

Summary of the PhD Thesis as a Thank You for the GTFCh Travel Fund for Presenting at the 2011 SOFT-TIAFT Meeting in San Francisco

Detektion diabetischer Stoffwechsellentgleisungen (Hypo- und Hyperglykämie) bei forensischen Fragestellungen

Cornelius Heß

Institut für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Bonn, Funktionsbereich forensische Toxikologie, Stiftsplatz 12, 53111 Bonn

1. Einführung

Diabetes mellitus ist eine weltweit auftretende chronische Krankheit. Ungefähr 285 Millionen Menschen sind zur Zeit von dieser Krankheit betroffen [1]. Diabetes wird gleichermaßen selten in Todesbescheinigungen [2, 3] als Krankheit (es kann mit weiteren 8 % Menschen mit unentdecktem Diabetes mellitus gerechnet werden) bzw. Todesursache [4, 5] festgehalten. Dabei sind Folgen einer Diabeteserkrankung die siebthäufigste Todesursache in den Entwicklungsländern (2007 waren Diabetes und dessen Folgen bei 2,7 % der Verstorbenen die Todesursache) [6]. Trotz sehr variablen Intervallen zwischen Mahlzeiten oder gelegentlich beachtlicher Kohlenhydratlast nach Nahrungsaufnahme bleibt die Blutglucosekonzentration des gesunden Menschen normalerweise innerhalb eines engen Bereichs (60-140 mg/dl [7]). Diese Mechanismen sind bei Patienten mit der Diagnose Diabetes mellitus gestört. Coma diabeticum ist die schwerwiegendste Form einer hyperglykämischen Stoffwechselfunktionsstörung. Es kann zwischen diabetischer Ketoazidose (DKA) und einer hyperosmolaren Krise unterschieden werden. Eine Überdosis Insulin ist die häufigste Ursache einer Hypoglykämie [8]. Die Behandlung mit insulinotropen oralen Antidiabetika kann ebenfalls zu Hypoglykämien führen, besonders wenn die Therapie mit Sulfonylharnstoffen der ersten Generation erfolgt. Die beschriebenen Stoffwechsellentgleisungen und deren Ursachen müssen sowohl ante mortem als auch post mortem nachweisbar sein. Die Doktorarbeit beschäftigte sich einerseits mit der analytischen Methodenentwicklung für Ursachen einer Hypoglykämie (humanes und synthetische Insuline und orale Antidiabetika) oder die Detektion einer Hyperglykämie (Anhydroglucitol, Methylglyoxal), andererseits mit der Korrelation und Anwendbarkeit dieser in klinischen und forensischen Realfällen.

2. Ergebnisse analytische Methodenentwicklung

2.1. Detektion und validierte Quantifizierung von humanem Insulin und synthetischen Analoga [9]

2.1.1 Probenvorbereitung: Nach Zusatz des Internen Standards Rinderinsulin (15 µl einer 1 pmol/µl-Lösung) werden 2 ml Serum zunächst mittels Acetonitril gefällt, anschließend mittels Immunoaffinitäts-Extraktion mit Hilfe von Anti-Insulin-Antikörpern und magnetischen beads extrahiert. *2.1.2 LC/MS: chromatographische Trennung:* Zorbax StableBond Vorsäule (1 mm*17 mm, 5 µm Partikelgröße) und Zorbax 300SB C₁₈ analytischen Säule (1*50 mm, 3,5 µm Partikelgröße). *Mobile Phasen:* 0,2 % Essigsäure mit 0,01 % TFA (Phase A) und 0,04 % Essigsäure und 0,002 % TFA in Acetonitril (Phase B). *Gradient:* 0 % B - 100 % B nach 10 min bei einer Flussrate von 0,15 ml/min. Innerhalb der nächsten 8 min wird der Gradient wieder auf 0 % B zurückgesetzt. *Massenspektrometrie:* ESI positiver Ionenmodus; Nadel-

spannung von 5500 V; Messung der fünffach geladenen Molekülionen im Enhanced Product Ion Modus. Die Unterscheidung von Humaninsulin und Humalog (Insulin lispro) erfolgt aufgrund derselben Molekülmasse durch die Integration der spezifischen Produktionen m/z 217 für Humalog und m/z 226 für Humaninsulin (siehe Abbildung 1). **2.1.3 Validierung:** Die Analyten humanes Insulin, Lantus, Apidra, Novolog, Levemir und Humalog können mittels der Methodik im Kalibrierbereich 5-200 $\mu\text{U/ml}$ linear quantifiziert werden. Die LoD aller Insuline liegt bei $< 2 \mu\text{U/ml}$ ($< 0,08 \text{ ng/ml}$), die LoQ bei $< 5 \mu\text{U/ml}$ ($< 0,2 \text{ ng/ml}$). Nüchtern-Konzentrationen von humanem Insulin, die normalerweise bei 5-30 $\mu\text{U/ml}$ (0,2-1,2 ng/ml) liegen, können mit dieser Methode detektiert werden. Matrixeffekte waren innerhalb der akzeptablen Bereiche zwischen 75 % und 125 %. Wiederfindungsraten mit dieser Immunoaffinitätsaufreinigung betragen 33,2-51,7 %. Genauigkeitsdaten lagen innerhalb der Vorgaben der GTFCh.

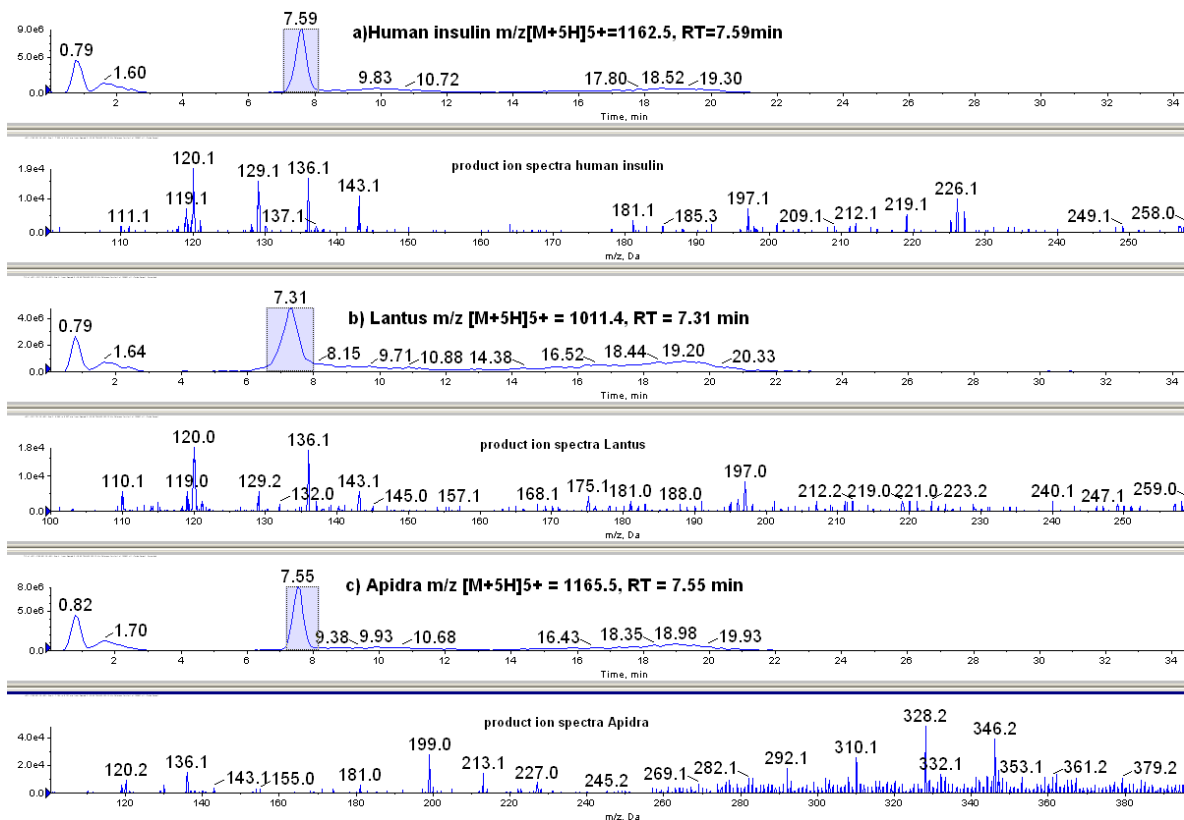


Abb. 1. Chromatographische Trennung und Produktionenspektren von (a) humanem Insulin und seinen synthetischen Analoga (b) Lantus[®], (c) Apidra[®]. Die Analoga Humalog[®], Novolog[®] und Levemir[®] können mittels der Methodik ebenfalls wuantifiziert werden.

2.2. Detektion und validierte Quantifizierung von oralen Antidiabetika mittels LC-MS/MS [10]

2.2.1 Probenvorbereitung: Serumproben (0,5 ml) werden mit 50 μl des eines Internen Standard-Mix (1 $\mu\text{g/ml}$ Hydroxytolbutamid-d₉, Repaglinid-ethyl-d₅, Pioglitazon-d₄ und Vildagliptin-d₃) versetzt. Die wässrige Phase wird mit 4 ml TBME bei 2 pHs (Zusatz Puffer pH 3 nach erster Extraktion) extrahiert und in Acetonitril wiederaufgenommen. **2.2.2 LC/MS: chromatographische Trennung:** Luna[®] Reversed phase C₈ analytische Säule (Partikelgröße 3 μm , 150*2 mm) und Kromasil[®] C₁₈ Vorsäule (Partikelgröße 4*2 mm). **Mobile Phasen:** A: Ammoniumformiat (0,005 M, mit Ameisensäure auf pH 3 eingestellt)/Acetonitril 90:10 und

B: Acetonitril. *Gradient*: 0-4 min 40 % B (Fluss: 0,3 ml/min), 4-6 min 90 % B (Fluss: 0,5 ml/min), 6-7min 90 % B (Fluss: 0,7 ml/min), 7-10 min 40 % B (Fluss: 0,3 ml/min). *Massenspektrometrie*: Multiple Reaction Monitoring mit je 2 Ionenübergängen im positiven Ionenmodus. **2.2.3 Validierung**: Eine Methode zur simultanen Quantifizierung von 14 antidiabetischen Arzneistoffen vom Sulfonylharnstoff-, Glinid-, Glitazon- und Gliptintyp wurde entwickelt. Wiederfindungsraten der meisten Arzneistoffe lagen zwischen 79,3% und 106 %, die Wiederfindungsraten von Vildagliptin und Saxagliptin lagen bei ungefähr 40 %. Die LLoD wurde definiert als die niedrigste Konzentration, die mit einer statistischen Sicherheit bei einem Signal-to-noise-Verhältnis > 3 gemessen werden kann. Dieses entscheidende Kriterium wurde für alle Analyten bei 1 ng/ml erreicht. Genauigkeitsdaten lagen innerhalb der Vorgaben der GTFCh.

2.3. Detektion und validierte Quantifizierung von Anhydroglucitol im Serum mittels LC/MS-MS [11]

2.3.1 Probenvorbereitung: 50 µl Serum wurde mit 10 µl des Internen Standards (200 µg/ml 1,5-Anhydro-D-[¹³C₆] glucitol) versetzt und die Proteine durch Zugabe von 200 µl Methanol gefällt. Nach Zentrifugation wurde der Überstand fünffach mit Acetonitril verdünnt. **2.3.2 LC/MS: chromatographische Trennung**: Luna[®] NH₂ (150*2 mm, 3 µm Partikelgröße) analytische Säule und NH₂ (4*2mm) Vorsäule (Abbildung 2). *Gradient*: isokratischer Fluss (0,5 ml/min) mit einer Mischung aus Acetonitril und Wasser (80:20, v/v) für 6 min. *Massenspektrometrie*: APCI, MRM im negativen Modus bei zwei Ionenübergängen. **2.3.3 Validierung**: Die Grenzen der Methode liegen bei LoD = 0,20 µg/ml und LoQ = 0,55 µg/ml. Die Methode zeigte sich linear vom LoQ bis 50 µg/ml. Damit erfasst die Methode physiologische Konzentrationen des Zuckers, die immer oberhalb der LoQ lagen. Genauigkeitsdaten lagen innerhalb der Vorgaben der GTFCh.

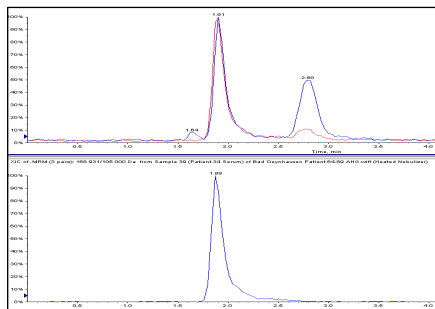


Abb. 2. LC-MS/MS Ergebnisse Anhydroglucitol: Chromatogramm des Serum eines diabetischen Patienten mit 23,7 µg/ml AG. Die oberen zwei Ionenübergänge stellen AG bei 1,91 min dar, der untere Ionenübergang zeigt den IS bei 1,88 min.

3. Diskussion

3.1. Möglichkeiten der Detektion einer Hypoglykämie ante und post mortem

Der Nachweis einer todesursächlichen Hypoglykämie fällt sehr schwer. Insulinvials, Spritzen, Nadeln oder Arzneimittelblister in der Nähe der aufgefundenen Person können erste Hinweise geben. Während der Obduktion gibt es kaum pathomorphologische Befunde, die direkt auf eine Überdosis mit Insulin oder oralen Antidiabetika hindeuten können. Intrinsische Ursachen einer Hypoglykämie, insbesondere ein Insulinom, sollten bei der Obduktion ausgeschlossen werden. Zunächst gestaltet sich der Nachweis der Hypoglykämie selbst über die Summenformel nach Traub als schwierig. Dabei wird die Glucosekonzentration mit der Hälfte der Laktatkonzentration in mg/dl addiert. Laktat gilt als Endprodukt der Glykolyse, die auch nach dem Tod noch weiterläuft. Es wurden Grenzwerte für die Traubsche Summenformel von <160 mg/dl [12] bzw. < 100 mg/dl [13] in der Glaskörperflüssigkeit beschrieben. De Letter et

al. [14] beschrieben den Cut-Off für die Summenformel nach Traub für den Nachweis einer Hypoglykämie mit 25 mg/dl. Ein extrem geringer HbA1c bei behandelten Diabetikern spricht weiterhin für periodisch aufgetrende hypoglykämische Episoden.

Neben dem Nachweis einer Hypoglykämie sollte auch die Ursache dieser gelingen. Orale Antidiabetika lassen sich im Blut als Muttersubstanz und im Urin als Metaboliten [15] auch in post mortem Proben nachweisen. Bei forensischen Fällen zeigt sich aber für den Insulinnachweis zunächst ein Matrixproblem. Weiterhin zeigt sich, dass die Schwierigkeit der Insulinanalytik post mortem nicht nur in der Qualifizierung und Quantifizierung selbst, sondern auch in der Interpretation der Analyseergebnisse besteht. In der Literatur sind nur wenige Fälle beschrieben.

Ante mortem sollte das Serum so schnell als möglich nach der Abnahme von den restlichen Bestandteilen des Blutes getrennt werden (siehe Fallbeispiel 3.1.2.2). Postmortale Blutproben weisen meist eine Hämolyse auf. Das zähe FVB lässt sich zwar noch zentrifugieren, um Hämolysat zu entfernen. Durch Zentrifugation lässt sich jedoch kein Serum gewinnen. Blut hat jedoch den Nachteil der bekannten Instabilität von Insulin post mortem. Diese wurde in einer Doktorarbeit am Institut für Rechtsmedizin in Frankfurt untersucht [16]. Es zeigte sich, dass bei einer Inkubation von Insulin mit Serum oder mit intakten Blutzellen keine Abnahme der Insulinkonzentration eintritt. Daher kann, wie auch bei unseren Stabilitätsuntersuchungen bestätigt, für die Insulinbestimmung Serum als Untersuchungsmaterial empfohlen werden. Der Abbau des Insulins post mortem wurde auf den Austritt von Hämoglobin aus den Erythrozyten zurückgeführt [16]. Unsere Untersuchungen an post mortem Femoralvenen- und Herzblut bestätigten diese Untersuchungen. In keinem Fall konnte humanes Insulin in diesen Matrices nachgewiesen werden. Leider lässt sich auch über die Stabilität von synthetischen Insulinen post mortem keine Aussage treffen, da für diese Aussagen Realfälle vorliegen müssen. Daher muss auf andere post mortem Matrices ausgewichen werden. Bei der Obduktion sollten neben den gängigen Materialien Femoralvenenblut und Urin auch die Glaskörperflüssigkeit entnommen werden. Für die Praxis wird, wenn möglich, eine Insulinbestimmung aus Serum empfohlen, am besten in ante mortem Material von Verstorbenen. Weiterhin können die Injektionsstelle und weitere Organe extrahiert werden. Die Detektion der Injektion von synthetischen Insulinanaloga stellt mit der beschriebenen Methodik zumindest im Serum kein Problem dar. Im Falle des Verdachts auf eine Injektion mit humanem Insulin muss auch die Analytik auf das C-Peptid erfolgen (siehe 3.1.1).

Eine wichtige post mortem Matrix für den Nachweis von Insulin ist die Glaskörperflüssigkeit (GKF). Die GKF ist ein wertvolles Material für chemisch-toxikologische Analysen und während der Obduktion leicht zu gewinnen. Der Vorteil dieser Matrix liegt in seiner anatomischen Isolation, so ist sie besonders nützlich in Fällen von fortgeschrittener Autolyse und Fäulnis. Für GKF zeigten Coe et al., dass humanes Insulin kaum die Blut-GKF-Barriere durchdringt. Ein in der Literatur beschriebener Fall [17] ist insofern interessant, da in diesem Fall ante mortem Blutproben vorliegen. Eine solche Situation ist in forensischen Routinefällen nicht üblich. Der Fall beschreibt die Analyse von Glaskörpermaterial im Falle einer Insulinüberdosis, die in ante mortem Blutproben (humanes Insulin > 5000 μ U/ml) bestätigt werden konnte. In diesem Fall lieferte post mortem Blut kein Ergebnis, sodass auf den Glaskörper ausgewichen wurde, in dem humanes Insulin in einer Konzentration von 28,8 μ U/ml aufgefunden wurde. Laut Literatur [18] wird immunoreaktives Insulin in der GKF von nicht-diabetischen Ratten im Mittel in Konzentrationen von 0,15 μ U/ml aufgefunden, in etwa 100fach geringer als in den entsprechenden Serumkonzentrationen. Angesichts der Beobachtung, dass die Diffusion von Analyten zwischen der Blut-Okular-Barriere konzentrationsabhängig ist und die Blutkonzentrationen bei Nicht-Diabetikern zwischen 5 und 30 μ U/ml schwankt, wurden noch viel geringere Konzentrationen in der GKF erwartet. In 10 nicht-diabetischen

Kontroll-GKF fand sich daher bei Thevis et al. [19] kein humanes Insulin. Auch bei unseren 46 Kontrollfällen post mortem fand sich im Glaskörper kein humanes Insulin. Nowicka et al. [20] analysierten 93 Glaskörperflüssigkeiten mittels Radioimmunoassay, wovon in 86 Fällen kein Insulin nachweisbar war. Nur in 7 Fällen konnte Insulin bestimmt werden (1,42-24,4 $\mu\text{U/ml}$). Besonders im Falle der höchsten Insulinkonzentration (24,4 $\mu\text{U/ml}$) konnte die Insulinkonzentration und die Anwesenheit einer Insulinspritze neben dem Leichnam auf eine Insulinintoxikation hinweisen. Auch synthetische Insuline können in der GKF (siehe Fallbeispiel 3.1.2.1) nachgewiesen werden, sodass sich die Analyse dieser Matrix bei Verdacht auf Insulinintoxikation empfiehlt.

Auch der qualitative Nachweis von humanem oder synthetischen Insulinen im Urin ist möglich. Insulin wird ganz normal im Glomerulus der Niere filtriert, wird aber nahezu komplett rückresorbiert [21]. Daher kommt nur eine geringe und sehr variable Fraktion des Insulins im Blutstrom in den Urin. Schon geringe Nierenfehlfunktion kann die Reabsorption beeinträchtigen und eine größere Fraktion des Insulins erreicht den Urin. Die Niere ist das Organ, in dem Insulin am meisten verstoffwechselt wird, daher erreicht nur weniger als 1 % des Insulins den Urin intakt. Humaninsulin wird [22] – wie auch die synthetischen Insulinanaloga Lantus[®] und Levemir[®], die ebenfalls nicht intakt in Urinproben aufgefunden werden können [23] – erheblich metabolisiert. Die Enzyme “insulin-degrading enzyme” (IDE) und “endosomal-acidic insulinase” (EAI) wurden als die Hauptenzyme identifiziert [24]. Einige Stellen des Moleküls in unterschiedlichen A- und B-Kettenpositionen, an denen Teilungen mittels IDE vonstatten gehen, wurden beschrieben: A13/14, A14/15, B9/10, B10/11, B13/14, B16/17, B24/25, B25/26 [25]. Thomas et al. [26] entdeckten nur einen dieser Metabolite in humanem Urin (desB25-30), fügten allerdings neue Metaboliten hinzu (DesB24-30, DesB25-30, DesB32-30, DesB30). Für Lantus[®] wurden desB30-32, desB31-32 und desB24-32 als Metaboliten identifiziert. Der Hauptmetabolismus von Levemir[®] beinhaltet eine Deacylierung des Myristinsäurerests, was zu dem Metaboliten desB30 Humaninsulin führt [27]. Nur in einem Insulin-Mordfall wurde das Urteil durch die Messung der Humaninsulinkonzentration im Urin gestützt [24]. Ansonsten ist aber eine quantitative quantitative Aussage in Urin nicht aussagekräftig genug.

3.1.1. Detektion der Injektion von humanem Insulin mittels des molaren Quotienten humanes Insulin zu C-Peptid

Proinsulin, das Vorläuferprotein von Insulin, wird in den Golgi-Apparat der Betazelle des Pankreas transportiert. Das Reifen sekretorischer Partikel im Golgi-Apparat ist verbunden mit der Spaltung von Proinsulin in Zwischenprodukte, in Insulin und das C-Peptid. Das C-Peptid ist ein Polypeptid (31 Aminosäuren) mit einer Molekülmasse von 3017 Da [28]. Unter physiologischen Bedingungen enthalten gesunde reife sekretorische Granulae im Pankreas äquimolare Mengen an Insulin und C-Peptid plus 2-6 % intaktes und gespaltenes Proinsulin [29]. Wenn die β -Zellen durch eine hohe Blutglucosekonzentration stimuliert werden, werden die beiden Peptide in äquimolaren Mengen in den Blutstrom abgegeben. Die Bestimmung des C-Peptids ist zum Nachweis einer Injektion mit humanem Insulin vonnöten [30], um die Sekretion des Pankreas zu evaluieren. Im Falle einer Insulininjektion kann man nämlich nicht zwischen dem endogenen Insulin der β -Zellen und injiziertem humanem Insulin unterscheiden. Die Insulininjektion verändert das molare Verhältnis humanes Insulin zu C-Peptid (I:C) zugunsten von Insulin. Insulinkonzentrationen im Serum sind hoch, C-Peptid-Konzentrationen sind durch einen negativen Feedback-Mechanismus [31], der die Teilung des Proinsulinmoleküls stoppt, niedrig bzw. nicht detektierbar [27]. Sowohl Insulin als auch das C-Peptid werden durch Enzyme mit unterschiedlichen Halbwertszeiten (HWZ) abgebaut. Zirkulierendes intaktes

Humaninsulin hat eine HWZ von 5 min [32] und ist in 10-20 min aus dem Kreislauf verschwunden [33]. Der Insulinabbau ist die Folge der Arbeit des Enzyms Glutathion-Insulintranshydrogenase in Leber, Niere, Plazenta, Muskel und zu einem geringeren Ausmaß im Plasma an A- und B-Kette, die vorher durch reduktive Spaltung der Disulfidbrücken getrennt wurden [34]. Etwa 50 % wird bei einem Durchgang durch die Leber entzogen. Das C-Peptid wird hauptsächlich durch die Niere abgebaut, passiert die Leber ohne Extraktion durch Hepatozyten und hat eine HWZ von 30 min. Daher hat das C-Peptid (4,4 ml/min) eine erheblich niedrigere Clearancerate als Insulin (11-34 ml/min) [35]. Als Konsequenz erreichen Insulin und C-Peptid abhängig von Größe und Zusammensetzung ihre maximalen Konzentrationen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Glucosezufuhr. Sie sind nicht in äquimolaren Mengen im Serum aufzufinden, die C-Peptid-Konzentrationen sind meist 5-10fach höher als die Insulinkonzentrationen in venösem Blut. Allgemeinen Konsens besitzt die Annahme, dass ein molares Verhältnis Insulin zu C-Peptid > 1 für eine exogene Gabe von humanem Insulin spricht.

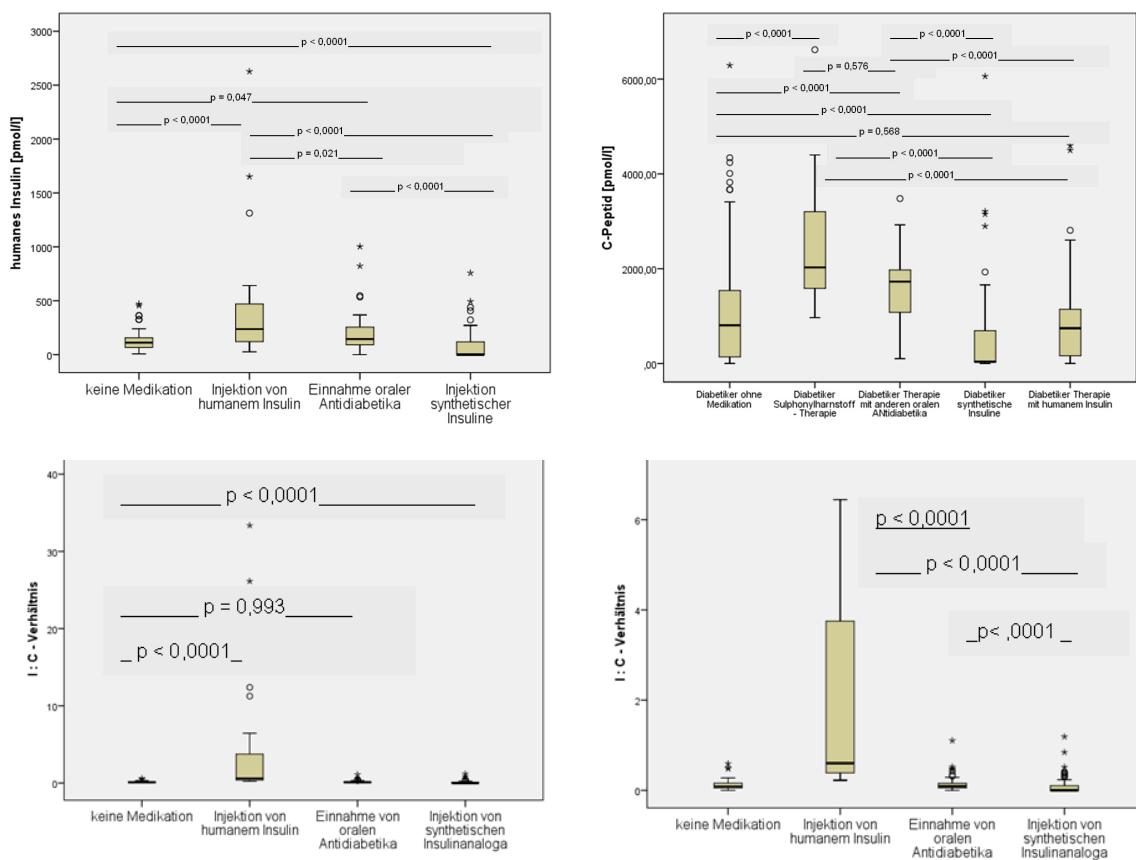


Abb. 3. Ermittelte Konzentration des C-Peptids, des humanen Insulins und des molaren Quotienten humanes Insulin zu C-Peptid (unten rechts vergrößert) bei Diabetikern eingeteilt nach ihrer (angegebenen und auch nachgewiesenen) Medikation.

Die Bestimmung des Verhältnisses der beiden Peptide ergibt aber nur in der Matrix Serum Sinn, da die Proteine im Vollblut unterschiedlich stabil sind. Wie unsere Auswertungen von diabetischen Patienten zeigen (Abbildung 3), ergibt der Quotient I:C mehr Information als die Konzentrationen an C-Peptid oder humanem Insulin alleine. Diabetische Patienten wurden nach ihrer Therapie (ohne Medikation (n = 58), nach Injektion von humanem Insulin (n = 30), nach nachgewiesener Injektion von Sulphonylharnstoffen, die die körpereigene C-Peptid und Insulinkonzentration erhöhen (n = 86), nach nachgewiesener Injektion von synthetischen Insu-

linen (n=74)) eingeteilt. Schon bei einem Cut-Off des molaren Verhältnisses von 0,3 konnten in unserem Kollektiv eine Sensitivität von 100 % und eine Selektivität von Sensitivität von 81,3% für die Abgrenzung zur Gruppe „keine diabetische Medikation“ erzielt werden.

3.1.2. Fallbeispiele der Detektion von Insulin [36]

3.1.2.1 Suizid mit Humalog Vorgeschichte: Eine Frau bat ihren Ehemann, sie im gemeinsamen Schlafzimmer alleine zu lassen. Sie wolle sich mit seinem Insulinvorrat – er ist Diabetiker – das Leben nehmen. Aus Rücksicht auf den Wunsch der Frau sollte der Ehemann erst nach einigen Stunden wieder ins Schlafzimmer gehen. Der Mann tat wie ihm aufgetragen und rief erst einige Stunden nach dem geäußerten Wunsch die Polizei, die die Ehefrau tot auf ihrem Bett vorfand. *Toxikologische und biochemische Befunde:* Insulin lispro in folgenden Matrices: FVB: kein Nachweis, Herzblut: kein Nachweis, Glaskörperflüssigkeit 103 $\mu\text{U/ml}$, mit Methanol extrahierte Injektionsstelle: 808 $\mu\text{U/g}$; Muskelgewebe: 373 $\mu\text{U/g}$, Nierengewebe: 384 $\mu\text{U/g}$.

3.1.2.2 Tötungsdelikt mit humanem Insulin Vorgeschichte: Frau X war eine aufgrund ihrer ständigen Extrawünsche bei den Stationsschwestern ungeliebte Bewohnerin einer Seniorenwohnanlage. Eines Abends nach dem Abendessen verlor sie nach Symptomen wie Zittern und Blässe das Bewusstsein. Der herbeieilende Arzt konnte an Ort und Stelle eine Blutglucosekonzentration von 26 mg/dl feststellen und ordnete das Verbringen in ein Krankenaus an. Vom Notarzt wurde eine Blutglucosekonzentration von 17 mg/dl festgestellt. Nach Eintreffen des Notarztes und Behandlung mit 40%iger Glucoselösung stieg der Blutzucker auf 203 mg/dl an, um nur eine viertel Stunde später wieder auf 86 mg/dl zu sinken. Frau X überlebte den Vorfall nach intensiven Glukagon- und Glucoseinfusionen über 4 Tage. Glücklicherweise wurde noch vom Notarzt ein Röhrchen Blut abgenommen, sofort zentrifugiert und das Serum bei -20°C gelagert. *Analytik:* Im Serum der Frau X vom Tag des Vorfalls wurde eine Humaninsulin-Konzentration von 5,18 mU/ml (= 37369 pmol/l) quantifiziert. In einer Probe, die später am Tag genommen wurde, wurde eine Konzentration von 2,86 mU/ml gefunden. Serumproben 2 und 3 Tage nach dem Vorfall enthielten kein humanes Insulin mehr. In keiner der Proben wurden synthetische Insuline nachgewiesen. Die C-Peptid-Konzentration in der Probe vom Vorfall lag bei 336 pmol/l, sodass sich ein I:C-Verhältnis von 111 ergibt. Der Verdacht keimte auf, dass eine der Nachtschwestern Frau X ein hypoglykämisches Agens (humanes Insulin) verabreicht haben könnte. Eine der Nachtschwestern hatte schon bei früheren Anlässen selbstständig Medikamente verabreicht. Im Computer der Verdächtigen wurde dann ein Bekennerbrief gefunden. In diesem wurde die Tat gestanden und der Hinweis gegeben, dass „sowohl 2 Fertipens Insulin Rapid als auch 2 Fertipens Actraphane 30/70 (30 % Normalinsulin und 70 % NPH Insulin) über eine Zeitspanne von 3-5 h gegeben wurde.“

3.2. Anhydroglucitol als Möglichkeit der Detektion einer Hyperglykämie post mortem

1,5-Anhydroglucitol (AG, Abbildung 4), die 1-Deoxy-Form von Glucose, wird über die Nahrung aufgenommen und konkurriert mit Glucose um die Reabsorption über den spezifischen Transporter SGLT4 (sodium dependent glucose transporter) in der Niere [37]. Normale Plasma-AG-Konzentrationen können während hyperglykämischen Phasen aufgrund der Hemmung der normalerweise hohen (> 99 %) tubulären Reabsorption dramatisch erniedrigt sein. Bei Normoglykämie bleibt AG aufgrund der im Vergleich zu der Nahrungseinnahme großen Körperreserve und aufgrund des fehlenden Metabolismus bei konstanten Steady State Konzentrationen [38]. Wenn die Blutglucosekonzentration die renale

Schwelle für Glucose von 180 mg/dl übersteigt, fällt die Konzentration von AG in enger Beziehung zum Ausmaß der Glucosurie [39]. Daher zeigen Patienten mit Diabetes signifikant niedrigere AG-Serumkonzentrationen als Nicht-Diabetiker [40, 41]. Es wurde gezeigt, dass die Messung von AG eine Alternative zur Bestimmung des HbA1c darstellt, da es schnelle Veränderungen im glykämischen Status, vor allem postprandiale Hyperglykämien, genauer prognostizieren kann als HbA1c oder Fructosamin [42]. Referenzkonzentrationen für AG werden im Mikrogramm pro Milliliter-Bereich für Nicht-Diabetiker beschrieben ($26,6 \pm 7,2$ $\mu\text{g/ml}$ bei Männern, $21,5 \pm 6,0$ $\mu\text{g/ml}$ bei Frauen [43]). Diabetiker gelten mit AG-Konzentrationen zwischen 10 und $13,9$ $\mu\text{g/ml}$ als exzellent, zwischen $6,0$ und $9,9$ $\mu\text{g/ml}$ als gut und bei < 6 $\mu\text{g/ml}$ als schlecht eingestellt [44].

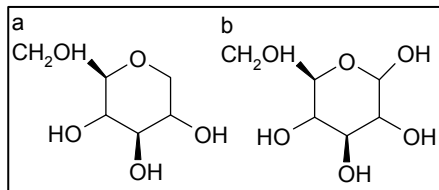


Abb. 4. Strukturformel von AG (a). Im Vergleich zu Glucose (b) fehlt die Hydroxygruppe in Position 1.

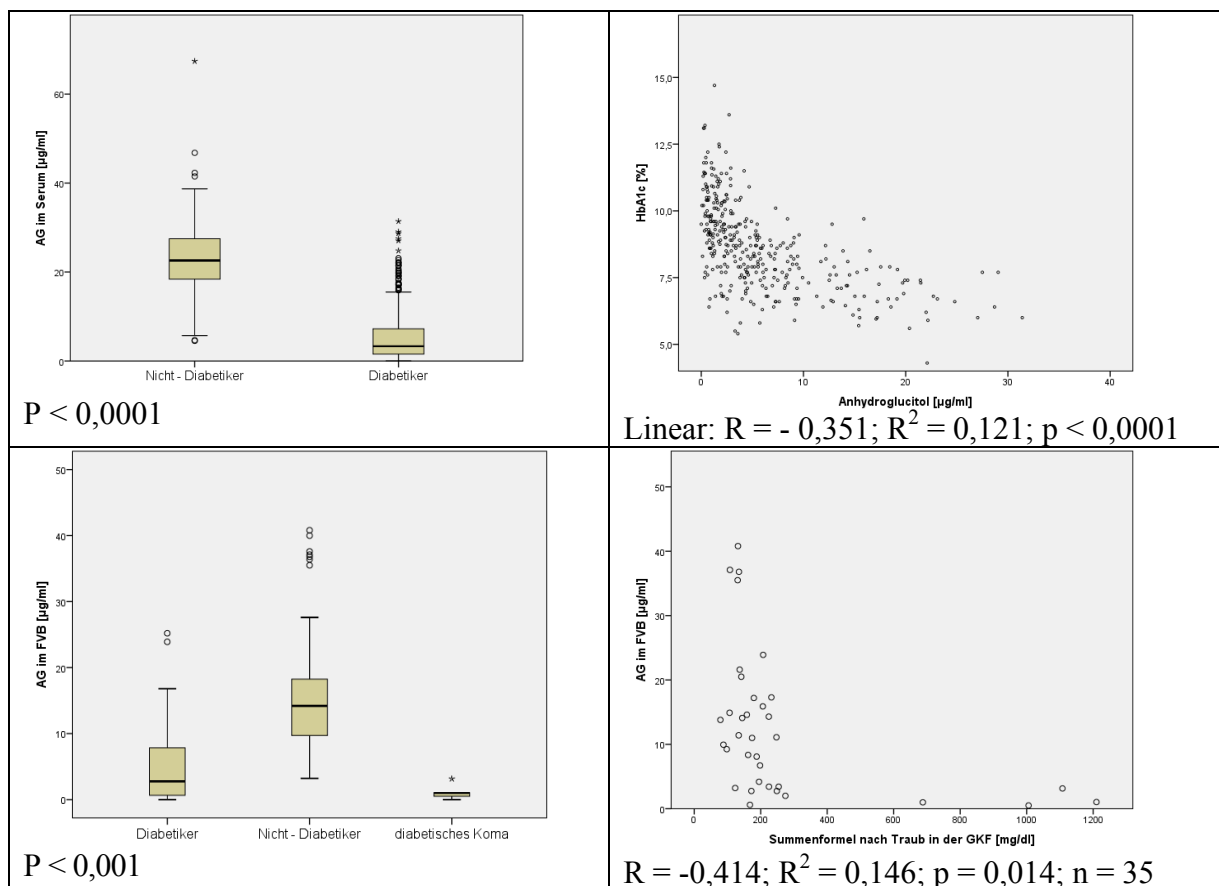


Abb. 5. oben links: Vergleich der ermittelten AG-Konzentrationen in Diabetikern und Nicht-Diabetikern im Lebenden. Oben rechts: Korrelation mit HbA1c im Blut bei Lebenden. Unten links: AG-Konzentrationen post mortem in Diabetikern, Nicht-Diabetikern und in Fällen mit Tod durch hyperglykämisches Koma nachgewiesen durch Glucosekonzentration in der GKF > 180 mg/dl und zusätzlich erhöhten Ketonkörpern im Blut. Unten rechts: Korrelation der AG-Konzentration im Femoralvenenblut mit Summenformel nach Traub in der GKF.

Wie wir nun zeigen konnten, besitzt AG auch post mortem den großen Vorteil der metabolischen Stabilität. Nach dem Tod kann es in etwa denselben Konzentrationen wie im Lebenden detektiert werden (Abbildung 5). Die AG-Konzentrationen waren gering niedriger als vor dem Tod. Die mittleren AG Konzentrationen bei lebenden Nicht-Diabetikern lagen bei 23,3 µg/ml, bei verstorbenen Nicht-Diabetikern bei 15,5 µg/ml ($p < 0,0001$). Die mittleren AG-Konzentrationen bei lebenden Diabetikern lagen bei 5,74 µg/ml, bei verstorbenen Diabetikern bei 4,74 µg/ml ($p < 0,0001$). Der Grund für diese Beobachtung liegt auch in der unterschiedlichen gemessenen Probenmatrix: in postmortem Fällen wurde Vollblut verwendet, in ante mortem Fällen Serum. Das Vollblut/Serum-Verhältnis wurde in unserer Studie mit 0,8 gemessen, das bedeutet, dass die Konzentrationen im Serum grundsätzlich höher sind als im Vollblut.

In Toten waren die mittleren AG Konzentrationen im FVB bei Nicht-Diabetikern ebenfalls signifikant höher als bei Diabetikern. Somit ist zumindest eine Aussage über die Diabetes-erkrankung möglich. Ein Cut-Off von > 10 µg/ml für einen gut eingestellten Glucosehaushalt, wie er im Lebenden vorgeschlagen wurde, kann auch post mortem gelten. Nur im Falle einer sehr niedrigen AG Konzentration kann jedoch ein Diabetes, der vor dem Tod nicht bekannt war, aufgrund der AG-Analytik aufgedeckt werden. Ein Diabetes kann aber aufgrund eines AG-Konzentration > 10 µg/ml nicht ausgeschlossen werden. Bei 5 Fällen mit Todesursache „diabetisches Koma“ waren die AG-Konzentrationen immer < 10 µg/ml und extrem niedrig. Die Konzentrationen unterscheiden sich zwar nicht signifikant von diabetischen Verstorbenen mit einer Summenformel im Normbereich, eine deutliche Korrelation zwischen der AG-Konzentration und der Summenformel nach Traub war nicht gegeben, die maximale Konzentration der Verstorbenen mit diabetischem Koma lag aber bei 3,15 µg/ml. AG kann als Alternative zur Messung des HbA1c oder Fructosamin angesehen werden, um abzusichern, ob der Verstorbene Diabetiker war und der Diabetes schlecht kontrolliert war. Im Falle eines diabetischen Komas werden sehr niedrige AG-Konzentrationen beobachtet.

4. Acknowledgements

Ich danke der GTFCh für die finanzielle Unterstützung und die tolle Möglichkeit, auf die TIAFT nach San Francisco reisen zu dürfen.

5. Literatur

1. Internat. Diabetes Fed. <http://derstandard.at/1254311950510/285-Millionen-Diabetiker-weltweit>. 2009.
2. Andresen EM, Lee JA, Pecoraro RE, Koepsell TD, Hallstrom AP, Siscovick DS. Underreporting of diabetes on death certificates, King County, Washington. *Am J Public Health* 1993;83:1021-4.
3. Fuller JH. Mortality trends and causes of death in diabetic patients. *Diabete Metab* 1993;19:96-9.
4. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 1997;20:1183-97.
5. Rathmann W, Haastert B, Icks A, et al. High prevalence of undiagnosed diabetes mellitus in Southern Germany: target populations for efficient screening. The KORA survey 2000. *Diabetologia* 2003;46:182-9.
6. Federal Statistic Office Germany. http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Presse/pm/2007/11/PD07_454_232.templateId=renderPrint.psml. 2007.
7. Thomas L. Labor und Diagnose. Indikationen und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik. 5. erweiterte Auflage, TH Books. 2000.
8. Butler PC, Rizza RA. Regulation of carbohydrate metabolism and response to hypoglycemia. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1989;18:1-25.
9. Hess C, Thomas A, Thevis M, Stratmann B, Quester W, Tschoepe D, Madea B, Musshoff F. Simultaneous determination and validated quantification of human insulin and its synthetic analogues in human blood serum by immunoaffinity purification and liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2012;404(6-7):1813-22
10. Hess C, Musshoff F, Madea B. Simultaneous identification and validated quantification of 11 oral hypoglycaemic drugs in plasma by electrospray ionisation liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2011;400(1):33-41.

11. Hess C, Stratmann B, Quester W, Madea B, Musshoff F, Tschöpe D. Clinical and forensic examinations of glycaemic marker 1,5-anhydroglucitol by means of high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Forensic Sci Int.* 2012;222(1-3):132-6.
12. Coe JI. Postmortem chemistries on human vitreous humor. *Am J Clin Pathol* 1969;51:741-50.
13. De Letter EA, Piette MH. Can routinely combined analysis of glucose and lactate in vitreous humor be useful in current forensic practice? *Am J Forensic Med Pathol* 1998;19:335-42.
14. Marks V, Teale JD. Hypoglycaemia in the adult. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1993;7:705-29.
15. Thevis M, Geyer H, Schanzer W. Identification of oral antidiabetics and their metabolites in human urine by liquid chromatography/tandem mass spectrometry--a matter for doping control analysis. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2005;19:928-36.
16. Wunder C. Systematische Untersuchungen zur Problematik postmortaler Insulin-Instabilität. Doktorarbeit am Institut für Rechtsmedizin der Universität Frankfurt. 2011.
17. Shires TK, Braddock KJ, Pulido JS. Insulin in the vitreous of the normal and streptozotocin-induced diabetic rat. *Peptides* 1992;13:671-5.
18. Thevis M, Thomas A, Schanzer W, Ostman P, Ojanpera I. Measuring insulin in human vitreous humour using LC-MS/MS. *Drug Test Anal* 2012;4:53-6.
19. Nowicka J, Skowronek R, Czech E, Kulikowska J, Olszowy Z. Comments on 'Measuring insulin in human vitreous humour using LC-MS/MS' by Thevis et al. *Drug Test Anal* 2012;10.
20. Thevis M, Thomas A, Schanzer W, Ostman P, Ojanpera I. Measuring insulin in human vitreous humour using LC-MS/MS. *Drug Test Anal* 2012;4:53-6.
21. Thevis M, Thomas A, Schanzer W. Mass spectrometric determination of insulins and their degradation products in sports drug testing. *Mass Spectrom Rev* 2008;27:35-50.
22. Kuerzel GU, Shukla U, Scholtz HE, et al. Biotransformation of insulin glargine after subcutaneous injection in healthy subjects. *Curr Med Res Opin* 2003;19:34-40.
23. Authier F, Danielsen GM, Kouach M, Briand G, Chauvet G. Identification of insulin domains important for binding to and degradation by endosomal acidic insulinase. *Endocrinology* 2001;142:276-89.
24. Authier F, Danielsen GM, Kouach M, Briand G, Chauvet G. Identification of insulin domains important for binding to and degradation by endosomal acidic insulinase. *Endocrinology* 2001;142:276-89.
25. Thomas A, Thevis M, Delahaut P, Bosseloir A, Schanzer W. Mass spectrometric identification of degradation products of insulin and its long-acting analogues in human urine for doping control purposes. *Anal Chem* 2007;79:2518-24.
26. Thomas A, Thevis M, Delahaut P, Bosseloir A, Schanzer W. Mass spectrometric identification of degradation products of insulin and its long-acting analogues in human urine for doping control purposes. *Anal Chem* 2007;79:2518-24.
27. Marks V. Insulin murders. *Med Leg J* 2009;77:39-47.
28. Robbins DC, Andersen L, Bowsher R, et al. Report of the American Diabetes Association's Task Force on standardization of the insulin assay. *Diabetes* 1996;45:242-56.
29. Karam JH. Pancreatic hormones and diabetes mellitus.
30. Iwase H, Kobayashi M, Nakajima M, Takatori T. The ratio of insulin to C-peptide can be used to make a forensic diagnosis of exogenous insulin overdose. *Forensic Sci Int* 2001;115:123-7.
31. Batalis NI, Prahlow JA. Accidental insulin overdose. *J Forensic Sci* 2004;49:1117-20.
32. Mayors FH. *Review of Medical Pharmacology* ed 7. Los Altos, California, Lange Medical Publications. In: Jawetz E, Goldfein A, ed. 1980.
33. Guyton. Insulin, Glucagon and Diabetes. In: *Textbook of medical physiology*, 8th edn. Philadelphia. WB Saunders 20, Chp 78. 1991.
34. Katzen HM, Tietze F, Stetten D, Jr. Further studies on the properties of hepatic glutathione-insulin transhydro-genase. *J Biol Chem* 1963;238:1006-11.:1006-11.
35. Lebowitz MR, Blumenthal SA. The molar ratio of insulin to C-peptide. An aid to the diagnosis of hypoglycemia due to surreptitious (or inadvertent) insulin administration. *Arch Intern Med* 1993;153:650-5.
36. Hess C, Madea B, Daldrup T, Musshoff F. Determination of hypoglycaemia induced by insulin or its synthetic analogues post mortem. *Drug Test Anal.* 2013;5(9-10):802-7.
37. Yamanouchi T, Tachibana Y, Akanuma H, et al. Origin and disposal of 1,5-anhydroglucitol, a major polyol in the human body. *Am J Physiol* 1992;263:E268-E273.
38. Yamanouchi T, Tachibana Y, Akanuma H, et al. Origin and disposal of 1,5-anhydroglucitol, a major polyol in the human body. *Am J Physiol* 1992;263:E268-E273.
39. Yamanouchi T, Ogata N, Tagaya T, et al. Clinical usefulness of serum 1,5-anhydroglucitol in monitoring glycaemic control. *Lancet* 1996;347:1514-8.
40. Yamanouchi T, Ogata N, Tagaya T, et al. Clinical usefulness of serum 1,5-anhydroglucitol in monitoring glycaemic control. *Lancet* 1996;347:1514-8.
41. McGill JB, Cole TG, Nowatzke W, et al. Circulating 1,5-anhydroglucitol levels in adult patients with diabetes reflect longitudinal changes of glycemia: a U.S. trial of the GlycoMark assay. *Diabetes Care* 2004;27:1859-65.
42. McGill JB, Cole TG, Nowatzke W, et al. Circulating 1,5-anhydroglucitol levels in adult patients with diabetes reflect longitudinal changes of glycemia: a U.S. trial of the GlycoMark assay. *Diabetes Care* 2004;27:1859-65.
43. Fukumura Y, Tajima S, Oshitani S, et al. Fully enzymatic method for determining 1,5-anhydro-D-glucitol in serum. *Clin Chem* 1994;40:2013-6.
44. Fukumura Y, Tajima S, Oshitani S, et al. Fully enzymatic method for determining 1,5-anhydro-D-glucitol in serum. *Clin Chem* 1994;40:2013-6.