßgeblich beeinflusst werden kann. Die Teilchen werden daraufhin durch den Fokussier-Ring und die daran angelegte Spannung, dem „focusing potential“ (FP), durch den Skimmer in den Quadrupol Q0 transferiert. Von dort werden die Ionen über die erste Interquad-Linse (IQ1) und den Quadrupol-Vorfilter (Stubbies, ST) in den ersten Massenfilter Q1 übertragen. Der Q1 wie auch der gleichartige Q3 erlangt seine Fähigkeit zur Ionenselektion durch Überlagerung einer Gleich- und Wechselspannung an den jeweils gegenüberliegenden Stäben des Quadrupols: im Inneren des Quadrupols befindliche Ionen beginnen, abhängig von ihrem Masse-Ladungs-Verhältnis sowie der Stärke bzw. Frequenz der anliegenden Spannungen, zu oszillieren. Selektierte Ionen können den Massenfilter passieren und nach Durchtritt der IQ2 in die Kollisionskammer Q2 eintreten, alle anderen Ionen jedoch werden durch ihre Oszillation an einen der Quadrupol-Stäbe herangetragen und dort neutralisiert.

In der Kollisionszelle, einem Quadrupol in einem mit inertem Gas befüllbaren Keramikgehäuse, können Probenmoleküle sowohl mit sich selbst als auch mit den umgebenden Gasparkeln zur Kollision gebracht werden, was einen Zerfall der Vorläuferionen in ihre Produktionen bewirkt. Der beschriebene Prozess wird als kollisionsaktivierte Dissoziation („Collisionally Activated Dissociation“, CAD) bezeichnet.

Die Produktionen werden daraufhin über die IQ3 in den zweiten Massenanalysator Q3 fokussiert, und dort anhand ihres Masse-Ladungs-Verhältnisses erneut separiert. Die Deflektorspannung (DF) beschleunigt die Ionen zum Detektor, wo sie durch ihren Aufprall einen Elektronenpuls erzeugen. Dieses Signal wird in der Folge verstärkt, digital konvertiert und aufgezeichnet.

Der schematische Aufbau des für diese Arbeit verwendeten PE Sciex API 2000 Triple-Quadrupol-Massenspektrometers ist in Abbildung 5 dargestellt.

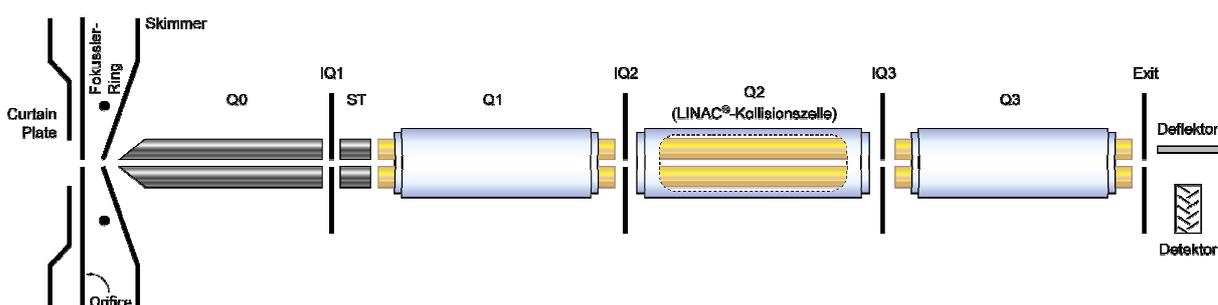


Abbildung 5: Schematischer Aufbau des PE Sciex API 2000 Triple-Quadrupol-Massenspektrometers

### 2.7.1.3 Messmodi und Methodenentwicklung

Im Folgenden sollen die im Rahmen dieser Arbeit angewandten LC-MS/MS-Messmodi und das generelle Vorgehen zur apparativen Methodenentwicklung kurz umrissen werden.

#### 2.7.1.3.1 Q1-Scan

Bei einem Q1-Scan werden (innerhalb eines vorgegebenen Massenintervalls) alle von der Ionenquelle gebildeten Analytionen ohne Fragmentierung im Q2 bzw. Selektion in Q1 oder Q3 direkt detektiert. Der Q1-Scan einer Reinsubstanzlösung liefert im Rahmen der analytischen Methodenentwicklung somit Informationen über die Häufigkeit der Entstehung einzelner Ionen, und dient der Vorauswahl besonders nachweisstarker Vorläuferionen. Die MS-internen Abläufe während eines Q1-Scans sind schematisch in Abbildung 6 dargestellt.

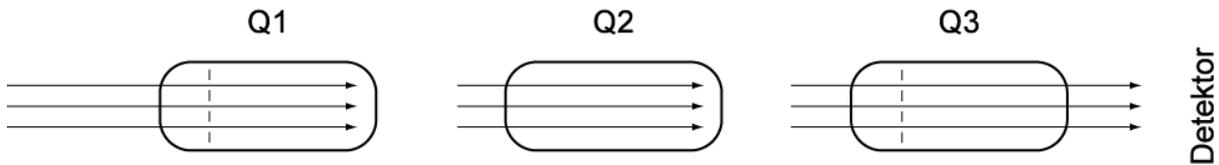


Abbildung 6: Schematischer Ablauf eines Q1-Scans

### 2.7.1.3.2 Produktionenscan

Beim Produktionenscan wird ein im Q1 selektiertes Vorläuferion in der Kollisionskammer Q2 fragmentiert, und alle entstehenden Produktionen ohne weitere Selektion im Q3 detektiert. Der Produktionenscan als zweiter Schritt der apparativen Methodenentwicklung liefert also Informationen über die Häufigkeit der Entstehung einzelner Analytfragmente, und dient der Auswahl besonders nachweisstarker Produktionen. Abbildung 7 stellt die Vorgänge während eines Produktionenscans schematisch dar.

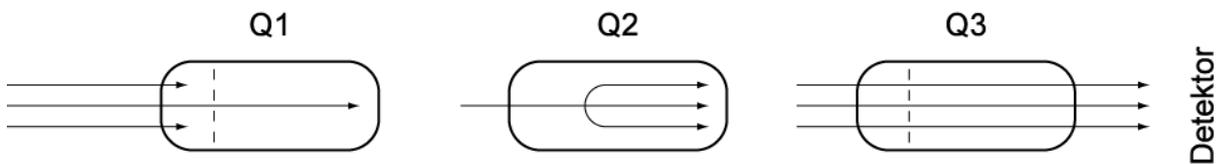
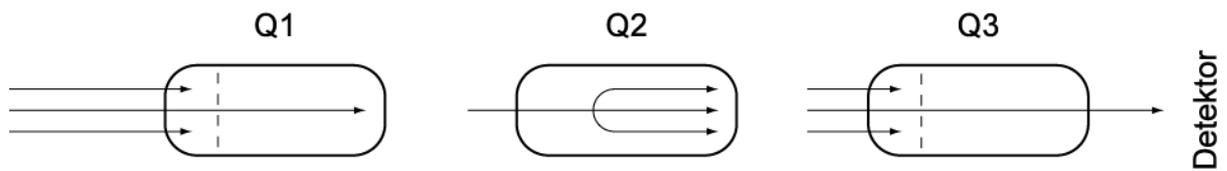


Abbildung 7: Schematischer Ablauf eines Produktionenscans

### 2.7.1.3.3 Multiple Reaction Monitoring (MRM)

Im Rahmen eines MRM-Experimentes wird nur ein ausgewähltes Produktion eines definierten Vorläuferions detektiert. Als letzter Schritt der LC-MS/MS-Methodenentwicklung können aus den gesammelten Informationen von Q1- und Produktionenscans die nachweisstärksten Ionenübergänge ermittelt und in einer MRM-Methode kombiniert werden. Eine nachfolgende Feinoptimierung der Geräteparameter für jeden individuellen Übergang stellt beste Ergebnisse, d.h. eine maximale Sensibilität der resultierenden Analysenmethode sicher. Abbildung 8 stellt das Prinzip des MRM schematisch dar.



**Abbildung 8: Schematischer Ablauf eines MRM-Experiments**

Mittels Tandem-MS werden also nur charakteristische Produktionen von ausgewählten Vorläuferionen detektiert, Kontaminanten werden daher im Gegensatz zur einfachen Massenspektrometrie im Normalfall nicht erfasst.

## 2.7.2 Interne Standardisierung mittels Isotopenmassenspektrometrie

### 2.7.2.1 Prinzip der internen im Vergleich zur externen Standardisierung

Die externe Standardisierung ist die unsicherste aller Standardisierungsmethoden zur Quantifizierung von Analyten: verschiedene Konzentrationen eines Analytstandards werden dabei in Form einer Kalibriergeraden vermessen, und unbekannte Probenkonzentrationen über diese Gerade determiniert. Problematisch bei diesem Vorgehen ist, dass Analytverluste (z.B. Extraktionsverluste) nicht oder nur unzureichend einbezogen werden können, wobei jedoch eine extrahierte Kalibrierung diese Mängel ansatzweise zu kompensieren vermag.

Die interne Standardisierung mittels nicht deuterierter interner Standards stellt demgegenüber bereits einen Fortschritt dar: die Zugabe einer Substanz mit ähnlichen physikochemischen Eigenschaften wie die des Analyten ermöglicht eine Dokumentation der Analytverluste über die Extraktion. Die Grenzen dieser Methodik sind jedoch ganz klar darin zu sehen, dass es sich nur um strukturell verwandte, nicht jedoch identische Substanzen handelt, d.h. der interne Standard verhält sich während der Extraktion teilweise anders als der Analyt und kann daher nicht als absolut verlässlicher Bezug gewertet werden.

Bei der internen Standardisierung mittels deuterierter Analoga der jeweiligen Analyten, der sog. Isotopenmassenspektrometrie („isotope dilution“-MS), haben die Standardsubstanzen die gleichen physikochemischen Eigenschaften wie die entsprechenden Analyten, sind jedoch mittels Massendetektion von letzteren zu unterscheiden. Diese Form der internen Standardisierung stellt die optimale Methode zur Quantifizierung dar, da in diesem Fall die Standardsubstanz einen maximal verlässlichen Bezug darstellt.

### 2.7.3 Design der internen Standards

Zur Entwicklung einer validen Methodik für die simultane Detektion von SUX und SMC sind entsprechende interne Standards (ISTDs), bestenfalls deuterierte Analoga der Ausgangssubstanzen, unentbehrlich. Für SUX haben einige Publikationen bereits über den Einsatz verschiedener deuterierter interner Standards, genauer SUX-d<sub>12</sub> [22,23] und SUX-d<sub>6</sub> [1,3], berichtet. Nur in zwei Studien wurde darüber hinaus bereits ein deuterierter interner Standard für die Detektion von SMC eingesetzt, die verwendete Substanz SMC-d<sub>4</sub> wurde jedoch in beiden Fällen durch die gezielte Hydrolyse von SUX-d<sub>8</sub>, dem jeweils etablierten internen Standard für SUX, gewonnen [24,25]. Da SUX jedoch *in vitro* sowohl enzymatisch bzw. sogar spontan zu SMC hydrolysiert, ist eine unkontrollierbare Umsetzung des SUX-d<sub>8</sub> in SMC-d<sub>4</sub> unvermeidlich. Eine derartige Konvertierbarkeit eines internen Standards in den anderen macht die simultane Bestimmung der Analytkonzentrationen beider Substanzen unmöglich bzw. im quantitativen Ergebnis höchst unsicher. Nach dem jetzigen Kenntnisstand ist bislang keine parallele Extraktion und Detektion von SUX sowie SMC mittels Isotopenmassenspektrometrie gelungen.

Da deuterierte Analoga für keine der beiden Ausgangssubstanzen kommerziell verfügbar sind, war die erfolgreiche Synthese der internen Standards mit Nachweis sowohl ihrer chemischen Identität als auch ihrer Reinheit das erste Ziel dieser Arbeit.

Die Synthese der beiden internen Standards muss derart konzipiert werden, dass ein unterschiedliches Deuterierungsmuster der Trimethylamingruppen des SUX- im Vergleich zum SMC-Standard resultiert. Andernfalls könnte, aufgrund der bereits erwähnten Degradation von SUX zu SMC, der angestrebte simultane Einsatz der beiden internen Standards zu einer fehlerhaften Datenerhebung führen: wenn das Abbauprodukt des internen Standards für SUX identisch mit dem internen Standard für SMC ist, so beeinflusst dies die Quantifizierung der beiden Analyten insofern, als dass die SMC-Konzentration drastisch unterschätzt werden könnte. Die hier gewählten Derivate SUX-d<sub>18</sub> und SMC-d<sub>3</sub> gewährleisten jedoch eine korrekte Bestimmung des Metaboliten SMC, da SMC-d<sub>9</sub> – das zu erwartende Abbauprodukt von SUX-d<sub>18</sub> – mithilfe der Massenspektrometrie leicht vom internen Standard SMC-d<sub>3</sub> unterschieden werden kann (Abbildung 9). Zur Verdeutlichung sind die unterschiedlich deuterierten Trimethylamingruppen der verschiedenen Substanzen in der folgenden Grafik grau unterlegt.

---

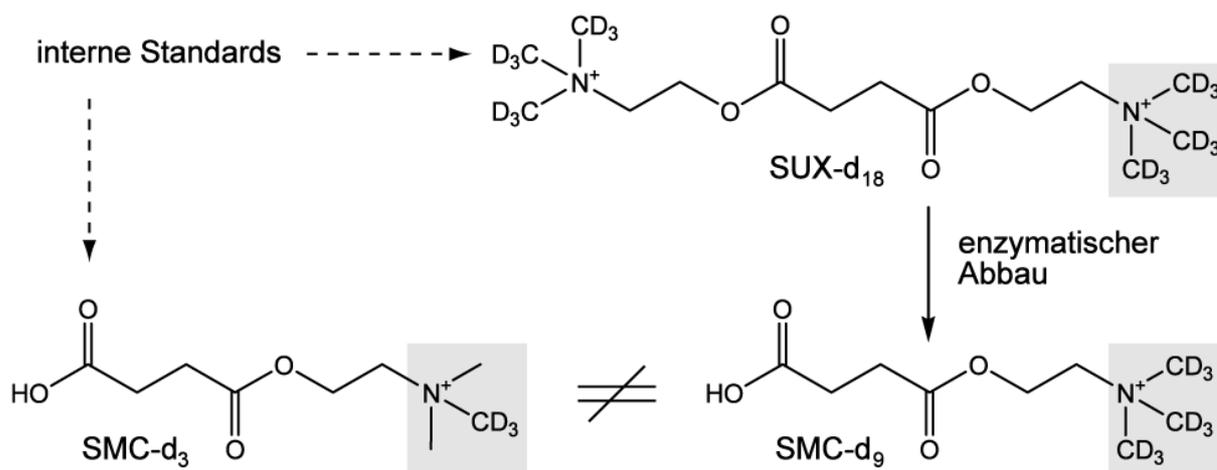


Abbildung 9: Synthesendesign der internen Standards für SUX und SMC

Einige Publikationen stellen Methoden zur Synthese von sowohl SUX [52-54], SUX-d<sub>12</sub> (über Cholin-d<sub>6</sub> [19]), möglichen (deuterierten) SUX-Vorläufern wie z.B. Cholin-d<sub>9</sub> [55] oder Desmethyl-SUX [18], als auch SMC [56] vor.

#### 2.7.4 Einführung in die Qualitätskontrolle

Trotz aller Stärken der HPLC-MS/MS-Analytik müssen auch die mit dieser Technik assoziierten Probleme erkannt, und während der individuellen Methodenentwicklung überwunden werden: gerade in der forensischen Toxikologie ist es von ultimativer Wichtigkeit, dass die Qualität und Zuverlässigkeit der eingesetzten Verfahren jederzeit sichergestellt ist, um eine Gerichtsverwertbarkeit der jeweiligen Analysenergebnisse zu gewährleisten. Bei selbst entwickelten Verfahren ist es daher notwendig, dass sowohl die Leistungsmerkmale einer gegebenen Methode exakt bestimmt, als auch die Qualität und Zuverlässigkeit des Analysenverfahrens im Routinebetrieb nachgewiesen werden. Man spricht in diesem Zusammenhang von der „Validierung“ einer Methode, wobei es speziell für den forensisch-toxikologischen Themenbereich genaue Vorgaben bezüglich des Umfangs einer solchen Validierung gibt [57,58]. Ihre Kernpunkte sollen im Folgenden kurz erläutert werden:

#### *2.7.4.1 Selektivität und Spezifität*

Unter der Spezifität einer Methode versteht man ihr Vermögen, einen zu bestimmenden Analyten oder eine Substanzklasse ohne Interferenz durch andere Probenkomponenten (konkurrierende Substanzen, Matrix etc.) zu detektieren. Die Selektivität einer Methode beschreibt darüber hinaus ihr Potential, mehrere parallel zu bestimmende Analyten ohne gegenseitige Beeinflussung oder auch eine Störung durch andere Probenkomponenten zu bestimmen und zu quantifizieren.

Zum Zweck der Feststellung der Selektivität und Spezifität einer gegebenen Analysenmethode wird zunächst 6-mal reine Leermatrix, und in einem Folgeschritt 2-mal Leermatrix mit zudotiertem internen Standard aufgearbeitet. Es muss hierbei gezeigt werden, dass in der reinen Leermatrix keine Störsignale auftreten, welche die Detektion und Quantifizierung der zu bestimmenden Analyten beeinflussen. Gleichsam muss sichergestellt werden, dass der verwendete interne Standard nicht mit der Detektion der Zielanalyten interferiert, oder gar Spuren dieser Analyten enthält (zu erwarten z.B. bei unvollständiger Deuterierung der internen Standards bei der Isotopenmassenspektrometrie).

#### *2.7.4.2 Linearität*

Eine Methode kann nur dann verlässlich eingesetzt werden, wenn nachgewiesen ist, dass über den gesamten Arbeitsbereich ein linearer Zusammenhang zwischen Messwert und Analytkonzentration besteht. Eine solche Linearität kann nachgewiesen werden indem mindestens 5 Kalibratoren, welche gleichmäßig über den Arbeitsbereich verteilt sind, jeweils mindestens 6-mal vermessen werden. Die so entstandene Kalibriergerade wird dann mittels Grubbs-Test auf Ausreißer, mit dem F-Test auf Varianzenhomogenität sowie mit dem Mandel-Test auf Linearität untersucht. Überspannen die Kalibratoren einen zu großen Konzentrationsbereich als dass Varianzenhomogenität erreicht werden könnte, so muss die Regression gewichtet werden: der Regressionsfaktor eines Kalibrationspunktes berechnet sich hierbei aus der Streuung seiner 6-fachen Vermessung.

---

### 2.7.4.3 Grenzwerte

Die analytischen Grenzen einer Methode können aus den oben erwähnten Kalibrationsdaten berechnet werden, wobei darauf zu achten ist, dass nur Kalibrator-Konzentrationen an der unteren Messbereichsgrenze einbezogen werden, damit die mit steigender Konzentration größer werdenden Messschwankungen das Ergebnis nicht verfälschen. Auch in diesem Fall werden zur Absicherung der Ergebnisse eine Regressionsanalyse sowie ein Grubbs-Test, F-Test und ein Linearitätstest nach Mandel durchgeführt. Die Bestimmungsgrenze wird über das Targetion mit einer Signifikanz von 99 % und einer Ergebnisunsicherheit von  $k = 3$ , die Nachweisgrenze dagegen über den nachweisschwächeren Qualifier auf einem 90 % Signifikanzniveau bei ebenfalls  $k = 3$  berechnet.

### 2.7.4.4 Genauigkeit

Die Evaluierung der Genauigkeit einer Methode schließt die Bestimmung systematischer und zufälliger Fehler, d.h. die Richtigkeit bzw. Präzision der Analytik, ein. Im Rahmen dieses Kapitels der Validierung werden mindestens zwei (hoch/niedrig), besser drei (mittel), verschiedene Probenkonzentrationen jeweils in Doppelbestimmung an 8 verschiedenen Tagen aufgearbeitet und vermessen. Aus den Schwankungen der so erhaltenen Messwerte kann daraufhin die Wiederhol- bzw. die Laborpräzision berechnet werden.

### 2.7.4.5 Extraktionsausbeute und Wiederfindung

Wiederfindung und Extraktionsausbeute bezeichnen das Ausmaß des Analyttransfers von der Probenmatrix in die zu vermessende Lösung bzw. den Primärextrakt. Die Wiederfindung kann nur bei Methoden bestimmt werden, bei denen der letztendlich detektierte Analyt als Reinsubstanz verfügbar ist (z.B. flüssigkeitschromatographische Verfahren); beinhaltet die Methode dagegen einen Derivatisierungsschritt wie z.B. bei vielen gaschromatographischen Methoden, so kann nur die Extraktionsausbeute bestimmt werden. Sowohl die Extraktionsausbeute als auch die Wiederfindung werden jeweils bei zwei Konzentrationen (hoch/niedrig) spezifiziert: Für die Bestimmung der Extraktionsausbeute werden 6 Kalibratorproben aufgearbeitet und erst im letzten Schritt vor der apparativen Analyse mit dem internen Standard versetzt. Diese extrahierten Proben werden mit den „100 %-Proben“ verglichen, für die 6 Leermatrixaliquots aufgearbeitet und im letzten Schritt sowohl mit

Analyt- als auch internem Standard dotiert werden. Im Gegensatz hierzu werden für die Wiederfindung zunächst 6 Wiederholbestimmungen nach Matrixextraktion durchgeführt, und diese mit den Messergebnissen von nicht-extrahierten Lösemittelstandards verglichen.

#### *2.7.4.6 Lösemittelkalibration*

Gerade bei der Isotopenmassenspektrometrie wird zur Vereinfachung der Routine oft der Einsatz einer Lösemittel- statt einer extrahierten Kalibration angestrebt. Um jedoch das Vorhandensein von Matrixeffekten in der Analyse ausschließen zu können und die Verwendung einer Lösemittelkalibration zu rechtfertigen, muss durch die vergleichende Messung einer Lösemittel- und einer Matrixkalibration bestätigt werden, dass kein signifikanter Unterschied zwischen beiden besteht. Eventuelle Ausreisser (Grubbs-Test) sowie die Linearität (nach Mandel) und Varianzhomogenität (F-test) werden für beide Kalibrationen bestimmt.

#### *2.7.4.7 Matrixeffekte*

Ionensuppressionseffekte werden zwar einheitlich als problematisch anerkannt, da sie die Sensitivität sowie die Präzision und Richtigkeit einer gegebenen Methode stark beeinträchtigen können, aber trotzdem wurden nur für eine Minderheit kürzlich publizierter Methoden entsprechende Untersuchungen im Validierungsprozedere durchgeführt [48].

Gemäß geltender Regeln werden Matrixeffekte in den zu untersuchenden Probenmatrices bei zumindest zwei Analytkonzentrationen (niedrig und hoch) evaluiert: der Kalibrator-Mix wird zu Leermatrixextrakten aus sechs verschiedenen Quellen dotiert, und die absolute Signalintensität dieser Proben wird verglichen mit der Injektion des entsprechenden Kalibrators in matrix-freier mobiler Phase.

Je nach Einsatzbereich der Analysenmethode können über die oben geschilderten Punkte hinaus noch weitere Tests vonnöten sein, um ihre Validität zu beweisen. Zu nennen sind hierbei die Evaluation der Robustheit der fraglichen Methode sowie die Stabilität der zu bestimmenden Analyten und vieles mehr.

---

---

Das abschließende Ziel einer Validierung ist die Beweisführung, dass die Kenndaten der geprüften Methode den gesetzten Ansprüchen genügen, sie also für die geplante Anwendung geeignet ist.

### 2.7.5 Selektivitätsprobleme in der HPLC-MS/MS-Analytik

Obwohl oben genannte Qualitätsrichtlinien insbesondere für den forensisch-toxikologischen Bereich in Kraft sind, ist auch in diesem Fach das Bewusstsein für Selektivitätsprobleme in der HPLC-MS/MS momentan wenig ausgeprägt: entgegen geltender Bestimmungen [59,60] werden immer noch Methoden publiziert, welche auf einem einzigen MRM in Kombination mit der Retentionszeit des Analyten als alleinige Identifikationskriterien basieren. Ein solches Vorgehen ist, wie schon beschrieben, prädestiniert für Selektivitätsprobleme: Gergov et al. [61] wurden beispielsweise in der Entwicklung einer Multi-Methode z.B. mit sogenannten „Cross-Talk“-Effekten konfrontiert, d.h. verschiedene ko-eluierende Substanzen bildeten ein identisches Produktion aus verschiedenen Vorläuferionen. Diesem Problem konnte jedoch mit einer Verlängerung der Latenzperiode auf über 200 ms zwischen den Messungen der betroffenen Ionenübergänge erfolgreich begegnet werden. Dieselbe Veröffentlichung greift darüber hinaus schon ein Thema auf, welchem Allen [62] eine eigene Publikation widmete, und zwar dass zwei ko-eluierende Substanzen durchaus einen identischen MRM-Übergang aufweisen, und dadurch die jeweilige Detektion beeinflussen können (unbekannte endogene Interferenz und Ropivacain sowie Atenolol und Practolol [61]; Tramadol und O-Desmethylvenlafaxin [62]). Weiterhin berichteten Naidong et al. [63] die Konversion von Hydromorphon-3-Glucuronid (H3G) zum zeitgleich eluierenden Hydromorphon (HYD) durch eine Fragmentierungsreaktion in der Ionenquelle des Massenspektrometers, und eine damit einhergehende Beeinträchtigung der Quantifizierung von freiem HYD. Um diese Probleme zu lösen und falsch-positive Ergebnisse zu verhindern, mussten Gergov et al. die Schwellenwert für die Detektion von Ropivacain erhöhen bzw. eine Verlängerung der Analysenzeit in einem Folgelauf zur chromatographischen Trennung von Atenolol und Practolol in Kauf nehmen. Naidong et al. entschieden sich ebenfalls für eine Änderung der chromatographischen Konditionen, um die interferierenden Substanzen voneinander zu trennen. Da ein chromatographischer Ansatz nicht die erwünschten Resultate erzielte, setzte Allen alternativ einen MRM-Übergang zur Detektion von O-Desmethyltramadol ein, um das Vorhandensein von Tramadol in einer gegebenen Probe über seinen Metaboliten nachzuweisen. Die

---

vorliegende Arbeit stellt eine HPLC-ESI-MS/MS-Methode zur parallelen Detektion und Quantifizierung von Succinylcholin (SUX) und Succinylmonocholin (SMC) vor, während deren Entwicklung vergleichbare Selektivitätsprobleme auftraten. Initiale Beobachtungen, weitergehende Untersuchungen der Problematik sowie ihre letztendliche Lösung werden in dieser Arbeit präsentiert.

## 2.7.6 Einführung in die NMR

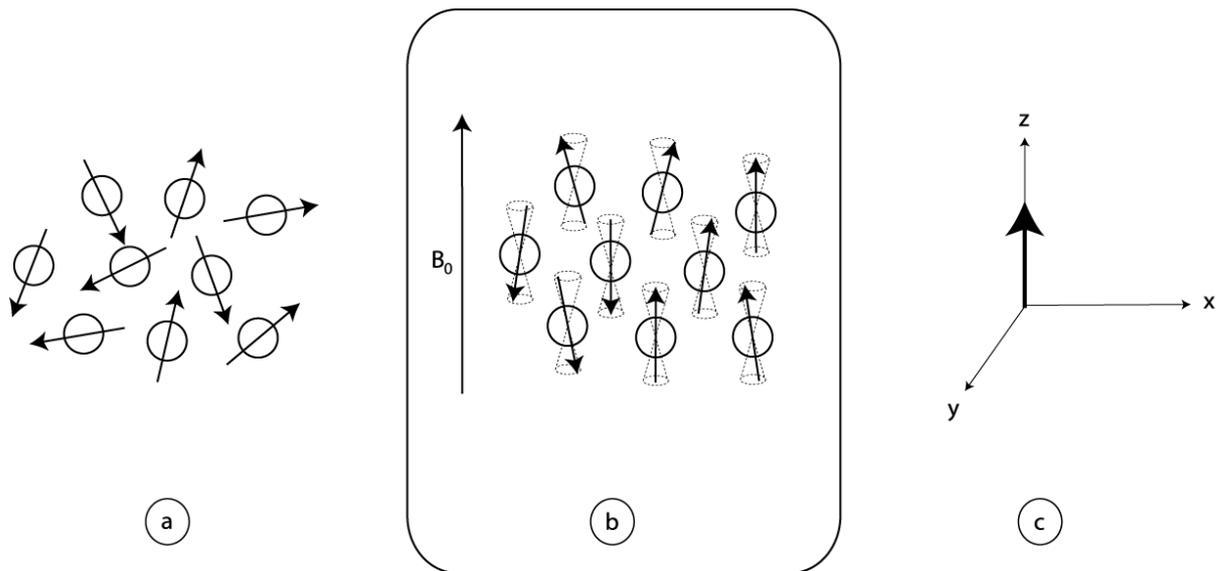
Die Kernresonanzspektroskopie („nuclear magnetic resonance“, NMR) ist eine Technik welche zur Strukturaufklärung organischer Moleküle in Lösung verwendet wird, und fand im Rahmen dieser Arbeit Anwendung bei der Charakterisierung der selbst synthetisierten internen Standardsubstanzen. Die Methode beinhaltet die Positionierung der Probe in ein starkes Magnetfeld und ihre nachfolgende elektromagnetische Irradiation. In Abhängigkeit von der eingestrahlten Frequenz („radiation frequency“, RF) werden die unterschiedlichen Atomkerne in der Probe zu einer Resonanzschwingung angeregt. Diese Resonanz ist das Signal, welches vom Spektrometer detektiert wird.

Die folgenden Paragraphen werden die der NMR zugrundeliegenden physikalischen Phänomene verkürzt erläutern. Eine genauere Erklärung kann den Standardwerken [64,65] entnommen werden.

### 2.7.6.1 Kernspin-Physik in der NMR

Kerne mit einer Spinquantenzahl ungleich 0 (z.B.:  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ) können mit Miniatur-Magneten verglichen werden: sie besitzen ein magnetisches Moment und erzeugen ein lokales magnetisches Feld. Diese Spins nehmen für gewöhnlich eine randomisierte Orientierung ein (Abbildung 10a), allerdings sind in einem starken magnetischen Feld nur zwei energetisch günstige Ausrichtungen erlaubt: die Orientierung mit dem externen magnetischen Feld (innerhalb eines Winkels von  $0 \pm 54^\circ$ ) ist der entgegengesetzten Ausrichtung (innerhalb eines Winkels von  $180^\circ \pm 54^\circ$ ) gegenüber schwach favorisiert. Im makroskopischen Modell erzeugt dies einen kleinen Netto-Magnetisierungsvektor in der Richtung des externen Feldvektors  $B_0$  (Abbildung 10b), welcher aus Konvention auf die z-Achse eines kartesischen Koordinatensystems referenziert wird (Abbildung 10c).

---

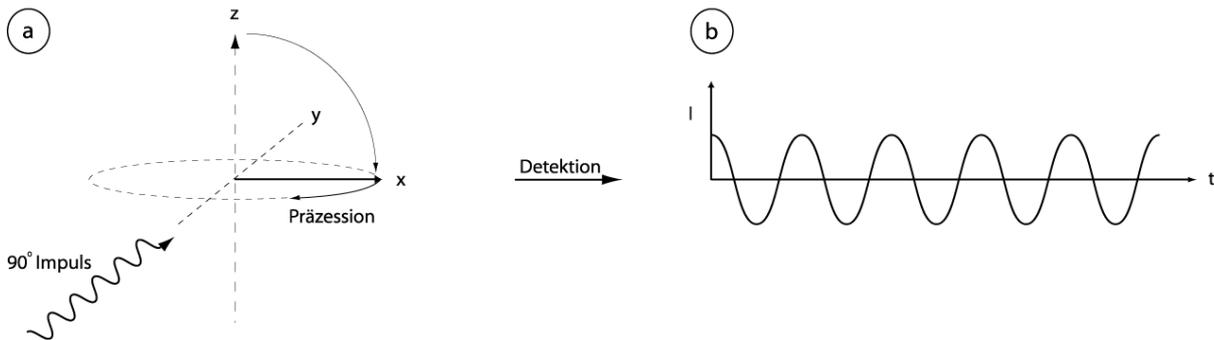


**Abbildung 10: NMR-aktive Kerne**

a) Kerne mit einer Spinquantenzahl ungleich 0 in zufälliger Orientierung (Spinmodell); b) Spinausrichtung in einem starken externen Magnetfeld (Spinmodell); c) resultierender Netto-Magnetisierungsvektor in einem kartesischen Koordinatensystem (makroskopisches Magnetisierungsmodell)

### 2.7.6.2 Irradiation

Bestrahlung der Kerne mit einer charakteristischen Frequenz bewirkt eine Anregung der Kernspins. Dies manifestiert sich als Rotation des makroskopischen Magnetisierungsvektors um die z-Achse herum und kann, wenn Energie in Form eines  $90^\circ$ -Impulses eingestrahlt wird, den Netto-Magnetisierungsvektor in die xy-Ebene verlagern (Abbildung 11a). Für Protonen wird dies durch eine Strahlungsfrequenz von 300-800 MHz erreicht. Die sog. Präzession (Rotation) des Nettomagnetisierungsvektors in der xy-Ebene erfolgt mit einer charakteristischen Frequenz, der „Larmor-Frequenz“, welche abhängig von der chemischen Umgebung des betrachteten Atoms ist. Die Präzession induziert eine Wechselspannung in der Detektionsspule des NMR-Spektrometers, die als sinusoidale Kurve aufgezeichnet werden kann (Abbildung 11b).



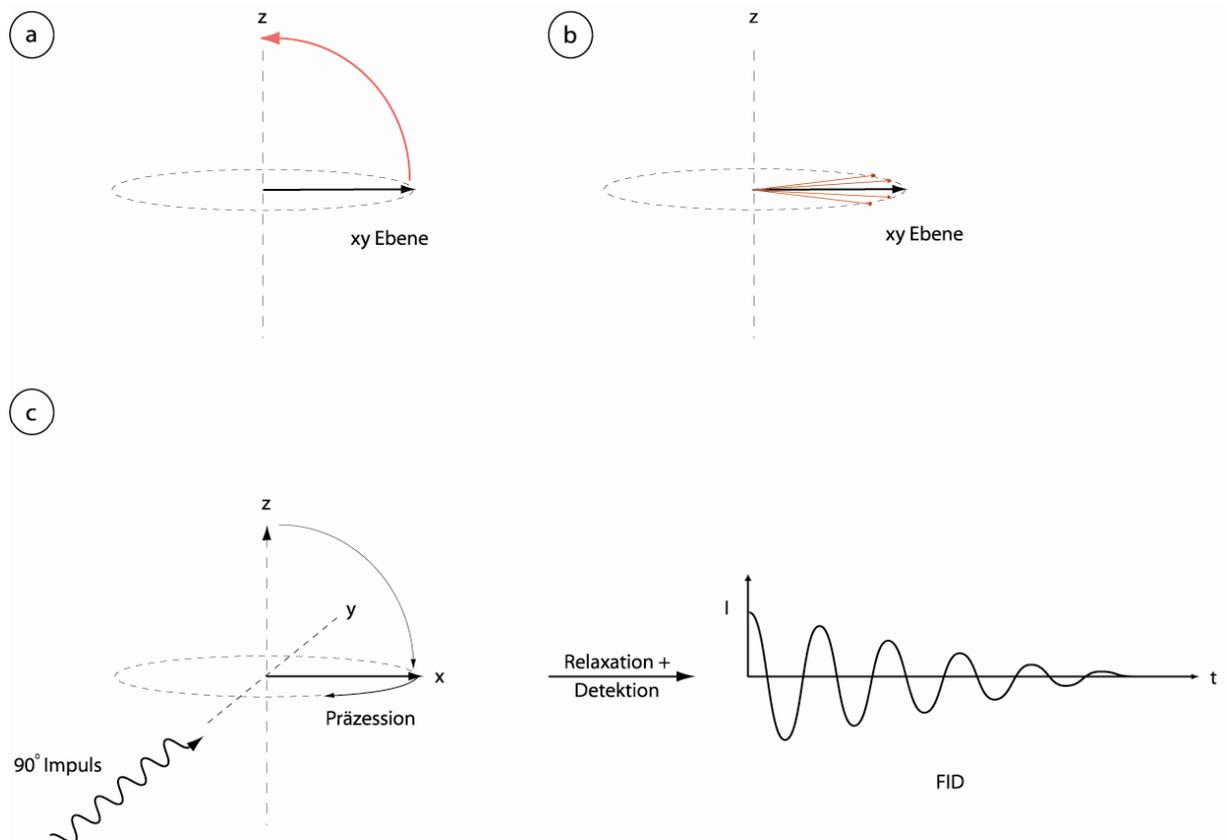
**Abbildung 11: Irradiation von Kernen in der NMR**

a) Ein  $90^\circ$ -Impuls führt zur Umlagerung des Netto-Magnetisierungsvektors in die  $xy$ -Ebene und zur Präzession des Spins. b) In der Detektionsspule des Spektrometers induziert diese Präzession eine Wechselspannung und wird in Form einer Sinuskurve aufgezeichnet (idealisierte Darstellung, vgl. Abbildung 12).

### 2.7.6.3 Relaxation

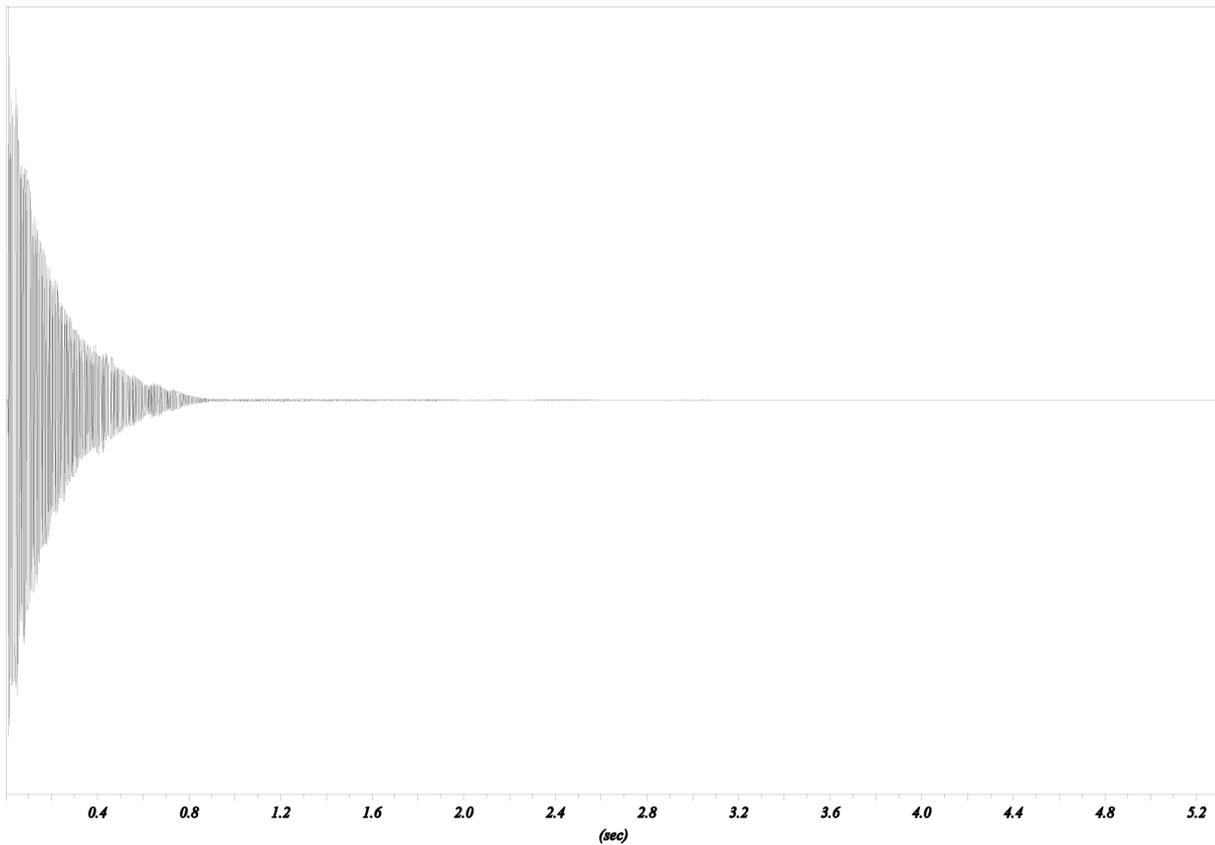
Nach der elektromagnetischen Bestrahlung kehrt der Kernspin durch einen als Relaxation bezeichneten Prozess ins thermodynamische Gleichgewicht zurück. Formell kann die Relaxation in zwei voneinander unabhängige Prozesse, die transversale sowie die longitudinale Relaxation, unterteilt werden. Ersteres beschreibt die Tatsache, dass die Spins – welche nach der Verlagerung in die  $xy$ -Ebene zunächst perfekt synchronisiert sind – während ihrer Präzession beginnen sich aufzufächern (Abbildung 12b), während letzterer Begriff die Rückkehr des Netto-Magnetisierungsvektors aus der  $xy$ -Ebene zurück in die ursprüngliche Orientierung entlang der  $z$ -Achse beschreibt (Abbildung 12b).

Die Relaxation bewirkt, dass in der Detektorspule des NMR-Spektrometers nicht wie in Abbildung 11b dargestellt eine ideale Sinuskurve, sondern vielmehr eine exponentiell abfallende Wechselspannung, das sog. FID („free induction decay“) detektiert wird (Abbildung 12c). Abbildung 13 zeigt ein reales FID ( $^1\text{H}$ -Experiment von SMC).



**Abbildung 12: Relaxation**

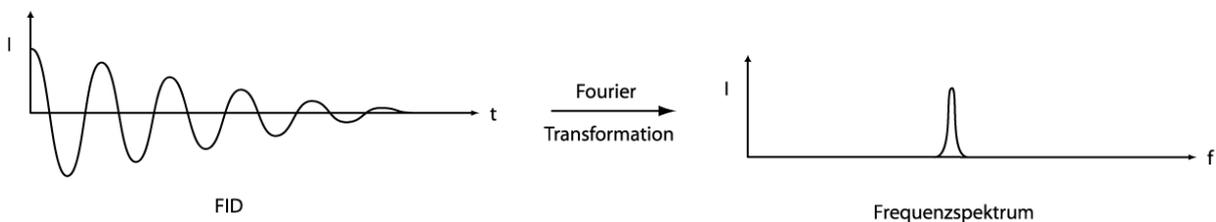
a) longitudinale Relaxation; b) transversale Relaxation ; c) Relaxationsmechanismen führen nach einem 90°-Impuls zur Detektion eines FID



**Abbildung 13: Reales Beispiel-FID ( $^1\text{H}$ -Experiment von SMC)**

#### 2.7.6.4 Datenkonversion

Die Fourier-Transformation wird verwendet, um aus dem Zeitsignal des FID das entsprechende eindimensionale (1D-) Frequenzspektrum zu berechnen, welches in der Folge weiter analysiert werden kann (Abbildung 14).



**Abbildung 14: Fourier-Transformation**

Es ist eine einzelne, beispielhafte Resonanzfrequenz dargestellt. Einheiten für Intensität  $I$ , Zeit  $t$  und Frequenz  $f$  sind relativ.

### 2.7.6.5 Strukturinformation in einem 1D-NMR-Spektrum

Ein gegebener Kerntypus hat eine – von den Eigenschaften seiner Elektronenhülle abhängige – charakteristische Resonanzfrequenz, man könnte daher fälschlicherweise erwarten, dass das NMR-Signal eines solchen Kerns auf immer derselben Frequenz in 1D-Spektren zu finden ist. In der Realität jedoch können selbst gleichartige Kerne signifikant unterschiedliche Resonanzfrequenzen aufweisen, wenn sie sich nämlich in einer unterschiedlichen chemischen Umgebung, durch z.B. unterschiedliche Partner in kovalenter Bindung oder auch nur in räumlicher Nähe, befinden. Diese Kerne haben dann eine voneinander abweichende sog. chemische Verschiebung („chemical shift“), welche sich nach untenstehender Formel 1 berechnet:

$$\delta = \frac{\text{Larmorfrequenz Probenatom} - \text{Larmorfrequenz Standard} \quad (\text{Hz})}{\text{Absolutwert der Larmorfrequenz des Standards} \quad (\text{MHz})}$$

#### Formel 1: Die chemische Verschiebung

$\delta$  ist abhängig von der Feldstärke und besitzt daher keine absolute Größe, ihre Einheit wird in ppm (parts per million) angegeben.

Die vom lokalen Umfeld abhängige, chemische Verschiebung der Kerne – z.B. bei Entschirmung („Deshielding“) durch benachbarte elektronegative Atome – kann zur Strukturaufklärung von unbekanntem Zielmolekülen verwendet werden. Abbildung 15 zeigt das Beispiel eines  $^1\text{H}$ -Spektrum von SMC und verdeutlicht einige Grundbegrifflichkeiten für die weitere Auswertung von NMR-Spektren.

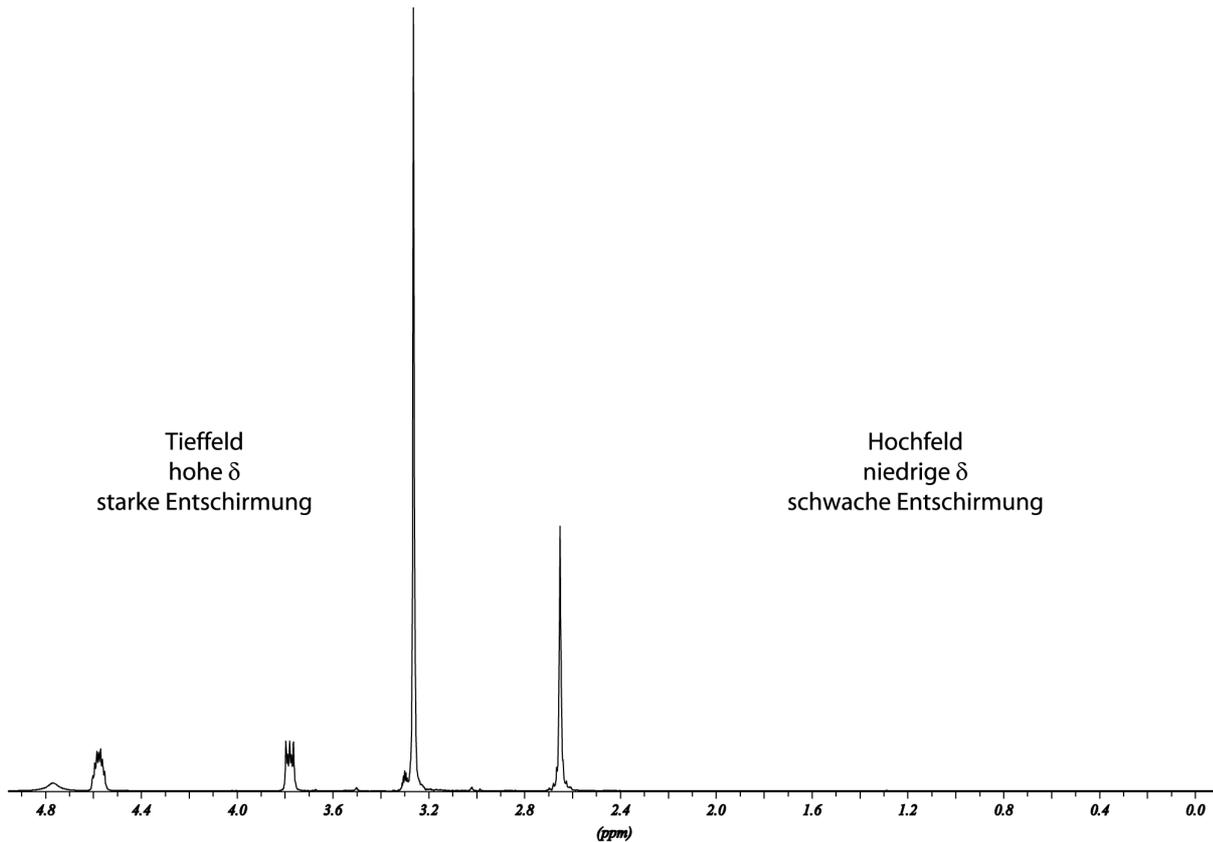


Abbildung 15: Beispiel-Spektrum (<sup>1</sup>H-Experiment SMC)

Aber nicht nur die chemische Verschiebung sondern auch die Peakaufspaltung („peak multiplicity“) sowie – in erster Linie bei <sup>1</sup>H-Experimenten – das Peakintegral können zur Aufklärung der räumlichen Struktur des Probenmoleküls herangezogen werden:

Eine Peakaufspaltung entsteht durch nahe Nachbarschaft und dadurch begründete Interaktion von Kernspins, dem sog. "spin coupling“. Die Signalmultiplizität ist hierbei bestimmt durch die Zahl von äquivalenten, benachbarten Kernen („ $2 \times n \times I + 1$ -Regel“, s. Formel 2), so dass z.B. eine gegebene Anzahl ( $n$ ) äquivalenter Protonen mit einer Spinquantenzahl  $I = \frac{1}{2}$  das Signal eines benachbarten Atoms in der <sup>1</sup>H-NMR somit in  $n + 1$  Resonanzen auflöst, wohingegen  $n$  benachbarte <sup>14</sup>N-Kerne ( $I = 1$ ) bei der <sup>13</sup>C-NMR dementsprechend zu einer Aufspaltung in  $n + 2$  Linien führen.

$$M = 2 \times n \times I + 1$$

Formel 2: Formel zur Kalkulation der Signalmultiplizität  $M$

Der Abstand zwischen den einzelnen, aufgespalteten Resonanzen sich gegenseitig beeinflussender Kerne ist stets gleich und wird als Kopplungskonstante  $J$  (Hz) bezeichnet.

Die Fläche unter einem  $^1\text{H}$ -NMR Signal, egal ob es sich um das Integral über ein Singulett oder ein Multiplett handelt, ist stets proportional zur Anzahl der Protonen die zu dieser Resonanz beitragen. Bei der  $^{13}\text{C}$ -NMR kann aufgrund von interferierender quantenphysikalischen Effekten (z.B. Kern-Overhauser-Effekt) ein solcher Zusammenhang nur äußerst bedingt angenommen werden.

### 2.7.7 Einführung in die FAB-MS

Die Methode des „Fast Atom Bombardment“ (Schnell-Atom-Beschusses) fand im Rahmen dieser Arbeit Anwendung bei der Charakterisierung der selbst synthetisierten internen Standardsubstanzen. Die Grundlagen dieser Methodik sollen in der Folge kurz beschrieben werden, detaillierte Ausführungen sind den einschlägigen Publikationen zu entnehmen [66,67].

Die FAB-MS stellt eine massenspektrometrische Desorptionsmethode dar, bei der die in eine schwerflüchtige, flüssige Matrix eingebetteten Analyten mit stark beschleunigten Teilchen (im keV-Bereich), den sog. „Primärpartikeln“, beschossen werden. Bei der FAB-MS kommen vor allem Xenon- und Argonatome als Primärpartikel zum Einsatz, wobei die Effektivität der Ionenbildung mit zunehmender Masse der Kollisionspartikel zunimmt; als Matrix werden Vakuum-kompatible Lösungsmittel wie z.B. meta-Nitrobenzylalkohol (mNBA) eingesetzt. Die durch die Kollision zerstäubte Analyt-Matrix-Oberfläche wird ständig regeneriert, so dass sich die FAB-MS durch besonders starke und gleichmäßige Ionenströme auszeichnet. Beim Eindringen in die Probe gibt der hochenergetische Primärstrahl seine kinetische Energie in Form einer Stoßkaskade ab, wodurch instantan eine große Anzahl an Matrix- sowie Analytpartikeln desorbiert werden. Vorgebildete ionische Analytmoleküle wie z.B. SMC ( $\text{M}^+$ ) oder SUX ( $\text{M}^{2+}$ ) können gemäß dem sog. „precursor model“ nun durch direkte Impulsübertragung von der Oberfläche desorbiert werden. In anderen Fällen erfolgt der Übergang von der flüssigen zur Gasphase durch die primäre Erhitzung der Probenoberfläche nach Auftreffen des Primärpartikels („thermal spike“), wobei sich durch die Überschall-Expansion ins Vakuum („supersonic jet“) und die dazu notwendige Überwindung der intermolekularen Wechselwirkungen in der flüssigen Phase sofort eine Absenkung der

inneren Energie der angeregten Teilchen anschließt. Nach der Abkühlung verbleibt den entstandenen Ionen nur wenig überschüssige Energie, was das weitgehende Fehlen von Molekülfragmenten und somit die Eignung der FAB-MS für die Detektion auch labiler Verbindungen erklärt. Für die resultierende Übergangszone („selvedge region“) zwischen flüssiger Phase und Vakuum sind sowohl ein hoher Druck als auch eine große Teilchendichte charakteristisch, was die mittlere freie Wellenlänge stark verkürzt: Analytteilchen erfahren multiple Kollisionen, was sowohl ihre Energie weiter erniedrigt als auch Intermolekularreaktionen ermöglicht. Als charakteristische Bestandteile eines FAB-MS-Spektrums sind im positiven Ionenmodus vor allem verschiedene Molekülionenspezies (z.B.  $[M+H]^+$  oder  $[M+Kation]^+$ ), Matrixionen oder auch  $-ionenserien$  (z.B.  $[mNBA_n+H]^+$ ) sowie Mischcluster aus Analytionen und Matrixionen (z.B.  $[M+mNBA+H]^+$ ) zu detektieren. In dem hier vorliegenden Sonderfall eines bisquaternären Amins sind für SUX darüber hinaus auch Molekülspezies vom Typ  $[M^{2+}+Anion]^+$  und  $[M^{2+}-H]^+$  zu erwarten. Abbildung 16 zeigt schematisch die oben geschilderten Abläufe bei der FAB-MS.

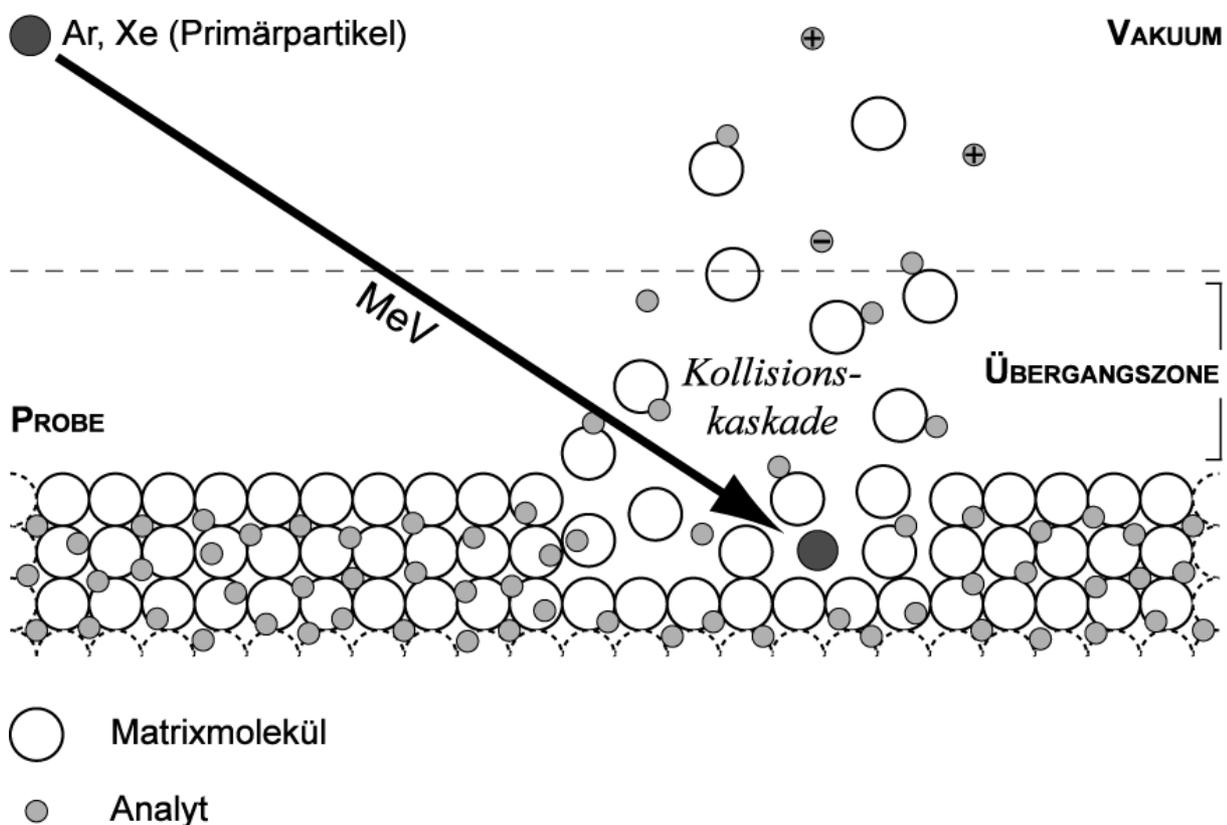


Abbildung 16: Schematische Darstellung der Vorgänge bei der FAB-MS

### 2.7.8 Kreatinin-Bestimmung

Kreatinin ist ein Abfallprodukt, welches in den Muskeln aus der energiereichen Speichersubstanz Kreatin-Phosphat gebildet wird. Die Serumkonzentration von Kreatinin ist im Wesentlichen von der Muskelmasse abhängig, und für eine gegebene Person annähernd konstant. Durch glomeruläre Filtration in den Nieren wird Kreatinin aus dem Blutkreislauf entfernt und mit dem Harn ausgeschieden, wobei seine normale urinäre Konzentration in einem gesunden Menschen zwischen 80-200 mg/dl liegt. Kreatinin wird in der klinischen Analytik zur Überprüfung der Nierenfunktion bestimmt, und kann in der forensischen Toxikologie dazu benutzt werden Manipulationsversuche an abgegebenen Urinproben nachzuweisen: durch Verdünnen des Urins mit Wasser oder auch durch Austausch mit einer drogenfreien Flüssigkeit versuchen einige Konsumenten ihre Urinprobe zu verfälschen, wobei der Nachweis eines zu niedrigen Kreatiningehalts in der Probe als Indikator für eine solche Manipulation dienen kann. Kreatinin wird kolorimetrisch, basierend auf der Jaffé-Reaktion [68], bestimmt. Der Kreatinin-Gehalt von Probandenurinen wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit zum Zwecke der genaueren Charakterisierung der endogenen SMC-Interferenz (s. Abschnitt 4.5.2) gemessen

---

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Chemikalien

Zu Beginn der Arbeit wurde SMC als Referenzstandard von USP (Rockville, MD, USA) bezogen, später jedoch durch selbst synthetisiertes Material ersetzt [69].

Alle für die Standardsynthese benötigten Chemikalien waren von analytischer Reinheit und wurden, mit der einzigen Ausnahme von Iodomethan- $d_3$  (von Acros Organics, Geel, Belgien), von Sigma Aldrich (Schnelldorf) bezogen.

Succinylcholin, Paraoxon, Heptafluorbuttersäure (HFBA) und Ammoniumformiat waren von Sigma Aldrich (Schnelldorf).

Organische Lösemittel für die Flüssigkeitschromatographie bzw. Extraktion waren stets HPLC-rein bzw. p.A.-rein, und entstammten verschiedenen Quellen.

Ameisensäure, wässrige Ammoniaklösung 25 %, HCl 25 % und NaOH 10 M waren allesamt p.A.-rein, und wurden von Merck (Darmstadt) bezogen.

Demineralisiertes Wasser wurde der hauseigenen Millipore-MilliQ Anlage entnommen.

### 3.2 Puffer und Laufmittel

3×-Puffer (für die SPE): 25 mM Ammoniumformiat, 40 mM HFBA, pH 3.0 mit Ammoniak

Waschpuffer (für die SPE): 5 mM Ammoniumformiat, 5 mM HFBA, pH 3.0 mit Ammoniak

Mobile Phase AII (für die HPLC): 5 mM Ammoniumformiat in H<sub>2</sub>O : Acetonitril 90:10 (v/v)

Mobile Phase BII (für die HPLC): 5 mM Ammoniumformiat in H<sub>2</sub>O : Acetonitril 10:90 (v/v)

### 3.3 Geräte und Materialien

#### *NMR*

Alle Spektren wurden bei Raumtemperatur unter Verwendung von Bruker DPX 300 und DPX 400 Instrumenten aufgezeichnet (Bruker, Rheinstetten). Die chemische Verschiebung ist in ppm relativ zum Standard Tetramethylsilan angegeben, und wurde durch Referenzierung von Lösemittelsignalen auf die entsprechenden Literaturwerte erhalten [70]. Die aufgezeichneten Daten wurden mittels der 1D-WinNMR Software (Bruker Daltonic, Bremen) analysiert. Für

---

die NMR Analyse wurden SUX-d<sub>18</sub> und SMC-d<sub>3</sub> in D<sub>2</sub>O bzw. MeOD zu Konzentrationen von jeweils ca. 35 mg/ml bzw. 65 mg/ml gelöst. Beide wurden auf dem DPX 300 vermessen.

Die NMR-spektrometrische Untersuchung der Intermediate wurde unter Verwendung methanolischer Lösungen (MeOD) von Desmethyl-SMC und Cholin-d<sub>9</sub> in Konzentrationen von ca. 75 mg/ml bzw. 95 mg/ml durchgeführt. Cholin-d<sub>9</sub> und Desmethyl-SMC wurden auf dem DPX 300 bzw. DPX 400 vermessen.

#### *FAB-MS*

FAB-MS-Spektren wurden auf einem Concept 1H (Kratos, Hofheim) Instrument mit mNBA als Matrix aufgezeichnet. Die Menge an für die Analyse eingesetztem Analyt wurde nicht exakt bestimmt.

#### *Festphasenextraktion*

Die für dieses Projekt letztlich entwickelte und optimierte Festphasen-Extraktion verwendet Strata-X (33µm, 200mg/3ml) Umkehrphasen-Polymersorbens-Kartuschen (Phenomenex, Aschaffenburg) in einer Vakuum-Arbeitsstation.

#### *HPLC-MS/MS*

Daten wurden mit einer Agilent 1100 HPLC (Agilent, Waldbronn) in Kombination mit einem PE Sciex API 2000 Massenspektrometer (Applied Biosystems, Darmstadt) erhoben. Eine Phenomenex Synergi Hydro RP Säule (150 x 2 mm, 4 µm von Phenomenex, Aschaffenburg) wurde zur Trennung verwendet. Es wurde jeweils ein 5 µl Probenaliquot direkt („splitless“) injiziert. Elution erfolgte bei 200 µl/min in einem Gradienten aus Laufmittel AII und BII. Die Gradientenkonditionen sind in Tabelle 2 dargestellt.

**Tabelle 2: HPLC Gradientenkonditionen**

Zeit [min]	Mobile Phase A II	Mobile Phase B II
0-3	95 %	5 %
3-5	95 % → 5 %	5 % → 95 %
5-8	5 %	95 %
8-10	5 % → 95 %	95 % → 5 %
10-13	95 %	5 %

Alle massenspektrometrischen Daten wurden mittels einer Turbo-Elektrospray-Ionisationsquelle (ESI-MS/MS) im positiven Ionenmodus bei 5000 V und 350°C erhoben. Produktionenspektren wurden unter Verwendung einer methanolischen Stammlösung (10 µg/ml) einer jeden Substanz im MCA (multiple channel acquisition) Modus über 10 Scans bei Kollisionsenergien von 25 eV für sowohl SMC und SMC-d<sub>3</sub>, und 18 eV bzw. 16 eV für SUX bzw. SUX-d<sub>18</sub>, aufgenommen. Die sich anschließenden Messungen wurden im MRM Modus unter Verwendung der folgenden Ionenübergänge (nach Intensität geordnet, Quantifier fett gedruckt, Kollisionsenergien in Klammern) akquiriert:

SUX: **145.1** → **115.1** (15 eV); 145.2 → 79.2 (21 eV)

SUX-d<sub>18</sub>: **154.0** → **120.0** (16 eV); 154.0 → 98.0 (21 eV)

SMC: [204.0 → 144.7 (20 eV)]; **204.0** → **98.6** (32 eV); 204.0 → 100.6 (33 eV)

SMC-d<sub>3</sub>: [207.1 → 144.8 (22 eV)]; **207.1** → **98.8** (34 eV); 207.1 → 100.8 (33 eV)

Aus Gründen, die im Abschnitt 4.4.1 noch genauer erläutert werden, wurde der Haupt-MRM von SMC (in eckigen Klammern) als charakteristisches Identifikationsmerkmal für diesen Analyten ausgeschlossen, aufgrund seiner Nützlichkeit für weiterführende Fragestellungen jedoch in der Methode belassen.

#### *Kreatinin-Assay*

Als Analysengerät wurde ein Hitachi 912 von Boehringer Mannheim verwendet. Die Kreatinin-Bestimmung erfolgte durch vorschriftsmäßige Verwendung des DRI® Creatinine-Detect®-Tests von Microgenics nach dem Prinzip der Jaffé-Reaktion [68]. Als Kontrollen wurden die MAS® UrichemTRAK Urinkontrollen (Level 1: 66 mg/dl, Level 2: 159 mg/dl) verwendet. Eine Kalibrierung des Analysengerätes fand arbeitstäglich statt. Die Ergebnisse einer Probenreihe wurden nur akzeptiert, wenn die ebenfalls arbeitstäglich analysierten Kontrollen im vom Hersteller angegebenen Akzeptanzbereich lagen.

#### *Kinetik-Studie*

Zur Blutabnahme wurden S-Monovetten® mit EDTA- bzw. Lithium-Heparin-Zusatz in einer jeweiligen Größe von 4 ml bzw. 5.5 ml verwendet (Sarstedt, Nümbrecht; Ref.: 03.1068 bzw. 03.1628). Urinproben wurden in 2 ml Safe-Lock®-Tubes der Firma Eppendorf (Hamburg) abgenommen.

---

### 3.4 *Synthese der internen Standards*

In der vorliegenden Arbeit wird die Synthese von SUX-d<sub>18</sub> und SMC-d<sub>3</sub> nach modifizierten Methoden von Forney et al. [19] bzw. Phillips et al. [56] beschrieben.

#### 3.4.1 *Synthese von SMC und SMC-d<sub>3</sub>*

##### 3.4.1.1 *Schritt 1 – Synthese von Desmethyl-SMC*

1 Moläquivalent (eq, 100 mmol, 10 g) Bernsteinsäureanhydrid und 1.12 eq (112.2 mmol, 10 g, 11.29 ml) Dimethylaminoethanol wurden in 100 ml trockenem Aceton für 3 Stunden bei 75°C (Ölbad) in einem Rückflusskühler umgesetzt. Nach der Reaktion wurde eine kleine Menge weißen Präzipitats abfiltriert und verworfen. Das übrige Acetonfiltrat wurde auf Eis gekühlt um das Reaktionsprodukt auszukristallisieren, welches anschließend filtriert und vakuumgetrocknet wurde. Das getrocknete Produkt wurde daraufhin aus 5 ml Aceton rekristallisiert. Vor Einsatz des Desmethyl-SMC als Edukt in der Folgereaktion wurde seine chemische Identität und Reinheit mittels NMR Spektroskopie sowie FAB-MS bestätigt.

##### 3.4.1.2 *Schritt 2 – Alkylierung von Desmethyl-SMC zu SMC-d<sub>3</sub>*

Für die Folgereaktion wurde 1 eq (10 mmol, 1.9 g) Desmethyl-SMC mit einem Überschuss von 3.2 eq (32 mmol, 4.65 g, 2 ml) Iodomethan-d<sub>3</sub> in 50 ml trockenem Aceton für 24 Stunden bei 75°C (Ölbad) in einem Refluxkühler umgesetzt. Nach Abschluss der Reaktion wurde das Lösemittel abdestilliert und der verbleibende Rückstand vakuumgetrocknet. Das Produkt wurde anschließend aus 10 ml einer 6:4 Methanol:Aceton (v/v) Mischung rekristallisiert und durch Filtration gewonnen. 10 ml Diethylether wurden zum Filtrat gegeben um gelöstes Produkt zu präzipitieren, welches ebenfalls abfiltriert wurde. Das gesammelte Produkt wurde vakuumgetrocknet und der NMR- bzw. FAB-MS-Analyse zugeführt.

##### 3.4.1.3 *Schritt 2 (alternativ) – Alkylierung von Desmethyl-SMC zu SMC*

Die Synthese von SMC erfolgte synonym zu der von SMC-d<sub>3</sub>, jedoch mit der einzigen Ausnahme, dass statt Iodomethan-d<sub>3</sub> nicht-deuteriertes Iodomethan eingesetzt wurde.

Abbildung 17 verdeutlicht den beschriebenen Reaktionsweg zur Synthese von SMC-d<sub>3</sub> bzw. SMC.

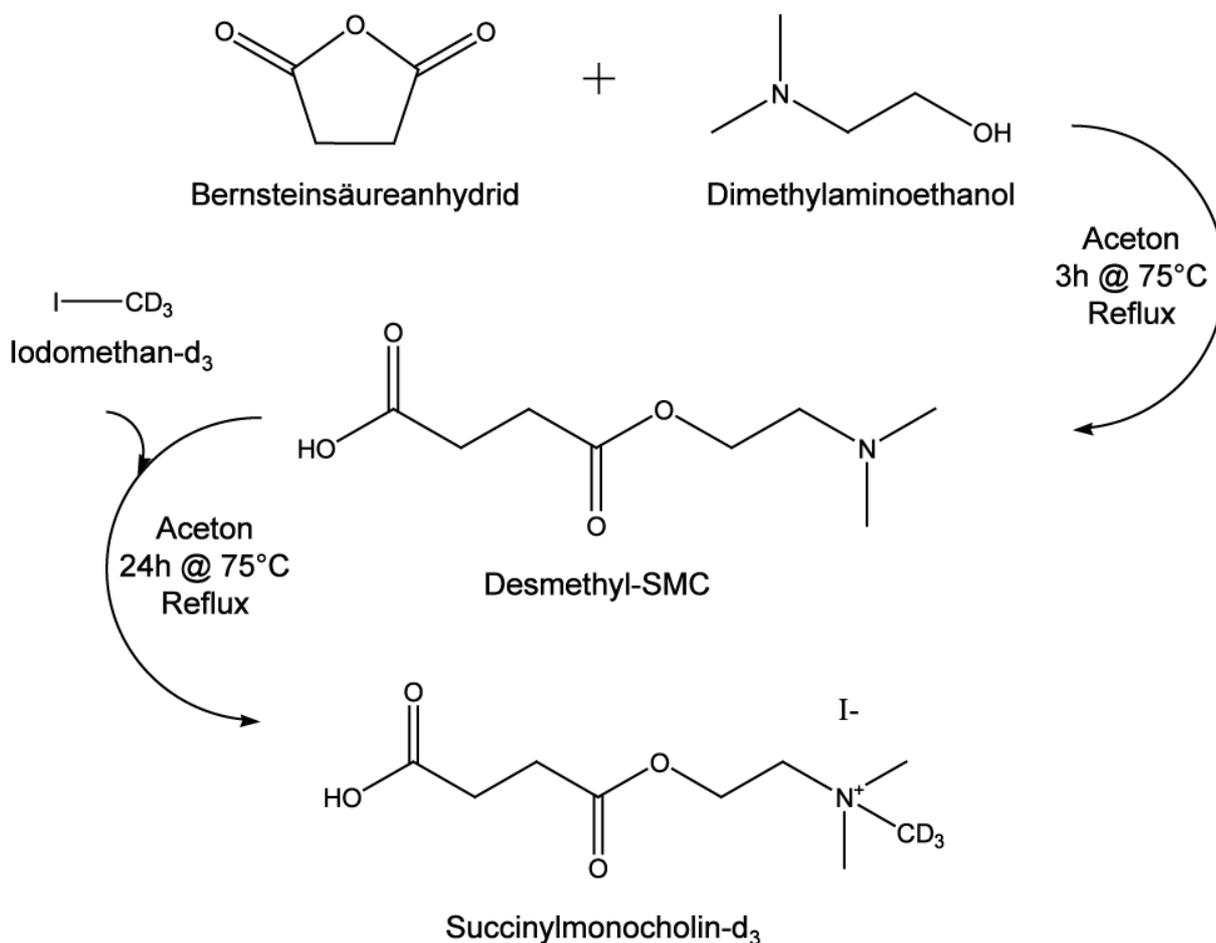


Abbildung 17: Zweistufige Synthese von SMC-d<sub>3</sub>

Für die Herstellung von SMC wurde ebenfalls der dargestellte Reaktionsweg eingeschlagen, es wurde allerdings nicht-deuteriertes Iodomethan anstelle von Iodomethan-d<sub>3</sub> eingesetzt.

### 3.4.2 Synthese von SUX-d<sub>18</sub>

#### 3.4.2.1 Schritt 1 – Synthese von Cholin-d<sub>9</sub>

1 eq Ethanolamin (25 mmol, 1.53 g, 1.51 ml) und ein Überschuss von 3.2 eq (80 mmol, 11.6 g, 4.98 ml) Iodomethan-d<sub>3</sub> in 10 ml Methanol wurden für 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. 2.1 eq (52.5 mmol, 2.84 g) Natrium-Methoxid wurden in 25 ml Methanol gelöst und in Aliquots von 7.5, 8.75 und 8.75 ml jeweils 1, 3.25 und 6.25 Stunden nach Reaktionsbeginn zugefügt, wenn der pH-Wert der Reaktionsmischung sich wieder neutralisiert hatte. Nach

Abschluss der Reaktion wurde das Lösemittel abdestilliert und der Rückstand vakuumgetrocknet. Das Produkt wurde zweifach aus jeweils 15 ml bzw. 12 ml Ethanol rekristallisiert, und reines Cholin-d<sub>9</sub>-Iodid durch Filtration gewonnen. Vor Einsatz des Cholin-d<sub>9</sub> als Edukt in der Folgereaktion wurde seine chemische Identität und Reinheit mittels NMR Spektroskopie sowie FAB-MS bestätigt.

#### 3.4.2.2 Schritt 2 – Umsetzung von Bernsteinsäuredichlorid mit Cholin-d<sub>9</sub> zu SUX-d<sub>18</sub>

In einem eisgekühlten Erlenmeyerkolben wurden 0.4 eq (1.68 mmol, 0.26 g, 185 µl) Bernsteinsäuredichlorid tropfenweise mit 1 eq (4.2 mmol, 1 g) Cholin-d<sub>9</sub> vereinigt, und erst anschließend mit 10 ml trockenem Chloroform versetzt. Die Reaktionsmischung wurde langsam in einem Ölbad erhitzt und dann für 12 Stunden bei 60°C in einem Rückflusskühler umgesetzt. Zur Reinigung des Produktes wurde das Lösemittel zunächst mit Hilfe eines Rotationsverdampfers und schließlich mittels Hochvakuums abgezogen. Zusammen mit 1 eq (4.2 mmol, 0.63 g) Natriumiodid wurde das getrocknete Produkt in 450 ml einer 1:2 Methanol:Ethanol-Mischung (v/v) gelöst. SUX-d<sub>18</sub>-Iodid kristallisierte bei Abkühlung der Reaktionsmischung aus und wurde durch Filtration isoliert. Der nachfolgende Reinigungsschritt bestand in der Rekristallisation des Produktes aus 450 ml einer 1:2 Methanol:Ethanol-Mischung (v/v) und der abschließenden Filtration der Produktkristalle. Die gewonnenen Kristalle wurden vakuumgetrocknet und der NMR- bzw. FAB-MS-Analyse zugeführt.

Abbildung 18 verdeutlicht den beschriebenen Reaktionsweg zur Synthese von SUX-d<sub>18</sub>.

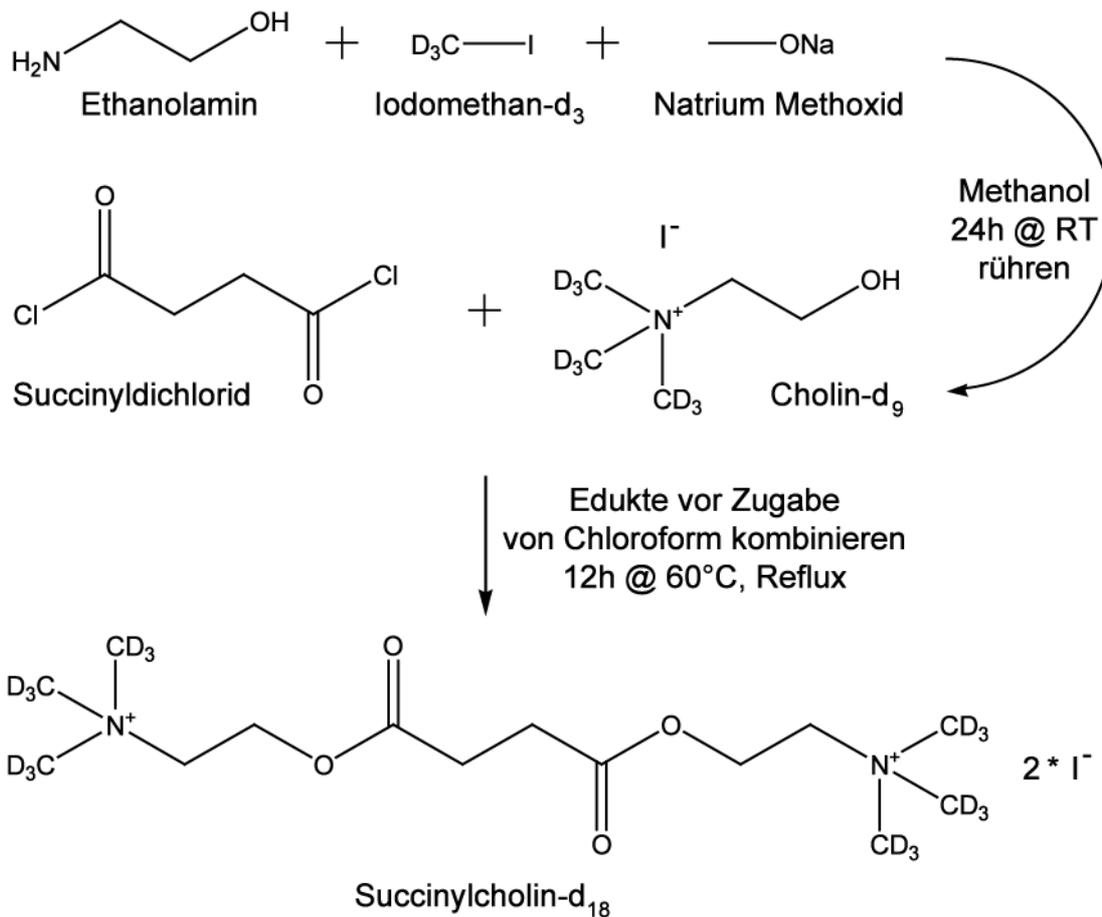


Abbildung 18: Zweistufige Synthese von SUX-d<sub>18</sub>

### 3.5 Optimierung der Extraktionsmethode

#### 3.5.1 Acetonitril-Fällung

Zur initialen Optimierung grundlegender Methodenparameter wie z.B. der Stabilisator-Konzentration wurde für Serum bzw. Vollblut als Probenmatrix zunächst eine Acetonitril-Fällung durchgeführt. Hierzu wurde 1 ml stabilisierte und mit einer definierten Standardmenge dotierte Matrix mit dem gleichen Volumen (s. 3.5.2) bzw. einem Überschuss (s. 3.11) eiskalten Acetonitrils (- 20°C) versetzt. Die so ausgefällten Serumproteine wurden in einem Zentrifugationsschritt (10 min bei mind. 3000 × g) abzentrifugiert, und der klare Überstand direkt (s. 3.5.2) bzw. nach vorheriger Einengung (s. 3.11) in das LC-MS/MS-System injiziert.

### 3.5.2 Enzymabhängige Degradation und Stabilisierung der Analyten

Zur Ermittlung des Ausmaßes der enzymabhängigen Degradation von SUX sowie SMC und, im Folgeschritt, der optimalen Stabilisatorkonzentration wurde je 1 ml Serum (aus tagesaktuell frisch abgenommenem Vollblut,  $n = 3$ ) mit 0-140 ng/ml Paraoxon versetzt und 5 min vorinkubiert. Anschließend wurden zu jedem Ansatz 20  $\mu\text{g/ml}$  SUX oder SMC dotiert, und die Probe nach definierten Inkubationszeiten einer AcN-Fällung unterworfen. 1 ml des durch Zentrifugation gewonnenen Überstandes wurde mit 20  $\mu\text{g/ml}$  SUX- $d_{18}$  und SMC- $d_3$  (für den SUX-Stabilitätsassay) bzw. nur SMC- $d_3$  (für den SMC-Stabilitätsassay) versetzt und abschließend in der HPLC-MS/MS vermessen. Die Daten wurden über den Quotienten aus der Peakfläche des Analyten durch die Peakfläche des entsprechenden internen Standards (AUC Analyt/AUC ISTD) ausgewertet.

Die umfassende Optimierung hat eine ideale Probenendkonzentration von 100 ng/ml Paraoxon ergeben (Kapitel 4.2.2), daher wurde diese Konzentration (sofern nicht anders spezifiziert) im gesamten weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit eingesetzt: je 1 ml wässrige Probe wurde durch Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  einer methanolischen 2  $\mu\text{g/ml}$  Paraoxon-Lösung (Paraoxon-Endkonzentration: 100 ng/ml) esterase-inaktiviert. Obwohl Urin für gewöhnlich enzymfrei ist und die Analyten in dieser Matrix entsprechend stabil sein sollten, so kann die Anwesenheit von Enzymen im Urin [15] gerade im forensischen Bereich nie ganz ausgeschlossen werden (z.B. bei fortgeschrittener Verwesung oder aber durch Kontamination während der autoptischen Probennahme), daher wurde in der Folge Urin wie auch Serum gleichermaßen esterase-inaktiviert.

### 3.5.3 Extraktionsversuche nach Literaturangaben

Es wurden Extraktionsversuche gemäß den Literaturangaben für SUX [4,5,22-25,30,35] bzw. SMC [24,25,30] durchgeführt und auf Reproduzierbarkeit sowie Eignung als universelle Extraktionsmethode für beide Zielanalyten getestet. Die methodischen Einzelheiten können den jeweiligen Referenzen entnommen werden.

Methodenkombinationen sowie eine Vielzahl von Modifikationen und Optimierungsschritten, die im Einzelnen nicht näher ausgeführt werden sollen, führten schließlich zur nachfolgend dargestellten, finalen Methode.

### 3.5.4 Optimierte Festphasenextraktion

Zur Extraktion werden Strata-X (33µm, 200mg/3ml) Umkehrphasen-Polymersorbens-Kartuschen (Phenomenex, Aschaffenburg) in einer Vakuum-Arbeitsstation verwendet. 1 ml wässrige Probe wurde durch Addition von 50 µl der Paraoxon-Lösung (Probenendkonz.: 100 ng/ml) stabilisiert und zusätzlich mit 100 µl eines internen Standardgemischs (Probenendkonz.: je 1 µg/ml SUX-d<sub>18</sub> und SMC-d<sub>3</sub>) versetzt. Zur Kalibration wurden darüber hinaus 100 µl der jeweiligen Kalibrierstandards (s. Abschnitt 3.7) eingesetzt. Die Probe wurde daraufhin mit 1 ml 0.1 M HCl angesäuert und der pH durch Zugabe von 1 ml 3×-Puffer eingestellt. Nach gründlichem Durchmischen auf einem Vortex-Schüttler wurde die resultierende Probe nach dem folgenden Protokoll (unter ausschließlicher Nutzung der Gravitation außer im Trocknungsschritt) aufgearbeitet:

- 1) Konditionierung: 6 ml Methanol
- 2) Equilibrierung: 3 ml 3×-Puffer
- 3) Probenaufgabe: 1 ml Serum (stabilisiert, mit ISTD und ggf. Analytstandard)  
+ 1ml 0.1 M HCl  
+ 1 ml 3×-Puffer
- 4) Waschschrift: 4 ml Waschpuffer
- 5) Trocknungsschritt: Trocknen der Säulenmatrix für 2 min im Vollvakuum
- 6) Elution: 4 ml Methanol

Das Eluat mit den enthaltenen Analyten wurde unter Stickstoff bei 70°C zur Trockne eingedampft und der Rückstand in 100 µl Laufpuffer AII resuspendiert (dazu ca. 1-2 min vortexen). Unlösliche Bestandteile des Extraktes wurden für 10 min bei 16250 × g abzentrifugiert und der klare Überstand anschließend in die LC-MS/MS injiziert.

Um einen höheren Automatisierungsgrad der Methode zu erreichen wurde die oben beschriebene manuelle Probenaufarbeitung für die Zymark RapidTrace (Caliper Life Sciences, Rüsselsheim), einen programmierbaren Festphasen-Extraktor, adaptiert. Die Programmierung ist in Tabelle 3 zusammengefasst.

---

**Tabelle 3: RapidTrace-Extraktionsprotokoll in Adaption der manuellen Aufarbeitung**

	Schritt	Solvent	ml	ml/min
1	Konditionierung	Methanol	6	0.5
2	Konditionierung	3×-Puffer	3	0.5
3	Probenaufgabe	Probengemisch	3.5	0.5
4	Waschschritt	Waschpuffer	4	0.5
5	Kanüle spülen	H <sub>2</sub> O	5	30
6	Kartusche trocknen	Zeit =	2 min	-
7	Elution	Methanol	4	0.5
8	Kanüle spülen	H <sub>2</sub> O	5	30
9	Kanüle spülen	Methanol	5	30
10	Kanüle spülen	H <sub>2</sub> O	5	30

### 3.6 Optimierung der Probenasservierung

Da umfassende Untersuchungen zur enzymunabhängigen Stabilität von SUX und SMC bereits existieren (s. Kapitel 2.4.1.2), wurden hier nur die direkt für die Probenasservierung wichtigen Parameter, d.h. die Glasadsorption und die Frier-Tau-Stabilität, eingehender untersucht.

#### 3.6.1 Glasadsorption

Für die Untersuchungen zum Ausmaß der materialabhängigen Analytadsorption wurden je 200 ng/ml SUX bzw. SMC in 1 ml Laufmittel AII in Probengefäße aus Polypropylen (PP) bzw. Glas überführt, und bei Raumtemperatur über 10 h vermessen (4 Ansätze, n = 1).

### 3.6.2 Frier-Tau-Stabilität

Zur Bestimmung der Frier-Tau-Stabilität wurden Standardproben einer niedrigen, mittleren und hohen Analytkonzentration (25 ng/ml, 500 ng/ml bzw. 80 µg/ml von sowohl SUX als auch SMC) in den Matrices Serum und Urin nach einem, zwei sowie drei Frier-Tau-Zyklen analysiert (n = 6). Innerhalb jedes Zyklus wurden die Proben für 23 h bei -20°C gelagert, anschließend aufgetaut und bei Raumtemperatur für insgesamt 1 h inkubiert. Der interne Standard-Mix wurde in allen Fällen erst unmittelbar vor der Probenextraktion zugegeben.

## 3.7 *Methodenvalidierung*

Die entwickelte Methode wurde sowohl für Serum als auch Urin als Matrix nach den oben beschriebenden Richtlinien der Gesellschaft für toxikologische und forensische Chemie (GTFCh) unter Verwendung des Programmes VALISTAT für die statistische Auswertung [57,58] validiert.

Die eingesetzten SUX-negativen Leermatrix (Serum/Urin) wurden von aufgeklärten und in das Prozedere einwilligenden Probanden gewonnen.

Die Untersuchungen auf Selektivität und Spezifität der Methode wurden wie vorgeschrieben an 6 verschiedenen Leermatrix sowie 2 mit internem Standard dotierten Leermatrix durchgeführt. Sowohl die Seren als auch die Urine aller Probanden wiesen signifikante Mengen einer Störsubstanz mit gleicher Retentionszeit sowie Haupt-MRM verglichen mit SMC auf. Da es nicht möglich war diese Interferenz chromatographisch von SMC zu trennen, musste der besagte MRM als wertlos für die Identifikation von SMC bewertet, und stattdessen der zweit- bzw. drittstärkste Ionenübergang als Quantifier respektive Qualifier definiert werden.

Für die Linearität wurde gemäß GTFCh-Richtlinien Leermatrix mit definierten Analytkonzentrationen dotiert und jeweils 6-fach aufgearbeitet und vermessen. Aufgrund des großen, durch die Validierung abzudeckenden Konzentrationsbereiches wurden je Analyt und Matrixtyp ein niedriger und ein hoher Konzentrationsbereich validiert. Die verwendeten Kalibrator-Endkonzentrationen sind mit 12.5, 25, 37.5, 50, 62.5, 125, 250, 375 und 500 ng/ml für den unteren sowie 0.5, 2.5, 5, 7.5, 10, 20, 40, 60, 80 und 100 µg/ml für den oberen Kalibrationsbereich für SUX und SMC identisch, und wurden durch Zugabe von jeweils 100

---

$\mu\text{l}$  einer methanolischen 10fach-Mischstandardlösung zu 1 ml Matrix erreicht. Die Endkonzentration von je 1  $\mu\text{g/ml}$  SUX- $d_{18}$  und SMC- $d_3$  wurde in jeder Probe durch Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  einer methanolischen 10fach-Misch-ISTD-Lösung zu 1 ml Matrix erzielt.

Mittels VALISTAT® wurden die Grenzen der Methode aus obigen Linearitätsdaten, genauer aus der Regression der Messwerte für die 6 niedrigsten Kalibratoren, unter erneuter Sicherstellung ihrer Linearität und Varianzenhomogenität errechnet.

Präzision und Richtigkeit der Methode wurden richtlinienkonform durch Analyse von 3 Qualitätskontrollproben (QC-Proben) von niedriger, mittlerer und hoher Konzentration innerhalb eines jeden Konzentrationsbereiches (d.h. 25, 62.5, und 375 ng/ml sowie 5, 20 und 80  $\mu\text{g/ml}$ ) jeweils doppelt über einen Zeitraum von 8 Tagen vermessen.

Die Extraktionsausbeute wurde jeweils für den niedrigen und hohen QC-Kalibrator beider Konzentrationsbereiche und Probenmatrices gemäß GTFCh-Richtlinien ermittelt.

Matrixeffekte wurden sowohl in Serum als auch Urin aufgrund des weiten Validierungsbereiches nicht nur bei zwei sondern vielmehr drei verschiedenen Analytkonzentrationen (25 ng/ml, 500 ng/ml und 80  $\mu\text{g/ml}$ ) gemäß o.g. Richtlinien evaluiert.

## **3.8 SMC-Interferenz**

### **3.8.1 Probandenkollektiv**

Serum- und Urinproben stammten von 63 bzw. 92 Probanden. Von 57 Probanden wurde sowohl Urin als auch Serum gewonnen, von zusätzlichen 35 bzw. 6 Probanden dagegen war ausschließlich Urin bzw. Serum vorhanden. Das gesamte Probenmaterial entstammt dem Archivbestand der toxikologischen Abteilung des hiesigen Institutes für Rechtsmedizin. In dieses Kollektiv wurden nur Proben eingeschlossen, welche als negativ für alle routinemäßig nachweisbaren Rauschmittel befundet wurden. Das entsprechende Probenmaterial wurde nach Dokumentation des Geschlechts sowie des Alters des Probanden codiert, und die Proben anschließend anonymisiert. Es wurde keine Referenzliste angelegt, daher war von diesem Zeitpunkt an eine Rückverfolgung der Probencodes zu den persönlichen Daten der Probanden ausgeschlossen. Eine derartige Verwendung von Archivmaterial in medizinischen Studien wird vom Ethikkomitee der Deutschen Ärzteschaft geduldet, sofern – wie in diesem Fall – keine direkt personenbezogenen oder genetischen Daten erhoben werden, und es folglich als

unverhältnismäßiger Aufwand angesehen werden kann, die Einwilligung der Betroffenen einzuholen; es wurde daher kein separates Votum der Ethikkommission der medizinischen Fakultät an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn eingeholt.

### **3.8.2 Alkalische Hydrolyse**

Native Serum- und Urinproben (je  $n = 3$ ) wurden einer alkalischen Hydrolyse unterzogen, indem der Matrix-pH mittels 10 M NaOH auf pH 11 eingestellt wurde. Alkalische Hydrolyse fand unter diesen Bedingungen für 72 h bei Raumtemperatur statt [30]. Der Matrixcharakter wurde im Folgenden durch Einstellen der Probe auf ihren ursprünglichen pH-Wert mittels 10 M und 1 M HCl weitgehend wiederhergestellt. Die Proben wurden dann wie beschrieben aufgearbeitet und die Extrakte analysiert.

## **3.9 *Forensische Realproben (Serum und Urin)***

Der forensische Routinebetrieb lieferte Probenmaterial von zwei vermuteten, einer tödlichen und einer überlebten, SUX-Intoxikation. Nur für letzteren Fall existieren verlässliche Rahmendaten zum Tathergang: die SUX-Applikation erfolgte knapp 5 Stunden vor der Abnahme der analysierbaren Blutprobe, Urin wurde 5 Stunden und 15 min nach vermuteter Gabe abgenommen. Eine zwischenzeitliche Blasenentleerung ist wahrscheinlich, jedoch nicht exakt dokumentiert. Entsprechend genaue Informationen liegen für die vermutete tödliche Intoxikation nicht vor, es ist allerdings ein postmortales Intervall von ca. 2.5-3 Tagen anzunehmen. Es muss zur späteren Deutung der Analyseergebnisse beachtet werden, dass in beiden Fällen (bedingt durch die Herkunft der Proben und die damit assoziierten legalen Formalitäten bzw. nötige Transportlogistik) eine Paraoxon-Stabilisierung der Proben innerhalb der ersten kritischen Minuten unmöglich war. Die Stabilisierung erfolgte jedoch stets direkt nach Probenerhalt, im Falle der überlebten Intoxikation somit innerhalb der ersten 24 h, im Falle der tödlichen Intoxikation ca. 2.5-3 Tage nach der vermuteten SUX-Gabe. Die stabilisierten Matrices wurden bis zur Analyse bei  $-20\text{ °C}$  gelagert, und mit der folgenden Ausnahme wie oben beschrieben aufgearbeitet: bedingt durch die hohe Viskosität der Probe musste das Blut des Todesfalles 1:1 mit deionisiertem Wasser verdünnt werden, um die SPE Kartuschen durchfließen zu können.

---

### 3.10 Studie zu nativem SMC in Organen und Glaskörperflüssigkeit

Gewebeproben (Hirn, Leber, Niere) und Glaskörperflüssigkeit der tödlichen SUX-Intoxikation wurden während der Obduktion am hiesigen Institut für Rechtsmedizin gewonnen, und bis zur Analyse ca. 2 Jahre lang bei  $-20\text{ °C}$  gelagert.

Kontrollproben (Hirn, Leber, Niere) wurden SUX-negativen Obduktionsfällen desselben Instituts entnommen, wobei sie entweder zeitnah nach der Entnahme (d.h. ohne jegliches Einfrieren, Analyse innerhalb von max. 2 Tagen bei einer Lagerung bei  $4\text{ °C}$ ), oder aber nach einer 2-jähriger Lagerung bei  $-20\text{ °C}$  (Archivbestand) analysiert wurden.

Die Kontrollleichen wurden als frisch klassifiziert, wenn sie schnell einer im Anschluss ununterbrochenen Kühlkette zugeführt wurden, und die Sektion innerhalb von 2 Tagen nach Todeseintritt stattfand. In den entsprechenden Fällen waren Zeichen beginnender Fäulnis nicht bemerkbar. Fäulnisveränderte Leichen wurden 6-12 Tage nach Todeseintritt obduziert, und waren einen Großteil des postmortalen Intervalls der Umgebungstemperatur (im deutschen Sommer) ausgesetzt. Die jeweiligen Obduktionsprotokolle dokumentieren für diese Leichen ausgeprägte Fäulniserscheinungen.

Tabelle 4 gibt einen Überblick über die Zusammensetzung des Gewebekollektivs für diese Studie.

#### **Tabelle 4: Zusammensetzung des Gewebekollektivs**

Die absolute Probenanzahl aktuell obduzierter sowie archivierter Fälle, und die darin enthaltene Anzahl an Gewebeproben in einem Stadium fortgeschrittener Fäulnis (\*in Klammern) sind für jeden Gewebetyp angegeben.

Gewebe	aktuell obduziert (*)	Archiv (*)
Hirn	15 (2)	14 (2)
Leber	19 (2)	14 (2)
Niere	19 (2)	14 (2)

Glaskörperflüssigkeit von 10 verschiedenen Personen entstammt SUX-negativem Archivmaterial des Instituts, und war für ca. 2 Jahre bei  $-20\text{ °C}$  gelagert worden

### 3.10.1 Probenvorbereitung der Gewebsasservate

Von jeder Probe wurden zwei gleichartige Aliquots von jeweils 1 g Gewebe eingewogen, und das exakte Gewicht dokumentiert. Jedes Aliquot wurde daraufhin mit 2 ml 0.1 M HCl versetzt. Diese Ansäuerung wurde durchgeführt um einerseits den Proben-pH für die sich anschließende SPE-Extraktion bereits grob einzuregeln, sowie andererseits eine Analytstabilisierung durch Unterbinden sowohl der enzymatischen (pH unterhalb des Optimums der Cholinesterasen) als auch nicht-enzymatischen Degradation zu erwirken. Da in ersten Tests ein Vergleich mit wässrigen Probenmatrices erhöhter Stabilisatorbedarf zur vollständigen Hemmung der gewebsständigen Esterasen erkennbar war, wurde Paraoxon stets in einer 5-fach höheren Konzentration, also 500 ng/g Probe (100 µl einer methanolischen 5 µg/ml Stammlösung), eingesetzt. Anschließend wurden zu jedem Ansatz 100 µl eines methanolischen ISTD-Mischstandards entsprechend einer Probenendkonzentration von 250 ng/g SUX-d<sub>18</sub> und SMC-d<sub>3</sub> zugefügt. Zur Analytquantifizierung mittels des Standardadditionsverfahrens wurde eines der beiden Aliquots mit 25 ng/g SMC (100 µl einer 250 ng/ml Stammlösung in Methanol) dotiert, wohingegen die entsprechende Vergleichsprobe mit 100 µl MeOH versetzt wurde. Die SMC-Konzentration von 25 ng/g wurde für die vorliegende Fragestellung insofern als ideal für eine sinnvolle 1-Punkt-Kalibrierung angesehen, als dass der endogene SMC-Gehalt zuvor mit 10-200 ng/g [25] angegeben wurde, wobei ein Großteil der Proben weniger als 50 ng/g SMC enthalten soll [24]. Die Proben wurden im Anschluss mit dem Ultra-Turrax von Janke & Kunkel (IKA-Labortechnik, Staufen i. Br.) mit einer Einzelpuls-Dauer von nicht mehr als 15 s und einer Gesamt-Zerkleinerungsdauer von max. 45 s homogenisiert, um ein Überhitzen der Proben zu vermeiden. Die homogenisierten Gewebeproben wurden 1 min kräftig für eine vollständige Verteilung der Analyten gevortext, und dann 15 min bei 4000 Umdrehungen pro Minute (rpm) in der Megafuge 1.0 (Heraeus/Thermo Fisher Scientific, Langenselbold) im Schwingrotor des Modells 2150 zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde anschließend einem zweiten Zentrifugationsschritt mit stärkerer Beschleunigung unterzogen (15 min bei 16250 × g; Zentrifuge Mikro 20, Hettich, Tuttlingen). Zur Lipidextraktion wurde der so erhaltene Überstand (meist ~ 1.5 - 2 ml) mit 4 ml Chloroform kombiniert und kräftig für 1-2 min gevortext. Phasentrennung wurde daraufhin durch Zentrifugation für 8 min bei 4000 rpm (Megafuge) erwirkt. Unter Vermeidung eines Transfers von Chloroform wurde die wässrige Oberschicht vorsichtig abgenommen und erneut für 15 min bei 16250 × g zentrifugiert. Um für alle Primärextrakte der Leichenorgane ein Verstopfen der SPE-

---

Kartuschen verlässlich ausschließen zu können und darüber hinaus auch mögliche Matrixeffekte zu minimieren, wurden Leber- und Nierenextrakte generell 1:4 mit H<sub>2</sub>O verdünnt, wobei 2 ml dieser Lösung zusammen mit 1 ml des 3×-Puffers der SPE zugeführt wurden. Extrakte von Hirngewebe waren weniger problematisch und wurden unverdünnt unter Zugabe von 1 ml 3×-Puffer in der SPE eingesetzt. In jedem Fall wurde der Proben-pH vor Beladen der SPE-Kartusche kontrolliert, und nötigenfalls auf pH 3.0 eingestellt.

Die Gewebeproben des SUX-assoziierten Todesfalls wurden analog zum oben beschriebenen Protokoll aufgearbeitet, zur Herstellung der dotierten Probe wurde jedoch nicht nur SMC, sondern auch SUX zugegeben (je 25 ng/g).

### **3.10.2 Probenvorbereitung der Glaskörperflüssigkeit**

Von jeder Probe wurden zwei 500 µl Aliquots abgenommen und durch Zugabe von 100 ng/ml Paraoxon (25 µl einer methanolischen 2 µg/ml Stammlösung) stabilisiert. Anschließend wurden beide Aliquots mit 50 µl eines methanolischen ISTD-Mischstandards entsprechend einer Probenkonzentration von je 1 µg/ml SUX-d<sub>18</sub> und SMC-d<sub>3</sub> versetzt. Zur Analytquantifizierung mittels des Standardadditionsverfahrens wurde eines der beiden Aliquots mit 12.5 ng/g SMC (50 µl einer methanolischen 125 ng/ml Stammlösung) dotiert, wohingegen die entsprechende Vergleichsprobe mit 50 µl MeOH versetzt wurde. Die Proben wurden nach Zugabe von 1.25 ml H<sub>2</sub>O, 250 µl 0.1 M HCl und 1 ml 3×-Puffer mittels SPE extrahiert. Für jedes Aliquot wurde der Proben-pH vor Beladen der SPE-Kartusche kontrolliert, und nötigenfalls auf pH 3.0 eingestellt.

Die Glaskörperflüssigkeit des SUX-assoziierten Todesfalls wurde analog zum oben beschriebenen Protokoll aufgearbeitet, zur Herstellung der dotierten Probe wurde jedoch nicht nur SMC, sondern auch SUX zugegeben (je 12.5 ng/g).

## **3.11 *In vitro*-Untersuchungen und Vorversuche**

Für die Erstellung eines verlässlichen pharmakokinetischen Modells müssen *in vitro*-Analytverluste vernachlässigbar sein, eine Optimierung der Probenasservierung sowie -vorbereitung hat also primär zu erfolgen.

### 3.11.1 Stabilisierung von Vollblutproben

Zur Ermittlung des Ausmaßes der enzymabhängigen Degradation von SUX und SMC im Vollblut und, im Folgeschritt, der optimalen Stabilisatorkonzentration wurde in Anlehnung an das Prozedere in 3.5.2 je 1 ml frisches EDTA-Vollblut (tagesaktuell abgenommen,  $n = 3$ ) mit 0-500 ng/ml Paraoxon versetzt und 5 min bei 37°C vorinkubiert. Anschließend wurden zu jedem Ansatz 1 bzw. 20 µg/ml SUX oder SMC dotiert, und die Probe nach einer 5-minütigen Inkubation bei 37°C im Wärmeschrank einer AcN-Fällung unterworfen. Im Fällungsreagens waren die internen Standards SUX-d<sub>18</sub> und SMC-d<sub>3</sub> entsprechend einer Probenendkonzentration von 1 µg/ml bereits enthalten. Der durch Zentrifugation gewonnene Überstand wurde unter Stickstoff zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in 100 µl Laufpuffer AII resuspendiert, mit 1 ml n-Hexan entfettet, und abschließend in der HPLC-MS/MS vermessen. Die Daten wurden über den Quotienten aus der Peakfläche des Analyten durch die Peakfläche des entsprechenden internen Standards (AUC Analyt/AUC ISTD) ausgewertet.

### 3.11.2 Materialvergleich - EDTA/Heparin-Monovetten

Von 8 gesunden Probanden (5 Frauen, 3 Männer) wurden im Hinblick auf das geplante BlutabnahmeprozEDURE in der klinischen Studie je 6 Vollblutproben in Paraoxon-stabilisierte Monovetten abgegeben. Die je 3 Monovetten des Typs EDTA-K sowie Li-Heparin wurden anschließend nach kräftiger Durchmischung der stabilisierten Probe durch Zugabe von 100 µl wässriger Standardlösungen mit jeweils einer niedrigen, mittleren bzw. hohen Konzentration der Analyten SUX und SMC (entsprechend 37.5, 2500 bzw. 40000 ng/ml Endkonzentration in der Vollblutprobe) dotiert, und nach erneutem Mischen sofort auf Eis gekühlt. Die Proben wurden in einer Kühlzentrifuge (Beckman J2-21; Beckman, Galway, Irland) bei 0 – 4°C mit 2500 – 3000 × g (je nach Position im Festwinkelrotor JA-20.1) zentrifugiert. 1 ml des gewonnenen Plasmas wurde direkt im Anschluss nach dem bereits beschriebenen Standardprotokoll (s. 3.5.4) aufgearbeitet, und der SUX- sowie SMC-Gehalt bestimmt.

---

### 3.11.3 *In vitro*-Distribution von SUX und SMC

5 Leerplasmen verschiedener Spender wurden in Paraoxon-stabilisierte Monovetten des Typs EDTA-K aufgezogen. Die Monovetten wurden anschließend nach kräftiger Durchmischung der stabilisierten Probe durch Zugabe von 100 µl wässriger Standardlösungen mit jeweils einer niedrigen, mittleren bzw. hohen Konzentration der Analyten SUX und SMC (entsprechend 37,5, 2500 bzw. 40000 ng/ml Endkonzentration in der Vollblutprobe) dotiert, und nach erneutem Mischen sofort auf Eis gekühlt. Die Proben wurden (nur zum Zwecke der absoluten Gleichbehandlung mit den Vergleichsproben in 3.11.2) in einer Kühlzentrifuge bei 0 – 4°C mit 2500 – 3000 × g (je nach Position im Festwinkelrotor) zentrifugiert. 1 ml des Plasmas wurde direkt im Anschluss nach dem bereits beschriebenen Standardprotokoll (s. 3.5.4) aufgearbeitet, und der SUX- sowie SMC-Gehalt bestimmt. Der Vergleich der Analytkonzentrationen dieser Plasmaproben mit denen der EDTA-Vollblutproben aus 3.11.2 wird zur Berechnung der *in vitro* Distribution von SUX und SMC genutzt.

### 3.11.4 *In vitro*-Degradation von SMC

Von 3 gesunden Probanden (2 Frauen, 1 Mann) wurden jeweils ca. 20 ml Vollblut (tagesaktuell abgenommen) in EDTA-Monovetten abgegeben, in einem Plastikgefäß vereinigt, und bei 37°C inkubiert. Ein Magnetrührer sorgte für eine konstante Durchmischung der Proben während des gesamten Versuchsablaufes. Durch Zugabe von 100 µl wässriger Standardlösung wurde jede der Proben mit einer SMC-Konzentration von 20 µg/ml dotiert. Direkt nach der Durchmischung jeder Probe, sowie nach 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 20, 25, 30 sowie 60 min wurde je ein 1 ml-Aliquot aus der jeweiligen Gesamtprobe entnommen, und eine eventuelle enzymatische Hydrolyse durch Zugabe von 100 ng/ml Paraoxon und sofortiger Kühlung auf Eis gestoppt. Die Proben wurden in einer Kühlzentrifuge bei 0-4°C mit 2500 – 3000 × g (je nach Position im Festwinkelrotor) zentrifugiert. 0,5 ml des gewonnenen Plasmas wurde direkt im Anschluss nach dem bereits beschriebenen Standardprotokoll (s. 3.5.4) aufgearbeitet, und der SUX- sowie SMC-Gehalt bestimmt. Die Proben des Experimentes werden einer mit 100 ng/ml Paraoxon-stabilisierten Standardprobe derselben Ausgangskonzentration gegenübergestellt.

## **3.12 *In vivo*-Untersuchungen - Probandenstudie**

### **3.12.1 Allgemeines**

Die Studie wurde in der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin des Universitätsklinikums Essen durchgeführt. Das Studienprotokoll wurde von der Ethik-Kommission des Universitätsklinikums Essen wie beantragt genehmigt. Eine schriftliche Einverständniserklärung nach erfolgter umfassender Aufklärung liegt für jeden Patienten vor.

### **3.12.2 Kollektiv**

Insgesamt 18 Patienten (10 Frauen, 8 Männer) wurden in die Studie eingeschlossen, und wiesen ein mittleres Alter von 60.0 Jahren mit einer Altersspanne von 19-79 Jahren auf. Ihr Gewicht lag zwischen 55-101.4 kg (im Mittel 77.1 kg). Die Probanden wurden im Rahmen elektiver Tumorresektionen (Leber: 9; Ösophagus/Magen: 5; Pankreas: 1; Darm: 1, Niere: 1, retroperitoneales Liposarkom: 1) chirurgisch behandelt.

Bei allen Patienten war das Legen eines Blasenkatheters sowie eines arteriellen Zugangs in die Arteria radialis indiziert.

Alle Patienten wurden nach den Vorgaben der ASA (American Society of Anesthesiologists) bezüglich ihres körperlichen Zustandes klassifiziert, und fielen sämtlich in die ASA-Klassen 2 (Patienten mit leichter Allgemeinerkrankung, 11 Probanden) oder 3 (Patienten mit schwerer Allgemeinerkrankung, 7 Probanden).

Insbesondere dem durchschnittlichen Alter des Kollektivs geschuldet bestanden bei den Probanden verschiedene klinisch relevante, teils medikamentenpflichtige Vorerkrankungen (Hypertonie: 6, KHK: 1, Herzinfarkt: 1, chronische/akute Krankheiten aus dem entzündlichen Formenkreis: 8, Diabetes Typ II: 1, Adipositas: 1, Gicht: 1, Hyper-/Hypothyreose: 4, Anämie: 1, Nierenzysten: 1, Depressionen: 1). Mehrfachnennungen bzw. Kombinationen waren möglich.

Die Rekrutierung von Probanden mit Tumorerkrankungen erklärt die häufige Dokumentation von bereits durchlaufenen Chemotherapien (10 Probanden) in diesem Kollektiv. Eine studiennahe bzw. aktuelle Medikation mit Chemotherapeutika (Methotrexat) ist für einen Probanden dokumentiert.

---

---

Für jeden Probanden sind Vor- bzw. Begleiterkrankungen sowie individuelle Medikation dokumentiert, auf eine detaillierte Auflistung wird an dieser Stelle jedoch verzichtet. Sollten die Ergebnisse der Studie eine genauere Betrachtung des Gesundheitszustandes oder Therapieregimes nötig machen, so wird an späterer Stelle speziell auf einzelne Probanden eingegangen.

### **3.12.3 Prämedikation und Narkose**

Sedierung der Patienten am Vorabend bzw. am OP-Tag wurde mit Benzodiazepinen erreicht (Flunitrazepam: 6, Midazolam: 13; Lorazepam: 1), Kombinationen der genannten Wirkstoffe waren möglich. Präoperative Gerinnungshemmung wurde bei 5 Probanden (Enoxaparin: 4, Heparin: 1), z.B. bei immobilen oder vormals marcumarisierten Patienten, vorgenommen.

Vor Narkoseeinleitung wurde einem Großteil der Probanden (12) ein Periduralkatheter zur späteren Schmerzbehandlung gelegt, zur Periduralanästhesie (PDA) wurde Bupivacain verwendet. Ebenfalls noch vor Einleitung der Anästhesie wurde ein Zugang in die Arteria radialis gelegt.

Die Narkose wurde mit Etomidat (3) bzw. Thiopental (15) eingeleitet. Die Blase wurde direkt nach Narkoseeinleitung katheterisiert. Analgesie wurde durch Gabe von Fentanyl erreicht.

Die individuelle Prä- und Narkosemedikation der Probanden ist dokumentiert, auf eine detaillierte Auflistung wird an dieser Stelle jedoch verzichtet. Sollten die Ergebnisse der Studie eine genauere Betrachtung der Medikation nötig machen, so wird an späterer Stelle speziell auf einzelne Probanden bzw. Medikamente eingegangen.

Muskelrelaxierung wurde durch eine Bolus-Gabe von 80-100 mg SUX (entsprechend 1.0 - 1.7 mg/kg KG, im Mittel: 1.3 mg/kg KG) initiiert. Der Zeitpunkt des SUX-Bolus wurde dokumentiert, und die Probennahme begonnen. Nachfolgend zeigte keiner der Patienten im quantitativen neuromuskulären Monitoring eine atypisch verlängerte, neuromuskuläre Blockade als Zeichen einer BChE-Depletion.

### **3.12.4 Co-Medikation**

Die Narkose wurde durch konstante Beimischung von 0.5 – 1.5 % Isofluran zu den Beatmungsgasen aufrecht erhalten.

---

In allen Fällen wurde Ringer-Lactat-Lösung zur Volumensubstitution verabreicht, die infundierte Menge lag zwischen 2 – 9 l, im Mittel bei 4.8 l.

9 Probanden wurde zur intravasalen Volumensubstitution Gelafundin®, eine 4 %ige Gelatine-Polysuccinat-Lösung, in Mengen von 0.5 – 2.5 l (Mittel: 1.1 l) appliziert.

Im Verlauf der Operationen wurden verschiedene Medikamente wie z.B. Herz-Kreislauf-Medikamente (Phenylephrin: 9, Noradrenalin: 14, Atropin: 6, Neostigmin: 1), Antibiotika (Ampicillin/Sulbactam: 12, Ciprofloxacin: 1, Clindamycin: 1, Cephazolin: 4), Diuretika (Furosemid: 1), Elektrolyte (Inzolen®: 4), Antiemetika (Granisetron: 4, Dimenhydrinat: 1), Glucocortikoide (Dexamethason: 1) und Sedativa (Midazolam: 1, Haloperidol: 1) verabreicht. Medikamente zur Aufrechterhaltung einer zusätzlichen, PDA-unabhängigen, Analgesie (Fentanyl: 9, Morphin: 3, Piritramid: 1) kamen ebenfalls zum Einsatz.

Mehrfach- bzw. kombinierte Gaben waren möglich. Die individuelle OP-Medikation der Probanden ist dokumentiert, auf eine detaillierte Auflistung wird an dieser Stelle jedoch verzichtet. Sollten die Ergebnisse der Studie eine genauere Betrachtung der OP-Medikation nötig machen, so wird an späterer Stelle speziell auf einzelne Probanden bzw. Medikamente eingegangen.

Die Muskelrelaxierung wurde mittels Rocuronium aufrecht erhalten.

### **3.12.5 Ausschlusskriterien**

Es wurden keine Patienten in die Studie eingeschlossen, bei denen Blutprodukte infundiert wurden. Das Einbringen von Fremdblut bzw. -blutbestandteilen stellt ein Ausschlusskriterium für die vorliegende Studie dar, da eine über den Zeitverlauf uneinheitliche qualitative bzw. quantitative Ausstattung mit Serum- oder auch membranständigen (erythrozytären) Esterasen die individuellen kinetischen Parameter der Zielsubstanzen verfälschen könnte.

Weitere Ausschlusskriterien wurden nicht formuliert.

Tabelle 5 fasst die wichtigsten Patientendaten zusammen.

---

**Tabelle 5: Patientendaten**

Patientenzahl	18
Geschlecht	
männlich	8
weiblich	10
Alter (Jahre)	
Spanne	19-79
Mittel	60.0
Gewicht	
Spanne	55-101.4
Mittel	77.1
Eingriff	
Tumor (Leber-; Magen-; andere)	18 (9; 5; 4)
SUX-Dosis absolut (mg)	80 – 100
SUX-Dosis (mg/kg KG)	
Spanne	1.0 – 1.7
Mittel	1.3

### 3.12.6 Probennahmeschema

Blutproben wurden über den liegenden, arteriellen Zugang entnommen. Um vergleichbare sowie maximal aussagekräftige Daten bezüglich der Nachweisfenster von SUX und SMC zu erhalten, sollten sowohl Blut- als auch Urinproben nach einem vorgegebenen Zeitplan entnommen werden. Blutproben sind innerhalb der ersten 2 min so schnell wie überhaupt möglich (ca. alle 20 s) vorzunehmen, weitere vorgesehene Entnahmezeiten liegen bei 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 7, 9, 11, 15, 20, 25, 30 min, sowie 1, 2, 4 und 6 h nach SUX-Einleitung. Frisch sezernierter Urin ist planmäßig 1, 2, 4 und 6 h nach SUX-Gabe zu sammeln. Bei 9 Probanden war darüber hinaus ein zusätzlicher Meßpunkt einzufügen, welcher den gesammelten Urin des Zeitintervalls bis 1 h nach SUX-Einleitung repräsentieren soll.

Aufgrund der Unwägbarkeiten mit denen auf einer chirurgischen bzw. intensivmedizinischen Station immer zu rechnen ist (z.B. Instabilität des Patienten und dadurch notwendigerweise entfallende oder verschobene Probennahmen) konnten diese Vorgaben nicht immer

eingehalten werden, jegliche Abweichung vom Zeitplan wurde allerdings immer sorgfältig dokumentiert und floss in die Datenauswertung ein.

Die Probennahme fand für beide Matrices zu Vergleichszwecken teils stabilisiert ( $n = 15$ ) und teils unstabilisiert ( $n = 3$ ) statt. Für Blut erfolgte die Probennahme stets in gerinnungshemmende S-Monovetten des Typs EDTA-K (4 ml): für unstabilisierte Probensätze wurden diese Gefäße nicht manipuliert, zur Abnahme einer stabilisierten Probenserie wurde jede Monovette dagegen mit 10  $\mu\text{l}$  einer wässrigen Paraoxon-Lösung entsprechend einer Endkonzentration von 100 ng/ml bei Komplettbefüllung der Monovette versetzt.

Frisch sezernierter Katheterurin wurde in 2 ml-Reaktionsgefäßen von Eppendorf (Hamburg) gesammelt, entweder ohne (unstabilisiert, 3 Probanden) oder mit Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  einer methanolischen Paraoxon-Lösung (15 Probanden) entsprechend einer 100 ng/ml Endkonzentration bei Komplettbefüllung. Sammelurin (Pool) wurde in 3 Fällen unstabilisiert und bei 6 Probanden paraoxon-stabilisiert abgenommen.

Die Proben wurden nach der Entnahme gut durchmischt, sofort auf Eis gekühlt, und so schnell wie möglich (generell innerhalb von 10 min) in einer schon vorgekühlten Zentrifuge bei 0 – 2 °C für 8 min bei  $3000 \times g$  zentrifugiert. 1 ml des Überstandes (EDTA-Plasma) wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Eventuell verbliebenes Rest-Plasma wurde in ein zweites Eppendorfgefäß überführt, und diese Rückstellprobe ebenfalls in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Urinproben wurden ohne weitere Bearbeitung direkt schockgefroren. Die Proben wurden bis zur Analyse bei – 20 °C gelagert, wobei auch während des Probenverkehrs in das Institut für Rechtsmedizin die Kühlkette niemals unterbrochen wurde.

### **3.12.7 Pharmakokinetisches Modelling mittels TopFit®**

Rohdaten für die SMC-Konzentrationsverläufe im Plasma eines jeden Probanden wurden sowohl mittels eines benutzerdefinierten als auch eines drei-kompartimentellen Ansatzes berechnet. In die Kalkulationen mittels des nutzerdefinierten Modells wurden auch SUX-Konzentrationsdaten einbezogen.

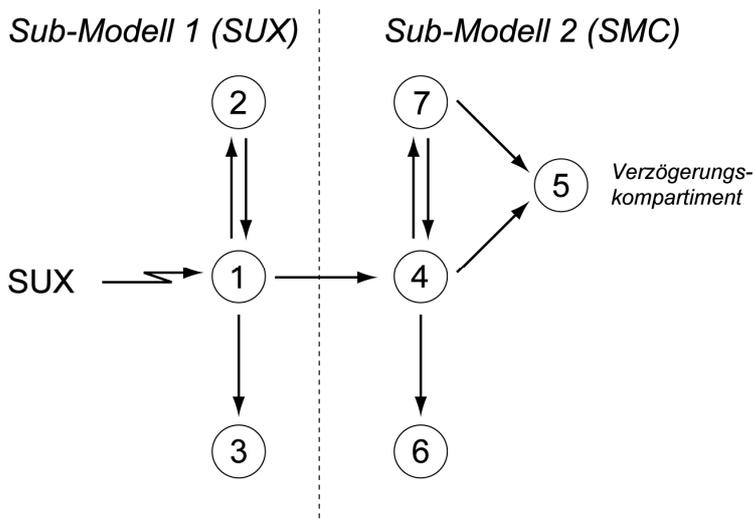
Um einer verzögerten Freisetzung bzw. Durchmischung im zentralen Kompartiment Rechnung zu tragen, beinhaltet sowohl das nutzerdefinierte als auch das 3-kompartimentelle Modell eine Verzögerungsphase („lag time“). Pharmakokinetische Parameter werden mittels

---

einer nicht-linearen Regression nach der Methode der kleinsten Quadrate aus den Konzentrations-Zeit-Profilen für SMC ermittelt. Die Optimierung fand nach modifizierten Versionen des Hooke-Jeeves-Algorithmus [71] bzw. der Marquardt/Gauss-Methode [72] statt. Eine Wichtung ( $1/y^2$ ) wurde vorgenommen. Die errechneten Modelle wurden zunächst visuell bezüglich ihrer Übereinstimmung mit den Rohdaten evaluiert, darüber hinaus wurden das Akaike Informationskriterium (AIC, [73]), die verwandten Schwarz- [74] bzw. Imbimbo-Tests [75] sowie der Regressionskoeffizient ( $r^2$ ) als Bewertungsgrundlage für die Korrelation zwischen Rohdaten und jeweiligem Modell herangezogen.

Um zu rigide und eventuell folglich falsche Annahmen bezüglich der Kompartimentierung zu vermeiden, wurde das benutzerdefinierte Modell bewusst sehr offen und flexibel angelegt; es bezieht aus diesem Grund nicht nur die Freisetzung und Umverteilung von SMC, sondern auch die des Vorläufers SUX mit ein.

Mittels des benutzerdefinierten Modells werden nur grundlegende pharmakokinetische Parameter wie die Fläche unter dem Konzentrations-Zeit-Profil („area under the curve“, AUC), die Eliminationshalbwertszeit, sowie die mittlere systemische Verweildauer von SMC („mean residence time“, MRT) bestimmt. Die erhobenen Daten werden zur Determination sowie Validierung des 3-kompartimentellen Ansatzes genutzt. Die folgende Abbildung verdeutlicht das angewendete, benutzerdefinierte Modell.

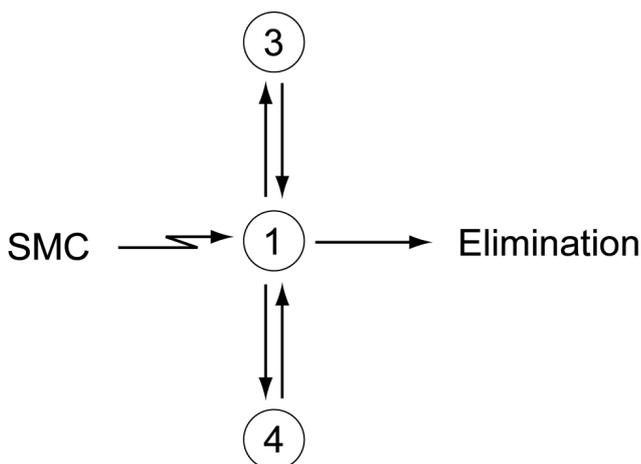


**Abbildung 19: Benutzerdefiniertes Modell zur SMC-Kinetik**

Die zugrunde liegenden Modellvorstellungen sind graphisch dargestellt.

Die Pharmakokinetik von SMC kann am besten mittels eines 3-Kompartiment-Modells beschrieben werden. Das Modell geht von einer quasi instantanen SMC-Freisetzung aus. Es wird weiterhin angenommen, dass SUX komplett über SMC umgesetzt wird, die SMC-Dosis wurde daher mit 70 % ( $MW_{\text{SUX}}: 290.4 \text{ g/mol}$ ,  $MW_{\text{SMC}}: 204.1 \text{ g/mol}$ ) der laut OP-Protokoll injizierten Menge an SUX veranschlagt. Es wird von einer ausschließlich zentralen Elimination ausgegangen. Gründe für die Aufstellung dieser Arbeitshypothesen, konzeptuelle Grenzen sowie eine Einordnung der erhaltenen Daten in das derartig determinierte Modell wird an späterer Stelle vorgenommen (s. Abschnitt 5.8.2).

Mittels dieses Ansatzes werden erneut die AUC, die Eliminationshalbwertszeit ( $t_{1/2\gamma}$ ), sowie die MRT bestimmt, und mit dem nutzerdefinierten Modell verglichen. Zusätzlich werden Parameter wie die maximale Plasmakonzentration von SMC ( $C_{\text{max}}$ ), der Zeitpunkt des Erreichens von  $C_{\text{max}}$  ( $T_{\text{max}}$ ), die initialen Halbwertszeiten  $t_{1/2\alpha}$  und  $t_{1/2\beta}$ , apparente Volumina des zentralen Verteilungsraums sowie der peripheren Kompartimente ( $V_C$ ,  $V_3$ ,  $V_4$ ), das apparente Verteilungsvolumen unter Gleichgewichtsbedingungen („steady state“,  $V_{\text{ss}}$ ), relevante Distributionsgeschwindigkeitskonstanten zur Beschreibung der Verteilungsvorgänge zwischen den Kompartimenten ( $k_{13}$ ,  $k_{31}$ ,  $k_{14}$ ,  $k_{41}$ ), die Eliminationsgeschwindigkeitskonstante  $k_{1e}$  sowie die Clearance (CL) berechnet. Die folgende Abbildung illustriert das 3-kompartimentelle Modell.



**Abbildung 20: Drei-kompartimentelles Modell zur SMC-Kinetik**

Die zugrunde liegenden Modellvorstellungen sind am Schema dargestellt.

### **3.13 Software**

NMR Spektren wurden mit der 1D-WinNMR-Software (Bruker Daltronic, Bremen) analysiert.

Zur Auswertung von Validierungsdaten wurde das Programm Valistat 1.0 (Arvecon, Walldorf) verwendet.

HPLC-MS/MS-Daten wurden mittels der Analyst® Software Version 1.4 (Agilent Technologies, Böblingen) ausgewertet.

Die statistische Auswertung der Rohdaten erfolgte mit Hilfe des WinSTAT® Add-ins (Version 2003.1) für Microsoft® Office Excel 2003.

Individuelle pharmakokinetische Parameter wurden mittels nutzerdefinierter Analyse sowie mittels eines Drei-Kompartiment-Dispositions-Modells unter Verwendung des Programms TopFit 2.0 (Fischer VCH, Stuttgart, [76]), Version TOPLIN 2.0.0, errechnet und evaluiert. Die Berechnungen wurden von Dr. Ralf A. Hilger aus dem westdeutschen Tumorzentrum am Universitätsklinikum Essen durchgeführt, und die resultierenden Datensätze zur weiteren Auswertung überlassen.

---

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Standardsynthese

#### 4.1.1 Ausbeuten

Die Ausbeute für das Zwischenprodukt Desmethyl-SMC wurde mit 36.4 % beziffert. Für die Summe aller kombinierten SMC- bzw. SMC-d<sub>3</sub>-Fraktionen belief sich die jeweilige Ausbeute auf 94.2 % bzw. 73.0 %. Eine Ausbeute von 62.5 % wurde für das Zwischenprodukt Cholin-d<sub>9</sub> festgestellt. Mit 22.2 % war die Ausbeute für die Synthese von SUX-d<sub>18</sub> am niedrigsten, es muss jedoch in diesem Zusammenhang berücksichtigt werden, dass die Synthese nicht auf hohe Ausbeuten hin optimiert wurde, sondern dass im Gegensatz höchste Sorgfalt darauf verwendet wurde, in jedem Schritt Material von größtmöglicher Reinheit zu erhalten.

#### 4.1.2 Synthese von SUX-d<sub>18</sub>

##### 4.1.2.1 NMR

Das <sup>13</sup>C-Spektrum von SUX-d<sub>18</sub> lässt 5 Signale erkennen, die allesamt dem Analyten zugeordnet werden können (Abbildung 21). Die Signale in (a) und (e) können eindeutig als Kohlenstoffatome im Carboxyl- bzw. Succinatrest des Moleküls bestimmt werden: durch die direkte Nachbarschaft von 2 Sauerstoffatomen befindet sich die chemische Verschiebung für die Nuclei in (a) im Tieffeld des Spektrums. Im Gegensatz dazu können die Signale der (e)-Kohlenstoffe, welche nicht an elektroneivere Heteroatome gebunden sind, bei niedrigeren Werten für  $\delta$  gefunden werden.

Bei der <sup>13</sup>C-NMR wird die Signalintensität, welche für gewöhnlich durch geringe Isotopenhäufigkeit sowie Signalaufspaltung niedrig ist, durch Protonenentkopplung erhöht. Unter Berücksichtigung dessen kann das Multiplettsignal in (d) unzweifelhaft den Methylkohlenstoffen des Analyten zugeordnet werden: die insgesamt 6 Kohlenstoffe sind jeweils an 3 Deuteriumatome (nicht entkoppelt) sowie 1 Stickstoffatom (nicht entkoppelt) gebunden, das <sup>13</sup>C-Signal ist daher vielfach aufgespalten und erhebt sich kaum noch über die Basislinie. Die Signale in (b) und (c) können mittels ihrer jeweiligen Multiplizität zugeordnet werden: bei dem Signal in (b) handelt es sich um ein Triplett, woraus klar hervorgeht dass das entsprechende signalgebende Kohlenstoffatom – im Gegensatz zu dem in (c) welches ein

---

Singulett erzeugt – unmittelbar an ein Stickstoffatom gebunden ist, und dem Effekt der ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{N}$ )-Dipolarkopplung ausgesetzt ist, welche zu o.g. Signalaufspaltung führt. Die komplette Zuordnung der Signale ist in Abbildung 21 zu sehen. Im  $^{13}\text{C}$ -Spektrum von SUX-d<sub>18</sub> gibt es keine Signale, die auf eine organische Verunreinigung oder eine unvollständige Deuterierung hinweisen würden.

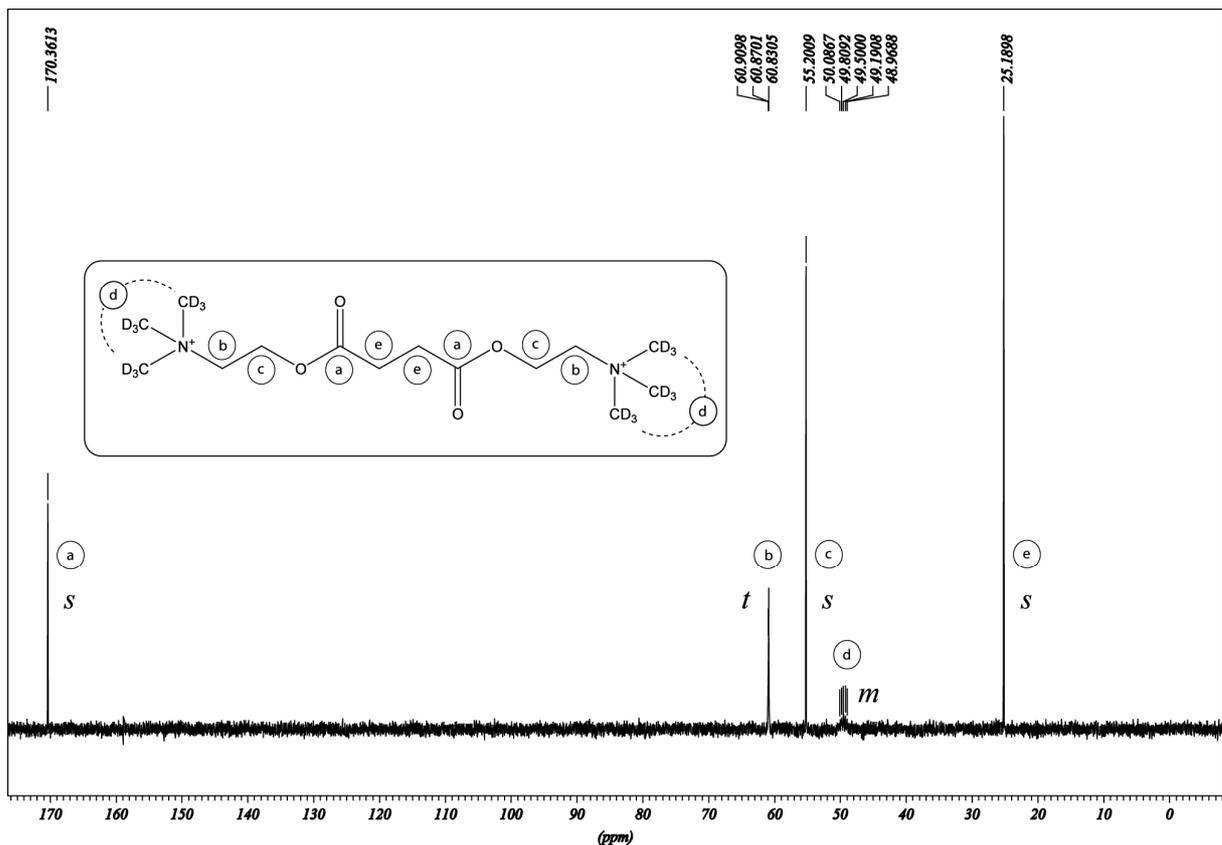


Abbildung 21:  $^{13}\text{C}$ -Spektrum von SUX-d<sub>18</sub>

Die Zielstruktur ist in der Umrandung dargestellt. NMR-Signale wurden ihren entsprechenden Kohlenstoffatomen durch Buchstabenpaare zugeordnet. Signalmultiplizität ist durch s=Singulett, t=Triplet und m=Multipllett beschrieben.

Das  $^1\text{H}$ -Spektrum von SUX-d<sub>18</sub> beinhaltet 4 Signale (Abbildung 22). Integration dieser Signale beweist, dass das Signal (a) mit einem ungeraden Wert von 0.87 das Lösemittelsignal (solvent residual signal) darstellt; die übrigen 3 Signale, jedes mit einem geraden Integralwert von 4.00, können jedoch dem Analyten zugerechnet werden. Wie schon durch die Integralwerte angedeutet tragen jeweils 4 Protonen zu jedem der o.g. Signale bei. Um die fraglichen 12 Protonen genauer zuzuordnen wurde in der Folge sowohl die chemische

Verschiebung als auch die Multiplizität aller Signale ausgewertet. Die Zuordnung der Protonen welche zum Signal (d) beitragen ist unzweideutig: nur abgeschirmte Protonen, d.h. solche in einer kohlenstoffreichen Umgebung, können ein derartiges Hochfeld-Signal erzeugen. Alle anderen Protonen sind an Kohlenstoffe gebunden, welche ihrerseits an elektronegravere Heteroatome gebunden sind: derartige Bindungen erzeugen eine Entschirmung der entsprechenden Protonen, wodurch ihre Signale im Tieffeld, d.h. bei höheren Werten für  $\delta$  detektiert werden.

Die genaue Zuordnung der obigen (b)- und (c)-Signale mag zunächst überraschen, da das Signal der (c)-Protonen in der Nähe eines Sauerstoffatoms normalerweise weiter gen Hochfeld verschoben sein sollten als das der (b)-Protonen, die einem (weniger elektronegativen) Stickstoff benachbart sind. Die hier postulierte Zuordnung konnte jedoch durch ein Zusatzexperiment, einem  $^{14}\text{N}$ -Entkopplungsexperiment, bewiesen werden: nach Suppression der  $^{14}\text{N}$ -Kopplungseffekte gleicht sich die Multiplizität des (b)-Signals der des (c)-Signals an, es konnte damit also bewiesen werden, dass die (b)-Protonen dem Stickstoff am nächsten benachbart sind. Die letztendliche Zuordnung der Signale ist in Abbildung 22 zusammengefasst. Im  $^1\text{H}$ -Spektrum von SUX-d<sub>18</sub> sind keine überschüssigen Signale sichtbar, welche auf eine organische Verunreinigung oder eine unvollständige Deuterierung hinweisen würden.

---

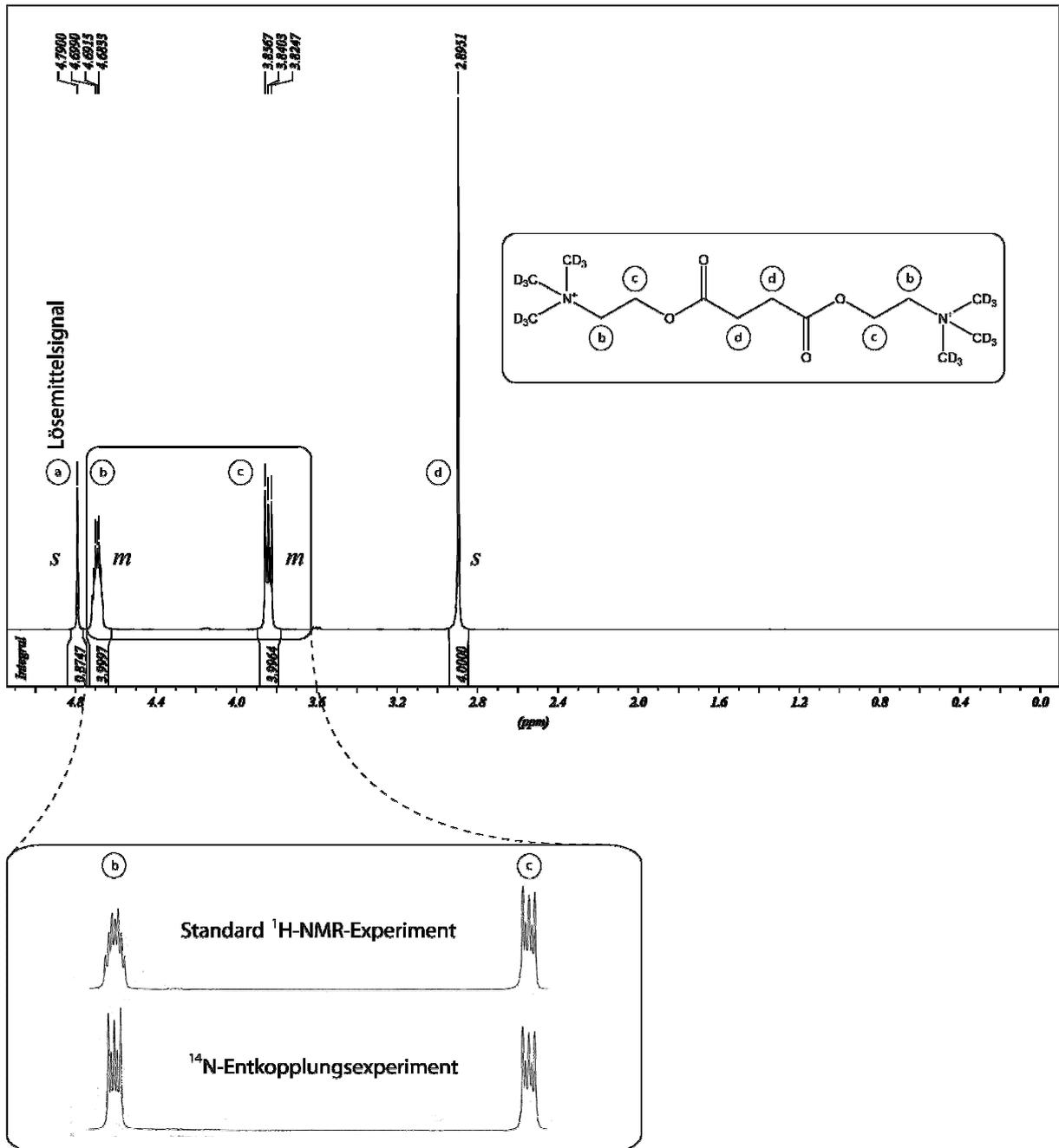


Abbildung 22:  $^1\text{H}$ -Spektrum von SUX- $\text{d}_{18}$

Oben:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von SUX- $\text{d}_{18}$ . Die Zielstruktur ist innerhalb der Umrandung dargestellt. NMR-Signale wurden ihren entsprechenden Protonen durch Buchstabenpaare zugeordnet. Signalmultiplizität ist durch s=Singulett und m=Multipllett beschrieben. Unten: Ausschnitt der bezeichneten Region des obigen Standard- $^1\text{H}$ -NMR Spektrums in Superposition mit der entsprechenden Spektralregion des  $^{14}\text{N}$ -Entkopplungsexperiments.

#### 4.1.2.2 FAB-MS

Das FAB-MS Spektrum von SUX-d<sub>18</sub> ist verhältnismäßig komplex: das Hauptsignal in diesem Spektrum ist bei einem Masse-Ladungsverhältnis von m/z 307.1 zu finden, was dem [M-H]<sup>+</sup>, also dem Molekülion nach Abstraktion eines Protons entspricht. Die beiden nächstgrößeren Signalintensitäten entsprechen dem Addukt des Zielmoleküls mit einem Iodidion ([M+I]<sup>+</sup> bei m/z 435.2) bzw. einem Zerfallsprodukt des Analyten ([M-CD<sub>3</sub>]<sup>+</sup> bei m/z 280.3). Alle anderen Signale liegen unterhalb von 30 % Intensität: die mit höherer m/z korrespondieren mit Komplexen zwischen dem Analyt und der Matrix (m/z 461.3) oder Matrixfragmenten (m/z 354.3), während Signale in der Region niedriger m/z verschiedenen Fragmenten des Analyten oder aber Analytkomplexen entsprechen, so z.B. der abgespaltenen Cholineinheit in Verbindung mit einem Iodidion (m/z 239.2). Das SUX-d<sub>18</sub> FAB-MS-Spektrum sowie seine Interpretation ist in Abbildung 23 dargestellt.

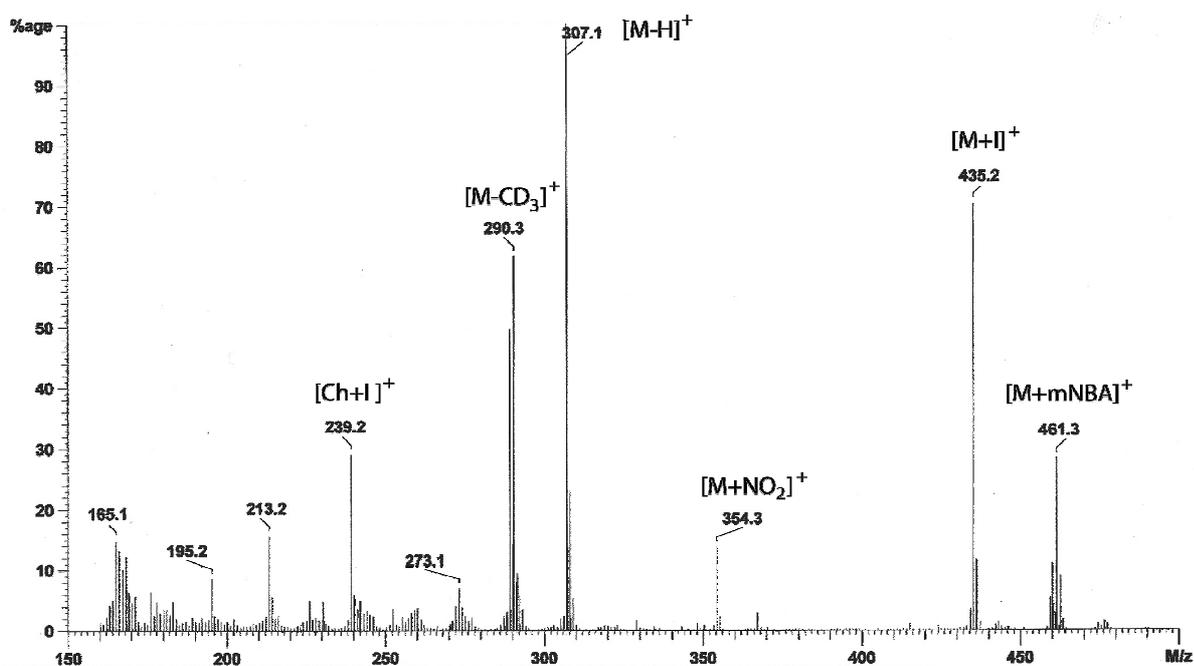


Abbildung 23: FAB-MS-Spektrum von SUX-d<sub>18</sub>

Das Hauptsignal bei m/z 307.1 korrespondiert mit [M-H]<sup>+</sup>, die beiden anderen prominenten Signale können als [M+I]<sup>+</sup> (bei m/z 435.2) sowie [M-CD<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (bei m/z 280.3) gedeutet werden. Die kleineren Ausschläge entsprechen Komplexen des Analyten mit der Matrix (m/z 461.3) oder eines ihrer Fragmente (m/z 354.3), sowie verschiedenen Analytfragmenten oder deren Komplexe (m/z 239.2). Es gibt keine Anzeichen für eine unvollständige Deuterierung oder Kontamination der Zielsubstanz.

### 4.1.3 Synthese von SMC-d<sub>3</sub>

#### 4.1.3.1 NMR

Im <sup>13</sup>C-Spektrum von SMC-d<sub>3</sub> wurden 8 hochaufgelöste Resonanzen detektiert (Abbildung 24), von denen eine, das Heptett, das Lösemittelsignal darstellt. Die verbleibenden 7 Signale wurden wie folgt zugeordnet: Resonanzen (a) und (b) stammen von stark entschirmten Kohlenstoffkernen, d.h. den Kohlenstoffen der Carboxy- bzw. Estergruppen. Im Gegensatz hierzu können die (g)- und (h)-Signale den hochgradig abgeschirmten Kohlenstoffen im Rückgrad des Succinatrestes zugeschrieben werden. Die verbleibenden 3 Signale können mittels einer Kombination von Multiplizitäts- und Integraldaten zugeordnet werden: Die Resonanz in (d) ist ein Singulett und kann daher dem der Esterbindung benachbarten Kohlenstoff zugeschrieben werden. Im Gegensatz hierzu sind die Resonanzen in (e) und (c) in Triplets aufgespalten, was eine enge Nachbarschaft der signalgebenden Kohlenstoffkerne zum Stickstoff beweist. Um diese Signale nun weitergehend zuordnen zu können wurden vorhandene Integraldaten berücksichtigt: die Integration von <sup>13</sup>C-NMR Signalen ist nicht so beweiskräftig wie entsprechende Integraldaten in <sup>1</sup>H-Spektren, sie kann jedoch als Hinweis für die Zuordnung der Resonanzen verwendet werden. In diesem Fall ergibt die Integration des NMR Signals in (e) einen zweimal höheren Wert als die des Signals (c), es kann daher geschlossen werden, dass die zwei nicht-deutერიerten Methylkohlenstoffe durch erstere Resonanz abgebildet werden (die deutერიerten Methylkohlenstoffe sind nicht entkoppelt und tragen daher kaum zum Signal bei), während letzteres Signal vom Kohlenstoff im Rückgrad des Cholinrestes neben dem quaternären Amin herrührt. Die abschließende Zuordnung ist in Abbildung 24 dargestellt. Die Abwesenheit von nicht interpretierbaren Signalen bzw. Signalintensitäten im vorliegenden Spektrum beweist, dass die Präparation korrekt deutერიert vorliegt, und nicht durch organische Spuren verunreinigt ist.

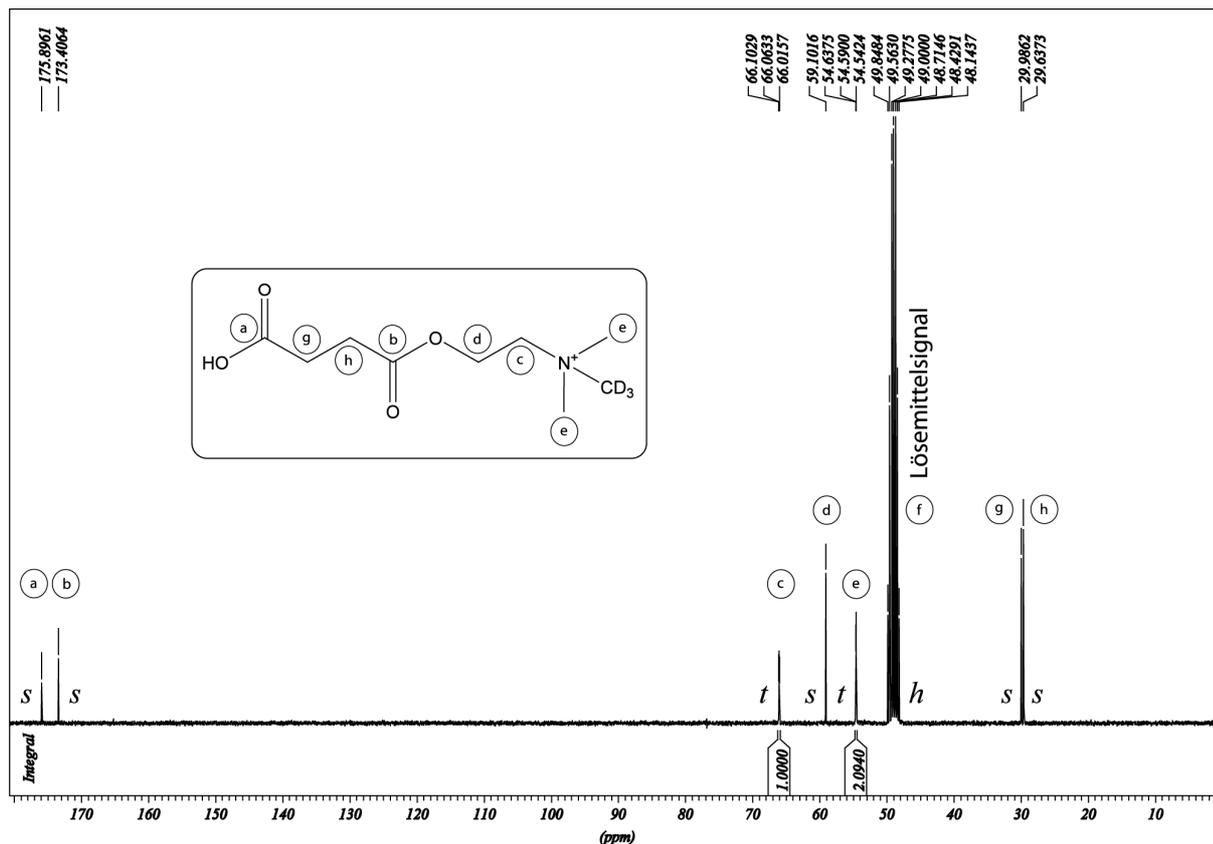


Abbildung 24:  $^{13}\text{C}$ -Spektrum von SMC- $\text{d}_3$

Die Zielstruktur ist in der Umrandung dargestellt. NMR-Signale wurden ihren entsprechenden Kohlenstoffatomen durch Buchstabenpaare zugeordnet. Signalmultiplizität ist durch s=Singulett, t=Triplet und h=Heptett beschrieben.

Das  $^1\text{H}$ -Spektrum von SMC- $\text{d}_3$  enthält 6 distinkte Signale (Abbildung 25). Integrationsdaten etablieren, dass die Signale (a) und (d) mit ihren ungeraden Werten von 0.96 und 0.52 einer  $\text{H}_2\text{O}$ -Verunreinigung (mit einer Konzentration im Spurenbereich) bzw. dem Lösemittelsignal zuzuschreiben sind. Ein Vergleich der chemischen Verschiebungen mit einer Referenzdatenbank [70] bestätigt diese Auslegung. Die verbleibenden 4 Signale können alle dem Analyten zugerechnet werden. Die Integralwerte wurden als 2.0, 2.0, 6.0, und 4.0 für die jeweiligen Signale in (b), (c), (e) und (f) bestimmt. Zusammen mit den Daten der jeweiligen chemischen Verschiebung lässt dies die Schlussfolgerung zu, dass das Signal in (f) von den am stärksten abgeschirmten Protonen der Zielkomponenten, d.h. den 4 Protonen des Succinatrestes, herrührt. Die 6 Methylprotonen liegen dem Singulett in (e) zugrunde, wobei diese Zuordnung im Einklang mit ihrer erwartungsgemäß niedrigeren Abschirmung durch den

---

benachbarten Stickstoff und somit einer höheren chemischen Verschiebung des resultierenden Signals ist. Jeweils zwei Protonen tragen zu den Signalen in (b) bzw. (c) bei, und auch hier gilt dasselbe wie für das  $^1\text{H}$ -Spektrum von SUX-d<sub>18</sub>: es konnte erneut durch ein  $^{14}\text{N}$ -Entkopplungsexperiment bewiesen werden, dass die mit (b) bezeichneten Protonen diejenigen in der nächsten Nachbarschaft zum Stickstoffatom sind. Die endgültige Zuordnung der Signale des  $^1\text{H}$ -NMR Spektrums von SMC-d<sub>3</sub> ist in Abbildung 25 zusammengefasst. Die Grafik verdeutlicht weiterhin dass keine Resonanzen vorhanden sind, welche als Indizien für Verunreinigungen oder unvollständige Deuterierung angesehen werden könnten.

---

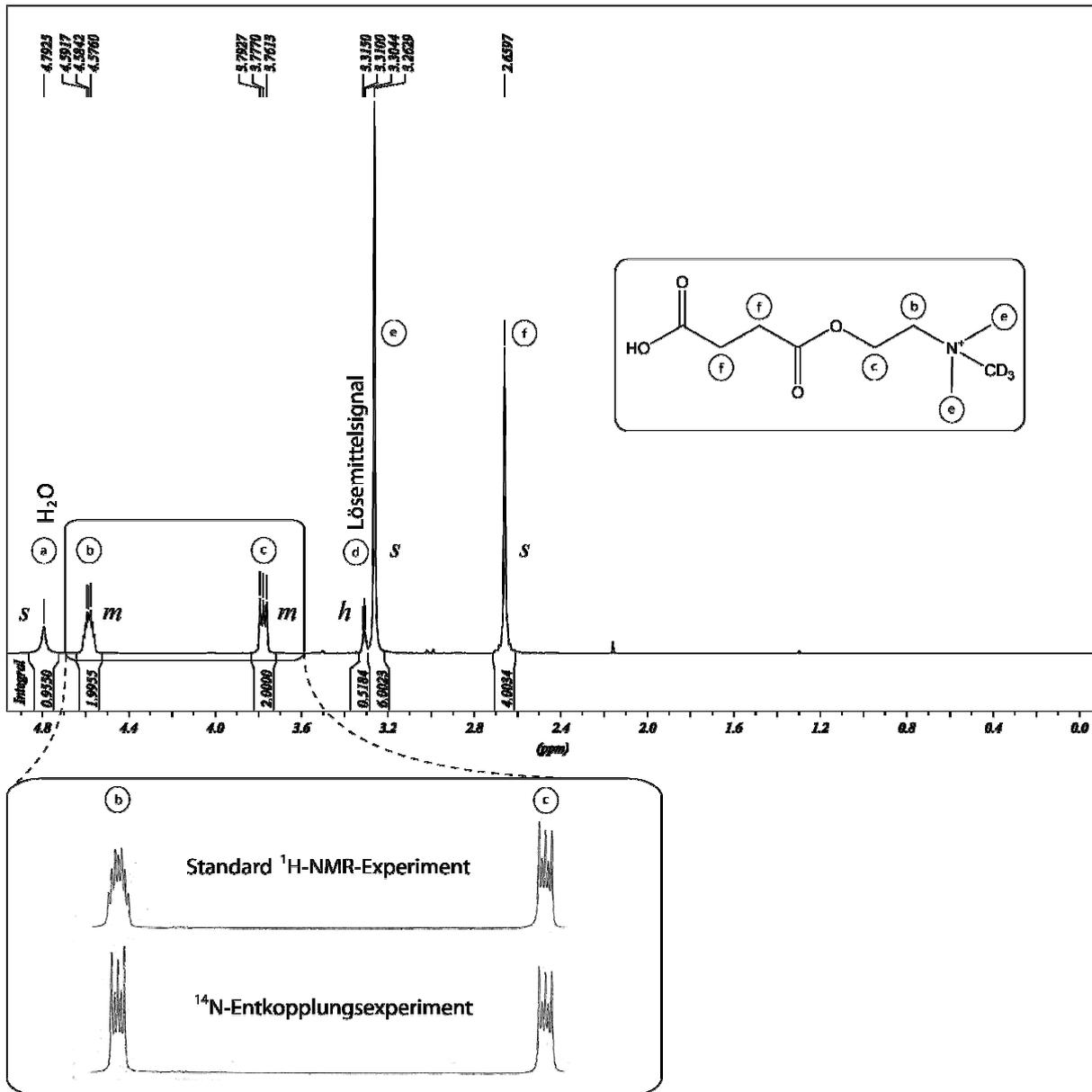


Abbildung 25:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von SMC- $\text{d}_3$  (oben)

Die Strukturformel der Zielsubstanz ist innerhalb der Umrandung dargestellt. NMR-Signale wurden ihren entsprechenden Protonen durch Buchstabenpaare zugeordnet. Signalmultiplizität ist durch s=Singulett, h=Heptett, und m=Multipllett beschrieben. Unten: Ausschnitt der bezeichneten Region des obigen Standard- $^1\text{H-NMR}$  Spektrums in Superposition mit der entsprechenden Spektralregion des  $^{14}\text{N-Entkopplungsexperiments}$ .

#### 4.1.3.2 FAB-MS

Die FAB-MS Analyse von SMC-d<sub>3</sub> ergibt ein Spektrum mit einem Hauptsignal bei m/z 207.1, was mit der exakten molekularen Masse des [M]<sup>+</sup> Zielions korreliert. Die kleineren Signale in diesem Spektrum können als Komplexe [2\*M-H]<sup>+</sup> sowie [2\*M+I]<sup>+</sup> gedeutet werden. Die Interpretation des FAB-MS Spektrums von SMC-d<sub>3</sub> ist in Abbildung 26 zusammengefasst.

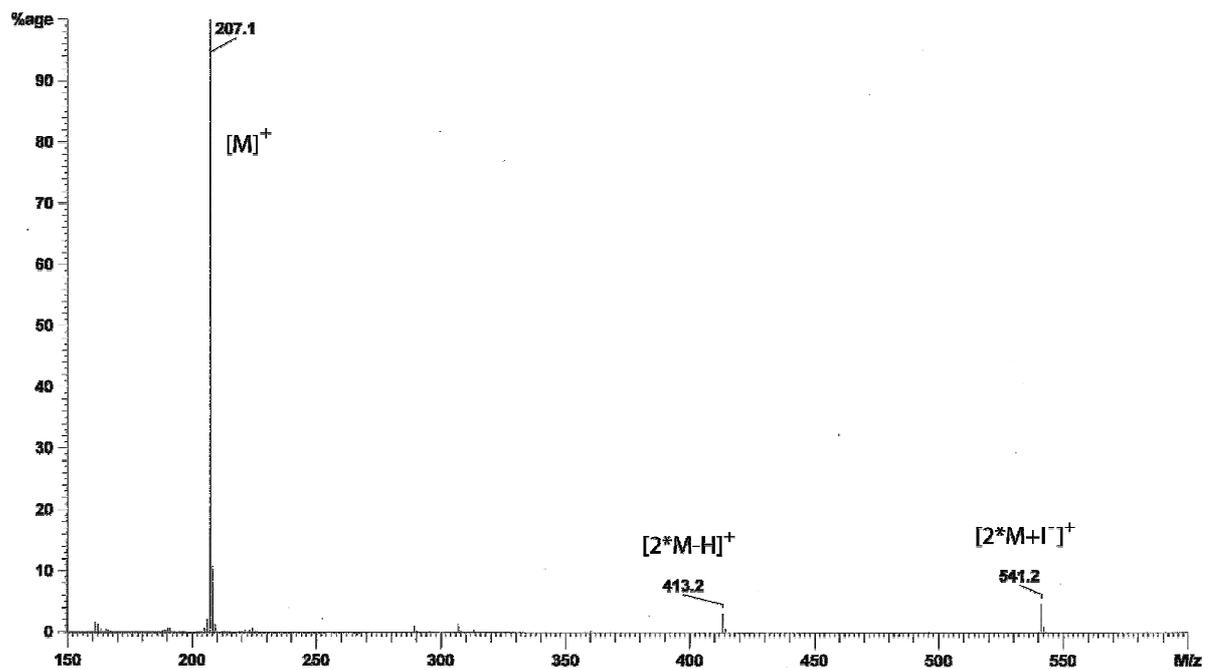


Abbildung 26: FAB-MS Spektrum von SMC-d<sub>3</sub>

Das Spektrum enthält ein Hauptsignal bei m/z 207.1, was dem isotopischen Atomgewicht des [M]<sup>+</sup> Zielions entspricht. Die kleineren Signale in diesem Spektrum können den Komplexen [2\*M-H]<sup>+</sup> bzw [2\*M+I]<sup>+</sup> zugerechnet werden. Es gibt keine Anzeichen für eine unvollständige Deuterierung oder Kontamination des Produkts.

## 4.1.4 Synthese von SMC

### 4.1.4.1 NMR

Im  $^{13}\text{C}$ -Spektrum von SMC wurden 8 hochaufgelöste Resonanzen detektiert (Abbildung 27), von denen eine, das Heptett, das Lösemittelsignal darstellt. Die verbleibenden 7 Signale wurden wie folgt zugeordnet: Resonanzen (a) und (b) stammen von stark entschirmten Kohlenstoffkernen, d.h. den Kohlenstoffen der Carboxy- bzw. Estergruppen. Im Gegensatz hierzu können die (g)- und (h)-Signale den hochgradig abgeschirmten Kohlenstoffen im Rückgrad des Succinatrestes zugeschrieben werden. Die verbleibenden 3 Signale können mithilfe einer Kombination von Multiplizitäts- und Integraldaten zugeordnet werden: Die Resonanz in (d) ist ein Singulett und kann daher dem der Esterbindung benachbarten Kohlenstoff zugeschrieben werden. Im Gegensatz hierzu sind die Resonanzen in (e) und (c) in Triplets aufgespalten, was eine enge Nachbarschaft der signalgebenden Kohlenstoffkerne zum Stickstoff beweist. Um diese Signale nun weitergehend zuordnen zu können wurden vorhandene Integraldaten berücksichtigt: die Integration von  $^{13}\text{C}$ -NMR Signalen ist nicht so beweiskräftig wie entsprechende Integraldaten in  $^1\text{H}$ -Spektren, sie kann jedoch als Hinweis für die Zuordnung der Resonanzen verwendet werden. In diesem Fall ergibt die Integration des NMR Signals in (e) einen dreifach höheren Wert als die des Signals (c), es kann daher geschlossen werden dass die drei Methylkohlenstoffe durch erstere Resonanz abgebildet werden, während letzteres Signal vom Kohlenstoff im Rückgrad des Cholinrestes neben dem quaternären Amin herrührt. Die abschließende Zuordnung ist in Abbildung 27 dargestellt. Die Abwesenheit von überschüssigen Signalen im vorliegenden Spektrum beweist, dass die Präparation nicht durch organische Spuren verunreinigt ist.

---

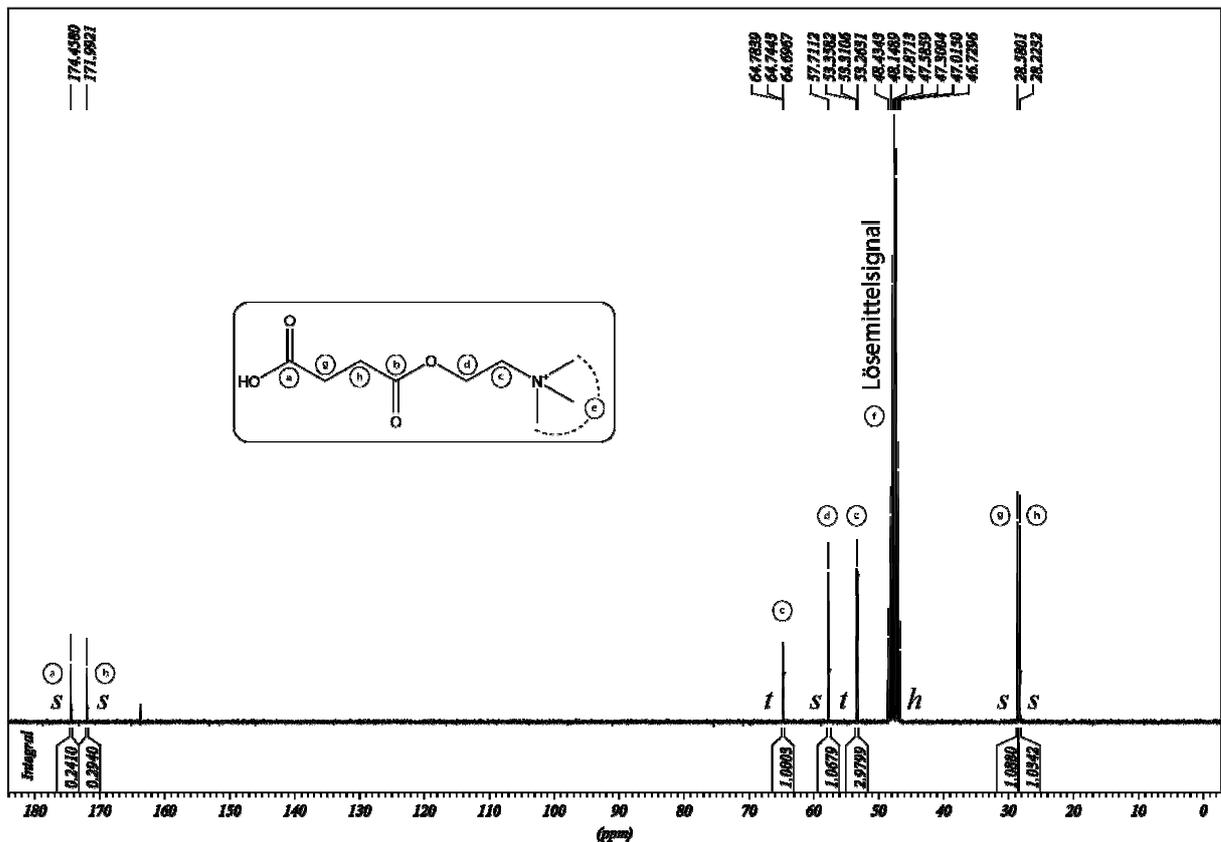


Abbildung 27:  $^{13}\text{C}$ -Spektrum von SMC

Die Zielstruktur ist in der Umrandung dargestellt. NMR-Signale wurden ihren entsprechenden Kohlenstoffatomen durch Buchstabenpaare zugeordnet. Signalmultiplizität ist durch s=Singulett, t=Triplet und h=Heptett beschrieben.

Das  $^1\text{H}$ -Spektrum von SMC enthält 6 distinkte Signale (Abbildung 28). Integrationsdaten etablieren, dass die Signale (a) und (d) mit ihren ungeraden Werten von 0.69 und 0.41 einer  $\text{H}_2\text{O}$ -Verunreinigung (mit einer Konzentration im Spurenbereich) bzw. dem Lösungsmittelsignal zuzuschreiben sind. Ein Vergleich der chemischen Verschiebungen mit einer Referenzdatenbank [70] bestätigt diese Auslegung. Die verbleibenden 4 Signale können alle dem Analyten zugerechnet werden. Die Integralwerte wurden als 2.0, 2.0, 9.0, und 4.0 für die jeweiligen Signale in (b), (c), (e) und (f) bestimmt. Zusammen mit den Daten der jeweiligen chemischen Verschiebung lässt dies die Schlussfolgerung zu, dass das Signal in (f) von den am stärksten abgeschirmten Protonen der Zielkomponenten, d.h. den 4 Protonen des Succinatrestes, herrührt. Die 9 Methylprotonen liegen dem Singulett in (e) zugrunde, wobei diese Zuordnung im Einklang mit ihrer erwartungsgemäß niedrigeren Abschirmung durch den

benachbarten Stickstoff und somit einer höheren chemischen Verschiebung des resultierenden Signals ist. Jeweils zwei Protonen tragen zu den Signalen in (b) bzw. (c) bei, und auch hier gilt dasselbe wie für die  $^1\text{H}$ -Spektren von SUX-d<sub>18</sub> bzw. SMC-d<sub>3</sub>: es konnte erneut durch ein  $^{14}\text{N}$ -Entkopplungsexperiment bewiesen werden, dass die mit (b) bezeichneten Protonen diejenigen in der nächsten Nachbarschaft zum Stickstoffatom sind. Die endgültige Zuordnung der Signale des  $^1\text{H}$ -NMR Spektrums von SMC ist in Abbildung 28 zusammengefasst. Die Grafik verdeutlicht weiterhin, dass keine überschüssigen Resonanzen vorhanden sind, welche als Indizien für Verunreinigungen angesehen werden könnten.

---

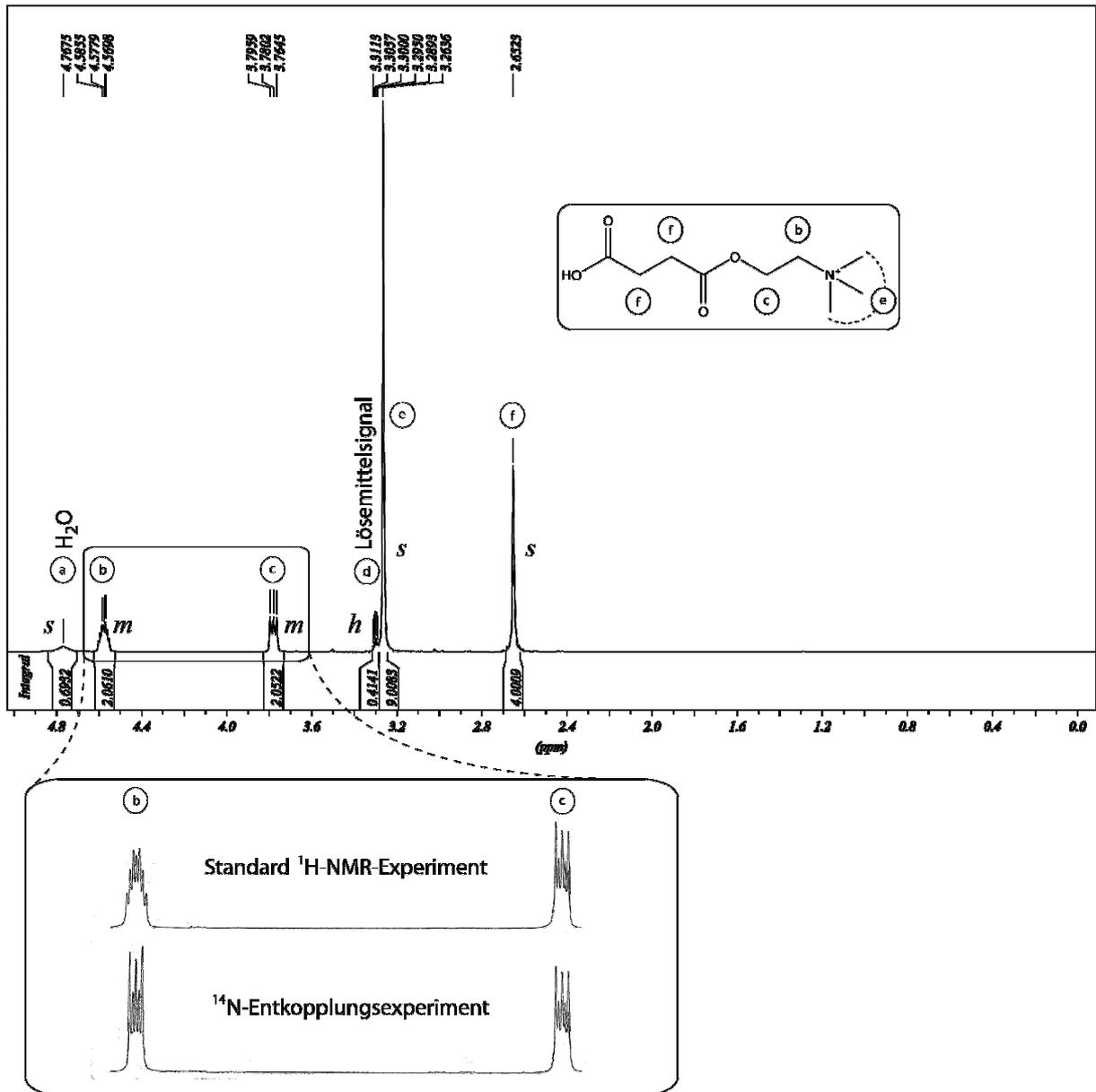


Abbildung 28:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von SMC (oben)

Die Strukturformel der Zielsubstanz ist innerhalb der Umrandung dargestellt. NMR-Signale wurden ihren entsprechenden Protonen durch Buchstabenpaare zugeordnet. Signalmultiplizität ist durch s=Singulett, h=Heptett, und m=Multipllett beschrieben. Unten: Ausschnitt der bezeichneten Region des obigen Standard- $^1\text{H-NMR}$  Spektrums in Superposition mit der entsprechenden Spektralregion des  $^{14}\text{N}$ -Entkopplungsexperiments.

#### 4.1.4.2 FAB-MS

Die FAB-MS Analyse von SMC ergibt ein Spektrum mit einem Hauptsignal bei  $m/z$  204.1, was mit der exakten molekularen Masse des  $[M]^+$  Zielions korreliert. Weitere Signale sind eindeutig als Komplex von zwei Molekülen SMC unter Abstraktion eines Protons ( $m/z$  407.3) bzw. in Verbindung mit einem Iodidion ( $m/z$  535.1) identifizierbar. Komplexe aus einem Molekül SMC mit einem Matrixmolekül konnten ebenfalls detektiert werden ( $m/z$  357.1). Andere untergeordnete Signale in diesem Spektrum können als Matrixkomplexe, genauer als  $[2^*mNBA+H]^+$  vor sowie nach Abstraktion von  $H_2O$  ( $m/z$  307.0 bzw.  $m/z$  289.0) gedeutet werden. Es sind keine Anzeichen für eine Kontamination des SMC erkennbar. Das FAB-MS-Spektrum von SMC sowie seine Interpretation ist in Abbildung 29 dargestellt.

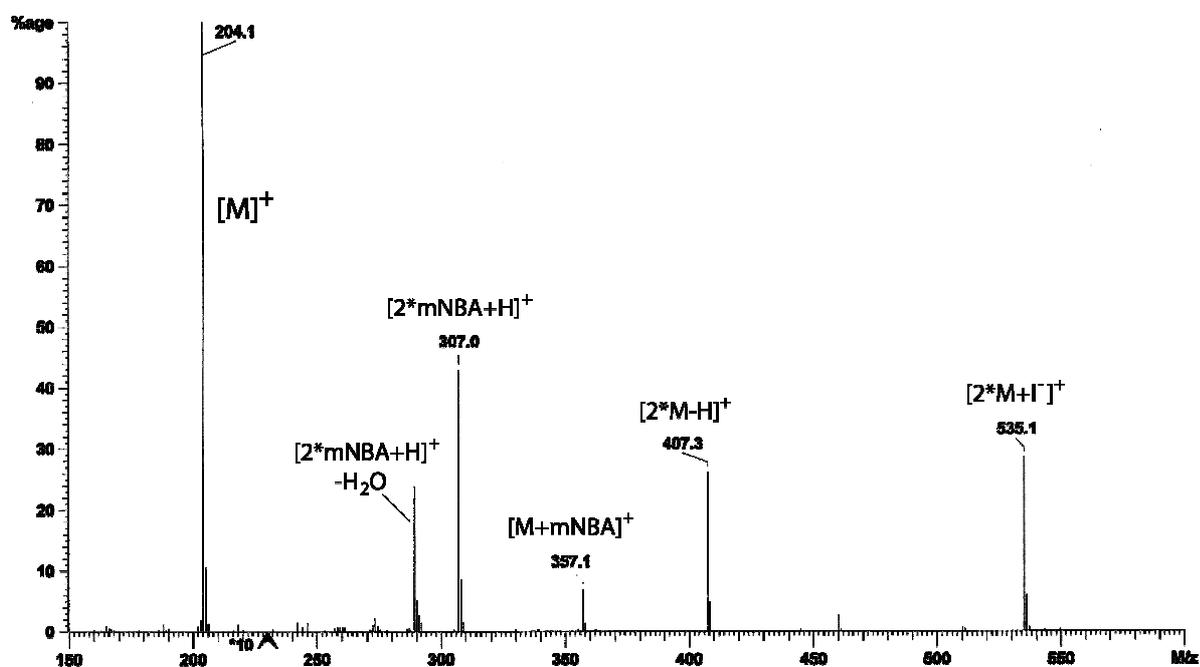
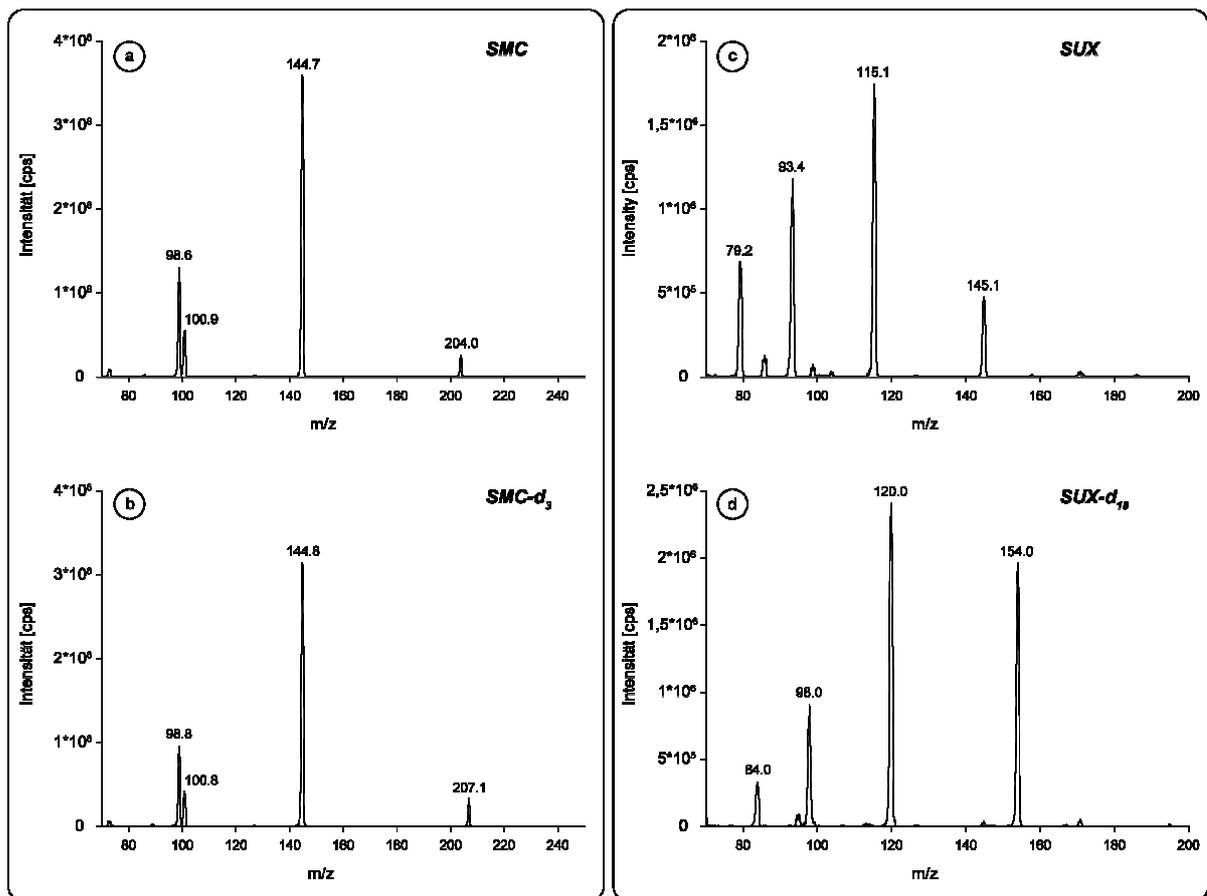


Abbildung 29: FAB-MS-Spektrum von SMC

Das Hauptsignal bei  $m/z$  204.1 korreliert mit der exakten molekularen Masse des  $[M]^+$  Zielions. Weitere Signale sind als  $[2^*M-H]^+$  ( $m/z$  407.3) bzw.  $[2^*M+I]^+$  ( $m/z$  535.1) identifizierbar. Der  $[M+mNBA]^+$ -Komplex konnte ebenfalls detektiert werden ( $m/z$  357.1). Untergeordnete Signale können als  $[2^*mNBA+H]^+$  vor sowie nach Abstraktion von  $H_2O$  ( $m/z$  307.0 bzw.  $m/z$  289.0) gedeutet werden.

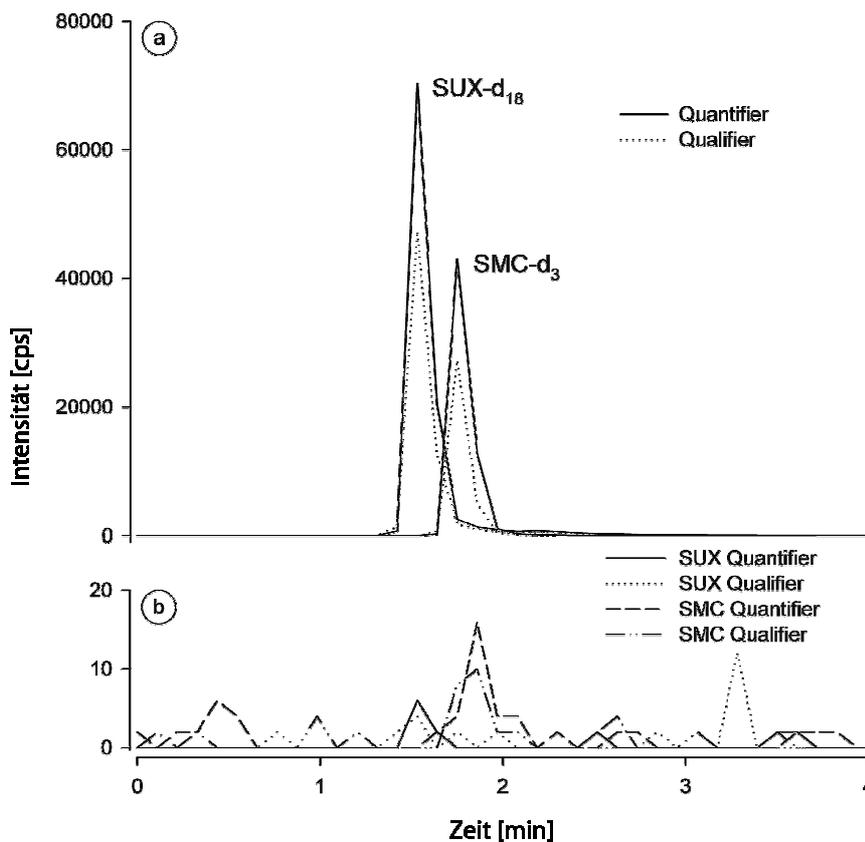
Die anschließende HPLC-MS/MS der synthetisierten internen Standards bewies schlussendlich ihre Anwendbarkeit für diese Analysetechnik: die beiden deuterierten Substanzen sind, wie auch die entsprechenden nicht-deuterierten Analyten, durch einzigartige Produktionenspektren und somit MRMs untereinander abgrenzbar und klar unterscheidbar (Abbildung 30).



**Abbildung 30: Produktionenspektren der Analyten sowie internen Standards**

Anhand der im Laufe der Methodenentwicklung aufgenommenen Produktionenspektren konnten für alle Analyten und ihre internen Standards charakteristische Fragmente ermittelt und in einzigartige MRM-Reaktionen umgesetzt werden.

Die Abwesenheit nicht-deuterierter Analyten in den Präparationen konnte auch mittels des Verfahrens der HPLC-MS/MS nachgewiesen werden (Abbildung 31).



**Abbildung 31: Anwendbarkeit der synthetisierten internen Standards in der HPLC-MS/MS-Analytik**

Die Abbildung zeigt das HPLC-MS/MS-Chromatogramm einer internen Standardlösung mit je 1  $\mu\text{g/ml}$  SMC-d<sub>3</sub> und SUX-d<sub>18</sub>. Acht charakteristische Ionenübergänge (1 Quantifier und ein Qualifier je Analyt) wurden wie unter 3.3 beschrieben aufgezeichnet. Beide deuterierten Analoga zeigen gute Signalintensitäten für sowohl den Quantifier- als auch den Qualifier-MRM (a) und die Abwesenheit nicht-deuterierter Analyten (b).

## 4.2 Methodenoptimierung

### 4.2.1 Acetonitril-Fällung

Mithilfe einer AcN-Fällung wurden nur ca. 10 % des SUX und 40 % des SMC wiedergefunden, daher wurde diese Art der Probenvorbereitung nicht als finale Extraktionsmethode akzeptiert, sondern diente nur als Ausgangspunkt für die weitere Methodenoptimierung.

### 4.2.2 Enzymatische Degradation

Es zeigte sich, dass bei einer Inkubationszeit von 5 min bei Raumtemperatur (RT) eine Serum-Paraoxonkonzentration von 100 ng/ml bereits maximal stabilisierend auf SUX wirkt, eine weitergehende Erhöhung der Organophosphatkonzentration führt darüber hinaus zu keinem messbaren Stabilitätsgewinn (Abbildung 32).

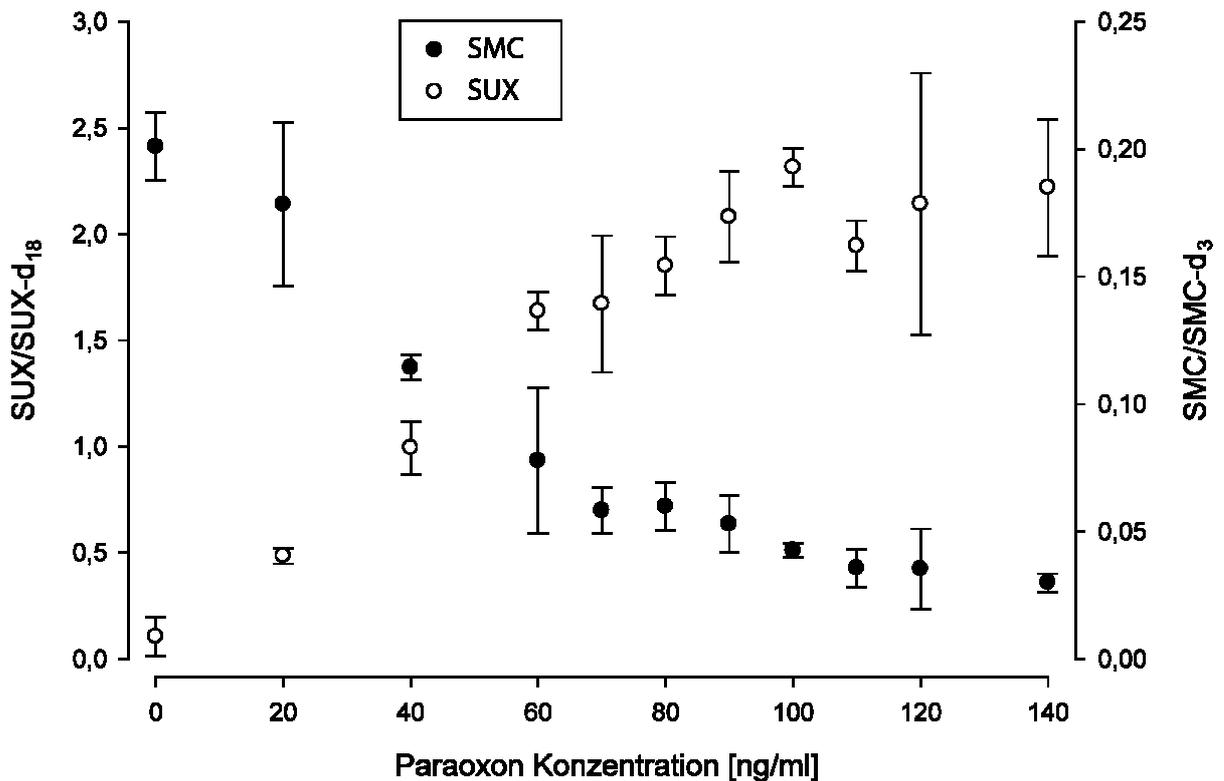
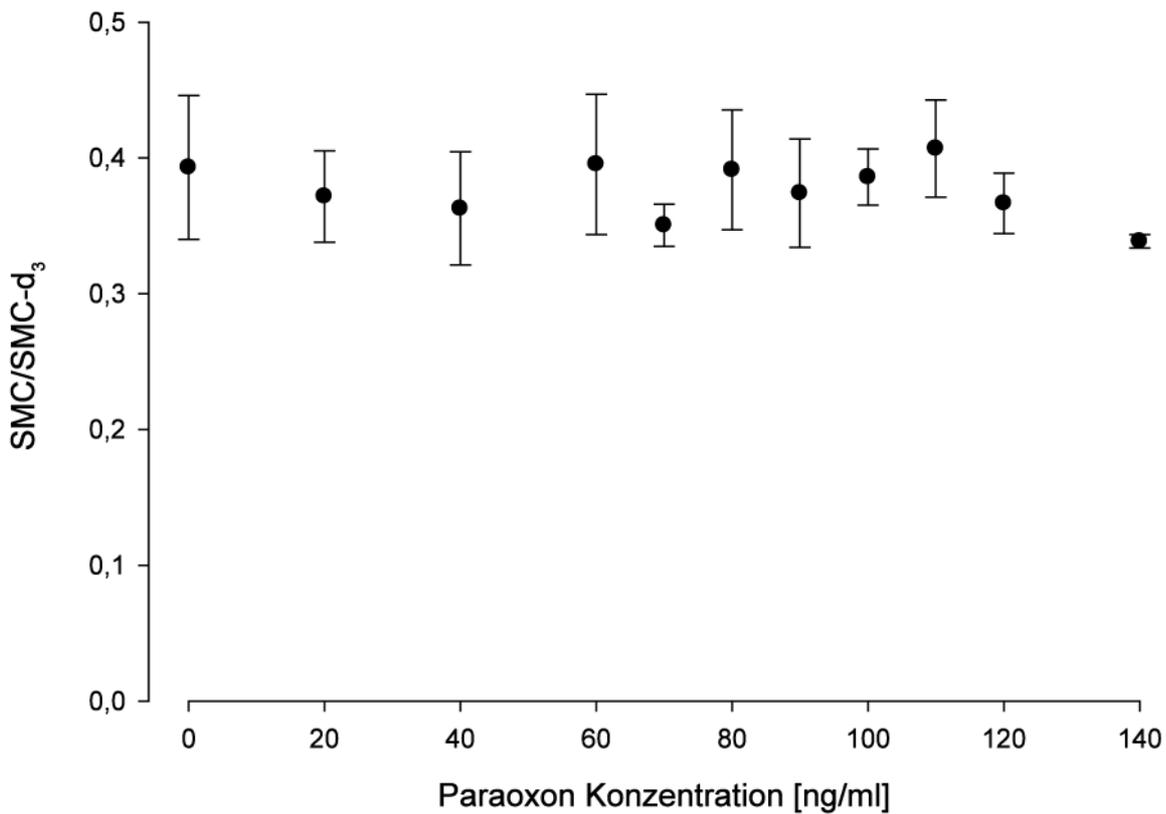


Abbildung 32: Stabilität von SUX in Abhängigkeit verschiedener Paraoxon-Konzentrationen (n = 3)

Über denselben Inkubationszeitraum von 5 min bei RT konnte keine stabilisierende Wirkung des Paraoxons auf SMC beobachtet werden (Abbildung 33).



**Abbildung 33: Stabilität von SMC in Abhängigkeit verschiedener Paraoxon-Konzentrationen (n = 3)**

In einem Folgeexperiment wurde die Inkubationszeit des unterschiedlich paraoxonierten Serums mit SMC auf 24 h bei RT erhöht, um über diesen längeren Zeitraum eventuelle stabilisierende Effekte des Organophosphats auf den Analyten dokumentieren zu können. Es ist zu beobachten, dass über die längere Zeitspanne sehr wohl eine Stabilisierung von SMC durch Paraoxon erreicht werden kann, jedoch ist in diesem Fall schon ab einer Organophosphatkonzentration von 40 ng/ml der maximal konservierende Effekt erreicht (Abbildung 34).

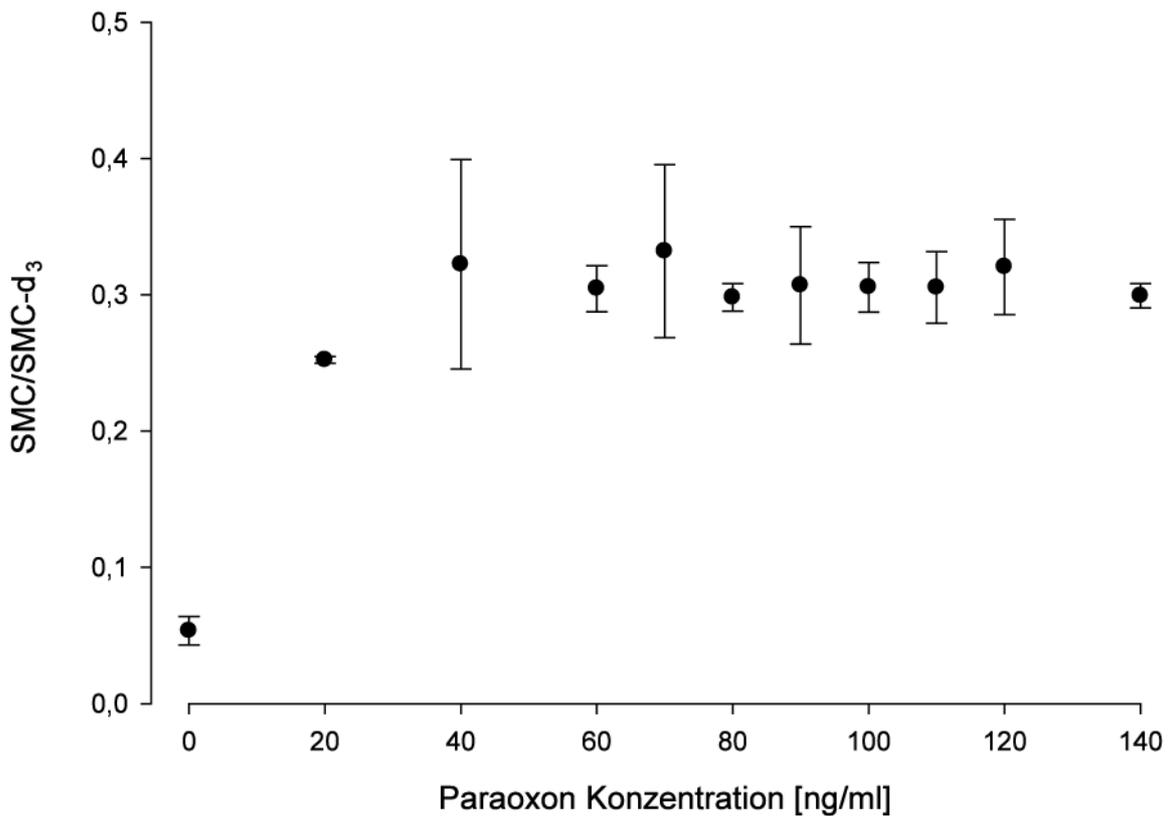


Abbildung 34: Stabilität von SMC in Abhängigkeit verschiedener Paraoxon-Konzentrationen (n = 3, 24 h)

In allen folgenden Experimenten wurde, sofern nicht anders angegeben, sowohl Serum als auch Urin immer mit einer Paraoxon-Konzentration von 100 ng/ml esterase-inaktiviert.

#### 4.2.3 Extraktionsversuche nach Literaturangaben

Die bereits publizierten (SUX-)Monomethoden mittels SPE über Carboxylsäure(CBA)-Matrices [30] oder C<sub>1</sub>-Festphasen [2] bzw. mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) mit KI<sub>3</sub> [22], erwiesen sich wie bereits erwartet als ungeeignet für eine gleichzeitige Extraktion von SMC: die Wiederfindung der letztgenannten Substanz war mit stets unter 30 % inakzeptabel niedrig. Zwei Arbeiten waren erwartungsgemäß noch nicht einmal für den postulierten Verwendungszweck des SUX-Nachweises [23,35] zu reproduzieren.

Als einzig erfolgversprechende Extraktionsstrategie wurde der generelle Ansatz einer sauren Extraktion in Anwesenheit eines Ionenpaarreagens über eine Festphasen-Säulenmatrix [24] weiter verfolgt und optimiert. Die Kenndaten der finalen Methode sind in Abschnitt 4.4 zusammengefasst.

#### **4.2.4 Optimierte Festphasenextraktion**

Es war festzustellen, dass die parallele Probenaufarbeitung von Hand für beide Matrices bessere und reproduzierbarere Ergebnisse lieferte als die automatisierte Probenvorbereitung mittels der Zymark RapidTrace, welche die einzelnen Proben nur hintereinander statt parallel abarbeiten kann (nicht dargestellt). Aus diesem Grund wurden alle Proben von Hand aufgearbeitet.

### **4.3 Probenasservierung**

#### **4.3.1 Glasadsorption**

Für SUX im Glasgefäß lässt sich ein anfänglich starker Konzentrationsabfall von ca. 30 % nachweisen, danach entspricht der weitere Signalabbau (lineare Regression:  $y = 100 - 0.043 x$ ) dem des SUX im Plastikgefäß. Letzterer ist wiederum mit dem nachweisbaren Signalabbau des SMC in Glas sowie Plastik vergleichbar (Abbildung 35).

---

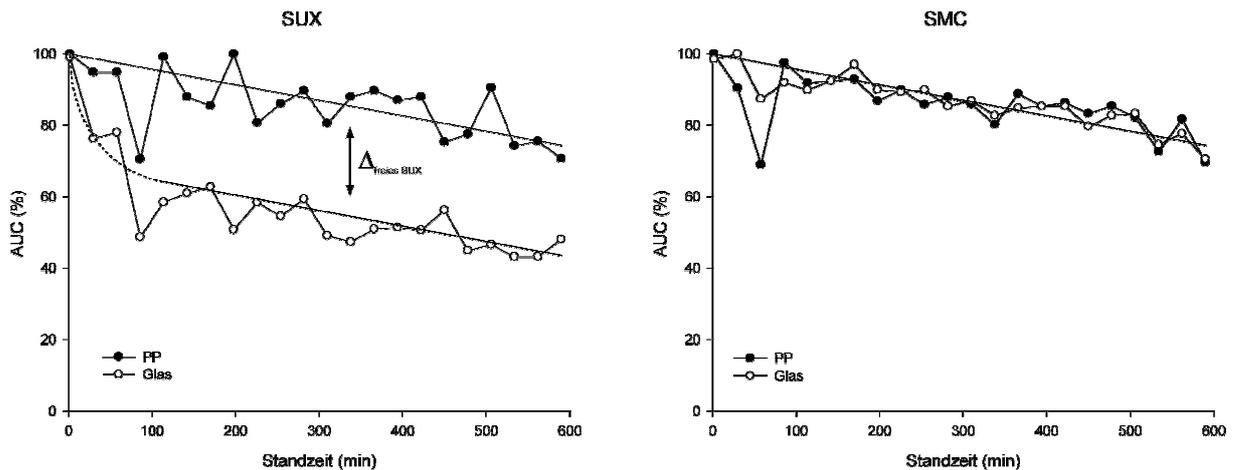


Abbildung 35: Materialabhängige Gefäßadsorption von SUX und SMC

Die y-Achse gibt die Analytkonzentration in Bezug zum gemessenen Ausgangsgehalt im PP-Gefäß an. Die Geraden verdeutlichen den Signalabbau nach oben angegebener Regressionsgeraden.

### 4.3.2 Frier-Tau-Stabilität

Die Stabilität von SUX bzw. SMC war in Serum und Urin vergleichbar, und die Analytverluste überstiegen auch nach drei durchlaufenen Frier-Tau-Zyklen nicht 10 % des jeweiligen Ausgangswertes. Eine Konzentrationsabhängigkeit der Analytstabilität konnte nicht nachgewiesen werden. Es war darüber hinaus ebenfalls nicht zu beobachten, dass Verluste bevorzugt in einem der Frier-Tau-Zyklen auftreten.

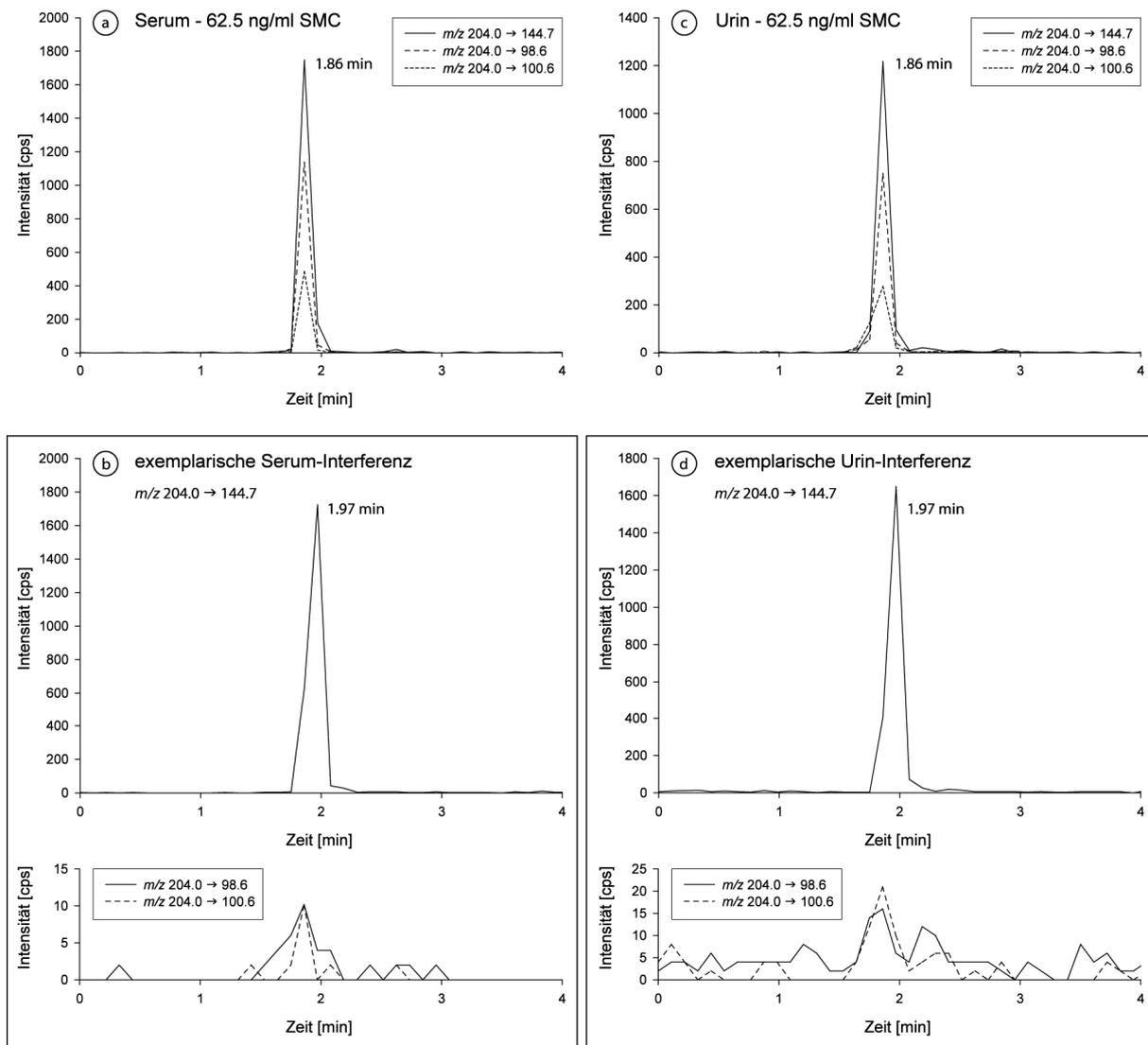
## 4.4 Methodvalidierung

### 4.4.1 Selektivität

Die chromatographische Trennung von SUX und SMC war befriedigend, und beide Analyten konnten eindeutig durch ihre einzigartigen MRM-Übergänge identifiziert werden [77].

Bei der weiteren Methodenentwicklung wurde jedoch entdeckt, dass die eingesetzten Leerseren und -urine aller Probanden signifikante aber variierende Mengen einer Störsubstanz mit annähernd gleicher Retentionszeit sowie identischem Haupt-MRM verglichen mit SMC

enthalten (Abbildung 36). Um letzteren, somit wertlosen Ionenübergang zu ersetzen, wurden der zweit- bzw. drittstärkste MRM als Quantifier respektive Qualifier für SMC etabliert. Bei erneuter Prüfung der Leermatrices waren keine Interferenzsignale oberhalb des Hintergrundrauschens detektierbar. Interferenzen mit SUX oder einer der internen Standardsubstanzen konnten nicht festgestellt werden (nicht dargestellt).



**Abbildung 36: SMC-Interferenz in Serum und Urin**

Es sind die MRM-Übergänge von SMC in dotiertem Serum (a) sowie Urin (c) dargestellt. In beiden nativen Matrices, d.h. in Serum (b) und Urin (d), konnte eine Interferenz mit dem Haupt-MRM von SMC ( $m/z$  204.0  $\rightarrow$  144.7) zu einer fast identischen Retentionszeit detektiert werden, was die Identifikation und Quantifizierung des Analyten stark erschwerte. Weder der bisherige Qualifier-Übergang von SMC ( $m/z$  204.0  $\rightarrow$  98.6) noch sein drittstärkster Fragmentionenübergang ( $m/z$  204.0  $\rightarrow$  100.6) waren für die Interferenz nachweisbar.

#### **4.4.2 Linearität**

Wegen der jeweils sehr großen Kalibrationsbereiche von 12.5 – 500 ng/ml und 0.5 – 100 µg/ml wurden gewichtete Kalibrationsmodelle verwendet. Die Korrelationskoeffizienten lagen konstant bei bzw. oberhalb von 0.998 (Tabelle 8, Tabelle 9).

#### **4.4.3 Grenzen der Methode**

Für Serum lagen die Nachweis- (LOD) und Bestimmungsgrenzen (LOQ) bei 1.9 ng/ml bzw. 6.0 ng/ml für SUX, sowie bei 2.5 ng/ml bzw. 8.6 ng/ml für SMC; für Urin wurden die korrespondierenden Grenzwerte mit 1.4 ng/ml bzw. 4.0 ng/ml (SUX) sowie 1.5 ng/ml bzw. 4.9 ng/ml (SMC) bestimmt (Tabelle 8).

#### **4.4.4 Extraktionsausbeute**

Die Extraktionsausbeute war mit Werten zwischen 88.1 und 103.9 % für beide Analyten und Matrices (Tabelle 8, Tabelle 9) ausgesprochen gut.

#### **4.4.5 Präzision und Richtigkeit**

Für Serum wurden gute Wiederhol- und Laborpräzisionen konstant unterhalb von 15 % für die niedrigste, sowie unterhalb von 10 % für alle höheren Konzentrationen der Qualitätskontrollproben ermittelt. Die Richtigkeit war ebenfalls gut und überschritt nie die 10 %-Marke. Für Urin als Probenmatrix wurden vergleichbar gute Resultate erzielt (Tabelle 6, Tabelle 7).

---

#### **4.4.6 Matrixeffekte**

Die matrixbedingte Ionensuppression war sowohl für SUX als auch SMC in beiden getesteten Matrices ausgeprägt: für SUX in Urin variierte die verbleibende Signalstärke zwischen 108.1 % für den hohen und 36.7 % für den niedrigen Kalibrator, für selbigen Analyten in Serum wurden die jeweiligen Werte mit 92.9 % bzw. 32.6 % beziffert. Die verbleibende Signalintensität für SMC in Urin lag im Bereich zwischen 98.9 % und 23.6 % für die hohe bzw. niedrige Analytkonzentration, die korrespondierenden Werte für seröses SMC bewegten sich zwischen 76.2 % und 28.4 %.

Es konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass die Quantifizierung über extrahierte und nicht etwa Lösemittel-Kalibrationen zu erfolgen hat.

---

Tabelle 6: Präzisions- und Richtigkeitsdaten des niedrigen Konzentrationsbereichs.

Die Begriffe „hoch“, „mittel“ und „niedrig“ bezeichnen die Konzentrationen 375, 62.5 bzw. 25 ng/ml.

Matrix	Analyt	Wiederholpräzision [%]			Laborpräzision [%]			Richtigkeit [%]		
		hoch	mittel	niedrig	hoch	mittel	niedrig	hoch	mittel	niedrig
Serum	SUX	3.47	5.79	14.67	3.47	5.79	14.67	-1.11	0.67	3.94
	SMC	7.66	8.55	8.16	9.67	8.55	11.21	-5.98	-4.93	2.15
Urin	SUX	4.11	7.21	5.21	4.41	8.21	7.91	-0.59	0.39	0.62
	SMC	5.86	7.36	12.4	6.29	9.89	14.24	-0.96	-0.79	4.21

Tabelle 7: Präzisions- und Richtigkeitsdaten des hohen Konzentrationsbereichs.

Die Begriffe „hoch“, „mittel“ und „niedrig“ bezeichnen die Konzentrationen 80, 20 bzw. 5 µg/ml.

Matrix	Analyt	Wiederholpräzision [%]			Laborpräzision [%]			Richtigkeit [%]		
		hoch	mittel	niedrig	hoch	mittel	niedrig	hoch	mittel	niedrig
Serum	SUX	3.04	3.59	4.02	5.26	6.65	4.87	6.04	8.02	2.55
	SMC	4.62	4.64	3.56	6.98	9.78	8.85	0.46	3.13	5.52
Urin	SUX	5.42	3.74	5.99	5.57	4.13	7.12	1.16	0.08	3.18
	SMC	5.74	5.72	4.82	6.56	6.40	5.24	1.05	-1.86	2.69

Tabelle 8: Lineare Regression, Grenzen der Methode und Extraktionsausbeuten des niedrigen Konzentrationsbereichs. Die Begriffe „hoch“ und „niedrig“ bezeichnen die Konzentrationen 375 bzw. 25 ng/ml.

Matrix	Analyt	Korrelationskoeffizient	Steigung	y-Achsenabschnitt	Grenzen der Methode		Extraktionsausbeute [%]	
					LOD	LOQ	hoch	niedrig
Serum	SUX	0.999	0.000409	0.000232	1.9	6.0	97.1	88.4
	SMC	0.999	0.000385	0.001992	2.5	8.6	96.0	99.0
Urin	SUX	0.999	0.000439	-0.000288	1.4	4.0	93.8	99.8
	SMC	0.999	0.000781	0.001546	1.5	4.9	103.9	102.0

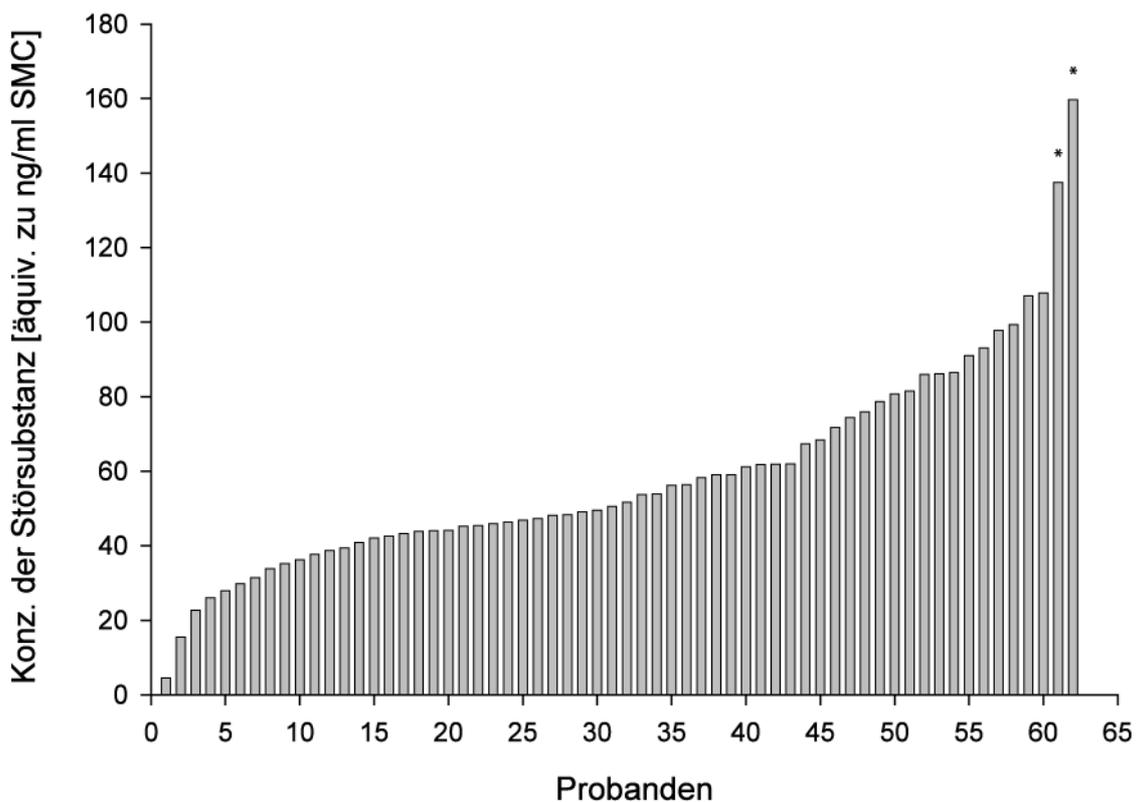
Tabelle 9: Lineare Regression und Extraktionsausbeuten des hohen Konzentrationsbereichs. Die Begriffe „hoch“ und „niedrig“ bezeichnen die Konzentrationen 80 bzw. 5 µg/ml.

Matrix	Analyt	Korrelationskoeffizient	Steigung	y-Achsenabschnitt	Extraktionsausbeute [%]	
					hoch	niedrig
Serum	SUX	0.999	0.685	0.044	95.0	88.1
	SMC	0.999	1.100	-0.469	99.2	97.5
Urin	SUX	0.998	0.630	0.116	93.4	96.3
	SMC	0.999	0.676	-0.898	101.0	100.7

## 4.5 SMC-Interferenz

### 4.5.1 Serum

In 62 der 63 untersuchten Serumproben wurde die SMC-Interferenz oberhalb der LOQ nachgewiesen; in einem Fall wurde die Störsubstanz zwar detektiert, konnte aber nicht quantifiziert werden. Die gefundenen Konzentrationen werden im Folgenden als „apparentes SMC“ bzw. „SMC-Äquivalente“ bezeichnet und in ng/ml angegeben; sie sind in Abbildung 37 aufsteigend geordnet dargestellt. Die 2 höchsten Konzentrationen wurden mittels Grubbs-Test als Ausreißer definiert, und für die folgenden statistischen Auswertungen eliminiert. Die niedrigste und höchste gefundene Konzentration war 4.5 ng/ml SMC-Äquivalente bzw. 107.8 ng/ml SMC-Äquivalente (159.7 ng/ml SMC-Äquivalente unter Berücksichtigung der Ausreißer).



**Abbildung 37: Störsubstanz in Probandenserum**

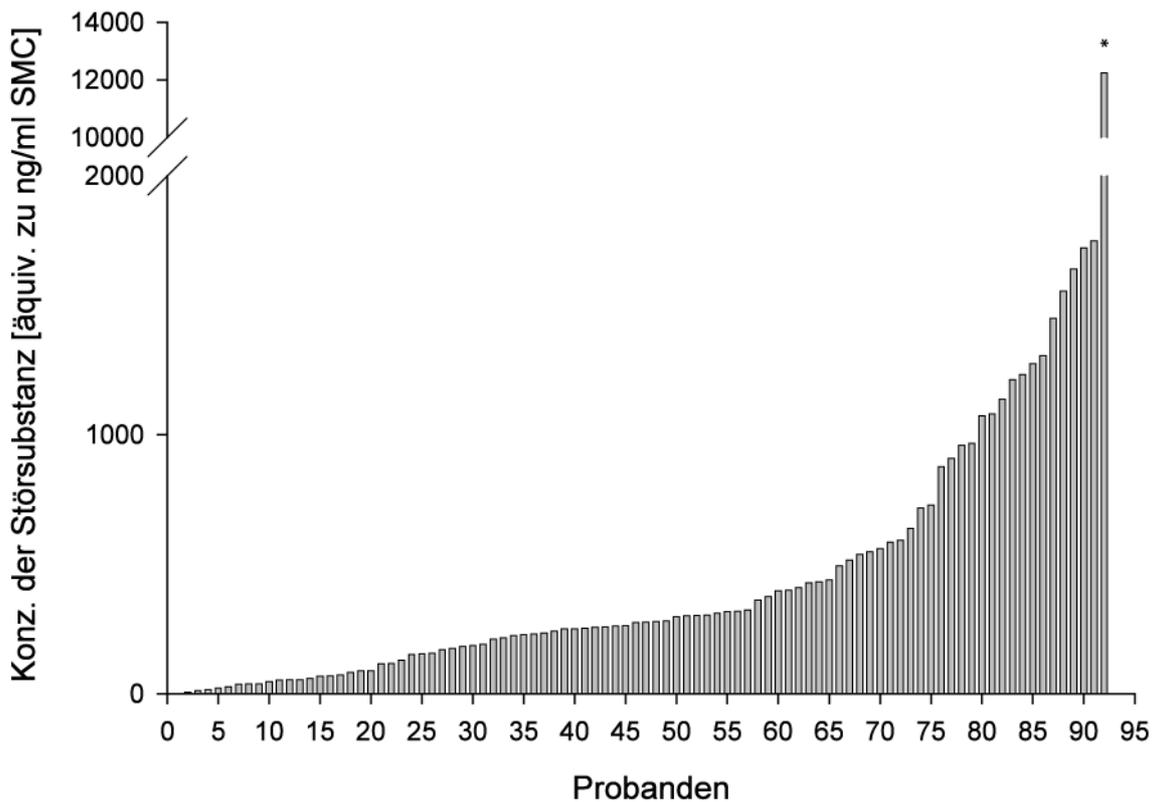
Es sind die 62 quantifizierbaren Serumproben dargestellt. Die jeweilige Menge der Störsubstanz ist als SMC-Äquivalent bzw. apparentes SMC in [ng/ml] angegeben. Die statistische Auswertung hat zwei Ausreißer (mit \* gekennzeichnet) definiert.

Nach Elimination der Ausreisser wurde für die verbleibenden 60 Datenpunkte mittels des Kolmogorov-Smirnov-Tests für kontinuierliche Variablen ein  $p$ -Wert von 0.52 sowie eine maximale Distanz zur Normalverteilung von  $d = 0.10$  ermittelt, es liegt somit kein signifikanter Unterschied zu einer Normalverteilung der Werte um den Mittelwert von 55.9 ng/ml SMC-Äquivalente vor.

#### **4.5.2 Urin**

Die 92 untersuchten Probandenurine enthielten allesamt die zu bestimmende Störsubstanz in quantifizierbaren Konzentrationen. Wie oben bereits erläutert, werden die gefundenen Konzentrationen im Folgenden als apparentes SMC oder SMC-Äquivalente bezeichnet und in ng/ml angegeben; sie sind in Abbildung 38 aufsteigend geordnet dargestellt. Die Datenreihe enthält einen extremen Ausreisser (Grubbs-Test). Die niedrigste und höchste gefundene Konzentration war 1.8 ng/ml SMC-Äquivalente bzw. 1748.2 ng/ml SMC-Äquivalente (12239.0 ng/ml SMC-Äquivalente unter Berücksichtigung des Ausreißers). Der Mittelwert der Messwerte beträgt 427.5 ng/ml SMC-Äquivalente.

---

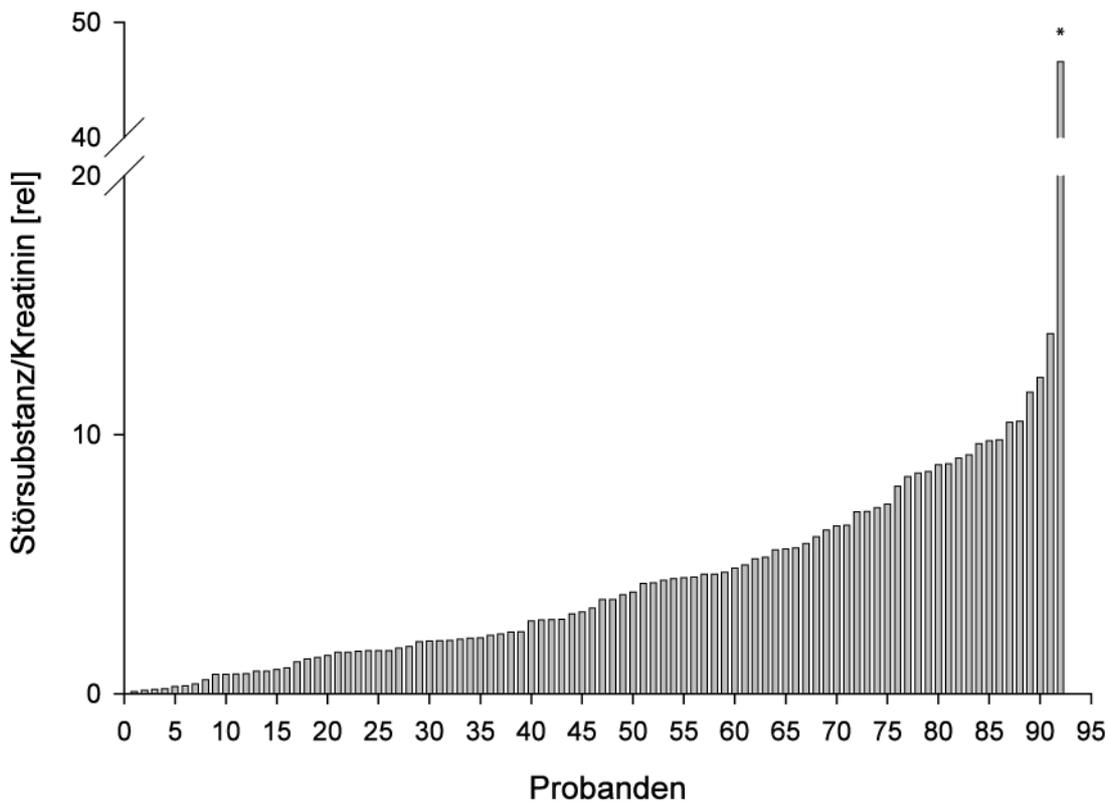


**Abbildung 38: Störsubstanz in Probandenurinen**

Es sind die 92 untersuchten Urinproben dargestellt. Die jeweilige Menge der Störsubstanz ist als SMC-Äquivalent bzw. apparentes SMC [ng/ml] angegeben. Der Datensatz enthält einen mit \* gekennzeichneten Ausreißer.

Nach Elimination des Ausreissers wurden die 91 verbleibenden Datenpunkte einem Kolmogorov-Smirnov-Test für kontinuierliche Variablen unterzogen. Aufgrund eines  $p$ -Wertes von 0.00027 sowie einem  $d = 0.22$  wird die Nullhypothese (Normalverteilung der Quelldaten) abgelehnt.

Im Folgenden wurde überprüft, ob durch Referenzierung der Interferenz-Konzentrationen auf den jeweiligen Kreatinin-Gehalt der Proben (9.4 - 278 mg/dl, Mittel: 112 mg/dl) normalverteilte Daten erhalten werden können. Das Ergebnis ist in Abbildung 39 graphisch dargestellt.



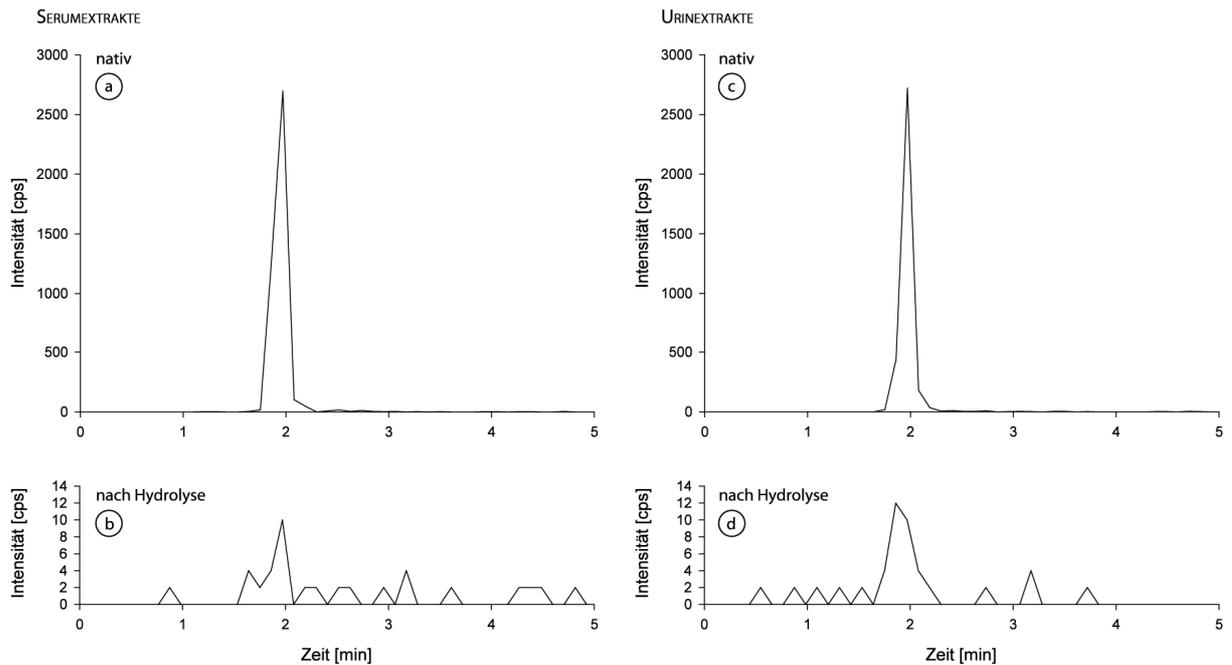
**Abbildung 39: Störsubstanz in Probandenurinen bezogen auf den jeweiligen Kreatiningehalt**

Der Quotient wird in relativen Einheiten (erhalten durch Division der absoluten Zahlenwerte für Störsubstanz-Konzentration und Kreatinin-Konzentration, diese in der jeweils üblichen Einheit ng/ml bzw. mg/dl) angegeben.

Mit einem  $p$ -Wert von 0.06 und  $d = 0.14$  kann für die erhaltenen Quotienten aus Störsubstanz-Konzentration und Kreatiningehalt der Proben eine Normalverteilung nicht mit ausreichender Sicherheit angenommen werden (s. 5.4).

Der Ausreisser kann durch Verrechnung mit dem Kreatiningehalt nicht in die restliche Datenmenge (0.08-13.9, Mittel: 4.2) eingegliedert werden, sondern stellt auch als Quotient weiterhin einen Ausreisser (46.6) dar.

Die endogene Interferenz wurde im Hinblick auf eine diagnostisch höchst relevante, physiko-chemische Schlüsseleigenschaft, nämlich ihre Alkali-Stabilität in Relation zu SMC, genauer untersucht: in diesem Kontext belegt die Abbildung 40 eindrucksvoll, dass die Störsubstanz neben einem identischen Haupt-MRM auch noch eine Hydrolyseempfindlichkeit aufweist, wie sie auch für SMC selbst beschrieben ist [30].

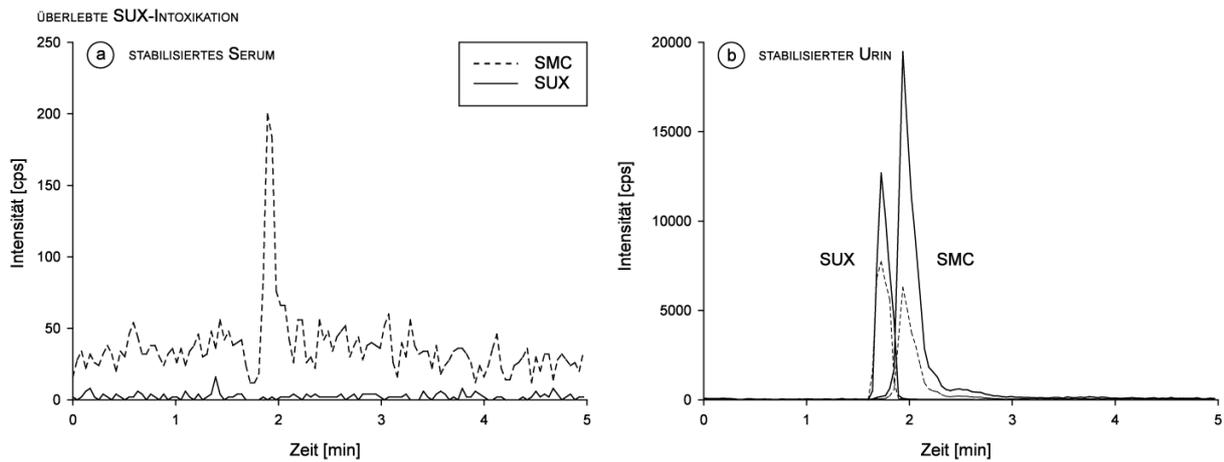


**Abbildung 40: Empfindlichkeit der Störsubstanz gegenüber alkalischer Hydrolyse**

Nach alkalischer Hydrolyse erhebt sich das Störsignal nicht mehr über das Hintergrundrauschen, die Interferenz weist also mit SMC vergleichbare physiko-chemische Eigenschaften auf. Für eine bessere Übersichtlichkeit ist jeweils nur der stör anfällige Haupt-MRM dargestellt.

#### 4.6 Forensische Realproben (Serum und Urin)

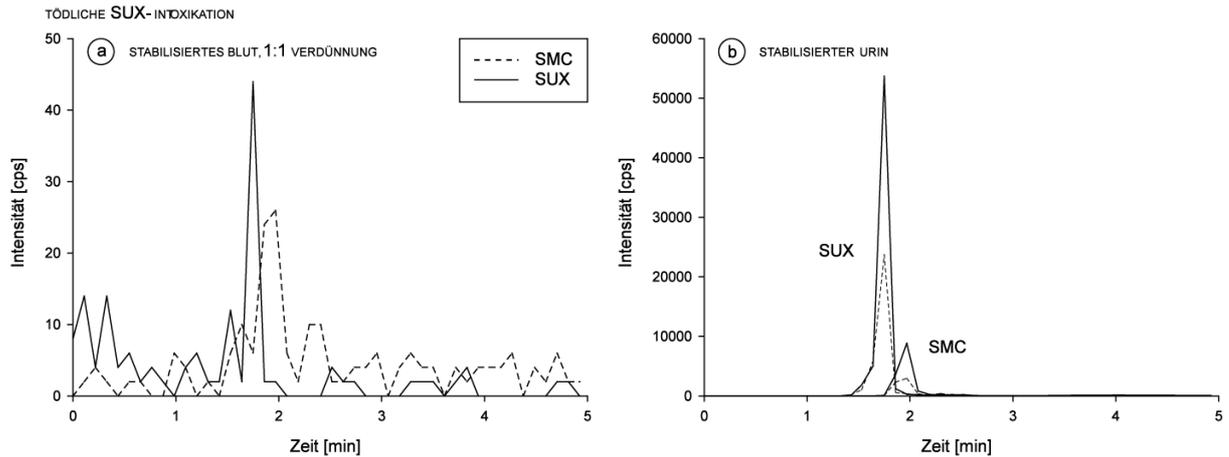
Im Fall der vermuteten überlebten SUX-Intoxikation war die Ausgangssubstanz SUX im Serum nicht nachweisbar. Das SMC Quantifier-Signal erhob sich nicht signifikant über das Hintergrundrauschen (Abbildung 41 a), und ein Qualifier-MRM, welches das Vorliegen von SMC hätte bestätigen können, konnte in derselben Matrix nicht detektiert werden. Im Urin desselben Patienten konnten sowohl SUX als auch SMC in Konzentrationen von 1.9 µg/ml bzw. 21.0 µg/ml nachgewiesen werden (Abbildung 41 b).



**Abbildung 41: Chromatogramme je einer authentischen, forensischen Serum- (a) und Urinprobe (b) einer vermuteten überlebten SUX-Intoxikation**

Für Serum zeigt das Chromatogramm nur die Quantifier-Übergänge für SUX (durchgehend) und SMC (gepunktet), die jeweiligen Qualifier erhoben sich nicht signifikant über das Hintergrundrauschen und wurden daher für eine bessere Übersichtlichkeit ausgespart. Für Urin werden beide Analyten sowohl durch ihren Quantifier (durchgehend) als auch Qualifier (gepunktet) dargestellt. Die Ionenübergänge der internen Standards sind nicht gezeigt. Im Serum konnte weder SUX noch SMC detektiert werden, im Urin waren beide Substanzen in Konzentrationen von 1.9 µg/ml (SUX) und 21.0 µg/ml (SMC) nachweisbar.

Bei der Untersuchung der vermuteten tödlichen SUX-Intoxikation konnten im Blut weder SUX noch SMC detektiert werden (Abbildung 42a), im Urin des Verstorbenen jedoch waren beide Analyten in Konzentrationen von 8.1 µg/ml (SUX) sowie 3.7 µg/ml (SMC) nachweisbar (Abbildung 42b).



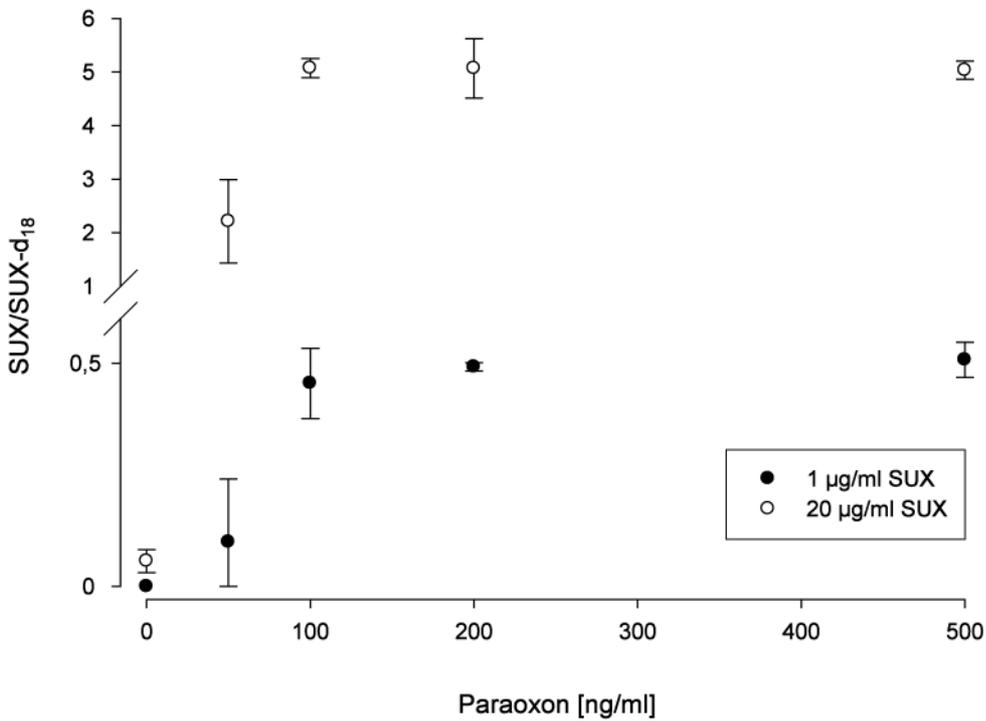
**Abbildung 42: Chromatogramme je einer authentischen, forensischen Urin- (b) und verdünnter Blutprobe (a) einer vermuteten tödlichen SUX-Intoxikation**

Für Blut zeigt das Chromatogramm nur die Quantifizier-Übergänge für SUX (durchgehend) und SMC (gepunktet), die jeweiligen Qualifier erhoben sich nicht signifikant über das Hintergrundrauschen und wurden daher für eine bessere Übersichtlichkeit ausgespart. Für Urin werden beide Analyten sowohl durch ihren Quantifizier (durchgehend) als auch Qualifier (gepunktet) dargestellt. Die Ionenübergänge der internen Standards sind nicht gezeigt. Im verdünnten Blut konnte weder SUX noch SMC detektiert werden, im Urin waren beide Substanzen in Konzentrationen von 8.1 µg/ml (SUX) und 3.7 µg/ml (SMC) nachweisbar.

## 4.7 *In vitro*-Untersuchungen und Vorversuche

### 4.7.1 Paraoxon-vermittelte Analyt-Stabilisierung im Vollblut

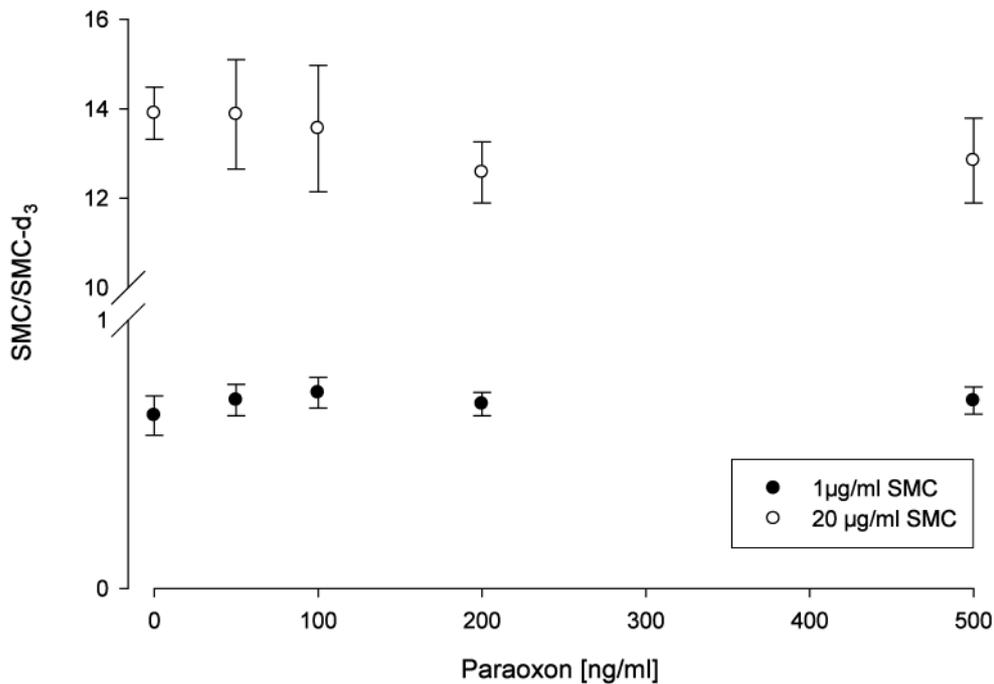
Es zeigte sich, dass auch für EDTA-Vollblut bei einer Inkubationszeit von 5 min bei 37°C eine Paraoxonkonzentration von 100 ng/ml bereits maximal stabilisierend auf SUX wirkt, eine weitere Erhöhung der Organophosphatkonzentration führte bei keiner der beiden getesteten Substratkonzentrationen zu einem messbaren Stabilitätsgewinn (Abbildung 43). Die Ergebnisse für Vollblut stimmen somit grundsätzlich mit denen für Plasma (s. 4.2.2) überein.



**Abbildung 43: Stabilität von SUX in Abhängigkeit verschiedener Paraoxon-Konzentrationen (n = 3)**

Für eine bessere Übersichtlichkeit ist die y-Achse gebrochen dargestellt. Der maximal stabilisierende Effekt wird bei 100 ng/ml Paraoxon im Vollblut erreicht.

Über denselben Inkubationszeitraum von 5 min bei 37°C konnte auch im ETDA-Vollblut keine stabilisierende Wirkung des Paraoxons auf SMC, weder in der hohen noch in der niedrigen Konzentration, beobachtet werden (Abbildung 44). Die Ergebnisse für SMC im Vollblut stimmen somit ebenfalls grundsätzlich mit denen für Plasma (s. 4.2.2) überein.



**Abbildung 44: Stabilität von SMC in Abhängigkeit verschiedener Paraoxon-Konzentrationen (n = 3)**

Für eine bessere Übersichtlichkeit ist die y-Achse gebrochen dargestellt. Es ist kein stabilisierender Effekt von Paraoxon auf SMC im Vollblut nachweisbar.

In allen folgenden Experimenten wurde, sofern nicht anders angegeben, auch Vollblut (vgl. Serum, Urin) immer mit einer Paraoxon-Konzentration von 100 ng/ml esterase-inaktiviert.

#### 4.7.2 Methodenvergleich – EDTA/Heparin-Monovetten

Um die beiden Probennahme-Systeme (EDTA- gegenüber Heparin-Monovetten) zu vergleichen, wurden die Messergebnisse jeweils 8 äquivalenter Messungen bei 3 verschiedenen Konzentrationen mittels eines zweiseitigen, gepaarten t-Tests untersucht. Es wurde die Nullhypothese (kein Unterschied von EDTA-Proben in Bezug auf Heparin-behandelte Proben) geprüft. Für eine bessere Übersichtlichkeit und Vergleichbarkeit werden die Ergebnisse tabellarisch dargestellt (Tabelle 10), und sind als Prozentpunkte (bezogen auf die Heparin-Werte) angegeben.

**Tabelle 10: Statistischer Vergleich zweier Probennahmesysteme (Heparin vs. EDTA-Monovetten)**

Analyt	Analyt- konzentration [rel.]	$\Delta$ [%] ( $MW_{EDTA} - MW_{Heparin}$ )	95 %-Konfidenz- intervall [%]	<i>p</i> -Wert
SUX	niedrig	11.5	-5.8 bis 28.8	0.16
	mittel	-5.5	-12.4 bis 1.5	0.10
	hoch	4.0	-1.0 bis 9.0	0.10
SMC	niedrig	-5.6	-13.9 bis 2.7	0.16
	mittel	3.0	-4.5 bis 10.4	0.37
	hoch	-2.4	-13.9 bis 9.0	0.32

$\Delta$  = Mittelwertdifferenz, MW = Mittelwert

In keinem Fall war eine statistisch signifikante Abweichung der Mittelwerte von EDTA- gegenüber Heparinplasma feststellbar, die Nullhypothese kann daher nicht abgelehnt werden. Da die Abwesenheit von statistisch signifikanten Unterschieden jedoch nicht gleichbedeutend mit nachgewiesener Äquivalenz ist, wurden die 95 %-Konfidenzintervalle im Hinblick auf eine eventuelle experimentelle Relevanz evaluiert: unter Annahme des Vorliegens eines Typ II-Fehlers (realer Effekt bei EDTA- verglichen mit Heparinverwendung trotz fehlender statistischer Signifikanz) liegen die mittleren Abweichungen der EDTA- gegenüber der Heparinmesswerte mit einer 95 %igen Wahrscheinlichkeit bei maximal -13.9 % bzw. 28.8 %. Ein eventuell bestehender positiver Effekt der EDTA-Anwendung von bis zu 28.8 % kann zwanglos akzeptiert werden, ein möglicher adverser Effekt von bis zu -13.9 % (bestimmt bei der niedrigsten eingesetzten SMC-Konzentration) kann als experimentell nicht relevant gewertet werden: systematische Fehler sowie Impräzision der Methode können jeweils zu Abweichungen von  $\pm 15$  % zwischen Meß- und Sollwert führen (s. auch Abschnitt 4.4.5), ein zu kleiner realer Effekt der EDTA- gegenüber der Heparin-Nutzung wird somit – insbesondere bei niedrigen Analytkonzentrationen – von der Messungenauigkeit überlagert. In Ermangelung einer nachweisbaren Überlegenheit von Heparin-Plasma für die vorliegende Analytik führten die bereits in 2.4.2.5 ausgeführten, praktischen Überlegungen dazu, EDTA-Monovetten für die durchzuführende Studie einzusetzen.

### 4.7.3 *In vitro*-Distribution von SUX und SMC

Im aus dotiertem Vollblut gewonnenen Plasma ( $P_{\text{Voll}}$ ) liegen die ermittelten Konzentrationen für SUX sowie SMC statistisch stets hoch signifikant (zweiseitiger ungepaarter t-Test; SMC niedrig:  $p = 0.02$ , Rest:  $p < 0.0001$ ) oberhalb derer im dotierten Plasma (P), wobei letztere im Rahmen der Meßgenauigkeit mit den extrahierten Kalibratoren übereinstimmen. Aus dieser Konzentrationsdifferenz  $\Delta$  (angegeben in Prozent bezogen auf  $MW_P$ ) kann das Volumen einer gegebenen Vollblutprobe ermittelt werden, welches für eine Verteilung des jeweiligen Analyten zur Verfügung steht (Verteilungsvolumen). Die Differenz zu 100 % beschreibt das verbleibende Volumendefizit, also denjenigen Raum, der nicht für eine Analytverteilung verfügbar ist.

**Tabelle 11: Distribution von SUX und SMC im Vollblut**

Analyt	Analyt- konzentration [rel.]	$\Delta$ Konzentration [%] ( $MW_{P_{\text{Voll}}}$ vs. $MW_P$ )	Verteilungsvolumen [% des Vollblut-Vol.]	$\Delta$ Volumen [%]
SUX	niedrig	70.6	58.6	41.4
	mittel	78.9	55.9	44.1
	hoch	74.4	57.3	42.7
SMC	niedrig	14.6	87.3	12.7
	mittel	57.2	63.6	36.4
	hoch	60.9	62.2	37.8

Für alle eingesetzten Konzentrationen von SUX korrespondiert das nicht an der Distribution beteiligte Kompartiment der Vollblutprobe ( $\Delta$  Volumen) sehr gut mit dem Hämatokrit, also dem Gehalt an zellulären Bestandteilen der Blutprobe (Norm: 46 %  $\pm$  6 % bei Männern, 42 %  $\pm$  6 % bei Frauen [78]). Das Verteilungsvolumen von SMC in der Vollblutprobe ist bei jeder getesteten Konzentration um mehrere Prozentpunkte größer als das von SUX, im niedrigen Konzentrationsbereich ist dieses Phänomen allerdings sehr viel stärker ausgeprägt als bei mittleren oder hohen SMC-Konzentrationen.

#### 4.7.4 *In vitro*-Abbau von SMC

Es wurde der *in vitro*-Abbau von SMC im EDTA-Vollblut über eine Inkubationszeit von 60 min (bei 37°C) hinweg untersucht, um über diesen längeren – und für die Probenaufbereitung während der Probandenstudie potentiell relevanten – Zeitraum eventuell auftretende, destabilisierende Effekte auf den Analyten dokumentieren zu können. Das Ergebnis der *in vitro*-Kinetik für SMC ist in Abbildung 45 dargestellt.

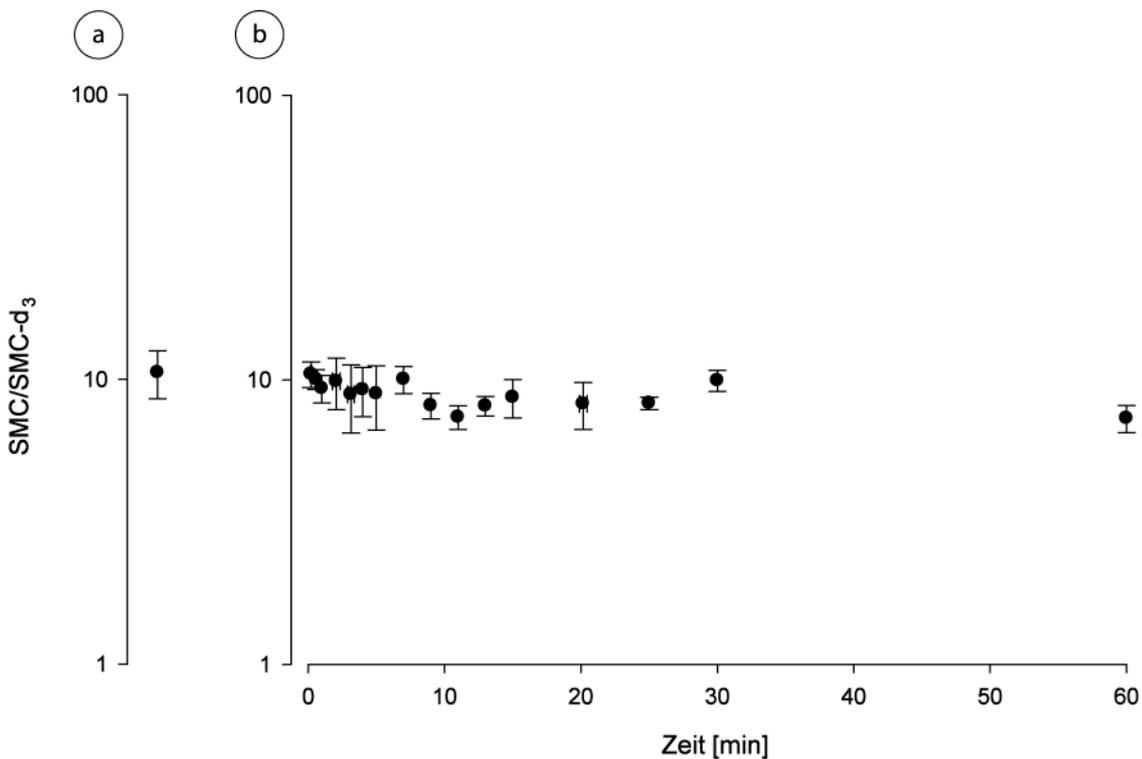


Abbildung 45: Stabilität von paraoxon-unbehandeltem SMC (n = 3)

Die Proben des Abbau-Experiments sind einer stabilisierten Referenzprobe derselben Konzentration (a) gegenübergestellt. *Ex vivo* ist kein relevanter Abbau von SMC im nicht-stabilisierten Vollblut (b) nachweisbar. Es lässt sich folglich keine Halbwertszeit für SMC ableiten, die verglichen mit der Dauer der Probenaufarbeitung in einer relevanten Größenordnung liegt.

## 4.8 *In vivo*-Untersuchungen - Probandenstudie

### 4.8.1 Plasma

Plasma-Konzentrationsprofile von SUX und SMC anhand von stabilisierten Probenaliquots wurden in 15 Probanden bestimmt.

#### 4.8.1.1 Konzentrationsprofil SUX

Wie bereits unter 3.12.6 beschrieben wurde mit dem Probennahmeschema ein Kompromiss von akzeptabler Datendichte für SUX (zur Definition der Nachweisfenster) bei maximaler Datendichte für SMC (für eine aussagekräftige Kinetik) angestrebt. Es soll daher hier nur eine beispielhafte SUX-Abbaukurve dargestellt werden, die durch eine vergleichsweise hohe Datendichte im Bereich bis 2 min nach SUX-Einleitung gut definiert ist.

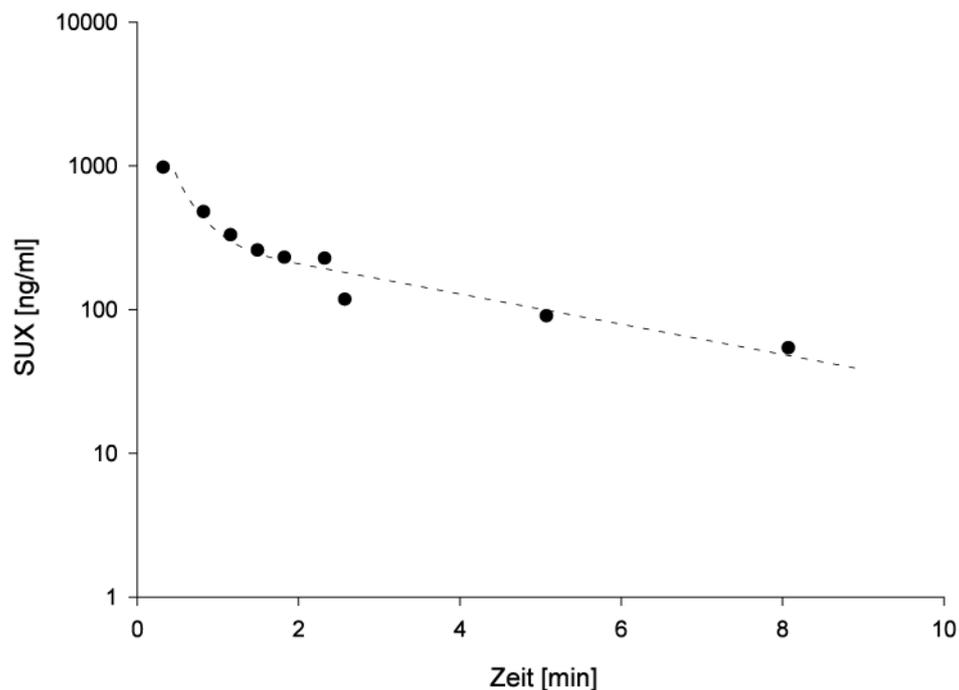


Abbildung 46: SUX-Abbau in einem Beispiel-Probanden

Das Vorliegen einer mehrphasigen Kinetik kann für SUX bestätigt werden.

#### 4.8.1.2 Konzentrationsprofil und Abbaukinetik von SMC

Nach intravenöser Bolus-Gabe von SUX wurden Peak-Plasmakonzentrationen (6.2 – 42.9 µg/ml, Mittel: 16.3 µg/ml) für SMC nach 0.03 – 2.0 Minuten (Mittel: 0.8 min) gemessen. SMC war in allen Probanden über das gesamte 6-stündige Studienintervall nachweisbar.

Der Konzentrationsabfall von SMC im Plasma stellt sich mehrphasig dar (Abbildung 47).

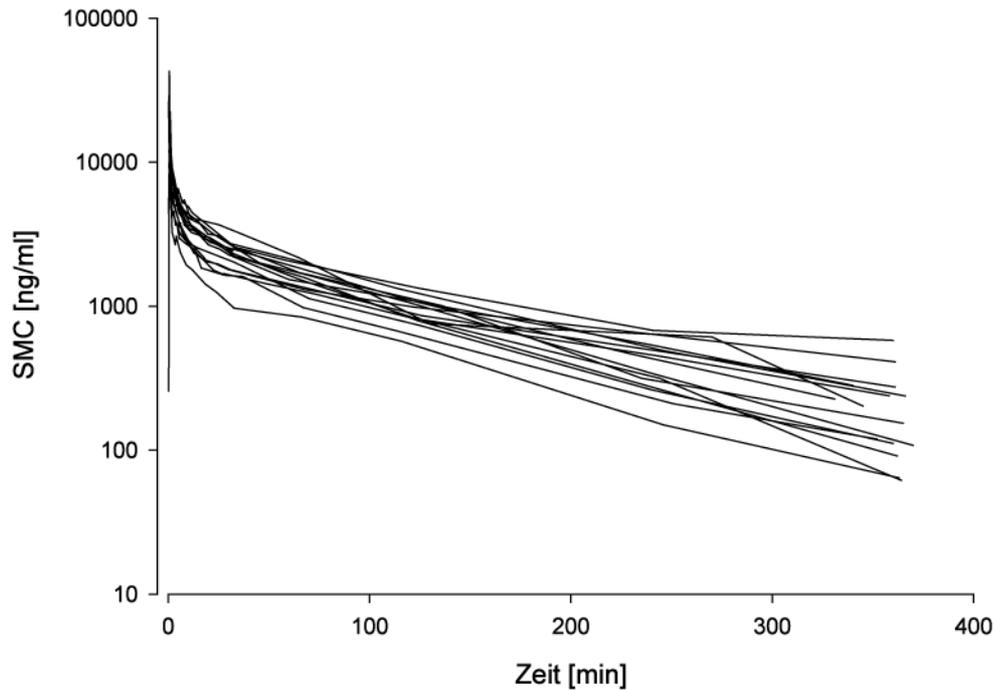
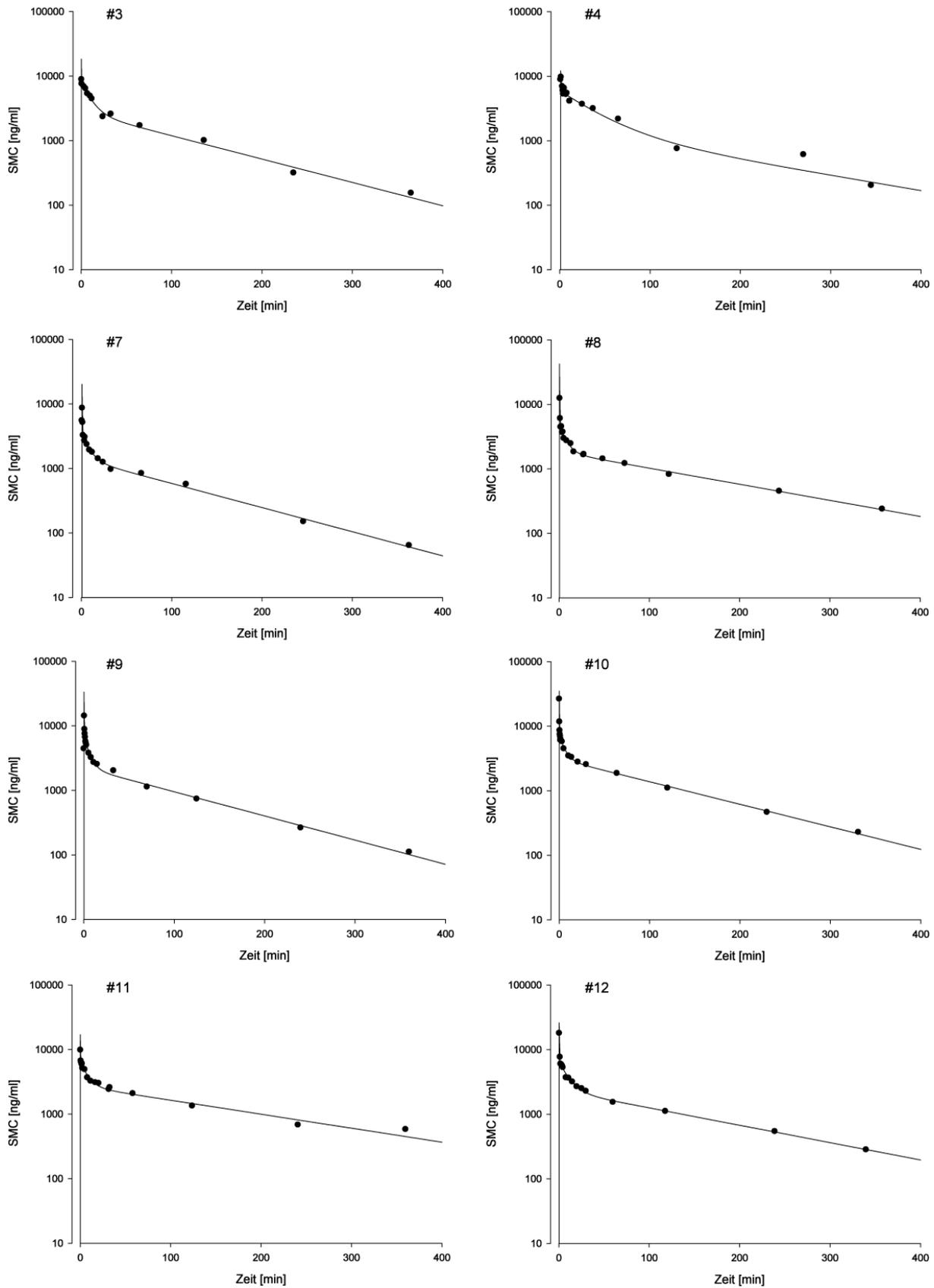


Abbildung 47: Überlagerung der 15 individuellen SMC-Konzentrations-Zeit-Profile im Plasma

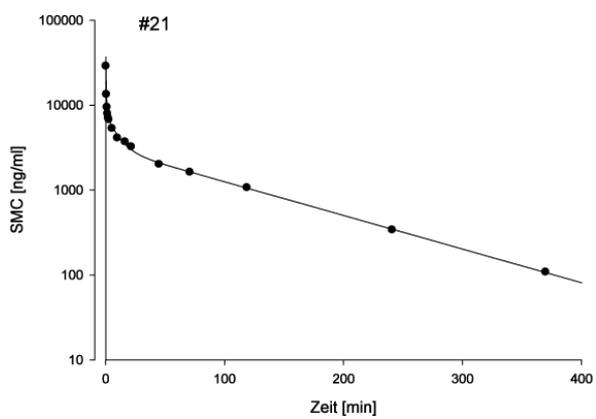
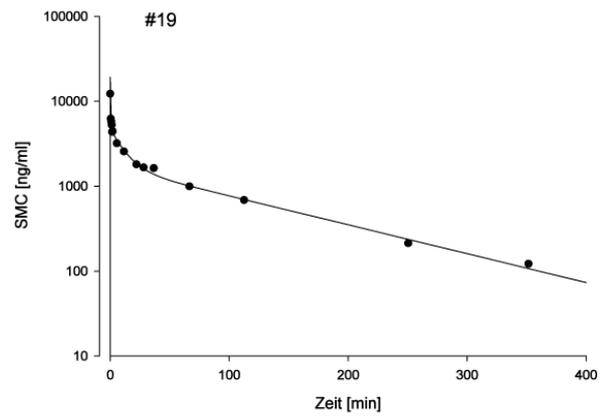
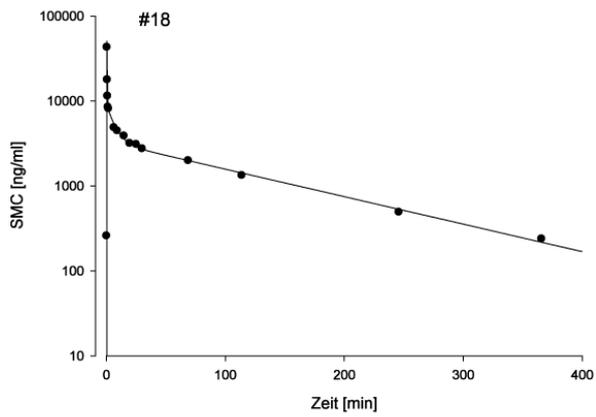
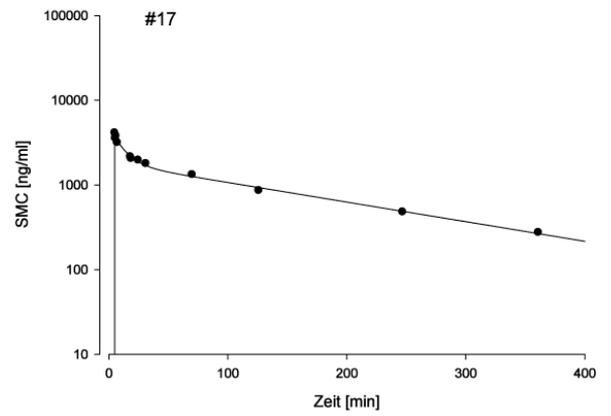
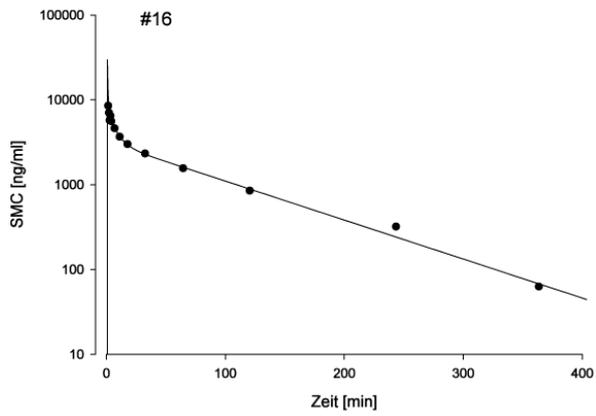
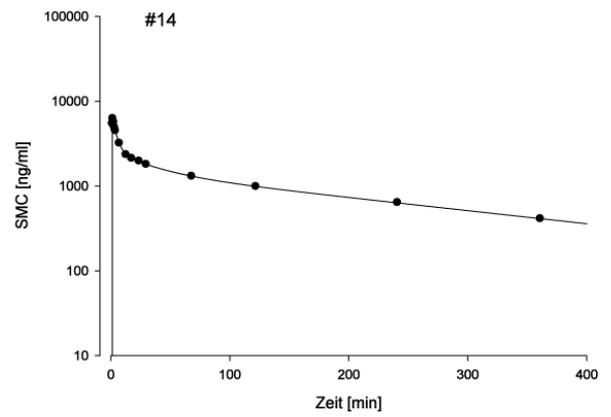
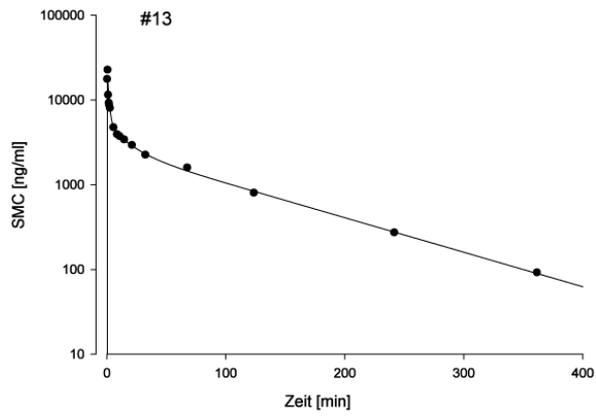
Es ist in allen Fällen ein mehrphasiger Konzentrationsabfall für SMC im Plasma sichtbar. Durch die halblogarithmische Auftragung können Halbwertszeiten visualisiert werden.

Die erhobenen Rohdaten wurden mittels TopFit® einer pharmakokinetischen Analyse unterzogen. Durch Auswertung der nutzerdefiniert modellierten Daten und Optimierung der Werte für das Akaike Informationskriterium sowie des Schwarz- und Imbimbo-Tests konnte ermittelt werden, dass der SMC-Plasmakonzentrations-Zeit-Verlauf am besten mit einem 3-Kompartiment-Modell beschrieben werden kann. Korrelationskoeffizienten von  $r^2 = 0.992 \pm 0.012$  für den 3-kompartimentellen Ansatz beweisen die hervorragende Übereinstimmung des Modells mit den jeweilig ermittelten Rohdaten.

Die folgenden Graphen zeigen die mittels 3-Kompartiment-Ansatz modellierten SMC-Plasmakonzentrationsverläufe in Zusammenschau mit den beim jeweiligen Probanden erhobenen Messwerten.

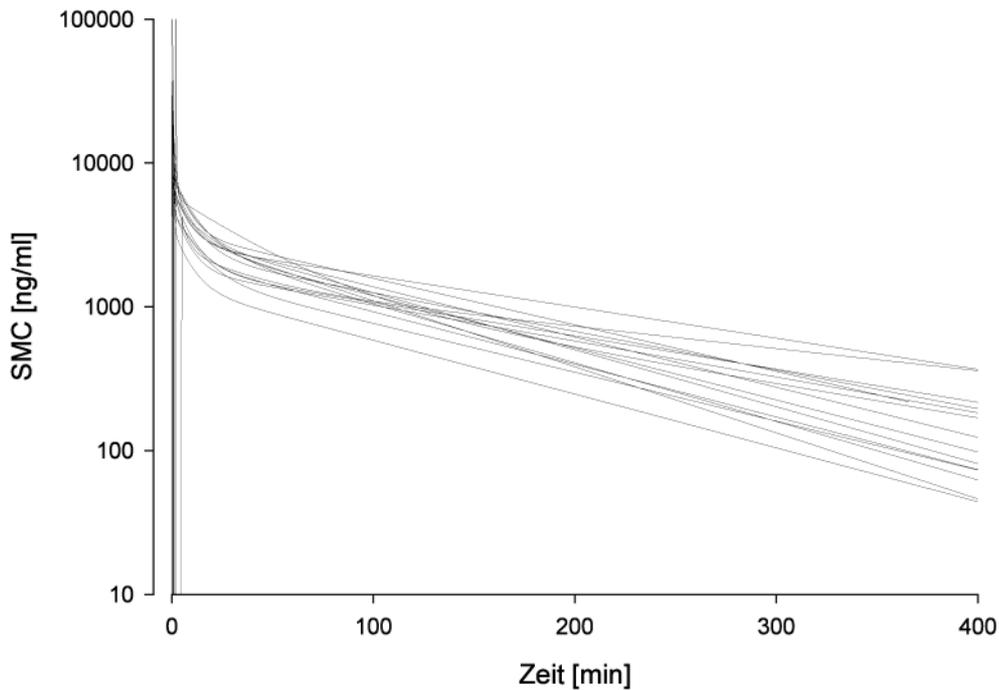


**Abbildung 48: Mittels 3-Kompartiment-Ansatz modellierte Plasma-Konzentrationsverläufe von SMC**  
Die individuell modellierten Kurvenverläufe sind als Linie, die Rohdaten als Punkte für jeden



Probanden (#Probandenkennung) dargestellt.

Bereits aus einer Überlagerung der oben dargestellten, modellierten Plasmakonzentrationsverläufe von SMC (Abbildung 49) können erste Erwartungswerte für die forensisch-toxikologische Fallarbeit abgeleitet werden: bis 1 h nach SUX-Injektion sind SMC-Konzentrationen von mindestens 1 µg/ml zu erwarten, nach 6 h kann noch von SMC-Konzentrationen zwischen 0.1-1 µg/ml ausgegangen werden.



**Abbildung 49: Überlagerung der modellierten SMC-Plasmakonzentrationsverläufen**

Erwartungswerte für die forensisch-toxikologische Fallarbeit können abgeleitet, und gemessene Werte im Rahmen einer Plausibilitätskontrolle eingeordnet und bewertet werden.

---

Für eine genauere Beschreibung des SMC-Abbaus wurden die mittels der 3-kompartimentellen Analyse ermittelten, forensisch relevanten pharmakokinetische Parameter detailliert ausgewertet:

$0.5 \pm 0.4$  min nach SUX-Injektion werden SMC-Peakplasmakonzentrationen von  $26.2 \pm 12.4$   $\mu\text{g/ml}$  kalkuliert. Der Verteilungsraum des zentralen Kompartiments weist ein apparentes Volumen von  $3.3 \pm 2.4$  l auf. Aus dem zentralen Kompartiment wird SMC zunächst schnell, mit einer Distributionsgeschwindigkeitskonstanten  $k_{13}$  von  $2.2 \pm 2.2$   $\text{min}^{-1}$ , in ein peripheres Kompartiment (3) verteilt, wobei für dieses Kompartiment ein apparentes Volumen  $V_3$  von  $6.5 \pm 2.4$  l bestimmt wurde. Als weiteres, peripheres Kompartiment nimmt (4) etwas langsamer, mit einer Distributionsgeschwindigkeitskonstanten  $k_{14}$  von  $0.27 \pm 0.19$   $\text{min}^{-1}$  an der Umverteilung von SMC teil, für dieses Kompartiment wurde ein apparentes Volumen  $V_4$  von  $13.8 \pm 4.8$  l bestimmt. Unter Gleichgewichtsbedingungen nimmt SMC ein apparentes Verteilungsvolumen von  $24.4 \pm 7.7$  l ein. Mit Distributionsgeschwindigkeitskonstanten  $k_{31}$  von  $1.0 \pm 1.4$   $\text{min}^{-1}$  bzw.  $k_{41}$  von  $0.11 \pm 0.16$   $\text{min}^{-1}$  verläuft die Rückverteilung von SMC aus der Peripherie in das zentrale Kompartiment im Mittel langsamer als seine Distribution in diese Kompartimente. Aus dem zentralen Kompartiment wird SMC mit einer Eliminationsgeschwindigkeitskonstanten  $k_{1e}$  von  $0.07 \pm 0.04$   $\text{min}^{-1}$  eliminiert. Die vorgenannten Prozesse schlagen sich in dem beschriebenen triphasischen Konzentrationsabfall von SMC im Plasma mit Halbwertszeiten  $t_{1/2\alpha}$  von  $0.5 \pm 0.6$  min,  $t_{1/2\beta}$  von  $8.5 \pm 6.8$  min sowie der terminalen HWZ  $t_{1/2\gamma}$  von  $103 \pm 34$  min nieder. Für SMC konnte insgesamt eine mittlere systemische Verweildauer (MRT) von  $132 \pm 47$  min bei einer apparenten Clearance von  $194 \pm 61$  ml/min bestimmt werden.

Tabelle 12 gibt einen Überblick über die ermittelten, individuellen kinetischen Parameter eines jeden Probanden.

---

Tabelle 12: Individuelle pharmakokinetische Parameter

Patient [#]	Alter [Jahre]	Geschlecht [m/w]	KG [kg]	abs. SUX- (SMC-) Dosis [mg]	rel. SUX- (SMC-) Dosis [mg/kg KG]	C <sub>max</sub> SMC [µg/ml]	T <sub>max</sub> SMC [min]
3	67	m	95	100 (70)	1.1 (0.8)	18.4	0.32
4	69	w	58	100 (70)	1.7 (1.2)	12.2	1.0
7	69	w	62.5	100 (70)	1.6 (1.1)	20.2	0.69
8	66	m	101.4	100 (70)	1.0 (0.7)	42.6	0.52
9	19	m	65	100 (70)	1.5 (1.1)	33.3	0.20
10	33	w	63	100 (70)	1.6 (1.1)	35.1	0.08
11	58	w	85	100 (70)	1.2 (0.8)	16.9	0.04
12	74	m	95	100 (70)	1.1 (0.8)	26.1	0.34
13	64	w	75	100 (70)	1.3 (0.9)	19.0	0.65
14	75	w	62	100 (70)	1.6 (1.1)	6.6	1.3
16	45	m	73	100 (70)	1.4 (1.0)	29.7	1.0
17*	79	w	90	100 (70)	1.1 (0.8)	4.3*	5.0*
18	72	m	74	100 (70)	1.4 (1.0)	50.7	0.54
19	40	w	55	80 (56)	1.5 (1.1)	19.2	0.11
21	61	w	74	100 (70)	1.4 (1.0)	36.9	0.20
Mittel	59.4	-	74.2	98.7 (69.1)	1.4 (1.0)	26.2	0.49
STABW	17.4	-	13.6	5.2 (3.6)	0.2 (0.2)	12.4	0.38
MIN	19	-	55	80 (56)	1.0 (0.7)	6.6	0.04
MAX	79	-	95	100 (70)	1.7 (1.2)	50.7	1.3

\*Die Daten von Proband 17 wurden nur teilweise in die statistischen Berechnungen (Mittelwert, Standardabweichung etc.) eingeschlossen, da aufgrund von Komplikationen bei der Einleitung eine Probennahme erstmals nach 5 min möglich war, eine Erfassung des wahren C<sub>max</sub> und abhängiger Parameter (markiert mit Asterisk) ist folglich nicht zu erwarten.

$V_c$ [l]	$V_3$ [l]	$V_4$ [l]	$V_{ss}$ [l]	$k_{13}$ [1/min]	$k_{31}$ [1/min]	$k_{14}$ [1/min]	$k_{41}$ [1/min]	$k_{1e}$ [1/min]
3.3	5.0	10.6	18.9	9.0	5.9	0.12	0.04	0.06
5.7	5.7	8.3	19.7	0.5	0.47	0.02	0.01	0.03
3.4	11.8	24.2	39.3	2.0	0.56	0.37	0.50	0.12
1.5	7.4	22.5	31.5	2.2	0.46	0.67	0.47	0.13
2.0	5.0	17.0	24.0	1.6	0.67	0.46	0.05	0.12
1.9	5.9	11.7	19.4	2.8	0.92	0.43	0.07	0.09
4.0	5.8	13.2	23.0	2.2	1.5	0.18	0.05	0.03
2.6	6.2	14.5	23.4	1.5	0.60	0.20	0.04	0.06
3.6	6.7	8.1	18.4	0.4	0.22	0.08	0.03	0.06
10.6	11.6	15.8	37.9	0.13	0.12	0.03	0.02	0.01
2.3	5.2	10.2	17.6	1.5	0.69	0.29	0.06	0.09
15.8*	3.2	16.3	35.2	2.5*	12.5*	0.05*	0.05*	0.01
1.3	5.1	11.1	17.5	3.6	0.90	0.50	0.06	0.11
2.8	7.1	13.8	23.8	1.5	0.61	0.17	0.03	0.08
1.8	5.3	9.8	16.9	1.8	0.63	0.25	0.05	0.10
3.3	6.5	13.8	24.4	2.2	1.0	0.27	0.11	0.07
2.4	2.4	4.8	7.7	2.2	1.4	0.19	0.16	0.04
1.3	3.2	8.1	16.9	0.13	0.12	0.02	0.01	0.01
10.6	11.8	24.2	39.3	9.0	5.9	0.67	0.50	0.13

Tabelle 12 (Fortsetzung)

Patient [#]	$t_{1/2\alpha}$ [min]	$t_{1/2\beta}$ [min]	$t_{1/2\gamma}$ [min]	MRT [min]	AUC [ $\mu\text{g/ml}\times\text{min}$ ]	CL [ml/min]	Korrelation ( $r^2$ )
3	0.46	6.9	83	104	385	182	0.989
4	0.72	26.7	127	127	448	156	0.978
7	0.24	5.4	80	103	182	384	0.996
8	0.21	4.8	121	158	350	200	0.997
9	0.25	3.9	81	102	298	235	0.996
10	0.17	4.1	86	115	415	169	0.999
11	0.18	5.3	139	189	575	122	0.992
12	0.31	7.1	112	143	428	164	0.997
13	0.96	11.1	74	91	342	204	0.992
14	2.54	22.1	195	255	468	150	1.00
16	0.28	4.6	66	85	335	209	0.993
17*	0.46*	7.2	130	183	353	198	0.998
18	0.14	4.5	93	123	490	143	0.997
19	0.30	7.8	89	109	256	219	0.994
21	0.25	6.1	76	96	395	177	0.998
Mittel	0.50	8.5	103	132	381	194	0.992
STABW	0.63	6.8	34	47	97	61	0.012
MIN	0.14	3.9	66	85	182	122	0.954
MAX	2.54	26.7	195	255	575	384	1.000

Wie bereits erläutert beschreibt das oben dargestellte 3-Kompartiment-Modell den Plasmakonzentrations-Zeit-Verlauf des SMC am besten, die pharmakokinetischen Parameter mit der größten forensischen Relevanz – die terminale Halbwertszeit sowie die MRT – erscheinen jedoch bei einem Vergleich des 3-kompartimentellen Ansatzes mit der benutzerdefinierten Auswertung faktisch äquivalent und somit doppelt abgesichert:

Mittels des nutzerdefinierten Ansatzes wurde eine mittlere terminale Halbwertszeit von  $106 \pm 37$  min bei einer mittleren, systemischen Verweildauer von  $134 \pm 49$  min ermittelt. Diese

Werte korrelieren sehr gut mit den anhand des 3-Kompartiment-Modells erhobenen Vergleichsparametern von  $103 \pm 34$  min für  $t_{1/2\gamma}$  bzw.  $132 \pm 47$  min für die MRT. Für einen Datensatz weichen die o.g. Ergebnisse für die zwei Modelle durchschnittlich nur  $\pm 1-2$  % voneinander ab, eine maximale Differenz von  $\pm 30$  % wurde für keinen Parameter und keinen Probanden je überschritten.

Die hohe Vergleichbarkeit des nutzerdefinierten mit dem 3-kompartimentellen Ansatz bezüglich der o.g. Parameter kann auf die annähernd deckungsgleichen Werte für die AUC von  $382 \pm 97$  (benutzerdefiniert) gegenüber  $381 \pm 97$  (3-Kompartiment-Modell) zurückgeführt werden.

Um eine eventuelle forensische Relevanz interindividueller Unterschiede herauszuarbeiten, wurden die Daten im Hinblick auf entsprechende Hypothesen [79] auf pharmakokinetische Unterschiede zwischen den Geschlechtern sowie zwischen Probanden mit primär hepatischen Erkrankungen gegenüber anderen Operationsindikationen ausgewertet. Ebenfalls untersucht wurde ein möglicher Einfluss des Probandenalters auf forensisch relevante Parameter.

Zunächst wurden dazu die Datensätze der männlichen (6) sowie weiblichen (9) Probanden mittels eines zweiseitigen, ungepaarten t-Tests untersucht. Es wurde die Nullhypothese (kein Unterschied zwischen den Untergruppen) geprüft. Für eine bessere Übersichtlichkeit und Bewertbarkeit werden die Ergebnisse tabellarisch dargestellt (Tabelle 13).

**Tabelle 13: Vergleich männlicher und weiblicher Probanden bezüglich forensisch relevanter pharmakokinetischer Parameter**

Parameter [Einheit]	MW weibl.	MW männl.	$\Delta$ (MW <sub>♀</sub> - MW <sub>♂</sub> )	STABW weibl.	STABW männl.	<i>p</i> -Wert
$C_{\max}$ [ $\mu\text{g/ml}$ ]	20.8	33.5	- 12.7	10.4	11.6	0.05
CL [ml/min]	198	189	9.1	76	33	0.79
$t_{1/2\gamma}$ [min]	111	93	18.1	40	21	0.33
MRT [min]	141	119	21.6	56	28	0.39

Für keinen Parameter war eine statistisch signifikante Abweichung der Mittelwerte von männlichen gegenüber weiblichen Probanden feststellbar, die Nullhypothese kann daher nicht abgelehnt werden. Nur für  $C_{\max}$  wurde ein  $p$ -Wert an der Grenze zur statistischen Signifikanz ermittelt.

Auch die Datensätze der primär an der Leber erkrankten (7) gegenüber nicht-lebergeschädigten Probanden (8) wurden mittels eines zweiseitigen, ungepaarten t-Tests untersucht. Es wurde die Nullhypothese (kein Unterschied zwischen den Untergruppen) geprüft. Für eine bessere Übersichtlichkeit und Bewertbarkeit werden die Ergebnisse tabellarisch dargestellt (Tabelle 14).

**Tabelle 14: Vergleich von primär hepatisch erkrankten und nicht-lebergeschädigten Probanden bezüglich forensisch relevanter pharmakokinetischer Parameter**

Parameter [Einheit]	MW krank	MW gesund	$\Delta$ (MW <sub>gesund</sub> - MW <sub>krank</sub> )	STABW krank	STABW gesund	$p$ -Wert
$C_{\max}$ [ $\mu\text{g/ml}$ ]	33.0	21.1	- 11.8	7.6	13.2	0.06
CL [ml/min]	225	167	- 57.0	74	32	0.06
$t_{1/2\gamma}$ [min]	91	114	22.5	24	40	0.21
MRT [min]	120	143	22.2	36	54	0.36

Für keinen Parameter war eine statistisch signifikante Abweichung der Mittelwerte von lebergeschädigten Probanden gegenüber Probanden ohne Leberschaden feststellbar, die Nullhypothese kann daher nicht abgelehnt werden.

Für  $C_{\max}$  und CL wurden  $p$ -Werte an der Grenze zur statistischen Signifikanz ermittelt, eine mögliche wissenschaftliche Relevanz erscheint jedoch aufgrund der Richtung der Mittelwertsabweichung ( $MW_{\text{krank}} > MW_{\text{gesund}}$ ) zumindest für die Clearance abzulehnen.

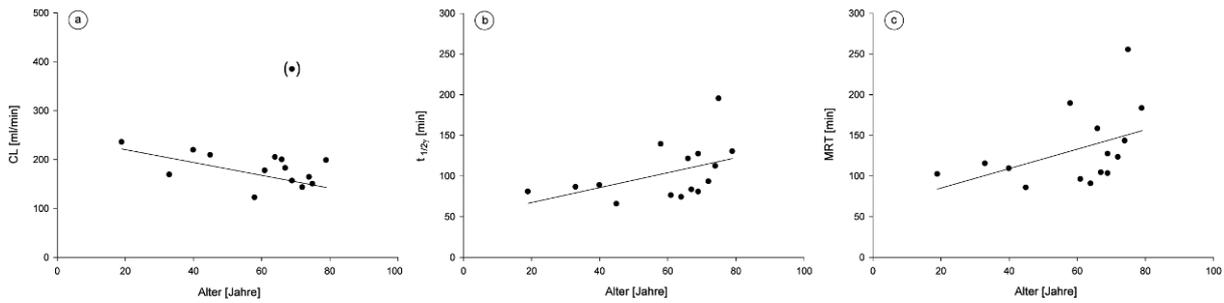
Auf einen möglichen Einfluss des Probandenalters auf pharmakokinetische Parameter ( $C_{\max}$ , CL,  $t_{1/2\gamma}$ , MRT) wurde mittels individueller Spearman Rangkorrelationen getestet. Die Ergebnisse können der folgenden Tabelle 15 entnommen werden.

**Tabelle 15: Korrelation des Probandenalters mit forensisch relevanten pharmakokinetischen Parametern**

Parameter [Einheit]	Spearman's Rho	<i>p</i> -Wert
$C_{\max}$ [ $\mu\text{g/ml}$ ]	-0.26	0.19
CL [ml/min]	-0.38	0.08
$t_{1/2\gamma}$ [min]	0.51	0.03
MRT [min]	0.54	0.02

Für  $t_{1/2\gamma}$  ( $\rho = 0.51$ ) sowie die MRT ( $\rho = 0.54$ ) konnte eine tendenziell positive Korrelation mit dem Alter der Patienten festgestellt werden, berechnete Spearman Rangkorrelationsfaktoren von  $\rho = -0.26$  sowie  $\rho = -0.38$  wiesen dagegen auf eine schwach negative Korrelation zwischen dem Probandenalter und  $C_{\max}$  sowie CL. Mit einem *p*-Wert von 0.19 war  $C_{\max}$  nicht signifikant mit dem Alter korreliert. Im Gegensatz dazu konnte statistische Signifikanz sowohl für  $t_{1/2\gamma}$  ( $p = 0.03$ ) sowie die MRT ( $p = 0.02$ ) festgestellt werden, wobei ein einzelner Ausreißer (Grubbs-Test) eine signifikante und stärkere Korrelation von Clearance und Alter verhinderte ( $p = 0.08$ ;  $p = 0.04$  mit  $\rho = -0.49$  nach Elimination des Ausreißers).

Abbildung 50 illustriert die oben präsentierten Ergebnisse. Durch die letztlich nur schwachen Korrelationen ist eine forensische Relevanz fraglich, wobei diese Zusammenhänge später noch eingehend diskutiert werden.



**Abbildung 50: Korrelation von Probandenalter mit forensisch relevanten, pharmakokinetischen Parametern von SMC**

Die Graphen zeigen die tendenziell negative Korrelation von Alter mit CL (a) bzw. die angedeuteten positiven Korrelationen von Probandenalter mit der terminalen Halbwertszeit (b) sowie der MRT (c). Im Rahmen der Gegenüberstellung von Alter mit Clearance wurde ein einzelner Ausreißer identifiziert (in Klammern). Die kalkulierten linearen Regressionsgeraden sind dargestellt.

Auch auf einen möglichen Einfluss des Probandengewichts auf pharmakokinetische Parameter ( $C_{\max}$ , CL,  $t_{1/2\gamma}$ , MRT) wurde mittels individueller Spearman Rangkorrelationen getestet. Die getesteten pharmakokinetischen Parameter waren weder statistisch signifikant ( $p > 0.15$ ) noch potentiell forensisch relevant ( $\rho$  stets kleiner als  $\pm 0.30$ ) mit dem Körpergewicht korreliert.

Um echte interindividuelle Unterschiede in der Physiologie der SMC-Metabolisierung annehmen zu können, muss ein signifikanter Einfluss der Methodik und der experimentellen Prozeduren auf die pharmakokinetischen Parameter ausgeschlossen sein. In diesem Zusammenhang wurde das Ausmaß intravenöser Infusionen (Ringer-Lactat-Lösung und/oder Gelafundin®) als die wahrscheinlichste Quelle systematischer Fehler identifiziert. Individuelle Spearman Rangkorrelationen wurden eingesetzt, um eine mögliche Verzerrung der SMC Konzentrations-Zeit-Profile zu detektieren. Die getesteten pharmakokinetischen Parameter (CL,  $t_{1/2\gamma}$ , MRT) korrelierten weder statistisch signifikant ( $p > 0.22$  und  $p > 0.20$  für Ringer-Lactat und Gelafundin®) mit der Infusionsmenge, noch war ein Verhältnis zwischen diesen Testgrößen als potentiell forensisch relevant zu erkennen (Spearman

Rangkorrelationsfaktor  $\rho$  stets kleiner als  $\pm 0.22$  bzw.  $\pm 0.25$  für Ringer-Lactat bzw. Gelafundin®). Eine mögliche wissenschaftliche Relevanz erschien auch in diesem Fall aufgrund der Richtung der vermeintlichen Korrelationen (schwach aber unplausible positive bzw. negative Korrelation der Infusionsmenge mit den einzelnen Parametern) stets abzulehnen.

Korrelationen von forensisch relevanten pharmakokinetischen Parametern mit anderen Medikamenten oder Therapien waren darüber hinaus ebenfalls nicht ersichtlich (nicht dargestellt).

#### 4.8.1.3 Einfluss der Stabilisierung auf SUX und SMC

Um die forensische Relevanz einer Probenstabilisierung bemessen zu können, wurden im Vergleich zu den 15 stabilisierten Probenserien bei 3 Probanden (s. Tabelle 16) Konzentrationsverläufe der Zielanalyten anhand von nicht stabilisierten Plasma-Proben bestimmt.

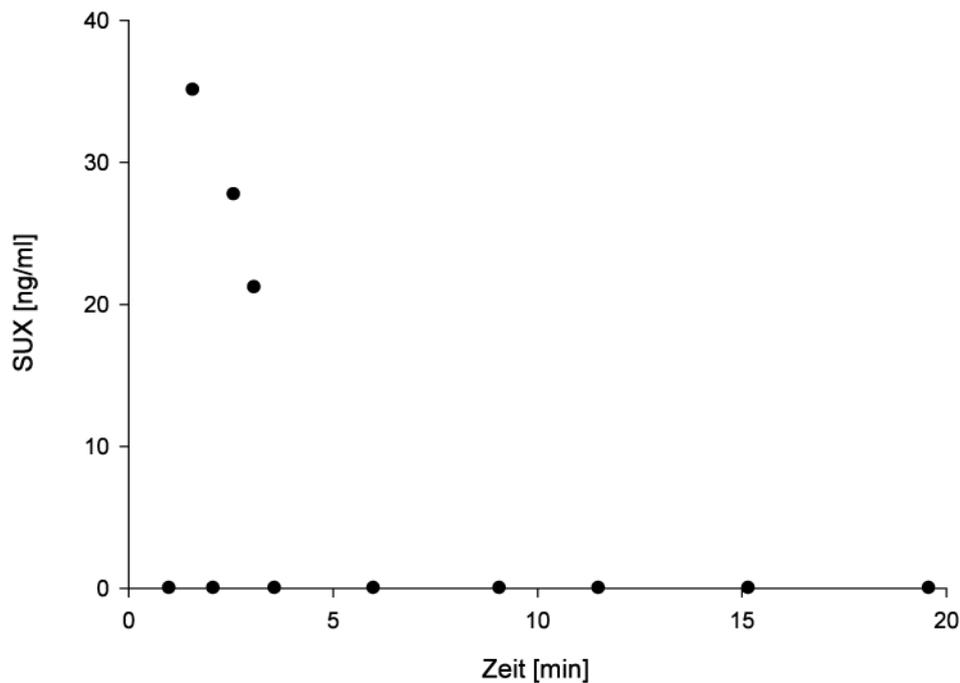
**Tabelle 16: Patientendaten des Kollektivs für nicht-stabilisierte Probenserien**

Patient [#]	Alter [Jahre]	Geschlecht [m/w]	Gewicht [kg]	abs. SUX-Dosis [mg]	rel. SUX-Dosis [mg/kg KG]
5	67	w	80	80	1.0
23	74	m	95	100	1.1
24	52	m	85	100	1.2

Wie bereits gezeigt sind die Konzentrationsverläufe der Zielsubstanzen, insbesondere die des SMC, nach Stabilisierung sehr regelmäßig und auch zwischen verschiedenen Probanden im grundsätzlichen Verlauf reproduzierbar (Abbildung 47).

Der Analytabbau in nicht-stabilisierten Proben verläuft im Gegensatz dazu häufig chaotischer, unplausibel starke auf- und abwärtsgerichtete Schwankungen in der messbaren Plasma-Konzentration können auch zwischen mehreren kurz aufeinanderfolgend entnommenen Proben beobachtet werden. Analyten sind im Vergleich zu zeitlich äquivalenten, stabilisierten Proben teils nur in sehr viel niedrigerer Konzentration oder auch gar nicht nachweisbar.

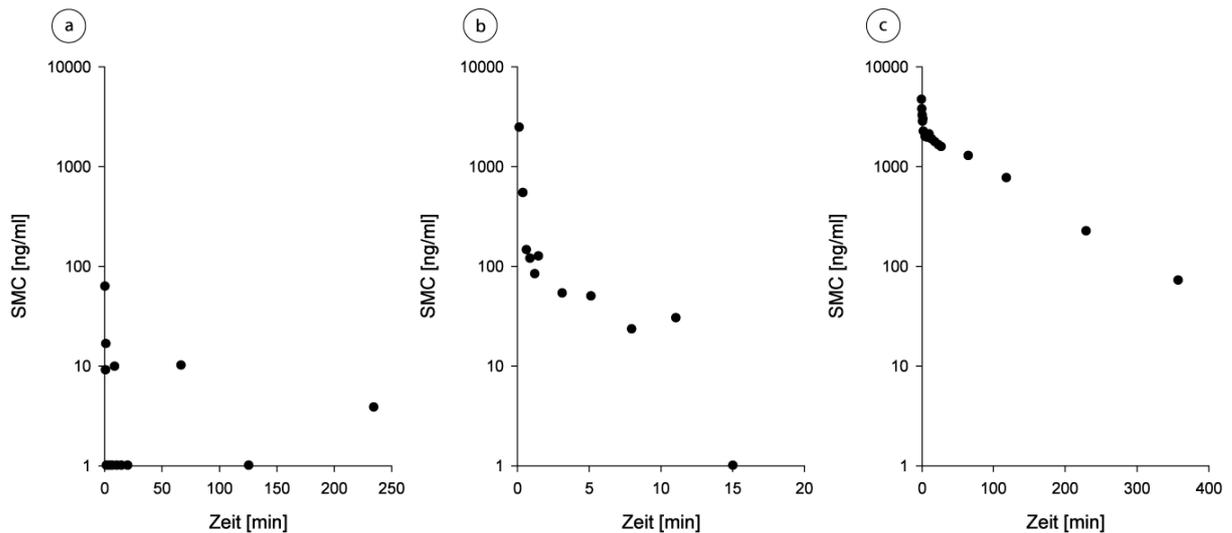
Für SUX konnte in allen nicht-stabilisierten Probanden eine im Vergleich zu den stabilisierten Probenreihen erheblich herabgesetzte Nachweisbarkeit – sowohl was die meßbaren Konzentrationen als auch die Dauer eines möglichen SUX-Nachweises angeht – beobachtet werden. Abbildung 51 zeigt beispielhaft den Verlauf der messbaren SUX-Konzentration über einen nicht-stabilisierten Probenlauf.



**Abbildung 51: SUX in nicht-stabilisiertem Plasma**

Die nachweisbaren SUX-Konzentrationen sind in einem niedrigen Konzentrationsbereich stark schwankend. SUX kann zu einem gegebenen Zeitpunkt nicht, und in einer zeitlich darauf folgenden Probe wiederum nachweisbar sein.

Für SMC konnten im Gegensatz dazu große interindividuelle Unterschiede bezüglich der Auswirkungen einer nicht erfolgten Paraoxonstabilisierung festgestellt werden: In einem Probanden (# 23) unterschied sich der mittels nicht-stabilsierter Blutproben ermittelte SMC-Konzentrationsverlauf im Plasma kaum von dem stabilsierter Probenreihen (Abbildung 52c), in einem anderen Probanden dagegen (# 24) waren unstabilisiert niemals mehr als 100 ng/ml SMC nachweisbar (Abbildung 52a). Abbildung 52 zeigt die SMC-Profile der drei nicht stabilisierten Probandenserien in einer graphischen Gegenüberstellung.



**Abbildung 52: Unterschiedliche Auswirkungen einer ausbleibenden Paraoxon-Stabilisierung auf den SMC-Abbau**

Es sind die SMC-Konzentrationsverläufe der nicht-stabilisierten Probenläufe (Proband #24, a; Proband #5, b; Proband #23, c) in halblogarithmischer Auftragung abgebildet. Die x-Achse ist für eine bessere Übersichtlichkeit teils verkürzt dargestellt. Ein Berühren der x-Achse ist (in Ermangelung der Darstellbarkeit der „0“ bei logarithmischer Auftragung) gleichbedeutend mit einem Unterschreiten der Nachweisgrenze. Enorme interindividuelle Unterschiede im Ansprechen auf eine Paraoxonstabilisierung sind zu beobachten.

Um die Komplexität dieser Ergebnisse übersichtlich darstellen zu können, soll die Nachweishäufigkeit der Zielanalyten in Abhängigkeit von der Zeit nach SUX-Einleitung für die nicht-stabilisierten Probenläufe ermittelt, und mit entsprechenden Werten für die stabilisierten Ansätze verglichen werden.

Zu diesem Zweck wurden die Ergebnisse aller stabilisierter sowie nicht stabilisierter Probenserien jeweils kombiniert, und nach dem Kriterium der Probennahmezeit in sinnvolle Gruppen eingeordnet: die Gruppen wurden derart gewählt, dass nur möglichst zeitgleiche Probennahmen zusammengefasst wurden, allerdings sollte ebenfalls eine minimale Anzahl von Messwerten pro Gruppe auch für die nicht-stabilisierten Versuchsreihen nicht unterschritten werden. Für die stabilisierten Probenserien wurden für SUX bzw. SMC 18 bzw. 16 Gruppen definiert, wobei in jeder Gruppe je 11-21 Werte (Mittel: 14.6 Werte für SUX bzw. 16.4 Werte für SMC) zusammengefasst wurden.

Für die nicht-stabilisierten Probenserien ergaben sich für SUX bzw. SMC 11 bzw. 9 Gruppen mit je 3-11 Einzelwerten (Mittel: 5.4 Werte für SUX bzw. 7.1 Werte für SMC), wobei die sehr gering scheinende, minimale Gruppenstärke von nur 3 Werten durch die Anzahl der Probanden von  $n = 3$  bei der Probennahmezeit von  $t \approx 6$  h unvermeidbar war.

Unterschiedliche Gruppenstärken wurden gewählt, um den unterschiedlichen Abbaugeschwindigkeiten von SUX und SMC gerecht zu werden: für SUX wurden eher kleine Gruppenstärken zu Gunsten sehr ähnlicher Probennahmezeiten gewählt, um auch abrupte Veränderungen in der Nachweishäufigkeit besser abbilden zu können. Für SMC konnten dagegen größere Zeitintervalle zugunsten einer höheren Aussagekraft weil größeren Gruppenstärken zusammengefasst werden.

Die ursprünglich kontinuierlichen Messwerte einer Analytkonzentration wurden in kategoriale Daten („positiv“, „negativ“) umgeformt, und die prozentuale Nachweishäufigkeit der Zielsubstanzen in jeder einzelnen Gruppe bestimmt.

#### **4.8.1.3.1 SMC**

In den stabilisierten Proben war SMC über den gesamten Versuchszeitraum oberhalb der Bestimmungsgrenze nachweisbar, dagegen nimmt die Häufigkeit eines positiven SMC Nachweises bei nicht-stabilisierten Proben über den Verlauf des Versuchszeitraums ab: nach ca. 4 h gelingt nur noch in 50 % der nicht-stabilisierten Proben ein Nachweis von SMC, nach 6 h ist nur noch ein Drittel dieser Proben SMC-positiv. In Abbildung 53 sind die diskutierten Nachweishäufigkeiten für SMC in stabilisierten gegenüber nicht-stabilisierten Plasmaproben graphisch dargestellt.

---

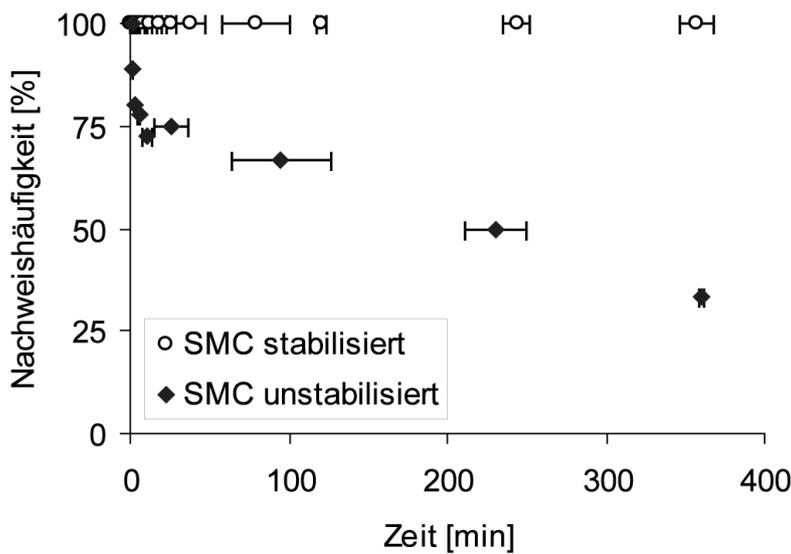


Abbildung 53: Nachweisbarkeit von SMC im Plasma

In stabilisiertem Plasma ist SMC über das gesamte Versuchsintervall nachweisbar. In nicht stabilisiertem Plasma nimmt die Nachweiswahrscheinlichkeit innerhalb von ca. 4 Stunden um 50 % ab, nach 6 Stunden ist SMC nur noch in einem Drittel der Proben nachweisbar.

Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der für eine Gruppe und somit einen Häufigkeitswert zusammengefassten Probennahmezeiten an.

#### 4.8.1.3.2 SUX

Die Häufigkeit eines SUX-Nachweises in stabilisiertem Plasma sinkt während der ersten 10 min sehr schnell auf ca. 25 % ab, der weitere Rückgang in der Inzidenz positiver SUX-Befunde verläuft langsamer. In einem Fall gelang ein SUX-Nachweis noch in einer Probe, welche zum Zeitpunkt  $t = 65$  min nach Einleitung entnommen wurde.

Im unstabilisierten Plasma besteht für SUX nur um den Zeitpunkt des Erreichens seiner  $C_{\max}$  ( $T_{\max} \approx 0.5$  min, [4]) herum überhaupt eine relevante Nachweiswahrscheinlichkeit: in diesem Zeitfenster wurden für bis zu 30 % der Proben positive SUX-Befunde erhoben. Der letzte SUX-Nachweis gelang nicht-stabilisiert in einer Probe, welche zum Zeitpunkt  $t = 4$  min nach Einleitung abgenommen wurde. In Abbildung 54 sind die diskutierten Nachweiswahrscheinlichkeiten für SUX in stabilisierten gegenüber nicht-stabilisierten Plasmaproben graphisch dargestellt.

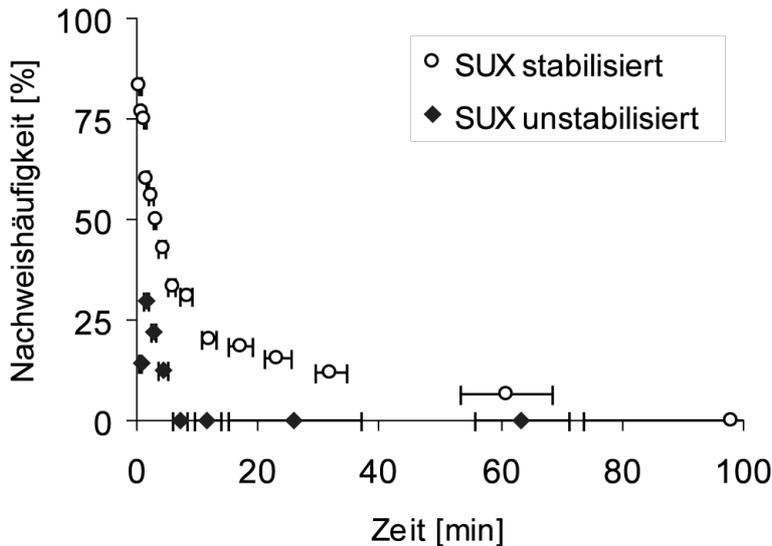


Abbildung 54: Nachweisbarkeit von SUX im Plasma

In stabilisiertem Plasma nimmt die Nachweisbarkeit innerhalb von 10 min auf ca. 25 % ab. In einem Fall war SUX in einer Probe mit  $t = 65$  min nachweisbar. In nicht stabilisiertem Plasma ist SUX nur zum Zeitpunkt der  $C_{\max}$  in max. 30 % der Proben nachweisbar, der letzte positive Befund wurde für eine Probe mit  $t = 4$  min erhoben. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der für eine Gruppe und somit einen Häufigkeitswert zusammengefassten Probennahmezeiten an.

## 4.8.2 Urin

### 4.8.2.1 Konzentrationsprofile von SUX und SMC

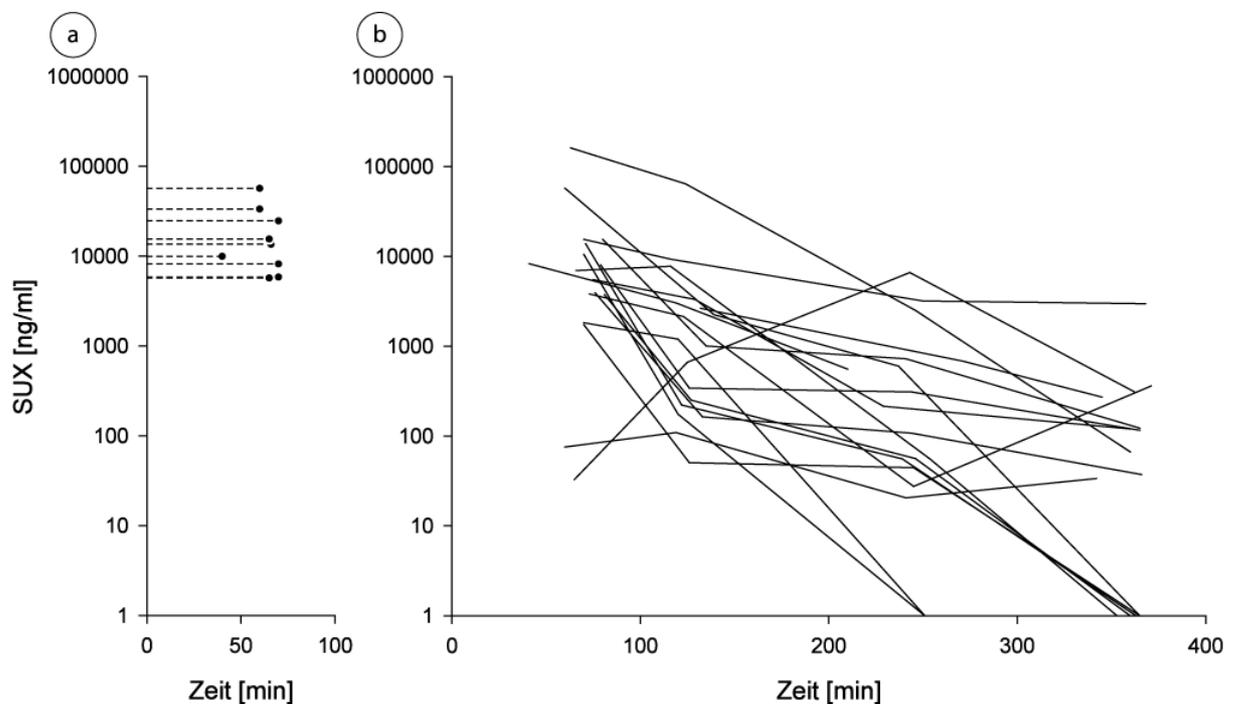
Urin-Konzentrationsprofile von SUX sowie SMC wurden anhand von 15 stabilisierten Probenserien bestimmt.

Um die forensische Relevanz einer Probenstabilisierung bemessen zu können, wurden vergleichend dazu bei 3 Probanden Konzentrationsverläufe der Zielanalyten anhand von nicht stabilisierten Urin-Proben bestimmt.

Sammelurinproben wurden von 9 Probanden entnommen (davon 3 nicht-stabilisiert), und beinhalteten den Urin des gesamten Zeitraums von der Einleitung von SUX bis ca. 1 h danach (Gesamt: 40-70 min, Mittel: 62.9 min; stabilisierte Proben: 60-70 min, Mittel: 66.8 min; nicht-stabilisierte Proben: 40-65 min, Mittel: 55.0 min).

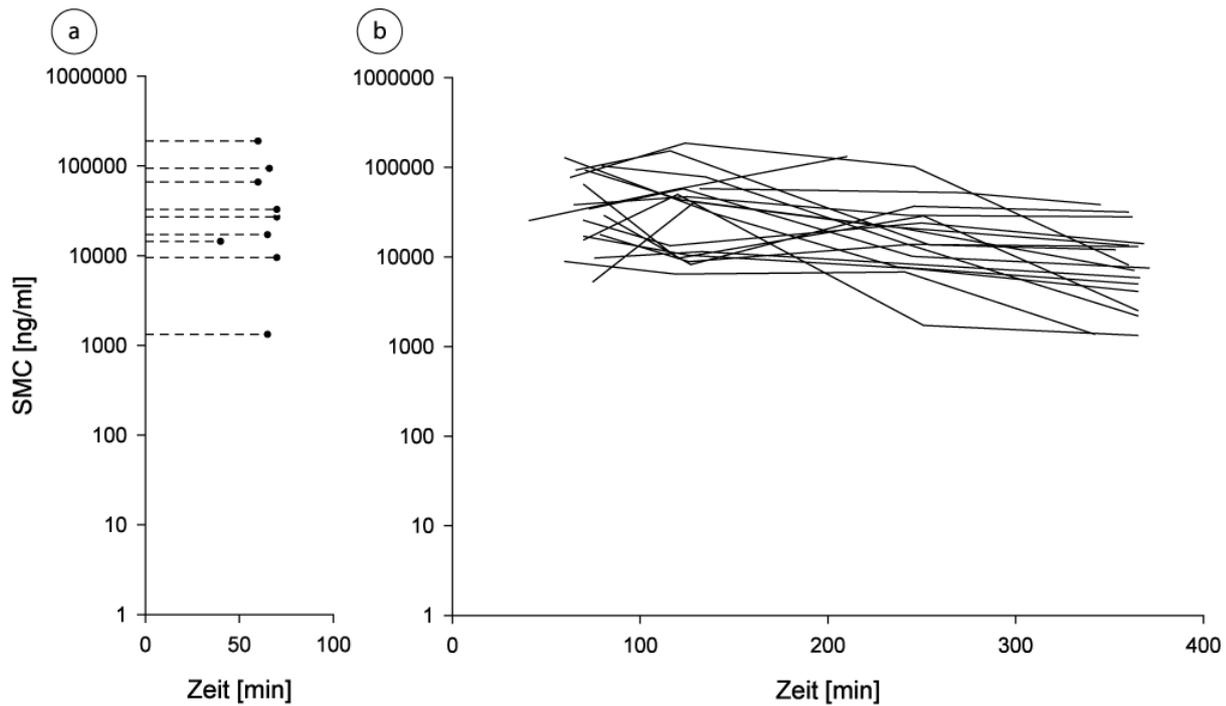
In allen – stabilisierten sowie nicht-stabilisierten – Sammelurinproben wurde SUX mit Konzentrationen von 5.7 µg/ml bis 56.9 µg/ml festgestellt, SMC war ebenfalls in allen Proben in Konzentrationen zwischen 1.3 µg/ml und 189.4 µg/ml nachweisbar. Eine Überlagerung der Konzentrationsprofile für SUX bzw. SMC in den Sammelurinproben ist in Abbildung 55a bzw. Abbildung 56a graphisch dargestellt.

In frisch sezernierten, stabilisierten sowie nicht-stabilisierten, Katheterurinen wurden SUX- bzw. SMC- Konzentrationen von (0-)0.02-160.7 µg/ml bzw. 1.3-186.0 µg/ml gemessen. Eine Überlagerung der Konzentrationsprofile für SUX bzw. SMC ist in Abbildung 55b bzw. Abbildung 56b dargestellt.



**Abbildung 55: Überlagerung der Poolkonzentrationen und Konzentrationsverläufe für SUX im Urin**

(a) Es sind die SUX-Konzentrationen der 9 Sammelurine dargestellt. Das Zeitintervall über welches der Urin gesammelt wurde ist durch die Länge der gepunkteten Linie angegeben, der Endpunkt repräsentiert den Zeitpunkt der Probenahme. (b) zeigt eine Überlagerung der Konzentrationsverläufe für SUX aller 18 Urinserien. Ein Berühren der x-Achse ist (in Ermangelung der Darstellbarkeit der „0“ bei logarithmischer Auftragung) gleichbedeutend mit einem Unterschreiten der Nachweisgrenze.



**Abbildung 56: Überlagerung der Poolkonzentrationen und Konzentrationsverläufe für SMC im Urin**

(a) Es sind die SMC-Konzentrationen der 9 Sammelurine dargestellt. Das Zeitintervall über welches der Urin gesammelt wurde ist durch die Länge der gepunkteten Linie angegeben, der Endpunkt repräsentiert den Zeitpunkt der Probennahme. (b) zeigt eine Überlagerung der Konzentrationsverläufe für SMC aller 18 Urinserien.

#### 4.8.2.2 Einfluss der Stabilisierung

Für die Sammelurinproben ist der Einsatz des Stabilisators auf seine forensische Relevanz hin zu überprüfen. Die Messergebnisse äquivalenter Probennahmen wurden dazu mittels eines zweiseitigen, ungepaarten t-Tests untersucht. Es wurde die Nullhypothese (kein Unterschied von unstabilisierten im Vergleich zu stabilisierten Proben) geprüft. Für eine bessere Übersichtlichkeit und Bewertbarkeit werden die Ergebnisse tabellarisch dargestellt (Tabelle 17).

**Tabelle 17: Vergleich stabilisierter gegenüber nicht stabilisierter Sammelurin-Proben**

Analyt	MW stabilisiert [µg/ml]	MW unstabilisiert [µg/ml]	$\Delta$ [µg/ml] (MW <sub>stab</sub> - MW <sub>unstab.</sub> )	STABW stabilisiert [µg/ml]	STABW unstabilisiert [µg/ml]	p-Wert
SUX	17.5	22.8	-5.3	9.7	29.5	0.69
SMC	62.5	25.7	36.8	68.7	35.3	0.42

MW = Mittelwert; STABW = Standardabweichung;  $\Delta$  = Differenz der Mittelwerte

In beiden Gruppen zeigen die Standardabweichungen, die meist sogar größer sind als der jeweilige Mittelwert, enorme Streubreiten der Werte an. In keinem Fall war daher eine statistisch signifikante Abweichung der Mittelwerte von stabilisierten gegenüber nicht stabilisierten Sammelurinproben feststellbar, die Nullhypothese kann nicht abgelehnt werden.

Auch für die Katheterurine soll der Einsatz des Stabilisators auf seine forensische Relevanz hin überprüft werden. Zu diesem Zweck wurden die Ergebnisse aller stabilisierten sowie nicht stabilisierten Probenserien zunächst jeweils kombiniert, und nach dem Kriterium der Probennahmezeit in sinnvolle Gruppen eingeordnet: die Gruppen wurden derart gewählt, dass nur annähernd zeitgleiche Probennahmen zusammengefasst wurden. Für die stabilisierten Probenserien wurden für SUX und SMC je 5 Gruppen definiert, wobei in jeder Gruppe 15 Werte zusammengefasst wurden. Eine Probennahme bei 40 min konnte nicht sinnvoll in die anderen Gruppen eingliedert werden, und wird daher individuell betrachtet. Letztere Probe ist nicht Gegenstand der noch folgenden statistischen Berechnungen.

Für die nicht-stabilisierten Probenserien wurden für SUX und SMC ebenfalls je 5 Gruppen mit jeweils 3 Einzelwerten eingerichtet. Eine generelle Vergleichbarkeit der nicht-stabilisierten mit den stabilisierten Urinproben war durch nur sehr geringe Streubreiten bei den Probennahmezeitpunkten (SD: 6.3 – 12 min, entsprechend 2.1 – 8.1 % der Sollentnahmezeit) gesichert.

Die Messergebnisse äquivalenter Probennahmen wurden mittels eines zweiseitigen, ungepaarten t-Tests untersucht. Es wurde die Nullhypothese (kein Unterschied von unstabilisierten im Vergleich zu stabilisierten Proben) geprüft. Für eine bessere Übersichtlichkeit und Bewertbarkeit werden die Ergebnisse tabellarisch dargestellt (Tabelle 18).

**Tabelle 18: Vergleich stabilisierter gegenüber nicht stabilisierter Katheterurin-Proben**

Zeit [min]	Analyt	MW stabilisiert [ $\mu\text{g/ml}$ ]	MW unstabilisiert [ $\mu\text{g/ml}$ ]	$\Delta$ ( $MW_{\text{stab}} - MW_{\text{unstab.}}$ )	STABW stabilisiert [ $\mu\text{g/ml}$ ]	STABW unstabilisiert [ $\mu\text{g/ml}$ ]	p-Wert
60	SUX	18.7	2.5	16.2	40.3	2.8	0.51
	SMC	49.8	41.3	8.5	39.3	37.7	0.74
120	SUX	6.0	1.6	4.4	16.3	1.5	0.66
	SMC	48.2	53.8	-5.5	54.5	17.4	0.87
240	SUX	0.5	3.4	-2.9	1.0	4.5	0.02*
	SMC	23.2	25.5	-2.4	25.4	5.0	0.90
360	SUX	0.3	0.1	0.1	0.8	0.2	0.82
	SMC	10.3	16.1	-5.8	10.9	10.8	0.41

Das \* markiert einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der stabilisierten gegenüber der nicht-stabilisierten Gruppe. MW = Mittelwert; STABW = Standardabweichung;  $\Delta$  = Differenz der Mittelwerte

In beiden Gruppen zeigen die Standardabweichungen, die häufig sogar größer sind als der jeweilige Mittelwert, enorme Streubreiten der Werte an. Einzig im Vergleich der Gruppen  $t \approx 240$  min wurde mit  $p = 0.02$  ein statistisch signifikanter Unterschied (mit \* markiert) zwischen den SUX-Konzentrationen in stabilisierten gegenüber nicht stabilisierten Proben festgestellt, wobei der Mittelwert in der nicht-stabilisierten Gruppe höher ist als der der stabilisierten. Bei einer Begutachtung der Einzelwerte fällt in der nicht-stabilisierten Gruppe (mit einer SUX-Konzentration von  $6.6 \mu\text{g/ml}$ ) ein im Vergleich zu den anderen Daten dieser Gruppe stark erhöhter Wert auf. Gerade bei kleinen Probengrößen wie sie für die nicht-stabilisierten Urinproben in dieser Studie vorliegen ( $n = 3$ ), können Ausreißer zur irrigen Annahme einer Signifikanz führen (Typ I-Fehler). Trotz der ermittelten statistische Signifikanz ist eine wissenschaftliche Relevanz in diesem Fall nicht erwiesen, erscheint sogar aufgrund der Richtung der Mittelwertsabweichung ( $MW_{\text{stab}} < MW_{\text{unstab.}}$ ) abzulehnen.

Es wird darauf hingewiesen, dass mittels der obigen Berechnungen zwar eine Abwesenheit statistisch signifikanter Unterschiede, nicht jedoch eine Äquivalenz der stabilisierten und nicht-stabilisierten Urinproben nachgewiesen wurde. Eine im Folgenden durchgeführte, einheitliche Auswertung aller Urinserien bezüglich der Nachweishäufigkeiten der

---

Zielsubstanzen ist somit zwar gerechtfertigt, die obigen Ergebnisse der statistischen Kalkulationen werden jedoch im Rahmen der Probennahme-Empfehlungen (s. Abschnitt 5.11) im Hinblick auf Ihre Aussagekraft noch kritisch diskutiert.

#### *4.8.2.3 Nachweishäufigkeiten*

In Sammelurinproben – stabilisiert sowie nicht-stabilisiert – gelang in stets 100 % der Fälle ein Nachweis von sowohl SUX als auch SMC, es erfolgt daher keine genauere Auswertung.

Zur Bestimmung der Nachweishäufigkeit der Zielanalyten in Katheterurinen wurden stabilisierte sowie unstabilisierte Urinproben wie bereits erläutert zusammengefasst, und vergleichbar mit dem Vorgehen zur Evaluation der Stabilisierung in Gruppen (5 Gruppen à 18 Werte) eingeteilt. Die ursprünglich erhobenen, kontinuierlichen Messwerte (Analytkonzentration) wurden in kategoriale Daten („positiv“, „negativ“) umgeformt.

Für jede der 5 Gruppen wurde die prozentuale Nachweishäufigkeit für SUX und SMC bestimmt.

SMC war über den gesamten Versuchszeitraum oberhalb der Bestimmungsgrenze im frisch sezernierten Katheterurin nachweisbar.

Die Häufigkeit eines positiven SUX Nachweises nimmt über den Verlauf des Versuchszeitraums ab: nach ca. 4 h gelingt noch in 89 % der Proben ein Nachweis von SUX, nach 6 h sind nur noch 56 % der frisch sezernierten Urine SUX-positiv. In Abbildung 57 sind die beschriebenen Nachweishäufigkeiten für SUX und SMC in Katheterurinproben graphisch dargestellt.

---

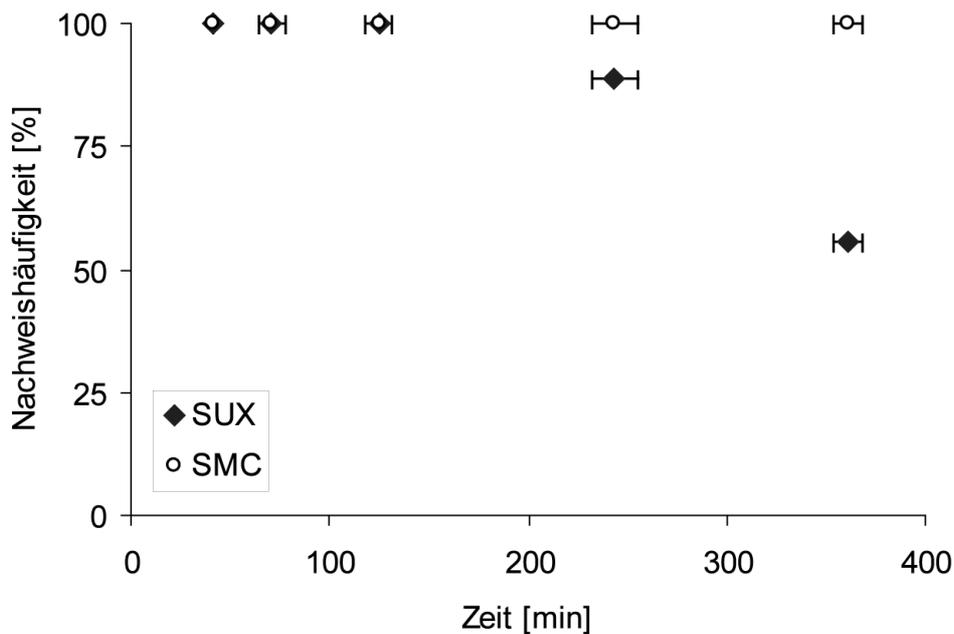


Abbildung 57: Nachweisbarkeit von SUX und SMC im Urin

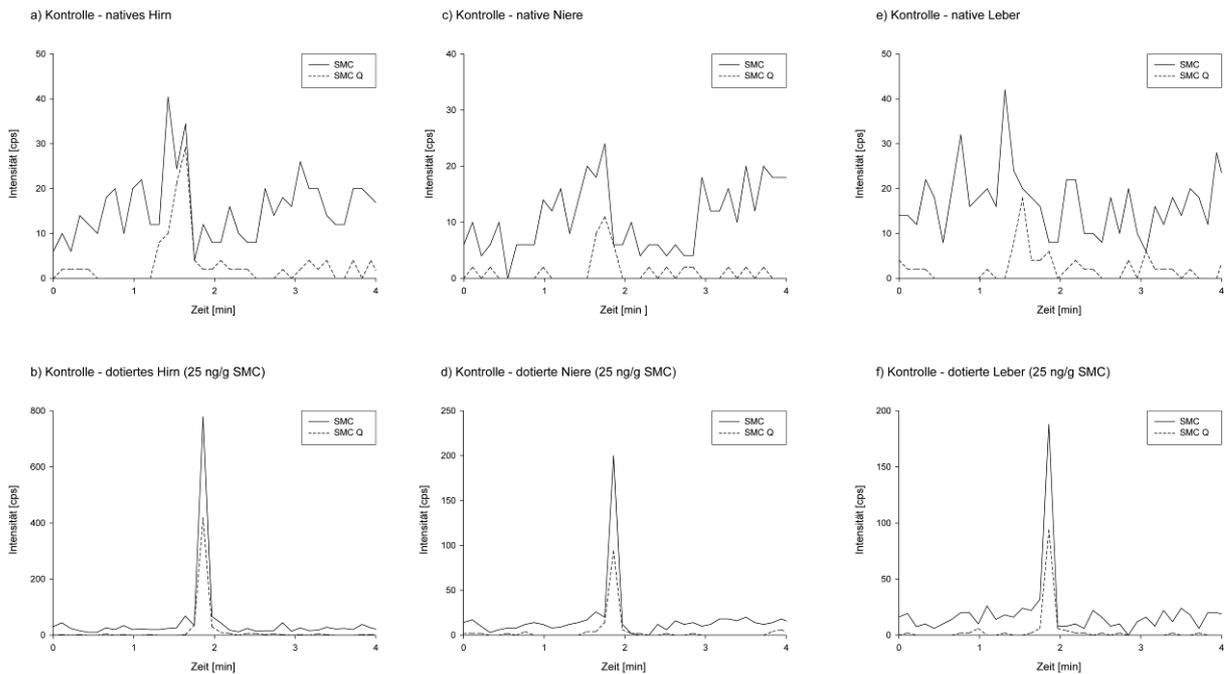
Im Urin ist SMC über den gesamten Versuchsverlauf nachweisbar. Die Nachweisfrequenz von SUX nimmt nach ca. 4 Stunden auf 89 %, und nach 6 Stunden auf 56 % ab. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der für eine Gruppe und somit einen Messwert zusammengefassten Probennahmezeiten an.

## 4.9 Studie zu nativem SMC in verschiedenen Probenmatrices

### 4.9.1 Gewebeproben

#### 4.9.1.1 SUX-negative Kontrollgewebe

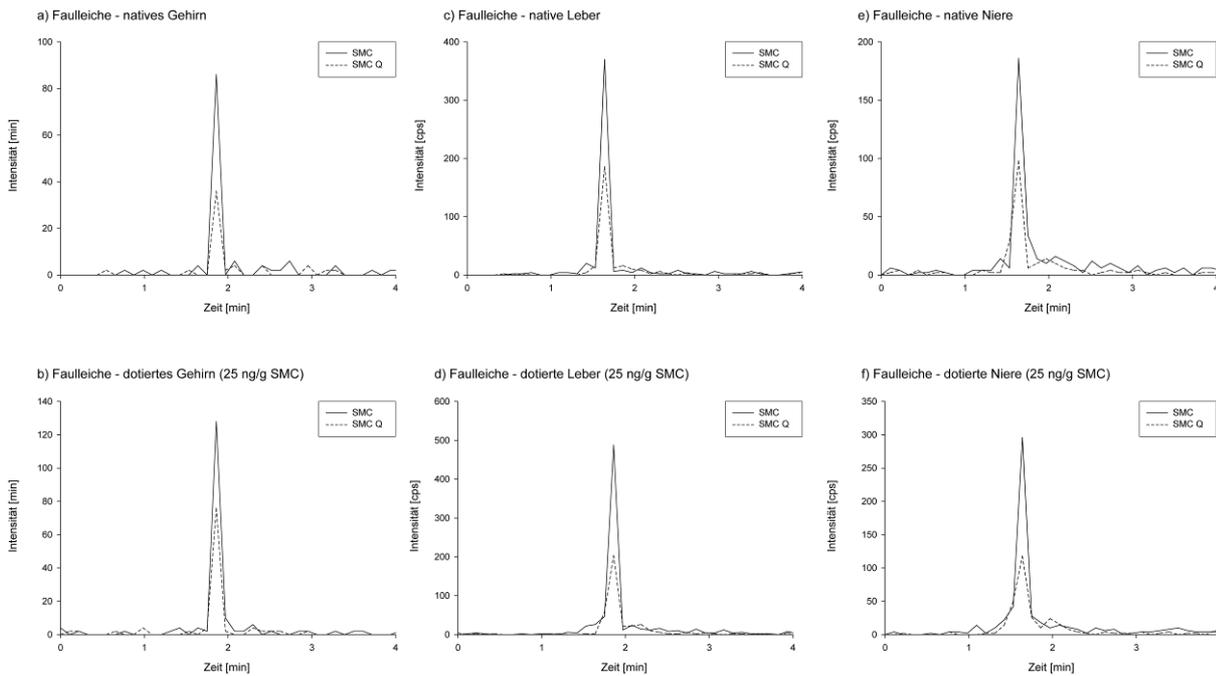
Die durchgeführten Analysen ergaben keinen Hinweis auf endogenes SMC in den frisch entnommenen (Abbildung 58 a,c,e) SUX-negativen Kontrollproben. In allen getesteten Gewebeproben führte eine SMC-Standardaddition von 25 ng/g zu Signalen mit einem guten Signal-Rausch-Verhältnis weit oberhalb der Nachweisgrenze (Abbildung 58 b,d,f).



**Abbildung 58: Vergleichende Analyse nativer (a,c,e) gegenüber dotierter (25 ng/g SMC; b,d,f) Gewebeproben postmortalen Kontrollen**

Die in dieser Abbildung grafisch dargestellten Ergebnisse wurden von einem frischen Kontrollkörper erhalten. SMC wird durch seinen Quantifier (durchgehend) sowie Qualifier (gepunktet) dargestellt. Übergänge für SUX sowie die internen Standards wurden zugunsten einer besseren Übersichtlichkeit nicht abgebildet.

Im Gegensatz zu den oben ausgeführten Ergebnissen für frische postmortale Gewebeproben war SMC in 3 von 4 Kontrollkörpern in einem Stadium fortgeschrittener Verwesung sowie in 3 von 12 archivierten (aber nicht von Fäulnisleichen stammenden) Kontrollfällen eindeutig nachweisbar. In diesen 6 Fällen war das Lebergewebe mit 21-65 ng/g (Mittel: 50.5 ng/g) stets SMC-positiv, wogegen nur in einem Fall SMC auch in der Niere (69 ng/g) sowie im Hirn (26 ng/g) oberhalb des LOD nachweisbar war. Die Ergebnisse für letzteren Fall sind in Abbildung 59 graphisch dargestellt.



**Abbildung 59: Vergleichende Analyse nativer (a,c,e) gegenüber dotierten (25 ng/g SMC; b,d,f) Gewebeproben eines stark verwesten Kontrolllechnams**

SMC wird durch seinen Quantifier (durchgehend) sowie Qualifier (gepunktet) dargestellt, und konnte in Konzentrationen von 26 ng/g, 42 ng/g sowie 69 ng/g im Hirn-, Leber- und Nierengewebe nachgewiesen werden. Übergänge für SUX sowie für die internen Standards wurden zugunsten einer besseren Übersichtlichkeit nicht abgebildet.

Die bereits beschriebene SMC-Interferenz war in allen frischen Gewebeproben in Konzentrationen von bis zu 139 ng/g SMC-Äquivalenten (Äq.; Hirn), 126 ng/g SMC-Äq. (Leber) sowie 165 ng/g SMC-Äq. (Niere) nachweisbar; mittlere Interferenzkonzentrationen in diesen Geweben waren 52,4, 38,3 sowie 53,4 ng/g SMC-Äq.

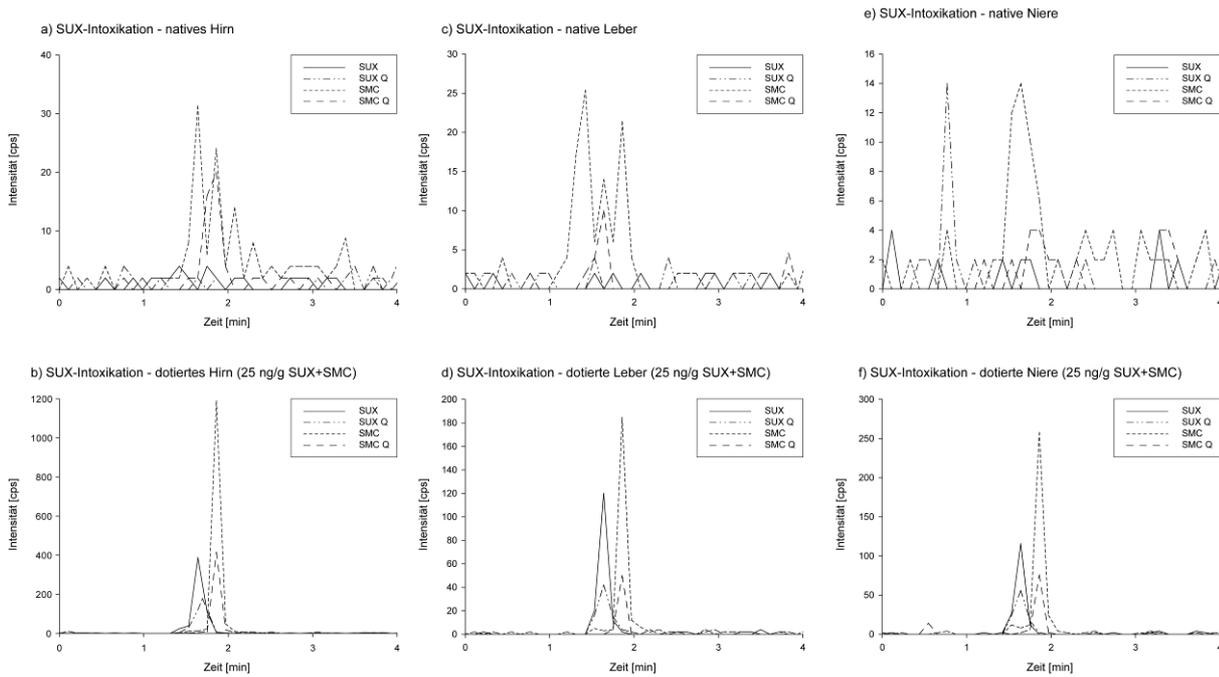
Verwestes oder archiviertes Kontrollmaterial enthielt nicht immer die bereits oben diskutierte SMC-Interferenz, wobei insbesondere Nierengewebe häufig negativ getestet wurde. Mit 47 bzw. 7,3 ng/g SMC-Äq. (Hirn), 12 bzw. 3,6 ng/g SMC-Äq. (Leber) und 7 bzw. 0,6 ng/g SMC-Äq. (Niere) war sowohl die maximale als auch die mittlere Interferenz-Konzentration in Fäulnis- oder Archivmaterial stets erheblich niedriger als in vergleichbaren Frischgeweben. Tabelle 19 gibt einen Überblick über die Analysenergebnisse für SUX-negative Kontrollgewebe.

**Tabelle 19: Zusammenfassung der Ergebnisse für die untersuchten Kontrollgewebe**

	Hirn (29)		Leber (33)		Niere (33)	
	frisch (13)	Fäulnis/ Archiv (16)	frisch (17)	Fäulnis/ Archiv (16)	frisch (17)	Fäulnis/ Archiv (16)
SMC-positiv [abs]	0	1	0	6	0	1
Interferenz- negativ [abs.]	0	3	0	5	0	11
mittlere Interferenz- Konz. [ng/g SMC Äq.]	52.4	7.3	38.3	3.6	53.4	0.6
max. Interferenz Konz. [ng/g SMC Äq.]	139	47	126	12	165	7

#### 4.9.1.2 SUX-Intoxikation

In keiner der untersuchten Gewebeproben des SUX-assoziierten Todesfalls konnte die Muttersubstanz nachgewiesen werden (Abbildung 60 a,c,e). Eine verlässliche Detektion von SMC war genauso unmöglich, da sich weder Quantifier noch Qualifier dieser Substanz signifikant gegenüber dem Hintergrundrauschen abhoben. (Abbildung 60 a,c,e). Dotierte Gewebeproben desselben Ursprungs hingegen waren eindeutig positiv für beide Analyten und lieferten Signale mit einem guten Signal-Rausch-Verhältnis weit oberhalb der Nachweisgrenze (Abbildung 60 b,d,f).



**Abbildung 60: Vergleichende Analyse von unbehandelten (a,c,e) gegenüber dotierten (je 25 ng/g SUX und SMC; b,d,f) Gewebeproben einer tödlichen SUX-Intoxikation**

Jeder Analyt wird durch seinen jeweiligen Quantifier und Qualifier dargestellt, wohingegen interne Standards zugunsten einer besseren Übersichtlichkeit nicht abgebildet wurden.

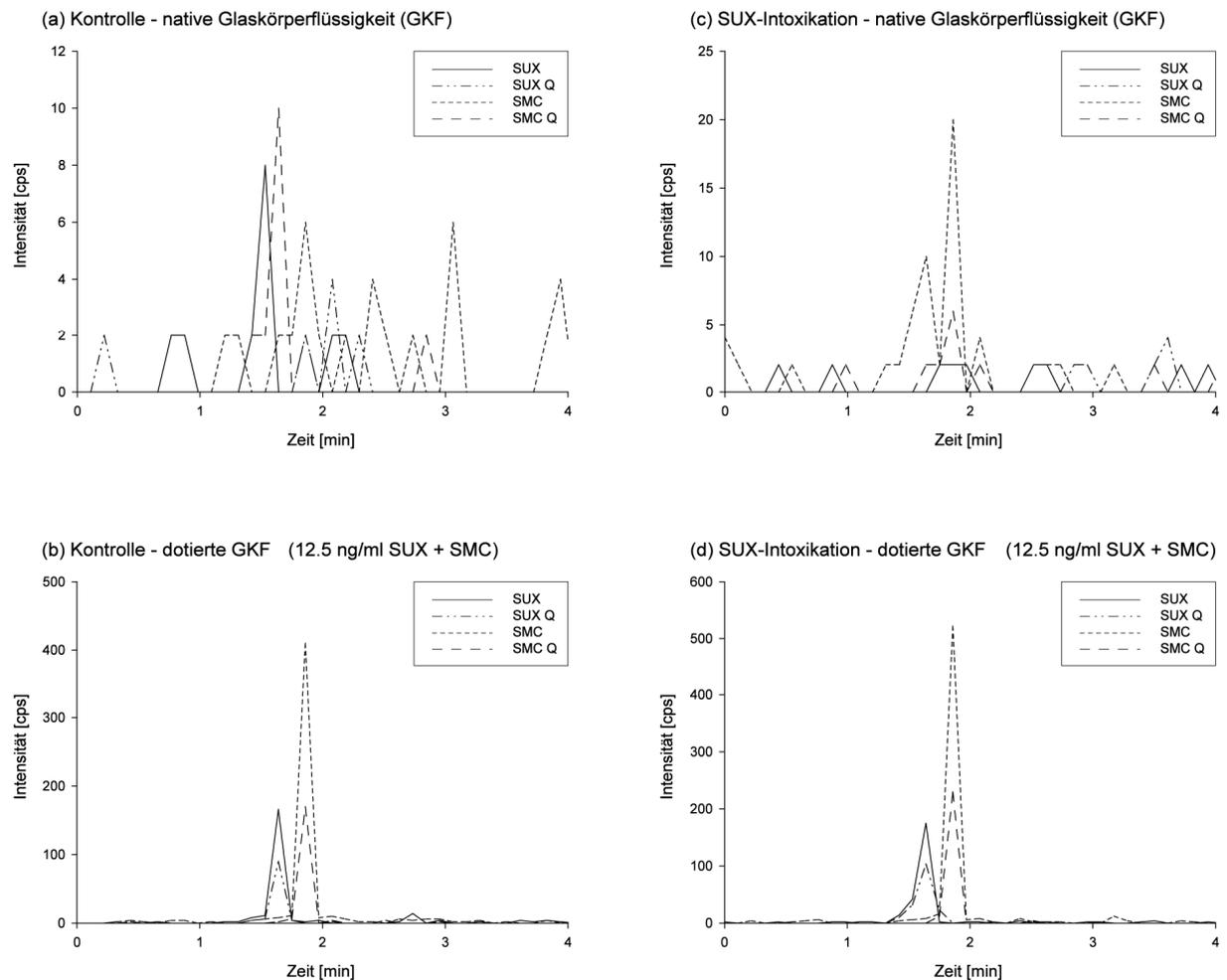
## 4.9.2 Glaskörperflüssigkeit

### 4.9.2.1 SUX-negative Glaskörperflüssigkeitskontrollen

Die Analysen ergaben in keiner der untersuchten Glaskörperflüssigkeitskontrollen einen Hinweis auf natives SMC, die bereits beschriebene SMC-Interferenz [80] war allerdings auch in fast allen getesteten Mustern dieser Probenmatrix in Konzentrationen von (0-)2-93 ng/ml (Mittel: 13.1 ng/ml) SMC-Äq. nachweisbar (nicht dargestellt). Abbildung 61a illustriert die Abwesenheit von Analytsignalen in nativer Glaskörperflüssigkeit eines repräsentativen nicht-SUX-assoziierten Todesfalls. Dotierte Glaskörperflüssigkeit (12.5 ng/ml SUX und SMC) erzielte immer Signale mit gutem Signal-Rausch-Verhältnis weit oberhalb der Nachweisgrenze (Abbildung 61b).

#### 4.9.2.2 SUX-Intoxikation

In der Glaskörperflüssigkeit des SUX-Todesfalls konnte kein SUX nachgewiesen werden, und auch Quantifier sowie Qualifier von SMC erhoben sich nicht signifikant über das Hintergrundrauschen (Abbildung 61c). Dotierte Glaskörperflüssigkeit (12.5 ng/ml SUX und SMC) derselben Quelle führte zu Signalen mit gutem Signal-Rausch-Verhältnis weit oberhalb der Nachweisgrenze (Abbildung 61d).



**Abbildung 61: Vergleichende Analyse von unbehandelter (a,c) gegenüber dotierter (je 12.5 ng/ml SUX und SMC; b,d) Glaskörperflüssigkeit einer tödlichen SUX-Intoxikation (c,d) und eines repräsentativen, nicht-SUX-assoziierten Todesfalls (a,b)**

Jeder Analyt wird durch seinen jeweiligen Quantifier und Qualifier dargestellt, wohingegen interne Standards zugunsten einer besseren Übersichtlichkeit nicht abgebildet wurden.

## 5 Diskussion

### 5.1 *Methodenoptimierung*

Die Stabilisierung der wässrigen Matrices Serum sowie Urin wurde zuerst untersucht, und ergab eine optimale Stabilisatorkonzentration von 100 ng/ml Paraoxon. Das Organophosphat wurde diesen Proben daraufhin in allen Folgeexperimenten in der ermittelten Konzentration zugesetzt.

Die sich anschließenden initialen Extraktionsversuche ergaben, dass Proteinpräzipitation, SPE mittels C<sub>1</sub>- und C<sub>18</sub>-Säulen, sowie LLE unter Einsatz von KI<sub>3</sub> zu einer nur sehr unzureichenden Extraktionsausbeute für mindestens einen der Analyten SUX und SMC führte, diese methodischen Ansätze wurden daher von der weiteren Probenentwicklung ausgeschlossen. Die SPE-Extraktion über CBA-Säulenmaterial wurde gleichsam abgelehnt, weil schon aus theoretischen Überlegungen hervorging, dass die dem Extraktionsmodus zugrunde liegenden Prinzipien, genauer die pH-abhängige Änderungen in der Retentionsfähigkeit der Matrix, mit dem für die erfolgreiche Extraktion notwendigen Dissoziationszustand des SMC-Carboxyterminus kollidieren: während das Säulenmaterial basisch äquilibriert werden muss um dissoziierte Säuregruppen für ionische Wechselwirkungen mit den quaternären Aminen bereitzustellen, so würde eine gleichsam basische Probenvorbereitung nicht nur zu einer zwitterionischen Gesamtladung des SMC und somit zu enormen Verlusten dieses Analyten während der Aufarbeitung (so auch beschrieben von Tsutsumi et al. [30]), sondern zudem noch zu einer Hydrolyse v.a. der Muttersubstanz SUX führen. Zwei Arbeiten waren erwartungsgemäß noch nicht einmal für den postulierten Verwendungszweck des SUX-Nachweises [23,35] zu reproduzieren. Da DPA in Deutschland als Sprengstoff geführt und demnach nicht (mehr) frei verkäuflich ist, war HFBA nicht zuletzt wegen seiner guten Kompatibilität mit massenspektrometrischer Detektion die Chemikalie erster Wahl für die weiteren Extraktionsversuche mittels Ionenpaarung. Ausgehend von den bereits publizierten Arbeiten zu diesem Ansatz [24,25] wurde die oben detaillierte Extraktionsmethode entwickelt und auf eine maximale Ausbeute bei ausreichender Reinheit der Extrakte hin optimiert.

Es wurde festgestellt dass die Aufarbeitung der Proben von Hand zu einer besseren Reproduzierbarkeit führte als die entsprechende Verwendung der Zymark RapidTrace

---

---

Workstation, für die weiteren Validierungsschritte sowie die Analyse der Realproben wurde demnach manuell aufgearbeitet.

## **5.2 Probenlagerung und -handhabung**

### **5.2.1 Glasadsorption**

Im Gegensatz zu SMC zeigt SUX ein stark materialabhängiges Adsorptionsverhalten: Der anfänglich starke Konzentrationsabfall von ca. 30 % ist auf Adsorptionsvorgänge zurückzuführen, danach folgt ein Signalabbau der für alle Ansätze annähernd gleich stark ausgeprägt, und vermutlich auf die Hydrolyse der Analyten in wässriger Lösung bei Raumtemperatur zurückzuführen ist. Für SMC konnte kein signifikantes Adsorptionsverhalten beobachtet werden. Diese Messdaten korrelieren insgesamt sehr gut mit den zuvor publizierten Werten, welche von einem konzentrationsabhängigen, 20 – 50 %igen SUX-Verlust in Glasgefäßen berichten [30]. Für SMC wurde von diesen Autoren zwar eine „leichte Adsorption“ an Glas festgestellt, diese konnte im vorliegenden Ansatz jedoch nicht bestätigt werden.

Es bleibt festzuhalten, dass in der SUX-Analytik auf jeden Fall sämtliche (potentiell) analythaltigen Materialien in Plastikgefäßen aufbewahrt, und auch nur solche im Rahmen der Extraktion zum Einsatz kommen sollten.

### **5.2.2 Frier-Tau-Stabilität**

Die Experimente zur Frier-Tau-Stabilität von SUX und SMC belegen, dass nur max. 10 % Analytverlust durch wiederholtes Probeneinfrieren und –auftauen befürchtet werden müssen. Obwohl also die Frier-Tau-Stabilität beider Analyten in den untersuchten Matrices nachweislich hoch ist, sollte eine derartige Probenbehandlung wenn möglich vermieden werden.

Aus den genannten Experimenten kann weiterhin die Effektivität der Paraoxon-vermittelten Analytstabilisierung abgeleitet werden: Die Tatsache, dass weder matrix-abhängige Unterschiede in der Analytstabilität noch signifikante Stabilitätsunterschiede zwischen den einzelnen Frier-Tau-Zyklen zu beobachten sind beweist, dass die Hemmung der Cholinesterasen verlässlich funktioniert; anderenfalls wäre zumindest in den (Cholinesterase-

---

enthaltenden) Serumproben und zumindest über den ersten Frier-Tau-Zyklus (d.h. vor einer möglichen Enzymzerstörung durch selbigen Prozess) eine enzymatische Degradation der Analyten nachweisbar.

### **5.3 Methodvalidierung**

Die Extraktionsmethode wurde nach den Vorgaben der Gesellschaft für toxikologische und forensische Chemie (GTFCh) validiert und folgt damit internationalen Richtlinien.

Die beschriebene Methodik erlaubt nachweislich die simultane Detektion von SUX und SMC in Serum- sowie Urinproben. Da beträchtliche Mengen einer Störsubstanz sowohl mit gleicher Retentionszeit als auch identischem Haupt-MRM wie SMC in allen untersuchten Leermatrizes gefunden wurden (s. 5.4), war es notwendig den zweit- bzw. drittstärksten Ionenübergang für die Quantifizierung und zweifelsfreie Identifikation von SMC heranzuziehen. Die so erhaltenen Selektivitätsdaten, d.h. die nachweisliche Abwesenheit von Interferenzen mit den Analytsignalen, sowie die sehr zufrieden stellenden Werte für die LOD und LOQ beweisen die Legitimität und Effektivität der Verwendung von o.g. Ionenübergang für die Quantifizierung von SMC.

Die Extraktion wurde manuell ausgeführt, wobei die vorgestellten Präzisions- und Richtigkeitsdaten die gute Reproduzierbarkeit dieser Methode eindrücklich belegen. Die beobachteten Ionensuppressionseffekte wurden der Verwendung von HFBA zugeschrieben, und im Austausch gegen eine exzellente Extraktionsausbeute sowie eine einfache und schnelle Aufarbeitungsmethodik akzeptiert. Die niedrigen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sowie die guten Kenndaten für Präzision und Richtigkeit der Methode beweisen darüber hinaus, dass diese Matrixeffekte vollständig durch die anderweitig optimierte Analytik kompensiert werden.

Aufgrund ihrer Charakteristika, insbesondere ihrer Einfachheit bei gleichzeitig hoher Sensitivität und Reproduzierbarkeit, könnte diese Methode dazu beitragen, die SUX-Analytik in mehr Routinelabors zu etablieren. Aufgrund des abgedeckten Validierungsbereiches ist die Methode zur Klärung sowohl forensischer als auch klinischer Fragestellungen einsetzbar.

---

## 5.4 SMC-Interferenz

In dieser Arbeit wurde ein eindrückliches Beispiel für Selektivitätsprobleme in der HPLC-MS/MS vorgestellt. Es wurde demonstriert, dass es für analytische Zwecke keinesfalls ausreicht nur die Retentionszeit in Verbindung mit einem einzigen MRM zur Identifikation eines Analyten heranzuziehen, da diese Kombination nicht charakteristisch für eine einzige Substanz sein muss: im vorliegenden Beispiel wurde u.a. in Serum sowie Urin eines großen Probandenkollektivs eine bisher unidentifizierte Interferenz gefunden, welche sowohl den selben MRM-Übergang als auch eine fast identische Retentionszeit im Vergleich zu SMC aufweist.

Neben den negativen Auswirkungen, die eine unkritische Interpretation derartig interferenzbelasteter Daten für die Routinearbeit bedeutet, d.h. falsch-positive Analysenergebnisse und folglich falsche Beurteilung, unterstreicht der vorliegende Fall die möglichen, weiterreichenden Auswirkungen auf die forensisch-toxikologische Forschung: die Tatsache, dass SMC kürzlich in nativen postmortalen Geweben nachgewiesen wurde – was die Frage nach der Existenz von nativem SMC aufwarf [24,25] – hätte leicht dazu verführen können, die vorläufigen Ergebnisse dieser Arbeit falsch zu interpretieren und die obige Theorie als bestätigt anzusehen. Dies wäre mit nachfolgend ausgeführten, fatalen Folgen für die forensisch-toxikologische Begutachtung verbunden gewesen:

Der Nachweis einer Normalverteilung des „nativen SMC“ im Serum hätte es zwar noch erlaubt, Erwartungswerte für die forensische Fallarbeit zu formulieren, und eine Grenzwertlösung zu verfolgen (d.h. nur wenn SMC oberhalb eines Schwellenwertes detektiert wird, dürfte von einer SUX-Beibringung ausgegangen werden), im Urin, der erwiesenermaßen besseren Matrix für einen SUX-Nachweis (s. Abschnitt 5.8.3), wäre eine solche Grenzwertlösung jedoch unmöglich: im Urin kann für das „native SMC“ keine Normalverteilung angenommen werden, und es wurden enorme Ausreisser nach oben beobachtet. Auch Kompensationsversuche mittels Referenzierung auf Kreatinin führten nicht zu einer Normalverteilung der erhaltenen Quotienten, und extreme Ausreisser waren immer noch nachweisbar. Im Falle einer Fehlinterpretation der Interferenz als natives SMC würde sich ein Einsatz von SMC als SUX-Marker aufgrund der vorliegenden Daten für Urin komplett verbieten, im Serum müssten massive Einschränkungen formuliert werden.

Die Gefahr einer derartig folgenschweren Fehlinterpretation war insbesondere deshalb gegeben, weil die berichteten SMC-Gewebekonzentrationen mit ca. 50 ng/g [24] relativ exakt mit den Mittelwerten der hier nachgewiesenen Interferenz-Konzentrationen von 55.9 ng/ml

(Serum) bzw. 38.3 – 53.4 ng/g (Gewebe) SMC-Äquivalenten übereinstimmen. Die weiterführende Entdeckung von vergleichbaren physiko-chemischen Eigenschaften, d.h. einem dem SMC vergleichbaren alkali-labilen Charakter der Interferenz, hätte uns in der Annahme von nativem SMC noch bestärkt.

Ausschließlich die Abwesenheit des für SMC charakteristischen zweit- bzw. drittstärksten Ionenübergangs bewies letztlich, dass es sich bei der erwähnten Interferenz auf keinen Fall um SMC handeln konnte. Als eine Konsequenz der in der Interferenz fehlenden Qualifier-MRMs wurden in mit SMC dotierten Proben darüber hinaus sehr inkonsistente relative Ionenintensitäten beobachtet: die Abweichungen überschritten bei Weitem die maximal erlaubten  $\pm 20\%$  für Ionenübergänge, bei denen wie in diesem Fall der nachweisschwächere MRM ( $m/z\ 204.0 \rightarrow 98.6$ ) mehr als  $50\%$  der Intensität des nachweisstärksten Übergangs ( $m/z\ 204.0 \rightarrow 144.7$ ) aufweist [60,81]. Es konnte somit exemplarisch gezeigt werden, dass die Berechnung und genaue Bewertung der relativen Ionenintensitäten ein wertvolles Werkzeug zum Nachweis von Interferenzen darstellt.

Es steht nun zwar außer Frage, dass Interferenzen dieser Art bei Ionenübergängen mit einer niedrigen und daher häufig vorkommenden Produktionsmasse zunehmend wahrscheinlich sind (e.g. Allen [62]:  $m/z\ 264.2 \rightarrow 58.2$ ), der entsprechende Umkehrschluss trifft jedoch keinesfalls zu: Die präsentierten Ergebnisse beweisen die Existenz einer endogenen MRM-Interferenz, welche mit  $m/z\ 204.0 \rightarrow 144.7$  ein vergleichsweise großes Fragmention bildet. Wie gleichsam von Gergov et al. publiziert ( $m/z\ 275.2 \rightarrow 126.0$ ), können Interferenzen also trotz relativ großer Produktionsmasse durchaus signifikant sein [61]. Es ist aus o.g. Gründen keinesfalls zulässig, das mögliche Vorhandensein von Interferenzen allein anhand der Größe der betroffenen MRM-Produktionen auszuschließen, sondern es muss vielmehr als imperativ gelten, mehr als nur einen Ionenübergang für eine zweifelsfreie Analytidentifikation zu berücksichtigen.

Obwohl die Identität der Signale ultimativ geklärt werden konnte, blieb die Quantifizierung der ko-eluierenden Substanzen zunächst problematisch: Im vorgestellten Fall erschwerte die unvollständige Trennung von Interferenz und SMC die Quantifizierung von letztgenanntem Analyten. Um eine valide Mengenbestimmung von SMC zu ermöglichen wurden verschiedene, zuvor publizierte Lösungsansätze für vergleichbare Selektivitätsprobleme evaluiert, und auf ihre Verwendbarkeit auf die vorliegende Problematik hin überprüft.

Um die Interferenzprobleme in der Detektion von Tramadol zu überwinden, schlug Allen [62] die ergänzende Detektion des Metaboliten O-Desmethyltramadol zum Nachweis der

---

---

Muttersubstanz in einer Probe vor. Dies stellt zwar ein legitimes Vorgehen für einen rein qualitativen Nachweis dar, ist aber auch als solcher nicht auf die hier beschriebene Problematik anwendbar, da SMC selbst schon einen Metaboliten von SUX darstellt, und dazu noch in die körpereigenen Substanzen Succinat und Cholin abgebaut wird: von einer Detektion der letztgenannten Analyten kann daher in keinem Fall auf die Anwesenheit von SMC oder gar SUX in der Probe geschlossen werden, der vorgestellte Lösungsansatz ist daher insbesondere für die angestrebte Quantifizierung dieser Substanzen in einem forensischen Kontext absolut ungeeignet [6,33].

Gergov et al. [61] wählten einen anderen Ansatz und erhöhten die Signalschwelle für den von der Interferenz beeinträchtigten Ionenübergang. Abgesehen von der reduzierten Aussagekraft der Ropivacain-Analyse auf ein letztendlich qualitatives Level ist auch diese Vorgehensweise nicht auf das in dieser Arbeit geschilderte Problem anwendbar: wie im obigen Ergebniskapitel vorgestellt zeigte das repräsentative Probandenkollektiv stark variierende und generell zu hohe Interferenz-Konzentrationen, als dass eine „Cut-off“-Lösung möglich wäre.

Im von Naidong et al. [63] geschilderten Fall war eine Änderung der Chromatographieeinstellungen die einzig mögliche Lösung des beschriebenen Selektivitätsproblems: der Analyt HYD wurde durch eine Fragmentation in der Ionenquelle des Massenspektrometers aus H3G gebildet, daher war eine MRM-basierte Unterscheidung von freiem HYD und dem Fragmentierungsprodukt des entsprechenden Konjugats nicht zu erreichen. Im Gegensatz hierzu handelt es sich bei der in der vorliegenden Arbeit präsentierten Interferenz nicht um ein derartiges Fragmentierungsartefakt, daher kann eine MS-basierte Lösung des Problems zwanglos weiter verfolgt werden. Der oben zitierte Lösungsansatz wurde daher verworfen, insbesondere da eine zufriedenstellende chromatographische Trennung von SMC und der im hiesigen Fall unbekanntes, jedoch offensichtlich dem SMC sehr ähnlichen Substanz, innerhalb vertretbarer Chromatographiezeiten nicht erreicht werden konnte.

Um übermäßig lange Chromatographiezeiten zu vermeiden wurde in diesem Kontext auch der Vorschlag von Allen [62] bzw. Gergov [61] abgelehnt, die co-eluierenden Störsubstanzen mittels eines sehr langsamen Gradienten zu trennen; es wurde stattdessen ein individueller Ansatz verfolgt: die Resultate beweisen die Abwesenheit von Interferenzen mit dem zweit- und drittstärksten Ionenübergang von SMC, und daher wurde die Methode mit besagten Übergängen als Quantifier bzw. Qualifier validiert. Die unvermeidbare, jedoch absolut tolerierbare Erhöhung der unteren LOD und LOQ wurde im Austausch gegen eine schnelle

---

und doch zugleich hoch selektive, quantitative Analysenmethode akzeptiert [69]. Aufgrund der so nachgewiesenen Anwendbarkeit der Methode für die Quantifizierung und zweifelsfreie Identifizierung von SMC kann die Verwendung nachweisschwächerer Fragmentationen-Übergänge als legitime Alternative zu bisher publizierten Lösungsansätzen für Selektivitätsprobleme in der HPLC-MS/MS angesehen werden.

## **5.5 SMC als SUX-Marker**

Da kürzlich Zweifel bezüglich der Eignung von SMC als SUX-Marker geäußert worden sind, war es eines der Ziele dieser Arbeit, die Signifikanz einer SMC-Detektion im forensischen Kontext zu prüfen und kritisch zu bewerten. Die erzielten Ergebnisse werden, nach Probenmaterialien getrennt, hinsichtlich dieser Fragestellung diskutiert.

### **5.5.1 Blut und Urin**

Die neuerliche Begutachtung der Analysenergebnisse für das zur Untersuchung der SMC-Interferenz getestete Probandenkollektiv ergibt, wie auch schon zuvor berichtet [24], keinen Hinweis auf eine Existenz von nativem SMC in humanem Blut. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass auch nativer Urin kein endogenes SMC enthält.

### **5.5.2 Gewebe**

Untersuchte Organe waren Leber, Niere und Hirn, die ob ihrer verhältnismäßig hohen Analytgehalte nach vorhergehender SUX-Gabe von forensischen Toxikologen bei einer entsprechenden Fragestellung bevorzugt untersucht werden. Die oben erwähnten, verhältnismäßig hohen Gehalte an SUX und SMC sind auf Resturinmengen im Nierengewebe (wobei Urin selbst ein sehr gutes Medium für die SUX-Analytik darstellt), der Metabolisierungs- und Ausscheidungstätigkeit der Leber bzw. der enormen Blutperfusion des Gehirns zurückgeführt worden [24]. Leider sind gerade diese Gewebearten bezüglich der Verlässlichkeit von SMC als SUX-Marker in die Kritik geraten: in frischem post-mortalem Leber- sowie Hirngewebe wurde ein Nachweis von SMC in Konzentrationen von 10-200 ng/g publiziert, wobei nur vereinzelte Proben negativ für diesen Analyten getestet wurden [25].

---

---

Ballard et al. [24] berichteten Konzentrationen von üblicherweise weniger als 50 ng/g SMC in frischen, postmortalen Leber- und Nierenkontrollen, wobei laut dieser Referenz Hirnproben (wie auch Blut) als SMC-frei angesehen werden können. Die vorliegende Studie beleuchtet die geschilderte Problematik mittels eines Vergleichs von frischen bzw. gefriergelagerten Kontrollgeweben mit korrespondierenden Proben einer tödlichen SUX-Intoxikation. Obwohl die Methodik nicht für die getesteten Matrices validiert wurde, so ergaben die individuell durchgeführten Standardadditionsexperimente sowohl für SUX als auch SMC eine Nachweisgrenze von konstant weit weniger als 25 ng/g in Geweben bzw. 12.5 ng/ml in Glaskörperflüssigkeit: exemplarische Chromatogramme beweisen, dass bei den o.g. Konzentrationen sowohl Quantifier- als auch Qualifierübergänge für beide Substanzen das kritische Signal-Rausch-Verhältnis für einen verlässliche Analytnachweis sowie seine Quantifizierung weit übersteigen. Obwohl somit nachgewiesen wurde, dass die verwendete Methode eine für den angestrebten Verwendungszweck ausreichende Sensitivität besitzt, so wurde generell kein natives SMC in frischen Gewebekontrollen nachgewiesen – ein Resultat, welches in klarem Kontrast zu Literaturberichten steht [24,25]. Auch die Mehrheit der archivierten Kontrollgewebe war nachweislich SMC-negativ, allerdings konnte die Möglichkeit einer artefaktischen SMC-Bildung in langzeitgelagertem Lebergewebe nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte in 3 von 4 Kontrollleichen im Stadium fortgeschrittener Verwesung eine Anwesenheit von SMC in der Leber, sowie in einem der genannten Fälle auch in Niere und Gehirn, bestätigt werden. Sowohl für die lagerungs- als auch für die fäulnisbedingten SMC-Artefakte kann am ehesten ein mikrobieller Ursprung angenommen werden. In vergleichbaren Fällen, d.h. Fällen die sich auf stark verwesene oder lang gelagerte Proben beziehen, muss eine SUX-Diagnostik daher stets mit höchster Vorsicht gestellt werden.

Abgesehen von echtem SMC in langzeitgelagerten Proben oder Faulleichen enthielten alle analysierten Gewebeproben beträchtliche Mengen der schon zuvor beschriebenen (s. Abschnitt 5.4; [80]) Interferenz mit dem Haupt-MRM von SMC ( $m/z$  204.0  $\rightarrow$  144.7), was zu falsch-positiven Nachweisen für diesen Metaboliten, genauer zu einer Detektion von bis zu 165 ng/g SMC in Geweben hätte führen können. Interferenzkonzentrationen lagen im Mittel bei 38.3, 52.4 bzw. 53.4 ng/g SMC-Äq. für Leber-, Hirn- und Nierengewebe. Diese Konzentrationsbereiche sind nahezu deckungsgleich mit Literaturwerten für den angeblich endogenen SMC-Gehalt [24,25], weshalb eine Fehlinterpretation der MS/MS-Daten bezüglich dieses Ionenübergangs in vorhergehenden Arbeiten möglich scheint. Diese Vermutung wird

---

dadurch unterstützt, dass für das ‚endogene SMC‘ auffällig variable relative Ionenintensitäten des Haupt- ( $m/z$  204  $\rightarrow$  145) in Relation zu den zwei untergeordneten MRMs ( $m/z$  204  $\rightarrow$  99;  $m/z$  204  $\rightarrow$  101) berichtet wurden, wobei letztere untereinander dagegen sehr reproduzierbare Abundanzen aufwiesen [24]: gerade diese Befunde haben zur Entdeckung der SMC-Interferenz (s. Abschnitt 5.4; [80]) geführt, und lassen eine Fehlinterpretation von MRM-Daten durch die Autoren vorangegangener Arbeiten vermuten.

Obwohl die vorgestellten Ergebnisse SMC also weitgehend als wertvollen Marker für eine SUX-Gabe rehabilitieren, so unterstreichen sie doch gleichzeitig ein essentielles Problem der SUX-Analytik, d.h. die ausgeprägte Instabilität beider Zielanalyten in biologischen Matrices: in keiner der untersuchten Gewebeproben des SUX-Todesfalls gelang ein verlässlicher Nachweis von SUX oder SMC. Diese Resultate korrelieren mit den ebenfalls negativen Analysenbefunden für das Blut dieses Verstorbenen (s. Abschnitt 5.10; [69]); die Zeitspanne zwischen SUX-Einleitung und Probennahme sowie -stabilisierung war also offenbar größer als die annehmbare Stabilität beider Analyten in den jeweiligen Matrices.

### **5.5.3 Glaskörperflüssigkeit als alternatives Probenmaterial**

Da Glaskörperflüssigkeit im Vergleich zu Geweben als potentiell bessere Zielmatrix erschien [18] wurde sie in die Studie eingeschlossen. Analog zu den anderen untersuchten Geweben war auch Glaskörperflüssigkeit häufig mit einer SMC-Interferenz in Konzentrationen von (0-) 2-93 ng/ml SMC Äq. belastet, war jedoch ebenfalls nachweislich frei von nativem SMC. Obwohl mittels Standardadditionsverfahren auch für diese Matrix eine dem Zweck angemessene Sensitivität der Analytik nachweisbar war, so konnte auch in der Glaskörperflüssigkeit des SUX-Todesfalls weder SUX noch SMC detektiert werden. Die Analytdegradation in der Glaskörperflüssigkeit scheint also, ähnlich wie in Blut bzw. Serum sowie Geweben, schneller fortzuschreiten als normalerweise eine Probennahme und -stabilisierung möglich ist. Abgesehen von derartigen Stabilitätsproblemen könnte auch eine zu langsame oder zu geringe Inkorporation der Analyten in die Glaskörperflüssigkeit – z.B. resultierend aus einer durch den Tod und folgenden Kreislaufzusammenbruch verkürzten Distributionsphase von SUX bzw. SMC [20] – als zusätzliche Erklärung für den nicht geglückten Analyt-Nachweis in dieser Matrix dienen. Der Analyttransfer in die Glaskörperflüssigkeit könnte daher bei überlebten Vergiftungen ausgeprägter sein, bedingt

---

---

durch die hohe Invasivität einer Probennahme kann derartiges Probenmaterial in solchen Fällen jedoch nicht zur Analyse gewonnen werden.

Da SMC somit weitgehend als SUX-Marker rehabilitiert werden konnte, lohnte die anschließende Durchführung einer kinetische Studie, um die forensisch relevanten Nachweisfenster insbesondere für den Metaboliten definieren und in der Fallarbeit etablieren zu können.

## 5.6 Voruntersuchungen

Vor Beginn der Probandenstudie wurde eine neuerliche Optimierung der Stabilisatorkonzentration für die Matrix Vollblut unter mit der Studie vergleichbaren Bedingungen (frisches EDTA-Vollblut, 37°C) durchgeführt.

Es ergaben sich insgesamt mit Serum vergleichbare Daten: für SUX in Vollblut wird ebenfalls bei 100 ng/ml Paraoxon der maximal stabilisierende Effekt erzielt, SMC war dagegen im Vollblut nicht stabilisierbar. Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass der SMC-Abbau *in vitro* über 60 min, d.h. weit über die voraussichtliche Dauer der Probenvorbereitung während der Studie hinaus, vernachlässigbar ist.

Die ermittelte, optimale Stabilisatorkonzentration von 100 ng/ml Paraoxon wurde für alle stabilisierten Probenserien eingesetzt, ein *in vitro*-Analytverlust kann somit weitgehend ausgeschlossen werden. Der valide Einsatz von EDTA-Monovetten für die Extraktion der Studienproben wurde in Vorversuchen geprüft und bestätigt.

Die im Rahmen der vorliegenden Studie erhobenen Werte bilden aus allen o.g. Gründen mit größtmöglicher Sicherheit die realen *in vivo*-Bedingungen zum Zeitpunkt der Probennahme ab.

## 5.7 Studiendesign

Für die vorliegende Arbeit wurde ein bezüglich Geschlecht, Gewicht, Alter, Begleiterkrankungen etc. möglichst heterogenes Kollektiv von Probanden rekrutiert, um eine Vielzahl möglicherweise forensisch relevanter Eigenschaften einzubinden. In diesem Zusammenhang waren z.B. auch adipöse, alte, kranke und unterschiedlich medikamentös behandelte Patienten interessant, um eine möglichst große Bandbreite an Konditionen abzudecken.

---

Da beide Zielanalyten von ubiquitären Esterasen (BChE, AChE) und nicht etwa hepatisch abgebaut werden, dürfte sowohl eine Co-Medikation als auch die Mehrzahl der dokumentierten Vorerkrankungen für die vorliegende Studie irrelevant sein.

Es könnte mit der selben Argumentation angenommen werden, dass auch Lebererkrankungen als Einflussfaktor zu vernachlässigen wären, die Leber ist allerdings an der Synthese der BChE beteiligt [79,82], daher sind je nach hepatischer Aktivität und Gesundheit Unterschiede in der Konzentration dieses Enzyms im Körper möglich. Ein verlängerter, SUX-bedingter neuromuskulärer Block als Zeichen eines manifesten BChE-Mangels ist in diesem Zusammenhang denkbar, wurde jedoch in keinem Fall beobachtet. Um eventuell auf den hepatischen Status der Probanden zurückgehende, interindividuelle Unterschiede abbilden zu können, wurden sowohl Patienten mit anamnestisch gesunder Leber, als auch solche mit primär hepatischen Erkrankungen und OP-Indikationen explizit in die Studie eingeschlossen.

In allen Fällen fand im Laufe der Operation des jeweiligen Probanden eine Volumensubstitution mittels Infusion von Ringer-Lactat-Lösung statt, 9 Probanden wurde darüber hinaus Gelafundin®, eine 4 %-ige Gelatine-Polysuccinat-Lösung, zur intravasalen Volumensubstitution verabreicht. Der potentielle Einfluss einer derartigen Volumensubstitution auf die Datenerhebung wurde im Vorfeld erwogen, und als unkritisch eingestuft: es ist zu erwarten, dass das Ringer-Laktat sofort ins Gewebe diffundiert, und die Blut-/Plasmakonzentrationen der Zielanalyten wenn überhaupt dann nur unwesentlich beeinflusst werden. Gelafundin® verteilt sich zwar langsamer im Körper, der Verdünnungseffekt erscheint jedoch bezogen auf das Gesamt-Blutvolumen vernachlässigbar. Unabhängig von diesen Überlegungen ist zu beachten, dass der Studieneinschluss von volumensubstituierten Probanden unumgänglich war, da aufgrund der Restriktionen des Ethik-Votums nur größere chirurgische Eingriffe – mit folglich meist notwendiger, derartiger Kreislaufstabilisierung – für die Studie in Frage kamen.

Im Gegensatz zur reinen Volumensubstitution durch Ringer-Lactat o.ä. wurde die Infusion von Blutprodukten als definitives Ausschlusskriterium formuliert: das Einbringen von Fremdblut bzw. -blutbestandteilen stellt ein Ausschlusskriterium für die vorliegende Studie dar, da eine über den Zeitverlauf uneinheitliche qualitative bzw. quantitative Ausstattung mit Serum- oder auch membranständigen (z.B. erythrozytären) Esterasen (s. Abschnitt 5.9.1) die individuellen kinetischen Parameter der Zielsubstanzen verfälschen könnte.

---

---

## 5.8 *In vivo*-Stabilität und Nachweisfenster

### 5.8.1 SUX im Plasma

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass SUX üblicherweise nur bis ca. 10 min nach Einleitung im Plasma oberhalb der Nachweisgrenze der verwendeten Analysenmethode nachweisbar ist. In einem Fall gelang noch 65 min nach Einleitung ein eindeutiger SUX-Nachweis im untersuchten Plasma.

Eine pharmakokinetische Auswertung der stabilisierten Probenreihen war aufgrund der zeitlich teils zu weit auseinanderliegenden Blutabnahmen nicht möglich, aufgrund bestehender Vorarbeiten zu diesem Thema [3-5,11,17] aber auch nicht vordringliches Ziel dieser Arbeit. Die oben resümierten Eckdaten der vorliegenden Probandenstudie zeigen allerdings eine generell gute Übereinstimmung mit bereits publizierten Daten zur terminalen Halbwertszeit bzw. zur Nachweisbarkeit von SUX, die im Folgenden vergleichend diskutiert werden sollen.

Die Geschwindigkeit, mit der eine Substanz aus dem Blutstrom verschwindet, ist abhängig von Abbauprozessen, Distributionsprozessen, dem Grad der Plasmaproteinbindung sowie der renalen Ausscheidung. Die beiden letzteren Effekte können bei SUX innerhalb der ersten Minuten vernachlässigt werden [14,27] daher ist der Fokus auf die Hydrolyse und Verteilung der Substanz zu legen.

Hoshi et al. [17] ermittelten 1993 eine Ein-Kompartiment-Kinetik mit einer mittleren Eliminationshalbwertszeit von 16.6 s für SUX, wobei der Analyt bereits nach 150 s nicht mehr nachweisbar war. Mit 25.4 s sind die später von Kato et al. ermittelten Werte vergleichbar kurz [3]. Die nur sehr kurze Nachweisbarkeit von SUX in diesen Studien liegt vermutlich in der verhältnismäßig unsensitiven HPLC-Methode begründet, welche jeweils zur Quantifizierung verwendet wurde. Es ist in diesem Zusammenhang denkbar, dass auf Grund des in beiden Studien nur sehr kurzen Beobachtungszeitraums (5 min) die meßbaren Konzentrationen und daraus errechneten kinetischen Konstanten nur die Distributions-, nicht jedoch die Eliminationsphase für SUX erfassen, die präsentierten Ergebnisse sind daher nur unter Vorbehalt als realistisches Abbild der *in vivo*-Abbauvorgänge zu interpretieren.

Lagerwerf et al. [5] berichten im klaren Gegensatz dazu von einem triphasischen SUX-Abbau mit Halbwertszeiten von 0.4, 1.2 und 8 min Insbesondere die sehr lange, terminale Eliminationshalbwertszeit von 8 min, sowie die berichtete Nachweisbarkeit von fast 200

---

ng/ml SUX noch 15 min nach Gabe (2 mg/kg, n = 1) ist verwunderlich. Aufgrund der dokumentierten Methodik scheinen jedoch auch in diesem Fall Zweifel an der Validität des kinetischen Modells und seiner Übertragbarkeit auf *in vivo*-Bedingungen berechtigt: die Verwendung einer (nicht-extrahierten) Standardkalibrierung ist bei – wie in der zitierten Arbeit – nicht erfolgtem Nachweis ihrer Übereinstimmung mit einer extrahierten Kalibrierung durchaus kritisch zu bewerten. Ähnliches gilt für den mangelnden Nachweis der Selektivität der gewählten HPLC-Methode mit Fluoreszenzdetektion: da nicht nachvollziehbar auf Interferenzen (insbesondere SMC) untersucht und die Ergebnisse dokumentiert wurden, kann an dieser Stelle nicht ausgeschlossen werden, dass z.B. der Metabolit als chemisch verwandte Komponente die Erfassung der Muttersubstanz in Richtung falsch-positiver bzw. fälschlich erhöhter Werte beeinflusst hat.

Mittels anderer Methodik und/oder weiterentwickelter Verfahren wurden in der Folge anhand von Probandenstudien bzw. *in vitro*-Experimenten nahezu gleiche Eliminationshalbwertszeiten von 41 s [2] bzw. 47.4 s [3] für SUX ermittelt, wobei diese Werte mit berichteten *in vivo*-Nachweisfenstern von ca. 7 min (1 mg/kg Dosis, Nachweisgrenze: 25 ng/ml [2]) korreliert waren. Eine pharmakodynamische Patientenstudie ermittelte darüber hinaus eine Effekt-Kompartiment-Halbwertszeit von 47 s [11]. Die vorliegende Arbeit fügt sich bezüglich der Nachweisdauer von SUX sehr gut in die vorgenannten Ergebnisse ein, aufgrund der erzielten Absenkung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen im Vergleich zu Roy et al. [2,4] konnte das Nachweisfenster allerdings, wenngleich nur marginal, erweitert werden. Es kann in der kritischen Gesamtschau aller bisheriger Arbeiten davon ausgegangen werden, dass auch mit einer optimierten, hochspezifischen Methode ein Nachweis von SUX üblicherweise nicht jenseits von 10 min nach seiner Applikation im Blut bzw. Plasma geführt werden kann.

Der einzelne Fall eines positiven SUX-Befundes im Blut, welcher noch 65 min nach Einleitung erhoben wurden, erscheint in diesem Zusammenhang zunächst verwunderlich. Neben der bisher diskutierten Instabilität und damit begründeten Elimination von SUX spielt jedoch auch noch seine Verteilung im Körper eine wichtige Rolle in der Pharmakokinetik dieser Substanz. Für SUX ist im Rahmen eines Zwei-Kompartiment-Modells [4] eine extensive Umverteilung beschrieben worden, welche neben dem enzymatischen Abbau als dominierender Faktor für den initialen Konzentrationsabfall im Blut gewertet werden kann [3,17,27].

---

Das Ausmaß dieser Distribution ist allerdings schwierig zu berechnen, da sowohl im zentralen Verteilungsraum als auch in den peripheren Kompartimenten sofort nach SUX-Einleitung ein Analytabbau stattfindet bzw. wahrscheinlich ist, welcher eine Unterschätzung des Verteilungsvolumens möglich macht [4]. Werte für das Verteilungsvolumen unter Gleichgewichtsbedingungen variieren daher, teils auch abhängig vom verwendeten kinetischen Modell, zwischen 2.2 [3], 16.4 [17] und 39 ml/kg [4]. Auch in diesem Fall ist sicher zu beachten, dass die älteren Arbeiten aufgrund weniger sensitiver Assays die *in vivo*-Bedingungen vermutlich nicht korrekt abbilden, am plausibelsten erscheint daher die Auswertung von Roy et al. [4], die anhand der von ihnen präsentierten Daten eine Verteilung von SUX zumindest im kompletten Intravasalraum postulieren können. Mit einem mittleren Verteilungsvolumen von 39 ml/kg kann dieses Postulat allerdings nur unter der Annahme einer ausschließlichen Verteilung im Plasmavolumen aufrecht erhalten werden, wobei ein solches Distributionsmuster zwar aufgrund seines bis-quaternären Charakters für SUX angenommen werden kann, aber bislang noch nicht bewiesen wurde. Durch eine systematische Untersuchung der *in vitro*-Distribution von SUX im Vollblut schließt die vorliegende Arbeit diese Lücke, wobei die Ausführungen von Roy et al. [4] bestätigt werden konnten: gemäß den Erwartungen für eine hochpolare Verbindung überwand SUX Membranen nicht, sondern nahm konzentrationsunabhängig einen Verteilungsraum entsprechend dem zellfreien Anteil des Blutes, eben dem Plasmavolumen, ein.

Eine vergleichsweise langsame Rückverteilung aus peripheren Kompartimenten [19,20], insbesondere wenn man eine relative Armut an unspezifischen Esterasen in diesen Kompartimenten annimmt [19], kann schließlich zwanglos als Erklärung für den im Rahmen dieser Studie gelungenen SUX-Nachweis in einer lang nach SUX-Einleitung entnommenen Blutprobe dienen.

### 5.8.2 SMC im Plasma

Auch für SMC sollen Prozesse wie Distribution, Abbau und Elimination mit ihrer forensischen Relevanz diskutiert werden, wobei die humane Pharmakokinetik von SMC im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals systematisch *in vivo* untersucht wurde.

Für den Zeitpunkt  $T_{\max} = 0.5 \pm 0.4$  min nach SUX-Injektion wurden SMC-Peakplasmakonzentrationen von  $26.2 \pm 12.4$  µg/ml modelliert. Eine Blutabnahme in dieser

Phase einer SUX-Intoxikation ist in einem forensischen Kontext höchst unwahrscheinlich, zur Formulierung realistischer Erwartungswerte für die Fallarbeit muss daher der weitere Konzentrationsverlauf von SMC im Blut verfolgt werden.

Die durchgeführte Probandenstudie ergab für den SUX-Hauptmetaboliten ein triphasisches Konzentrations-Zeit-Profil mit Plasma-Halbwertszeiten  $t_{1/2\alpha}$  von  $0.5 \pm 0.6$  min,  $t_{1/2\beta}$  von  $8.5 \pm 6.8$  min sowie  $t_{1/2\gamma}$  von  $103 \pm 34$  min.

Für den zentralen Verteilungsraum wurde ein apparentes Volumen von  $3.3 \pm 2.4$  l ermittelt, wobei eine erste Umverteilung in das periphere Kompartiment (3) mit einem apparenten Volumen von  $6.5 \pm 2.4$  l sehr schnell ( $k_{13} = 2.2 \pm 2.2 \text{ min}^{-1}$ ) stattfindet. Das errechnete Volumen des zentralen Kompartiments korreliert mit dem Plasmavolumen eines Erwachsenen, das Kompartimentvolumen  $V_3$  kann mit einem Erschließen des gesamten Intravasalraumes und beginnender extravasaler Verteilung in Einklang gebracht werden. Diese Deutung ist auch im Hinblick auf die *in vitro*-Distribution von SMC plausibel: Für die *in vitro*-Distribution von SMC im Vollblut wurde ein um mehrere Prozentpunkte größeres Verteilungsvolumen als für SUX festgestellt. Während SUX konzentrationsunabhängig einen Verteilungsraum entsprechend dem Plasmavolumen einnahm, muss für SMC dagegen auch eine intrazelluläre Distribution angenommen werden: insbesondere bei niedrigen SMC-Konzentrationen (im Versuch 37.5 ng/ml) war die Differenz zwischen Vollblutvolumen und Verteilungsvolumen von SMC signifikant kleiner als der Hämatokrit, der Metabolit scheint also die Hüllmembranen der Blutzellen zu überwinden. Dies ist aufgrund der immerhin noch monoquaternären Struktur der Substanz zwar mittels passiver Diffusion unwahrscheinlich, aktive Transportmechanismen sind jedoch denkbar, und zumindest im Rahmen der renalen Elimination für den proximalen Tubulus bereits postuliert worden [37]. Die Beteiligung eines aktiven Transportprozesses könnte ebenfalls erklären, dass die intrazelluläre Distribution von SMC zeitabhängig, und somit im sehr kurz angelegten Distributionsexperiment nur im Ansatz sichtbar ist. Ebenfalls kommt die Beteiligung eines  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Transporters in Frage, der im EDTA-Blut gehemmt vorliegen, und Transportvorgänge somit nur eingeschränkt ausführen könnte.

Die weitere Verteilung von SMC findet langsamer statt ( $k_{14} = 0.27 \pm 0.19 \text{ min}^{-1}$ ) und führt zur Erschließung des Kompartiments (4) mit dem apparenten Volumen von  $13.8 \pm 4.8$  l. Im Gleichgewichtszustand nimmt SMC ein apparentes Verteilungsvolumen von  $V_{ss} = 24.4 \pm 7.7$  l ein.

---

Es ist an dieser Stelle darauf hinzuweisen, dass den Probanden in der vorliegenden Studie nicht etwa SMC selbst verabreicht werden konnte, sondern vielmehr die Ausgangssubstanz SUX injiziert wurde. Die pharmakokinetischen Berechnungen für SMC mussten daher unter verschiedenen, vorformulierten Annahmen durchgeführt werden, woraus sich wiederum konzeptuelle Grenzen des Modells ergeben: die Arbeitshypothesen sehen vor, dass die gesamte SUX-Dosis über SMC abgebaut wird, und sich dieser Vorgang derartig schnell vollzieht, dass der Metabolit ähnlich den Verhältnissen bei einer Bolus-Injektion von SMC selbst im Körper anflutet. Eliminationsvorgänge werden nur für das zentrale Kompartiment angenommen. Diese Annahmen waren unumgänglich, um eine übermäßige Flexibilität des Modells zu vermeiden, und scheinen im Hinblick auf die vorhandenen Daten zum SUX bzw. SMC-Abbau durchaus haltbar: Foldes et al. berichten, dass mit max. 3 % der Ausgangsdosis nur insignifikante Mengen von SUX unverändert in den Urin ausgeschieden werden [8,34], ein extensiver, hydrolytischer Abbau über SMC ist somit plausibel. Die Metabolisierung von SUX kann darüber hinaus als äußerst rapide angenommen werden, da sich sowohl eine sehr schnelle *in vitro*-Degradation von SUX, als auch eine *in vivo* stark begrenzte Wirkdauer dieser Substanz nachweisen lässt. Eine entsprechende Auswertung des nutzerdefinierten Ansatzes (genauer: des Sub-Modells 1) ist ebenfalls im Einklang mit einem extrem schnellen SUX-Abbau (nicht dargestellt). Alle bislang publizierten *in vivo*-Studien zur SUX-Kinetik untermauern diese Beobachtungen zusätzlich [3-5,17].

Vergleichsweise größere Schwierigkeiten ergaben sich beim sinnvollen Modellieren der Eliminationsvorgänge: es ist unbestritten, dass es sowohl bei SUX als auch SMC Hinweise auf eine periphere Elimination (z.B. eine nachweisliche Instabilität dieser Substanzen in Geweben [24], s. auch Abschnitt 5.5.2) gibt, das Ausmaß dieser Elimination ist jedoch völlig unbekannt. Für SMC konnte darüber hinaus im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass noch nicht einmal das Ausmaß und die Effektoren seiner Degradation im Vollblut, ergo dem zentralen Kompartiment, als vollständig aufgeklärt gelten können (s. Abschnitt 5.9.1), sondern dass die Pharmakologie von SMC vielmehr nur ansatzweise bekannt scheint.

Aus Mangel an belastungsfähigem Datenmaterial modellierten daher Roy et al. [4] ihre SUX-Kinetik zunächst auch unter der Annahme einer ausschließlich zentralen Eliminierung, zeigten jedoch schließlich vergleichend, dass ein Modell mit zusätzlich peripherem Abbau zu einer annähernden Verdopplung der apparenten Verteilungsvolumina führt. Auch ein in der zitierten Arbeit diskutierter, schneller Abbau der Zielsubstanzen kann nachvollziehbar eine Unterschätzung des Verteilungsvolumens begünstigen.

---

Übertragen auf die vorliegende Arbeit bedeutet dies, dass auch für SMC am ehesten größere als die ermittelten Verteilungsvolumina angenommen werden müssen: wie SUX ist auch SMC instabil und wird mit großer Wahrscheinlichkeit ebenfalls peripher eliminiert, daher ist ein Unterschätzen des wahren Verteilungsraumes sehr wahrscheinlich. Kann momentan aufgrund der Datenlage nur ein Volumen ungefähr entsprechend dem Extrazellulärraum als Verteilungsraum für SMC bewiesen werden ( $24.4 \pm 7.7$  l), so sprechen doch alle Hinweise – darunter auch seine nachweisliche Überwindung von Membranen in den *in vitro*-Versuchen – für eine weiträumigere Verteilung des Metaboliten. Eine Distribution im Gesamtkörperwasser erscheint in diesem Zusammenhang plausibel.

Ein im Vergleich zu SUX erheblich größeres Verteilungsvolumen ist trotz aller Unwägbarkeiten zweifelsfrei bestätigt, und kann als günstiger für einen Substanznachweis im forensisch-toxikologischen Kontext gewertet werden.

Nicht nur das Verteilungsvolumen, sondern auch die Geschwindigkeiten, mit denen Umverteilungsprozesse stattfinden, können forensische Relevanz erlangen: ein Vergleich der in dieser Studie erhobenen Distributionsgeschwindigkeitskonstanten mit entsprechenden Literaturwerten von Roy et al. [4] zeigt, dass die oben beschriebenen Verteilungsprozesse, wie schon von Dal Santo 1968 anhand von Tierversuchen postuliert [27], für SMC ( $k_{13} = 2.2 \pm 2.2 \text{ min}^{-1}$ ;  $k_{14} = 0.27 \pm 0.19 \text{ min}^{-1}$ ) im Mittel langsamer ablaufen als für SUX ( $k_{12} = 2.9 \pm 3.9 \text{ min}^{-1}$ ). Mit Distributionsgeschwindigkeitskonstanten  $k_{31}$  von  $1.0 \pm 1.4 \text{ min}^{-1}$  bzw.  $k_{41}$  von  $0.11 \pm 0.16 \text{ min}^{-1}$  verläuft die Rückverteilung von SMC aus der Peripherie in das zentrale Kompartiment im Mittel langsamer als seine Distribution in diese Kompartimente.

Insbesondere unter der Annahme von relativ Esterase-armen oder -inaktiven peripheren Kompartimenten [19] kann dies die im Vergleich zu SUX erheblich geringere Clearance ( $CL_{SMC} = 194 \pm 61 \text{ ml/min}$ ;  $CL_{SUX} = 37 \pm 9 \text{ ml/min} \times \text{kg}$ , [4]) sowie stark verlängerte terminale HWZ ( $t_{1/2\gamma SMC} = 103 \pm 34 \text{ min}$ ;  $t_{1/2\beta SUX} = 41 \text{ s}$ , [4]) von SMC erklären.

Die verhältnismäßig ausgedehnte Nachweisbarkeit von SMC ( $MRT = 132 \pm 47 \text{ min}$ ) ist von größter Bedeutung für die forensisch-toxikologische Arbeit, da sie SMC als einzig sinnvollen weil ausreichend lang nachweisbaren Marker für eine SUX-Beibringung bestätigt.

Es ist nachvollziehbar, dass die MRT und terminale HWZ als forensisch wichtigste Parameter weitestgehend modellunabhängig sind, und somit nicht von den bereits diskutierten Grenzen des 3-kompartimentellen Modells beeinflusst werden. Es konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass die im Vergleich zu SUX stark verlängerte Nachweisbarkeit auch vom

---

---

benutzerdefinierten Ansatz bestätigt wird, und die Werte für die Eliminations-HWZ sowie die MRT somit als doppelt abgesichert gelten können.

Aus den Daten zur Nachweisbarkeit und den Konzentrations-Zeit-Verläufen für SMC können für die forensisch-toxikologische Fallarbeit nützliche Erwartungswerte abgeleitet werden: nach Applikation einer therapeutischen SUX-Dosis sind bis 1 h nach Exposition Konzentrationen von mindestens 1 µg/ml für den Metaboliten zu erwarten, 6 Stunden nach Verabreichung werden noch SMC-Konzentrationen von 0.1 – 1 µg/ml erreicht.

Die beobachteten interindividuellen Unterschiede in der Pharmakokinetik von SMC – z.B. Schwankungen in der höchst relevanten, terminalen HWZ von 66 – 195 min und damit einhergehend Unterschiede in den erwartbaren Konzentrationen bei späteren Blutabnahmen – könnten in einer bereits von Foldes et al. postulierten [34], unterschiedlichen Enzymausstattungen der Probanden bezüglich der BChE oder auch anderer Esterasen bzw. Faktoren im Blut begründet sein, eine Bestätigung oder Entkräftung dieser Hypothese blieb bislang aus. Abschnitt 5.9.1 der vorliegenden Arbeit wird noch genauer auf diesen Themenkomplex eingehen.

Es konnten in diesem Kontext allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen den kinetischen Profilen von Männern und Frauen, bzw. zwischen denen von Probanden mit dokumentierten Lebererkrankungen gegenüber Probanden mit anamnestisch gesunder Leber nachgewiesen werden. Die von Sawyer und Everett für das Tiermodell (Ratte) publizierten, geschlechts- bzw. krankheitsspezifischen Unterschiede in der BChE-Ausstattung konnten somit anhand des untersuchten Probandenkollektivs nicht als forensisch relevant für den Menschen bestätigt werden [79]. Auch eine Gewichtsabhängigkeit war nicht nachzuweisen.

Im Gegensatz dazu hatte das Alter der Probanden einen zwar eher schwachen, aber statistisch nachweisbaren Einfluss auf den Abbau und die Elimination von SMC: zwischen Alter und terminaler Halbwertszeit sowie MRT konnte eine positive Beziehung etabliert werden, wogegen Probandenalter und Clearance negativ korreliert waren. Obwohl die errechneten Rangkorrelationsfaktoren insgesamt klein waren ( $\rho \leq 0.54$ ) und eine forensische Relevanz daher eher fragwürdig ist, so könnte doch das Zeitfenster für eine mögliche SMC-Detektion in älteren Menschen verlängert sein.

Eine relevante Beeinflussung der Messwerte durch den Versuchsaufbau und daraus resultierende Beeinflussungen der individuell ermittelten, kinetischen Parameter waren in

---

diesem Zusammenhang nicht nachweisbar. Es kann insgesamt davon ausgegangen werden, dass die Ausschlusskriterien für den Zweck der Studie sowohl ausreichend offen als auch genügend restriktiv formuliert wurden, um forensisch relevante interindividuelle Unterschiede optimal abbilden zu können.

### **5.8.3 SUX und SMC im Urin**

Ein eindeutiger Nachweis der Analyten im Urin erfordert eine unveränderte Ausscheidung von SUX bzw. SMC, welcher für beide Analyten beschrieben ist [8,34].

Insgesamt sind nur wenige Daten bezüglich der renalen Ausscheidung von SUX sowie insbesondere SMC verfügbar, wobei im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Matrix Urin erstmals systematisch auf ihre forensische Eignung für den Nachweis einer SUX-Gabe hin untersucht wurde.

Dal Santo untersuchte 1968 [27] anhand eines Tiermodells (Hund) die Distribution von  $^{14}\text{C}$ -SUX und  $^{14}\text{C}$ -SMC, und wies eine im Vergleich zu SUX geringere Plasmaproteinbindung mit dadurch vermehrter renaler Elimination von SMC nach. Letzterer Befund konnte von Foldes et al. auch für den Menschen bestätigt werden: während stets weniger als 3 % einer verabreichten SUX-Dosis unverändert ausgeschieden werden, gelangen nach Injektion von SMC dagegen 3.8 – 22.9 % unverändert in den Urin [8,34]. Die beobachteten extremen Schwankungen in der urinären Elimination vom SMC führten die Autoren wie bereits angemerkt auf eine interindividuell verschiedene Metabolisierung im Blut, z.B. durch unterschiedliche Enzymausstattung, zurück [34].

Es ist für die weiterführende Diskussion zu beachten, dass die o.g. Vorarbeiten die Elimination unter pharmakologischen Gesichtspunkten untersucht haben, und so z.B. die absolute Ausscheidung von SUX bzw. SMC in Prozent der jeweils verabreichten Dosis bestimmt haben. Die Daten der vorliegenden Arbeit wurden dagegen wie bereits oben erwähnt unter einer forensischen Fragestellung erhoben, aufgrund des somit konzentrationsbasierten Ansatzes ist eine uneingeschränkte Vergleichbarkeit mit den obigen Literaturwerten daher nicht gegeben.

Die vorliegende Studie wies für unterschiedliche Probanden sehr differente SUX- bzw. SMC-Urinkonzentrationen nach, wobei Analytkonzentrationen zeitlich äquivalenter Proben sich um einen Faktor von ca. 100 unterscheiden konnten.

---

---

Die festgestellte, sehr große Varianz der Urinkonzentrationen für SUX und SMC, kann zwar mit der von Foldes et al. diskutierten, unterschiedlichen enzymatischer Metabolisierung von SMC im Blut durchaus in Einklang gebracht werden [8,34], aber eine Vielzahl weiterer Einflussfaktoren ist darüber hinaus denkbar: urinäre Analytkonzentrationen sind neben einem Substanzabbau im Blut v.a. noch abhängig von der Nierenfunktion, darunter z.B. von der Filtrationsrate, dem Ausmaß von Sekretion und/oder Rückresorption, der Diurese und ggf. sogar von einer zu esterase-aktivem Urin führende Enzymdurchlässigkeit [15].

Aufgrund der Komplexität und enormen Varianz dieser Vorgänge – und somit einer meist äußerst begrenzten Korrelation von Blut- und Urinparametern – ist eine Rückrechnung von Urin- auf Serumkonzentrationen in der forensischen Toxikologie daher generell nicht statthaft.

Insbesondere aus diesen Zusammenhängen bezieht die vorliegende Studie ihre besondere forensische Bedeutung: die anhand eines vergleichsweise großen Probandenkollektivs erhobenen Daten erlauben erstmals eine Plausibilitätskontrolle urinärer SUX- und SMC-Konzentrationen für verschiedenste Szenarien der toxikologischen Fallarbeit. Die Implikationen für die Begutachtung überlebter sowie tödlich verlaufener SUX-Intoxikationen sollen in der Folge dargestellt werden:

Im Fall von überlebten SUX-Intoxikationen können, aufgrund eines sich oft erst langsam entwickelndem Verdachts, bis zur Entnahme der später zu analysierenden Urinprobe teils sogar mehrere Blasenentleerungen erfolgen. Für dieses Szenario berichtete bisher nur eine Gruppe [15] einen nach einmaliger (durch Inkontinenz erfolgter) Blasenentleerung nicht mehr möglichen Nachweis von Succinylcholin; auf SMC wurde in der zitierten Arbeit nicht untersucht. Die zeitlichen Zusammenhänge zwischen SUX-Gabe, Blasenentleerung und Entnahme der letztlich vermessenen Urinprobe sind für diesen Fall leider nicht nachvollziehbar.

Anhand der vorliegenden Studie kann nun konkretisiert werden, dass trotz ggf. mehrerer zwischenzeitlicher Blasenentleerungen eine SUX-Gabe über den Nachweis von urinärem SMC noch sicher nachweisbar ist, wenn bis 6 Stunden (und vermutlich noch darüber hinaus) nach Verabreichung der Ausgangssubstanz eine Urinprobe gewonnen wird. Für die Muttersubstanz SUX ist ein solcher Nachweis nur für zwischenzeitliche Blasenentleerungen bei letztendlicher Probennahme innerhalb der ersten 2 Stunden zu führen.

---

Bei tödlichen Intoxikationen sammelt sich die gesamte Menge des noch sezernierten SUX sowie SMC in der Blase und kann, vorausgesetzt es tritt perimortal keine völlige Blasenentleerung ein, im Urin nachgewiesen werden. Die im Rahmen der vorliegenden Studie entnommenen und analysierten Sammelurinproben deuten einen bereits für kontrollierte Bedingungen sehr großen Streuungsbereich der nachweisbaren Konzentrationen an, für Realfälle sind darüber hinaus weitere Einflussfaktoren zu berücksichtigen:

Zwar sind trotz der meist nur kurzen Überlebenszeit bei tödlich verlaufenden SUX-Intoxikationen detektierbare Level von SUX und/oder SMC im Urin zu erwarten [15,27], je nach Überlebenszeit bzw. postmortaler Restaktivität der Nieren sind allerdings unterschiedlichste Konzentrationen sowie Konzentrationsverhältnisse für SUX und SMC möglich.

Die Urinbefunde der im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals beschriebenen forensischen Realfälle [69] können mittels obiger Ausführungen plausibel (s.u.) erklärt werden.

#### **5.8.4 Nachweisfenster**

Zur Erstellung der Nachweisfenster werden die in der Patientenstudie ermittelten Nachweishäufigkeiten für SUX und SMC der stabilisierten Probenmatrices als Nachweiswahrscheinlichkeit interpretiert. Es wird von einer generellen Übertragbarkeit der erhobenen Daten auf die gesamte Population ausgegangen.

Bei zeitnah erfolgter Stabilisierung von entnommenen Blutproben ist ein Nachweis von SUX üblicherweise nur bis zu 10 min nach Einleitung, in Einzelfällen sogar bis ca. 1 h nach SUX-Gabe möglich.

Ein Nachweis von SMC im Blut gelang in allen Probanden über den gesamten Versuchszeitraum von 6 h nach Einleitung von SUX. Die kinetischen Daten lassen darüber hinaus erwarten, dass ein Nachweis von SMC noch 8-24 Stunden nach SUX-Applikation oberhalb der Bestimmungsgrenze der verwendeten Methode möglich ist.

In frisch sezerniertem Urin kann von Nachweisfenstern (100 %-ige Nachweisbarkeit) von ca. 2 Stunden für SUX bzw. mindestens 6 Stunden für SMC ausgegangen werden. In Anbetracht der Serumkinetik von SMC erscheint eine Nachweisbarkeit dieses Metaboliten in frisch sezerniertem Urin über mindestens 8-24 Stunden plausibel. Da die Blase üblicherweise ein

---

stabiles Analytreservoir darstellt, wird der Nachweis selbst über diesen Zeitraum hinaus nur durch eine ggf. stattfindende Blasenentleerung begrenzt.

Abbildung 62 fasst die anhand der vorliegenden Studie ermittelten Nachweisfenster für SUX und SMC zusammen.

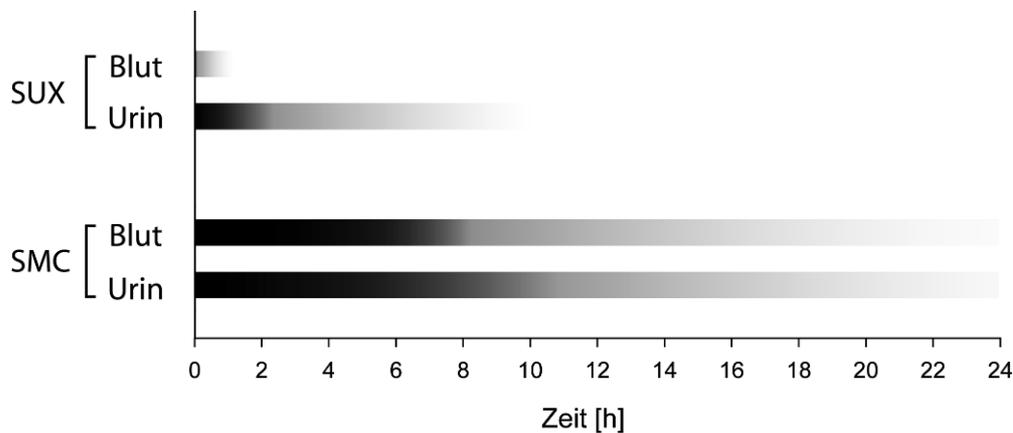


Abbildung 62: *In vivo*-Nachweisfenster von SUX und SMC im Blut bzw. frisch sezerniertem Urin

## 5.9 *In vitro*-Stabilität von SUX und SMC

Im Urin konnte durch die vorliegenden Daten weder für SUX noch für SMC ein stabilisierender Effekt von Paraoxon nachgewiesen werden. Dies ist insofern nicht verwunderlich, als dass Urin üblicherweise eine enzymfreie Matrix darstellt, im Rahmen der Asservierungsempfehlungen (s. Abschnitt 5.11) wird jedoch auf mögliche destabilisierende Einflüsse noch genauer eingegangen.

Im Probanden-Blut war für die Ausgangssubstanz SUX ein erheblicher stabilisierender Effekt durch Paraoxon feststellbar: unstabilisiert war der Analyt bis max. 4 min, stabilisiert dagegen bis 10 min nach SUX-Einleitung im Plasma nachweisbar.

Dieses Ergebnis war aufgrund der Resultate eigener Vorversuche (s. 4.2.2) sowie einschlägiger Literatur [24] zu erwarten. Die forensische Bedeutsamkeit der somit erneut nachgewiesenen, erheblichen *in vitro*-Instabilität von SUX wird in den Asservierungsempfehlungen noch ausführlicher diskutiert werden.

Auch für SMC konnte im Rahmen der Patientenstudie ein stabilisierender Effekt durch Paraoxon nachgewiesen werden: in stabilisiertem Plasma war der SUX-Metabolit über den gesamten Versuchsverlauf von 6 Stunden nachweisbar, in unstabilierten Plasmaproben nahm die Nachweishäufigkeit im Gegensatz dazu innerhalb von 4 Stunden auf 50 % ab, nach 6 Stunden waren nur noch ein Drittel der untersuchten Proben SMC-positiv. Dabei waren enorme interindividuelle Unterschiede zu beobachten: für einen Probanden war der Effekt der mangelnden Stabilisierung vernachlässigbar, in den beiden anderen zeigte sich eine starke bis sehr starke Abnahme der nachweisbaren SMC-Konzentrationen mit entsprechender Verkürzung des Nachweisfensters dieser Substanz auf bis zu wenige Minuten.

Während das rein forensische Ziel der Arbeit durch den erfolgten Nachweis einer Relevanz der Paraoxon-Stabilisierung als erfüllt angesehen werden kann, so fallen doch Unstimmigkeiten bezüglich der bisher beschriebenen Pharmakologie von SMC auf, welche im Folgenden diskutiert werden sollen.

### **5.9.1 SMC-Stabilität - Weiterführende Überlegungen**

Die beobachtete, teilweise fulminante SMC-Instabilität steht zunächst in klarem Kontrast zu den Ergebnissen der initial an Serum durchgeführten *in vitro*-Untersuchungen: in den genannten Experimenten zeigte sich für SMC über einen Beobachtungszeitraum von 5 min überhaupt kein stabilisierender Effekt von Paraoxon, erst bei Ausdehnung des Versuchszeitraums auf 24 h konnte eine solche Stabilisierung beobachtet werden. Auch die bisherigen Arbeiten anderer Gruppen konstatieren, dass SMC von den Serum-Esterasen weitaus langsamer abgebaut wird als die Muttersubstanz SUX [3,7-9,28,29], woraus häufig eine generell höhere *in vivo*-Stabilität von SMC verglichen mit SUX abgeleitet wird [24,28,30]. Alle oben genannten Arbeiten beziehen sich jedoch ausnahmslos auf Versuche, die anhand von Serum, Plasma oder isolierter BChE durchgeführt wurden.

An dieser Stelle muss angemerkt werden, dass im Vollblut nicht nur die in den meisten Vorarbeiten experimentell erfassten, freien Serum-Butyrylcholinesterasen, sondern auch echte Cholinesterasen am Abbau von SMC beteiligt sein könnten: während die Pseudocholinesterase SUX nachweislich schneller hydrolysiert als SMC, so gilt im Gegensatz dazu für echte Cholinesterasen (z.B. membranständige Esterasen der Erythrozyten oder Lymphozyten), dass sie SMC, nicht jedoch SUX, bereits in niedrigen Konzentrationen hydrolysieren [7]. Dieser Effekt ist im Rahmen von Experimenten, welche anhand von Serum

---

---

oder Plasma durchgeführt wurden, nicht erkennbar und seine Relevanz für die Pharmakologie des SMC daher nicht abschätzbar: die *in vitro* Stabilität von SMC ist im Vergleich zu SUX in zellfreien Matrices zwar nachweislich um ein Vielfaches größer [8,9,29], die Versuchskonzeption lässt aus oben angeführten Gründen jedoch (die trotzdem oft angestellten) Schlüsse auf *in vivo*-Bedingungen [24,28,30] nicht zu.

Um zu ermitteln, ob es sich bei den beobachteten Einflüssen auf den SMC-Abbau um zellvermittelte Effekte handelt, müssen daher Ergebnisse von Vollblut-basierten Stabilitätsassays betrachtet werden:

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten *in vitro*-Stabilitätsassays konnte, vergleichbar mit Serum, auch für Vollblut keine Stabilisierung von SMC durch Paraoxon erzielt werden. In nicht-stabilisiertem Vollblut wurde darüber hinaus kein relevanter Analyt-Zerfall über einen Zeitraum von bis zu 1 h, d.h. weit über die übliche Dauer der Probenvorbereitung im Rahmen der Probandenstudie hinaus, beobachtet. Die Ursache für die nachweislichen Unterschiede zwischen den nicht-stabilisierten Probandenproben und den *in vitro*-Untersuchungen bleibt zunächst unklar, intraindividuelle Unterschiede durch unterschiedliche Enzymausstattungen sind jedoch – wie bereits von Foldes et al. anhand einer Studie mit vergleichbarem Umfang (n = 3) postuliert [34] – plausibel. Die Autoren der zitierten Arbeit diskutierten in diesem Zusammenhang sowohl die Möglichkeit einer uneinheitlichen Ausstattung mit Pseudocholinesterasen, als auch Unterschiede in der Funktionalität von möglicherweise beteiligten und zu diesem Zeitpunkt noch unbekanntem Esterasen.

In diesem Zusammenhang ist zu beachten, dass die *in vitro*-Distributionsstudie der vorliegenden Arbeit zeigte, dass sich SMC im Gegensatz zu SUX nicht nur außerhalb der Zellen verteilt, sondern (insbesondere sichtbar bei niedrigen Konzentrationen) einen größeren Verteilungsraum einnimmt. Neben einem Abbau über membranständige Esterasen kann somit für SMC auch eine intrazelluläre Metabolisierung, wie z.B. für manche Xenobiotika in neutrophilen Granulozyten beschrieben [83,84], nicht ausgeschlossen werden.

Eine weitere Untersuchung dieser Thematik und Bestätigung anderer, beteiligter Enzymsysteme, z.B. der erythrozytären Cholinesterasen, steht bislang aus:

Aufgrund der scheinbar hohen interindividuellen Varianz bezüglich der SMC-Stabilität in Vollblut ist das im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewählte Kollektiv (jeweils n = 3 für die *in vivo*- sowie *in vitro*-Versuche) nicht groß genug, das Phänomen der SMC-Instabilität im

---

Vollblut - über seine grundlegende forensische Relevanz hinausgehend - bereits an dieser Stelle umfassend aufzuklären.

Weiterführende Studien sollten sich dieser Thematik mittels eines spezifisch dafür ausgewählten Probandenkollektivs widmen.

### **5.10 Forensische Realproben**

Bei der Untersuchung der forensischen Realproben konnte weder SUX noch SMC in Serum detektiert werden. Dies ist insofern nicht verwunderlich, als dass sowohl die Zeit bis zur Probennahme (aufgrund von Todesermittlungsformalitäten) als auch die Zeit bis zur angemessenen Probenstabilisierung (durch den Probenversand) soweit verzögert wurden, dass die nachgewiesenermaßen geringe *in vivo*- bzw. *in vitro*-Stabilität dieser labilen Substanzen als überschritten angesehen werden muss. Die Gesamtheit der akquirierten Daten erhärtet trotzdem den in beiden Fällen bestehenden Anfangsverdacht einer SUX-Intoxikation: die nicht beweiskräftigen Ergebnisse der Blut- bzw. Serumanalyse werden durch die im Urin nachgewiesenen SMC- und insbesondere SUX-Konzentrationen ergänzt, und weisen zweifelsfrei die Beibringung einer mindestens therapeutischen Dosis SUX nach [15]. Die festgestellten höheren SMC-Spiegel im Urin der überlebten im Vergleich zur tödlichen SUX-Intoxikation könnten einerseits auf eine Dosisdifferenz zurückgehen (die exakte Höhe der applizierten SUX-Dosis konnte in keinem Fall rekonstruiert werden), oder alternativ durch eine fortschreitende urinaire Sekretion des Metaboliten im Fall des rekonvaleszenten Patienten [8] im Gegensatz zum baldigen Ende der SMC-Ausscheidung nach Todeseintritt im zweiten Fall erklärt werden. Der niedrigere SUX-Spiegel im Überlebenden können nach demselben Prinzip mit einer Verdünnung des initial sezernierten SUX mit neu produziertem Urin in der Blase des Patienten erklärt werden [15]. Auch die bereits diskutierten interindividuellen Unterschiede in der SUX- und insbesondere SMC-Metabolisierung können darüber hinaus relevant sein.

Basierend auf den Analyseergebnissen konnte in beiden diskutierten Fällen zweifelsfrei eine nichtindizierte Verabreichung von SUX nachgewiesen werden. Im ersten Fall geschah dies durch Selbstbeibringung in suizidaler Absicht, in letzterem Fall wurde u.a. aufgrund der forensisch-toxikologischen Beweise Anklage gegen eine Intensivschwester wegen versuchten Mordes erhoben. Die Angeklagte wurde schließlich wegen gefährlicher Körperverletzung rechtskräftig verurteilt.

---

---

## 5.11 Empfehlungen und Hinweise zur SUX-Analytik

### 5.11.1 Allgemeines

Für alle Asservate hat eine Probennahme und -lagerung ausschließlich mittels Plastikmaterialien zu erfolgen. Die Zahl der Frier-Tau-Zyklen über die Gesamtdauer der Fallbearbeitung ist zu minimieren.

### 5.11.2 Asservierung von Blut

Auch wenn SUX in Einzelfällen bis ca. 1 h nach Gabe des Relaxans in Blutproben nachgewiesen werden kann, so ist die Eignung von Blut als Matrix für einen SUX-Nachweis im forensischen Kontext trotzdem eher kritisch zu bewerten:

Im Gegensatz zu Substanzen, welche eine vornehmlich CYP-P450-basierte Metabolisierung in der Leber aufweisen, stellt die SUX-Intoxikation einen Sonderfall dar, da der Abbau dieses Wirkstoffs im Gegensatz zu vielen anderen Analyten weitgehend unabhängig von einem intakten Kreislaufsystem scheint. Im Tierversuch (Hund) wurde in diesem Zusammenhang gezeigt, dass bei tödlichen Intoxikationen der weitere Konzentrationsabfall von SUX im Blut nach Todeseintritt zwar verlangsamt wird [20], diese Studie beleuchtete jedoch nur die ersten 20 min nach Kreislaufzusammenbruch, d.h. ausschließlich die Phase, in der Distributions-Effekte wie bereits diskutiert einen signifikanten Einfluss auf die nachweisbaren Analytkonzentrationen im Blut nehmen. Es kann anhand dieser Tierversuchsstudie allerdings nicht ausgeschlossen sondern muss vielmehr weiterhin angenommen werden, dass auch in Leichen die Esteraseaktivität der Serumenzyme zumindest eine Zeitlang aufrecht erhalten sein kann. Bei überlebten Intoxikationen kann darüber hinaus von einer unverminderten Enzymaktivität ausgegangen werden.

Ohne schnelle Probennahme und deren paraoxon-vermittelte Stabilisierung können daher insbesondere das höchst instabile SUX, aber anscheinend auch SMC sowohl *in vivo* als auch *in vitro* komplett aufgezehrt werden. Diese Annahme wird von den (trotz der in einem Fall innerhalb von ca. 5 h nach SUX-Applikation erfolgten Probennahme) negativen SUX- aber auch SMC-Befunden der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten, forensischen Realproben bestätigt.

Um einen *in vivo*-Abbau so gering wie möglich zu halten, ist daher eine möglichst schnelle Asservierung von Probenmaterial nach der vermeintlichen SUX-Gabe durchzuführen.

---

Um auch die *in vitro*-Degradation der Zielanalyten weitestgehend zu verhindern, ist darüber hinaus in einem forensischen Kontext stets eine Stabilisierung von Blutproben zu fordern. Die in paraoxonierte oder anderweitig esterase-inaktivierte Probengefäße abgenommenen Blutproben sind schnellstmöglich zu kühlen, zu prozessieren und mittels flüssigen Stickstoffs schockzugefrieren. Die Kühlkette ( $-20\text{ °C}$  oder kälter) ist danach bis zur Analyse nicht mehr zu unterbrechen.

Können einzelne Punkte dieses Katalogs nicht eingehalten werden, so ist besonderen Wert auf die realisierbaren Punkte, z.B. auf eine besonders schnelle Verbringung auf  $-20\text{ °C}$  bei nicht vorhandenem Paraoxon zu legen. Die im Rahmen der vorliegenden Studie durchgeführten, paraoxon-freien Blutentnahmen stellen derartige Idealfälle einer nicht-stabilisierten Probennahme dar, in der Realität ist allerdings eine meist weitaus schlechtere Umsetzung zu erwarten:

Da im Laufe von Todesermittlungsverfahren oft mehrere Stunden bis Tage vergehen, bis die fragliche Leiche dem Toxikologen zugänglich ist, ist eine Probennahme und somit Stabilisierung der Matrices innerhalb der ersten kritischen Sekunden bis Minuten in diesem Kontext meist nicht realisierbar. Auch bei überlebten Vergiftungen wird die Probe meist nicht von einem sachkundigen Toxikologen, sondern von einem Arzt vor Ort entnommen, die Probe kann daher üblicherweise erst nach Versand und letzlichem Eintreffen im forensisch-toxikologischen Labor fachgerecht stabilisiert und prozessiert werden.

Blutproben sind zusätzlich zu der meist nicht erfolgten Stabilisierung sowohl bei tödlichen als auch bei überlebten SUX-Intoxikationen meist längere Zeit verhältnismäßig hohen Temperaturen ausgesetzt, darunter zunächst ca.  $37\text{ °C}$  im kürzlich Verstorbenen oder noch lebenden Intoxikationsopfer, danach der Umgebungstemperatur für den Zeitraum der Leichenliegezeit oder des Proben transports, bis hin zu bestenfalls ca.  $4\text{ °C}$  für den Zeitraum der Leichenlagerung in einer Kühlkammer bzw. der Probenlagerung in einem klinischen Labor. Bei diesen Temperaturen werden enzymatische Prozesse, in diesem Fall die Hydrolyse der Zielanalyten, keinesfalls unterbunden, sondern bestenfalls verlangsamt.

Die negativen SUX- sowie SMC-Befunde, welche für die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten forensischen Realblutproben erhoben wurden, unterstützen die Auslegung, dass diese Matrix im forensischen Kontext meist eine untergeordnete Rolle für den Nachweis einer SUX-Intoxikation spielen wird.

---

### 5.11.3 Asservierung von Gewebeproben

Obwohl Gewebe als generell frei von endogenem SMC angesehen werden können (*cave*: stark verweste Probenmaterialien), so kann jedoch für beide Zielsubstanzen eine Instabilität ähnlich der in Blut- bzw. Serumproben angenommen werden: die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Gewebeproben der tödlichen SUX-Intoxikation erbrachten allesamt (falsch-) negative Resultate, wobei dieses Ergebnis angesichts beschriebener, gewebständiger Esterasen [85] durchaus plausibel ist. Nichtsdestotrotz sind sowohl in Tierversuchen [18,20,37] als auch anhand von menschlichen Gewebeproben bereits positive SUX-Befunde erhoben worden [24] – alle Arbeiten bestätigen jedoch einhellig, dass ein SUX-Nachweis nur äußerst selten, und darüber hinaus meist nur in sehr niedriger Konzentration geführt werden kann [18]. Aufgrund des hohen Gehalts an Urin erwies sich Nierengewebe für die forensisch-toxikologische Fallarbeit als noch aussichtsreichster Matrixkandidat für einen positiven Befund [24].

Neben nativen sind auch einbalsamierte Gewebe untersucht, und teils positiv auf sowohl SUX als auch SMC untersucht worden [19,37]. In diesem Zusammenhang wurde diskutiert, dass einerseits die im Rahmen einer Einbalsamierung applizierten, leicht sauren Bedingungen förderlich für eine spätere SUX-Analytik sein könnten [24,37], und/oder die im Gewebe vorhandenen Esterasen andererseits durch die Einbalsamierung zerstört werden könnten, was einen enzymatischen Analytabbau verhindern würde [19,24]. Ebenfalls erörtert wurde eine eventuell geringere Aktivität gewebständiger Esterasen im Vergleich zu denen im Blut [19]. Es ist an dieser Stelle zu beachten, dass es sich bei den erwähnten Arbeiten um Studien am Tiermodell (Ratte, Hund) handelte, in denen teils sehr hohe Dosen von SUX (Ratte: 10-200 mg/kg; Hund: 0.5-5 mg/kg) verabreicht wurden, eine Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den forensisch relevanten Konzentrationsbereich und den menschlichen Organismus ist daher nur sehr begrenzt gegeben.

Da Leichen in Deutschland vor einer Bestattung für gewöhnlich nicht einbalsamiert werden, konnten Stabilisierungseffekte von SUX bzw. SMC durch eine Konservierung des Leichnams nicht beobachtet und auch nicht untersucht werden. Es bleibt letztlich fragwürdig, ob eine Einbalsamierung überhaupt schnell genug erfolgen kann, um einen stabilisierenden Effekt auf SUX bzw. SMC auszuüben.

#### 5.11.4 Asservierung von Urin

Aufgrund aller o.g. Argumente sollte in einem Fall von vermuteter SUX-Beibringung der Fokus der Aufmerksamkeit zuerst auf Urin als meistversprechendes Medium für die SUX-Analytik gesetzt werden:

Es ist erwiesen, dass sowohl SUX als auch SMC unverändert renal ausgeschieden werden [8,34], und auch nach einer nur kurzen Sekretionsphase, z.B. im Rahmen von tödlichen SUX-Intoxikationen, im Urin nachweisbar sind [15,69]. Wie auch Blut oder Serum hat sich Urin darüber hinaus als negativ für endogenes SMC erwiesen [80], wobei die Zielanalyten im Urin im Gegensatz zu den Alternativen (Blutprodukten und Geweben) generell stabil genug sind, um auch unter Realbedingungen einen positiven Nachweis zu führen [15,23,24,69]. Ein weiterer Vorteil dieses Materials liegt in der Möglichkeit der nicht-invasiven Probengewinnung, d.h. im Gegensatz insbesondere zu Gewebeproben können, wie im Rahmen dieser Arbeit gelungen, auch überlebte SUX-Intoxikationen sehr patientenschonend einer forensisch-toxikologischen Untersuchung zugänglich gemacht und diagnostiziert werden [69]. Aus vorgenannten Gründen ist bei vermuteten SUX-Intoxikationen größter Wert auf eine sachgerechte Asservierung von Urin zu legen.

Durch die vorliegende *in vivo*-Studie konnte zwar kein stabilisierender Effekt von Paraoxon auf SUX oder auch SMC im Urin nachgewiesen werden, dieses Ergebnis ist jedoch nicht uneingeschränkt auf Realproben übertragbar:

Bei Probennahmen im Rahmen von Sektionen ist so z.B. eine Kontamination des Urins mit Blut und somit Enzymen möglich bzw. sogar wahrscheinlich. Nach überlebten Vergiftungen erscheint eine derartige Gefahr einer Enzymkontamination zwar geringer, ist aber insbesondere nach Legen eines Blasenkatheters und damit einhergehenden, etwaigen Verletzungen des Urogenitaltraktes durchaus gegeben. Darüber hinaus ist auch in einem Studienkollektiv gesunder Probanden der Fall einer esterase-aktiven Urinprobe berichtet worden [15].

Aufgrund dieser Unwägbarkeiten sind auch Urinproben für eine weitere forensisch-toxikologische Untersuchung auf SUX bzw. SMC stets mittels Paraoxon oder anderer, unspezifischer Esterasehemmern zu stabilisieren, und schnellstmöglich einzufrieren. Ein Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff stellt dabei auch für Urinproben den Goldstandard dar.

---

### **5.11.5 Hinweise zur Begutachtung**

Wenn kein Urin für die Analyse zur Verfügung steht, so muss ein SUX- bzw. SMC-Nachweis abschließend als schwierig angesehen werden: auf der einen Seite wird die Analytdetektion in Blut- und Gewebeprobe von Lebenden bzw. frischen Leichnamen durch die ausgeprägte Instabilität der beiden Zielsubstanzen behindert, in diesem Zusammenhang ist vor einer falsch-negative Befundung zu warnen. In stark verwesten Geweben auf der anderen Seite muss eine mögliche Probenkontamination mit SMC vermutlich mikrobiellen Ursprungs beachtet werden, wobei das Gutachten in diesen Fällen die Möglichkeit falsch-positiver Analysenergebnisse diskutieren muss.

---

## 6 Schlussfolgerung

Diese Arbeit beschreibt eine HPLC-ESI-MS/MS-Methodik zur simultanen Bestimmung von SUX und SMC sowohl in Serum als auch Urin. Die Methode ist durch exzellente Extraktionsausbeuten, hohe Sensitivität sowie gute Präzisions- und Richtigkeitsdaten gekennzeichnet. Zusätzlich zu ihren sehr zufrieden stellenden Kenndaten ist die Methode schnell und einfach und sollte daher helfen, die SUX-Analytik mehr Routine- bzw. Forschungslaboren zugänglich zu machen. Die Methode wurde erfolgreich für den Nachweis sowohl einer tödlichen als auch einer überlebten SUX-Intoxikation sowie zur Darstellung des *in vivo*-Abbaus von SUX und SMC verwendet, sie ist somit nachweislich für die Bearbeitung sowohl forensischer als auch klinischer Fragestellungen geeignet.

Die SMC-Analytik unterstreicht die Notwendigkeit immer mindestens zwei MRM-Übergänge aufzuzeichnen, da die Kombination von Retentionszeit und nur einem Übergang nachweislich nicht charakteristisch für eine gegebene Substanz sein muss, und so zu unschlüssigen bzw. falschen Ergebnissen führen könnte. Das Heranziehen von relativen Ionenintensitäten als weitere Maßnahme zur Qualitätssicherung hat sich als sehr effektiv herausgestellt und wird daher allgemein empfohlen. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass Interferenzen keinesfalls nur auf MRM-Übergänge mit kleinen Fragmentationen beschränkt sind, weswegen die Selektivität einer Methode ohne Ausnahme entsprechend untersucht und sichergestellt werden muss. In dem vorgestellten Fall war eine derart rigide Qualitätssicherung absolut notwendig um falsch-positive Resultate – absolut unakzeptabel sowohl in der forensisch-toxikologischen Routinearbeit als auch der Forschungstätigkeit – zu vermeiden. Es wurde weitergehend demonstriert, dass die individuelle Lösung von Selektivitätsproblemen substanz- sowie methodenspezifischen Besonderheiten Rechnung zu tragen hat, und dass verschiedene Ansätze hinsichtlich ihrer Eignung für das vorliegende Problem kritisch evaluiert werden müssen, um ein optimales Endergebnis zu ermöglichen. In der vorliegenden Arbeit konnte bewiesen werden, dass auch die Verwendung nachweisschwächerer MRM-Übergänge für die Identifikation sowie Quantifizierung zu sehr befriedigenden methodischen Kenndaten führen kann, und dass der präsentierte Ansatz daher eine legitime Alternative zu den bereits publizierten Lösungen für HPLC-MS/MS-Selektivitätsprobleme darstellt.

---

---

Vorherige Berichte bezüglich der Existenz von nativem SMC, mit allen negativen Implikationen für die forensisch-toxikologische SUX-Analytik, konnten nicht bestätigt werden: in einem großen Probandenkollektiv ergaben sich keine Hinweise auf die Existenz von endogenem SMC in humanem Serum bzw. Urin, und auch in frischen Gewebe- und Glaskörperflüssigkeitsproben wurde generell kein natives SMC detektiert. In beinahe allen Proben wurde jedoch die schon diskutierte Interferenz mit dem Haupt-Ionenübergang von SMC gefunden, wobei der Nachweis in Konzentrationen äquivalent zu vorher berichteten Durchschnittsgehalten an endogenem SMC erfolgte; eine frühere Fehlinterpretation dieser MRM-Daten mit resultierenden falsch-positiven Analyseergebnissen für endogenes SMC ist daher wahrscheinlich. SMC konnte somit weitgehend als SUX-Marker rehabilitiert werden, wobei eine Ausnahme in Fällen stark verwester Gewebeproben sowie langzeitgelagerter Proben gesehen werden muss: in derartigen Fällen konnte SMC vermutlich mikrobiellen Ursprungs in Gewebeproben, insbesondere in Lebergewebe, zweifelsfrei nachgewiesen werden.

Das Wissen über die *in vivo*-Stabilität der Zielanalyten wird durch die vorliegenden Ergebnisse der klinischen Studie erweitert: ein SUX-Nachweisfenster in der Größenordnung von bis ca. 10 min (max. ca. 60 min) in stabilisiertem Plasma konnte in Einklang mit vorhergehenden Arbeiten bestätigt werden. Dieser Analyt war ohne Paraoxonzugabe in keiner der Proben mit  $t > 4$  min nachweisbar. Für SMC im Plasma ergab sich ein Nachweisfenster von 8-24 h, wobei auch für diesen Analyten ein positiver Einfluss der Paraoxon-Stabilisierung auf die Nachweishäufigkeit klar bestätigt werden konnte. In älteren Probanden könnte die Nachweisdauer verlängert sein.

Die beobachteten intraindividuellen Unterschiede bezüglich der Paraoxon-vermittelten Stabilisierung von SMC sind pharmakologisch sehr interessant, da sie Aufschluss über am Abbau von SMC beteiligte, und bislang in dieser Funktion unbekannte Enzyme bzw. Enzymsysteme (z.B. spezifische Esterasen der roten Blutkörperchen) liefern können. Auch ein intrazellulärer Metabolismus kann für SMC zu diesem Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden, da sein Verteilungsvolumen im Vollblut einen zumindest teilweisen Übergang in das intrazelluläre Milieu nahelegt. Insbesondere bei niedrigen SMC-Konzentrationen sowie abhängig von individuellen physiologischen Gegebenheiten können die genannten Vorgänge zu einer forensisch bedeutsamen Herabsetzung der Nachweiswahrscheinlichkeit für SMC führen.

---

Für Urin konnte im Rahmen der klinischen Studie gezeigt werden, dass SUX in allen untersuchten Probanden noch bis 2 h nach SUX-Einleitung frisch sezerniert wird, die Nachweishäufigkeit für diesen Analyten nimmt danach bis 6 h nach SUX-Exposition auf ca. 50 % ab. SMC war in allen Probanden über den gesamten Studienverlauf nachweisbar. Ein Nachweis von SUX und SMC ist jedoch auch weit über o.g. Zeitintervalle hinaus möglich, da einmal in die Blase sezernierte Analyten nachfolgend zwar (insbesondere bei überlebten Intoxikationen) zunehmend verdünnt werden, aber auch unabhängig von einer Organophosphat-Behandlung in der Regel stabil und somit detektierbar bleiben. Im Falle von überlebten Intoxikationen sind eventuell bereits vor der Probennahme erfolgte Blasenentleerungen bei einer Begutachtung zu berücksichtigen.

Anhand der Studienergebnisse konnten zwei SUX-Intoxikationsfälle, eine tödliche sowie eine überlebte, fundiert begutachtet werden. Der erfolgreich geführte Nachweis einer paraoxonpflichtigen Instabilität von SMC erlaubte in diesem Zusammenhang die korrekte Bewertung der durchweg negativen Befunde im Blut: der Abbau beider Zielanalyten in diesen Probenmaterialien vollzieht sich schneller als eine Probennahme möglich ist, eine SUX-Intoxikation ist nach alleiniger Analyse dieser Matrices allerdings keinesfalls auszuschließen. In den untersuchten Realfällen ermöglichten schließlich die für SUX sowie SMC jeweils positiven Urin-Befunde den eindeutigen und gerichtsverwertbaren Nachweis einer SUX-Intoxikation. Diese Arbeit unterstreicht, dass Urin ein ideales und vermutlich das einzig wirklich verlässliche Probenmaterial für die SUX-Analytik darstellt.

Die Gesamtheit der erzielten Ergebnisse wurde abschließend in Empfehlungen bezüglich der Auswahl, Entnahme, Handhabung sowie Lagerung von geeigneten Probenmaterialien umgesetzt. Insbesondere bei Einhaltung der Empfehlungen liefert die vorgestellte Arbeit dem forensischen Toxikologen wertvolles Datenmaterial, um eigene Analysenergebnisse auf ihre Plausibilität hin zu untersuchen.

---

In der gegenständlichen Arbeit wurde eine rechtsverwertbare Methode zum parallelen Nachweis von SUX und seinem Metaboliten SMC entwickelt, und für sowohl Serum als auch Urin komplett validiert. Die Methode wurde darüber hinaus erweitert, um auch ein breites Spektrum von Geweben der SUX-Analytik zugänglich zu machen. Die Anwendbarkeit der Methode für den forensisch-toxikologischen Routinebetrieb sowie auch für Fragestellungen klinischer Art wurde anhand der durchgeführten Studien belegt.

Schwächen der teils überschätzten MS/MS-Analytik konnten aufgedeckt, und neue Anregungen zur Problembehandlung und Qualitätssicherung in diesem Bereich gegeben werden. Fehlinterpretationen basierend auf falsch-positiven Analyseergebnissen vorhergehender Arbeiten konnten in diesem Zusammenhang korrigiert werden.

Die vorliegende Arbeit kann als Leitfaden für die SUX-Analytik verwendet werden, und ermöglicht dem forensischen Toxikologen eine fundierte Plausibilitätskontrolle durch Abgleich eigener Analyseergebnisse mit dem vorgestellten *in vivo*-Modell für Analytabbau und Wirkstoffelimination.

---

## 7 Ausblick

Eine der nicht vollständig gelösten Fragen dieser Arbeit betrifft die Detektion von SMC in stark verwesenen Kontrollproben von nicht-SUX-assoziierten Todesfällen. Um SMC auch in Faulleichen ausnahmslos und zweifelsfrei als Marker für eine vorangegangene SUX-Gabe zu etablieren, kann eine Differenzierung von pharmazeutischem gegenüber mikrobiell erzeugtem SMC durch Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (IRMS) angestrebt werden. Diese Methode soll hier kurz vorgestellt und ihr mögliches Potential für die forensische Toxikologie, und hier insbesondere die SUX-Analytik, diskutiert werden.

Von wissenschaftlichem Interesse sind in aller Regel vergleichende Analysen des  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ - sowie des  $^2\text{H}/^1\text{H}$ -Isotopenverhältnisses. Das  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ - bzw.  $^2\text{H}/^1\text{H}$ -Profil eines Lebewesens ergibt sich durch seine Aufnahme der genannten Isotope aus der Umgebung, und ist daher bei heterotrophen Organismen zu einem wesentlichen Teil durch die aufgenommene Nahrung beeinflusst. Synthetische Verbindungen haben demhingegen meist nur eine überschaubare Anzahl an Vorläufern mit jeweils einheitlichem Isotopenprofil, welche sich im Isotopenverhältnis des Produktes niederschlagen. Da mit Hilfe der äußerst sensitiven IRMS-Analytik bereits Unterschiede der Isotopenhäufigkeit im ppm-Bereich nachweisbar sind, reicht ein entsprechend geringer Unterschied im Isotopenprofil einer biogenen gegenüber der entsprechenden synthetisch hergestellten Verbindung, um die jeweilige Herkunft zweifelsfrei nachzuweisen. Die IRMS wird erfolgreich unter anderem in der Dopinganalytik (z.B. zum Nachweis exogener Steroide), der Lebensmittelchemie (z.B. zur Klärung der Herkunft von Lebensmitteln) sowie in der Pharmazie (z.B. zum Arzneimittel-Fingerprinting sowie zur Kontrolle der Patientencompliance) eingesetzt [86-91], und könnte sich auch für die forensische Toxikologie als nützlich erweisen. Im folgenden soll nur die HPLC-C-IRMS als Methode der Wahl für die SMC-Problematik kurz beschrieben werden: hierunter versteht man die vorausgehende HPLC-Auftrennung eines Probenextraktes, die anschließende restlose Verbrennung einer definierten Probenfraktion in reinem Sauerstoff („C“ für „combustion“) und die letztendliche Bestimmung des Isotopenverhältnisses des entstehenden  $\text{CO}_2$  bzw.  $\text{H}_2\text{O}$  mittels IRMS. Das so definierte Isotopenverhältnis kann auf einen universell eingesetzten, zertifizierten Referenzstandard bezogen, und so einem Vergleich mit anderen Werten zugänglich gemacht werden.

Ein diese Arbeit fortführendes Projekt sollte zunächst die Bestimmung der SMC-Isotopenverhältnisse von erhältlichen SUX-Präparaten nach ihrer Hydrolyse in den

---

---

Hauptmetaboliten behandeln. Darauf aufbauend kann die vergleichende Bestimmung der Isotopenprofile eines Kontrollkollektivs von mikrobiell erzeugtem SMC aufschlussreich sein. Anhand der Ergebnisse dieses Projektes kann dann abgeschätzt werden, inwiefern die IRMS geeignet ist forensisch interessante Substanzen wie eben SMC, aber auch z.B.  $\gamma$ -Hydroxybuttersäure (GHB) und andere, nach industrieller bzw. biogener Herkunft zu differenzieren.

Die vorliegende Arbeit hat darüber hinaus eindrücklich aufgezeigt, dass die bislang herrschende Meinung der höheren *in vivo*-Stabilität von SMC im Vergleich zu SUX nicht uneingeschränkt gültig ist: die präsentierten Ergebnisse deuten auf bislang unentdeckte, mögliche Abbaewege von SMC hin. Diese Einflussfaktoren sind bislang unbeachtet geblieben, da die berichteten Effekte nur im Vollblut zu beobachten sind, und scheinbar eine hohe interindividuelle Varianz aufweisen. SMC stand bislang nur selten im Fokus des Forschungsinteresses, und seine Abbaucharakteristika wurden in diesen Fällen nur in zellfreien Matrices (Serum, Plasma, Enzymextrakten) untersucht.

Weiterführende Arbeiten können die in dieser Arbeit präsentierten Anknüpfungspunkte für eine genauere Erforschung der Pharmakologie von SMC nutzen. Lohnend erscheint in diesem Zusammenhang z.B. eine Studie zur *in vitro*-Kinetik von SMC im Vollblut eines größeren Probandenkollektivs zur Erfassung der interindividuellen Variabilität des SMC-abbauenden Systems. Darüber hinaus kann eine genaue Lokalisation und Charakterisierung dieses am SMC-Abbau beteiligten Systems angestrebt werden, und die in der vorliegenden Arbeit bereits diskutierten Möglichkeiten einer Metabolisierung über membranständige (erythrozytäre) Cholinesterasen bzw. eines intrazellulären Abbaus über bislang unbekannte Enzymsysteme kritisch evaluiert werden.

---

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Succinylcholin-Abbau durch Cholinesterasen .....	4
Abbildung 2: Irreversible Hemmung von Cholinesterasen durch Organophosphate .....	11
Abbildung 3: Metabolische Giftung von Parathion .....	12
Abbildung 4: Prinzip der Elektrosprayionisation (ESI) .....	24
Abbildung 5: Schematischer Aufbau des PE Sciex API 2000 Triple-Quadrupol-Massenspektrometers .....	25
Abbildung 6: Schematischer Ablauf eines Q1-Scans .....	26
Abbildung 7: Schematischer Ablauf eines Produktionen-Scans .....	26
Abbildung 8: Schematischer Ablauf eines MRM-Experiments .....	27
Abbildung 9: Synthesendesign der internen Standards für SUX und SMC .....	29
Abbildung 10: NMR-aktive Kerne .....	35
Abbildung 11: Irradiation von Kernen in der NMR .....	36
Abbildung 12: Relaxation .....	37
Abbildung 13: Reales Beispiel-FID ( $^1\text{H}$ -Experiment von SMC) .....	38
Abbildung 14: Fourier-Transformation .....	38
Abbildung 15: Beispiel-Spektrum ( $^1\text{H}$ -Experiment SMC) .....	40
Abbildung 16: Schematische Darstellung der Vorgänge bei der FAB-MS .....	42
Abbildung 17: Zweistufige Synthese von SMC- $\text{d}_3$ .....	48
Abbildung 18: Zweistufige Synthese von SUX- $\text{d}_{18}$ .....	50
Abbildung 19: Benutzerdefiniertes Modell zur SMC-Kinetik .....	67
Abbildung 20: Drei-kompartimentelles Modell zur SMC-Kinetik .....	68
Abbildung 21: $^{13}\text{C}$ -Spektrum von SUX- $\text{d}_{18}$ .....	71
Abbildung 22: $^1\text{H}$ -Spektrum von SUX- $\text{d}_{18}$ .....	73
Abbildung 23: FAB-MS-Spektrum von SUX- $\text{d}_{18}$ .....	74
Abbildung 24: $^{13}\text{C}$ -Spektrum von SMC- $\text{d}_3$ .....	76
Abbildung 25: $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von SMC- $\text{d}_3$ (oben) .....	78
Abbildung 26: FAB-MS Spektrum von SMC- $\text{d}_3$ .....	79
Abbildung 27: $^{13}\text{C}$ -Spektrum von SMC .....	81
Abbildung 28: $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von SMC (oben) .....	83
Abbildung 29: FAB-MS-Spektrum von SMC .....	84

---

---

Abbildung 30: Produktionenspektren der Analyten sowie internen Standards.....	85
Abbildung 31: Anwendbarkeit der synthetisierten internen Standards in der HPLC-MS/MS-Analytik .....	86
Abbildung 32: Stabilität von SUX in Abhängigkeit verschiedener Paraoxon-Konzentrationen (n = 3) .....	87
Abbildung 33: Stabilität von SMC in Abhängigkeit verschiedener Paraoxon-Konzentrationen (n = 3) .....	88
Abbildung 34: Stabilität von SMC in Abhängigkeit verschiedener Paraoxon-Konzentrationen (n = 3, 24 h) .....	89
Abbildung 35: Materialabhängige Gefäßadsorption von SUX und SMC.....	91
Abbildung 36: SMC-Interferenz in Serum und Urin.....	92
Abbildung 37: Störsubstanz in Probandenserum.....	97
Abbildung 38: Störsubstanz in Probandenurinen .....	99
Abbildung 39: Störsubstanz in Probandenurinen bezogen auf den jeweiligen Kreatiningehalt .....	100
Abbildung 40: Empfindlichkeit der Störsubstanz gegenüber alkalischer Hydrolyse.....	101
Abbildung 41: Chromatogramme je einer authentischen, forensischen Serum- (a) und Urinprobe (b) einer vermuteten überlebten SUX-Intoxikation .....	102
Abbildung 42: Chromatogramme je einer authentischen, forensischen Urin- (b) und verdünnter Blutprobe (a) einer vermuteten tödlichen SUX-Intoxikation.....	103
Abbildung 43: Stabilität von SUX in Abhängigkeit verschiedener Paraoxon-Konzentrationen (n = 3) .....	104
Abbildung 44: Stabilität von SMC in Abhängigkeit verschiedener Paraoxon-Konzentrationen (n = 3) .....	105
Abbildung 45: Stabilität von paraoxon-unbehandeltem SMC (n = 3) .....	108
Abbildung 46: SUX-Abbau in einem Beispiel-Probanden .....	109
Abbildung 47: Überlagerung der 15 individuellen SMC-Konzentrations-Zeit-Profile im Plasma.....	110
Abbildung 48: Mittels 3-Kompartiment-Ansatz modellierte Plasma-Konzentrationsverläufe von SMC.....	112
Abbildung 49: Überlagerung der modellierten SMC-Plasmakonzentrationsverläufen.....	114
Abbildung 50: Korrelation von Probandenalter mit forensisch relevanten, pharmakokinetischen Parametern von SMC .....	122

---

Abbildung 51: SUX in nicht-stabilisiertem Plasma.....	124
Abbildung 52: Unterschiedliche Auswirkungen einer ausbleibenden Paraoxon-Stabilisierung auf den SMC-Abbau .....	125
Abbildung 53: Nachweisbarkeit von SMC im Plasma .....	127
Abbildung 54: Nachweisbarkeit von SUX im Plasma.....	128
Abbildung 55: Überlagerung der Poolkonzentrationen und Konzentrationsverläufe für SUX im Urin .....	129
Abbildung 56: Überlagerung der Poolkonzentrationen und Konzentrationsverläufe für SMC im Urin .....	130
Abbildung 57: Nachweisbarkeit von SUX und SMC im Urin.....	134
Abbildung 58: Vergleichende Analyse nativer (a,c,e) gegenüber dotierter (25 ng/g SMC; b,d,f) Gewebeproben postmortaler Kontrollen .....	135
Abbildung 59: Vergleichende Analyse nativer (a,c,e) gegenüber dotierten (25 ng/g SMC; b,d,f) Gewebeproben eines stark verwesten Kontrollleichnams.....	136
Abbildung 60: Vergleichende Analyse von unbehandelten (a,c,e) gegenüber dotierten (je 25 ng/g SUX und SMC; b,d,f) Gewebeproben einer tödlichen SUX-Intoxikation .....	138
Abbildung 61: Vergleichende Analyse von unbehandelter (a,c) gegenüber dotierter (je 12.5 ng/ml SUX und SMC; b,d) Glaskörperflüssigkeit einer tödlichen SUX-Intoxikation (c,d) und eines repräsentativen, nicht-SUX-assoziierten Todesfalls (a,b) .....	139
Abbildung 62: <i>In vivo</i> -Nachweisfenster von SUX und SMC im Blut bzw. frisch sezerniertem Urin .....	161

---

---

## 9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht bereits publizierter Arbeiten zur SUX-Analytik .....	7
Tabelle 2: HPLC Gradientenkonditionen .....	45
Tabelle 3: RapidTrace-Extraktionsprotokoll in Adaption der manuellen Aufarbeitung .....	53
Tabelle 4: Zusammensetzung des Gewebekollektivs .....	57
Tabelle 5: Patientendaten .....	65
Tabelle 6: Präzisions- und Richtigkeitsdaten des niedrigen Konzentrationsbereichs .....	95
Tabelle 7: Präzisions- und Richtigkeitsdaten des hohen Konzentrationsbereichs .....	95
Tabelle 8: Lineare Regression, Grenzen der Methode und Extraktionsausbeuten des niedrigen Konzentrationsbereichs .....	96
Tabelle 9: Lineare Regression und Extraktionsausbeuten des hohen Konzentrationbereichs ..	96
Tabelle 10: Statistischer Vergleich zweier Probennahmesysteme (Heparin vs. EDTA-Monovetten) .....	106
Tabelle 11: Distribution von SUX und SMC im Vollblut .....	107
Tabelle 12: Individuelle pharmakokinetische Parameter .....	116
Tabelle 13: Vergleich männlicher und weiblicher Probanden bezüglich forensisch relevanter pharmakokinetischer Parameter .....	119
Tabelle 14: Vergleich von primär hepatisch erkrankten und nicht-lebergeschädigten Probanden bezüglich forensisch relevanter pharmakokinetischer Parameter .....	120
Tabelle 15: Korrelation des Probandenalters mit forensisch relevanten pharmakokinetischen Parametern .....	121
Tabelle 16: Patientendaten des Kollektivs für nicht-stabilisierte Probenserien .....	123
Tabelle 17: Vergleich stabilisierter gegenüber nicht stabilisierter Sammelurin-Proben .....	131
Tabelle 18: Vergleich stabilisierter gegenüber nicht stabilisierter Katheterurin-Proben .....	132
Tabelle 19: Zusammenfassung der Ergebnisse für die untersuchten Kontrollgewebe .....	137

---

## 10 Formelverzeichnis

Formel 1: Die chemische Verschiebung .....	39
Formel 2: Formel zur Kalkulation der Signalmultiplizität M.....	40

---

---

## 11 Literatur

- [1] Glick, D. Some additional observations on the specificity of cholinesterase. *J. Biol. Chem.* **137** (1941); 357-362
  - [2] Roy, J. J.; Boismenu, D.; Gao, H.; Mamer, O. A.; Varin, F. Measurement of succinylcholine concentration in human plasma by electrospray tandem mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **290** (2001); 238-244
  - [3] Kato, M.; Shiratori, T.; Yamamuro, M.; Haga, S.; Hoshi, K.; Matsukawa, S.; Jalal, I. M.; Hashimoto, Y. Comparison between in vivo and in vitro pharmacokinetics of succinylcholine in humans. *J. Anesth.* **13** (1999); 189-192
  - [4] Roy, J. J.; Donati, F.; Boismenu, D.; Varin, F. Concentration-effect relation of succinylcholine chloride during propofol anesthesia. *Anesthesiology* **97** (2002); 1082-1092
  - [5] Lagerwerf, A. J.; Vanlinthout, L. E.; Vree, T. B. Rapid determination of succinylcholine in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr.* **570** (1991); 390-395
  - [6] Pitts, N. I.; Deftereos, D.; Mitchell, G. Determination of succinylcholine in plasma by high-pressure liquid chromatography with electrochemical detection. *Br. J. Anaesth.* **85** (2000); 592-598
  - [7] Lehmann, H. and Silk, E. Succinylmonocholine. *Br. Med. J.* **1** (1953); 767-768
  - [8] Foldes, F. F.; Vandervort, R. S.; Shanor, S. P. The fate of succinylcholine in man. *Anesthesiology* **16** (1955); 11-21
  - [9] Foldes, F. F. Succinylmonocholine iodide: its enzymatic hydrolysis and neuromuscular activity. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **83** (1953); 187-189
  - [10] Foldes, F. F.; McNall, P. G.; Birch, J. H. The neuromuscular activity of succinylmonocholine iodide in anaesthetized man. *Br. Med. J.* **1** (1954); 967-968
  - [11] Torda, T. A.; Graham, G. G.; Warwick, N. R.; Donohue, P. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of suxamethonium. *Anaesth. Intensive Care* **25** (1997); 272-278
  - [12] Lehmann, H. and Ryan, E. The familial incidence of low pseudocholinesterase level. *Lancet* **271** (1956); 124
  - [13] Kalow, W. and Staron, N. On distribution and inheritance of atypical forms of human serum cholinesterase, as indicated by dibucaine numbers. *Can. J. Biochem. Physiol* **35** (1957); 1305-1320
  - [14] Roy, J. J. and Varin, F. Physicochemical properties of neuromuscular blocking agents and their impact on the pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship. *Br. J. Anaesth.* **93** (2004); 241-248
-

- [15] Stevens, H. M. and Moffat, A. C. A rapid screening procedure for quaternary ammonium compounds in fluids and tissues with special reference to succinylcholine. *J. Forensic Sci. Soc.* **14** (1974); 141-148
- [16] Fiori, A. and Marigo, M. A method for the detection of d-tubocurarine, gallamine, decamethonium and succinylcholine in biological materials. Modification and development. *J. Chromatogr.* **31** (1967); 171-176
- [17] Hoshi, K.; Hashimoto, Y.; Matsukawa, S. Pharmacokinetics of succinylcholine in man. *Tohoku J. Exp. Med.* **170** (1993); 245-250
- [18] Malthe-Sorensen, D.; Odden, E.; Blanch, J.; Bugge, A.; Morland, J. Determination of succinylcholine in different tissue samples from guinea pigs after injection of a single intravenous dose. *Forensic Sci. Int.* **32** (1986); 171-178
- [19] Forney, R. B., Jr.; Carroll, F. T.; Nordgren, I. K.; Pettersson, B. M.; Holmstedt, B. Extraction, identification and quantitation of succinylcholine in embalmed tissue. *J. Anal. Toxicol.* **6** (1982); 115-119
- [20] Nordgren, I.; Baldwin, K.; Forney, R., Jr. Succinylcholine--tissue distribution and elimination from plasma in the dog. *Biochem. Pharmacol.* **33** (1984); 2519-2521
- [21] Nordgren, I. K.; Forney, R. B., Jr.; Carroll, F. T.; Holmstedt, B. R.; Jaderholm-Ek, I.; Pettersson, B. M. Analysis of succinylcholine in tissues and body fluids by ion-pair extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Arch. Toxicol. Suppl* **6** (1983); 339-350
- [22] Nisikawa, M.; Tatsuno, M.; Suzuki, S.; Tsuchihashi, H. The analysis of quaternary ammonium compounds in human urine by direct inlet electron impact ionization mass spectrometry. *Forensic Sci. Int.* **51** (1991); 131-138
- [23] Kerskes, C. H.; Lusthof, K. J.; Zweipfenning, P. G.; Franke, J. P. The detection and identification of quaternary nitrogen muscle relaxants in biological fluids and tissues by ion-trap LC-ESI-MS. *J. Anal. Toxicol.* **26** (2002); 29-34
- [24] Ballard, K. D.; Vickery, W. E.; Nguyen, L. T.; Diamond, F. X.; Rieders, F. An Analytical Strategy for Quaternary Ammonium Neuromuscular Blocking Agents in a Forensic Setting Using LC-MS/MS on a Tandem Quadrupole/Time-of-Flight Instrument. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **17** (2006); 1456-1468
- [25] LeBeau, M. and Quenzer, C. Succinylmonocholine identified in negative control tissues. *J. Anal. Toxicol.* **27** (2003); 600-601
- [26] Agarwal, D. P. and Goedde, H. W. Thin-layer chromatographic-separation of <sup>14</sup>C-labelled succinylcholine, succinylmonocholine and choline. *J. Chromatogr.* **121** (1976); 170-172
- [27] Dal Santo, G. Kinetics of Distribution of Radioactive Labeled Muscle Relaxants. *Anesthesiology* **29** (1968); 435-443
- [28] Goedde, H. W.; Held, K. R.; Altland, K. Hydrolysis of succinylcholine and succinylmonocholine in human serum. *Mol. Pharmacol.* **4** (1968); 274-287

---

- 
- [29] Schmidinger, S.; Held, K. R.; Goedde, H. W. Hydrolysis of succinylcholine by Pseudocholinesterase at low concentrations. *Humangenetik*. **2** (1966); 221-224
- [30] Tsutsumi, H.; Nishikawa, M.; Katagi, M.; Tsuchihashi, H. Adsorption and stability of suxamethonium and its major hydrolysis product succinylmonocholine using liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J. Health Sci.* **49** (2003); 285-291
- [31] Ikarashi, Y.; Hada, T.; Way, E. L.; Maruyama, Y. Determination of succinylcholine hydrolytic enzyme activity in human plasma. *J. Chromatogr.* **533** (1990); 23-33
- [32] Maltby, J. R. Criminal poisoning with anaesthetic drugs: murder, manslaughter, or not guilty. *Forensic Sci.* **6** (1975); 91-108
- [33] Meyer, E.; Lambert, W. E.; de Leenheer, A. Succinic acid is not a suitable indicator of suxamethonium exposure in forensic blood samples. *J. Anal. Toxicol.* **21** (1997); 170-171
- [34] Foldes, F. F. and Norton, S. The urinary excretion of succinylcholine and succinylmonocholine in man. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* **9** (1954); 385-388
- [35] Somogyi, G.; Varga, M.; Prokai, L.; Dinya, Z.; Buris, L. Drug identification problems in two suicides with neuromuscular blocking agents. *Forensic Sci. Int.* **43** (1989); 257-266
- [36] Lukaszewski, T. The extraction and analysis of quaternary ammonium compounds in biological material by GC and GC/MS. *J. Anal. Toxicol.* **9** (1985); 101-108
- [37] Baldwin, K. A. and Forney, R., Jr. The influence of storage temperature and chemical preservation on the stability of succinylcholine in canine tissue. *J. Forensic Sci.* **33** (1988); 462-469
- [38] Baldwin, K. A. and Forney, R., Jr. Correlation of plasma concentration and effects of succinylcholine in dogs. *J. Forensic Sci.* **33** (1988); 470-479
- [39] Singer, E. Pharmakologische Grundlagen: Wichtige Begriffe aus der Pharmakodynamik und Pharmakokinetik. *Onkologie* **31** (2008); 21-24
- [40] Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H. K., Ruth, P., and Schäfer-Korting, M. (2008) *Mutschler Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*, 9. Aufl., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart
- [41] Satoh, K.; Xiang-Yu, Z.; Miya-iri, M.; Honma, A.; Sawada, K. Ion-pair solvent extraction of EDTA anions with tetraalkylammonium ions in various organic solvents. *Monatshefte für Chemie* **137** (2006); 1375-1383
- [42] Rosenberry, T. L. and Scoggin, D. M. Structure of human erythrocyte acetylcholinesterase. Characterization of intersubunit disulfide bonding and detergent interaction. *J. Biol. Chem.* **259** (1984); 5643-5652
- [43] Szelenyi, J. G.; Bartha, E.; Hollan, S. R. Acetylcholinesterase activity of lymphocytes: an enzyme characteristic of T-cells. *Br. J. Haematol.* **50** (1982); 241-245
-

- 
- [44] Moriya, F. and Hashimoto, Y. Comparative studies on tissue distributions of organophosphorus, carbamate and organochlorine pesticides in decedents intoxicated with these chemicals. *J. Forensic Sci.* **44** (1999); 1131-1135
- [45] Appleyard, M. E.; McDonald, B.; Benjamin, L. Presence of a soluble form of acetylcholinesterase in human ocular fluids. *Br. J. Ophthalmol.* **75** (1991); 276-279
- [46] Saint-Marcoux, F.; Sauvage, F. L.; Marquet, P. Current role of LC-MS in therapeutic drug monitoring. *Anal. Bioanal. Chem.* **388** (2007); 1327-1349
- [47] Thevis, M. and Schanzer, W. Current role of LC-MS(/MS) in doping control. *Anal. Bioanal. Chem.* **388** (2007); 1351-1358
- [48] Maurer, H. H. Current role of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical and forensic toxicology. *Anal. Bioanal. Chem.* **388** (2007); 1315-1325
- [49] Ardrey, B. (2003) *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction*, Wiley, Chichester, West Sussex
- [50] Iribarne, J. V. and Thomson, P. A. On the evaporation of small ions from charged droplets. *J. Chem. Phys.* **64** (1976); 2287-2294
- [51] Röllgen, F. W., Juraschek, R., and Karas, M. (1996) Formation of charged droplets from a cone jet in ESI. Orlando, Florida
- [52] Glick, D. Some additional observations on the specificity of cholinesterase. *J. Biol. Chem.* **137** (1941); 357-362
- [53] Wunderlich, H. and Voigtländer, W. Basische Verbindungen von Dicarbonsäuren. *J. Prakt. Chem.* **3** (1956); 259-273
- [54] Phillips, A. P. Synthetic curare substitutes from aliphatic dicarboxylic acid aminoethyl esters. *J. Am. Chem. Soc.* **71** (1949); 3264
- [55] Karlén, B., Lundgren, G., Nordgren, I., and Holmstedt, B. (1974) Ion-Pair Extraction and Gas-Phase Analysis of Acetylcholine and Choline. In Hanin, I., editor. *Choline and Acetylcholine: Handbook of Chemical Assay Methods*, Raven Press, New York
- [56] Phillips, A. P. Preparation of the monocholine ester of succinic acid and some related derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **75** (1953); 4725-4727
- [57] Peters, F. T.; Hartung, M.; Herbold, M.; Schmitt, G.; Daldrup, T.; Musshoff, F. Anlage zu den Richtlinien der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen, Anhang C: Anforderungen an die Durchführung von Analysen, 1. Validierung. *Toxichem & Krimtech* **71** (2004); 146-154
- [58] Schmitt, G., Herbold, M., and Peters, F. (2003) VALISTAT Methodvalidierung nach den Richtlinien der GTFCh unter Berücksichtigung der ISO 5275. ARVECON GmbH, Walldorf, Germany
- [59] Maralikova, B. and Weinmann, W. Confirmatory analysis for drugs of abuse in plasma and urine by high-performance liquid chromatography-tandem mass
-

- spectrometry with respect to criteria for compound identification. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **811** (2004); 21-30
- [60] Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Off. J. Eur. Comm.* **221** (2002); 8-36
- [61] Gergov, M.; Ojanpera, I.; Vuori, E. Simultaneous screening for 238 drugs in blood by liquid chromatography-ion spray tandem mass spectrometry with multiple-reaction monitoring. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **795** (2003); 41-53
- [62] Allen, K. R. Interference by venlafaxine ingestion in the detection of tramadol by liquid chromatography linked to tandem mass spectrometry for the screening of illicit drugs in human urine. *Clin. Toxicol. (Phila)* **44** (2006); 147-153
- [63] Naidong, W.; Jiang, X.; Newland, K.; Coe, R.; Lin, P.; Lee, J. Development and validation of a sensitive method for hydromorphone in human plasma by normal phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **23** (2000); 697-704
- [64] Wüthrich, K. (1986) *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, John Wiley & Sons, New York
- [65] Cavanaugh, J., Fairbrother, W. J., Palmer III, A. G., and Skelton, N. J. (1995) *Protein NMR Spectroscopy: Principles and Practice*, Academic Press, San Diego, California
- [66] Seifert Jr., W. E. and Caprioli, R. M. Fast atom bombardment mass spectrometry. *Methods Enzymol.* **270** (1996); 453-486
- [67] Busch, K. L. Desorption ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **30** (1995); 233-240
- [68] Butler, A. R. The Jaffé reaction. Identification of the coloured species. *Clin. Chim. Acta* **59** (1975); 227-232
- [69] Kuepper, U.; Musshoff, F.; Madea, B. A fully validated isotope dilution HPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of succinylcholine and succinylmonocholine in serum and urine samples. *J. Mass Spectrom.* **43** (2008); 1344-1352
- [70] Gottlieb, H. E.; Kotlyar, V.; Nudelman, A. NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities. *J. Org. Chem.* **62** (1997); 7512-7515
- [71] Hooke, R. and Jeeves, T. A. "Direct search" solution of numerical and statistical problems. *J. Assoc. Comput. Mach.* **8** (1961); 212-229
- [72] Marquardt, D. W. An algorithm for least squares estimation of nonlinear parameters. *SIAM J. Appl. Math.* **11** (1963); 431-441
- [73] Akaike, H. A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control* **19** (1974); 716-723
-

- 
- [74] Schwarz, G. Estimating the dimension of a model. *Annals of Statistics* **6** (1978); 461-464
- [75] Imbimbo, B. P.; Imbimbo, E.; Daniotti, S.; Verotta, D.; Bassotti, G. A new criterion for selection of pharmacokinetic multiexponential equations. *J. Pharm. Sci.* **77** (1988); 784-789
- [76] Tanswell, P. and Koup, J. TopFit: a PC-based pharmacokinetic/pharmacodynamic data analysis program. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.* **31** (1993); 514-520
- [77] Kuepper, U.; Musshoff, F.; Madea, B. Synthesis and characterization of succinylcholine-d<sub>18</sub> and succinylmonocholine-d<sub>3</sub> designed for simultaneous use as internal standards in mass spectrometric analyses. *J. Mass Spectrom.* **42** (2007); 929-939
- [78] Fairbanks, V. F. and Tefferi, A. Normal ranges for packed cell volume and hemoglobin concentration in adults: relevance to 'apparent polycythemia'. *Eur. J. Haematol.* **65** (2000); 285-296
- [79] Sawyer, C. H. and Everett, J. W. Cholinesterases in rat tissues and the site of serum nonspecific cholinesterase production. *Am. J. Physiol* **148** (1947); 675-683
- [80] Kuepper, U.; Musshoff, F.; Madea, B. Succinylmonocholine analytics as an example for selectivity problems in high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry, and resulting implications for analytical toxicology. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **22** (2008); 1965-1970
- [81] Concheiro, M.; de Castro, A.; Quintela, O.; Cruz, A.; Lopez-Rivadulla, M. Determination of illicit drugs and their metabolites in human urine by liquid chromatography tandem mass spectrometry including relative ion intensity criterion. *J. Anal. Toxicol.* **31** (2007); 573-580
- [82] Abdallah, C. and Udomtecha, D. Pseudocholinesterase activity: determination and interpretation in pediatric anesthesia. *Middle East J. Anesthesiol.* **19** (2007); 423-428
- [83] Mtairag, E. M.; Abdelghaffar, H.; Labro, M. T. Investigation of dirithromycin and erythromyclamine uptake by human neutrophils in vitro. *J. Antimicrob. Chemother.* **33** (1994); 523-536
- [84] Uetrecht, J. P. Metabolism of clozapine by neutrophils. Possible implications for clozapine-induced agranulocytosis. *Drug Saf* **7 Suppl 1** (1992); 51-56
- [85] Massoulie, J.; Pezzementi, L.; Bon, S.; Krejci, E.; Vallette, F. M. Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Prog. Neurobiol.* **41** (1993); 31-91
- [86] de la Torre, X.; Gonzalez, J. C.; Pichini, S.; Pascual, J. A.; Segura, J. <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C isotope ratio MS analysis of testosterone, in chemicals and pharmaceutical preparations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **24** (2001); 645-650
- [87] Aguilera, R.; Becchi, M.; Mateus, L.; Popot, M. A.; Bonnaire, Y.; Casabianca, H.; Hatton, C. K. Detection of exogenous hydrocortisone in horse urine by gas
-

- 
- chromatography-combustion-carbon isotope ratio mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **702** (1997); 85-91
- [88] Godin, J. P.; Fay, L. B.; Hopfgartner, G. Liquid chromatography combined with mass spectrometry for  $^{13}\text{C}$  isotopic analysis in life science research. *Mass Spectrom. Rev.* **26** (2007); 751-774
- [89] Schwarcz, H. P. Use of stable isotopes to determine compliance. *Control Clin. Trials* **5** (1984); 573-575
- [90] Klein, P. D. Stable isotopic abundances as reflections of ingestion practices. *Control Clin. Trials* **5** (1984); 568-572
- [91] Bommer, P.; Moser, H.; Stichler, W.; Trimborn, P.; Vetter, W. Determination of the origin of drugs by measuring natural isotope contents: D/H and  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratios of some diazepam samples. *Z. Naturforsch.* **31 c** (1976); 111-114
-