

**Untersuchungen zu den Alkoholmarkern
Ethylglucuronid und Ethylsulfat sowie zu
Fettsäureethylestern in unterschiedlichen Matrices**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

von
Dipl.-Chem. Maria Elena Albermann
aus Köln

2012

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: 25.10.2012
Erscheinungsjahr: 2012

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Oktober 2007 bis August 2012 am Institut für Rechtsmedizin der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Frank Mußhoff angefertigt.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. F. Mußhoff danke ich für die interessante Themenstellung und die Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Für die Übernahme der Zweitbetreuung seitens der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät danke ich Herrn Prof. Dr. K.-J. Steffens, Institut für Pharmazeutische Technologie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Bei Herrn Prof. Dr. B. Madea bedanke ich mich für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit am Institut für Rechtsmedizin in Bonn durchführen zu können sowie für die großzügige Unterstützung bei Tagungsteilnahmen.

Insbesondere danke ich allen Freiwilligen, die sich den verschiedenen Trink- und Essversuchen mit Inkaufnahme aller Konsequenzen gestellt haben. Weiteren Dank schulde ich Frau Dr. Elke Doberentz für die ausdauernde Probennahme in der Abteilung für Abhängigkeitserkrankungen und Psychotherapie der Rheinischen Landeskliniken, Bonn.

Einen besonderer Dank auch an Chantal und Heidi für die unzähligen Analysen und die fast immer vorhandene Arbeitsbereitschaft. Jörg Bayer danke ich für die gemeinsame Zeit und für die vielen Tipps, die die Arbeit mit den manchmal störrischen Geräten wesentlich erleichtert haben.

Mein Dank gilt des Weiteren allen Mitarbeitern der Tox für die stete Hilfsbereitschaft sowie für die gute Arbeitsatmosphäre, die über die eine oder andere schwere Stunde hinweg geholfen hat. Den Auszubildenden und Praktikanten danke ich für die sehr hilfreiche Unterstützung meiner praktischen Tätigkeiten. Leonie Aengenheister danke ich für ihre Unterstützung im Rahmen ihrer Bachelorarbeit.

Ganz herzlichen Dank auch an meine Freunde, die mich während der ganzen Zeit immer unterstützt und aufgemuntert haben, vor allem an Katja Halbritter und Xenia Mielke. Xenia Mielke danke ich zudem für die Durchsicht diverser Manuskripte. Zuletzt möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Mutter, Harriet Bredemeyer und Jonas Weinen für ihre grenzenlose Geduld sowie ihre fortwährende Unterstützung bedanken, ohne die diese Arbeit und vieles mehr nicht zu Stande gekommen wäre.

Publikationsverzeichnis

Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht

Albermann ME, Musshoff F, Madea B (2010) A fully validated high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of ethyl glucuronide in hair for the proof of strict alcohol abstinence. *Anal. Bioanal. Chem.* 396: 2441 – 2447.

Musshoff F, Albermann E, Madea B (2010) Ethyl glucuronide and ethyl sulfate in urine after consumption of various beverages and foods - misleading results? *Int. J. Legal Med.* 124: 623 – 630.

Albermann ME, Musshoff F, Madea B (2011) Comparison of ethyl glucuronide (EtG) and fatty acid ethyl esters (FAEEs) concentrations in hair for testing abstinence. *Anal. Bioanal. Chem.* 400: 175 – 181.

Albermann ME, Musshoff F, Madea B (2011) Ethyl glucuronide in hair and urine – examinations on actual cut-off values. *Toxichem Krimtech* 78: 357-360.

Albermann ME, Musshoff F, Madea B (2012) A high performance liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method for the determination of ethyl glucuronide and ethyl sulfate in urine validated according to forensic guidelines. *J. Chromatogr. Sci.* 50: 51 – 56.

Albermann ME, Musshoff F, Aengenheister L, Madea B (2012) Investigations on the influence of different grinding procedures on measured ethyl glucuronide concentrations in hair determined with an optimized and validated LC-MS/MS method. *Anal. Bioanal. Chem.* 403:769 – 776.

Albermann ME, Musshoff F, Doberentz E, Heese P, Banger M, Madea B (2012) Preliminary investigations on ethyl glucuronide and ethyl sulfate cutoffs for detecting alcohol consumption on the basis of an ingestion experiment and on data from withdrawal treatment. *Int. J. Legal Med.* DOI: 10.1007/s00414-012-0725-3.

Albermann ME, Madea B, Musshoff F (2012) A SPME-GC/MS procedure for the determination of fatty acid ethyl esters in hair for confirmation of abstinence test results. *J. Chromatogr. Sci.*, submitted.

Weitere Publikationen

Albermann ME, Musshoff F, Hagemeyer L, Madea B (2010) Determination of glycyrrhetic acid after consumption of liquorice and application to a fatality. *For. Sci. Int.* 197: 35 – 39.

Vorträge

Albermann ME, Mußhoff F, Hagemeyer L, Madea B: Tod durch Lakritz? Übermäßige Glycyrrhizin Aufnahme als Auslöser für eine tödliche Stoffwechsellage? 17. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin Region Nord. 30. – 31.05.2008, Essen.

Albermann ME, Mußhoff F, Madea B: Ein positiver EtG/EtS-Befund ist möglich obwohl das Bier „alkoholfrei“ war. 88. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin, 22. – 26.09.2009, Basel/Schweiz.

Albermann ME, Mußhoff F, Doberentz E, Banger M, Madea B: Zum Nachweisfenster von Ethylglucuronid im Urin nach chronischem Alkoholabusus und bei moderatem Konsum. 19. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin Region Nord, 28. – 29.5.2010, Gießen.

Albermann ME, Musshoff F, Madea B: Comparison of the ethyl glucuronide (EtG) and fatty ethyl esters (FAEEs) concentrations in hair for testing abstinence. 48th Annual Meeting of the Int. Association of Forensic Toxicologists (TIAFT) Joint Meeting with the Society of Toxicological and Forensic Chemistry (GTFCh), 29.08. – 02.09.2010, Bonn.

Albermann ME, Mußhoff F, Doberentz E, Banger M, Madea B: Ethylglucuronid und Fettsäureethylester-Konzentrationen in Haaren bei Alkoholproblematik und Vergleich mit Trinkangaben. 89. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin, 21. – 25.09.2010, Berlin.

Posterpräsentationen

Albermann ME, Musshoff F, Madea B: Nachweis von Ethylglucuronid (EtG) und Ethylsulfat (EtS) in Haaren mittels Flüssigkeitschromatographie/Elektrospray Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS). 87. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin. 24. – 27.09.2008 Dresden.

Albermann ME, Musshoff F, Hagemeyer L, Madea B: Determination of glycyrrhetic acid after consumption of liquorice and application to a fatality. 21st Congress IALM, 28. – 30.05.2009, Lissabon/Portugal.

Albermann ME, Musshoff F, Madea B: Validation of a liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method (LC-MS/MS) for the quantification of ethyl glucuronide in hair according to the guidelines of forensic toxicology. 47th Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT), 23. – 27.8.2009, Genf/Schweiz.

Albermann ME, Musshoff F, Madea B: Störsignale — ein Problem auch bei der Analyse von Ethylglucuronid in Haaren mittels LC-MS/MS. 88. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin, 22. – 26.09.2009, Basel/Schweiz.

Albermann ME, Musshoff F, Madea B: Consumption of Certain Foods or Drinks can cause positive urinary EtG/EtS Results. IVth Mediterranean Academy of Forensic Sciences Meeting. 14. – 18.10.2009, Antalya/Turkei.

Albermann ME, Musshoff F, Madea B: Ethyl glucuronide – Concentrations in pulverized and cut hair samples. Joint Meeting of the Society of Forensic Toxicologists (SOFT) & the Int. Association of Forensic Toxicologists (TIAFT), 25. – 30.09.2011, San Francisco/USA.

Albermann ME, Musshoff F, Madea B: Ethyl glucuronide – Concentrations in pulverized and cut hair samples. 8th International Symposium on Advances in Legal Medicine (ISALM) combined with 90th Annual Conference German Society of Legal Medicine, 26. – 30.09.2011, Frankfurt am Main.

Albermann ME, Musshoff F, Madea B: Ethyl glucuronide – Concentrations in pulverized and cut hair samples. 19th World Meeting of the International Association of Forensic Sciences, 14. – 17.09.2011, Madeira/Portugal.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Summary	5
3	Einleitung und Zielsetzung	9
4	Kenntnisstand	11
4.1	Alkohol	11
4.1.1	Metabolismus von Alkohol	12
4.2	Alkoholkonsummarker	13
4.2.1	Allgemein	13
4.2.2	Weit verbreitete Biomarker	14
4.2.3	Weitere Biomarker	18
4.3	Ethylglucuronid (EtG) und Ethylsulfat (EtS)	19
4.3.1	Allgemeines zu EtG und EtS	19
4.3.2	Anwendungsgebiete	20
4.3.3	EtG und EtS in Urin und anderen Körperflüssigkeiten	20
4.3.4	EtG in Haaren	29
4.4	Fettsäureethylester (FAEE)	36
4.4.1	Allgemeines zu FAEE	36
4.4.2	FAEE in Haaren	38
4.5	Untersuchte Matrices	45
4.5.1	Urin	45
4.5.2	Haare	46
4.6	Instrumentelle Analytik	51
4.6.1	Immunoassays	51
4.6.2	Chromatographie	53
4.6.3	Massenspektrometrie	57
4.6.4	Festphasenmikroextraktion (engl. SPME)	60
4.7	Validierung	63
4.7.1	Selektivität	63
4.7.2	Linearität der Kalibration	63
4.7.3	Analytische Grenzen	64
4.7.4	Präzision und Genauigkeit	64
4.7.5	Stabilität	64
4.7.6	Wiederfindungsrate und Extraktionsausbeute	65
4.7.7	Matrixeffekte und Wiederfindung (für LC-MS/MS)	65

5	Material	67
5.1	Geräte	67
5.1.1	Großgeräte	67
5.1.2	Software	67
5.1.3	Geräte zur Probenvorbereitung	67
5.2	Verbrauchsmaterialien	68
5.3	Chemikalien und Standardlösungen	68
5.3.1	Chemikalien	68
5.3.2	Standardlösungen EtG und EtS	69
5.3.3	Laufmittel für die LC-MS/MS	69
5.3.4	Standardlösungen FAEE	69
5.3.5	Phosphatpuffer nach Sørensen (pH 7,6)	70
5.4	Probengewinnung und Asservierung	70
5.4.1	Urinproben	70
5.4.2	Haarproben	70
6	Methoden - Entwicklung und Validierung	71
6.1	Bestimmung von EtG und Kreatinin in Urin mittels ELISA	71
6.1.1	Aufarbeitung der Proben	71
6.1.2	Ergebnisse der vergleichende Analysen	71
6.1.3	Diskussion	71
6.2	Bestimmung von EtG und EtS in Urin mittels LC-MS/MS	73
6.2.1	Aufarbeitung der Proben	73
6.2.2	LC-MS/MS-Methode	74
6.2.3	Validierung des Verfahrens	74
6.2.4	Ergebnisse der Ringversuche (GTFCh)	77
6.2.5	Alternative Messmethode	78
6.2.6	Diskussion	79
6.3	Bestimmung von EtG in Haaren mittels LC-MS/MS	80
6.3.1	Optimierung des Mahlverfahrens für Haarproben	80
6.3.2	Aufarbeitung der Proben	82
6.3.3	LC-MS/MS-Methode	83
6.3.4	Validierung des Verfahrens	83
6.3.5	Ergebnisse der Ringversuche (GTFCh)	87
6.3.6	Diskussion	87
6.4	Bestimmung von FAEE in Haaren mittels HS-SPME/GC-MS	89
6.4.1	Aufarbeitung der Proben	89
6.4.2	HS-SPME/GC-MS-Methode	89
6.4.3	Validierung des Verfahrens	90
6.4.4	Diskussion	94
7	Studien	97
7.1	Bestimmung von EtG in Haaren im Rahmen von Abstinenzuntersuchungen	97
7.1.1	Einbezogene Proben und durchgeführte Analysen	97
7.1.2	Ergebnisse	97
7.1.3	Diskussion	97

7.2	Einfluss der Haarzerkleinerung auf die gemessenen EtG-Konzentrationen	99
7.2.1	Einbezogene Proben und durchgeführte Analysen	99
7.2.2	Ergebnisse	102
7.2.3	Diskussion	103
7.3	EtG und FAEE in Haaren aus Abstinenzuntersuchungen	104
7.3.1	Einbezogene Proben und durchgeführte Analysen	105
7.3.2	Ergebnisse	105
7.3.3	Diskussion	106
7.4	EtG und FAEE in Haaren von Alkoholikern	109
7.4.1	Einbezogene Proben	109
7.4.2	Durchgeführte Analysen	110
7.4.3	Ergebnisse	111
7.4.4	Diskussion	114
7.5	Retrospektive Auswertung der EtG-Konzentrationen in Urinen aus Ab- stinenzuntersuchungen	118
7.5.1	Einbezogene Proben und durchgeführte Analysen	118
7.5.2	Ergebnisse	118
7.5.3	Diskussion	118
7.6	EtG und EtS in Urin nach dem Konsum alkoholhaltiger Lebensmittel	119
7.6.1	Studiendesign	120
7.6.2	Durchgeführte Analysen	120
7.6.3	Ergebnisse	121
7.6.4	Diskussion	125
7.7	Untersuchungen zum Nachweisfenster von EtG und EtS in Urin	128
7.7.1	Studiendesign	128
7.7.2	Durchgeführte Analysen	130
7.7.3	Ergebnisse	130
7.7.4	Diskussion	134
8	Schlussfolgerungen und Ausblick	137
9	Literaturverzeichnis	141

Abbildungsverzeichnis

4.1	Erfasste Alkoholunfälle insgesamt sowie Alkoholunfälle mit Personenschäden im Zeitraum von 1995 bis 2005. Quelle: Statistisches Bundesamt [8]	12
4.2	Übersicht über die enzymatische Oxidation von Ethanol zu Essigsäure nach [37].	13
4.3	Chemische Strukturen von EtG, EtS.	19
4.4	Übersicht über die verschiedenen Bildungswege von FAEE nach [2]. . . .	37
4.5	Chemische Strukturen der vier FAEE: Ethylmyristat (C14), Ethylpalmitat (C16), Ethyloleat (Δ C18) und Ethylstearat (C18).	39
4.6	Struktur der obersten Hautschichten (1.) und des Haarfollikels (2.) sowie ein Querschnitt des Haares (3.) übernommen aus [254].	47
4.7	Verschiedene Einlagerungs- und Eliminationsmechanismen in die Haar-matrix übernommen aus [252].	49
4.8	Schematische Darstellung der Abläufe in Immunoassays bei nicht vorhan-den sein oder Vorliegen der entsprechenden Droge.	52
4.9	Schematische Darstellung des Prinzips der Chromatographie nach [276].	54
4.10	Schematische Darstellung eines Chromatogramms nach [277].	54
4.11	Schematische Darstellung eines idealen Peaks in Gauß-Form (links) sowie eine Peakverbreiterung durch Tailing (Mitte) sowie durch Fronting (rechts) [277].	56
4.12	Schematische Darstellung einer ESI Ionenquelle nach [278].	58
4.13	Verschiedene Messmodi eines Tandem-Massenspektrometers nach [280].	60
4.14	Prinzip des SPME-Verfahrens: Ad- bzw. Absorption direkt aus der Probe (a) bzw. aus dem Dampfraum (b), Überführung in den Injektor (c) sowie Desorption (d).	61
6.1	Vierfeldertafel für den Vergleich von EtG-Konzentrationen in Urin, ermit-telt mittels LC-MS/MS (Grenzwert: 0,1 mg/L) und ELISA (Grenzwert: 0,08 mg/L).	72
6.2	Mittels ELISA ermittelte EtG-Konzentrationen aufgetragen gegen die LC-MS/MS-Ergebnisse.	72
6.3	MRM-Chromatogramme für EtG (A) und EtS (B) von einer Leerprobe (1), einem aufgestockten Leerurin (je 0,1 mg/L) (2) und einer authenti-schen Urinprobe ($c_{EtG} = 0,054$ mg/L, $c_{EtS} = 0,028$ mg/L) (3), untersucht mit der validierten LC-MS/MS-Methode sowie einem aufgestockten Leer-urin (je 0,1 mg/L), analysiert mit der in Abschnitt 6.2.5 vorgestellten Alternativmethode (4).	75

6.4	Kugelmühle Fast Prep-24 (MP-Biomedicals) (I), Nahansicht mit 24er Probenhalter und Mahlgefäßen (II), Kugeln aus rostfreiem Stahl ($\varnothing = 3\text{ mm}/5\text{ mm}$) (Retsch) (III).	81
6.5	Fotos von Haarproben (75 mg) zerkleinert mit der Schere bzw. gemahlen.	82
6.6	MRM-Chromatogramme von extrahierten Haarproben analysiert mit Methode 1 (Polar RP) von Leerhaaren (A), einer aufgestockten Probe bei 7 pg/mg (B) sowie von authentischen Haarproben bei denen Störsignale auftauchten (C: nicht eindeutig, D: 22 pg/mg).	84
6.7	MRM-Chromatogramme von extrahierten Haarproben analysiert mit Methode 2 (Hypercarb) von Leerhaaren (E), einer aufgestockten Probe bei 7 pg/mg (F) sowie von authentischen Haarproben bei denen Methode 1 zu Störsignalen führte (siehe Abbildung 6.6 C und D) (G: 2,4 pg/mg, H: 24 pg/mg).	85
6.8	GC-MS Chromatogramme von Kinderhaaren (A), aufgestockten Haaren mit je 0,05 ng/mg (B) sowie von einer positiv getesteten Haarprobe ($c_{\text{FAEE}} = 0,26\text{ ng/mg}$) (C).	91
6.9	Vergleich der FAEE-Peakflächen bei zwei verschiedenen Konzentrationen (0,05 und 1,0 ng/mg) nach einer einwöchigen Lagerung bei -20°C : im Extraktionsgefäß mit <i>n</i> -Heptan und DMSO (DMSO), des <i>n</i> -Heptan Extraktes (<i>n</i> -Heptan), nach dem Eindampfen des <i>n</i> -Heptan Extraktes (Eingedampft) und nach Zugabe des Phosphatpuffers (Mit Puffer).	94
7.1	Gemessene EtG-Konzentrationen in Haaren aus Abstinenzuntersuchungen sowie unterschiedliche Grenzwerte (waagerechte Linien).	98
7.2	Verteilung der gemessenen EtG-Konzentrationen aus Abstinenzuntersuchungen.	98
7.3	MRM-Chromatogramme von einer negativ (1) sowie einer positiv (2) getesteten authentischen Haarprobe, analysiert im geschnittenen (a) bzw. im gemahlten (b) Zustand.	100
7.4	Verteilung der ermittelten FAEE- (links) und EtG- (rechts) Konzentrationen von 160 im Rahmen von Abstinenzuntersuchungen analysierten Haarproben.	105
7.5	Links: gemessene EtG- und FAEE-Konzentrationen in den 160 Haarproben aus Abstinenzuntersuchungen, rechts: Neunfeldertafel mit Vergleichsdaten.	106
7.6	Vergleichende Untersuchung von Haarproben mit EtG-Konzentrationen zwischen 4 und 10 pg/mg. Links: gemessene EtG- und FAEE-Konzentrationen, sortiert nach den EtG-Konzentrationen; rechts: Vierfeldertafel mit der Anzahl an übereinstimmenden und abweichenden Resultaten.	107
7.7	Verteilung der 160 Fälle in solche, in denen beide Marker übereinstimmen, bzw. in Fälle ohne eindeutiges Ergebnis.	107
7.8	Gemessene EtG- und FAEE-Konzentrationen (oben: Ergebnisse der 1. Messreihe sowie drei Kreuztabellen mit dem Vergleich der nach aktuellen Grenzwerten bewerteten Ergebnisse; unten: Ergebnisse der 2. Messreihe).	112

7.9	Neun-Felder-Tafeln mit den Ergebnissen des Vergleiches zwischen gemessener EtG-/FAEE-Konzentration und dem angegebenen korrigierten Alkoholkonsum, aufgeteilt in die Daten der ersten und zweiten Messreihe und dem Gesamtergebnis. Dargestellt sind zudem die Ergebnisse bei der ausschließlichen Betrachtung des ersten Segments.	113
7.10	Verteilung der gemessenen EtG-Konzentrationen von 150 Urinproben aus Abstinenzuntersuchungen. Alle Proben mit EtG-Konzentrationen > 0,16 mg/L sind in einem Balken (grau) zusammengefasst.	119
7.11	Gemessene Alkoholkonzentrationen von sechs Trauben- und neun Apfelsäften, direkt nach dem Öffnen des Gebindes, nach sieben Tagen Lagerung bei Raumtemperatur (RT) und bei 2–8°C im Kühlschrank.	120
7.12	Fotos von den verwendeten Lebensmitteln, Apfelsaft (A), roter Traubensaft (B), Weinsauerkraut (C), alkoholfreies Bier (D).	122
7.13	Zeitlicher Verlauf der gemessenen EtS-Konzentrationen nach dem Trinken von 1,5–2,0 L Traubensaft (links) sowie die gemessenen EtG-Konzentrationen nach dem Verzehr von 750–1320 g Sauerkraut (rechts).	123
7.14	Fotos der konsumierten Bananen während der lichtgeschützten Lagerung bei 18–20°C zwei (a), vier (b), sieben (c) und neun (d) Tage nach dem Kauf.	123
7.15	Zeitlicher Verlauf der gemessenen EtG-Konzentrationen (links) sowie der auf eine Kreatininkonzentration von 100 mg/dL normierten Konzentrationen (rechts). nach dem Konsum von reifen Bananen.	124
7.16	Zeitlicher Verlauf der gemessenen EtG- (A) und EtS- (B) Konzentrationen sowie der auf eine Kreatininkonzentration von 100 mg/dL normierten EtG- (C) und EtS- (D) Konzentrationen nach dem Konsum von 2–3 L alkoholfreiem Bier.	125
7.17	Zeitlicher Verlauf der EtG- und EtS-Konzentrationen, gemessen (A,C) und auf eine Kreatininkonzentration von 100 mg/dL normiert (B, D) nach dem Konsum von 0,1 bzw. 0,2 L Weißwein oder 0,33 bzw. 0,66 L Bier sowie eine vergrößerte Darstellung des grenzwertigen Bereiches (A1,B1,C1,D1).	131
7.18	Gemessene EtG- (oben) und EtS- (unten) Konzentrationen im Urin der Entzugspatienten im Bereich der betrachteten Grenzwerte (waagerechte Linien). Die kleinen Diagramme oben rechts zeigen eine Übersicht über den gesamten Konzentrationsbereich.	133

Tabellenverzeichnis

4.1	Übersicht über bisher veröffentlichte Methoden zum Nachweis von EtG und EtS in Urin und Serum.	22
4.2	Weitere Fakten (z. B. verwendete Säule und Laufmittel) der veröffentlichten LC-MS/MS Methoden zur Quantifizierung von EtG und EtS in Urin und Serum.	23
4.3	Zusammenfassung der Ergebnissen von Studien, in denen die EtG/EtS-Konzentrationen nach der Gabe einer definierten Alkoholmenge im Urin bestimmt wurden.	25
4.4	Übersicht über bisher veröffentlichte Methoden zum Nachweis von EtG in Haaren.	30
4.5	Ausführliche Informationen zu den Methoden, die EtG im Haar mittels LC-MS/MS quantifizieren.	31
4.6	In vorherigen Studien gefundene EtG-Konzentrationen in den Haaren von abstinenten Personen, moderaten sowie starken Trinkern und Verstorbenen mit einer prämortalen Alkoholproblematik sowie verwendete LODs.	33
5.1	Zusammenfassung der Verbrauchsmaterialien mit einer genauen Bezeichnung sowie der Hersteller.	68
5.2	Im Rahmen der Arbeit verwendete Chemikalien mit Angabe des Herstellers und des Reinheitsgrades.	69
6.1	Ausgewählte Ionenübergänge für den Nachweis von EtG und EtS sowie der deuterierten Verbindungen im MRM-Mode.	74
6.2	Ermittelte Daten für die Genauigkeit sowie Intra- und Inter-Day Präzision für den Nachweis von EtG und EtS in Urin.	76
6.3	Bestimmte Extraktionsausbeuten und Matrixeffekte bei niedrigen (0,1 mg/L) und hohen (1,5 mg/L) EtG- und EtS-Konzentrationen in %. . . .	76
6.4	Prozentuale Abweichungen der EtG-/EtS-Konzentrationen (0,1, 0,5 und 1,5 mg/L) nach drei- bzw. siebentägiger Lagerung im Autosampler bei 10°C.	77
6.5	Ergebnisse der Untersuchungen zur Stabilität von EtG und EtS in Urin bei drei verschiedenen Konzentrationen (0,1, 0,5 und 1,5 mg/L) nach einer zwei- bzw. sechsmonatigen Lagerung bei -20°C sowie nach drei Auftauzyklen.	77
6.6	Bisher eingereichte Ergebnisse, Sollwerte, akzeptierte Bereiche sowie ermittelte Abweichungen des Ringversuchs „Ethylglucuronid in Serum und Urin“.	78

6.7	Mittels Regressionsanalyse ermittelte Geradengleichungen, Bestimmtheitsmaße sowie die LODs und LOQs von beiden validierten Methoden zum Nachweis von EtG in Haaren.	86
6.8	Ermittelte Daten für die Genauigkeit sowie die Intra- und Inter-Day Präzision für beide Methoden, bestimmt bei drei Konzentrationen im unteren, mittleren und oberen Kalibrationsbereich.	86
6.9	Gefundene prozentuale Extraktionsausbeuten und Matrixeffekte für beide Methoden ermittelt bei jeweils zwei verschiedenen Konzentrationen. . .	87
6.10	Ergebnisse der Ringversuche „Ethylglucuronid in Haar“ aus den Jahren 2010 und 2011.	87
6.11	Parameter für die SPME und die GC-MS-Methode sowie die verwendeten m/z-Werte zum Nachweis der vier FAEE im SIM-Modus.	90
6.12	Ermittelte Kalibriergeraden mit Bestimmtheitsmaßen (r^2) sowie die berechneten LODs und LOQs für die vier FAEE.	92
6.13	Ergebnisse für die Genauigkeit und die Intra- und Inter-Day-Präzision für die validierte Methode zur Quantifizierung der FAEE.	92
6.14	Über den gesamten Kalibrationsbereich ermittelte Wiederfindungen und Extraktionsausbeuten für die vier untersuchten FAEE in Haaren.	93
7.1	Alle gemessene EtG-Konzentrationen beim Vergleich von geschnittenen und gemahlten Haaren sowie berechnete Differenzen und prozentuale Abweichungen.	101
7.2	Deskriptive Statistik für die ermittelten EtG-Konzentrationen sowie Konzentrationsdifferenzen in geschnittenen und gemahlten Haaren.	102
7.3	Vergleich der Präzisionen von beiden Zerkleinerungsmethoden durch dreifache Analyse zweier positiv getesteter Haarproben.	103
7.4	Persönliche Daten der Patienten aus der Entzugsklinik, die an der Studie teilgenommen haben.	110
7.5	Informationen über die untersuchten Segmente, die angegebenen, korrigierten Alkoholmengen sowie die gemessenen EtG- und FAEE-Konzentrationen.	111
7.6	Zusammenfassung der Ergebnisse aus dem Vergleich der EtG-/FAEE-Konzentrationen und dem angegebenen, korrigierten Alkoholkonsum. . .	116
7.7	Persönliche Daten aller Teilnehmer sowie die jeweils konsumierten Mengen der ausgewählten alkoholhaltigen Lebensmittel.	121
7.8	Zusammengefasste Ergebnisse der durchgeführten Trink- und Essversuche.	127
7.9	Persönliche Daten der Teilnehmer sowie die Einteilung der Gruppen mit den jeweils konsumierten Mengen an Wein oder Bier.	129
7.10	Persönliche Daten der Studienteilnehmer sowie die bei der stationären Aufnahme gemessenen Atemalkoholkonzentrationen (AAK).	129
7.11	Die maximalen EtG- und EtS-Konzentrationen, die Zeiten bis zu den Maxima, die maximalen Nachweisfenster sowie die Anzahl von Probanden, bei denen die EtG- und EtS-Konzentrationen nach 24 h oberhalb verschiedener Grenzwerte lagen.	132

Abkürzungsverzeichnis

5-HIAA	5-Hydroxyindolylessigsäure (engl. 5-Hydroxyindoleacetic acid)
5-HTOL	5-Hydroxytryptophol
AAK	Atemalkoholkonzentration
ACN	Acetonitril
ADH	Alkohol-Dehydrogenase
ALT	Alanin-Aminotransferase
APCI	Chemische Ionisation unter Atmosphärendruck (engl. Atmospheric-pressure chemical ionization)
AST	Aspartat-Aminotransferase
AUC	Fläche unter der Kurve (engl. Area under the curve)
BAK	Blutalkoholkonzentration
BMI	Body-Mass-Index
CDT	Kohlenhydrat-defiziente Transferrine
CE	Kapillarelektrophorese (engl. Capillary electrophoresis)
dem.	demineralisiert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DVB	Divinylbenzol
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ESI	Elektrospray-Ionisation
EtG	Ethylglucuronid
EtG100	EtG normiert auf eine Kreatininkonzentration von 100 mg/dL
EtS	Ethylsulfat
EtS100	EtS normiert auf eine Kreatininkonzentration von 100 mg/dL
FAEE	Fettsäureethylester (engl. Fatty Acid Ethyl Ester)

FID	Flammenionisationsdetektor
GC-MS	Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
GGT	γ -Glutamyltransferase
GTFCh	Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie
HS-SPME	Dampfraum-Festphasenmikroextraktion (engl. Headspace-Solid phase microextraction)
IS	Interner Standard
LC-MS/MS	Flüssigchromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie-Kopplung
Lit.	Literatur
LOD	Nachweisgrenze (engl. Limit of detection)
LOQ	Bestimmungsgrenze (engl. Limit of quantification)
MCV	Mittleres korpuskuläres Erythrozytenvolumen (engl. Mean corpuscular/cell volume)
MW	Mittelwert
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
PDMS	Polydimethylsiloxan
PETH	Phosphatidylethanol
ROC	Grenzwertoptimierungskurve (engl. Receiver operating characteristic)
RPC	Umkehrphasenchromatographie (engl. Reversed-phase chromatography)
RSD	Relative Standardabweichung
SD	Standardabweichung
SoHT	Society of Hair Testing
SPE	Festphasenextraktion
SPME	Festphasenmikroextraktion (engl. Solid phase microextraction)
StGB	Strafgesetzbuch
StVG	Straßenverkehrsgesetz
WHO	World Health Organization

1 Zusammenfassung

Der Konsum von Alkohol lässt sich unter anderem durch eine Bestimmung der direkten Alkoholmarker Ethylglucuronid (EtG), Ethylsulfat (EtS) oder ausgewählter Fettsäureethylestern (FAEE) in Haaren sowie verschiedenen Körperflüssigkeiten nachweisen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Nachweismethoden für die Quantifizierung von EtG bzw. FAEE in Haaren sowie EtG und EtS in Urin optimiert und validiert und diverse Studien zum besseren Verständnis der Biomarker durchgeführt.

Der Nachweis von EtG in Haaren ermöglicht eine retrospektive Einschätzung des Alkoholkonsums über mehrere Monate. Ein empfindliches Flüssigchromatographie-Verfahren mit Tandem-Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS/MS) mit einer Bestimmungsgrenze (4 pg/mg) weit unterhalb des aktuellen Grenzwertes für Abstinenzuntersuchungen (7 pg/mg) wurde im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich optimiert und nach den Richtlinien der Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie (GTFCh) validiert. Bei der Analyse von über 1000 Haarproben aus Fällen zur Fahreignungsbegutachtung traten mit ansteigender Häufigkeit Störsignale im Retentionszeitfenster des EtG auf, die eine Veränderung der Methode erforderten. Die erneute Optimierung der Methode wurde mit der Entwicklung eines automatisierten Mahlverfahrens für die Haare verknüpft. Erstmals durchgeführte, vergleichende Analysen von Haarproben im gemahlenden oder geschnittenen Zustand konnten zeigen, dass ein Mahlen der Haare zu signifikant höheren EtG-Konzentrationen mit einem durchschnittlichen Anstieg von 51% führte. Die großen Variationen der Abweichungen (-5 – +181%) sind wahrscheinlich auf die Inhomogenität der Matrix zurückzuführen und verdeutlichen die Schwierigkeiten von Haaranalysen.

Eine kürzlich veröffentlichte Studie von Kronstrand et al. [1] verdeutlicht, dass ein negativer Befund in Haaren keinen Beweis für eine Abstinenz darstellt. Eine retrospektive Auswertung der Ergebnisse von 835 im Rahmen dieser Arbeit analysierten Haarproben aus Fahreignungsbegutachtungen zeigte jedoch, dass eine Senkung des Grenzwertes keinen bedeutenden Anstieg der positiven Befunde zur Folge hätte. In 75% der Proben wurden EtG-Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze (4 pg/mg) gefunden und nur 11% der Ergebnisse lagen im grenzwertigen Bereich zwischen 5 und < 7 pg/mg.

Die diagnostische Genauigkeit eines Befundes kann durch eine Absicherung von grenzwertigen Resultaten durch die Bestimmung eines zweiten, unabhängigen Parameters erhöht werden. FAEE stellen aufgrund ihrer konträren Eigenschaften im Bezug auf EtG sowie abweichender Bildungswege und Einlagerungsmechanismen in die Haare einen möglichen Parameter dar. Eine Methode zum Nachweis der vier FAEE: Ethylmyristat, Ethylpalmitat, Ethyloleat und Ethylstearat mittels Festphasenmikroextraktion und Gaschromatographie mit Massenspektrometrie wurde in der vorliegenden Arbeit in Anlehnung an die Methode von Pragst et al. [2], mit besonderem Augenmerk auf den unteren Konzentrationsbereich, optimiert und erfolgreich validiert. Es wurden

niedrige Nachweisgrenzen (0,016–0,025 ng/mg) sowie gute Resultate für die Präzision und Genauigkeit mit Abweichungen $\leq 11\%$ auch im unteren Konzentrationsbereich (0,05 ng/mg) erreicht.

Eine Bestimmung der EtG- und FAEE-Konzentrationen in 160 zufällig ausgewählten Haarproben (proximale 3 cm) aus Abstinenzuntersuchungen wurde durchgeführt, um den Grad der Übereinstimmung beider Marker zu ermitteln. Unter Berücksichtigung der von der Society of Hair Testing (SoHT) empfohlenen Grenzwerte [3] wurden Übereinstimmungen in 77,5% der Fälle gefunden. In 16,9% der Fälle deuteten die FAEE-Konzentrationen auf einen höheren Alkoholkonsum hin, in 5,6% die bestimmten EtG-Konzentrationen. Eine weitere Analyse von 73 Haarproben mit grenzwertigen EtG-Konzentrationen zwischen 4 und 10 pg/mg ergab eine nahezu deckungsgleiche Übereinstimmung der EtG- und FAEE-Ergebnisse von 72,6%. Eine lineare Abhängigkeit zwischen den gemessenen EtG- und FAEE-Konzentrationen bestand aufgrund der unterschiedlichen Eigenschaften beider Marker nicht.

In einer zweiten Studie wurden die EtG- und FAEE-Konzentrationen in 247 Haarsegmenten von 73 Patienten im Alkoholzug mit deren Selbstauskünften verglichen. Übereinstimmende Ergebnisse von allen drei Parametern wurden in 43,9% der untersuchten Segmente gefunden. In 81,3% der Fälle spiegelte mindestens einer der beiden Biomarker (EtG: 64,9%, FAEE: 59,3%) die Angaben zum Alkoholkonsum richtig wider. Die beste Übereinstimmung (76,7%) wurde für EtG bei einer Beschränkung auf das proximale Segment gefunden. Übereinstimmende EtG- und FAEE-Konzentrationen konnten in 57,7% der untersuchten Segmente ermittelt werden. Eine direkte Korrelation zu den angegebenen Trinkmengen wurde weder für EtG noch für die FAEE gefunden. Mögliche Gründe für diese Abweichungen sind, neben den beschriebenen Einflüssen auf die beiden Marker, die großen Unsicherheiten bei subjektiven Angaben der Patienten zum eigenen Trinkverhalten.

Beide Studien deuten darauf hin, dass EtG der verlässlichere Alkoholmarker zu sein scheint und daher primär zum Ausschluss einer Abstinenz eingesetzt werden sollte. In kritischen Fällen ist eine parallele Bestimmung der FAEE-Konzentrationen sowie ein eingehendes Studium der Angaben der betreffenden Person z. B. über eventuelle Haarbehandlungen zu empfehlen.

Eine schnelle und einfache LC-MS/MS-Methode zum Nachweis von EtG und EtS in Urin mit sehr niedrigen Bestimmungsgrenzen von 0,019 mg/L bzw. 0,015 mg/L wurde im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls erfolgreich optimiert und validiert. Eine hohe Sensitivität war hierbei entscheidend, da bei Urinen mit sehr niedrigen Kreatininkonzentrationen im Bereich von 20 mg/dL eine Normierung auf 100 mg/dL selbst bei EtG-Konzentrationen $\geq 0,02$ mg/L zu einer Überschreitung des Grenzwertes (0,1 mg/L) führen kann.

Zudem konnte gezeigt werden, dass der zur Verfügung stehende klinisch-chemische Analyzer für eine semiquantitative Bestimmung von EtG in Urin geeignet war. Mit einem Grenzwert von 0,08 mg/L konnten falsch negative Ergebnisse fast ausgeschlossen werden (Sensitivität: 98,6%). Die ermittelte zufriedenstellende Spezifität von 90% sorgte dafür, dass die Zahl an zeit- und kostenintensiven Bestätigungsanalysen mittels LC-MS/MS deutlich verringert werden konnte.

Der in die zweite Auflage der *Beurteilungskriterien – zur – Urteilsbildung in der Medizinisch-Psychologischen Fahreignungsdiagnostik* [4] aufgenommene Grenzwert für EtG in Urin von 0,1 mg/L wird unter anderem aufgrund der Eventualität von falsch positiven Ergebnissen durch den Konsum oder Gebrauch von alkoholhaltigen Lebensmitteln und Hygieneprodukten fortwährend diskutiert.

Durch die erfolgten kontrollierten Trink- und Essversuche mit alkoholhaltigen Lebensmitteln konnte deutlich gemacht werden, dass ein Nachweis von EtG und EtS höchstensfalls nach einem übermäßigen Konsum der getesteten Produkte (Apfelsaft, Traubensaft, Weinsauerkraut, überreife Bananen und alkoholfreies Bier) über einen sehr begrenzten Zeitraum möglich ist. Eine Überschreitung des Grenzwertes von 0,1 mg/L wurde nach dem Konsum von 2–3 L alkoholfreiem Bier (7,1-10,7 g Alkohol) für maximal 13,0 h beobachtet. Kein EtG konnte nach dem Konsum von 1–2 L Apfelsaft (0,6 g Alkohol) bzw. 1,5–2 L Traubensaft (0,9–2,5 g Alkohol) im Urin gefunden werden. Eine Normierung der gemessenen EtG-/EtS-Konzentrationen auf eine Kreatininkonzentration von 100 mg/dL (EtG100 bzw. EtS100) ergab zwar deutlich glattere Konzentrationskurven und konformere Ergebnisse für die unterschiedlichen Teilnehmer hatte jedoch keine entscheidenden Auswirkungen auf die maximalen Nachweisfenster.

Ein weiterer ausgeführter Trinkversuch konnte zudem zeigen, dass selbst ein Grenzwert von 0,1 mg/L in Kombination mit einer Einbestellungsfrist von 24 h nicht zum Nachweis einer strikten Abstinenz geeignet ist, sondern nur zum Ausschluss dieser. Nach einer Aufnahme von 8,2 g (0,2 L Wein) bzw. 11,2 g (0,33 L Bier) Alkohol konnte EtG für maximal 22,0 h (EtG100: 23,5 h) bzw. 23,5 h (EtG100: 23,5 h) nachgewiesen werden. Eine Absenkung des Grenzwertes zur Verbesserung der Sensitivität wäre jedoch nicht praktikabel und hätte bei den im Rahmen der Arbeit untersuchten Proben keine bedeutende Auswirkung auf die Anzahl an positiven Befunden.

Für EtS wurde bisher kein Grenzwert für Abstinenzuntersuchungen festgelegt, obwohl vorherige Arbeiten eine im Vergleich zu EtG, das durch Bakterien im Urin gebildet oder abgebaut werden kann, höhere Stabilität gefunden haben. Aus den Daten der durchgeführten Trinkversuche wurde ein möglicher Grenzwert von 0,05 mg/L ermittelt. Dieser Wert steht in Übereinstimmung mit dem gefundenen molaren Verhältnis von EtG und EtS (Median 2,3) und wurde nach dem Konsum von 16,4 bzw. 23,1 g Alkohol in Form von Wein oder Bier für 21–>28 h überschritten. Durch die Wahl des Grenzwertes, der falsch positive Befunde unwahrscheinlich werden lässt, ist ein Beweis von strikter Abstinenz jedoch ebenfalls nicht möglich. Der Konsum von 8,2 g Alkohol führte zu einer Überschreitung für maximal 11,8 h. Dieser vorläufige Wert muss durch weitere, größere Studien statistisch bestätigt werden. Ein großer Nachteil ist zudem, dass EtS auch nach dem Konsum von EtS-haltigen Lebensmitteln, z. B. Traubensaft, im Urin zu finden ist.

2 Summary

The consumption of alcohol can be detected through the direct alcohol markers, ethyl glucuronide (EtG), ethyl sulfate (EtS) or selected fatty acid ethyl esters (FAEE) in hair and different body fluids. In the context of this dissertation, various detection methods for the quantification of EtG or FAEE in hair as well as EtG and EtS in urine were optimized and validated, and several studies were conducted for a better understanding of the biomarkers.

The detection of EtG in hair provides a retrospective assessment of alcohol consumption over several months. A sensitive liquid chromatography – tandem mass spectrometry method (LC-MS/MS) with a limit of quantification (4 pg/mg) far below the current cut-off for abstinence tests (7 pg/mg) was successfully optimized in this dissertation and validated according to the guidelines of the German Society of Toxicological and Forensic Chemistry (GTFCh). In the analysis of hair samples from more than 1000 cases of driving ability diagnostics, interfering signals in the retention time window of the EtG occurred with increasing frequency, thus requiring a change in method. The re-optimization of the method was linked together with the development of an automated grinding process for the hair. Initially carried out comparative analysis of hair samples in the ground or cut state showed that significantly higher EtG concentrations resulted through the grinding of the hair, with an average increase of 51%. The large variations of the deviations (-5 – +181%) are likely due to the inhomogeneity of the matrix, and illustrate the difficulties of hair analysis.

A recent study by Kronstrand et al. [1] showed that a negative result in hair is no evidence of abstinence. A retrospective examination of the results of 835 hair samples, analyzed in the context of driving ability diagnostics, however, showed that lowering the cut-off did not result in a considerable increase in the positive findings. In 75% of the samples EtG concentrations below the limit of quantification (4 pg/mg) were found and only 11% of results were in the borderline range between 5 and < 7 pg/mg.

The diagnostic accuracy of a test can be increased through a backup of borderline results by determination of a second, independent parameter. Due to their contrasting characteristics in relation to EtG, and diverse development and storage mechanisms in hair, FAEE represent a possible parameter. Based on the method of Pragst et al. [2] and with particular attention to the lower concentration range, a method for the detection of the four FAEE: ethyl myristate, ethyl palmitate, ethyl oleate and ethyl stearate by solid phase micro extraction and gas chromatography with mass spectrometry, was successfully optimized and validated in this dissertation. Low detection limits (0.016 to 0.025 ng/mg) and good results for precision and accuracy, with deviations of <11% even in the lower concentration range (0.05 ng/mg) were reached.

A determination of EtG and FAEE concentrations in 160 randomly selected hair samples (proximal 3 cm) from abstinence tests was conducted to determine the degree of agreement between the two markers. Taking the recommended cut-offs of the Society of Hair Testing (SoHT) [3] into account, matches were found in 77.5% of the cases. In 16.9% of the cases there was an indication that FAEE concentrations showed higher alcohol consumption, in 5.6% the determined EtG concentrations. Further analysis of 73 hair samples with borderline EtG concentrations between 4 and 10 pg/mg revealed a nearly congruent line of EtG and FAEE results of 72.6%. A linear dependence between the measured EtG and FAEE concentrations was not due to the different properties of both markers.

EtG and FAEE concentrations were compared in a second study, in 247 hair segments of 73 patients in alcohol withdrawal treatment according to their self-assessments. Matching results of all three parameters were found in 43.9% of the analyzed segments. In 81.3% of the cases at least one of the two biomarkers (EtG: 64.9%, FAEE: 59.3%) reflected the data on alcohol consumption correctly. The best match (76.7%) was found for EtG when limited to the proximal segment. Consisting EtG and FAEE concentrations were determined in 57.7% of the studied segments. A direct correlation with the indicated amounts of drinking was found neither for EtG nor for FAEE. Possible reasons for these deviations, in addition to the described effects on the two markers, are the large uncertainties associated with subjective reports of patients as to their own drinking behavior.

Both studies suggest that EtG seems to be the more reliable alcohol marker and therefore should be used primarily to rule out abstinence. In critical cases, a parallel determination of FAEE concentrations as well as a detailed study of the claims of the person concerned is recommended, for example potential hair treatments.

A rapid and simple LC-MS/MS method for the detection of EtG and EtS in urine with very low quantification limits of 0.019 mg/L and 0.015 mg/L was also successfully optimized and validated in this dissertation. Very high sensitivity was essential here, since in urine samples with very low creatinine concentrations in the range of 20 mg/dL, normalization to 100 mg/dL even with EtG concentrations ≥ 0.02 mg/L can cause an exceedance of the cut-off (0.1 mg/L).

In addition, it was shown that the available clinical chemical analyzer was suitable for a semi-quantitative determination of EtG in urine. With a cut-off of 0.08 mg/L false negative results could be almost eliminated (sensitivity: 98.6%). The determined satisfactory specificity of 90% ensured that the number of time-consuming and costly confirmatory analyzes using LC-MS/MS could be significantly reduced.

The current cut-off for EtG in urine (0.1 mg/L), recorded in the second edition of the German Assessment Criteria - of - Discernment in the Medical-Psychological Driver Ability Diagnostics [4], is constantly discussed due to the eventuality of false positive results from the consumption or use of alcoholic beverages, food and hygiene products.

Through the controlled drinking and eating experiments with foods and beverages containing alcohol, it could be made clear that EtG and EtS are only detectable due to an excessive consumption of the tested products (apple juice, grape juice, wine, sauerkraut, overripe bananas and non-alcoholic beer) over a very limited time period. An exceedance of the cut-off of 0.1 mg/L after consumption of 2–3 L non-alcoholic beer (7.1

to 10.7 g alcohol) was observed for a maximum of 13.0 h. No EtG could be determined in the urine after drinking 1–2 L of apple juice (0.6 g alcohol) or 1.5–2 L grape juice (0.9–2.5 g alcohol). A normalization of the measured EtG/EtS concentrations to a creatinine concentration of 100 mg/dL (ETG100 or EtS100) did indeed result in much smoother concentration curves and more conform results for the various participants, however, had no significant effect on the maximum window of detection.

Another drinking experiment carried out also showed that even a cut-off of 0.1 mg/L in combination with a 24 h summons is not suitable for the detection of strict alcohol abstinence, but rather only to exclude it. After an intake of 8.2 g (0.2 L of wine) and 11.2 g (0.33 L of beer) alcohol, EtG could be detected for up to 22.0 h (ETG100: 23.5 h) and 23.5 h (ETG100: 23.5 h). However, lowering the threshold to improve sensitivity would be impractical and would have no considerable effect on the number of positive findings in the samples studied within the context of this dissertation.

So far no cut-off has been set for EtS in abstinence tests, although previous studies have found greater stability compared to EtG, which can be formed or broken down by bacteria in urine. From the data of drinking experiments carried out, a potential cut-off of 0.05 mg/L was determined. This value is consistent with the found molar ratio of EtG and EtS (median 2.3) and was exceeded by the consumption of 16.4 and 23.1 g of alcohol in the form of wine or beer for 21 to > 28 h. By choosing the threshold, which makes false positive findings unlikely, a proof of strict abstinence, however, is not possible either. The consumption of 8.2 g of alcohol led to an exceedance of a maximum of 11.8 h. This estimated value must be statistically confirmed by further larger studies. A major disadvantage is that EtS can be found in urine even after the consumption of foods containing EtS, such as grape juice.

3 Einleitung und Zielsetzung

Der Konsum von Alkohol als Genussmittel ist in Deutschland weit verbreitet und stößt auf eine breite Akzeptanz. 97,1% der 18–64-jährigen sind Alkoholkonsumenten [5]. Laut einer Studie der Weltgesundheitsorganisation (engl. World Health Organization (WHO)) [6] lag der jährliche pro-Kopf-Konsum von reinem Alkohol für Personen älter 15 Jahre zwischen 2003 und 2005 bei 12,8 L. Konsumiert wurden hauptsächlich Bier (53%), Wein (27%) und Spirituosen (20%) deren Herstellung und Konsum hierzulande sowie weltweit eine lange Tradition hat.

Der Konsum von Alkohol bringt jedoch auch eine Reihe von Problemen mit sich. Laut dem Jahrbuch Sucht 2012 [5] liegt der tägliche Konsum bei 9,5 Mio. Deutschen oberhalb der vom Bundesministerium für Gesundheit bezifferten riskanten Menge von 12 g für Frauen bzw. 24 g für Männer. Eine Alkoholabhängigkeit besteht bei etwa 3,4% der Männer und 1,4% der Frauen. Gut ein Fünftel aller Todesfälle zwischen 35 und 65 sind alkoholbedingt. Volkswirtschaftliche Kosten infolge alkoholbezogener Krankheiten in Höhe von € 26,7 Mrd. standen 2007 Einnahmen von € 3,3 Mrd. aus alkoholbezogenen Steuern gegenüber [5].

Laut der polizeilichen Kriminalstatistik [7] von 2010 wurden von insgesamt 151.617 aufgeklärten Fällen im Bereich der Gewaltkriminalität 48.563 Fälle (32,0%) unter Alkoholeinfluss verübt. Auch im Straßenverkehr stellt Alkohol ein großes Problem dar. 2010 wurden 39.345 Unfälle (1,6% aller Unfälle im Straßenverkehr) registriert, bei denen mindestens ein Beteiligter alkoholisiert war [8]. Bei einer aktuellen Online-Umfrage des Reifenherstellers Goodyear [9] gaben 58 der 100 Befragten zwischen 18 und 34 Jahren an, dass sie auch nach dem Genuss von Alkohol oder Drogen selbst autofahren oder bei einem alkoholisierten Fahrer einsteigen würden. „Es wird schon gut gehen.“ war der meistgenannte Grund (42%) gefolgt von einem Nichtbedenken der Konsequenzen (24%).

Ein wichtiger Ansatz, um die risikobehafteten Folgen des Alkoholkonsums einzudämmen, ist die Möglichkeit, diesen auch langfristig nachweisen und beurteilen zu können. Ein direkter Nachweis des Ethanols im Blut ist, abhängig von der konsumierten Menge, nur über einen Zeitraum von einigen Stunden möglich. In vielen Fällen, in denen eine Abstinenz überwacht werden soll, z. B. zur Fahreignungsbegutachtung, während eines ambulanten Entzuges oder bei Überwachungen am Arbeitsplatz, ist jedoch ein längeres Nachweisfenster erforderlich. Gleiches gilt für Fragestellungen in denen es z. B. darauf ankommt, ob ein moderater oder chronischer Konsum vorliegt. Lange Zeit wurden zu diesem Zweck ausschließlich indirekte Alkoholmarker eingesetzt, die mit alkoholbedingten Leberschäden (z. B. γ -Glutamyltransferase (GGT)) oder mit alkoholbedingten Stoffwechselveränderungen (z. B. Kohlenhydrat-defiziente Transferrine (CDT)) assoziiert sind. Ein Großteil dieser klassischen Marker hat jedoch aufgrund schlechter Sensitivitäten und Spezifitäten eine unzureichende diagnostische Aussagekraft. Zahlreiche krankhafte

Zustände beeinflussen die Werte. Darüber hinaus ist erst ein regelmäßiger Konsum von Alkohol nachweisbar.

Eine deutlich bessere diagnostische Genauigkeit wird direkten Alkoholmarkern zugesprochen, die Abbauprodukte des Ethanols darstellen. Untersucht werden zurzeit die Ethanolmetabolite: Ethylglucuronid (EtG), Ethylsulfat (EtS), Fettsäureethylester (FAEE) sowie Phosphatidylethanol (PEth). Seitdem bekannt wurde, dass diese Substanzen ausschließlich nach dem Konsum von Alkohol im Körper gebildet werden, wurden eine Reihe von Nachweismethoden zur Quantifizierung der Alkoholmarker in Blut, Urin, Haaren, Mekonium und verschiedenen Geweben sowie Studien zur Anwendbarkeit in der Routine und zur Verifizierung von Grenzwerten durchgeführt. Für diese Arbeit relevante Methoden sowie Studien werden in den Abschnitten 4.3 und 4.4 ausführlich beschrieben. In die zweiten Auflage der *Beurteilungskriterien – zur – Urteilsbildung in der Medizinisch-Psychologischen Fahreignungsdiagnostik* [4] wurden 2008 Grenzwerte von 0,1 mg/L für EtG in Urin und 7 pg/mg für Haare zum Ausschluss einer Alkoholabstinenz aufgenommen. Von der Society of Hair Testing (SoHT) wurden Grenzwerte von 7 pg/mg (EtG) und 0,2 ng/mg (FAEE) für den Ausschluss einer Abstinenz sowie 30 pg/mg (EtG) und 0,5 ng/mg (FAEE) für die Unterscheidung von moderatem und exzessiven Konsum empfohlen, die mindestens alle zwei Jahre kritisch überprüft werden sollen [3, 10, 11].

Obwohl der Nachweis von EtG und EtS in Urin sowie EtG und FAEE in Haaren bereits in vielen Laboren etabliert ist, sind noch viele Fragen offen. Bereits der Konsum geringer Mengen Alkohol führt zu einer zeitlich begrenzten Nachweisbarkeit von EtG und EtS in Urin [12, 13]. Unklar ist daher beispielsweise, ob der Konsum von alkoholhaltigen Lebensmitteln ebenfalls zu einer Überschreitung des Grenzwertes führt. Dieser wird vereinzelt als vermeintliche Erklärung für einen positiven Befund angegeben. Zum Teil gegensätzliche Ergebnisse wurden bei Studien zur Auswirkung des Gebrauchs von alkoholhaltigen Händedesinfektionsmitteln [14–18] bzw. Mundwässern [19–22] gefunden. Ähnliches gilt für Haare, bei denen bisherige Untersuchungen sowohl auf mögliche falsch positive Ergebnisse durch den Gebrauch von alkoholhaltigen Haarpflegeprodukten [23–28] als auch auf eventuelle falsch negative Befunde durch verschiedene Haarbehandlungen [28–31] hindeuten.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Methoden zum Nachweis von EtG und EtS in Urin sowie EtG bzw. FAEE in Haaren, insbesondere für den Einsatz bei Abstinenzuntersuchungen, optimiert, nach den Richtlinien der Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie (GTFCh) validiert und anschließend in der Routine etabliert werden. Kontrollierte Trink- und Essversuche sollten unter anderem zeigen, ob auch versteckter Alkohol in Lebensmitteln, wie z. B. in Säften, zu positiven EtG-/EtS-Befunden in Urin führen kann. Vergleichende Bestimmungen von EtG- und FAEE-Konzentrationen in Haarproben aus Abstinenzuntersuchungen sollten zeigen, inwieweit die Ergebnisse der beiden Marker übereinstimmen und welcher Marker eine höhere Zuverlässigkeit besitzt. Zudem sollten die Konzentrationen beider Marker in Haaren mit Selbstauskünften der Patienten, die sich in einem stationären Alkoholentzug befinden, verglichen werden.

4 Kenntnisstand

4.1 Alkohol

Ethanol, ein aliphatischer, einwertiger Alkohol, ist eine klare, farblose, leicht entzündliche sowie hygroskopische Flüssigkeit [32]. Verwendet wird Ethanol hauptsächlich für Genusszwecke als Bestandteil von Bier, Wein und Spirituosen sowie als Lösemittel und als Brennstoff. Das in alkoholischen Getränken erhaltene Ethanol wird in vielen Zusammenhängen als Alkohol bezeichnet. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird ebenfalls der Begriff „Alkohol“ als Äquivalent/Synonym für „Ethanol“ eingesetzt. Alkohol ist als legale Droge das am meisten gebrauchte Suchtmittel weltweit. Jährlich verursacht der schädliche Konsum von Alkohol eine Vielzahl von Todesfällen sowie Krankheiten und ist Auslöser für Gewalttaten [6].

Alkohol hat eine akute Wirkung auf die Funktionen des zentralen Nervensystems [33]. Der Ionentransport an der Nervenzellmembran und damit die transmembranale Signalübertragung ist beeinflusst. Hemmende Neuronen im besonders empfindlichen Großhirn werden zunächst stärker als stimulierende in ihrer Funktion supprimiert. Bei moderater Alkoholisierung kommt es daher zu einer generellen Enthemmung, größere Mengen wirken berauschend. Die Alkoholwirkung ist individuell verschieden und im hohem Maße abhängig von der Alkoholgewöhnung (Toleranz) [32, 34]. Eine merkbare Alkoholisierung ist etwa ab 0,3‰ Alkohol im Blut zu spüren. Ab etwa 0,5‰ ist das Unfallrisiko durch Alkohol im Vergleich zum Nüchternzustand etwa verdoppelt, bei 0,9‰ ist es etwa verfünffacht [35].

Seit 1975 werden Daten zu Alkoholunfällen mit Personenschäden in Deutschland erhoben [8]. Zwischen 1995 und 2010 verringerte sich die Zahl der erfassten Alkoholunfälle (1995: 91.897; 2010: 39.345) um knapp 60% (siehe Abbildung 4.1). Die Anzahl der dabei Verletzten (1995: 49.630; 2010: 18.874) oder Getöteten (1995: 1.716; 2010: 342) Personen nahm im gleichen Zeitraum um 62% bzw. 80% ab. Trotz des Rückgangs starben in Deutschland 2010 immer noch 9,4% aller Verkehrstoten an den Folgen eines Alkoholunfalls [8].

Nach dem Straßenverkehrsgesetz (StVG) gilt in Deutschland für das Führen von Fahrzeugen eine Obergrenze von 0,5‰. Bei einer Blutalkoholkonzentration (BAK) zwischen 0,5‰ und 1,09‰ ohne Ausfallerscheinungen beim Fahrzeugführer liegt eine Ordnungswidrigkeit nach § 24 StVG vor. Eine alkoholbedingte relative Fahruntüchtigkeit besteht nach § 316 des Strafgesetzbuches (StGB) ab 0,3‰, wenn weitere Beweisanzeichen für eine Fahruntüchtigkeit vorliegen, wie z. B. leichtsinnige Fahrweise, Fahren in Schlangenlinien, Fahrfehler, Verwicklung in einen Unfall oder psychophysische Leistungsdefizite bei allgemeinen Verkehrskontrollen. Ab einer BAK von 1,1‰ wird in jedem Fall eine absolute Fahruntüchtigkeit angenommen, ein Strafverfahren nach § 315c oder § 316 StGB wird eingeleitet. Als Strafen werden dem Beschuldigten Punkte im Verkehrszentralregister, Geld oder Freiheitsstrafen von bis zu fünf Jahren sowie ein zeitlich begrenzter oder dau-

erhafter Führerscheintzug auferlegt. Für die Wiedererlangung der Fahrerlaubnis kann die Fahrerlaubnisbehörde nach § 13 der Fahrerlaubnisverordnung (FeV) [36] anordnen, dass:

1. ein ärztliches Gutachten (§ 11 Absatz 2 Satz 3) beizubringen ist, wenn Tatsachen die Annahme von Alkoholabhängigkeit begründen, oder
2. ein medizinisch-psychologisches Gutachten beizubringen ist, wenn:
 - a) nach dem ärztlichen Gutachten zwar keine Alkoholabhängigkeit, jedoch Anzeichen für Alkoholmissbrauch vorliegen oder sonst Tatsachen die Annahme von Alkoholmissbrauch begründen,
 - b) wiederholt Zuwiderhandlungen im Straßenverkehr unter Alkoholeinfluss begangen wurden,
 - c) ein Fahrzeug im Straßenverkehr bei einer BAK von 1,6‰ oder mehr oder einer Atemalkoholkonzentration (AAK) von 0,8 mg/L oder mehr geführt wurde,
 - d) die Fahrerlaubnis aus einem der unter den Buchstaben a bis c genannten Gründe entzogen war oder
 - e) sonst zu klären ist, ob Alkoholmissbrauch oder Alkoholabhängigkeit nicht mehr besteht.

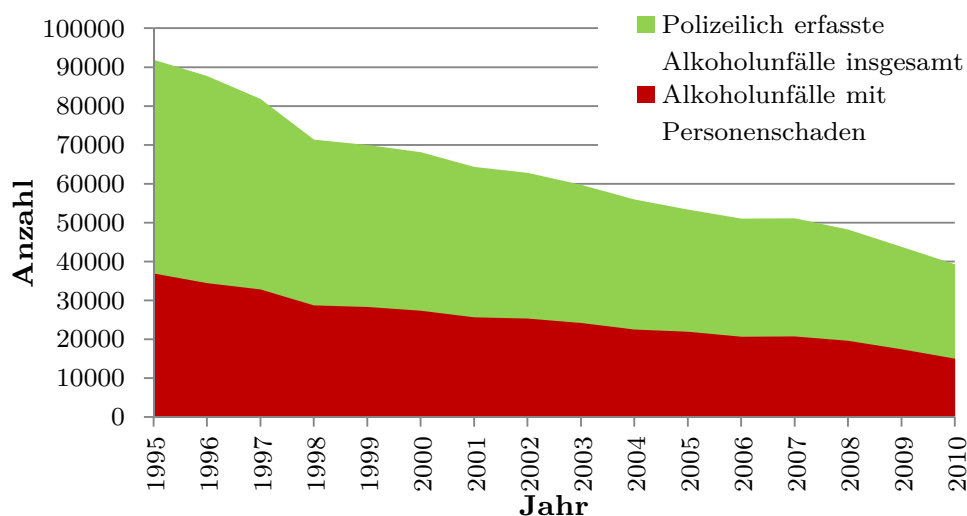


Abbildung 4.1: Erfasste Alkoholunfälle insgesamt sowie Alkoholunfälle mit Personenschäden im Zeitraum von 1995 bis 2005. Quelle: Statistisches Bundesamt [8]

4.1.1 Metabolismus von Alkohol

Alkohol wird fast zu 100% im Gastrointestinaltrakt (20% Magen, 80% Dünndarm) resorbiert. Eine Verzögerung der Magenentleerung durch die Anwesenheit von Nahrung verlängert den Zeitraum für die Absorption und bewirkt dadurch einen niedrigeren

Spitzenwert der BAK sowie eine kleinere Fläche unter der Blutalkoholkurve verglichen mit dem Alkoholkonsum bei leerem Magen [33]. Der absorbierte Alkohol wird in allen wasserhaltigen Geweben und Körperflüssigkeiten verteilt. 10% des Alkohols wird unverändert, im Wesentlichen über die Atemluft, den Harn und den Schweiß, eliminiert. Der Großteil von 90% wird vornehmlich in der Leber metabolisiert [37]. Der Abbau erfolgt zu einem großen Teil über drei wichtige Stoffwechselwege [33,37,38]: im Cytoplasma der Leberzellen wird Alkohol durch eine Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (NAD)-abhängige Alkohol-Dehydrogenase (ADH) zu Acetaldehyd oxidiert. Intermediär gebildetes Acetaldehyd wird schnell durch Acetaldehyd-Dehydrogenasen zu Essigsäure oxidiert, die im Citratzyklus zu CO_2 und H_2O umgesetzt wird. Eine weitere Möglichkeit ist eine Oxidation des Alkohols in der Leber über ein Cytochrom P-450-abhängiges System, das sogenannte mikrosomale ethanoloxidierende System (MEOS). MEOS benötigt Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) und O_2 . Der dritte Stoffwechselweg zur Umwandlung von Alkohol in Acetaldehyd läuft über die Katalase. Das für die Oxidation benötigte H_2O_2 wird durch NADPH-Oxidase oder Xanthin-Oxidase generiert. Abbildung 4.2 zeigt eine Übersicht über die verschiedenen Stoffwechselwege. Ein geringer Anteil des Alkohols wird über andere Biotransformationen wie z. B. Konjugationen (Glucuronidierung, Sulfatierung) metabolisiert.

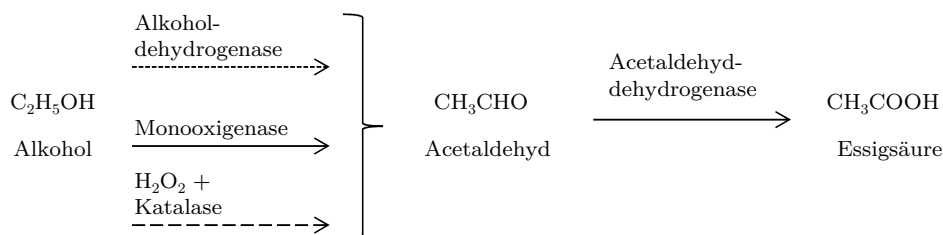


Abbildung 4.2: Übersicht über die enzymatische Oxidation von Ethanol zu Essigsäure nach [37].

4.2 Alkoholkonsummarker

4.2.1 Allgemein

Der Bedarf an Kenngrößen des Alkoholkonsums, die je nach Fragestellung einen missbräuchlichen bzw. chronisch erhöhten Alkoholkonsum sensitiv und spezifisch anzeigen, wächst stetig [39]. Vorhandene Kenngrößen lassen sich in zwei Gruppen einteilen: State-Marker sowie Trait-Marker. Trait-Marker identifizieren die genetische Prädisposition für einen missbräuchlichen Konsum von Alkohol. Gute Marker sollten folgende drei Kriterien erfüllen: sie sollten vererbbar sein, bei einem Großteil der Bevölkerung im Zusammenhang mit der untersuchten Krankheit stehen und unabhängig vom Status und Verlauf der Krankheit sein. Bei Enzymen (z. B. Adenylylcyclasen) sowie bei einer Reihe von Neurotransmittern (γ -Aminobuttersäure, Dopamin, β -Endorphin und Serotonin) wird ein mögliches Potential als Trait-Marker für den Konsum von Alkohol gesehen [40].

State-Marker hingegen geben Informationen über Veränderungen im Körper, die durch den Konsum von Alkohol ausgelöst werden und reversibel sind. Je nach Länge des Nachweisfensters und alkoholspezifischer Aussagekraft haben die verschiedenen laborchemischen Marker verschiedene Einsatzschwerpunkte, die von der Diagnose von Alkoholmissbrauch bis zur Therapie- bzw. Abstinenzkontrolle reichen.

Geeignete Biomarker sollten die konsumierte Alkoholmenge widerspiegeln, zwischen Abstinenz, moderatem und problematischem Trinkverhalten unterscheiden, verlässliche und reproduzierbare Ergebnisse liefern, mehrere Wochen nach beginnender Abstinenz wieder im Normbereich liegen sowie einfach und preiswert nachweisbar sein [41].

Es wurde eine Vielzahl von Biomarkern erforscht, von denen sich die meisten wegen einer unzureichenden diagnostischen Aussagekraft und/oder eines unpraktikablen analytischen Aufwandes nicht dauerhaft in der Routinediagnostik etablieren konnten. Sie lassen sich grob in vier Untergruppen einteilen [39]:

1. Mit alkoholbedingten Leberschäden verbundene Kenngrößen (z. B. GGT, Aspartat-Aminotransferase (AST) und Alanin-Aminotransferase (ALT)),
2. Alkohol selbst sowie dessen Metabolite (z. B. Acetaldehyd, EtG und EtS, FAEE und PEth),
3. durch Ethanol(metabolite) verursachte Stoffwechselveränderungen (z. B. Kohlenhydrat-defiziente Transferrine (CDT), 5-Hydroxytryptophol (5-HTOL)/5-Hydroxyindolyllessigsäure (engl. 5-Hydroxyindoleacetic acid, 5-HIAA)-Quotient, Mittleres korpuskuläres Erythrozytenvolumen (engl. Mean corpuscular/cell volume, MCV)),
4. der direkte Nachweis von in alkoholischen Getränken enthaltenen Begleitstoffen (z. B. Methanol, 2-Propanol).

Für klinische Labore sind chromatographische Methoden meist zu aufwendig, so dass trotz bekannter Nachteile durch nicht ausreichende Sensitivität und Spezifität auf die etablierten Langzeitmarker: GGT, CDT, MCV und Methanol zurückgegriffen wird [42,43]. Die in Studien bestimmten Sensitivitäten und Selektivitäten sind stark abhängig vom untersuchten Kollektiv. In unselektierten Krankenhausstudien beispielsweise schwanken die Werte sehr stark [44]. Geschlecht, Alter, Gewicht, Herkunft und weitere Faktoren haben bei vielen Biomarkern einen großen Einfluss auf die Ergebnisse [45]. Keiner dieser Biomarker alleine ist ausreichend für die Diagnose eines problematischen Alkoholkonsums. Kombinationen aus mehreren indirekten Markern sowie weiteren Untersuchungen und Befragungen der Patienten führen zu einer Verbesserung der diagnostischen Genauigkeit.

Im Folgenden werden einige etablierte und neue Biomarker vorgestellt. Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Marker EtG, EtS und FAEE werden in den Abschnitten 4.3 und 4.4 ausführlich beschrieben.

4.2.2 Weit verbreitete Biomarker

Aspartat-Aminotransferase (AST) und Alanin-Aminotransferase (ALT)

AST und ALT sind klassische, nahezu ubiquitär im Körper vorkommende Enzyme, die bei der Metabolisierung von Aminosäuren zu Proteinen benötigt werden. Ein chronischer

Konsum von Alkohol führt zu erhöhten AST- und ALT-Werten. Durch Erkrankungen einer Reihe von Organen (z. B. Leber, Niere, Pankreas, Milz und Lunge) sowie durch eine Hämolyse des Blutes kommt es jedoch ebenfalls zu einem Anstieg der ALT-Serumaktivität [39]. Sowohl die Sensitivitäten als auch die Spezifitäten schwanken daher sehr stark und sind geschlechtsspezifisch [45]. Für eine forensisch belastbare Bewertung müssen alle Ursachen für falsch positive Befunde differentialdiagnostisch ausgeschlossen werden. Zum Teil wird der sogenannte De-Ritis-Quotient (AST/ALT) bestimmt. Werte < 1 sprechen für eine schwach ausgeprägte Leberschädigung ausgelöst durch Krankheiten oder Entzündungen. Werte > 1 hingegen weisen auf eine nekrotische Leberveränderung hin, die Folge eines chronischen Alkoholkonsums sein könnte [42].

γ -Glutamyltransferase (GGT)

GGT ist ebenfalls ein nahezu ubiquitär im menschlichen Organismus vorkommendes, membrangebundenes Enzym (Glycoprotein) mit einer maximalen Aktivität in Leber und Niere. Erhöhte Werte sind Ausdruck einer Leberzellschädigung und können nach einem mehrwöchigen Konsum von 80–200 g Alkohol/Tag im Serum nachgewiesen werden. Zahlreiche andere Substanzen (z. B. Barbiturate) und krankhafte Zustände (z. B. Leberveränderungen, Herz- und Nierenleiden und Adipositas) sowie Alter und Geschlecht haben jedoch ebenfalls Einfluss auf den GGT-Spiegel. Eine ausreichende Spezifität (18–65%) ist daher nicht gegeben. Die Sensitivität ist für Männer größer als für Frauen und schwankt zwischen 69–85%. 2–5 Wochen nach Abstinenzbeginn liegen die Werte in der Regel wieder im Normalbereich [43]. Im Gegensatz zu AST und ALT kommt GGT nicht in Erythrozyten und Muskelzellen vor. Hämolyse sowie Muskelerkrankungen haben daher im Gegensatz zu vielen anderen Erkrankungen der Leber und anderen Organen keinen Einfluss auf die Serumaktivität der GGT [39].

Ethanol

Die direkte Messung von Ethanol in Blut, Atem, Urin, Schweiß oder Speichel ist die einfachste und spezifischste Methode zum Nachweis eines kurz zurückliegenden Alkoholkonsums. Ein negativer Befund schließt einen chronischen Alkoholkonsum jedoch nicht aus. Die Elimination des Alkohols aus dem Körper sowie das psychische und physische Leistungsbild sind stark von den Konsumgewohnheiten und einer damit verbundenen Toleranzentwicklung bei chronischem Konsum abhängig. Ein chronischer Konsum von Alkohol ist wahrscheinlich bei Promillewerten: $> 1,0\text{‰}$ während eines Arzttermins, $> 1,5\text{‰}$ ohne Ausfallerscheinungen, $> 3,0\text{‰}$ im Allgemeinen. Headspace-Gaschromatographie gekoppelt mit einem Flammenionisationsdetektor (FID) ist der Gold-Standard für den Nachweis von Ethanol und anderen flüchtigen Substanzen [38, 42, 43, 46].

Acetaldehyd und Acetaldehydaddukte

Acetaldehyd ist chemisch sehr reaktiv, flüchtig und kommt nur in mikromolaren Konzentrationen vor. Ein sicherer Beleg für einen Zusammenhang der venösen Acetaldehyd-Konzentration und dem Konsum von Alkohol konnte nicht ermittelt werden [47]. Acetaldehyd bildet mit einer Vielzahl von zellulären Verbindungen, die Amino- und Sulfhydryl-

gruppen besitzen, irreversibel charakteristische Addukte (z. B. Acetaldehyd-Hämoglobin), die als Alkoholmarker dienen könnten. Bei Alkoholikern konnten beispielsweise deutlich größere Mengen an Acetaldehyd-modifiziertem Albumin sowie Addukte aus Acetaldehyd und Hämoglobin gefunden werden [46]. Sowohl freies als auch gebundenes Acetaldehyd kann mit HPLC und Fluoreszenzdetektion nachgewiesen werden [48]. Höhere Konzentrationen von Ethylacetat sowie eine größere Anzahl an Immunglobulin A-Antikörpern gegen Addukte aus Erythrozyten und Aldehyden konnten ebenfalls im Blut von Alkoholikern gefunden werden [42].

Phosphatidylethanol (PEth)

PEth wird in der Zellmembran aus Phosphatidylcholin und Ethanol durch eine Phospholipase D-katalysierte Reaktion gebildet. Bisher sind 48 verschiedene Homologen mittels eines HPLC-Verfahrens nachgewiesen worden [49]. Sie können bis zu drei Wochen nach Abstinenzbeginn im Blut von vormals alkoholabhängigen Personen gemessen werden [50]. Die Konzentrationen von PEth im Blut sind signifikant mit der konsumierten Alkoholmenge korreliert [51]. In bisherigen Studien konnten keine falsch positiven Resultate gefunden werden [52–54]. Für die Anwendung in der Routine muss die Analyse auf eine reduzierte Anzahl von Homologen beschränkt werden. Für die Vergleichbarkeit der Ergebnisse ist eine Standardisierung des Verfahrens sinnvoll. Zu Problemen könnten individuelle Unterschiede bei dem natürlichen Anteil der verschiedenen Homologen führen [39].

Kohlenhydrat-defiziente Transferrine (CDT)

CDT sind Abwandlungen des Glycoproteins Transferrin, welches für den Eisentransport im Blut zuständig ist, bei denen eine oder mehrere der gebundenen Sialinsäuren fehlen. Bestimmt werden die Einzel-Konzentrationen oder die Summe aus den drei Transferrin-Isoformen-Konzentrationen: Asialotransferrin (nur bei starkem chronischen Alkoholkonsum nachweisbar), Monosialotransferrin (lediglich von geringer analytischer Bedeutung) und Disialotransferrin (die quantitativ bedeutendste Form). Die verschiedenen Isoformen sind bei allen Menschen zu finden. Im Blut von Alkoholikern werden jedoch deutlich höhere CDT-Werte gemessen als im Blut von abstinenten Personen [39, 40].

Ursächlich ist vermutlich eine Interferenz des Alkohols oder Acetaldehyds mit dem Glykoproteinstoffwechsel in der Leber. CDT sind eine Kenngröße für chronischen Alkoholmissbrauch. Der Konsum von 50–80 g Alkohol/Tag über einen Zeitraum von mindestens einer Woche führt zu erhöhten CDT-Werten. Unter Abstinenz normalisieren sich die Werte innerhalb von zwei Wochen [38, 46].

Das weitverbreitete immunochemische Nachweisverfahren ist nicht geeignet zur Unterscheidung der Isoformen und zur Detektion der genetischen Variationen. Mittels HPLC, Kapillarelektrophorese oder isoelektrischer Fokussierung können die Isoformen jedoch aufgetrennt werden [39, 43, 46].

Ermittelte Sensitivitäten (39–94%) und Spezifitäten (82–100%) sind geschlechtsspezifisch und je nach untersuchtem Kollektiv und verwendeter Methode stark schwankend [43, 46]. Genetische Transferrin-Varianten können eine HPLC-Bestimmung stören,

indem sie mit den gesuchten CDT-Isoformen coeluiieren [39]. Verschiedene krankhafte Zustände sowie eine lange Lagerung der Blutprobe bei 4°C können ebenfalls zu erhöhten CDT-Werten führen [46]. Eine bestehende Schwangerschaft hat ebenfalls einen Einfluss auf die CDT-Werte [55]. Bergström et al. [56] hingegen fanden bei ihren Untersuchungen von Personen mit unterschiedlichen Erkrankungen keine bzw. nur geringe Erhöhungen der CDT-Werte.

5-Hydroxytryptophol (5-HTOL) und 5-Hydroxyindolylessigsäure (5-HIAA)

5-Hydroxyindolacetaldehyd, ein Abbauprodukt von Serotonin, wird entweder durch Aldehyd-Dehydrogenasen (ALDH) zu 5-HIAA oxidiert oder durch die Aldehyd-Reduktase zu 5-HTOL reduziert. Der Konsum von Alkohol bedingt eine verstärkte Bildung von 5-HTOL und eine gleichzeitig verminderte Bildung von 5-HIAA. Durch die Berechnung des Quotienten aus 5-HTOL und 5-HIAA werden Ethanol-unabhängige Schwankungen eliminiert. Ein Nachweis ist mittels Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (GC-MS) oder Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit elektrochemischer Detektion möglich. Die Sensitivität (29–100%) ist stark abhängig vom Zeitraum zwischen Alkoholkonsum und Messung. Die Selektivität liegt zwischen 90–100%. Nach einer einmaligen Aufnahme von 20–25 g können erhöhte 5-HTOL-Werte bis zu 24 h länger im Urin nachgewiesen werden als der Alkohol selbst [42, 43, 46].

Mittleres korpuskuläres Erythrozytenvolumen (MCV)

Das Volumen der Erythrozyten ist bei chronischen Alkoholikern im Durchschnitt größer als bei abstinenten Personen. Als Ursache wird u. a. ein alkoholinduzierter Folsäuremangel, eine alkoholbedingte Leberschädigung oder eine direkte toxische Wirkung des Alkohols auf das Knochenmark vermutet. Erhöhte Werte sind nach längerfristigem Konsum von moderaten Alkoholmengen (< 40g/Tag) messbar (Sensitivität 27–64%, Spezifität 66–91%). Erhöhte MCV-Werte können auch durch andere krankhafte Zustände (z. B. Folsäure- oder Vitamin B₁₂-Mangel oder Erkrankungen des Knochenmarks) verursacht werden. Eine gleichzeitige Erhöhung von GGT und MCV hat meist einen chronischen Alkoholkonsum als Ursache. Ein Nachteil ist die lange Lebensdauer der Erythrozyten von ca. 120 Tagen, die erhöhte Werte nach Abstinenzbeginn über einen Zeitraum von mehreren Monaten zur Folge hat [38, 43].

Methanol

Methanol kommt neben anderen Begleitstoffen in alkoholischen Getränken vor und wird während länger andauernden Trinkphasen auch endogen gebildet. Ab einer BAK von 0,2‰ wird der Methanolmetabolismus aufgrund einer deutlich höheren Affinität der ADH für Ethanol gehemmt. Hohe Methanolspiegel (> 10 mg/L) deuten auf einen langfristigen, massiven Alkoholkonsum ohne größere Trinkpausen hin [43]. Erhöhte Konzentrationen von Aceton und 2-Propanol im Blut können ebenfalls auf einen chronischen Konsum von Alkohol hindeuten, jedoch auch Folge einer Stoffwechselstörung sein [46].

4.2.3 Weitere Biomarker

Weitere mögliche Biomarker, die Hinweise auf einen chronischen Alkoholkonsum geben, sind im Folgenden aufgelistet:

- **Salsolinol**

Produkt der Reaktion des Neurotransmitters Dopamin mit Acetaldehyd oder Pyruvat, das in verschiedenen Studien als möglicher Biomarker bestehen konnte [40].

- **Cocaethylen**

Wird in der Leber und in den Nieren bei einem zeitnahen Konsum von Alkohol und Kokain gebildet [57]. Eine Korrelation zwischen EtG- und Cocaethylen-Konzentrationen in Haaren konnte aufgrund eines stark schwankenden Konsums, individuellen Unterschieden im Metabolismus sowie abweichenden Einlagerungsmechanismen nicht gefunden werden [58].

- **Dolichol**

Ein Polyisoprenoidalkohol, der wie Ethanol durch ADH oxidiert wird. Eine Alkoholaufnahme führt durch eine Hemmung des Dolichol-Abbaus zu erhöhten Dolichol-Konzentrationen, z. B. im Urin. Nachteil ist eine geringe Sensitivität (9–19%) [59].

- **β -Hex**

Ein Enzym, welches unter anderem bei Alkoholikern in höheren Konzentrationen gefunden worden ist [60]. Die Anwendbarkeit in der Routine ist jedoch noch nicht überprüft.

- **Sialinsäure Index von Plasma Apolipoprotein J (SIJ)**

Ein Glycoprotein, das verantwortlich für den Transport von Fetten ins Blut ist. Ähnlich wie bei Transferrin sind Sialinsäure Moleküle gebunden, deren Anzahl durch den Konsum von Alkohol reduziert wird [40].

- **Sialinsäure**

Ein Aminosaccharid, welches frei oder gebunden an Proteinen, Peptiden und Fetten in nahezu allen Geweben und Flüssigkeiten vorkommt [61]. Eine Studie ergab eine erhöhte Konzentration im Blut von Alkoholikern im Vergleich zu moderaten Trinkern mit einer ähnlichen Sensitivität und Spezifität wie der CDT-Wert [60].

- **Cholesterinester-Transferprotein (CETP)**

Ein weiteres primär in der Leber gebildetes Glycoprotein, welches am Cholesterintransport beteiligt ist. Ein erniedrigter Wert im Serum kann ähnlich wie bei GGT, MCV, AST und ALT neben dem Konsum von Alkohol viele weitere Auslöser (z. B. Krankheiten, Medikamente, Ernährung) haben [42].

- **High-density Lipoprotein (HDL)**

Der Konsum von Alkohol erhöht die Konzentrationen von Cholesterin und Phospholipiden in HDL und führt zu einer Ansammlung von Phospholipid-reichen HDL₂ Partikeln [42].

4.3 Ethylglucuronid (EtG) und Ethylsulfat (EtS)

4.3.1 Allgemeines zu EtG und EtS

EtG und EtS sind schwerflüchtige, wasserlösliche Phase-II-Metaboliten von Ethanol. Abbildung 4.3 zeigt die chemischen Strukturen von EtG und EtS. EtG wurde 1951 erstmals von Kamil et al. [62,63] im Urin von Kaninchen gefunden. Jaakonmaki et al. [64] konnten 1967 EtG im Urin von Ratten und Menschen qualitativ nachweisen. Eine erste Quantifizierung von EtG in Urin gelang Schmitt et al. [65] 1995 nach der erfolgreichen Synthese von reinem EtG aus Ethanol und Triacetyl- α -D-6-bromoglucuronsäuremethylester. Gebildet wird EtG durch eine von Uridindiphosphat (UDP)-Glucuronosyltransferasen katalysierte Konjugation des Alkohols mit UDP-Glucuronsäure [66]. Genetische Polymorphismen beeinflussen die individuelle Bildung von EtG [67].

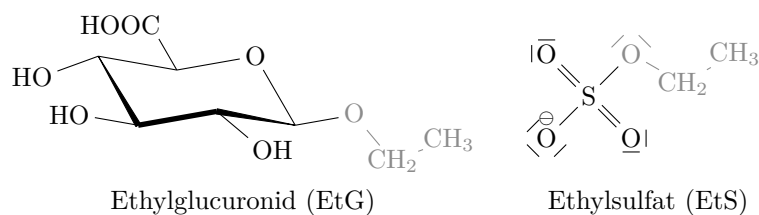


Abbildung 4.3: Chemische Strukturen von EtG, EtS. Der eingebaute Alkohol ist jeweils grau markiert.

EtS wird aus Ethanol, durch Sulfotransferasen katalysiert, gebildet [68,69]. Vestermark und Boström [70] konnten 1959 erstmals EtS als Konjugationsprodukt aus Ethanol und aktiviertem Sulfat in der Leber von Ratten nachweisen. Eine Aktivität von Sulfotransferasen in der Lunge konnte von Manautou und Carlson [71] gefunden werden. Polymorphismen im menschlichen Genom, die für individuelle Unterschiede bei der Bildung von EtS sorgen, wurden bei den beteiligten Sulfotransferasen nachgewiesen [69, 72, 73]. EtS und deuteriertes EtS für analytische Zwecke kann aus Ethanol bzw. deuteriertem Ethanol, Schwefelsäure (97%) und wasserfreiem Natriumsulfat synthetisiert werden [74].

Review-Artikel über EtG und EtS, z. B. von Wurst et al. [75, 76], Seidl et al. [77], Politi et al. [78], Palmer [79] sowie von Walsham und Sherwood [80] geben einen guten Überblick über den jeweils aktuellen Wissensstand.

Die folgenden Abschnitte fassen die wichtigsten Erkenntnisse über EtG und EtS zusammen. Ein besonderes Augenmerk liegt dabei auf dem Nachweis von EtG und EtS in Urin sowie der Bestimmung von EtG in Haaren.

4.3.2 Anwendungsgebiete

Ein Nachweis von EtG und EtS ist in den meisten Körperflüssigkeiten möglich. Neben Blut und Urin, den klassischen Matrices für forensische oder klinische Untersuchungen, können auch Speichel [81] oder Schweiß [82, 83] analysiert werden. Eine Bestimmung von EtG in getrockneten Blutproben konnte ebenfalls erfolgreich durchgeführt werden [84]. Kürzlich wurde zudem EtG in den Finger- und Fußnägeln von Personen, die Alkohol trinken, gefunden [85]. Mit einer neu entwickelten Ionenaustauschchromatographie-Methode gelang der Nachweis von EtS in Abwasser [86]. Es konnten maximale Konzentrationen an Wochenenden sowie eine Korrelation mit der verkauften Alkoholmenge in der untersuchten Region gefunden werden. EtG hingegen ist in Abwasser nicht stabil.

Die möglichen Anwendungsgebiete für einen Nachweis von EtG/EtS in Serum, Urin oder Haaren sind vielfältig und umfassen z. B. Drogentests am Arbeitsplatz [83], Überwachungen von Entzugspatienten während oder nach einem Alkoholentzug [87–91], Diagnosestellungen bei Notfallpatienten mit Verdacht auf einen übermäßigen Alkoholkonsum [92, 93], Voruntersuchungen für Lebertransplantationen zur Einschätzung der Erfolgsaussichten [94–96] sowie weiterführende Untersuchungen bei Verdacht auf eine KO-Mittelgabe (z. B. γ -Hydroxybuttersäure) [97]. Vorhandenes EtG in Mekonium von Neugeborenen deutet auf einen Alkoholkonsum der Mutter während der Schwangerschaft hin [98–102]. Eine Analyse der Haare der Mutter oder des Neugeborenen auf EtG und/oder FAEE kann ebenfalls Hinweise auf eine nicht angegebene Alkoholaufnahme während der Schwangerschaft geben [103–105]. Auch in der Plazenta und in fötalem Gewebe konnten EtG und EtS nachgewiesen werden [106].

Für postmortale Analysen eignet sich die Bestimmung von EtG und EtS in Glas-körperflüssigkeit [107, 108] sowie in Blut, Urin [109–113] und Haaren [114]. Auch in aus den Rippen entnommenen Knochenmark sowie in Muskelfleisch, Nieren und Leber konnte postmortal EtG nachgewiesen werden [115]. Insbesondere bei niedrigen Alkoholkonzentrationen oder bei dem Verdacht einer postmortalen Bildung von Alkohol können wichtige Erkenntnisse durch die Bestimmung der Alkoholmetaboliten gewonnen werden. Bei ausreichender Kühlung (4°C) der Blut- und Gewebeproben waren auch nach einer vierwöchigen Lagerung nur geringe Abweichungen in den EtG-Konzentrationen zu finden [116]. Selbst in den Überresten einer exhumierten Leiche, 27 Jahre nach dem Tod, wurden EtG und EtS gefunden [117].

4.3.3 EtG und EtS in Urin und anderen Körperflüssigkeiten

Methoden zum Nachweis von EtG und EtS

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von analytischen Methoden zur Detektion und Quantifizierung von EtG veröffentlicht. Für den Nachweis in Urin und Serum kommen folgende Techniken zum Einsatz:

- Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC-MS) [65, 75, 118–120],
- Flüssigchromatographie/Massenspektrometrie (LC-MS) [121–125],

- Flüssigchromatographie/Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) [75, 126–131],
- Flüssigchromatographie/Elektrochemische Detektion [132, 133],
- Kapillarelektrophorese (engl. Capillary Electrophoresis, CE) [134–137],
- Immunchemische Verfahren [138–141].

Auch bei der Aufarbeitung der Proben gibt es weitreichende Unterschiede. Neben einfachen Verdünnungen oder Proteinfällungen mit Methanol [75, 118, 121–123, 126–131, 134, 135, 137, 139, 141] kommen Aufreinigungen mittels Festphasenextraktion (engl. Solid phase microextraction, SPE) [119, 124, 125, 132, 133, 136] sowie Extraktionen mit Mikrowellenstrahlung [120] zum Einsatz. Laut Zheng et al. [124] ist ein ungestörter Nachweis von EtG nur nach einer Aufreinigung des Urin mittels SPE möglich. Favretto et al. [142] stellten einen Intensitätsabfall des Messsignals bei Analyse von mehreren Proben hintereinander fest. Die Probleme konnten durch einen Wechsel der Ionenquelle am Massenspektrometer (chemische Ionisation unter Atmosphärendruck (engl. Atmospheric-pressure chemical ionization, APCI) statt einer Elektrospray-Ionisation (ESI)) behoben werden. Tabelle 4.1 zeigt eine Übersicht der bisher veröffentlichten Methoden. Weitere Informationen über verwendete LC-MS/MS-Methoden sind in Tabelle 4.2 zu finden.

Immunchemische Bestimmung von EtG in Urin

2002 wurde von Zimmer et al. [139] ein erster Immunoassay zum Nachweis von EtG in Urin und Serum entwickelt und getestet. Während für die Seren ($n = 335$) gute Ergebnisse mit einer Übereinstimmung mit den GC-MS Ergebnissen von $> 90\%$ ermittelt werden konnten, wurden bei den Urinen ($n = 186$) 24,3% der Fälle falsch negativ und 23,2% falsch positiv bewertet. Die mittels einer Grenzwertoptimierungskurve (engl. receiver operating characteristic (ROC)) ermittelte Selektivität und Spezifität für Urin lagen bei einem Grenzwert von 1,33 mg/L lediglich bei 75,7% bzw. 76,8%. Starke Schwankungen in der Wiederfindungsrate (40,8–100%) sowie die vielen falsch negativen Ergebnisse deuten auf Kreuzreaktionen mit anderen Substanzen, z. B. endogene und exogene Glucuronide, hin. Der getestete Immunoassay ist daher nur für EtG Bestimmungen in Serum geeignet.

Die Verwendung von monoklonalen statt polyklonalen Antikörpern brachte eine deutliche Verbesserung des immunchemischen Nachweises von EtG in Urin. Bih et al. [140] erhielten bei vergleichenden Untersuchungen Übereinstimmungen mit den mittels LC-MS/MS ermittelten EtG-Konzentrationen in über 90% der Fälle. Hinweise auf Kreuzreaktionen mit anderen Glucuroniden und weiteren Substanzen wurden nicht gefunden. Boettcher et al. [141] fanden bei einer Untersuchung von 400 Urinproben neben einer guten Reproduzierbarkeit auch bei kleinen Konzentrationen (0,1 mg/L), eine signifikante Korrelation zwischen den Ergebnissen des Immunoassays und den LC-MS/MS-Untersuchungen ($r^2 = 0,931$, $P < 0,0001$). Je nach vorgegebenem Grenzwert (0,5 oder 1,0 mg/L) konnten Sensitivitäten von 98,7% bzw. 97,9%, Spezifitäten von 98,0% bzw. 98,4%, sowie eine Übereinstimmung der Ergebnisse in 98,3% der untersuchten Proben gefunden werden.

Weitere Studien bestätigten die Übereinstimmungen zwischen den Ergebnissen des Immunoassays mit denen aus LC-MS/MS-Bestimmungen und damit die Eignung der

Tabelle 4.1: Übersicht über bisher veröffentlichte Methoden zum Nachweis von EtG und EtS in Urin und Serum. Neben Kurzinformationen zur Aufarbeitung sind u. a. das verwendete Analyseverfahren sowie die ermittelten LODs und LOQs aufgeführt.

Jahr	Analyt	Matrix	Aufarbeitung	Instrumentelle Analytik	LOD [mg/L]	LOQ [mg/L]	Lit.
1995	EtG	Urin/Serum	Keine oder Fällung	GC-MS	0,1	-	[65]
1995	EtG	Urin	Fällung	GC-MS	-	-	[118]
1999	EtG	Urin/Serum	Verdünnung/Fällung	GC-MS und LC-MS/MS	0,1 (beide)	-	[75]
1999	EtG	Serum	Fällung	LC-MS	0,03	-	[121]
2001	EtG	Urin/Serum	SPE	GC-MS	0,168/0,037	0,560/0,173	[119]
2002	EtG	Urin/Serum	Verdünnung	Immunchemisch (ELISA)	-	-	[139]
2002	EtG	Urin	Verdünnung	LC-MS	0,05	0,1	[122]
2004	EtS	Urin	Verdünnung	LC-MS/MS	0,05	0,11	[126]
2004	EtG	Urin	Verdünnung/Fällung	LC-MS/MS	0,052	0,125	[127]
2004	EtG	Urin	Verdünnung/Fällung	LC-MS/MS	0,1	0,3	[128]
2004	EtS	Urin	SPE	LC-MS/MS	-	-	[69]
2005	EtG	Urin	SPE	Elektrochemische Detektion	0,03–0,1	0,1–0,8	[132]
2005	EtG	Serum	Verdünnung	CE	0,1	-	[134]
2005	EtS	Urin	Verdünnung	LC-MS	0,05	-	[123]
2005	EtG/EtS	Urin	Verdünnung	LC-MS/MS	0,025	0,05	[129]
2006	EtG	Urin	SPE	Elektrochemische Detektion	0,08	0,3	[133]
2006	EtG/EtS/EtP	Urin	Verdünnung/Fällung	LC-MS/MS	-	0,1	[130]
2006	EtG	Urin	Keine	Immunchemisch (ELISA)	0,35	-	[140]
2006	EtS	Urin	Verdünnung	CE/UV-Detektion	-	5	[135]
2007	EtG/EtS	Serum	Verdünnung/Fällung	LC-MS/MS	0,01	0,05	[131]
2008	EtG	Urin	Mikrowellen	GC-MS	0,005	0,1	[120]
2008	EtG	Urin	Keine oder Fällung	Immunchemisch (ELISA)	-	<0,1	[141]
2008	EtS	Urin/Serum	SPE	CE	0,4–1,0/0,1	0,6–2,0/0,2	[136]
2008	EtG	Serum	Verdünnung	CE	0,01	-	[137]
2008	EtG	Urin	SPE	LC-MS	-	-	[124]
2009	EtG	Urin	Fällung	LC-MS/MS	0,1	0,25	[143]
2010	EtG/EtS	Urin	SPE	LC-MS	0,05	0,1	[125]
2010	EtG/EtS	Urin	Fällung	LC-MS/MS	0,13/0,2	0,001 (beide)	[113]

EtP: Ethylphosphat, Lit.: Literatur

Tabelle 4.2: Weitere Fakten (z. B. verwendete Säule und Laufmittel) der veröffentlichten LC-MS/MS Methoden zur Quantifizierung von EtG und EtS in Urin und Serum.

Jahr	Analyt	Säule	Laufmittel	Elution	Fluss [mL/min]	p.-c. ACN [mL/min]	Lit.
1999	EtG	5 Micron C-18 (125×2 mm)	A: 1% HAm in H ₂ O, B: 0,1% HAm in Methanol	Gradient	0,18	-	[75]
1999	EtG	TSKgel Amide 80 (250×4,6 mm)	30 mmol Ammoniumacetat:ACN (30:70)	isokratisch	0,8	-	[121]
2002	EtG	Hypercarb (100×2,1 mm, 5 µm)	25 mmol/L HAm mit 5% ACN	isokratisch	0,2	-	[122]
2004	EtS	Synergi Polar RP (250×2 mm, 4 µm)	A: 0,1% HAm, B: ACN	Gradient	0,2	ja	[126]
2004	EtG	Synergi Polar RP (250×2 mm, 4 µm)	0,1% HAm	isokratisch	0,2	ja	[127]
2004	EtG	Synergi Polar RP (250×2 mm, 4 µm)	0,1% HAm	isokratisch	0,2	ja	[128]
2004	EtS	Hypersil Duet SAX (150×4,6 mm, 5 µm)	H ₂ O:Methanol (7:3) + 0,05 Gew.-% Triethylamin (pH 4)	isokratisch	0,6	-	[69]
2005	EtS	Hypercarb (100×2,1 mm, 5 µm)	25 mmol/L HAm mit 5% ACN	isokratisch	0,2	-	[123]
2005	EtG/EtS	Chrompack Inertsil ODS-3 (100×3 mm, 3 µm)	A: 0,1% HAm, B: ACN	Gradient	0,2	0,1	[129]
2006	EtG/EtS/EtP	Gemischte RP/Anionenaustausch Phase	A: 0,1% HAm, B: ACN	Gradient	0,2	0,1	[130]
2007	EtG/EtS	Chrompack Inertsil ODS-3 (100×3 mm, 3 µm)	A: 0,1% HAm, B: ACN	Gradient	0,2	0,1	[131]
2008	EtG	Hypercarb (100×2,1 mm, 5 µm)	25 mmol/L HAm mit 5% ACN	isokratisch	0,2	-	[124]
2009	EtG	Hypercarb (100×2,1 mm, 5 µm)	A: 0,1% HAm, B: ACN	Gradient	0,2	-	[143]
2010	EtG/EtS	Hypercarb (150×2,1 mm, 5 µm)	0,1% HAm, 10 mmol/L CH ₅ NO ₂ (pH 3) A: in H ₂ O, B: in ACN	Gradient	0,2	-	[125]
2010	EtG/EtS	ZIC-HILIC (150×2,1 mm, 3,5 µm)	A: 5 mmol/L Ammoniumacetat, B: ACN	Gradient	0,2-0,4	-	[113]

EtP: Ethylphosphat, HAm: Ameisensäure, p.-c.: post-column Addition, Gew.-%: Gewichtsprozent, CH₅NO₂: Ammoniumacetat

immunchemischen Untersuchung als richtungsweisende Screeninguntersuchung für den Nachweis von EtG in Urin [144–146]. Turfus et al. [146] fanden gute Korrelationen zwischen Immunoassay- und LC-MS/MS-Ergebnissen sowohl bei klinischen Proben ($r^2 = 0,996$) als auch bei postmortalen Proben ($r^2 = 0,956$). Der beste Kompromiss zwischen Sensitivität und Spezifität, ermittelt mit einer ROC-Analyse, lag bei 0,092 mg/L für einen LC-MS/MS-Grenzwert von 0,1 mg/L und bei 0,3 mg/L für einen LC-MS/MS-Grenzwert von 0,5 mg/L.

Dass in 87,2% der positiven Fälle mittels LC-MS/MS höhere EtG-Konzentrationen nachgewiesen wurden als mit dem Immunoassay, deutet darauf hin, dass Kreuzreaktionen nur eine untergeordnete Rolle spielen. McDonnell et al. [147] verglichen Selbstauskünfte von Patienten während eines Entzuges mit den AAK und den immunchemisch bestimmten EtG-Konzentrationen im Urin. Während keiner der Atemalkoholtests positiv war, konnte in neun von 14 Fällen der angegebene Alkoholkonsum durch einen positiven EtG-Befund nachgewiesen werden (Übereinstimmung in 77% der Fälle). Ein täglicher Konsum von weniger als drei Standardgetränken führte jedoch zu keiner Überschreitung des Grenzwertes (0,5 mg/L). Eine Übereinstimmung in 77% der Fälle stimmt mit den Ergebnissen ähnlicher Studien mit anderen Drogen überein.

Während eine Kreuzreaktivität von EtG mit EtS ausgeschlossen werden konnte [141], wurden falsch positive Befunde nach der Einnahme des Hypnotikums Chloralhydrat beobachtet [148]. Da eine Kreuzreaktion von EtG mit Chloralhydrat sowie den Metaboliten Trichlorethanol und Trichloressigsäure ausgeschlossen werden konnte, ist wahrscheinlich gebildetes Trichlorethylglucuronid verantwortlich für die falsch positiven Ergebnisse.

Studien – EtG in Urin und Serum

Eine Reihe von Studien zum Nachweis von EtG und EtS mit Daten aus Trinkversuchen und klinischen Studien wurde bisher veröffentlicht. EtG-Konzentrationen in Serum, Urin oder Speichel wurden nach der Aufnahme von definierten Mengen Alkohol bestimmt. Konsumiert wurden vom Körpergewicht abhängige Mengen zwischen 0,15 und 1,0 g Alkohol/kg [123, 130, 149–155] sowie absolute Alkoholmengen zwischen 1,0 und 49 g [12, 13, 15, 122]. Tabelle 4.3 zeigt Eckdaten und Ergebnisse der durchgeführten Trinkversuche. Weitere Studien beobachteten die EtG- und zum Teil EtS-Konzentrationen in Urin oder Serum während der Entgiftungsphase zu Beginn eines Entzugs bzw. im weiteren Verlauf der Therapie [91, 122, 123, 128, 143, 144, 156, 157].

Bereits nach dem Konsum von 1–3 g Alkohol konnten EtG und EtS im Urin nachgewiesen werden [13, 127]. Es konnte eine signifikante Korrelation zwischen den EtG- und EtS-Konzentrationen im Urin nachgewiesen werden [123, 130, 150]. Die bestimmte Urin-Alkoholkonzentration war jedoch nicht mit der Konzentration der Alkoholmetaboliten korreliert [113, 130]. Gründe hierfür sind die unterschiedliche Elimination sowie bei postmortalen Untersuchungen eine Bildung von Alkohol.

Untersuchungen zur Kinetik von EtG und EtS wurden durchgeführt. Sowohl EtG als auch EtS werden nach einer Kinetik erster Ordnung gebildet und über einen exponentiellen Verlauf eliminiert. Relevante Geschwindigkeitskonstanten konnten mittels Simulationsrechnungen bestimmt werden [158, 159]. Die berechnete EtG-/EtS-Konzentrationskurve im Serum erreicht ihr Maximum deutlich nach dem Erreichen der

Tabelle 4.3: Zusammenfassung der Ergebnissen von Studien, in denen die EtG/EtS-Konzentrationen nach der Gabe einer definierten Alkoholmenge im Urin bestimmt wurden.

Jahr	Tln.	Alkoholmenge	Alkoholart	Alkoholaufnahme [min]	Probenahme [h]	Maximale Konzentration [mg/L]		Zeitpunkt Maximum [h]		Nachweisfenster [h]		LOD [mg/L]	LOQ [mg/L]	Lit.
						EtG	EtS	EtG	EtS	EtG	EtS			
2002	6	0,5 g/kg	Bier (5%)	30	31,5	20,6-124	n.b.	5,5	n.b.	22,5-31,5	n.b.	n.a./n.b.	0,1/n.b.	[149]
2002	4	7 g	Bier (2,2%)	kurz	6	0,2-8,4	n.b.	n.a.	n.b.	> 6	n.b.	0,05/n.b.	0,1/n.b.	[122]
2004	1	0,5 g/kg	n.a.	30	32	n.b.	n.a.	4	4	<32	<32	0,05/0,06	n.a./n.a.	[150]
2005	9	0,15 g/kg	n.a.	30	24	n.b.	n.a.	n.b.	1-4	n.b.	>12	n.b./0,05	n.b./n.a.	[123]
	9	0,5 g/kg	n.a.	30	24	n.b.	n.a.	n.b.	1-5	n.b.	>24			
2006	2	0,2 g/kg		24		0,68-2,93	0,27-1,10	4-12	4	>24	<18/<24	0,1/0,1	0,3/0,3	[130]
2006	4	9 g	n.a.	20-30	36	5,2-15,6	2,0-11,1	1,7-9,4	1,7-2,8	13,3-19,8	19,7-26,3	0,052/0,05	0,125/0,11	[12]
	3	18 g	n.a.	20-30	36	9,7-12,3	8,1-14,8	2,3-6,5	2,0-5,0	23,0-24,5	21-29,4			
	1	20 g	n.a.	20-30	36	2,4	1,1	2	1,2	3,3	5			
	1	49 g	n.a.	30	36	72,9	44,1	2,1	2,8	36	36			
2007	5	0,19-0,28 g/kg	Wein/Bier/Spir.	15-60	72	n.a.	n.b.	n.a.	n.b.	<24	n.b.	0,1/n.b.	n.a./n.b.	[152]
	7	0,39-0,58 g/kg	Wein/Bier/Spir.	15-250	72	n.a.	n.b.	n.a.	n.b.	<48	n.b.			
	7	0,66-0,85 g/kg	Wein/Bier/Spir.	50-220	72	n.a.	n.b.	n.a.	n.b.	<48	n.b.			
2007	10	0,5 g/kg	Wodka (40%)	15	45-50	41-73	n.b.	4,0-7,0	n.b.	25-35	n.b.	0,09/n.b.	0,2/n.b.	[151]
2008	13	0,50-0,78 g/kg	n.a.	30	24-70	23,1-179	5,8-67,2	5,0-7,5	3,1-7,4	27->44	23-47	n.a./n.a.	0,1/0,1	[153]
2008	10	0,5 g/kg	Wodka (40%)	15	45-50	47-88	14-29	4,0-7,0	2,3-7,0	25-48	25-39	0,1/0,1	n.a./n.a.	[154]
2008	4	24 g	Wodka (32%)	20	75	12,2-83,2	n.b.	3-8	n.b.	38-46	n.b.	0,004/n.b.	0,01/n.b.	[15]
2009	4	1 g	Sekt (5%)	n.a.	24	<LOD-0,35	<LOD-0,26	2-6,25	2-6,25	9	11,3	0,05/0,04	0,05/0,05	[13]
	12	1 g	Whisky(40%)	n.a.	24	<LOD-0,49	n.a.	0,5-3,5	n.a.	8,25	n.a.			
	12	3 g	Sekt (5%)	n.a.	24	<LOD-1,36	0,13-0,86	1-3,6	1-3,6	19	19			
2010	11	0,5 g/kg	Wodka (60%)	15	24	47,1-96,5	n.b.	1,5-3,5	n.b.	12->24	n.b.	0,002/n.b.	0,004/n.b.	[155]
	11	1,0 g/kg	Wodka (60%)	60	24	97,2-225,5	n.b.	3,5-5,5	n.b.	>24	n.b.			

n. a.: nicht angegeben, n. b.: nicht bestimmt, Spir.: Spirituosen, Tln.: Teilnehmer

maximalen Alkoholkonzentration, fällt dann bis zu einer kompletten Eliminierung des Ethanols linear ab und verhält sich danach exponentiell [158]. Aus einem Vergleich von berechneten und gemessenen Werten können Aussagen über den Alkoholkonsum überprüft werden [159]. Es konnte gezeigt werden, dass EtG mit einer Halbwertszeit von ca. 2,5 h aus dem Körper eliminiert wird [122, 149, 160]. Innerhalb der ersten 24 h nach dem Konsum von Alkohol werden ca. 95–99% des EtG/EtS ausgeschieden. 79–92% der Metaboliten verlassen bereits innerhalb der ersten 10–12 h den Körper [12, 15]. Ein Nachweis von EtG in Urin ist deutlich länger möglich als der Nachweis des Alkohols selbst. Das Nachweisfenster ist stark abhängig von der aufgenommenen Menge an Alkohol. Während nach dem Konsum einer kleinen Alkoholmenge (≤ 9 g) nach maximal 20 h kein EtG und nach maximal 26 h kein EtS mehr detektiert werden konnte [12, 13], sind die Metaboliten nach der Aufnahme einer größeren Menge Alkohol deutlich länger als 24 h nachweisbar (siehe Tabelle 4.3). Bei einem erheblichen Konsum ist ein Nachweis sogar über 100 h nach dem letzten Konsum möglich [144]. Wright et al. [161] konnten bei Versuchen mit Ratten Daten zur Bildung und Elimination von EtG finden, die mit denen von Menschen übereinstimmen.

Es konnte gezeigt werden, dass die gemessene EtG-Konzentration abhängig von der Nahrungsaufnahme während der Alkoholaufnahme ist [122]. Im Urin von nüchternen Personen konnte eine bis zu 14-fach höhere EtG-Konzentration nachgewiesen werden als im Urin von Personen, die vorher gegessen hatten. Es gibt Hinweise, dass auch die Alkoholgewöhnung Einfluss auf die Bildung von EtG hat [154]. Anzeichen für eine Akkumulation von EtG im Körper konnten trotz einer täglichen Aufnahme von Alkohol (0,8 g/kg) über einen Zeitraum von fünf Tagen nicht gefunden werden [162]. Es wurden jedoch große Schwankungen bei den bestimmten EtG-Konzentrationen in Urin ermittelt.

Unterschiedliche Ergebnisse ergaben sich betreffend des molaren Verhältnisses von EtG und EtS in Urin. Wurst et al. [12] konnten etwa übereinstimmende Konzentrationen nachweisen. Weitere Studien fanden dagegen höhere EtG-Konzentrationen mit einem durchschnittlichen molaren Verhältnis von 1,5 (0,3–3,0) [150] bzw. 1,7 (Median) [123, 154]. Auch der Anteil des Alkohols, der zu EtG bzw. EtS metabolisiert wird, wurde in verschiedenen Publikationen unterschiedlich beziffert. Die gemittelten Werte reichen für EtG von 0,019% bis 0,04% und weisen große individuelle Schwankungen auf [12, 130, 149, 154, 163]. Zu EtS werden etwas geringere Mengen des Alkohols (0,011–0,022%) metabolisiert [12, 154]. Bicker et al. [130] fanden bei Männern einen höheren Anteil (EtG: 0,023%, EtS: 0,015%) als bei Frauen (EtG: 0,018%, EtS: 0,011%). Zudem besteht laut Rosano et al. [15] eine Abhängigkeit von der aufgenommenen Alkoholmenge. Es konnte eine positive Korrelation gefunden werden, die unabhängig von individuellen Unterschieden besteht.

Nach einem Konsum von 0,5–0,78 g/kg Alkohol erreichte EtG seine Maximalkonzentration im Serum 0,5–2,0 h später als der Alkohol selbst und konnte mehr als 10 h nachgewiesen werden [153]. Es wurde eine Eliminationsrate für EtG in Serum von 0,14 g/L h (Median, Bereich 0,11–0,18 g/L h) sowie eine Halbwertszeit von 2,2 h ermittelt [151]. Ähnliche Ergebnisse wurden von Schmitt et al. [159] gefunden, die EtG in einem Trinkversuch 8 h länger im Blut nachweisen konnten als den Alkohol selbst. Eine Korrelation zwischen der Alkohol- und der EtS-Konzentration in Urin bestand nicht.

Im Blut von chronischen Vieltrinkern konnten Halbwertszeiten für EtG (3,3 h) und EtS (3,6 h) gefunden werden, die sich nicht signifikant von denen bei moderatem Konsum unterscheiden [157].

Durch eine Bestimmung von EtG in zwei zeitversetzt genommenen Blutproben kann analog zu Ethanol eine Auskunft über den Zeitraum zwischen Alkoholaufnahme und Probenahme getroffen werden. Kurzfristiges Trinken kann bei einer abfallenden EtG-Konzentration sowie bei einem Verhältnis von Ethanol (mg/L) zu EtG (mg/L) < 1 ausgeschlossen werden [151].

Mögliche Beeinflussungen der EtG-/EtS-Konzentrationen in Urin

Im Rahmen der durchgeführten Studien wurde eine Reihe von Faktoren gefunden, die die EtG-Konzentrationen in Urin und Serum beeinflussen können. Eine Aufnahme von großen Flüssigkeitsmengen führt zu einer vermehrten Ausscheidung und damit zu einer Verdünnung des Urins. Als Folge werden niedrigere EtG- und EtS-Konzentrationen gemessen [149]. Eine Normierung der gemessenen EtG-/EtS-Konzentration mit der Kreatininkonzentration des Urins kann den Einfluss der Verdünnung beheben. Kreatinin ist ein harnpflichtiges Stoffwechselprodukt, welches als Marker für den Verdünnungsgrad des Urins eingesetzt werden kann [164]. Laut Bergström et al. [165] besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen normierten EtG- und Alkoholkonzentrationen im Urin, während bei direkt gemessenen EtG-Konzentrationen keine Korrelation gefunden wurde. Ergebnisse von Trinkversuchen zeigten eine deutlich geringere Abhängigkeit der normierten EtG-/EtS-Konzentrationen von dem aufgenommenen Flüssigkeitsvolumen [149]. Die gemessenen EtG-Konzentrationen scheinen zudem abhängig von der Art des konsumierten Alkohols zu sein. Høiseth et al. [21] bestimmten deutlich höhere EtG-Konzentrationen im Urin nach dem Konsum von alkoholfreiem Wein als nach dem Trinken von Wodka, obwohl in beiden Fällen die gleiche Menge Alkohol (1,8 g) aufgenommen wurde. Als Grund wurden die unterschiedlich langen Trinkphasen angegeben.

EtG kann im Urin durch Bakterien sowohl gebildet als auch abgebaut werden. Insbesondere in unzureichend gekühlten Urinproben kann es zu einer hohen Anzahl und Aktivität von Bakterien kommen [166, 167]. Bei einer Temperatur von 36°C wurde EtG in einer in vitro Studie von den Bakterienstämmen *Escherichia Coli* und *Klebsiella Pneumoniae* innerhalb von 96 h komplett abgebaut [168]. Durch die Zugabe von Konservierungsmitteln (z. B. Chlorhexidin) [169] sowie bei einer ausreichenden und lückenlosen Kühlung der Urinprobe [116] konnte der Abbau von EtG verhindert werden. Vor kurzem wurde ein Verfahren zur Analyse von Trockenurinproben, in denen kein bakterieller Abbau stattfindet, veröffentlicht [170]. EtS scheint stabiler gegenüber Bakterien zu sein [166–168]. Erst bei einer hohen Bakteriendichte konnte ein Abbau von EtS nachgewiesen werden [171].

Falsch positive Ergebnisse können ebenfalls durch den Konsum oder Gebrauch von Produkten mit geringen und zum Teil versteckten Mengen Alkohol entstehen. Alkoholfreies Bier beispielsweise darf bis zu 0,5% Alkohol enthalten. Ein Konsum dieses Getränks in großen Mengen (2,5 L) führte zu maximalen EtG-Konzentrationen zwischen 0,3 und 14,1 mg/L und maximalen EtS-Konzentrationen zwischen $< 0,04$ und

16,1 mg/L [172]. Nach dem Konsum einer Flasche (750 mL) alkoholfreien Weins (0,2% Alkohol) konnte kein EtG, jedoch EtS in Konzentrationen bis zu 2,15 mg/L detektiert werden [21]. Sowohl EtG (0,15–3,97 mg/L) als auch EtS (0,21–39,14 mg/L) waren in dem konsumierten alkoholfreien Wein enthalten [129]. In einem Glas Wein (0,2 L) kann mehr EtS (8 mg) enthalten sein als aus dem vorhandenen Alkohol gebildet wird (4–12 mg bei einem Alkoholgehalt von 10%). Dass nur EtS und kein EtG im Urin gefunden wurde, deutet auf eine unterschiedliche Bioverfügbarkeit hin [21]. Der Konsum von Hefe in Kombination mit Zucker führte zu nachweisbaren EtG- und EtS-Konzentrationen im Urin von maximal 0,5 mg/L (auf eine Kreatininkonzentration von 100 mg/dL normiert (EtG100): 0,67 mg/L) sowie 1,05 mg/L (auf eine Kreatininkonzentration von 100 mg/dL normiert (EtS100): 1,41 mg/L) [173].

Während Reisfield et al. [22] nach dem mehrfachen, bestimmungsgemäßen Gebrauch (viermal täglich für 30 s) von alkoholhaltigem Mundwasser (26,9% Alkohol) EtG nur in einer Urinprobe ($c_{\text{EtG}} = 0,17$ mg/L) sowie EtS im Urin von sieben der zehn Probanden (c_{EtS} maximal = 0,10 mg/L) finden konnten, lagen die nachgewiesenen Konzentrationen in einer Studie von Jones et al. [19] deutlich höher. Bis zu 0,37 mg/L EtG und 0,19 mg/L EtS konnten 6 h nach einer neunmaligen, stündlichen Anwendung eines alkoholhaltigen Mundwassers (21,6% Alkohol) für jeweils 30 s gefunden werden. Høiset et al. [21] konnten nach achtmaligem, bestimmungsgemäßem Gurgeln mit 15 ml alkoholhaltigem Mundwasser (21,6% Alkohol) für eine Minute kein EtG im Urin finden. Alle getesteten Blut- und Speichelproben waren ebenfalls negativ. Constantino et al. [20] konnten zeigen, dass ein positiver EtG-Befund in Urin durch den Gebrauch eines alkoholhaltigen Mundwassers (12% Alkohol) nach der Empfehlung des Herstellers sehr unwahrscheinlich ist. In nur zwei von 55 Morgenurinen konnten EtG-Konzentration $> 0,1$ mg/L (0,108 und 0,117 mg/L) gefunden werden. Lediglich der Gebrauch einer ganzen Flasche des Mundwassers (120 mL) führte zu positiven Resultaten in 12 von 39 Urinproben mit einer maximalen EtG-Konzentration von 0,35 mg/L.

Auch eine regelmäßige Anwendung von alkoholhaltigen Händedesinfektionsmitteln kann zu erhöhten EtG-Konzentrationen in Urin führen. Karch [16] warnt vor möglichen falsch positiven EtG-Resultaten in Urin, ohne genaue Untersuchungsergebnisse aufzuführen. Reisfield et al. [17] fanden die höchsten EtG-Konzentrationen im Vergleich zu ähnlichen Studien im Abendurin ($c_{\text{EtG}} = 0,07$ –2,0 mg/L) nach dem Gebrauch von alkoholhaltigen Desinfektionsmittel (62% Alkohol) 120-mal am Tag für 30 s über einen Zeitraum von fünf Tagen. Jedoch konnte in nur drei von 44 Morgenurinen EtG nachgewiesen werden ($c_{\text{EtG}} = 0,096$ –0,139 mg/L). Ähnliche Ergebnisse fanden Rosano und Lin [15], die nach einer Händedesinfektion (61% Alkohol) über fünf Tage (20-mal pro Tag) in drei von 99 Morgenurinen EtG-Konzentrationen $> 0,1$ mg/L (0,106, 0,114 und 0,105 mg/L) nachweisen konnten. Rohrig et al. [14] konnten hingegen nach dem Gebrauch des alkoholhaltigen Händedesinfektionsmittels Germ-x (62% Alkohol) alle 15 bzw. 30 min kein EtG im Urin nachweisen.

Eine Aufnahme des Alkohols über den Atem während des Gebrauchs eines alkoholhaltigen Desinfektionsmittels scheint keine Relevanz zu haben [18].

Grenzwerte für EtG und EtS in Urin

Verschiedene Grenzwerte für den Nachweis von Abstinenz sind in der Literatur zu finden. In die aktuellen *Beurteilungskriterien – zur – Urteilsbildung in der Medizinisch-Psychologischen Fahreignungsdiagnostik* ist ein Grenzwert von 0,1 mg/L EtG in Urin für Abstinenzprogramme aufgenommen worden [4]. Teilnehmer werden viermal in einem halben Jahr oder sechsmal in einem Jahr unangekündigt einbestellt. Innerhalb von 24 h müssen sie daraufhin unter Aufsicht eine Urinprobe abgeben, die in einem dafür akkreditierten Labor untersucht wird. Die Ergebnisse von Wojcik et al. [152] zeigten jedoch, dass ein Nachweis von strikter Abstinenz mit einer Einbestellungsfrist von 24 h selbst mit einem Grenzwert von 0,1 mg/L nicht möglich ist. Aufgrund der Vermutung, dass EtG-Konzentration $> 0,1$ mg/L in Urin auch nach dem Konsum von alkoholhaltigen Lebensmitteln nachgewiesen werden können, empfahlen Halter et al. [174], einen solch niedrigen Grenzwert nur für Personen anzuwenden, die über versteckte Alkoholgehalte in Lebensmitteln und Pflegeprodukten aufgeklärt worden waren. Bei allgemeinen Kontrolluntersuchungen sollte ein Grenzwert von 0,5 mg/L verwendet werden [143, 144]. Favretto et al. [125] empfahlen einen Grenzwert von 0,3 mg/L.

Für EtS wurde bisher kein Grenzwert festgelegt. EtS wird meist ausschließlich für eine Bestätigung der ausschlaggebenden EtG-Konzentration bestimmt. Aufgrund der unterschiedlichen Bildungswege von EtG und EtS sorgt eine parallele Bestimmung für eine Verbesserung der analytischen Genauigkeit durch eine gegenseitige Überprüfung der Marker [12].

4.3.4 EtG in Haaren

Methoden zum Nachweis von EtG in Haaren

Haaranalysen erlauben einen Nachweis von Drogen und anderen Substanzen, die in die Haare eingelagert werden, über einen Zeitraum von mehreren Monaten. Eine direkte Bestimmung von Ethanol in Haaren als Marker für einen Alkoholkonsum ist nicht praktikabel, da Ethanol hoch volatil ist und zudem eine Absorption aus der Umgebung und eine Bildung im und auf dem Haar aus Ethylestern möglich ist [175]. Einen Ausweg bietet der Nachweis von direkten Alkoholmetaboliten, deren Bildung mit einer Körperpassage des Alkohols verknüpft sind.

EtG wurde erstmals 1993 von Sachs et al. [176] in Haaren nachgewiesen. Erste Methoden zur Quantifizierung wurden 2000 von Alt et al. [177] und Skopp et al. [178] veröffentlicht. Die Nachweisgrenzen (engl. Limit of Detection, LOD) dieser Methoden lagen im Bereich von einigen Nanogramm. 2004 und 2006 wurden deutlich verbesserte Methoden veröffentlicht, mit denen Konzentrationen im unteren Pikogrammbereich nachgewiesen werden konnten [179, 180]. Eine Vielzahl von weiteren Methoden wurde in den folgenden Jahren veröffentlicht. Tabelle 4.4 gibt eine Übersicht über alle bisher veröffentlichten Methoden. Tabelle 4.5 zeigt weitere Parameter der Methoden, bei denen die Flüssigchromatographie zum Einsatz kam. Alle in Tabelle 4.5 aufgeführten Methoden außer [186] und [1] beschleunigen die Extraktion aus der Haarmatrix durch Ultraschall mit Dauern zwischen 15 min und mehreren Stunden (über Nacht). 2 h im Ultraschallbad bzw. 4 h konstantes Schütteln reichen bei pulverisierten Haaren zu einem nahezu vollständigen Herauslösen des EtG aus der Haarmatrix aus [1, 184].

Tabelle 4.4: Übersicht über bisher veröffentlichte Methoden zum Nachweis von EtG in Haaren. Neben Kurzinformationen zur Aufarbeitung sind das verwendete Analyseverfahren sowie die ermittelten LODs und LOQs aufgeführt.

Jahr	Einwaage [mg]	Dekontamination	Zerkleinerung	Extraktion	Aufreinigung Extrakt	Derivatisierung	Detektion	LOD/LOQ [pg/mg]	Lit.
2000	100	MeOH, Aceton	~ 1 mm	H ₂ O	-	BSTFA	GC-MS	-/-	[177]
2000	50	Ether, Aceton	Pulver	H ₂ O/MeOH	Filtration	MSTFA	GC-MS	2200/5000	[178]
2002	100	MeOH, Aceton	kleine Stücke	H ₂ O	SPE	-	LC-MS/MS	51/102	[181]
2004	100	H ₂ O, Aceton	< 1 mm	H ₂ O	-	PFPA	GC-MS	25/50	[179]
2004	30	<i>n</i> -Heptan	Pulver	H ₂ O	SPE	PFPA/PFPOH	GC-MS	2/4	[29]
2006	100	CH ₂ Cl ₂ , MeOH	1-2 mm	H ₂ O/MeOH	-	-	LC-MS/MS	2/3	[180]
2008	10	MeOH	-	H ₂ O	SPE	BSTFA	GC-MS/MS	-/-	[182]
2008	100	CH ₂ Cl ₂ , MeOH	1-2 mm	H ₂ O	-	-	UPLC-MS/MS	0,9/2,5	[114]
2008	50	CH ₂ Cl ₂	< 1 mm	H ₂ O	SPE	-	LC-MS/MS	2/10	[183]
2009	30	H ₂ O, Aceton	Pulver	H ₂ O	SPE	PFPA	GC-MS/MS	3,0/8,4	[184]
2009	30	H ₂ O, CH ₂ Cl ₂	1-2 mm	H ₂ O	SPE	-	LC-MS/MS	4/10	[185]
2009	100	Tween 80, H ₂ O	1 mm	<i>n</i> -Hexan/H ₂ O	-	BSTFA	GC-MS	100/300	[186]
2009	100	CH ₂ Cl ₂ , MeOH	Pulver	H ₂ O	Filtration	-	LC-MS/MS	25/50	[143]
2010	25	n.a.	1-2 mm	H ₂ O/ACN	-	-	LC-MS/MS	-/20	[101]
2010	10-50	H ₂ O, Aceton	Pulver	H ₂ O	SPE	HFBA	HS-SPME GC-MS/MS	0,6/2,8	[97]
2010	30-50	CH ₂ Cl ₂ , MeOH	kleine Stücke	H ₂ O/ACN	SPE	-	LC-MS/MS	2/6	[187]
2011	20	MeOH	5 mm	H ₂ O	SPE	BSTFA	GC-MS/MS	5/10	[188]
2011	50	CH ₂ Cl ₂ , MeOH	1-2 mm	H ₂ O/MeOH	-	-	LC-MS/MS	3/10	[189]
2011	50	Aceton, H ₂ O	1-2 mm	ACN/HCl (1 N)	SPE	-	LC-MS/MS	1/2,6	[31]
2012	100	H ₂ O, CH ₂ Cl ₂	1-2 mm	H ₂ O	SPE	-	LC-MS/MS	10/20	[190]
2012	30	CH ₂ Cl ₂ , MeOH	5 mm	H ₂ O	SPE	-	UPLC-MS/MS	-/2	[1]

BSTFA: N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid, HFBA: Heptafluorbuttersäureanhydrid, MeOH: Methanol, MSTFA: N-Methyl-N-trifluoroacetamid, n. a.: nicht angegeben, PFPA: Pentafluorpropionsäureanhydrid, PFPOH: 2,2,3,3,3-Pentafluoro-1-propanol, SPE: Festphasenextraktion, Tween 80: Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monooleat, UPLC: Ultra Performance Liquid Chromatography (engl.)

Tabelle 4.5: Ausführliche Informationen zu den Methoden, die EtG im Haar mittels LC-MS/MS quantifizieren.

Jahr	Säule	Laufmittel	Elution	Fluss [mL/min]	p.-c. ACN [mL/min]	Lit.
2002	Synergi Polar RP (150×2 mm, 4 µm)	1% ACN, 0,1% HAm in H ₂ O	isokratisch	0,2	0,2	[181]
2006	Chrompack Inertsil ODS-3 (100×3 mm, 3 µm)	A: 0,1% HAm, B: ACN	Gradient	0,2	0,1	[180]
2008	Acquity UPLC High Strength Silica (HSS) T3 (100×2,1 mm, 1,8 µm)	A: 0,1% HAm, B: ACN	Gradient	0,4	-	[114]
2008	Acquity BEH HILIC (100×2,1 mm, 1,7 µm)	A: Formiatpuffer (pH 3,0), B: ACN	Gradient	0,4		[183]
2009	Uptisphere-3SI (100×2 mm, 3 µm)	95% ACN, 5% Ammoniumacetatpuffer (pH 6,8)	isokratisch	0,2	-	[185]
2009	Hypercarb (100×2,1 mm, 5 µm)	A: 0,1% HAm, B: ACN	Gradient	0,2	-	[143]
2010	Luna HILIC (150×3 mm, 5 µm)	A: 2 mmol/L Ammoniumacetat, B: ACN	Gradient	0,4	-	[101]
2010	Hypercarb (100×2,1 mm, 5 µm)	8% ACN, 92% Ameisensäure 0,1%	isokratisch	0,3	-	[187]
2011	LiChroCART STAR RP 18E (150×4,6 mm, 5 µm)	A: 5 mol/L HAm, B: ACN	Gradient	0,5	-	[189]
2011	Zorbax Eclipse XDB-C8 (4,6×50 mm, 1,8 µm)	A: 5 mol/L Ammoniumformiat + 0,01% HAm, B: 95% ACN + 5% 2 mol/L Ammoniumformiat	Gradient	0,5		[31]
2012	Chrompack Inertsil ODS-3 (100×2,1 mm, 5 µm)	A: 0,1% HAm, B: ACN	Gradient	0,3	-	[190]
2012	Acquity UPLC High Strength Silica (HSS) T3 (100×2,1 mm, 1,8 µm)	A: 0,1% HAm, B: ACN	Gradient	0,4	-	[1]

HAm: Ameisensäure, p.-c.: post-column Addition

Bei klein geschnittenen Haaren werden jedoch erst nach 18 h Schütteln vergleichbare Extraktionsausbeuten (85%) erreicht. Eine schnellere und günstigere Extraktion ist laut Alvarez et al. [186] mit Mikrowellenstrahlung möglich.

Die Extraktion der sehr polaren Substanz EtG wird bei einem Großteil der Methoden mit Wasser durchgeführt. Jurado et al. [179] erhielten bei einer Extraktion mit Wasser einen deutlich saubereren Extrakt und ein geringeres Hintergrundrauschen als bei einer Extraktion mit reinem Methanol oder Methanol-Gemischen.

Studien – EtG in Haaren

EtG wird aufgrund der sauren Eigenschaften deutlich schlechter in die Haarmatrix eingelagert als neutrale oder basische Moleküle. In den Haaren sind daher nur sehr geringe Konzentrationen zu finden. Hohe LODs führten dazu, dass EtG in frühen Studien nicht in allen Haaren von Vieltrinkern und Alkoholikern nachgewiesen werden konnte [177, 178, 181]. Ein Ausschluss eines Alkoholkonsums aufgrund eines negativen EtG Befundes sowie ein Nachweis von moderatem Konsum war mit diesen Methoden nicht möglich. Durch niedrigere LODs wurde in einer folgenden Studie nur noch einer von 22 Patienten zu Beginn eines Alkoholentzugs falsch negativ getestet [191].

In der Folgezeit beschäftigten sich viele weitere Studien mit der Frage, ob ein Zusammenhang zwischen der konsumierten Alkoholmenge und der gemessenen EtG-Konzentration besteht, sowie mit der Suche nach geeigneten Grenzwerten. Tabelle 4.6 zeigt eine Übersicht der gefundenen Konzentrationen für die vier Gruppen: Abstinente, moderate Trinker, starke Trinker sowie Verstorbene mit einer prämortalen Alkoholproblematik und verwendete LODs. In einigen Studien konnte keine derartige Korrelation gefunden werden [188, 192]. Paul et al. [188] gaben große individuelle Unterschiede im Alkohol-Metabolismus als Grund für die fehlende Korrelation an. Andere Studien konnten hingegen eine gute Korrelation zwischen den Angaben zum Konsum und den EtG-Konzentrationen in Haaren nachweisen [30, 191, 194, 195, 198]. Politi et al. [191] fanden 2006 eine gute Korrelation (Polynom zweiten Grades) zwischen der EtG-Konzentration und der angegebenen Trinkmenge, normiert auf das Körpergewicht. Mit einem Grenzwert von 4 pg/mg konnte gut zwischen einem täglichen Alkoholkonsum kleiner und größer 30 g unterschieden werden. Ein kritischer Alkoholkonsum von 20 g/Tag für Frauen und 40 g/Tag für Männer konnte mit einem Grenzwert von 5 pg/mg bis auf einen Ausreißer richtig bewertet werden.

Nach einem Ausschluss von drei unklaren Fällen (einmal Haare gebleicht, zweimal widersprüchliche Angaben) konnten Appenzeller et al. [195] 2007 eine gute Korrelation ($r = 0,8353$) zwischen den EtG-Konzentrationen und der getrunkenen Alkoholmenge finden. Steigende und fallende Trinkmengen wurden durch die gemessenen EtG-Konzentrationen widergespiegelt. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurden folgende Grenzwerte berechnet: 23 pg/mg für exzessive Trinker und 4–15 pg/mg für moderate Trinker. Als Gründe für den Nachweis einer Korrelation, im Gegensatz zu früheren Studien, wurden der Ausschluss von unklaren Fällen sowie die Analyse von kürzeren Haarsegmenten (0,5–3 cm statt 3–12 cm in früheren Studien) angegeben.

Morini et al. [192] ermittelten 2009 aus Daten von 98 Freiwilligen mit unterschiedlichen Trinkgewohnheiten mittels einer ROC-Kurve einen Grenzwert von 27 pg/mg (Sensitivität:

Tabelle 4.6: In vorherigen Studien gefundene EtG-Konzentrationen in den Haaren von abstinenten Personen, moderaten sowie starken Trinkern und Verstorbenen mit einer prämortalen Alkoholproblematik sowie verwendete LODs. In [193], [194] und [101] wurden keine Angaben zum Alkoholkonsum der getesteten Personen dargelegt.

Jahr	Anzahl der Teilnehmer	LOD [pg/mg]	Abstinent [pg/mg]	Moderate Trinker [pg/mg]	Starke Trinker [pg/mg]	Verstorbene [pg/mg]	Lit.
2000	5/6/4/16	-	n.n.	n.n.	119 - 388	<LOD - 4025	[177]
2000	3/7/4/-	2200	<LOD	4 >LOD	2 >LOD	-	[178]
2002	5/5/60/27	51	<LOD	<LOD - 55	<LOD - 984	<LOD - 13157	[181]
2004	14	25	-	-	50 - 750	-	[179]
2004	3/4/10/11	2	<LOD	<LOD	30 - 450	72-3380	[29]
2006	n.a.	2	-	<LOD - 35,4	<LOD - 434	<LOD - 4180	[180]
2006	7/21/22/-	2	<LOD	<LOD - 35,4	<LOD - 434,7	-	[191]
2007	15	-	-	-	8 - 261	-	[195]
2009	7	-	-	-	-	61-819	[184]
2008	70	0,9	-	-	-	<LOD - 10400	[114]
2009	15	100	-	440 - 4590	-	-	[186]
2009	86	-	-	-	2 - 890,5	-	[193]
2009	32	0,7	-	-	<LOD - 1446	-	[194]
2010	13	-	-	-	<20 - 6975	-	[101]
2010	5/4/21/-	2	<LOD	7,6 - 15,7	37,5 - 149	-	[30]
2011	4/14/8/-	-	0	0 - 70	50 - 110	-	[188]
2011	65/51/59/-	3	<LOD	<LOD - 48	<LOD - 637	-	[196]
2012	43/44/38/-	-	0 - 10	0 - 32	1 - 1190	-	[197]

n. a.: nicht angegeben

92%, Spezifität 96%) für die proximalen 3 cm Kopfhair zur Unterscheidung von einem Alkoholkonsum < 60 oder ≥ 60 g/Tag.

Kharbouche et al. [198] konnten 2010 bei Versuchen mit Ratten eine signifikante Korrelation zwischen der BAK und der EtG-Konzentration nachweisen und sprechen dem Blut einen entscheidenden Einfluss bei der Einlagerung in die Haare zu.

Pirro et al. [196] verglichen 2011 bei einer Studie mit 175 Patienten einer Entzugsklinik mit unterschiedlichen Trinkgewohnheiten die EtG-Konzentrationen in Haaren mit traditionellen Biomarkern und den Angaben der Teilnehmer. Ausschließlich die Bestimmung von EtG in Haaren ergab gute Ergebnisse für die Unterscheidung von starken Trinkern und abstinenten Personen bzw. moderaten Trinkern.

Kharbouche et al. [197] veröffentlichten 2012 die erste prospektive Studie zur Evaluation von Grenzwerten. Blut und Haare von 125 Freiwilligen, die auf Grundlage ihrer Angaben zum Trinkverhalten über zwölf Wochen in vier Gruppen (abstinent (0 g/Tag), risikoarme Trinker (≤ 20 g/Tag für Frauen; ≤ 30 g/Tag für Männer), Risikotrinker (> 20 g/Tag für Frauen; > 30 g/Tag für Männer) und starke Trinker (> 60 g/Tag)) eingeteilt worden waren, wurden auf traditionelle Biomarker und EtG untersucht. Bei 58% der risikoarmen Trinker lagen die EtG-Konzentrationen unterhalb der Bestimmungsgrenze (engl. Limit of Quantification, LOQ) von 4 pg/mg. Eine Unterscheidung von Abstinenten und risikoarmen Trinkern war nicht möglich, jedoch ist eine Abstinenz bei einem Nachweis von EtG sehr unwahrscheinlich. Konzentrationen > 9 pg/mg deuten auf einen Risikotrinker hin (Sensitivität: 82%, Spezifität: 93%). Für eine Unterscheidung

von Risikotrinkern und starken Trinkern wurden mittels einer ROC-Analyse 27 pg/mg als optimaler Kompromiss zwischen Sensitivität (95%) und Spezifität (97%) ermittelt.

Mögliche externe Beeinflussungen der EtG-Konzentrationen in Haaren

Bei Drogen, die in der Haarmatrix an Melanin gebunden sind, hängt die Konzentration in den Haaren vom Melaningehalt und damit von der Haarfarbe ab [199]. Bei einer getrennten Analyse von pigmentierten und nicht-pigmentierten Haaren von 27 Verstorbenen auf EtG konnte jedoch keine Abhängigkeit von der Pigmentierung der Haare gefunden werden [200]. Übereinstimmende Ergebnisse wurden nach einer kontrollierten Alkoholgabe an 18 mehrfarbige Ratten gefunden [198].

EtG wird nach aktuellen Kenntnissen über Schweiß in die Haare einige Millimeter über der Kopfhaut eingelagert [29,187]. Der Nachweis von EtG-Konzentrationen zwischen 1,7 und 103 ng/mL in Schweiß nach der Aufnahme von 38–155 g Alkohol durch Schummer et al. [82] bekräftigt diese These. Aufbauend auf der von Halter et al. [153] gefundenen guten Korrelation zwischen den Flächen unter den Kurven (engl. Area under the curve, AUC) von Alkohol und EtG in Blut kommen Pragst et al. [187] zu dem Schluss, dass auch zwischen der AUC von EtG in Blut und der Konzentration in Haaren eine Proportionalität besteht, die jedoch durch eine Reihe von Faktoren gestört werden kann. Starke Variationen in der Schweißproduktion, abhängig von individuellen Unterschieden, der Umgebungstemperatur sowie körperlichen Aktivitäten, können jedoch dazu führen, dass auch das gesamte Haar mit Schweiß benetzt wird.

Aufgrund der nur sehr schwachen Bindung an die Keratin-Struktur des Haares ist zu vermuten, dass EtG selbst bei normaler Haarpflege ausgewaschen wird [29,181]. Tsanaclis et al. [201] fanden in 102 Haarproben signifikant niedrigere EtG-Konzentrationen in distalen (2–3 cm) als in proximalen Segmenten (0–1 cm). Gegenteilige Ergebnisse wurden von Agius et al. [202] und Appenzeller et al. [195] gefunden, die eine Stabilität im Haar von mehreren Monaten bis hin zu einem Jahr feststellten.

Einen deutlich höheren Anteil an positiven Fällen ergab jedoch die Analyse der proximalen 2 statt 3 cm [31,202]. Als Grund wurde unter anderem die Einlagerung über den Schweiß in diesen Bereich der Haare angegeben.

Bleichen oder Färben der Haare führt zu einem starken Verlust von EtG. In verschiedenen Studien wurden Verluste von 60–80% [29,31] sowie eine komplette Entfernung [30] aus dem Haar beobachtet. Morini et al. [30] fanden bei einem Nachweis mittels LC-MS/MS eine deutliche höhere Ionensuppression bei gebleichten Haaren. Nur durch eine zusätzliche Aufreinigung mittels SPE konnte eine ausreichende Sensitivität erreicht werden. Die Ergebnisse von in vitro Experimenten deuten eher auf ein Auswaschen von EtG aus den Haaren als auf eine Hydrolyse durch die in der Bleiche enthaltenen stark basischen Substanzen.

Es besteht der Verdacht, dass EtG auch nach dem regelmäßigen Gebrauch von alkoholhaltigen Pflegeprodukten in den Haaren zu finden ist. Yegles et al. [23] ermittelten um 4–10 pg/mg erhöhte EtG-Konzentrationen in den Haaren der Kopfhälfte, die mit alkoholhaltigen Haarwassern behandelt wurde. Sporkert et al. [24] konnten in einem Haarwasser nicht nur Alkohol, sondern auch EtG nachweisen. Sowohl eine kontrollierte

Anwendung als auch die Inkubation einer Haarsträhne mit dem Haarwasser führte zu nachweisbaren EtG-Konzentrationen (72 bzw. 140 pg/mg). Ihrer Meinung nach sollte eine äußere Kontamination in Betracht gezogen werden und im Zweifelsfall das betreffende Haarpflegeprodukt auf EtG getestet werden. Ferreira et al. [25] konnten hingegen weder in neun verschiedenen Haarwassern (Alkoholgehalt 3,5–44%) EtG nachweisen noch erhöhte EtG-Konzentrationen in den damit behandelten Haaren ($n = 7$) feststellen.

Grenzwerte für EtG in Haaren

Verschiedene Grenzwerte zwischen 4 und 27 pg/mg wurden in den oben beschriebenen Studien für den Nachweis eines chronischen Alkoholkonsums ermittelt. 2009 veröffentlichte die SoHT erstmals Empfehlungen für den Einsatz von EtG in Haaren als Biomarker für den Alkoholkonsum [10]. EtG-Konzentration ≥ 30 pg/mg, gemessen in Kopfharen, sprechen danach für einen starken, chronischen Alkoholkonsum von mehr als 60 g Alkohol/Tag. Aufgrund der Möglichkeit, dass EtG aus den Haaren heraus gewaschen werden kann, sollte nur das proximale Segment (0–3 cm) untersucht werden. In einem daraufhin veröffentlichten Brief kritisierte eine Gruppe von Wissenschaftlern die Empfehlung eines Grenzwertes als verfrüht und weist auf unzureichende bzw. widersprüchliche Ergebnisse bisheriger Studien hin [203]. Der Vorstand der SoHT verteidigte daraufhin seine Empfehlung in einem Antwortbrief mit einem Hinweis auf die Ergebnisse aktueller Studien sowie die stetige Aktualisierung der Empfehlung alle zwei Jahre [204]. 2011 wurde eine neue Empfehlung veröffentlicht, die weiterhin einen Grenzwert von 30 pg/mg beinhaltet, jedoch auch längere Segmente bis zu 6 cm einschließt [11]. Bei einer Analyse von Haarsegmenten, die kürzer als 3 cm sind, wird empfohlen, die Ergebnisse mit Vorsicht zu beurteilen.

Weitere Studien beschäftigten sich daraufhin mit der Überprüfung des empfohlenen Grenzwertes von 30 pg/mg anhand von retrospektiven Untersuchungen. Pirro et al. [196] fanden 2011 bei 175 Patienten einer Entzugsklinik mit unterschiedlichen Trinkgewohnheiten zufriedenstellende Resultate für Sensitivität (91,5%) und Spezifität (97,4%) (AUC: 0,982).

Eine Studie von Süße et al. [31], die sich 2011 mit der retrospektiven Auswertung der Ergebnisse von 1872 Haarproben aus Sorgerechtsfällen beschäftigte, ergab eine übereinstimmende Spezifität (97%), jedoch eine deutlich niedrigere Sensitivität (75%) (AUC: 0,954). Dies verdeutlicht, dass die aktuellen Grenzwerte so ausgelegt sind, dass sie vorrangig falsch positive Ergebnisse ausschließen.

Ein ähnliches Ergebnis mit noch schlechteren Werten für die Sensitivität erhielten Lees et al. [205] 2012 bei einer Studie mit 100 Freiwilligen (Spezifität: 95%, Sensitivität: 23–25%).

Ein Beweis einer strikten Abstinenz scheint trotz einer deutlichen Verbesserung der analytischen Methoden nicht möglich zu sein (u. a. [114]). Während ein positiver Befund ein deutlicher Hinweis für einen Alkoholkonsum ist, kann ein negativer Test einen Alkoholkonsum nicht ausschließen [197, 205]. Insbesondere eine 2012 veröffentlichte, kontrollierte Studie von Kronstrand et al. [1] bekräftigte diese These. Selbst ein regelmäßiger Konsum von 16 bzw. 32 g Alkohol/Tag als Rotwein über einen Zeitraum von drei

Monaten führte nicht unbedingt zu einer detektierbaren EtG-Konzentration in Haaren. Quantifizierbare EtG-Konzentrationen konnten bei der niedrigen Dosis nur in einem Fall (3 pg/mg) bzw. nach der höheren Dosis in vier Fällen (5–11 pg/mg) nachgewiesen werden.

Pragst und Yegles [206] verglichen 2008 Ergebnisse vorheriger Studien und kamen zu dem Schluss, dass EtG-Konzentrationen > 7 pg/mg nicht mit einer Abstinenz vereinbar sind, Werte < 7 pg/mg werden jedoch auch bei moderaten Trinkern gefunden. 2008 wurde eine Grenzwert von 7 pg/mg im proximalen Segment (0–3 cm) des Kopfhaares als Ausschlusskriterium für eine Alkoholabstinenz in die zweite Auflage der *Beurteilungskriterien – zur – Urteilsbildung in der Medizinisch-Psychologischen Fahreignungsdiagnostik* aufgenommen [4]. 2012 wurde eine Empfehlung der SoHT speziell für Abstinenzuntersuchungen veröffentlicht [3]. EtG-Konzentrationen > 7 pg/mg im proximalen Haarsegment (0–3 oder 0–6 cm) deuten danach stark auf einen wiederholten Alkoholkonsum hin.

Laut Agius et al. [207] sind auf Grundlage der aktuellen Richtlinien bei Fahreignungsbegutachtungen Haaranalysen einer Untersuchung von Urin vorzuziehen. Bei einer retrospektiven Auswertung der Ergebnisse von 4248 Urinproben und 386 Haarproben konnten durch eine Haaranalyse zehnmal mehr positive Fälle (20% statt 2%) gefunden werden. Zudem besteht nicht die Gefahr einer Beeinflussung durch Bakterien und die Probenahme ist weniger invasiv und nicht termingebunden. Jedoch sollte aufgrund der verschiedenen Wachstumsphasen der Haare zwischen Beginn der Abstinenz und Haarentnahme eine Wartezeit von mindestens mehreren Wochen liegen. Für kurzfristige Analysen ist der Nachweis von EtG/EtS in Urin oder PEth in Blut besser geeignet [197].

Während Tsanaclis et al. [201] und Sporkert et al. [24] empfehlen, die Ergebnisse der EtG Bestimmung als hinweisgebend zu betrachten und durch weitere Ergebnisse abzusichern, kommen Kharbouche et al. [197] zu dem Schluss, dass eine parallele Bestimmung weiterer Biomarker keine Verbesserung der diagnostischen Aussage bringt.

EtG in Körperhaaren

Bei einem Fehlen von Kopfharen stellt die Analyse von Körperhaaren eine mögliche Alternative da. Ein unterschiedliches Wachstumsverhalten sowie Konzentrationsunterschiede erschweren jedoch die Interpretation und erfordern die Verwendung angepasster Grenzwerte [189, 194]. Brusthaare stellen dabei die beste Alternative bei fehlenden Kopfharen dar [189]. Während in Achselhaaren die geringsten EtG-Konzentrationen gemessen wurden, konnten besonders hohe Konzentrationen in Schamhaaren nachgewiesen werden [189]. Sogar bei Personen, deren Kopfhare und andere Körperhaare negativ getestet wurden, wurden in Schamhaaren EtG-Konzentrationen bis zu 1370 pg/mg nachgewiesen. [183, 194]. Eine Einlagerung von EtG aus dem Urin ist wahrscheinlich.

4.4 Fettsäureethylester (FAEE)

4.4.1 Allgemeines zu FAEE

Goodman et al. [208] gelang 1963 FAEE im Körperfett von Ratten nachzuweisen, denen zuvor Alkohol zugeführt wurde. 1981 konnten Lange et al. [209] FAEE als Produkte des Alkoholmetabolismus im Herzmuskel von Kaninchen nachweisen. Es konnte gezeigt

werden, dass FAEE Auslöser für alkoholinduzierte Schäden am Herzen und anderen Organen sind. Kinnunen et al. [210] veröffentlichten 1984 die erste Methode zum Nachweis von FAEE in verschiedenen Geweben. Weitere Untersuchungen ergaben, dass FAEE in der Leber, der Bauchspeicheldrüse, im Herzmuskel und im Fettgewebe sowie in Teilen des Gehirns und in Erythrozyten durch cytosolische und mikrosomale FAEE-Synthasen und anderen unspezifischen Enzymen aus Alkohol und freien Fettsäuren, Lipoproteinen und Phospholipiden gebildet werden [211–214]. Auch in der Lunge von Ratten konnte die Bildung von FAEE insbesondere Ethyloleat, Ethylstearat, und Ethylpalmitat nach einer Gabe von Alkohol nachgewiesen werden [71]. Abbildung 4.4 zeigt die verschiedenen Bildungswege für FAEE nach [2]. Die höchsten FAEE-Hydrolyseaktivitäten wurden in Leber und Bauchspeicheldrüse gefunden [212]. Eine Bestimmung von FAEE in Fettgewebe ist nach Laposata et al. [215] für den Nachweis eines prämortalen, starken Alkoholkonsums geeignet, auch wenn der Alkohol selbst bereits vollständig aus dem Körper eliminiert wurde [215]. 1991 konnten DePergola et al. [216] zeigen, dass sich die FAEE-Synthaseaktivität im Fettgewebe von Ratten nach einer Alkoholgabe über 10 bzw. 17 Wochen verdoppelt und erst vier Wochen nach Beendigung der Gabe wieder auf dem Niveau der Kontrollgruppe liegt. Nach einer einmaligen Alkoholgabe wurde im Fettgewebe eine Halbwertszeit von etwa 24 h ermittelt.

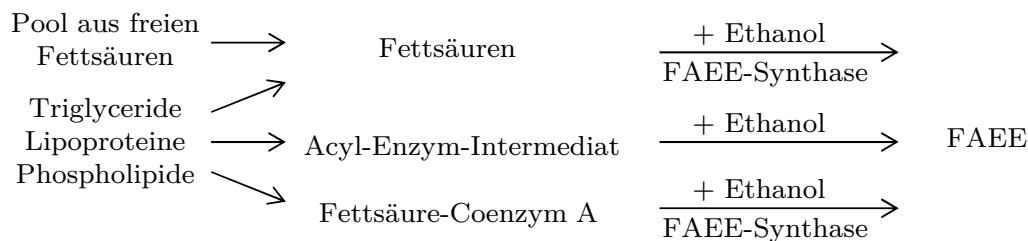


Abbildung 4.4: Übersicht über die verschiedenen Bildungswege von FAEE nach [2].

Doyle et al. [217] konnten 1994 FAEE im Serum von alkoholisierten Patienten einer Notfallambulanz und im Rahmen eines kontrollierten Trinkversuchs nachweisen. Gorski et al. [218] wiesen 1996 nach, dass auch in Blut und insbesondere in Erythrozyten eine FAEE-Synthase-Aktivität besteht, die bei Alkoholikern nur halb so hoch ist wie bei der Kontrollgruppe. Nicht geklärt werden konnte, ob eine verringerte FAEE-Synthase-Aktivität Folge eines jahrelangen, chronischen Alkoholkonsums ist oder, ob eine genetische Prädisposition vorliegt, die für eine geringere Aktivität verantwortlich ist und bei Alkoholikern häufiger auftritt. FAEE können im Blut etwa 24 h länger nachgewiesen werden als der Alkohol selbst [219]. Die primäre und terminale Halbwertszeit der FAEE im Blut betragen 3 bzw. 10 h [220]. Borucki et al. [221] erklärten erhöhte FAEE im Blut von Alkoholikern von bis zu 99 h nach dem letzten Konsum von Alkohol mit Veränderungen der Kinetik sowie einer temporären Einlagerung in verschiedene Gewebe. Doyle et al. [217] konnten zeigen, dass eine Korrelation zwischen BAK und FAEE-Konzentrationen besteht. Bernhardt et al. [222] entwickelten 1996 eine HPLC-Methode zum Nachweis von FAEE im Fettgewebe, auf die viele der späteren Methoden zum Nachweis in Blut und Geweben aufbauen. 2006 veröffentlichten Kulig et al. [223]

eine verbesserte Methode zum Nachweis von FAEE in Serum mittels GC-MS ohne die Verwendung einer Festphasenmikroextraktion (engl. Solid phase microextraction, SPME) und mit einer kürzeren Laufzeit.

1994 gelang Mac et al. [224] der Nachweis von FAEE in Mekonium. Klein et al. [225] zeigten 1999, dass FAEE als Biomarker für einen mütterlichen Alkoholkonsum geeignet sind. Chan et al. [226] konnten 2004 zeigen, dass FAEE nicht plazentagängig sind und daher nur im Organismus des Neugeborenen aus zugeführtem Alkohol gebildet werden können. Eine Reihe von verbesserten Nachweismethoden, Studien zur Verifizierung von Grenzwerten und Review-Artikel wurden veröffentlicht und bestätigten die Eignung einer FAEE-Bestimmung in Mekonium zum Nachweis einer pränatalen Alkoholaufnahme [226–229]. Burd et al. [230] wiesen 2008 in einem kritischen Review darauf hin, dass eine Interpretation der Ergebnisse schwierig ist, da noch unklar ist, zu welchem Zeitpunkt das Mekonium genau gebildet wurde, ob eine Abhängigkeit der Konzentrationen vom Zeitpunkt und Ort der Probenahme besteht und viele verschiedene Nachweisverfahren mit unterschiedlichen Grenzwerten zum Einsatz kamen. Ein weiteres Problem ist, dass Mekonium nur an den ersten drei Tagen nach der Geburt zur Verfügung steht. Eine Bestimmung von FAEE in Haaren des Neugeborenen kann das Fenster für den Nachweis eines Alkoholkonsums während der Schwangerschaft auf bis zu drei Monate verlängern. In einem Experiment mit schwangeren Meerschweinchen, denen kontrolliert Alkohol gegeben wurde, konnte sowohl in den Haaren der Muttertiere als auch in den Haaren der Jungtiere 10- bzw. 15-fach höhere FAEE-Konzentrationen nachgewiesen werden als in der Kontrollgruppe [231]. Ein Nachweis eines moderaten Konsums während der Schwangerschaft war nicht möglich, da auch in den Haaren von Neugeborenen, deren Mütter abstinent lebten, FAEE nachgewiesen werden konnten. Signifikant erhöhte Konzentrationen wurden jedoch nur bei einem stärkeren und problematischen Alkoholkonsum gefunden.

4.4.2 FAEE in Haaren

Methoden zum Nachweis von FAEE in Haaren

Von Pragst et al. [175] wurde im Jahr 2000 erstmals die Möglichkeit erwähnt, den Nachweis von FAEE in Haaren als Marker für Alkoholkonsum einzusetzen. Ein Jahr später wurde von ihnen die erste Methode zur Quantifizierung von FAEE in Haaren veröffentlicht [2]. Für die Extraktion aus den Haaren wurde eine Mischung aus *n*-Hexan und Dimethylsulfoxid (DMSO) gewählt, um sowohl ein Aufquellen der Haarmatrix als auch ein Lösen der FAEE zu erreichen. Ein ausreichend sensitiver Nachweis der FAEE im Haarextrakt gelang mit einer optimierten Dampfraum-Festphasenmikroextraktion (engl. Headspace-Solid phase microextraction, HS-SPME), gekoppelt mit einer GC-MS-Analyse unter Verwendung von deuterierten FAEE als IS. Für die HS-SPME wurde eine Polydimethylsiloxan (PDMS)/Divinylbenzol (DVB) beschichtete Faser sowie ein neutraler Phosphatpuffer (0,1 mol/L, pH 7,6) eingesetzt, der eine ausreichende Stabilität der FAEE gewährleistet und ein Verdampfen der freien Fettsäuren, die in der ionisierten Form vorliegen ($pK_s \approx 5$), verhindert. Eine Zugabe von Natriumchlorid erhöht den Dampfdruck der FAEE und damit die Extraktionsausbeute. Ein weiterer Versuch zur Verbesserung der Extraktionsausbeute durch ein Mahlen der Haare sowie durch die

Verwendung eines Ultraschallbades führte zu einem stärkeren Grundrauschen in den Chromatogrammen und zu einer schlechteren Sensitivität. Auwärter konnte im Rahmen seiner Dissertation [232] eine Vielzahl von FAEE in Haaren nachweisen, jedoch bestand nur bei den vier FAEE: Ethylmyristat (C14), Ethylpalmitat (C16), Ethyloleat (Δ C18) und Ethylstearat (C18) eine Korrelation mit dem Alkoholkonsum. Zur Interpretation der Ergebnisse wird die Summenkonzentration aus den vier FAEE verwendet, die als FAEE-Konzentration oder c_{FAEE} bezeichnet wird. Abbildung 4.5 zeigt die chemischen Strukturen dieser vier FAEE.

In der folgenden Zeit wurde die Methode von Pragst et al. [2] von anderen Arbeitsgruppen weiterentwickelt und verbessert [206, 228, 233–235]. Giovanni et al. [233] konnten Ethyloleat in keiner Haarprobe nachweisen und Ethylstearat nicht ausreichend reproduzierbar quantifizieren, so dass beide Substanzen aus der Methode gestrichen wurden. Zimmermann et al. [234] konnten die Extraktionszeit von 15 h auf 15 min verringern, indem sie die Haare mahlten und ein Ultraschallbad zur Extraktion einsetzten. Durch den Einsatz eines selektiveren Tandem-Massenspektrometers mit chemischer Ionisation konnten trotz einer auf 9 min verkürzten Analysezeit ausreichend gute Spezifitäten und Sensitivitäten mit LODs zwischen 0,002 und 0,030 ng/mg erreicht werden. Die 2011 von Politi et al. [235] entwickelte Methode ist die einzige, die den Extrakt direkt in den GC injiziert. Trotzdem erreichten sie eine gute Abtrennung der vier untersuchten FAEE von freien Fettsäuren, weiteren Estern und anderen endogenen und exogenen Substanzen sowie eine hohe Sensitivität (LOQ: 0,01 ng/mg).

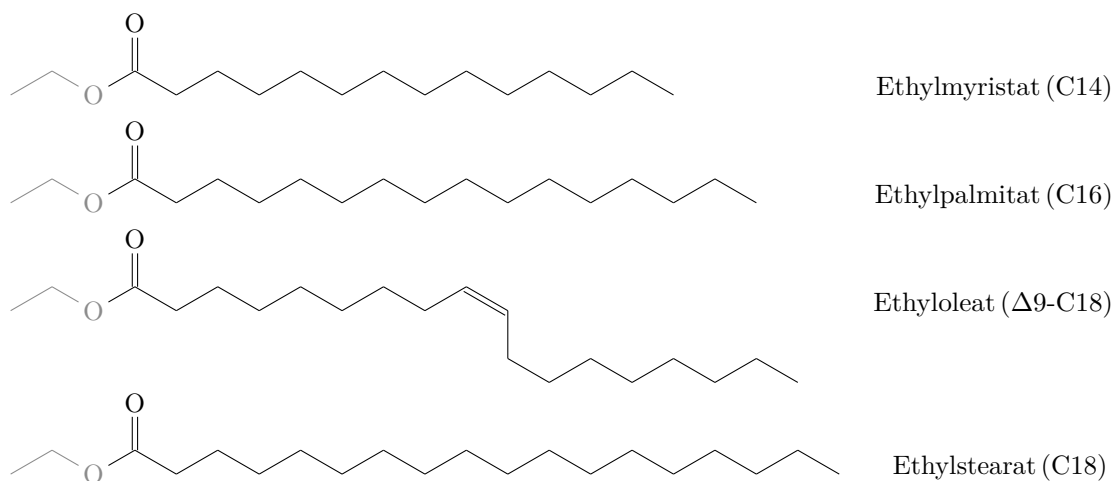


Abbildung 4.5: Chemische Strukturen der vier FAEE: Ethylmyristat (C14), Ethylpalmitat (C16), Ethyloleat (Δ C18) und Ethylstearat (C18). Der eingebaute Alkohol ist jeweils grau markiert.

Studien

Eine Reihe von Studien zur Eignung der FAEE als Alkoholmarker wurden bisher durchgeführt. Auwärter et al. [236] fanden bei einer Untersuchung von 44 Haarproben, (19 Alkoholiker im Entzug, zehn Todesfälle mit prämortalem, starken Alkoholkonsum, zehn moderate Trinker und fünf strikt abstinente Personen) deutlich höhere FAEE-

Konzentrationen bei Alkoholikern (0,92–11,6 ng/mg, Mittelwert (MW): 4,0 ng/mg) als in den Haaren von moderaten Trinkern (0,20–0,85 ng/mg, MW: 0,41 ng/mg) und abstinenten Personen (0,06–0,37 ng/mg, MW: 0,16 ng/mg). Ein Grenzwert von 1,0 ng/mg scheint geeignet zu sein, um einen starken Alkoholkonsum nachzuweisen. Die noch größeren FAEE-Konzentrationen in den Haaren der Verstorbenen (2,5–13,5 ng/mg, MW: 6,8 ng/mg) sind wahrscheinlich auf eine mangelnde Pflege der Haare und eine damit verbundene ausgeprägtere Ablagerungen von Fetten zurückzuführen.

Ein Zusammenhang zwischen gemessenen FAEE-Konzentrationen und Trinkangaben konnte nicht gefunden werden [53, 236]. Die fehlenden Übereinstimmungen sowie ansteigende Konzentrationen von proximalen zu distalen Segmenten können am besten durch eine Einlagerung der FAEE über das Sebum ins fertig gebildete Haar erklärt werden [236]. Sebum, das das Haar bereits in der Wurzel umgibt, besteht aus Triglyceriden, Wachsester, Cholesterinester und Squalen. Die Bildung von Sebum ist hormonell gesteuert und daher abhängig von Alter, Geschlecht und weiteren individuellen Unterschieden. Es kann davon ausgegangen werden, dass FAEE auch direkt in den Sebumdrüsen gebildet werden und ein direkter Zusammenhang zwischen der Alkoholkonzentration im Blut, aus dem der Alkohol in die Sebumdrüsen diffundiert, und der Bildung von FAEE besteht [187]. Eine sequentielle Bestimmung der FAEE-Konzentration für eine zeitlich aufgelöste Überwachung des Trinkverhaltens ist daher nicht möglich. Eine Einlagerung der lipophilen FAEE direkt über das Blut in die Haarwurzel kann jedoch nicht ausgeschlossen werden [236].

Eine weitere Studie von Pragst et al. [237] konnte bekräftigen, dass die Einlagerung der FAEE über das Sebum abläuft, indem sie auch in den Hautoberflächenlipiden von Alkoholikern eine deutlich höhere durchschnittliche FAEE-Konzentration nachweisen konnten ($c_{\text{FAEE}}/m_{\text{Squalen}} = 13,1 \text{ ng/mg}$) als bei Abstinenz und moderatem Konsum ($m_{\text{FAEE}}/m_{\text{Squalen}} = 0,34 \text{ ng/mg}$ bzw. $0,37 \text{ ng/mg}$). Die ermittelten FAEE-Konzentrationen wurden mit den Squalenkonzentrationen normiert, um die natürlichen Schwankungen der Lipidkonzentrationen auszugleichen. Squalen wurde als Vergleichssubstanz gewählt, da es eine hohe Stabilität aufwies und bei vergleichbaren Bedingungen akzeptable Konzentrationschwankungen im Sebum auftraten.

Obwohl auch hier kein direkter Zusammenhang zwischen den angegebenen Alkoholmengen und den bestimmten FAEE-Konzentrationen besteht, war eine Detektion eines starken Alkoholkonsums über einen Hautabstrich mit einem Nachweisenfenster von einer Woche möglich [237, 238]. Selbst ein einmaliger Alkoholkonsum ist nachweisbar [236]. Im Rahmen einer kontrollierten Alkoholgabe von einmalig 92 g bzw. 112 g konnte gezeigt werden, dass die maximalen FAEE-Konzentrationen in Hautoberflächenlipiden mit einer Verzögerung von 7–12 Tagen auftreten. Eine Zeitdifferenz von acht Tagen zwischen Sebumproduktion und Erreichen der Hautoberfläche von acht Tagen erklärt dies [237]. Aufgrund der deutlich höheren FAEE-Konzentrationen im Sebum ist eine gründliche Dekontamination vor einer Analyse der Haare unerlässlich [238].

Eine Studie von Auwärter et al. [239] beschäftigte sich mit der Frage, ob auch der Nachweis von FAEE in Haaren durch eine Normierung mit der Squalenkonzentration präziser wird. Es wurden FAEE-Konzentrationen von 0,02–0,85 ng/mg (1,21 ng/mg nach dem Gebrauch von alkoholhaltigem Haarwasser) bei abstinenten Personen, 0,08–1,20 ng/mg (1,38 und 1,96 ng/mg nach dem Gebrauch von alkoholhaltigem Haarwasser)

bei moderaten Trinkern und 1,04–9,09 ng/mg bei Alkoholikern gefunden. Die gemessenen Squalenkonzentrationen lagen zwischen 0,02 und 1,97 µg/mg (MW: 0,66 µg/mg). Eine Korrelation zwischen FAEE- und Squalenkonzentrationen in unterschiedlichen Haarsegmenten konnte aufgrund eines schwankenden Alkoholkonsums, abweichender Inkorporationsmechanismen und einer unterschiedlichen Stabilität nicht gefunden werden. Trotzdem kann eine Bestimmung der Squalenkonzentration in grenzwertigen Fällen Klarheit bringen. Aufgrund deutlich höherer Squalenkonzentrationen in distalen Segmenten wurde eine Normierung nur für Segmentlängen von bis zu 6 cm empfohlen.

Grenzwerte für FAEE in Haaren

Eine Studie von Wurst et al. [53] bestimmte aus Ergebnissen von 18 Patienten im Entzug ($c_{\text{FAEE}} = 0,39\text{--}3,19\text{ ng/mg}$, MW: 1,09 ng/mg) und Daten aus einer früheren Studie (zehn moderate Trinker und zehn abstinenten Personen) einen Grenzwert von 0,29 ng/mg zur Unterscheidung von Abstinente/moderaten Trinkern und starken Trinkern/Alkoholikern. Mittels einer ROC-Analyse wurde eine Sensitivität von 100%, eine Spezifität von 94,4% und eine AUC von 0,983 gefunden. Es konnte zudem eine signifikante Korrelation zwischen der FAEE-Konzentration und der Ethylpalmitatkonzentration sowie der PEth-Konzentration in Blut nachgewiesen werden.

In einer vergleichenden Studie von EtG- und FAEE-Konzentrationen, durchgeführt von Yegles et al. [29], wurden FAEE-Konzentrationen von 0,05–0,37 ng/mg in den Haaren von drei strikt abstinenten Personen, 0,26–0,50 ng/mg bei moderatem Alkoholkonsum $\leq 20\text{ g Ethanol/Tag}$ ($n = 4$), 0,65–20,50 ng/mg bei zehn Alkoholikern im Entzug und 1,30–30,60 ng/mg bei elf Todesfällen mit prämortalem starkem Alkoholkonsum ermittelt.

Zimmermann et al. [234] fanden bei der Analyse von gemahlene Haaren kombiniert mit einer Extraktion im Ultraschallbad höhere FAEE-Konzentrationen, als in vorherigen Studien nachgewiesen wurden ($\sim 2\text{ ng/mg}$ für starke Trinker, $\sim 1\text{ ng/mg}$ für moderate Trinker und $< 0,4\text{ ng/mg}$ für abstinenten Personen). Analog zu den Ergebnissen von Pragst et al. [2] konnte keine Abhängigkeit der Ethyllauratkonzentration, welche zusätzlich zu den vier bereits erwähnten FAEE in die Methode aufgenommen wurde, vom Alkoholkonsum gefunden werden.

Zwei weitere Studien beschäftigen sich mit der retrospektiven Auswertung von FAEE-Konzentrationen in Haaren, die im Rahmen von Untersuchungen zum Schutz von abhängigen Minderjährigen untersucht worden sind. Kulaga et al. [240] fanden bei einer Analyse von 172 Haarproben erhöhte FAEE-Konzentrationen in Fällen, bei denen über die Selbstauskünfte oder durch die Angaben von Dritten ein Alkoholkonsum während der vorangegangenen sechs Monate angegeben wurde. Die Ergebnisse von zufällig ausgewählten Teilnehmern oder von Personen mit einer vergangenen Suchtproblematik waren hingegen unauffällig. Süße et al. [238] fanden in allen der untersuchten 644 Haarproben FAEE mit einer durchschnittlichen Konzentration von 1,77 ng/mg (0,11–31 ng/mg). Eine Korrelation zwischen traditionellen Biomarkern (CDT, GGT, ALT und AST), die im Blut nachgewiesen wurden und deutlich geringere Sensitivitäten und Spezifitäten zeigten, und den FAEE-Konzentrationen konnte, übereinstimmend mit den Ergebnissen einer früheren Studie [53], nicht gefunden werden.

Die gemessenen FAEE-Konzentrationen von 3 oder 6 cm langen Haarsegmenten unterschieden sich aufgrund der Einlagerung über die gesamte Haarlänge aus dem Sebum signifikant. Deshalb wurden von Süße et al. [238] unterschiedliche Grenzwerte für die verschieden langen Segmente gewählt (< 3 cm: 0,5 ng/mg, > 3 cm und Körperhaare: 1,0 ng/mg). Mit diesen Grenzwerten konnten signifikante Unterschiede in den FAEE-Konzentrationen von Abstinente/moderaten Trinkern (< 60 g Alkohol/Tag) und starken Trinkern (> 60 g Alkohol/Tag) gefunden werden. Gestaffelte Grenzwerte von 0,5 ng/mg für proximale Segmente ≤ 3 cm, 0,65 ng/mg für $> 3 - 4,5$ cm und 0,80 ng/mg für $> 4,5 - 6$ cm wurden auch von Pragst et al. [187] empfohlen.

Pragst und Yegles [206] berechneten mittels ROC-Analyse eine Sensitivität und Spezifität von 90% (AUC: 0,935) für einen Grenzwert von 0,5 ng/mg. Eine Erhöhung auf 1,0 ng/mg führte zu einer Spezifität von 100%, begleitet von einer deutlich verringerten Sensitivität.

In den 2009 von der SoHT veröffentlichten Empfehlungen für den Einsatz von FAEE in Haaren als Alkoholbiomarker wurde eine Summenkonzentration der vier FAEE von 0,5 ng/mg für das proximale 3 cm lange Kopfhaarsegment als Grenzwert zur Bestimmung eines chronischen Alkoholkonsums (> 60 g Alkohol/Tag) aufgenommen [10]. In die aktualisierte Version der Empfehlung von 2011 wurden, wie bereits von Süße et al. [238] angewandt und von Pragst et al. [187] empfohlen, verschiedene Grenzwerte für unterschiedlich lange Haarsegmente (0,5 ng/mg für 3 cm und 1,0 ng/mg für 6 cm) angegeben [11].

Eine Unterscheidung von abstinenten Personen und moderaten Trinkern scheint durch eine Bestimmung von FAEE in Haaren nicht möglich zu sein, da auch in den Haaren von abstinenten Personen FAEE nachweisbar sind und eine Überlappung der gemessenen Konzentrationen beobachtet wurde [233, 234, 236]. Individuelle Unterschiede in der Sebumproduktion oder in der Haarpflege (siehe S. 42), könnten hierfür verantwortlich sein [238]. Während Wurst et al. [53], Auwärter et al. [236] und Zimmermann et al. [234] bei abstinenten Personen FAEE-Konzentrationen bis zu 0,4 ng/mg fanden, konnten Auwärter et al. [239] und Giovanni et al. [233] FAEE-Konzentrationen $> 0,5$ ng/mg in Haaren von zwei moderaten Trinkern finden, die beide den Gebrauch von alkoholhaltigen Pflegeprodukten angaben. Pragst und Yegles [206] kamen zu dem Schluss, dass FAEE-Konzentration $< 0,2$ ng/mg in keinem Widerspruch zu einer Abstinenz stehen. In einer 2012 veröffentlichten Empfehlung der SoHT zum Gebrauch der Alkoholmarker EtG und FAEE für Abstinenzuntersuchungen wurden Summenkonzentrationen aus den vier FAEE von $> 0,2$ ng/mg für das 0–3 cm Segment und von $> 0,4$ ng/mg für das 0–6 cm Segment als starker Hinweis für einen wiederholten Alkoholkonsum angegeben [3]. Eine Bestimmung der FAEE-Konzentrationen kann, unter Berücksichtigung der individuellen Haarbehandlung, zur Absicherung eines primär durchgeführten EtG-Nachweises durchgeführt werden.

Äußere Einflüsse auf die FAEE-Konzentrationen in Haaren

Eine Abhängigkeit der FAEE-Konzentration vom Melaningehalt der Haare konnte im Rahmen eines Versuches mit mehrfarbigen Ratten nicht gefunden werden [241].

Häufige Haarwäschen, die eine Entfernung des Sebums verursachen, könnten eine verringerte Einlagerung der FAEE in die Haarmatrix zur Folge haben [53]. Um die Möglichkeit eines Auswaschens der FAEE zu testen, wuschen Hartwig et al. [28] eine positiv getestete Haarsträhne (8,6 ng/mg) 20-mal und analysierten nach jedem Zyklus einen Teil der Haare sowie die Waschlösung. Während die FAEE-Konzentration in der Waschlösung stark abnahm (51 ng/mg \rightarrow 2 ng/mg), blieb die Konzentration in den Haaren stabil. Es konnten jedoch starke Schwankungen beobachtet werden, die mit der Inhomogenität der Haarmatrix erklärt wurden. Bei der Auswertung der Ergebnisse von 75 authentischen Proben konnte ebenfalls keine Abhängigkeit von der Haarwaschfrequenz gefunden werden.

Die gleiche Arbeitsgruppe führte *in vitro* Versuche durch, bei denen der Einfluss verschiedener Haarbehandlungen (Färben, Tönen, Bleichen und Dauerwellen) auf die FAEE-Konzentration untersucht wurde [28]. Während in den Waschlösungen eine starke Abnahme der FAEE-Konzentration von 8–50% beim Tönen bis hin zu 97% beim Färben beobachtet wurde, wichen die Konzentrationen in den Haaren außer beim Färben um weniger als 20% ab. Während ein *in vitro* Färben zu einer deutliche Abnahme der FAEE-Konzentrationen in den Haaren (64%) führte, konnte bei authentischen Haarproben kein Zusammenhang zwischen einem Färben der Haare und der FAEE-Konzentration gefunden werden. Grund für diesen Unterschied könnte die stetige Einlagerung der FAEE aus dem Sebum über die gesamte Haarlänge sein, die nicht *in vitro* simuliert werden kann. Dass Ethylmyristat, der Ester mit der kürzesten Alkylkette und damit höchsten Wasserlöslichkeit, am stärksten abgebaut wird, deutet darauf hin, dass die Verluste besonders in der Waschlösung eher auf ein Auswaschen als auf eine Hydrolyse der FAEE zurückzuführen sind.

Da fast in allen Zellen eine FAEE-Synthase-Aktivität vorliegt, besteht der Verdacht, dass FAEE auch bei der Verwendung von alkoholhaltigen Pflegeprodukten in der Kopfhaut und auf oder in den Haaren, z. B. durch bakterielle Enzyme, gebildet werden [233]. Sowohl eine Behandlung einer Kopfhälfte mit alkoholhaltigem Haarwasser als auch eine Lagerung einer Haarsträhne über zwei Monate in einer alkoholhaltigen Umgebung führte zu einem Anstieg der FAEE-Konzentration auf Werte über 1 ng/mg. Giovanni et al. [26] fanden in Haaren (FAEE negativ), die für 15 Tage in einer alkoholhaltigen Atmosphäre gelagert wurden, ebenfalls einen konstanten Anstieg der FAEE-Konzentrationen mit maximalen Konzentrationen am letzten Tag (C14: 3,39 ng/mg, C16: 6,85 ng/mg, C18: 1,19 ng/mg). Da die äußere Lipidschicht der Haare vor der Analyse entfernt wurde, müssen die FAEE entweder direkt im Inneren der Haare nach einer Absorption des Alkohols entstanden oder auf der Oberfläche der Haare gebildet und dann eingelagert worden sein. Gareri et al. [27] berichten von neun positiv auf FAEE getesteten Haarproben ($> 0,5$ ng/mg), deren Spender einen chronischen Alkoholkonsum abstritten, jedoch mindestens ein alkoholhaltiges Pflegeprodukt mit einem Alkoholvolumenanteil von 10–95% verwendeten. Alkohol wurde bei folgenden Untersuchungen nur in Haarspray gefunden und nicht in Shampoos oder Spülungen. Ein Zusammenhang zwischen dem Alkoholgehalt des Haarpflegeproduktes und der FAEE-Konzentration konnte nicht beobachtet werden. Jedoch scheinen bereits die geringen Mengen Alkohol in Haarpflegeprodukten für eine Bildung von FAEE auszureichen. Im Vorfeld einer Haaranalyse auf FAEE sollte daher mindestens ein Monat auf alkoholhaltige Pflegeprodukte verzichtet werden.

In 49 verschiedenen Haarpflegeprodukten konnten zudem FAEE (0,16–29,6 ng/mg) mit unterschiedlichen Anteilen der verschiedenen FAEE nachgewiesen werden [28]. Die niedrigen Anteile von maximal 0,003% sprechen dafür, dass die FAEE während der Produktion oder Lagerung gebildet wurden und nicht absichtlich zugegeben worden sind. Falsch positive Ergebnisse wurden nur bei FAEE-Konzentrationen > 1 ng/mg oder bei einer langen Einwirkzeit beobachtet. In Haarwachs konnten zwar FAEE-Konzentrationen von 10,4 ng/mg nachgewiesen werden, jedoch sank nach der Anwendung die FAEE-Konzentrationen in den Haaren von 3,6 auf 1,6 ng/mg. Eine gleichzeitig höhere FAEE-Konzentration im Sebum (6,3 ng/mg) spricht für ein Herauslösen der FAEE aus der Haarmatrix durch den Haarwachs.

Während bei einer Bildung von FAEE durch alkoholhaltige Haarpflegeprodukte die gleiche Verteilung der vier FAEE auftrat wie nach dem Konsum von Alkohol, konnten nach der Anwendung von FAEE-haltigen Produkten ein niedrigerer Anteil an Ethyloleat und mehr Ethylstearat nachgewiesen werden [28]. Starke Abweichungen von den oben genannten Verhältnissen der vier FAEE sind daher ein Hinweis für eine äußere Kontamination der Haare [238].

FAEE sind auch in einer Reihe von Lebensmitteln enthalten. Pérez-Camino et al. [242] konnten in einigen Olivenölen FAEE und geringere Mengen an Fettsäuremethylester (FAME) und anderen Estern nachweisen, die vor der Extraktion durch Veränderungen in den Oliven und im Trester entstehen. Die größten Konzentrationen von Ethylpalmitat, Ethyloleat und Ethyllinoleat sowie Methyl-, Propyl- und Butylester der Ölsäure wurden in „Fusti“-Olivenölen gefunden, die nach einer längeren Lagerung des Oliventresters hergestellt wurden.

Während in Wein und klaren Schnäpsen wie Gin, Wodka und Bourbon Whiskey keine FAEE gefunden wurden, konnten in Scotch Whiskey und Wermut die Ester der Caprin- und Laurinsäure sowie Spuren von Ethylmyristat, Ethylpalmitat und Ethyloleat nachgewiesen werden [243] sowie in verschiedenen Sorten von weißem Rum die Ethylester der kurzkettigen Fettsäuren: Capronsäure, Caprylsäure, Caprinsäure und Laurinsäure [244]. Ob oral aufgenommene FAEE Ursache für einen falsch positiven Test sein können, ist jedoch zweifelhaft, da sie im Verdauungstrakt mit einer Halbwertszeit von 58 s abgebaut werden und selbst nach einer Absorption nur für wenige Minuten im Blutkreislauf zirkulieren [243].

FAEE in Körperhaaren

Bei einer vergleichenden Bestimmung von FAEE-Konzentrationen in Kopfhaaren und Körperhaaren von einem Abstinente, fünf moderaten Trinkern und 22 Todesfällen konnten Hartwig et al. [245] zeigen, dass auch Körperhaare für die Bestimmung eines exzessiven Alkoholkonsums geeignet sind. Unterschiedliche Wachstumseigenschaften der Haare sowie eine unterschiedliche Anzahl und Aktivität der Sebumdrüsen verursachen jedoch große Konzentrationsdifferenzen. In einer Studie von Süße et al. [238] konnten hingegen keine signifikanten Unterschiede zwischen den FAEE-Konzentrationen in Kopf und Körperhaaren gefunden werden.

4.5 **Untersuchte Matrices**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden EtG- und EtS-Konzentrationen in Urinen sowie EtG- und FAEE-Konzentrationen in Haaren bestimmt. Die beiden untersuchten Matrices werden in den folgenden Abschnitten beschrieben.

4.5.1 **Urin**

Urin, das flüssige Exkret der Niere, wird in dieser durch komplizierte Filtrations- und Rückresorptionsvorgänge gebildet, in der Harnblase gesammelt und schließlich ausgeschieden [246]. Ein gesunder Mensch bildet abhängig von Geschlecht, Alter und einer Vielzahl weiterer Faktoren (z. B. Anregung der Nierentätigkeit) täglich zwischen 500 und 2000 mL Urin [247]. Es handelt sich um eine wässrige, leicht saure Lösung aus zahlreichen organischen und anorganischen Stoffen (Normbereich pH 5,6–7,0) mit einer Dichte zwischen 1,015 und 1,022 mg/L. Die hellgelbe bis dunkelrote Farbe des Urins, hauptsächlich hervorgerufen durch die beiden Urochrome A und B, wird durch die Konzentration an gelösten Stoffen, pathologische Bestandteile sowie Arznei- und Nahrungsmittel beeinflusst.

Über den Urin werden Stoffwechselprodukte und überschüssige Körperflüssigkeit ausgeschieden. Unterschieden wird hierbei zwischen Urin-fähigen und Urin-pflichtigen Stoffen, je nachdem, ob Stoffwechselprodukte mit dem Urin ausgeschieden werden können oder müssen [246]. Viele Stoffwechselprodukte werden in Phase-II-Reaktionen zu sehr polaren und meist unwirksamen Metaboliten umgewandelt. Diese können leichter als die Ausgangssubstanzen über Niere und Leber ausgeschieden werden. Wichtige Phase-II-Reaktionen sind Glucuronidierung, Sulfonierung, Methylierung, Acetylierung sowie die Konjugation mit Aminosäuren und Glutathion [247]. Bilirubin, Steroidhormone und Abbauprodukte, Phenole, Benzoesäure sowie weitere Arzneimittel und Fremdstoffe reagieren beispielsweise mit aktivierter Glucuronsäure und Mitwirkung der Glucuronyltransferase zu wasserlöslichen Glucuroniden [248].

Urin als Untersuchungsmatrix in der Forensischen Toxikologie

Die Analyse von Urin lässt gegenüber Blut einen längeren Nachweis der Aufnahme von zentral wirksamen Mitteln zu [34]. Nachweisbar sind viele Ausgangssubstanzen sowie hydrophile, zum Teil unwirksame Metabolite. Geeignet sind Urinanalysen insbesondere für Abstinenzuntersuchungen, Screeninguntersuchungen sowie für länger zurückliegende Vorfälle. Der Grad einer akuten Beeinträchtigung kann mittels einer Urinanalyse nicht bestimmt werden. Aufgrund der nichtinvasiven Probenahme sind Urinproben gut geeignet zur Durchführung von richtungsweisenden Schnelltests.

Im Rahmen von Abstinenzprogrammen für die Fahreignungsbegutachtung ist eine vorgegebene Anzahl von unauffälligen Urinbefunden innerhalb von sechs bis zwölf Monaten beizubringen [4]. Kandidaten werden unangekündigt einbestellt und müssen spätestens am Folgetag eine Urinprobe unter Aufsicht durch autorisierte Personen abgeben. Bei einem Verdacht auf einen versuchten Täuschungsversuch, z. B. durch die Abgabe von Fremdurin, die chemische Manipulation durch Zusatzstoffe oder eine Verdünnung des Urins als Folge einer großer Flüssigkeitsaufnahme, bestehen die Möglichkeiten einer Tem-

peraturkontrolle sowie die Bestimmung weiterer Parameter wie Kreatininkonzentration, pH-Wert oder der spezifischen Dichte.

4.5.2 Haare

Haare sind Hautanhangsgebilde, die aus einer kompakten Zusammenlagerung von abgestorbenen Zellen bestehen. Eine Reihe von Veröffentlichungen beschäftigt sich ausführlich mit dem Aufbau und Wachstum von Haaren sowie deren Bedeutung als Untersuchungsgut in der forensischen Toxikologie [249–253]. Die folgenden Abschnitte geben eine Übersicht über Aufbau und Wachstum von Haaren, die Einlagerungsmechanismen für Drogen sowie die Grundlagen der Haaranalytik.

Haarstruktur und Aufbau

Haarfollikel finden sich auf der gesamten Hautoberfläche des Menschen mit Ausnahme der Handinnenflächen und Fußsohlen. Bereits in der pränatalen Phase bilden sich feine, seidige und in der Regel unpigmentierte Lanugohaare, die das ungeborene Kind vor dem Aufweichen durch das Fruchtwasser schützen und nach der Geburt ausfallen. Sie werden ersetzt durch weiche, marklose und pigmentarme Wollhaare oder auch Vellushaare, die die Körperoberflächenbehaarung darstellen. Kopfhaare, Wimpern und Augenbrauen sowie die ab der Pubertät wachsenden Achsel-, Bart- und Schamhaare gehören zu der Gruppe der Terminalhaare. Diese sind deutlich dicker, länger und in der Regel pigmentiert. Gesunde Menschen besitzen etwa 90.000 bis 150.000 Kopfhaare, was in etwa einer Dichte von 200 Haare/cm² entspricht. Der normale Haarverlust beträgt ca. 70–150 Haare/Tag. Bei einer Haarwäsche gilt ein Verlust von bis zu 300 Haaren als unauffällig. Die Zusammensetzung der Haare ist wie folgt: 65–95% Proteine (90% Keratin), 15–35% Wasser (abhängig von der Luftfeuchtigkeit), 1–9% Lipide (Sebum) und Mineralien (<1%).

Der Aufbau von Haaren ist nicht homogen, sondern stellt eine konzentrische Struktur aus drei verschiedenen Arten von keratinisierten Zellen dar. Die Primärstruktur der Haare besteht aus zwei oder drei α -Keratinketten, die zu sogenannten Mikrofibrillen zusammen gewunden sind. Diese sind wiederum zu größeren Bündeln, den Makrofibrillen, zusammengefasst, die die innere Struktur des Haares, die Cortex, darstellen. Die Zellen in der Cortex erhalten die für die Farbe verantwortlichen Melaninpigmente und sorgen für die große Dehnbarkeit des Haares. Geschützt wird das Haar durch die Cuticula, eine 5–10-lagige, schuppenartige Schicht aus unpigmentierten Epithelzellen, die dem Haar seinen Glanz verleiht. Disulfid- und Wasserstoffbrücken stabilisieren und formen das Haar und geben ihm seine semikristalline Struktur. Terminalhaare besitzen zudem einen hohlen Kern, die sogenannte Medulla.

An jedem Haarfollikel ist ein kleiner Aufrichtmuskel, der *Musculus arrector pili*, mit dem das Haar bei Kälte oder psychischen Einflüssen aufgerichtet werden kann. In den Sebumdrüsen, im oberen Part jeder Haarwurzel, wird Sebum gebildet, welches das wachsende Haar zwei bis drei Tage bevor es die Hautoberfläche erreicht komplett bedeckt. Sebum besteht zu einem Drittel aus freien Fettsäuren, zu einem weiteren Drittel aus gebundenen Fettsäuren sowie aus nicht verseifbaren Anteilen wie z. B. Squalen,

Cholesterin und Wachsen. Die durchschnittliche Sebumproduktion auf einer Kopfhautfläche von 10 cm^2 liegt zwischen $0,2$ und $0,6\text{ mg/h}$. Schweißdrüsen sind nicht in den Haarwurzeln, jedoch in der unmittelbaren Nähe zu diesen zu finden. Abbildung 4.6 zeigt eine graphische Darstellung der obersten Hautschichten sowie der Haarstruktur aus [254].

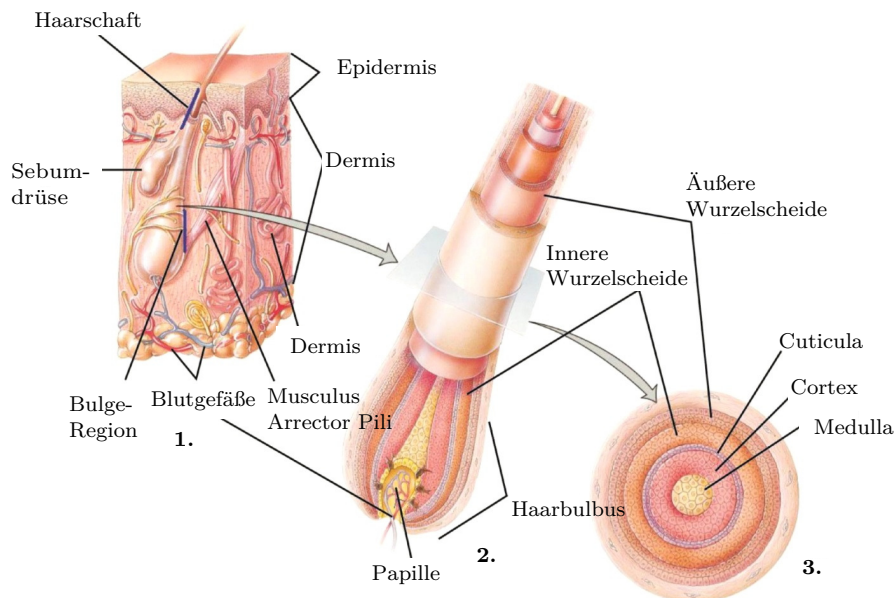


Abbildung 4.6: Struktur der obersten Hautschichten (1.) und des Haarfollikels (2.) sowie ein Querschnitt des Haares (3.) übernommen aus [254].

Bildung von Haaren und Phasen des Haarwachstums

Haare werden in Haarfollikeln gebildet, die in die Dermis der Haut eingebettet und von einem Netzwerk aus Blutgefäßen durchzogen sind. Durch sie wird das wachsende Haar mit metabolischem Material versorgt. Am Grund der Haarfollikel befindet sich der Haarbulbus, der von den darüberliegenden Wurzelscheiden umgeben ist. In der Basis des Follikels, dem Wachstumsbereich, werden die Haare durch Zellteilungen gebildet. In den größer und länger werdenden Zellen wird daraufhin das von Melanozyten in Melanosomen produzierte Pigment Melanin eingelagert. In der Folge verhornen die Zellen und sterben in der Aushärtungszone unter Elimination des Zellkerns und von Wasser ab. Der Zellzyklus von Haarzellen ist mit einer Zykluszeit von ca. 12 h einer der schnellsten im Vergleich zu anderen menschlichen Geweben und wird lediglich von der Teilungsaktivität des Knochenmarks übertroffen. Untersuchungen zum durchschnittlichen Haarwachstum ergaben Werte zwischen $0,2$ und $0,5\text{ mm/Tag}$ bzw. $0,56$ und $1,5\text{ cm/Monat}$. Neu gebildete Haarzonen erreichen etwa nach 9–14 Tagen die Hautoberfläche.

Haare wachsen dabei in einem dreistufigen Zyklus. In der 4–8 Jahre dauernden anagenen Phase findet ein aktives Wachstum statt. Etwa 85% der Kopfhare befinden sich in dieser Phase. Weitere 1–3% der Haare sind im einem Übergangszustand, der

als katagene Phase bezeichnet wird und einige Wochen anhält. In dieser Zeit stellt die Matrix ihre Zellproduktion ein und das Haar löst sich von der Papille. In der telogenen Phase befinden sich ca. 15% der Haare ca. 4–6 Monate lang in einem Ruhezustand. Nach einer Regeneration der Haarpapille und des Haarfollikels wird ein neues Haar gebildet. Bevor dieses die Hautoberfläche erreicht, fällt das telogene Haar aus. Sowohl die Wachstumsgeschwindigkeit als auch die Dauer der unterschiedlichen Haarzyklen sind abhängig vom Geschlecht und Alter, dem Gesundheitszustand sowie von endokrinen (z. B. Sexualhormone), aber auch nicht-hormonellen Faktoren und ernährungsbedingten Einflüssen. Abhängig von der ethnischen Herkunft existieren große Unterschiede bei der Morphologie, der Struktur, der Geometrie, der Quellung durch Wasser sowie der mechanischen Eigenschaften der Haare [255].

Einlagerung von Drogen in die Haarmatrix

Der genaue Einlagerungsmechanismus von Drogen in die Haarmatrix ist noch nicht komplett erforscht. Aufgrund der polymeren Haarstruktur mit einer Vielzahl von funktionellen Gruppen (z. B. Säuren, Basen, Peptide) gibt es Bindungsstellen für viele verschiedene Moleküle. Drogen können abhängig von ihrer Struktur sowie den chemischen und physikalischen Eigenschaften auf unterschiedlichen Wegen in die Haarmatrix gelangen. Blut, Schweiß, Sebum und die Haut sind mögliche Quellen, aus denen Drogen in die Haare eingelagert werden können. Zudem kann eine Absorption aus der Umgebung stattfinden. Abbildung 4.7 aus [252] stellt verschiedene Einlagerungsmechanismen ins Haar sowie Möglichkeiten zur Elimination graphisch dar. Drogen und andere Substanzen gelangen zum Teil durch eine passive Diffusion aus den Blutkapillaren in die sich bildenden Haarzellen. Die zu überwindenden Biomembranen sind für lipophile Substanzen deutlich durchgängiger als für hydrophile, für die die Zellmembranen ein unüberwindbares Hindernis darstellen. In Haaren können daher häufig höhere Konzentrationen der lipophilen Muttersubstanzen nachgewiesen werden als von ihren hydrophilen Metaboliten.

Anagene Haarfollikel sind etwa 3–5 mm tief in der Dermis der Kopfhaut lokalisiert. Zwischen der Zellteilungs- und der Keratinisierungszone liegt eine Strecke von 1,2–1,5 mm, in der Fremdstoffe in die nach oben wandernden Zellen eingelagert werden können. Dies entspricht einem Zeitfenster für die Einlagerung von 3–5 Tagen. Bei Drogen, die über das Blut in die Haare diffundieren, gibt es einen linearen Zusammenhang zwischen der Konzentration im Blut und in der Haarmatrix.

Der pH-Wert von Melanozyten liegt zwischen 3 und 5 und ist damit niedriger als der pH des Plasmas. Basische Drogen werden dadurch in einem größeren Maßstab in die Haare eingelagert als saure, die nur in sehr geringen Konzentrationen im Haar nachgewiesen werden können. Die Konzentration von basischen und aromatischen Drogen hängt zudem vom Melaningehalt der Haare ab. Zwischen kationischen Drogen und den anionischen Gruppen des Melanins können Ionenbindungen ausgebildet werden. Zwischen den aromatischen Strukturen des Melanins und denen von Drogen kommt es zu Van-der-Waals-Wechselwirkungen. Weitere Bindungsstellen, auch in pigmentfreien Haaren, stellen Sulfhydrylgruppen von Aminosäuren (z. B. Cystin) sowie Proteine dar, die elektrostatische und Van-der-Waals Wechselwirkungen ausbilden können.

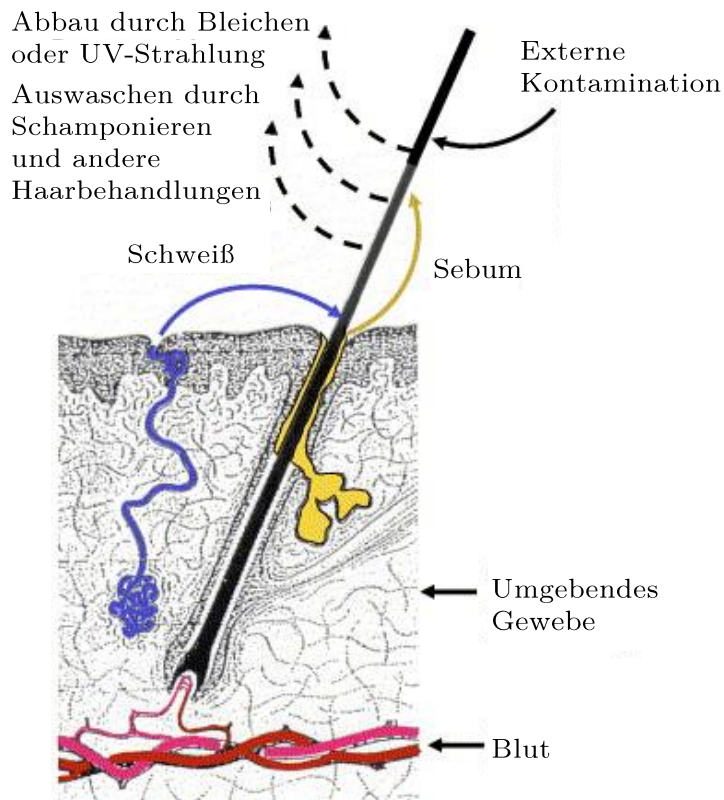


Abbildung 4.7: Verschiedene Einlagerungs- und Eliminationsmechanismen in die Haarmatrix übernommen aus [252].

Weitere Möglichkeiten zur Einlagerung von Drogen sind Diffusionen aus Schweiß oder Sebum in den fertigen Haarschaft. Eine Emulsion aus Schweiß und Sebum benetzt das Haar. Durch Schweiß angefeuchtete Haare können durch eine radiale Schwellung bis zu 30% ihres Eigengewichtes an Wasser aufnehmen. Auf diesem Weg werden hydrophile Drogen in die Haarmatrix eingelagert. Lipophile Substanzen können entlang der Zellmembrankomplexe aus dem Sebum in die Haarmatrix diffundieren. Für die meisten Substanzen wird eine Kombination aus den beschriebenen Einlagerungsmechanismen angenommen, die an Hand einer Haaranalyse nicht näher charakterisiert werden kann.

Haaranalytik allgemein

Die Ursprünge der Haaranalyse liegen in dem 1979 von Baumgartner et al. entwickelten Nachweis von Opiaten in Haaren mittels eines Radioimmunoassays [256]. Der erste chromatographische Nachweis von Opiaten gelang Klug im Jahr 1980 [257]. 2004 wurden von der SoHT Richtlinien für Haaranalysen für forensische Zwecke veröffentlicht [258].

Aufgrund der hohen Spezifität und Sensitivität sind chromatographische Verfahren gekoppelt mit massenspektrometrischer Detektion heutzutage der Gold-Standard für den qualitativen und quantitativen Nachweis von Drogen und deren Metaboliten in Haaren. GC-MS ist dabei das am häufigsten verwendete Verfahren mit LODs im Bereich

von 0,5 ng/mg. Mittels LC-MS/MS können auch schwer verdampfbare sowie temperatur-empfindliche Substanzen (z. B. Benzodiazepine) mit einer sehr hohen Empfindlichkeit (LOD \approx 1 pg/mg) nachgewiesen werden. Seit einiger Zeit ist es möglich, Drogen sogar in einzelnen Haaren nachzuweisen und die Verteilung im Haar abzubilden [259].

Die Stabilität der meisten Drogen in der Haarmatrix ist hoch. Bei einer normalen Haarpflege ohne aggressive Behandlungen wie Bleichen oder Dauerwellen können viele Drogen auch Jahre nach dem Konsum im Haar nachgewiesen werden. Durch kosmetische Behandlungen kann ein Großteil der anfänglichen Drogenkonzentration aus dem Haar eliminiert werden. Auch die Einwirkung von UV-Licht und/oder Wasser kann einen entscheidenden Einfluss haben. In gut gelagerten Haarproben (geschützt vor Licht und Feuchtigkeit) können einige organische Substanzen bis zu mehrere hundert Jahren überdauern. Sogar in den Haaren von Mumien ist der Nachweis von Drogen und anderen Fremdstoffen gelungen [260, 261].

Die Möglichkeit, Substanzen auch Monate nach dem Konsum nachweisen zu können, ist ein Hauptvorteil von Haaranalysen. Im Gegensatz zur Urinanalyse kann mit einer Haaranalyse zwischen einmaligem und chronischem Konsum unterschieden werden. Durch eine sequenzielle Analyse kann der Verlauf des Drogenkonsums überwacht werden. Sogar eine Einmalgabe von Drogen oder Medikamenten im Rahmen einer Straftat ist mittels einer Haaranalyse noch nach mehreren Monaten nachweisbar. Durch einen Vergleich der Ergebnisse des entsprechenden Haarsegments mit älteren Segmenten kann hierbei ein chronischer Konsum der Droge ausgeschlossen werden [262].

Auch im Bereich der Dopingkontrolle kann eine Haaranalyse zum Einsatz kommen. Sowohl endogene (z. B. Testosteron) als auch exogene Steroide (z. B. Nandrolon), die Sportler zur Steigerung der Leistungsfähigkeit einsetzen, können beispielsweise nachgewiesen werden [263].

Für eine Analyse werden Haare üblicherweise vom Hinterkopf, dem sogenannten „Posterior Vertex“, gesammelt. In diesem Bereich ist der Einfluss von Alter und Geschlecht am geringsten, das Wachstum am gleichmäßigsten und der Anteil an Haaren in der anagenen Phase am höchsten. Wenn Kopfhaar fehlt, können alternative Haare (z. B. Scham-, Achsel- oder Körperhaare) für die Analyse verwendet werden. Eine sequenzielle Bestimmung ist in diesen Fällen aufgrund der abweichenden Wachstumseigenschaften nicht möglich.

Bei der Durchführung von Haaranalysen gibt es unterschiedliche Fehlerquellen, die bei der Probenahme, der Aufarbeitung oder bei der anschließenden Analyse liegen. Hinzu kommen falsch Positive, die auf eine externe Kontamination der Haare zurückzuführen sind. Neben einem optimierten Extraktionsverfahren ist eine Dekontamination der Haare mittels geeigneter Waschschriffe unerlässlich. Ein sicherer Ausschluss einer externen Kontamination wird durch den Nachweis von Metaboliten erreicht, die eine Körperpassage der Muttersubstanz erfordern, nicht durch Hydrolyse gebildet werden können und kein Bestandteil der entsprechenden Drogen sind.

4.6 Instrumentelle Analytik

4.6.1 Immunoassays

Immunoassays sind Verfahren für qualitative oder semiquantitative Bestimmung von Substanzen auf der Grundlage von Antikörpern, die spezifisch an das gesuchte Antigen binden. Die heutzutage stark automatisierte Technik ermöglicht einen einfachen, schnellen, kostengünstigen und richtungweisenden Nachweis der wichtigsten Drogen im Rahmen von chemisch-toxikologischen Untersuchungen. 1950 legte Rosalyn Sussman Yalow den Grundstein für immunochemische Verfahren mit der Entwicklung einer radioimmunologischen Methode zur Bestimmung von Peptidhormonen, für die sie 1977 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet wurde. Für den Nachweis von Insulin-Antikörpern wurde ^{131}I markiertes Insulin mit dem Blut des Patienten gemischt und nach Abtrennung des freien Insulins die austretenden γ -Strahlen gemessen. Die Menge an gebundenem, radioaktiv markiertem Insulin ist mit der Konzentration der Antikörper korreliert.

Für den Nachweis von Drogen werden entsprechende Antikörper in Tieren durch eine kontrollierte Gabe der Drogen generiert. Nach einer Mischung des erhaltenen Antiserums mit der markierten Droge sowie mit dem zu untersuchenden Material kommt es zu einer Konkurrenz um die freien Bindungsstellen der Antikörper. Aus einem Vergleich der Menge der gebundenen, markierten Drogen mit der Menge in Referenzproben wird die Drogenkonzentration bestimmt. Markierte Verbindungen müssen dabei zwei wichtige Voraussetzungen erfüllen: sie müssen ähnliche immunologische Eigenschaften wie die zu testende Substanz besitzen und sensitiv sowie spezifisch nachgewiesen werden können. Als Marker werden unter anderem radioaktive oder fluoreszierende Moleküle sowie Enzyme eingesetzt. Letztere katalysieren eine Farbreaktion, welche spektroskopisch nachgewiesen werden kann. Verschiedene Verfahren kommen dabei zum Einsatz. Abbildung 4.8 zeigt eine schematische Darstellung der Enzymreaktion.

Bei Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) sind Antikörper an eine feste Phase (z. B. Mikrotiterplatten) gebunden. Die im Serum oder Urin enthaltene Droge sowie das entsprechende, markierte Analogon konkurrieren um die freien Bindungsstellen. Eine Bindung der markierten Droge mit dem Antikörper führt dabei zu einer Deaktivierung der Enzymaktivität. Der folgende Farbumschlag ist daher proportional zur Drogenkonzentration.

Für den Nachweis von im Straßenverkehr relevanten, illegalen Drogen (z. B. Amphetamine, Cannabinoide, Opiate oder Kokain) werden häufig sogenannte Cloned Enzyme Donor Immunoassays (CEDIA) eingesetzt [264–267]. Für die Aktivierung des Enzyms ist eine Bindung zwischen dem Enzymakzeptor und dem Enzymdonor nötig. Diese Bindung wird durch eine Kopplung der markierten Droge, an die der Enzymdonor als Marker gebunden ist, mit dem Antikörper verhindert. Je größer die Konzentration der gesuchten Droge ist, umso größer ist der Anteil des vereinigten Enzyms. Durch die katalysierte Umwandlung von farblosem Chlorphenolrot- β -Galactopyranosid zu Chlorphenolrot, das eine maximale Absorption bei 570 nm zeigt, wird ein Farbumschlag erreicht.

Ein weiteres Verfahren ist die Enzyme-multiplied immunoassay technique (EMIT), mit dem unter anderem der Alkoholmarker EtG semiquantitativ nachgewiesen werden kann [268]. Zu der zu untersuchenden Urinprobe werden murine, monoklonale EtG-

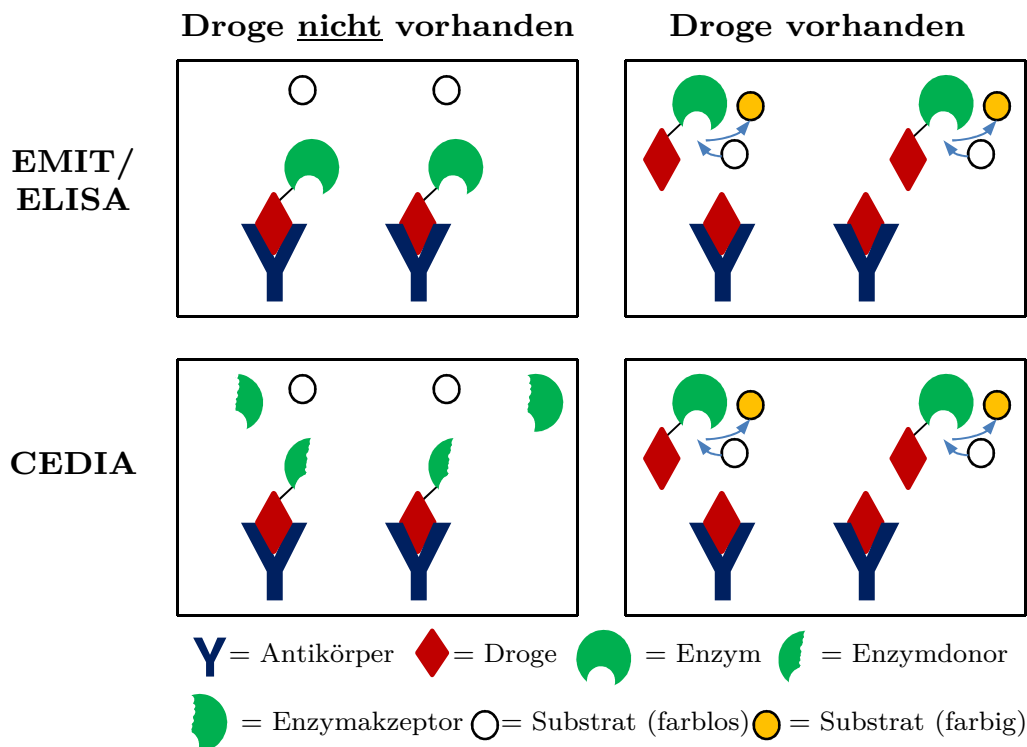


Abbildung 4.8: Schematische Darstellung der Abläufe in Immunoassays bei nicht vorhanden sein oder Vorliegen der entsprechenden Droge.

Antikörper geben, an die vorhandene EtG-Moleküle binden. In einem zweiten Schritt bindet ein Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH)-markiertes EtG-Derivat an freie Antikörper. Während freie Enzyme die Reduktion von Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (NAD) zu protoniertem NAD (NADH) katalysieren, sind gebundene Enzyme durch die Bindung des EtG-Derivats an den Antikörper deaktiviert. Das durch die Reduktion gebildete chinoid System absorbiert Licht mit einer Wellenlänge von 340 nm.

Der größte Schwachpunkt der immunchemischen Verfahren ist die zum Teil geringe Spezifität. Welche Substanzen von einem Antikörper gebunden werden, hängt von der molekularen Zusammensetzung sowie der räumlichen Orientierung des Moleküls ab. Durch die Anbindung strukturverwandter Substanzen kommt es zu Kreuzreaktionen, die je nach untersuchter Droge unterschiedlich stark ausgeprägt sind und zu falsch positiven Ergebnissen führen können. Dem Urin nachträglich zur Vertuschung eines Drogenkonsums zugegebene Stoffe, wie z. B. Reinigungsmittel, Bleiche oder Essig, können die Enzymaktivität verringern und dadurch zu falsch negativen Ergebnissen führen. Durch eine Überprüfung der Enzymaktivität können derartige Täuschungsversuche ermittelt werden [269].

Kreatinin kann ebenfalls mit einem vollautomatischen, klinisch-chemischen Analyser nachgewiesen werden. Diesem Test liegt jedoch nicht wie bei den vorherigen eine enzymatische Reaktion zu Grunde, sondern die nach Max Jaffé benannte Komplexbildung mit

Pikrinsäure [270]. Der Nachweis von Kreatinin im Urin gelang Max Jaffé bereits 1886 [271]. Aus Kreatinin und alkalischer Pikrat-Lösung werden über das Kreatininpikrat zwei Meisenheimer-Komplexe gebildet, deren Gleichgewichtseinstellung pH-Wert-abhängig ist und die Licht bei 484 bzw. 384 nm absorbieren [272].

4.6.2 Chromatographie

Bei der Chromatographie handelt es sich um einen Trennungsprozess, basierend auf dem unterschiedlichen Verhalten von Substanzen zu einer mobilen und einer stationären Phase. Die Ursprünge der Chromatographie lagen in der Auftrennung der Farbstoffe in Blattextrakten. 1906 veröffentlichte Tswett [273,274] zwei Artikel, in denen erstmals das Wort „Chromatographie“ auftaucht. Einen Überblick über die frühen Entwicklungen der Chromatographie gibt zudem [275].

Heute existieren verschiedenste Formen der Chromatographie. Die für die Trennung verantwortlichen physikalischen Vorgänge lassen sich dabei grob in zwei Prinzipien einteilen. Diese kommen im Allgemeinen nicht rein, sondern in unterschiedlichem Maße gemischt vor. Bei der Adsorptionschromatographie erfolgt die Trennung durch Adsorption an einem Feststoff (stationäre Phase). Eine Stofftrennung durch einen Lösevorgang in zwei, nicht miteinander mischbaren Phasen ist die Grundlage der Verteilungschromatographie. Neben planaren Techniken (z. B. Papier- und Dünnschichtchromatographie) hat die Säulenchromatographie einen hohen Stellenwert. Je nach Art der Phasenzustände (fest, flüssig und gasförmig) von mobiler und stationärer Phase wird u. a. zwischen Ionenaustauschchromatographie, Gaschromatographie (GC) und Flüssigkeitschromatographie (LC) unterschieden.

Im Rahmen dieser Arbeit kamen die GC für den Nachweis der FAEE sowie die HPLC zur Bestimmung von EtG und EtS zum Einsatz. Die allgemeinen Grundlagen der Chromatographie und die angewandten Verfahren werden im Folgenden kurz beschrieben.

Grundlagen der Chromatographie

Substanzen mit unterschiedlichen physikalischen und chemischen Eigenschaften wechselwirken unterschiedlich mit der stationären Phase. Hierdurch werden sie in Bezug zur mobilen Phase unterschiedlich stark verzögert. Abbildung 4.9 zeigt eine schematische Darstellung des Prinzips der Chromatographie anhand einer säulenchromatographischen Trennung. Der Verteilungskoeffizient K_d , der das Gleichgewicht zwischen mobiler und stationärer Phase beschreibt, ist abhängig vom Druck, der Temperatur sowie den Eigenschaften der Analyten und der mobilen wie der stationären Phase und definiert als der Quotient aus der Konzentration des Analyten in der stationären Phase und in der mobilen Phase.

Je nach Art der Chromatographie haben die verschiedenen Parameter einen unterschiedlichen Einfluss auf die Trennung. Bei der GC hat beispielsweise das verwendete Inertgas nur einen geringen Einfluss auf den Verteilungskoeffizienten. Bei der HPLC hingegen ist die Auswahl des Säulenmaterials und des Laufmittels entscheidend. Die Temperatur wird dagegen meist konstant gehalten und beeinflusst den Verteilungskoeffizienten nur in einem begrenzten Ausmaß.

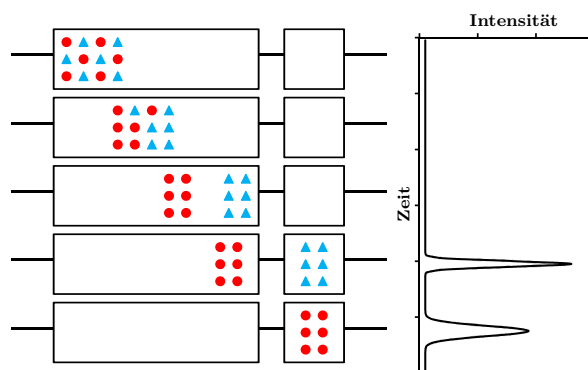


Abbildung 4.9: Schematische Darstellung des Prinzips der Chromatographie nach [276].

Substanzen, deren Verteilungskoeffizienten sich nicht unterscheiden, können nicht getrennt werden. Der Zeitpunkt, zu dem das Maximum eines Peaks auftritt, wird als Retentionszeit t_r bezeichnet. Die Retentionszeit, nach der Substanzen im Chromatogramm erscheinen, die gar nicht von der stationären Phase zurückgehalten werden, wird als Totzeit (t_0) bezeichnet. Absolute Retentionszeiten sind stark abhängig von den vorherrschenden Bedingungen. Relative Retentionszeiten t'_{ra} , berechnet aus der Differenz von t_r und t_0 , sind deutlich stabiler und besser reproduzierbar. Abbildung 4.10 zeigt die schematische Darstellung eines Diagramms nach [277] in der die beschriebenen Parameter dargestellt sind.

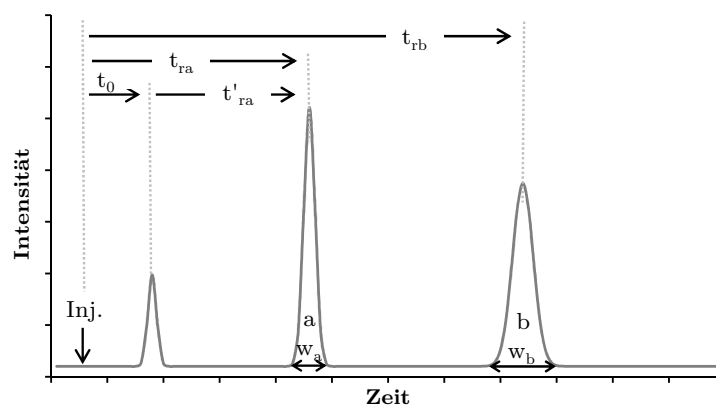


Abbildung 4.10: Schematische Darstellung eines Chromatogramms nach [277]. (t_{rb} , t_{ra} : Retentionszeit für die Substanzen a bzw. b, t_0 : Totzeit, t'_{ra} : relative Retentionszeit Substanz a, w_a , w_b : Peakbreiten an der Basis der Peaks (Substanz a bzw. b).

Ziel der Chromatographie ist es, eine möglichst vollständige Trennung aller in der Probe enthaltenen Substanzen zu erreichen. Als Maß für die Trennung zweier Substanzen

steht die chromatographische Auflösung R . Diese ist abhängig vom Quotienten aus der Retentionszeitendifferenz und dem Mittelwert der Peakbreiten an der Basis (w).

$$R = \frac{(t_{rb} - t_{ra})}{\frac{1}{2}(w_b - w_a)} \quad (4.1)$$

Die Effizienz einer Trennung wird als Trennstufenzahl N bezeichnet. Sie beschreibt die Anzahl der Gleichgewichtseinstellungen des Analyten zwischen stationärer und mobiler Phase und ist definiert als:

$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_r}{w}\right)^2 \quad (4.2)$$

Die Trennstufenzahl ist bei der GC (~ 100.000) deutlich größer als bei der HPLC ($\sim 15.000 - 20.000$). Dies ermöglicht eine bessere Trennung sogar von komplexen Mischungen.

Ein weiterer Indikator für die Effizienz einer chromatographischen Säule ist die Trennstufenhöhe H . Diese beschreibt den gedachten Abschnitt der Trennsäule, auf dem das Gleichgewicht zwischen dem Analyten in der mobilen und stationären Phase einmal eingestellt wird. Die Trennstufenhöhe kann als Quotient aus Säulenlänge L und Trennstufenzahl sowie mit der Van-Deemter-Gleichung unter Einbeziehung der Flussrate $\bar{\mu}$ beschrieben werden.

$$H = \frac{L}{N} \quad (4.3)$$

$$H = A + \frac{B}{\bar{\mu}} + C\bar{\mu} + D\bar{\mu} \quad (4.4)$$

Die Terme A , B , C und D beschreiben die Ursachen für Peakverbreiterungen und sind folgendermaßen definiert:

- A : Eddy-Diffusion – entsteht durch unterschiedlich lange Strecken, die die mobile Phase in gepackten Säulen um die Partikel der stationären Phase zurück legen muss. Bei Kapillarsäulen entfällt dieser Term.
- B : longitudinale Diffusion – beschreibt die Diffusion der Analyten in der mobilen Phase in Richtung von Bereichen mit geringerer Konzentration. Der Einfluss auf eine Peakverbreiterung ist bei der GC größer als bei der HPLC, da die Diffusionskoeffizienten in Gasen deutlich höher sind als in Flüssigkeiten. Dichter gepackte Säulen sowie eine höhere Flussrate $\bar{\mu}$ der mobilen Phase verringern die longitudinale Diffusion.
- C : Massentransfer in der stationären Phase – beschreibt die begrenzten Geschwindigkeiten von Diffusionsprozessen und Phasenübergängen. Die Dauer der Gleichgewichtseinstellung zwischen mobiler und stationärer Phase ist sowohl bei der GC als auch bei der HPLC von großer Bedeutung. Eine dünne stationäre Phase mit einer hohen Uniformität sowie eine Verlangsamung der Flussrate $\bar{\mu}$ schwächen den Einfluss des Massentransfers.
- D : horizontale Diffusion – beschreibt die Diffusion des Analyten horizontal zur Flussrichtung. Entfällt für gepackte Säulen.

Peaksymmetrie

Im Idealfall folgen Chromatographie-Peaks einer Gauß-Funktion. In der Praxis wird jedoch häufig eine asymmetrische Peakverbreiterung beobachtet. Eine Verbreiterung der ansteigenden Flanke des Peaks wird als Fronting bezeichnet. Tailing steht für eine Verbreiterung der absteigenden Flanke. Alle drei Fälle sind in Abbildung 4.11 dargestellt. Gründe für auftretende Asymmetrien sind vielfältig und reichen von Abweichungen bei der Gleichgewichtseinstellung, z. B. durch eine zu hohe Analytkonzentration, bis hin zu instrumentellen Problemen oder Problemen bei der Probeninjektion. Das Maß der Peaksymmetrie kann durch den Tailingfaktor T als Quotient aus den Abständen vom Lot zur Peakfront a und zum Peakende b bei 10% der Peakhöhe bestimmt werden.

$$T = \frac{b}{a} \quad (4.5)$$

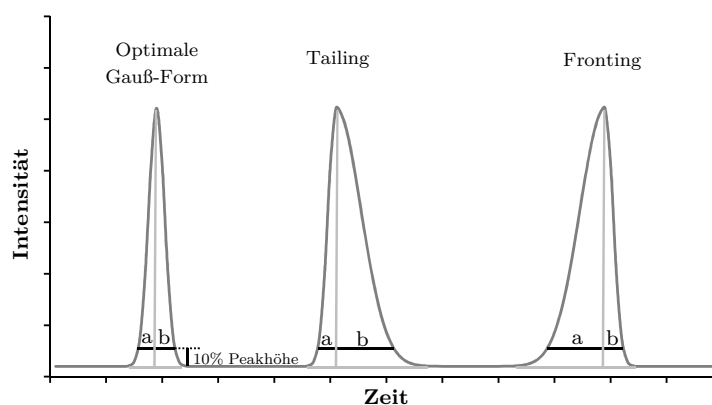


Abbildung 4.11: Schematische Darstellung eines idealen Peaks in Gauß-Form (links) sowie eine Peakverbreiterung durch Tailing (Mitte) sowie durch Fronting (rechts) [277].

Gaschromatographie (GC)

Die GC eignet sich zur Trennung von Substanzgemischen, die im verwendeten Temperaturbereich bis 300°C verdampfen und eine hohe thermische Stabilität aufweisen. Proben werden manuell oder automatisiert in den Injektor verbracht, in dem sie ins Vakuum überführt werden und verdampfen. Für die anschließende Trennung werden meist beschichtete Kapillarsäulen aus Quarzglas (Länge: 10–60 m, Innendurchmesser: 0,1–0,5 mm, Filmdicke: 0,1–5,0 μm) verwendet. Als mobile Phase kommen hochreine Inertgase (z. B. Helium oder Stickstoff) zum Einsatz. Die Trennung der Substanzen mit unterschiedlichen Siedepunkten und Polaritäten erfolgt durch das Durchlaufen eines Temperaturgradienten. Die Polarität beschreibt dabei die Größe eines permanenten oder induzierbaren Dipolmoments. Je nach Fragestellung und geforderter Sensitivität wie Spezifität kommen verschiedene Verfahren zur Detektion der Analyten zum Einsatz.

Weit verbreitet sind unter anderem der FID, der Wärmeleitfähigkeitsdetektor sowie der im Rahmen dieser Arbeit verwendete massenselektive Detektor (siehe Abschnitt 4.6.3).

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Gemische aus löslichen Substanzen können mittels der HPLC getrennt werden. Über ein Ventil wird ein Aliquot der Probe in den Laufmittelstrom eingebracht. Die Trennung erfolgt mittels einer gepackten Säule, deren Material je nach Art des Analyten ausgewählt wird.

Die verwendeten Säulen lassen sich in zwei Klassen einteilen. Trennphasen für die Normalphasenchromatographie bestehen meist aus Kieselgelen, an die z. T. Ketten mit funktionellen Gruppen gebunden sind, die den Grad der Polarität bestimmen. Zum Einsatz kommen entweder alleinig apolare Laufmittel (isokratische Elution) oder solche mit einem wechselnden Anteil eines polaren Laufmittels (Gradienten-Elution).

Für polare Analyten, die von polaren Phasen zu stark zurückgehalten werden, kommt die Umkehrphasenchromatographie (engl. Reversed-phase chromatography, RPC) zum Einsatz. An die polare Oberfläche des Kieselgels sind apolare Seitenketten (z. B. Alkane oder Phenyle) gebunden. Als Laufmittel werden wässrige Puffer in Kombination mit einem mischbaren apolaren Lösemittel (z. B. Methanol (MeOH) oder Acetonitril (ACN)) verwendet.

Wie bei der GC stehen unterschiedliche Detektoren für den Nachweis der Analyten zur Verfügung. Neben der bereits erwähnten massenselektiven Detektion kommen u. a. Dioden-Array-Detektoren, Fluoreszenzdetektoren und elektrochemische Detektoren zum Einsatz.

4.6.3 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie bezeichnet ein Verfahren zur Messung der Masse von ionisierten Atomen oder Molekülen. Die zu untersuchenden Substanzen werden in die Gasphase überführt und ionisiert. In einem elektrischen Feld werden die Ionen beschleunigt und im Analysator abhängig von ihrem Masse-zu-Ladung-Verhältnis (m/z) getrennt. Mit Hilfe eines Sekundärelektronenvervielfachers wird das Signal verstärkt und detektiert. Grundlagen der Massenspektrometrie sowie Erläuterungen zu Massenspektren von vielen organischen Verbindungen sind in [278] und [279] zu finden.

Ionisierungstechniken

Je nach Art der zu analysierenden Substanzen und abhängig vom Ziel der Untersuchung stehen unterschiedliche Ionisierungstechniken zu Verfügung [278, 279]. Häufig verwendet wird die Elektronenstoßionisation (EI), bei der senkrecht zum Probenstrom ein Elektronenstrahl beschleunigt wird. Die Wechselwirkung der Elektronen mit den Molekülen bewirkt entweder die Abspaltung eines Elektrons (Bildung eines positiven Ions) oder den Einbau eines Elektrons in ein unbesetztes Orbital (Bildung eines negativen Ions). Durch die eingesetzten hohen Energien kommt es zu einer starken Fragmentierung der gebildeten instabilen Radikale in charakteristische Bruchstücke.

Ein sanfteres Ionisierungsverfahren, z. B. für die Bestimmung von Molmassen, stellt die Chemische Ionisation (CI) dar. Ein im großen Überschuss vorhandenes Reaktandgas

(z. B. Methan) wird durch den Elektronenbeschuss ionisiert. Durch Wechselwirkungen der Reaktandgasionen mit den Analyten kommt es zu Ladungsübertragungen und Anlagerungsreaktionen.

Bei der Analyse von Proben in flüssiger Form können Sprühmethoden verwendet werden. Bei der Elektrospray-Ionisation (ESI) wird die Probe durch eine Kapillare, an der eine hohe Spannung anliegt, versprüht. Aus dem Flüssigkeitskonus (Taylor-Konus), in dem sich am Ende der Sprühkapillare, abhängig von der angelegten Spannung, positive oder negative Ionen ansammeln, bilden sich geladene Tröpfchen. Durch die Verdampfung der neutralen Lösemittelmoleküle verringert sich der Tröpfchenradius. Übersteigt die Dichte der Oberflächenladungen das sogenannte Rayleigh-Limit, bei dem die Coulomb-Abstoßung der gleichsinnigen Ladungen die Oberflächenspannung übersteigt, kommt es zu einem Zerfall in kleinere Tröpfchen. Nach mehreren Zerfällen kommt es zu einem Übergang der Ionen aus dem Tropfen in die Gasphase. Abbildung 4.12 zeigt eine schematische Darstellung der Funktionsweise der ESI.

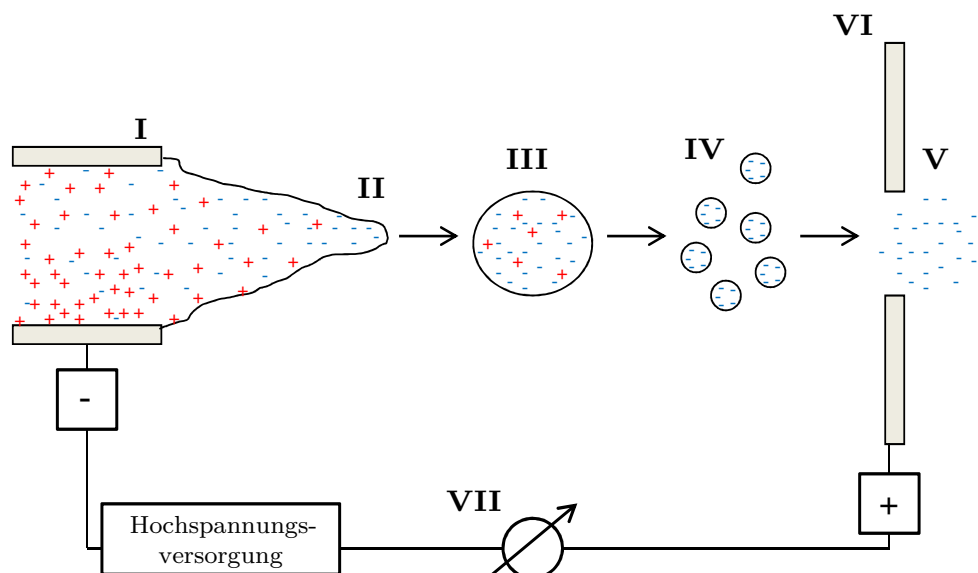


Abbildung 4.12: Schematische Darstellung einer ESI Ionenquelle nach [278]. (I) unter Hochspannung stehende Sprühkapillare, (II) gebildeter Flüssigkeitskonus (Taylor-Konus) am Ende der Kapillare, (III) gebildetes Tröpfchen mit einem Überschuss an positiven Ionen, (IV) Erhöhung der Oberflächenladung/cm² durch kleiner werdende Tröpfchenradien, (V) Bildung von gasförmigen Ionen nach dem Zerfall der Tröpfchen, (VI) Gegenelektrode, (VII) Spannungsversorgung.

Die ebenfalls zum Einsatz kommende chemische Ionisation unter Atmosphärendruck (engl. Atmospheric-pressure chemical ionization, APCI) funktioniert ähnlich wie ESI. Die Lösung des Analyten wird jedoch schon vor der Ionisation verdampft. Analog zu der chemischen Ionisation sorgen Reaktandionen, in diesem Fall an einer spitzen Elektrode ionisierte Lösemittelmoleküle, für die Ionisation der Analyten. Besonders kleine sowie thermisch stabile Moleküle können mit diesem Verfahren sensitiv untersucht werden.

Weitere Verfahren wie z. B. die Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (engl. Matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI), bei der die Ionisation der Analyten durch die Bestrahlung der auf ein Target aufgebrachten Probe mit einem gepulsten Laser erfolgt, werden in [278] beschrieben.

Analysator

Im Analysator werden die beschleunigten und fokussierten Ionen nach ihrem Masse-zu-Ladung-Verhältnis getrennt. Dies kann durch eine Ablenkung der Ionen im Magnetfeld oder im elektrischen Feld sowie aufgrund der unterschiedlichen Geschwindigkeiten der Ionen erreicht werden. Diese sowie weitere Analysatoren sind in [278, 280] beschrieben. Im Folgenden wird nur die Funktionsweise des im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Quadrupol-Massenspektrometers erläutert.

Ein Quadrupol besteht aus vier parallel im Quadrat angeordneten Metallstäben, von denen kreuzweise jeweils zwei mit einander leitend verbunden sind. Durch das Anlegen von Wechselspannungen werden die Ionen oszillierend abgelenkt. Die Phasen zwischen den beiden Stabpaaren sind dabei um π versetzt. Eine zusätzlich angelegte Gleichspannung bewirkt bei zwei Stäben eine generelle Ablenkung zur Mittelachse und bei den anderen eine Ablenkung zu den Metallstäben. Je nach Höhe der angelegten Spannungen können Ionen mit einem bestimmten m/z den Quadrupol ungehindert passieren. Alle anderen Ionen werden so stark abgelenkt, dass sie die Stäbe treffen und entladen werden.

Eine Anordnung mehrerer Quadrupole in Reihe erhöht das Auflösungsvermögen und ermöglicht die Anwendung verschiedener Messmodi, die je nach Fragestellung zum Einsatz kommen. (siehe Abbildung 4.13). Im Full Scan Modus (a) wird das Gerät wie ein einfacher Quadrupol verwendet. Im sogenannten Product Ion Scan Modus (b) selektiert der erste Quadrupol (Q1) ein spezifisches Ion. In Q2 werden aus den Ionen durch eine Kollision mit den Molekülen des Stoßgases charakteristische Fragmentionen gebildet, die in dritten Quadrupol (Q3) analysiert werden. Bei einem Precursor Ion Scan (c) analysiert Q1 den gesamten Massenbereich. Nach der Fragmentierung wird ein Produkt selektiert, welches charakteristisch für ein oder mehrere der Analyten ist. Im Multiple Reaction Monitoring (MRM) Modus (d) werden sowohl in Q1 als auch in Q3 spezifische Ionen bzw. Fragmentionen selektiert. Eine durch die Selektion verursachte starke Reduktion des Grundrauschens erhöht dabei die Sensitivität. Durch automatisierte Tuning-Experimente, bei denen der Analyt als Reinstoff direkt in das Gerät injiziert wird, können für jeden Analyten die optimalen Einstellungen für die Ionisation sowie Fragmentierung gefunden werden.

Detektor

Die Detektion der den Analysator verlassenden Ionen kann ebenfalls auf verschiedenen Wegen erfolgen [280]. Meist werden Sekundärelektronenvervielfacher zur Verstärkung des Signals eingesetzt. In einem Photomultiplier werden die Ionen beim Auftreffen auf eine Dynode in Elektronen umgewandelt. Weitere Dynoden sorgen für einen ex-

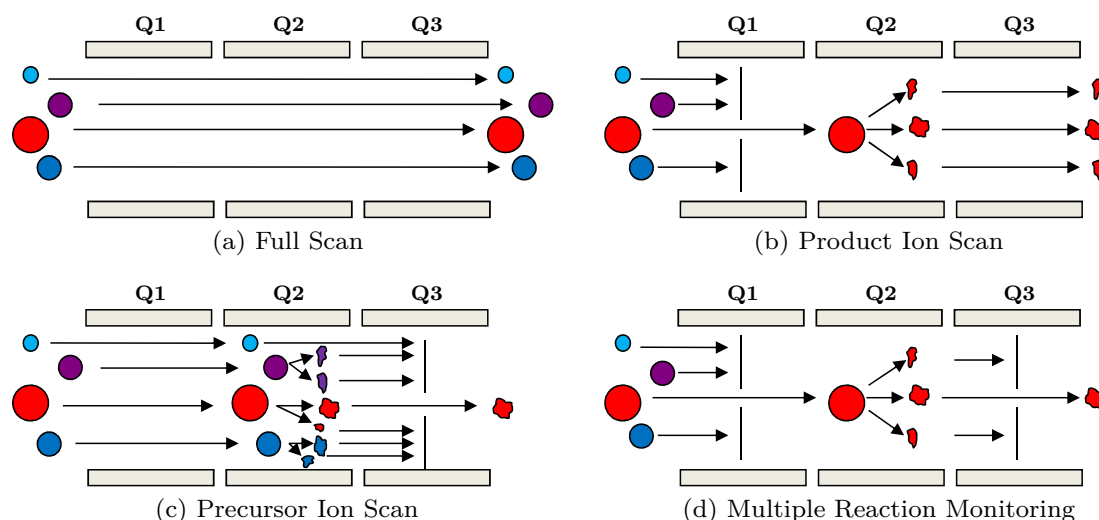


Abbildung 4.13: Verschiedene Messmodi eines Tandem-Massenspektrometers nach [280]. (a) Full Scan Modus: Analyse des gesamten Massenbereichs, (b) Product Ion Scan Modus: Analyse der Fragmente eines selektierten Ions, (c) Precursor Ion Scan Modus: Analyse eines Fragments ohne vorherige Selektion in Q1, (d) Multiple Reaction Monitoring (MRM) Modus: Analyse von charakteristischen Fragmentationen welche aus einem in Q1 selektierten Ion gebildet werden.

ponentiellen Anstieg der Elektronenzahl, indem jedes auftreffende Elektron mehrere Sekundärelektronen herausschlägt.

Beim Kanalelektronenvervielfacher (KEV) entsteht beim Auftreffen der Ionen sowie der entstehenden Sekundärelektronen auf die hochohmige Oberfläche des Detektors eine Kaskade an Elektronen, die leicht ausgelesen werden kann.

4.6.4 Festphasenmikroextraktion (engl. SPME)

Die Festphasenmikroextraktion (engl. solid phase micro extraction, SPME) ist eine einfache, effiziente sowie lösemittelfreie Methode zur Probenaufarbeitung, bei der die Analyten durch eine Ab- oder Adsorption an einer speziellen Faser aus der Probe extrahiert werden. Die Technik wurde von Pawliszyn [281] entwickelt und seither fortwährend weiterentwickelt. Eine umgebaute Hamilton-Spritze, in der eine Quarzglasfaser an die Spitze einer Mikrokanüle befestigt wurde, fand Verwendung als erster Probenhalter.

Heutzutage kommen SPME-Verfahren in den unterschiedlichsten Fachbereichen zum Einsatz. Neben der Analyse von Umweltgiften und Nahrungsmitteln kommt die SPME beispielsweise bei der Prozessüberwachung und zur klinischen Diagnostik zum Einsatz. In der forensischen Toxikologie findet die SPME Anwendung sowohl bei qualitativen Screeninguntersuchungen als auch bei der quantitativen Bestimmung von Drogen und Medikamenten, Pestiziden, Lösemitteln sowie weiteren Substanzen in Blut, Urin, Haaren und anderen Geweben. Aktuelle Entwicklungen betreffen die Entwicklung von Hochdurchsatzmethoden (> 1000 Proben pro Tag), in denen beispielsweise bis zu 96

Proben auf Multiwellplatten extrahiert werden können sowie die Weiterentwicklung der Probengeber, die den Einsatz von stabileren Metallfasern ermöglichen [282]

Bei einer Extraktion von semi-volatilen Substanzen aus einer wässrigen Lösung wird die Faser direkt in die Lösung getaucht (DI-SPME). Die schnellere und meist selektivere Extraktion in der Gasphase über der Probe (HS-SPME) wird für volatilere Analyten eingesetzt. Aus wässrigen Lösungen können auch Substanzen mit einem hohen Siedepunkt aufgrund ihrer schlechten Löslichkeit mit HS-SPME extrahiert werden. Die Faser ist an einem Stahlrohr befestigt und wird nach der Extraktion in eine umgebende Metallnadel zurückgezogen. Dies ermöglicht das Durchstechen der Septen von Probenvial und Injektor und schützt die Faser vor Beschädigungen und Kontaminationen aus der Umgebung. Abbildung 4.14 zeigt eine schematische Darstellung der verschiedenen Schritte der SPME.

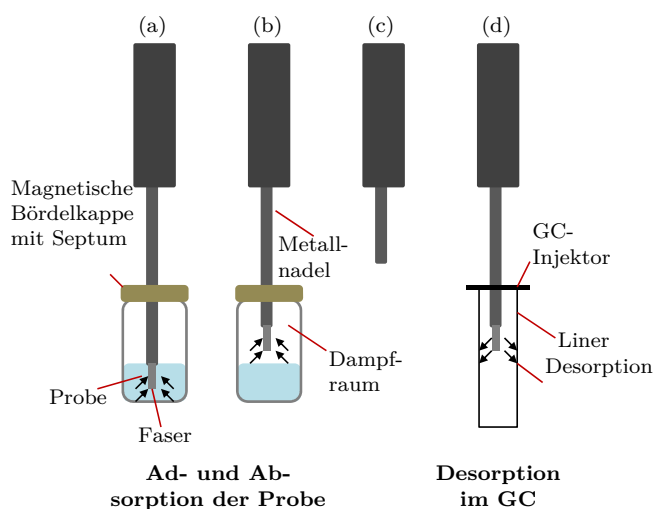


Abbildung 4.14: Prinzip des SPME-Verfahrens: Ad- bzw. Absorption direkt aus der Probe (a) bzw. aus dem Dampfraum (b), Überführung in den Injektor (c) sowie Desorption (d).

Während der Extraktion stellt sich ein Gleichgewicht zwischen den Analyten in der Probe und auf der Faser ein, so dass die von der Faser ad- oder absorbierte Menge über einen begrenzten Konzentrationsbereich proportional zu der Analytkonzentration in der Probe ist. Die Einstellung des Gleichgewichts kann zwischen einigen Minuten und mehreren Stunden dauern. Ein Schütteln der Probe sorgt für eine Beschleunigung der Gleichgewichtseinstellung. Wird die Faser vor Einstellung des Gleichgewichts aus der Probe entfernt, müssen die zeitlichen Abläufe genau eingehalten werden, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten.

Die Extraktionsausbeute ist abhängig von einer Vielzahl von Parametern, wie z. B. der Volatilität und Hydrophobie der Analyten, und liegt etwa zwischen 0,1 und 60%. Durch eine Kühlung der Faser kann eine höhere Extraktionsausbeute erreicht werden [283]. Kleine Mengen an organischen Lösemitteln wie z. B. Alkohole erniedrigen die Extraktionsausbeute, indem sie die Löslichkeit des Analyten in der wässrigen Phase erhöhen

und dadurch dessen Dampfdruck senken. Bei dem Vorliegen eines Mehrkomponentensystems konkurrieren zudem mehrere Substanzen um die aktiven Stellen auf der Faser. Sowohl die Konzentrationen der konkurrierenden Substanzen als auch deren Affinität zum Fasermaterial nehmen hierbei Einfluss. Wasser z. B. hat zwar nur eine sehr geringe Affinität, jedoch liegt dies meist in einer solch hohen Konzentration vor, dass es die Extraktion des Analyten erheblich beeinflusst.

Für eine hohe Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse müssen die Extraktions- und Desorptionsbedingungen sowie das Probenvolumen, der pH-Wert der Probe und die Ionenstärke konstant gehalten werden. Schwankungen des Salzgehalts können durch eine Sättigung der Probe mit Salz ausgeglichen werden.

Fasermaterial und Schichtdicke haben neben dem Probenvolumen sowie der Geometrie ebenfalls einen großen Einfluss auf die Extraktionskinetik. Während polare Fasern für den Nachweis von polaren Analyten eingesetzt werden, lassen sich apolare Substanzen mit apolaren Fasern nachweisen. Dickere Faserbeschichtungen erhöhen zwar die Wiederfindung, sorgen aber ähnlich wie niedrige Diffusionskoeffizienten der Analyten für eine Verlängerung der Extraktionszeit.

Die häufig verwendeten Quarzglasfasern haben einen Durchmesser zwischen 100 und 200 μm und werden von einer 7–100 μm dicken Polymerschicht umgeben. Durch die nichtbindenden und teilweise oder hochgradig vernetzten Polymere ist die Faser immobilisiert und stabil gegenüber organischen und wässrigen Lösemitteln. Für einen Großteil der Verfahren kann eine der kommerziell erhältlichen Fasern verwendet werden. In Ausnahmefällen ist es jedoch nötig auf Spezialanfertigungen zurückzugreifen, von denen einige in [284] vorgestellt werden. Die am meisten verwendeten Beschichtungen sind aus PDMS, eine hochviskose, gummiartige Flüssigkeit sowie aus Polyacrylat, eine kristalline Verbindung, die an der Desorptionstemperatur flüssig wird. Beide Beschichtungen absorbieren die Analyten, die abhängig von ihrem Diffusionskoeffizienten unterschiedlich weit in das Beschichtungsmaterial eindringen. Die Absorption ist ein kompetitiver Vorgang, bei dem Moleküle mit einer geringeren Affinität zum Beschichtungsmaterial von stärker bindenden verdrängt werden. Einen Überblick über die der Absorption zugrunde liegenden Theorie geben Pawliszyn et al. [285].

Mischbeschichtungen wie z. B. Carbowax-DVB, PDMS-Carboxen oder PDMS-DVB bestehen aus einem porösen Feststoff und adsorbieren die Analyten als Monoschicht an der Oberfläche der Faser. Aufgrund der begrenzten Oberfläche, an der die Adsorption stattfindet, kann es zu einer Absättigung der Faser kommen. Bei einer hohen Analytkonzentration oder einer starken Belastung durch Matrixbestandteile ist der lineare Zusammenhang zwischen der Analytkonzentration auf der Faser und in der Probe aufgehoben. In einer Arbeit von Gorecki et al. [286] werden Formeln zur Berechnung der Konzentration des adsorbierten Analyten auf der Faser unter Berücksichtigung Einfluss nehmender Parameter, wie z. B. des Probenvolumens oder der Konzentration konkurrierender Analyte, ausführlich hergeleitet und beispielhafte Ergebnisse graphisch dargestellt.

Für die weitere Analyse wird meist eine thermische Desorption im Injektor eines Gaschromatographen durchgeführt. Ein ungepackter Liner mit einem kleinen Innen-

durchmesser erhöht den linearen Gasfluss, verkürzt die Desorptionszeit und verhindert Peakverbreiterungen. Hohe Sensitivitäten werden bei diesem lösemittelfreien Verfahren durch eine Injektion im Splitless-Mode erreicht. Die optimale Desorptionstemperatur liegt beim Siedepunkt des am schlechtesten verdampfbaren Analyten. In der Praxis richtet sich die Desorptionstemperatur jedoch nach der Temperatur-Obergrenze der Faser. Eine Derivatisierung von polaren oder schwer verdampfbaren Analyten zur Verbesserung der Extraktionseffizienz und Detektion kann auch bei der Verwendung der SPME durchgeführt werden. Hierbei ist sowohl eine Derivatisierung des Analyten in der Probe als auch auf der Faser sowie im Injektor des GC möglich [287].

Für Substanzen, die mittels gaschromatographischen Verfahren nicht nachweisbar sind, eignet sich eine Kopplung mit einem HPLC-System [288]. Sowohl thermisch labile als auch Substanzen mit großen Molekülmassen und hohen Siedepunkten können hiermit analysiert werden. Die Durchführung und insbesondere die Desorption der Faser ist jedoch deutlich komplizierter als eine Kombination von SPME und GC-MS. Die Vielzahl von existierenden Desorptionsmethoden zeigt, dass kein Verfahren für alle Anwendungen geeignet ist. Die drei hauptsächlich zum Einsatz kommenden Verfahren sowie deren Vor- und Nachteile werden ausführlich in [288] beschrieben.

4.7 Validierung

Alle entwickelten analytischen Methoden wurden nach den Richtlinien der GTFCh validiert [289]. Eine Validierung dokumentiert die Eignung von Analyseverfahren für ihren Bestimmungszweck und ist eine Grundvoraussetzung für die Qualität und die Vergleichbarkeit der Ergebnisse. Überprüft werden: Selektivität, Linearität der Kalibration, analytische Grenzen, Präzision und Genauigkeit, Wiederfindungsrate und Extraktionsausbeute sowie bei LC-MS/MS-Methoden die Matrixeffekte. Im Folgenden werden alle Punkte kurz angesprochen und die dazugehörigen Messungen aufgeführt.

4.7.1 Selektivität

Selektivität ist gegeben, wenn verschiedene nebeneinander zu bestimmende Analyten ohne gegenseitige Störungen oder Störungen durch andere endogene oder exogene Substanzen eindeutig zu identifizieren sind. Untersucht werden müssen mindestens sechs Leerproben ohne IS und zwei Nullproben mit IS. Bei keiner der aufgearbeiteten Leerproben, die von unterschiedlichen Spendern stammen müssen, dürfen Interferenzen auftauchen, die den Nachweis der Analyten stören.

4.7.2 Linearität der Kalibration

Innerhalb des Kalibrationsbereichs muss der Quotient der Peakflächen von Analyt und IS direkt proportional zur Konzentration des Analyten in der Probe sein. Der Kalibrationsbereich sollte bestehende Grenzwerte umfassen und einen möglichst großen Anteil der in authentischen Proben zu erwartenden Konzentrationen abdecken. Mit mindestens fünf von Null verschiedenen, gleichmäßig über den Kalibrationsbereich verteilten Kalibratoren aufgestockte Leerproben müssen sechsfach analysiert werden. Es

dürfen maximal zwei Ausreißer vorliegen, die nicht auf dem gleichen Konzentrationsniveau liegen. Mittels F-Test wird die Varianzhomogenität zwischen höchster und niedrigster Konzentration bestimmt. Liegt diese über 99%, kann nach einem Linearitätstest nach Mandel (Signifikanz: 99%) eine einfache lineare Regression verwendet werden. Ist keine ausreichende Varianzhomogenität gegeben, muss ein gewichtetes Regressionsmodell angewandt werden.

4.7.3 Analytische Grenzen

Die Nachweisgrenze (engl. Limit of Detection, LOD), definiert als die niedrigste, qualitativ nachweisbare Konzentration des Analyten in der Probe sowie die Bestimmungsgrenze (engl. Limit of Quantification, LOQ), die die kleinste Konzentration angibt, bei der eine Quantifizierung des Analyten möglich ist, sind wichtige Faktoren für die Bewertung einer Methode. Diese können aus dem Signal-Rausch-Verhältnis oder nach DIN 32645 [290] mittels einer linearen Regression im unteren Konzentrationsbereich bestimmt werden. Hierfür werden Leerproben mit fünf gleichmäßig über den unteren Kalibrationsbereich verteilten Konzentrationen analysiert.

4.7.4 Präzision und Genauigkeit

Die Präzision beschreibt den Grad der Streuung von einzelnen Werten um den Mittelwert, ausgelöst durch zufällige Fehler. Der durch systematische und zufällige Fehler verursachte Abstand zwischen einzelnen Werten und dem Sollwert bestimmt die Genauigkeit einer Methode. Qualitätskontrollproben (QC-Proben) bei möglichst drei verschiedenen Konzentrationen (niedrig, mittel, hoch relativ zum Kalibrationsbereich) werden an mindestens acht verschiedenen Tagen jeweils zweifach aufgearbeitet und analysiert. Sowohl der systematische Fehler (Bias), berechnet aus der prozentualen Abweichung der Messwerte vom Sollwert, sowie die „Inter-Day“ und „Intra-Day“ Präzision, ausgedrückt durch die Standardabweichungen der Messergebnisse, dürfen nicht mehr als 15% betragen. In Bereich der Bestimmungsgrenze gelten 20% als akzeptabel.

4.7.5 Stabilität

Die Stabilität der Analyten in der Probe sowie im aufgearbeiteten Extrakt muss mindestens bis zum Abschluss der Analysen gewährleistet sein. Zur Bestimmung der Stabilität von aufgearbeiteten Proben müssen sechs aufgestockte Leerproben bei zwei Konzentrationen aufgearbeitet und in den folgenden Tagen mehrfach analysiert werden. Die absoluten Peakflächen dürfen bei Verwendung deuterierter Standards um maximal 25% abweichen. Die Stabilität eines Analyten in der Probe ist bei ordnungsgemäßer Lagerung methodenunabhängig, so dass bereits vorhandene Stabilitätsdaten aus der Literatur übernommen werden können. Liegen keine Daten vor, müssen die Einfrier-/Auftaustabilität sowie die Langzeitstabilität bestimmt werden. Für Ersteres müssen sechs QC-Proben dreimal für mindestens 1 h aufgetaut werden. Die gemittelte Konzentration der aufgetauten Proben darf nicht mehr als 10% vom Sollwert abweichen. Zur Bestimmung der Langzeitstabilität werden QC-Proben aliquotiert gelagert und über einen Zeitraum, der den üblichen Laborbedingungen entspricht, analysiert. Auch hier ist eine Abweichung von bis zu 10% akzeptabel.

4.7.6 Wiederfindungsrate und Extraktionsausbeute

Die Wiederfindung beschreibt den Transfer des Analyten von der Matrix in die zu vermessende Lösung. Sie wird bestimmt durch die Analyse von jeweils mindestens sechs Reinsubstanzlösungen und Extrakten bei hohen und niedrigen Konzentrationen oder bei mindestens sechs über den Messbereich verteilten Konzentrationen. Die Extraktionsausbeute ist definiert als Transfer des Analyten von der Matrix in den primären Extrakt. Sie wird berechnet aus der Bestimmung von jeweils mindestens sechs Extrakten bei hohen und niedrigen Konzentrationen oder von mindestens sechs über den Messbereich verteilten Kontrollkalibratoren, bei denen der Analyt vor bzw. nach der Extraktion in die Matrix und der IS immer erst nach der Extraktion in den primären Extrakt gegeben wird. Wiederfindungsraten bzw. Extraktionsausbeuten, berechnet aus dem Verhältnis der absoluten Peakflächen, sollten mindestens 50% betragen. Bei Verwendung des Regressionsverfahrens entspricht dies einem Verhältnis der Steigungen von 0,5.

4.7.7 Matrixeffekte und Wiederfindung (für LC-MS/MS)

Bei LC-MS/MS-Methoden müssen zusätzlich die Matrixeffekte nachgewiesen werden. Hierbei handelt es sich um eine Unterdrückung (Ion Suppression) oder eine Verstärkung (Ion Enhancement) des Messsignals durch coeluierende Substanzen [280]. Viele der anderen Validierungsparameter (LOD, LOQ, Linearität, Präzision) können durch ausgeprägte Matrixeffekte beeinflusst werden. Besonders bei Untersuchungen in hoch spezifischen Messmodi (z. B. MRM) können diese Effekte leicht übersehen werden.

Qualitativ können Matrixeffekte durch eine post-column Addition des Analyten bestimmt werden. Das konstante Signal wird durch coeluierende Substanzen aus der Säule beeinflusst. Eine quantitative Bestimmung der Matrixeffekte ist von Matuszewski et al. [291] entwickelt worden. Analysiert werden müssen jeweils bei hohen und niedrigen Konzentrationen: mindestens fünf Reinsubstanzlösungen, mindestens fünf aufgestockte Matrixproben aus unterschiedlichen Leermatrixquellen sowie mindestens fünf aufgestockte Leermatrixextrakte aus den gleichen Matrixquellen. Die Verhältnisse der Peakflächen der aufgestockten Matrixproben zu denen der entsprechenden aufgestockten Extrakte in Prozent (Wiederfindung) sowie das Verhältnis der Peakflächen der aufgestockten Extrakte zu denen der Reinsubstanzlösungen (Matrixeffekte) werden berechnet. Bei Verwendung eines deuterierten IS gelten Standardabweichungen von bis zu 25% als akzeptabel.

5 Material

5.1 Geräte

5.1.1 Großgeräte

Für die quantitative Bestimmung von EtG und EtS in Urin sowie von EtG in Haaren wurde eine HPLC-Anlage aus der LC-20A Prominence Serie (Shimadzu, Kyoto, Japan), gekoppelt an ein 4000 QTRAP Massenspektrometer (AB Sciex, Foster City, Kalifornien, USA), verwendet. Die Konzentrationen der FAEE wurden mit einer Kombination aus dem Gaschromatographen 6890 und dem massenselektiven Detektor 5973 der Firma Agilent (Santa Clara, Kalifornien, USA) bestimmt. Als Probengeber und für die SPME kam ein Combi PAL Autosampler (Chromtech GmbH, Idstein, Deutschland) zum Einsatz. Die immunchemische Bestimmung von EtG und Kreatinin in Urin wurde auf einem 912 Automatic Analyzer (Hitachi, Tokio, Japan) sowie einem AU 400 (Olympus, Tokio, Japan) durchgeführt.

5.1.2 Software

Die Durchführung der LC-MS/MS-Analysen, die Auswertung der Chromatogramme sowie die Quantifizierung der EtG- und EtS-Konzentrationen erfolgte mit der Software Analyst (Versionen 1.4 [292] und 1.5 [293]). Für die HS-SPMS/GC-MS-Untersuchungen sowie anschließende Auswertungen wurde die Software ChemStation [294] eingesetzt. Die Berechnung der Validierungsdaten wurde mit der Software Valistat (Versionen 1.0 und 2.0) durchgeführt [295].

5.1.3 Geräte zur Probenvorbereitung

Zum temperierten Schütteln der Haarproben während der Extraktion wurde der Thermomixer MHR 11 (HLC Biotech, Bovenden, Deutschland) eingesetzt. Für die automatisierte Zerkleinerung der Haare kam ein Fast Prep-24 Homogenisationssystem (MP Biomedicals, Santa Ana, Kalifornien, USA) zum Einsatz. Bis zu 24 Haarproben konnten mit dem verwendeten Quick Prep Adapter (24 x 2 mL) (ebenfalls MP Biomedicals) gleichzeitig zerkleinert werden. Für die Analysen benötigtes demineralisiertes (dem.) Wasser wurde mit einem Barnstead Nanopure Reinstwassersystem (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) hergestellt.

Des Weiteren kamen folgende Geräte zum Einsatz:

- Schüttler: Vortex Genie 2 (Scientific Industries, Bohemia, New York, USA)
- Heizblock: TCS-Metallblock Thermostat (Labor Technik Barkey, Leopoldshöhe, Deutschland)

- Zentrifuge 1: Mikro 20 (Hettich Zentrifugen, Mülheim a. d. R., Deutschland)
- Zentrifuge 2: Megafuge 1.0 (Heraeus, Hanau, Deutschland)
- Zentrifuge 3: Labofuge A (Heraeus, Hanau, Deutschland)
- Zentrifuge 4: Biofuge Stratos (Heraeus, Hanau, Deutschland)
- Feinwaage: AB 104-S/PH (Mettler-Toledo, Columbus, Ohio, USA)
- Ultraschallbad: Sonorex Super RK 510 (Bandelin, Berlin, Deutschland)
- pH-Meter: pH-Meter CG840 (Schott, Mainz, Deutschland)

5.2 Verbrauchsmaterialien

Die folgende Tabelle 5.1 bietet eine Übersicht über die genauen Bezeichnungen sowie die Hersteller der wichtigsten Verbrauchsmaterialien.

Tabelle 5.1: Zusammenfassung der Verbrauchsmaterialien mit einer genauen Bezeichnung sowie der Hersteller.

	Bezeichnung	Hersteller
Urin-Monovetten	Urin-Monovette 10 mL	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Schraubrohren	Mikroröhre 2,0 mL mit Verschluss	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Mahlkugeln	Mahlkugeln, rostfreier Stahl, 5 mm	Retsch (Haan, Deutschland)
Einmalspritzen	Omnifix-F, Feindosierungsspritzen 1 mL	Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland)
Spritzenfilter	ReZist, 13 mm, PTFE, 0,2 µm steril	Maidstone (Kent, UK)
Eppendorf Cups	Safe-Lock Tubes 2,0 mL	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
2 mL Vials	Injektionsflaschen 2,0 mL klar, 11 mm Rand	Wicom (Heppenheim, Deutschland)
Deckel	11 mm Alu-Crimp Kappen mit Teflon/Silikon Septum (1,0 mm)	Wicom (Heppenheim, Deutschland)
Einsatz	Mikro Insert aus Glas (200 µL Inhalt)	Wicom (Heppenheim, Deutschland)
4 mL Vials	Gewinde-Flasche G4 klar	CS Chromatographie (Langerwehe, Deutschland)
Deckel	Schraubkappe mit Dichtscheibe G13	CS Chromatographie (Langerwehe, Deutschland)
10 mL Vials	20 mm Rollrand-Vials 10 mL, klar	Wicom (Heppenheim, Deutschland)
Deckel	SS-Kappe R20-L/Sil	CS Chromatographie (Langerwehe, Deutschland)
Vorsäule	Schutzsäule C18 (4 x 2,0 mm)	Phenomenex (Torrance, Kalifornien, USA)
HPLC-Säule 1	Synergi Polar RP (250 x 2,0 mm, 4 µm)	Phenomenex (Torrance, Kalifornien, USA)
HPLC-Säule 2	Hypercarb (100 x 2,1 mm, 5 µm)	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
SPME-Faser	StableFlex SPME Faser 65 µm PDMS-DVB Beschichtung	Supelco (St. Louis, Missouri, USA)
Liner	SPME Injection Sleeve 0,75 mm ID	Supelco (St. Louis, Missouri, USA)
Septum (SPME)	Microseal Septum 310	Merlin Instruments (Half Moon Bay, CA, USA)
GC-Säule	HB-5MS (30 m x 0,250 mm, 0,25 µm)	Agilent (Santa Clara, Kalifornien, USA)

5.3 Chemikalien und Standardlösungen

5.3.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 5.2 unter Angabe der Reinheit und des Herstellers zusammengefasst. Die deuterierten FAEE wurden freundlicherweise von Dr. Volker Auwärter bereitgestellt.

Tabelle 5.2: Im Rahmen der Arbeit verwendete Chemikalien mit Angabe des Herstellers und des Reinheitsgrades.

	Reinheit	Hersteller
Acetonitril	für die HPLC	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ameisensäure	98 - 100%, zur Analyse	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Chloroform	für die HPLC	Merck (Darmstadt, Deutschland)
d ₅ -EtS (als Na-Salz)	≥ 99%	Lipomed (Arlesheim, Schweiz)
d ₅ -EtG	≥ 99%	Lipomed (Arlesheim, Schweiz)
Dichlormethan	für die HPLC	J.T. Baker (Deventer, Niederlande)
DMSO	> 99,5%	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
EtG	≥ 99%	Lipomed (Arlesheim, Schweiz)
Ethylmyristat	99% (GC)	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
Ethyloleat	98%	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
Ethylpalmitat	99%	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
Ethylstearat	≥ 99% (GC)	Fluka (St. Louis, Missouri, USA)
EtS (als Na-Salz)	≥ 99%	Lipomed (Arlesheim, Schweiz)
KH ₂ PO ₄	zur Analyse	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Methanol	für die HPLC	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	zur Analyse	Merck (Darmstadt, Deutschland)
NaOH	zur Analyse	Merck (Darmstadt, Deutschland)
n-Heptan	reinst	Merck (Darmstadt, Deutschland)

5.3.2 Standardlösungen EtG und EtS

Ethylglucuronid und Ethylsulfat sowie die deuterierten Verbindungen wurden in Methanol gelöst. Es wurden Reinsubstanzlösungen in folgenden Konzentrationen hergestellt: 1, 10 und 100 mg/L.

Für die Urinanalytik wurden EtG- und EtS-haltige Lösungen in folgenden Konzentrationen angesetzt: 0,05, 0,075, 0,1, 0,125, 0,15, 0,25, 0,5, 0,625, 1,25, 1,75, 2,5, 5, 6,25, 7,5, 10 mg/L. Für d₅-EtG und d₅-EtS wurden gemeinsame Stamm- und Arbeitslösungen mit Konzentrationen von 10,0 bzw. 2,5 mg/L angesetzt.

Für die Haaranalytik wurden methanolische EtG-Lösungen in folgenden Konzentrationen hergestellt: 0,01, 0,02, 0,05, 0,1, 0,2, 0,5, 1,0, 2,0 mg/L (Kalibration); 0,035, 0,175, 0,75 mg/L (QC-Proben). Als IS verwendete d₅-EtG-Lösungen wiesen Konzentrationen von 0,125 bzw. 0,5 mg/L auf.

5.3.3 Laufmittel für die LC-MS/MS

Die verwendete 0,1%ige Ameisensäure wurde durch eine entsprechende Verdünnung (1 mL auf 1 L) der konzentrierten Säure hergestellt. ACN wurde direkt als Reinsubstanz eingesetzt.

5.3.4 Standardlösungen FAEE

Reinsubstanzen der vier FAEE ((Ethylmyristat (C14), Ethylpalmitat (C16), Ethyloleat (Δ9-C18), Ethylstearat (C18)) sowie der fünffach deuterierten Analoga wurden einzeln in Chloroform gelöst. Es wurden Stammlösungen in folgenden Konzentrationen hergestellt: C14: 1,366 g/L, d₅-C14: 1,522 g/L, C16: 1,919 g/L, d₅-C16: 1,400 g/L, Δ9-C18: 2,259 g/L, C18: 2,341 g/L, d₅-C18: 1,090 g/L. Verdünnte Lösungen aus den vier FAEEs bzw. aus

den drei deuterierten Verbindungen wurden jeweils mit Konzentrationen von 10 und 100 mg/L angesetzt. Für die Kalibration und für QC-Proben wurden Lösungen in zehn verschiedenen Konzentrationen hergestellt: 0,03, 0,06, 0,075, 0,12, 0,15, 0,24, 0,45, 0,9, 1,5 und 1,8 ng/mg. Die Arbeitslösung mit den IS hatte eine Konzentration von 0,5 mg/L.

5.3.5 Phosphatpuffer nach Sørensen (pH 7,6)

3,52 g Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) und 9,1 g Dinatriumhydrogenphosphat x 2 Wasser ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$) wurden in 1 L demineralisiertem Wasser gelöst. Durch Zugabe von NaOH-Lösung (1 mol/L) wurde der Puffer mit Hilfe eines pH-Meters auf pH 7,6 eingestellt.

5.4 Probengewinnung und Asservierung

Die Probengewinnung erfolgte sowohl direkt im Institut als auch auswärtig von hierfür autorisierten Personen.

5.4.1 Urinproben

Extern gesammelte Urinproben wurden bei Ankunft im Institut registriert und schnellst möglichst tiefgekühlt. Im Institut abgegebene Urine sowie im Rahmen der Trinkversuche außerhalb des Institutes gesammelte Proben wurden in Urin-Monovetten gefüllt und dann tiefgefroren. Alle Urinproben wurden bis zur Analyse und danach bei -20°C gelagert. Bei einem bestehenden Täuschungsverdacht bestand die Möglichkeit einer Kontrolle der Urintemperatur bzw. der Kreatininkonzentration. Zur Methodenentwicklung, Validierung, Kalibration und Qualitätskontrolle verwendete Leerurine wurden von Personen aus dem Umfeld des Institutes gesammelt, die in den vorangegangenen sieben Tagen auf Alkohol und alkoholhaltige Produkte verzichtet hatten.

5.4.2 Haarproben

Extern abgenommene Haarproben wurden beim Eingang im Institut registriert und auf eine ordnungsgemäße Verpackung überprüft. Im Institut abgenommene Haarproben wurden als Strähnen auf einem Blatt Papier fixiert, die Wuchsrichtung eindeutig gekennzeichnet und in einem Briefumschlag verpackt. Alle Haarproben wurden bei Raumtemperatur vor Licht und Feuchtigkeit geschützt gelagert. Die verwendeten Leerhaare stammen von alkoholabstinenten Personen und Kindern aus dem Umfeld des Institutes.

6 Methoden - Entwicklung und Validierung

6.1 Bestimmung von EtG und Kreatinin in Urin mittels ELISA

Immunchemische Untersuchungen lassen eine Unterscheidung zwischen positiven und negativen Proben sowie eine erste semiquantitative Abschätzung der EtG-Konzentrationen zu. Eine vergleichende Analyse von 171 Urinproben mit bekannten EtG-Konzentrationen (LC-MS/MS) aus Trinkversuchen sowie von Patienten zu Beginn eines Entzuges soll zeigen, ob der im Labor angewandte Immunoassay (Olympus AU 400) die Anforderungen erfüllt. Hierfür wurden ausschließlich Urinproben mit EtG-Konzentrationen im Bereich des Grenzwertes für Abstinenzuntersuchungen ($c_{\text{EtG}} = 0,1 \text{ mg/L}$) ausgewählt.

6.1.1 Aufarbeitung der Proben

Für die immunchemische Bestimmung von EtG ist keine Aufarbeitung der Urinproben notwendig. Zur Homogenisierung wurden die Proben gevortext und danach für 10 min bei $2415 \times g$ zentrifugiert.

6.1.2 Ergebnisse der vergleichende Analysen

100 der 171 untersuchten Proben wurden im Vorfeld negativ ($c_{\text{EtG}} < 0,1 \text{ mg/L}$) getestet. Bei den übrigen 71 Urinen wurden mittels LC-MS/MS EtG-Konzentrationen zwischen $0,1$ und $0,7 \text{ mg/L}$ ermittelt. In $93,6\%$ der Fälle konnten mit dem Immunoassay übereinstimmende Ergebnisse gefunden werden. Abbildung 6.1 zeigt die Verteilung der Ergebnisse als Vierfeldertafel. Mittels einer ROC-Analyse wurde ein Grenzwert für den Immunoassay von $0,08 \text{ mg/L}$ als optimaler Kompromiss von Sensitivität ($98,6\%$) und Spezifität ($90,0\%$) gefunden (AUC: $0,984$). Lediglich ein falsch negatives sowie zehn falsch positive Ergebnisse wurden hiermit festgestellt. Es wurden positive und negative Vorhersagewerte von $0,875$ bzw. $0,989$ und ein Youden-Index von $0,886$ berechnet. Eine Senkung des Grenzwertes auf $0,07 \text{ mg/L}$ führte zwar zu einer Sensitivität von 100% , jedoch auch zu einer Senkung der Spezifität auf 84% .

Zur Bestimmung, ob der immunchemische Test auch für eine semiquantitative Bestimmung von EtG geeignet ist, wurden die Ergebnisse der LC-MS/MS- und ELISA-Untersuchungen gegeneinander aufgetragen (siehe Abbildung 6.2). Nach dem Ausschluss von zwei Ausreißern (\diamond) konnte ein linearer Zusammenhang mit einem zufriedenstellenden Bestimmtheitsmaß von $0,76$ gefunden werden.

6.1.3 Diskussion

Die durchgeführten Untersuchungen konnten zeigen, dass der eingesetzte Immunoassay für hinweisgebende Bestimmungen von EtG-Konzentrationen in Urin geeignet ist. Durch die Wahl eines ELISA-Grenzwertes von $0,08 \text{ mg/L}$ wurde lediglich eine Urinprobe falsch

		ELISA	
		[mg/L] < 0,08	[mg/L] ≥ 0,08
LC-MS/MS	< 0,1	90 (52,6%)	10 (5,8%)
	≥ 0,1	1 (0,6%)	70 (40,9%)

Abbildung 6.1: Vierfeldertafel für den Vergleich von EtG-Konzentrationen in Urin, ermittelt mittels LC-MS/MS (Grenzwert: 0,1 mg/L) und ELISA (Grenzwert: 0,08 mg/L).

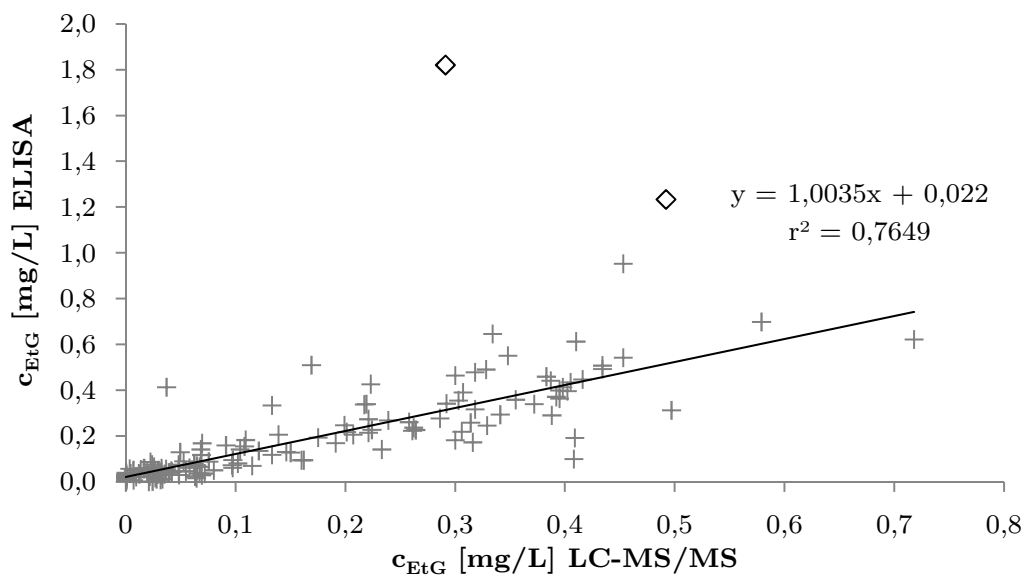


Abbildung 6.2: Mittels ELISA ermittelte EtG-Konzentrationen aufgetragen gegen die LC-MS/MS-Ergebnisse. Die beiden als Ausreißer markierten Werte (◊) wurden bei der linearen Regression nicht beachtet.

negativ bewertet. Eine hohe Sensitivität des Immunoassays ist von besonderer Bedeutung, um falsch negative Befunde, die nicht mehr revidiert werden können, auszuschließen. Eine gute Selektivität vermindert zudem die Zahl der „überflüssigen“ LC-MS/MS Analysen. Zehn zusätzlich durchgeführte LC-MS/MS-Analysen aufgrund falsch positiver Befunde sind dabei tolerierbar. Durch einen Einsatz des Immunoassays kann die Anzahl von zeitaufwendigen und kostenintensiven LC-MS/MS-Analysen deutlich verringert werden, da Bestätigungsanalysen zur Quantifizierung der EtG-Konzentrationen nur bei positiv bewerteten Proben durchgeführt werden müssen.

Die ermittelte Sensitivität (98,6%) und Spezifität (90,0%) liegt in dem Bereich, den auch vorherige Studien unter Verwendung des gleichen Immunoassays erhalten haben. Unter Verwendung eines Grenzwertes von 0,5 mg/L für beide Verfahren wurden dort Sensitivitäten und Spezifitäten von 98,7% und 98,0% [141] bzw. 87,3% und 100% [146] sowie eine Übereinstimmung in 90% [140] bzw. 98,3% [141] der Fälle gefunden. Turfus et al. [146] erhielten auch für einen Grenzwert von 0,1 mg/L gute Ergebnisse (Sensitivität: 83,3%, Spezifität: 100%) und ermittelten einen Grenzwert für den Immunoassay von 0,092 mg/L als optimalen Kompromiss zwischen Sensitivität und Spezifität. Bei dem im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Kollektiv würde dieser Grenzwert zu drei zusätzlich falsch negativ bewerteten Proben führen. Für die zusätzlich berechneten Vorhersagewerte sowie für den Youden-Index wurden ebenfalls gute Ergebnisse $> 0,875$ erzielt.

Die ermittelte Korrelation zwischen ELISA- und LC-MS/MS-Ergebnissen ($r^2 = 0,76$) ist schlechter, als sie in vorherigen Veröffentlichungen angegeben wurde ($r^2 = 0,994$ [140], $r^2 = 0,931$ [141], $r^2 = 0,9906$ [145], $r^2 = 0,996$ [146]). Erklärt werden kann dies durch die eingeschränkte Auswahl von Proben im unteren Konzentrationsbereich (0–0,7 mg/L) sowie die große Zahl von Proben ($n = 100$) mit EtG-Konzentrationen $< 0,1$ mg/L. Hinweise auf einen entscheidenden Einfluss von Kreuzreaktionen konnten, wie auch in den früheren Studien [140, 141], nicht gefunden werden.

6.2 Bestimmung von EtG und EtS in Urin mittels LC-MS/MS

Zur Quantifizierung von EtG und EtS wurde ein LC-MS/MS Verfahren entwickelt und validiert. Ziel war es, ein möglichst einfaches und schnelles Verfahren zu entwickeln, das trotzdem verlässlich und hoch sensitiv ist. Die Aufarbeitung der Proben wurde auf eine Fällung mit Methanol beschränkt. Zur Minimierung der Matrixeffekte wurden die Urine vor der Messung stark verdünnt.

6.2.1 Aufarbeitung der Proben

100 μ L Urin wurden in einem 2,0 mL Eppendorf-Cup mit 20 μ L IS (d_5 -EtG und d_5 -EtS je 2,5 μ g/mL) und 280 μ L Methanol versetzt. Die Proben wurden kurz gevortext und für 10 min bei 30.230 x g zentrifugiert. 300 μ L des Überstandes wurden in ein 2,0 mL Glasvial überführt und bei 40°C im Stickstoffstrom eingedampft. Der Rückstand wurde in 600 μ L Ameisensäure (0,1%) gelöst und 10 μ L in die HPLC injiziert. Bei Kalibrationsproben wurden zusätzlich 20 μ L der entsprechenden Standardlösung hinzugegeben und nur 260 μ L Methanol.

6.2.2 LC-MS/MS-Methode

Für die chromatographische Trennung wurde die Ether-verknüpfte Phenyl-Umkehrphase Synergi Polar-RP (250 x 2 mm, 4 µm; Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) mit einer Schutzsäule des gleichen Herstellers (ODS Octadecyl 4 mm x 2 mm) eingesetzt. Die Trennung wurde bei 40°C mit einem konstanten Fluss von 0,2 mL/min mit Ameisensäure (0,1%) (A) und ACN (B) als Laufmittel durchgeführt. Folgender Gradient kam zum Einsatz: 100% A für 6 min, auf 100% B in 1 min, halten für 2 min, zurück zu 100% A in 1 min, halten für 4 min. Zur Steigerung der Ionisationsrate wurde ACN (0,1 mL/min) über ein T-Stück post-column hinzugegeben.

Die Ionisation der Analyten erfolgte mittels ESI. Mit Hilfe des automatisierten Tuning-Programms der verwendeten Software Analyst wurden für EtG und EtS sowie für die deuterierten Verbindungen charakteristische Ionenübergänge gesucht und die verschiedenen Temperatur- und Spannungseinstellungen optimiert: Spannung der Ionenquelle: -4500 V, Temperatur der Ionenquelle: 450°C, Gas 1 (N₂): 60 psi, Gas 2 (N₂): 50 psi. Die für die massenselektive Detektion im negativen MRM-Mode ausgewählten Ionenübergänge sind in Tabelle 6.1 zusammengefasst. Die zur eindeutigen Identifizierung der Analyten nötigen relativen Peakflächen sind: 221/75:221/85:221/113 → 100:100:60 für EtG und 125/97:125/80:125/64 → 100:30:1 für EtS.

Tabelle 6.1: Ausgewählte Ionenübergänge für den Nachweis von EtG und EtS sowie der deuterierten Verbindungen im MRM-Mode.

	Quantifier	Qualifier 1	Qualifier 2
EtG	221/75	221/85	221/113
d₅-EtG	226/85	226/75	-
EtS	125/97	125/80	125/64
d₅-EtS	130/98	130/80	-

6.2.3 Validierung des Verfahrens

Selektivität

Fünf Leerurine von verschiedenen abstinenten Personen und fünf Nullproben (Leerurin + IS) wurden negativ auf EtG und EtS getestet. In keiner dieser Proben tauchten Störsignale im Retentionszeitfenster von EtG und EtS auf. Abbildung 6.3 zeigt die MRM-Chromatogramme für EtG (A) und EtS (B) von einer Leerprobe (1), einem aufgestockten Leerurin (je 0,1 mg/L) (2) und einer authentischen Urinprobe ($c_{\text{EtG}} = 0,054 \text{ mg/L}$, $c_{\text{EtS}} = 0,028 \text{ mg/L}$) (3).

Kalibration sowie Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Für die Kalibration wurden mit EtG und EtS aufgestockte Leerurine in sieben Konzentrationen (0,025, 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 1,0 und 2,0 mg/L) sechsfach aufgearbeitet und analysiert. Für beide Analyte wurde ein linearer Zusammenhang zwischen dem Quotienten aus den Peakflächen des Analyten und des IS sowie der Analytkonzentration über den gesamten Konzentrationsbereich festgestellt. Mittels Regressionsanalyse wurden folgende Geradengleichungen ermittelt: EtG: $y = 2,98 \cdot 10^{-3} x + 1,14 \cdot 10^{-2}$ ($r^2 = 0,9989$) und

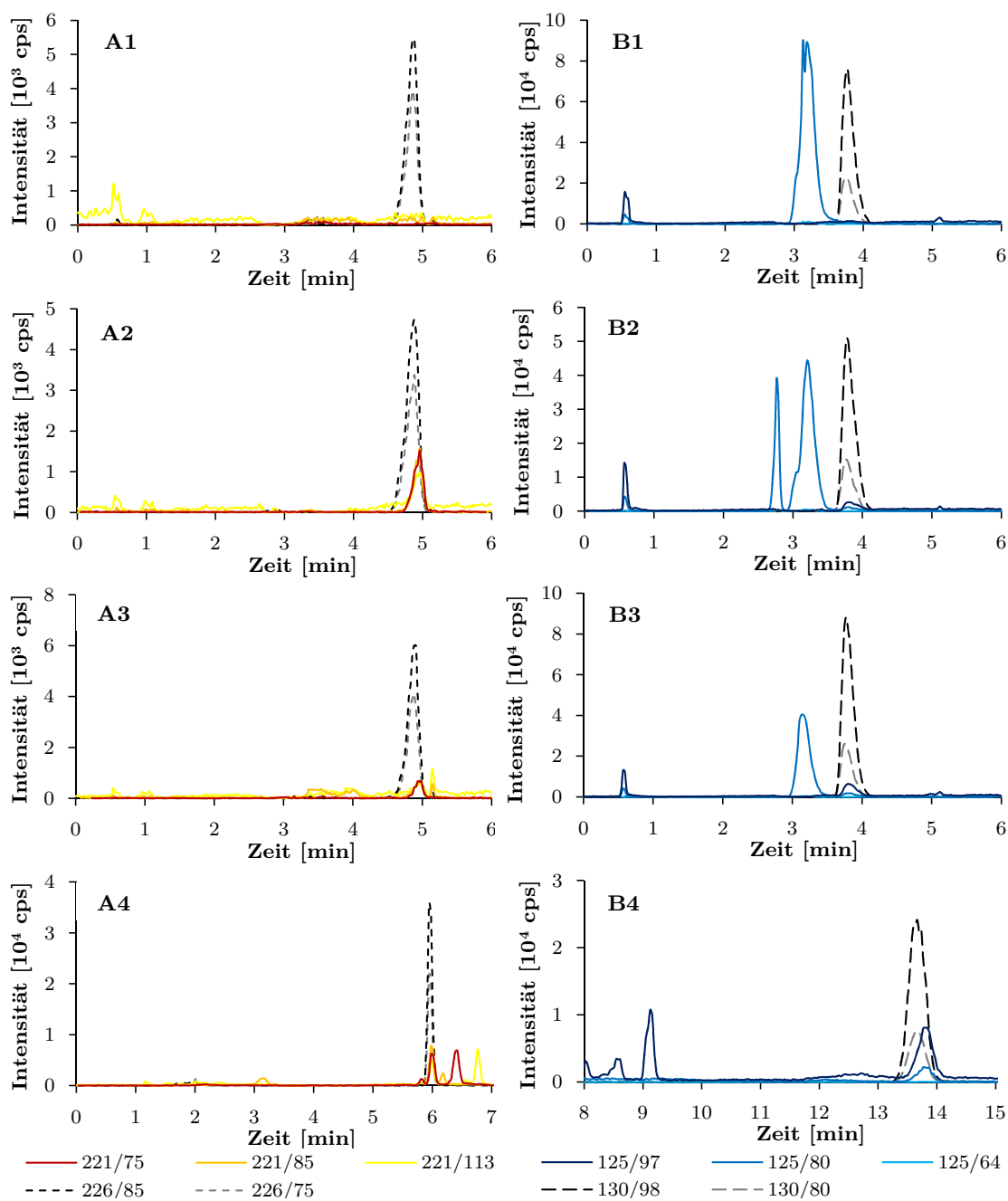


Abbildung 6.3: MRM-Chromatogramme für EtG (A) und EtS (B) von einer Leerprobe (1), einem aufgestockten Leerurin (je 0,1 mg/L) (2) und einer authentischen Urinprobe ($c_{EtG} = 0,054$ mg/L, $c_{EtS} = 0,028$ mg/L) (3), untersucht mit der validierten LC-MS/MS-Methode sowie einem aufgestockten Leerurin (je 0,1 mg/L), analysiert mit der in Abschnitt 6.2.5 vorgestellten Alternativmethode (4).

EtS: $y = 1,44 \cdot 10^{-3} x + 9,71 \cdot 10^{-3}$ ($r^2 = 0,9982$). Zur Bestimmung der LODs und LOQs wurde eine Extra-Kalibration im niedrigen Konzentrationsbereich mit äquidistanten Abständen (0,010, 0,015, 0,020, 0,025 und 0,030 mg/L) durchgeführt. In Anlehnung an die Deutsche Industrienorm DIN 32645 [290] wurden folgende Konzentrationen ermittelt: EtG: 0,005 mg/L (LOD) und 0,019 mg/L (LOQ), EtS: 0,005 mg/L (LOD) und 0,015 mg/L (LOQ).

Präzision und Genauigkeit

Für die Bestimmung der Präzision und Genauigkeit der Methode wurden Konzentrationslevel gewählt (niedrig 0,1 mg/L, mittel 0,35 mg/L und hoch 1,5 mg/L), die im Bereich der geltenden Grenzwerte liegen und den gesamten Kalibrationsbereich abdecken. Über einen Zeitraum von acht Tagen wurden täglich zwei Proben jedes Levels aufgearbeitet und analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6.2 zu finden.

Tabelle 6.2: Ermittelte Daten für die Genauigkeit sowie Intra- und Inter-Day Präzision für den Nachweis von EtG und EtS in Urin.

	Sollkonz. c [mg/L]	EtG			EtS		
		Niedrig 0,1	Mittel 0,35	Hoch 1,5	Niedrig 0,1	Mittel 0,35	Hoch 1,5
Kenndaten	MW	0,093	0,383	1,567	0,101	0,359	1,552
	SD	0,004	0,014	0,058	0,007	0,010	0,054
	RSD [%]	4,61	3,57	3,70	7,14	2,79	3,48
Genauigkeit	Varianz	-0,007	0,033	0,067	0,001	0,009	0,052
	Bias [%]	-7,13	9,51	4,44	0,93	2,68	3,44
Intra-Day	SD	0,004	0,014	0,035	0,003	0,009	0,029
Präzision	RSD [%]	4,5	3,78	2,26	3,15	2,42	1,84
Inter-Day	SD	0,004	0,014	0,060	0,007	0,010	0,055
Präzision	RSD [%]	4,61	3,78	3,80	7,31	2,81	3,55

RSD: relative Standardabweichung, SD: Standardabweichung

Extraktionsausbeuten und Matrixeffekte

Extraktionsausbeuten und Matrixeffekte wurden nach Matuszewski et al. [291] bei zwei unterschiedlichen Konzentrationen (niedrig 0,1 mg/L und hoch 1,5 mg/L) durchgeführt. Alle Ergebnisse sind in Tabelle 6.3 zu finden.

Tabelle 6.3: Bestimmte Extraktionsausbeuten und Matrixeffekte bei niedrigen (0,1 mg/L) und hohen (1,5 mg/L) EtG- und EtS-Konzentrationen in %.

c [mg/L]	Extraktionsausbeute		Matrixeffekte	
	0,1	1,5	0,1	1,5
EtG	95%	93%	79%	69%
d ₅ -EtG	93%	92%	69%	68%
EtS	98%	92%	104%	94%
d ₅ -EtS	98%	92%	98%	95%

Stabilität von aufgearbeiteten Proben

Zur Bestimmung der Stabilität von aufgearbeiteten Proben wurden aufgestockte Leerurine bei zwei unterschiedlichen EtG- und EtS-Konzentrationen (0,1 und 1,5 mg/L) aufgearbeitet und direkt nach der Aufarbeitung sowie nach zwei und sieben Tagen bei 10°C im Autosampler analysiert. Die Abnahme der relativen Peakflächen im Vergleich zu Tag Null betrug für beide Analyten weniger als 14 % (siehe Tabelle 6.4).

Tabelle 6.4: Prozentuale Abweichungen der EtG-/EtS-Konzentrationen (0,1, 0,5 und 1,5 mg/L) nach drei- bzw. siebentägiger Lagerung im Autosampler bei 10°C.

c [mg/L]	EtG			EtS		
	Tag 0	Tag 3	Tag 7	Tag 0	Tag 3	Tag 7
0,1	100%	101%	91%	100%	97%	91%
0,5	100%	101%	87%	100%	94%	86%
1,5	100%	101%	88%	100%	95%	87%

Langzeitstabilität sowie Frier-/Tau-Stabilität

Zur Bestimmung der Langzeitstabilität und der Frier-/Tau-Stabilität wurde mit drei unterschiedlichen Konzentrationen (0,1, 0,5 und 1,5 mg/L) aufgestocktes Leerurin in 100 µL Aliquote aufgeteilt und bei -20°C tiefgefroren. Jeweils sechs Proben jeder Konzentration wurden direkt, nach zwei Monaten und nach einem halben Jahr aufgearbeitet und analysiert. Drei Frier-/Tau-Zyklen wurden durch ein Auftauen von sechs Proben jeder Konzentration für mindestens 5 h bei Raumtemperatur simuliert. Die prozentualen Abweichungen der EtG- und EtS-Konzentrationen relativ zum Zeitpunkt Null lagen innerhalb der von der GTFCh geforderten 25% (siehe Tabelle 6.5).

Tabelle 6.5: Ergebnisse der Untersuchungen zur Stabilität von EtG und EtS in Urin bei drei verschiedenen Konzentrationen (0,1, 0,5 und 1,5 mg/L) nach einer zwei- bzw. sechsmonatigen Lagerung bei -20°C sowie nach drei Auftauzyklen.

c [mg/L]	EtG			EtS		
	0,1	0,5	1,5	0,1	0,5	1,5
2 Monate	91%	88%	85%	82%	91%	92%
6 Monate	85%	93%	95%	92%	91%	98%
Frier/Tau	85%	88%	87%	74%	91%	93%

6.2.4 Ergebnisse der Ringversuche (GTFCh)

Seit Anfang 2009 nimmt das Institut für Rechtsmedizin Bonn regelmäßig an dem von der GTFCh organisierten Ringversuch „Ethylglucuronid in Serum und Urin“ teil. Dreimal im Jahr werden lyophilisierte Serum- und Urinproben mit zugesetztem EtG und EtS in unbekannter Konzentration zur Analyse versandt. Die ermittelten Konzentrationen der rekonstituierten Proben müssen innerhalb von vier Wochen gemeldet werden. Der Sollwert wird aus dem ausreißerfreien Mittelwert der Ergebnisse der Teilnehmer berechnet (Ausreißertest nach Grubbs, $\alpha = 5\%$). Akzeptiert werden alle Konzentrationen, die innerhalb der zweifachen Standardabweichung nach Horwitz liegen. Bisher wurden alle

Ringversuche mit einer maximalen Abweichung vom Sollwert von 12,2% für EtG und 13,6% für EtS bestanden. Obwohl keine separaten Kalibrationen durchgeführt wurden, konnten auch für die Serumproben gute Ergebnisse erreicht werden. Alle Ergebnisse, Sollwerte sowie Abweichungen sind in Tabelle 6.6 zu finden.

Tabelle 6.6: Bisher eingereichte Ergebnisse, Sollwerte, akzeptierte Bereiche sowie ermittelte Abweichungen des Ringversuchs „Ethylglucuronid in Serum und Urin“.

Urin	EtG				EtS			
	Sollwert [mg/L]	Bereich [mg/L]	Messwert [mg/L]	Abw. [%]	Sollwert [mg/L]	Bereich [mg/L]	Messwert [mg/L]	Abw. [%]
1/09	0,770	0,51 - 1,03	0,790	2,6	0,580	0,38 - 0,78	0,520	-10,3
2/09	3,020	2,200 - 3,840	2,880	-4,6	1,750	1,230 - 2,270	1,540	-12,0
3/09	1,760	1,240 - 2,280	1,920	9,1	1,180	0,820 - 1,540	1,120	-5,1
1/10	0,878	0,592 - 1,164	0,920	4,8	0,920	0,620 - 1,220	0,900	-2,2
2/10	1,980	1,400 - 2,560	2,010	1,5	1,250	0,870 - 1,630	1,180	-5,6
3/10	1,270	0,870 - 1,670	1,210	-4,7	0,810	0,550 - 1,070	0,700	-13,6
1/11	0,820	0,540 - 1,100	0,920	12,2	1,120	0,760 - 1,480	1,020	-8,9
1/11	1,120	0,760 - 1,480	1,210	8,0	1,210	0,830 - 1,590	1,220	0,8
1/11	1,450	1,010 - 1,890	1,440	-0,7	0,885	0,595 - 1,175	0,812	-8,2

Serum	EtG				EtS			
	Sollwert [mg/L]	Bereich [mg/L]	Messwert [mg/L]	Abw. [%]	Sollwert [mg/L]	Bereich [mg/L]	Messwert [mg/L]	Abw. [%]
1/09	1,380	0,96 - 1,80	1,300	-5,8	1,620	1,14 - 2,10	1,350	-16,7
2/09	0,840	0,560 - 1,120	0,850	1,2	0,970	0,650 - 1,290	0,950	-2,1
3/09	2,420	1,740 - 3,100	2,500	3,3	1,480	1,040 - 1,920	1,400	-5,4
1/10	1,100	0,760 - 1,440	1,100	0,0	1,210	0,830 - 1,590	1,240	2,5
2/10	1,620	1,140 - 2,100	1,500	-7,4	1,440	1,000 - 1,800	1,210	-16,0
3/10	0,640	0,420 - 0,860	0,680	6,3	0,910	0,610 - 1,210	0,810	-11,0
1/11	1,360	0,940 - 1,780	1,350	-0,7	0,820	0,540 - 1,100	0,680	-17,1
2/11	0,550	0,350 - 0,750	0,640	16,4	0,950	0,650 - 1,250	0,920	-3,2
3/11	1,043	0,711 - 1,375	1,150	10,3	0,651	0,427 - 0,875	0,610	-6,3

Abw.: Abweichung des Messwerts vom Sollwert, Bereich: akzeptierter Bereich

6.2.5 Alternative Messmethode

In einigen besonders trüben Urinen kam es zu Überlagerungen des EtG-Signales, verursacht durch unbekannte Inhaltsstoffe des Urins. Um auch in solchen Fällen ein eindeutiges Ergebnis zu erhalten, wurde ein zweites Verfahren mit veränderten chromatographischen Bedingungen entwickelt. Die Probenaufarbeitung war bei beiden Verfahren identisch, so dass einmal aufgearbeitete Proben mehrfach vermessen werden konnten. Auch die Einstellungen des Tandem-Massenspektrometers wurden nicht verändert. Als Trennsäule wurde eine reine Graphitphase (Hypercarb 100 x 4,6 mm, 5 µm; Thermo Scientific) eingesetzt. Die verwendeten Laufmittel, Ameisensäure (0,1%) und ACN sowie eine post-column Zugabe von ACN konnten beibehalten werden (siehe Abschnitt 6.2.2). Der Laufmittelgradient wurde folgendermaßen auf die neue Säule angepasst: 95% A für 1 min, auf 30% B in 6 min, auf 95% B in 1 min, halten für 2 min, zurück zu 95% A in 1 min, halten für 9 min. EtS wurde sehr stark von der verwendeten Graphitphase zurückgehalten. Um eine Elution innerhalb eines angemessenen Zeitfensters (< 20 min) zu erreichen, wurde der Laufmittelfluß nach 12 min für 4 min von 0,2 mL/min auf 0,4 mL/min angehoben.

Dadurch wurde erreicht, dass der EtS-Peak mit einer Retentionszeit von 14 min eluiert. Die alternative Methode für die Urinanalyse wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht validiert. Bei allen bisherigen Ringversuchen wurden bei Doppelbestimmungen mit beiden Methoden Ergebnisse im Bereich der akzeptierten Werte erhalten. Ein MRM-Chromatogramm von einem aufgestockten Leerurin mit je 0,1 mg/L EtG (A4) und EtS (B4) ist in Abbildung 6.3 dargestellt.

6.2.6 Diskussion

Eine einfache, schnelle und sensitive Methode zum Nachweis von EtG und EtS konnte optimiert und nach den Richtlinien der GTFCh [289] validiert werden. Trotz der einfachen und unselektiven Probenaufarbeitung konnten sehr niedrige LODs und LOQs von 0,005 mg/L bzw. 0,019 mg/L für EtG und 0,004 mg/L bzw. 0,015 mg/L für EtS erreicht werden. Während bei anderen Methoden z. T. eine SPE zur weiteren Aufreinigung der Proben nötig war (siehe Tabelle 4.1 in Abschnitt 4.3.3), um eine ausreichende Sensitivität und Selektivität zu erreichen (z. B. [124]), konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine einfache Proteinfällung in Kombination mit einer starken Verdünnung des Urins (1:8) und einem hochsensitiven Tandem-Massenspektrometer ausreichend für einen Nachweis von EtG und EtS in sehr niedrigen Konzentrationen ist.

Bei einer Reihe von Methoden wurden trotzdem LODs und LOQs von $\geq 0,1$ mg/L ermittelt. Dieser Wert entspricht zwar dem aktuellen Grenzwert aus den *Beurteilungskriterien – zur – Urteilsbildung in der Medizinisch-Psychologischen Fahreignungsdiagnostik* [4], jedoch können Probleme bei stark verdünnten Urinproben auftreten. Wie auf Seite 27 und [149, 164] beschrieben, sind die EtG- und EtS-Konzentrationen im Urin abhängig von der Verdünnung des Urins und sollten daher auf eine Kreatininkonzentration von 100 mg/dL normiert werden. Kreatininkonzentrationen von ≥ 20 mg/dL liegen im Normbereich, so dass in Extremfällen EtG-Konzentrationen von 0,02 mg/L als positiv zu bewerten sind und daher mit einer ausreichenden Präzision und Genauigkeit nachgewiesen werden müssen. Die entwickelte Methode mit einem LOQ für EtG von 0,019 mg/L erfüllt dieses Kriterium.

Auch die Genauigkeit und Präzision der Methode waren mit maximalen Abweichungen vom Sollwert von 10% sowie einer Intra- und Inter-Day Präzision mit Abweichungen von maximal 5% sehr hoch. Die Stabilitätstests konnten zeigen, dass EtG und EtS bei einer ordnungsgemäßen Lagerung sowohl im Urin als auch in aufgearbeiteten Proben ausreichend stabil waren.

Während die gefundenen Extraktionsausbeuten $> 90\%$ lagen, wurden hohe Matrixeffekte von bis zu 31% gefunden. Eine Vielzahl von endogenen und exogenen Substanzen werden zu Glucuroniden oder Sulfaten metabolisiert, die aufgrund ihrer zum Teil ähnlichen Eigenschaften mit EtG und EtS coeluiieren könnten [127] und auch durch eine SPE nicht abgetrennt werden können. Ausgeglichen wurden die Matrixeffekte durch den Einsatz der deuterierten Verbindungen als IS, die im gleichen Maße von der Ionensuppression betroffen sind (siehe auch [1]). Eine entscheidende Verringerung der Sensitivität konnte hierdurch nicht beobachtet werden.

Seit 2009 wurde regelmäßig dreimal pro Jahr erfolgreich an den Ringversuchen der GTFCh teilgenommen, die eine Zertifizierung der Methode bedeuten. Maximale prozentuale Abweichungen von 12,2% für EtG und 13,6% für EtS zeigen, dass EtG- und EtS-Bestimmungen in Urin mit einer hohen Genauigkeit möglich sind. Dass auch alle ermittelten Serum-Konzentrationen innerhalb des akzeptierten Bereiches lagen, zeigt, dass die Methode auch für eine Untersuchung von Serum geeignet zu sein scheint.

Obwohl die Urinproben im Rahmen der Proteinfällung mit Methanol stark verdünnt wurden (1:8), konnten, insbesondere bei Proben mit hohen Kreatininkonzentrationen, Überlagerungen der EtG-Peaks durch Störsignale nicht immer verhindert werden. Ähnliche Probleme wurden von Gnann et al. [296] 2008 auf einer Tagung vorgestellt. Durch die Entwicklung einer abgewandelten chromatographischen Methode mit einer anderen stationären Phase und einem angepassten Laufmittelgradient konnte eine Abtrennung des Störsignals erreicht werden, ohne dass auf eine aufwendigere Aufarbeitung der Proben zurückgegriffen werden musste. Dass die Analyse aller Ringversuchsproben auch mit dieser, noch nicht vollständig validierten, Methode zu zufriedenstellenden Ergebnisse führte, zeigt die hohe Genauigkeit dieser Methode und erlaubt ihren Einsatz in unklaren Fällen.

6.3 Bestimmung von EtG in Haaren mittels LC-MS/MS

Wie bereits im theoretischen Teil der Arbeit geschrieben, ist die quantitative Bestimmung von EtG in Haaren ein geeignetes Verfahren zum Nachweis eines vorangegangenen Alkoholkonsums. Ein sehr empfindliches Analyseverfahren ist notwendig, um EtG-Konzentrationen im Bereich des aktuell geltenden Grenzwertes für Abstinenzuntersuchungen von 7 pg/mg [3, 4, 206] nachweisen zu können. Die entwickelte Methode zum Nachweis von EtG und EtS in Urin wurde hierfür adaptiert und eine Extraktion aus der Haarmatrix, in Anlehnung an die Methode von Morini et al. [180], aufgenommen. Nachdem das Verfahren ca. ein Jahr lang in der Routine eingesetzt wurde, traten vermehrt Probleme durch Störsignale im Retentionszeitfenster des EtG auf. Betroffen waren hierdurch ausschließlich die beiden als Qualifier verwendeten Ionenübergänge, so dass eine Quantifizierung weiterhin möglich war. Eine Auswertung nach den Richtlinien der GTFCh unter Einbeziehung mindestens eines Qualifiers war jedoch nicht immer möglich. Zur Absicherung der Ergebnisse wurde auch die entwickelte alternative Methode zum Nachweis von EtG und EtS in Urin für die Haaranalyse angepasst, optimiert und validiert.

Mit einer steigenden Zahl der zu analysierenden Haarproben wurde zudem das Zerkleinern der Haare mit einer Schere besonders zeitintensiv. Ein Mahlverfahren wurde daraufhin entwickelt, optimiert und in Verbindung mit dem alternativen Messverfahren validiert. Die Auswirkungen des Mahlens wurden zudem im Rahmen von vergleichenden Analysen von geschnittenen und gemahlten Haaren untersucht (siehe Abschnitt 7.2).

6.3.1 Optimierung des Mahlverfahrens für Haarproben

Durch den Einsatz eines automatischen Zerkleinerers sollte die Aufarbeitung der Haarproben beschleunigt und dadurch ein höherer Probendurchsatz erreicht werden. Zwei ver-

schiedene Geräte wurden zu diesem Zweck getestet. Die Schwingmühle MM 400 (Retsch, Haan, Deutschland) sowie das Homogenisationssystem Fast Prep-24 (MP Biomedicals, Santa Ana, Kalifornien, USA). Mit der Schwingmühle gelang eine zufriedenstellende Zerkleinerung der Haare nur in großen Mahlbechern aus Stahl (25 mL). Lediglich zwei Haarproben ließen sich gleichzeitig mahlen und eine deutlich größere Haarmenge war nötig. Bei der Verwendung von Eppendorf Cups als Mahlgefäße entstanden Haarknäuel, die sich nicht weiter zerkleinern ließen.

Mit dem Homogenisationssystem Fast Prep-24 (Abbildung 6.4 I) wurde eine gute Zerkleinerung in 15 mL Tubes mit zehn Keramikugeln ($\varnothing = 1/4$ inch) mit Granatsplintern erreicht. Jedoch musste auf Grund der großen Mahlgefäße die Menge an Lösemittel verdreifacht werden. Um ein späteres Einengen zu vereinfachen, wurde Methanol statt Wasser eingesetzt, das durch die größere Extraktionskraft erhebliche Störungen in den Chromatogrammen verursachte. Mit Kugeln aus rostfreiem Stahl (Abbildung 6.4 III) war eine Zerkleinerung der Haare auch in 2 mL Schraubdeckelgefäßen möglich. In diesen Gefäßen konnten bis zu 24 Proben gleichzeitig zerkleinert werden (Abbildung 6.4 II).



Abbildung 6.4: Kugelmühle Fast Prep-24 (MP-Biomedicals) (I), Nahansicht mit 24er Probenhalter und Mahlgefäßen (II), Kugeln aus rostfreiem Stahl ($\varnothing = 3$ mm/5 mm) (Retsch) (III).

Verschiedene Kugeln sowie unterschiedliche Mahlvorgänge wurden verglichen. Die Anzahl der Kugeln mit Durchmessern (\varnothing) von 3 oder 5 mm, die Menge der Haare sowie die Mahldauer wurden dabei variiert. Maximal 85 mg Haare konnten zufriedenstellend zerkleinert werden. Bei Verwendung der Höchstgeschwindigkeit von 6,5 m/s wurden z. T. die Deckel der Schraubdeckelgefäße durchstoßen oder die Gefäße platzten auf. Die Dauer der einzelnen Mahlvorgänge musste auf eine Minute begrenzt werden, um ein überhitzen der Proben zu vermeiden. Die besten Ergebnisse wurden bei zwei Mahlvorgängen à 1 min mit vier großen Kugeln ($\varnothing = 5$ mm) und einer Geschwindigkeit von 6,0 m/s erreicht

(siehe Abbildung 6.5 C). Bei einer Reduktion auf einen Mahlvorgang blieben noch einige längere Haare zurück (siehe Abbildung 6.5 B). Ebenfalls gute Ergebnisse konnten bei dem Einsatz von zehn kleinen Kugeln ($\varnothing = 3$ mm) nach drei Mahlvorgängen à 1 min mit einer Geschwindigkeit von 6,5 m/s beobachtet werden (siehe Abbildung 6.5 D).

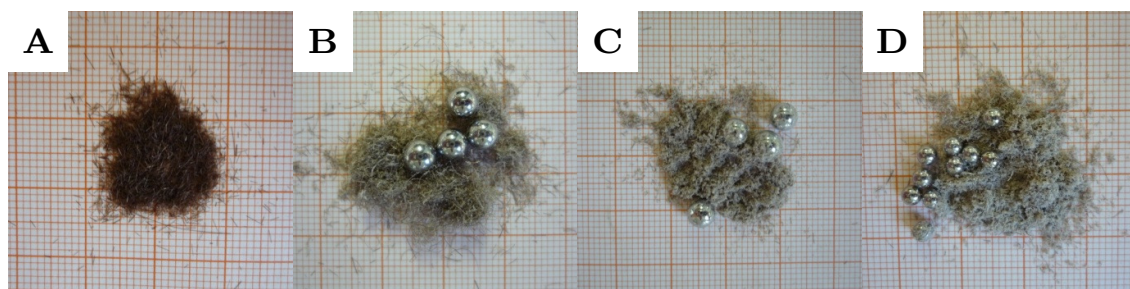


Abbildung 6.5: Haarproben (75 mg) mit der Schere zerkleinert (A), gemahlen mit vier großen Kugeln ($\varnothing = 5$ mm), 1 x 1 min bei 6,0 m/s (B) sowie 2 x 1 min bei 6,0 m/s (C) und mit zehn kleinen Kugeln ($\varnothing = 3$ mm), 3 x 1 min bei 6,5 m/s (D).

6.3.2 Aufarbeitung der Proben

Das für die Analyse verwendete Segment (meist die proximalen 3 cm) wurde zuerst vom Rest der Haarprobe abgetrennt. Für die ursprünglich entwickelte erste Methode wurden etwa 100 mg der Haare (min. 20 mg – max. 130 mg) mit 3–4 mL Dichlormethan (30 s vortexen und 10 min Ultraschallbad) und danach mit 3–4 mL Methanol (30 s vortexen) gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die Haare bei Raumtemperatur im Stickstoffstrom ca. 30 min getrocknet, anschließend eingewogen und mit einer Präparierschere in 1–5 mm lange Stücke geschnitten. Nach der Zugabe von 700 μ L Wasser dem., 20 μ L IS (0,125 μ g/mL) und 20 μ L Methanol wurden die Proben kurz gevortext und 5 min bei 5.724 x g zentrifugiert. Die mit Parafilm fest verschlossenen Proben wurden über Nacht bei Raumtemperatur gelagert und danach für 2 h ins Ultraschallbad gestellt. Im Anschluss wurden die Proben zentrifugiert (5 min, 5.724 x g), der flüssige Anteil in ein 1,5 mL Eppendorf Cup überführt und dieser erneut mit einer höheren Beschleunigung zentrifugiert (10 min, 30.231 x g). 150 μ L des Extraktes wurden in ein eindeutig beschriftetes Glasvial mit Mikroinsert eingefüllt.

In Fällen, in denen die vorhandene Haarmenge unter 60 mg lag, wurden die Haar-extrakte zusätzlich aufkonzentriert, um eine ausreichende Sensitivität zu erreichen. Hierfür wurden 300 μ L des Haarextraktes bei 40°C in Stickstoffstrom eingedampft und je nach eingewogener Haarmenge mit 100–150 μ L mobiler Phase A resuspendiert. Hierbei wurden 100 μ L bei 20–40 mg Haare und 150 μ L bei 40–60 mg Haare gewählt.

Für den Einsatz der Mühle waren leichte Abänderungen in der Aufarbeitung der Haarproben nötig. Etwa 80 mg Haare wurden nach dem oben beschriebenen Verfahren gewaschen und getrocknet. 75 mg Haare wurden daraufhin in einem 2 mL Schraubdeckelgefäße mit vier Stahlkugeln ($\varnothing 5$ mm) zweimal für je 1 min mit einer Geschwindigkeit von 6,0 m/s gemahlen. Zwischen den Mahlvorgängen wurde eine fünfminütige Abkühlpause eingelegt. Nach der Zugabe von 15 μ L IS ($c_{EtG} = 0,125$ mg/L) und 500 μ L Wasser dem.

wurden die Proben kurz gevortext und über Nacht bei Raumtemperatur lichtgeschützt gelagert. Nach 2 h im Ultraschallbad wurden die Extrakte zentrifugiert (10 min, 30.231 x g). Durch das feinst gemahlene Haarmaterial lagen trotz des Zentrifugierens häufig trübe Extrakte vor. Durch eine Filtration des Extraktes mit Spritzenvorsatzfiltern konnte eine schnelle und einfache Aufreinigung des Extraktes erreicht werden. Die Mahlkugeln blieben bis zum Ende der Extraktion in den Schraubdeckelgefäße und wurden danach hintereinander mit Wasser dem. und Methanol gereinigt.

6.3.3 LC-MS/MS-Methode

Für die quantitative Bestimmung von EtG in Haaren konnten die beiden Methoden, die für die Urinanalytik entwickelt wurden, mit kleinen Veränderungen übernommen werden. Neben dem Löschen aller Ionenübergänge zur Quantifizierung von EtS wurde der Gradient für die Hypercarb-Säule folgendermaßen optimiert: 95% A für 1 min, auf 70% A in 6 min, auf 5% A in 1 min, halten für 2 min, zurück zu 95% A in 1 min, halten für 9 min. Durch die Abänderung des Gradienten konnte eine noch bessere Abtrennung des EtG-Peaks von einem nur bei Haaren auftretenden Störsignal gewährleistet werden. Bei beiden Methoden wurde eine post-column Addition von ACN (0,1 mL/min) zur Steigerung der Empfindlichkeit eingesetzt.

6.3.4 Validierung des Verfahrens

Beide Verfahren wurden nach den Richtlinien der GTFCh validiert [289]. Es wurden Untersuchungen zu folgenden Themen durchgeführt:

Selektivität

Bei der Analyse von fünf Leerhaarproben von verschiedenen abstinenten Personen und fünf Nullproben (Leerhaare + IS) tauchten bei keiner der beiden Methoden Störsignale im Retentionszeitfenster des EtG auf. Die beschriebenen Störsignale, die ausschlaggebend für eine Abwandlung der ursprünglichen Methode waren, sind erst im Routinebetrieb aufgetaucht. Die Abbildungen 6.6 und 6.7 zeigen MRM-Chromatogramme von Leerhaaren (A und E) sowie aufgestockten Leerhaaren bei 7 pg/mg (B und F), analysiert mit Methode 1 (Polar RP) (A und B) bzw. Methode 2 (Hypercarb) (E und F). Ebenfalls abgebildet sind MRM-Chromatogramme von zwei authentischen Proben, bei denen Methode 1 zu Störsignale führte (C und D) und eine zusätzliche Analyse mit Methode 2 (G und H) durchgeführt wurde. Bei der positiv getesteten Probe (D und H) wurden übereinstimmende Ergebnisse (22 bzw. 24 pg/mg) mit beiden Methoden gefunden.

Kalibration sowie Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Für die Kalibration wurden mit EtG aufgestockte Leerhaare in acht Konzentrationen (2, 4, 10, 20, 40, 100, 200 und 400 pg/mg) sechsfach aufgearbeitet und analysiert. Für beide Methoden wurde ein linearer Zusammenhang zwischen dem Quotienten aus den Peakflächen des Analyten und des IS sowie der Analytkonzentration über den gesamten Konzentrationsbereich festgestellt. Mittels Regressionsanalyse erhaltene

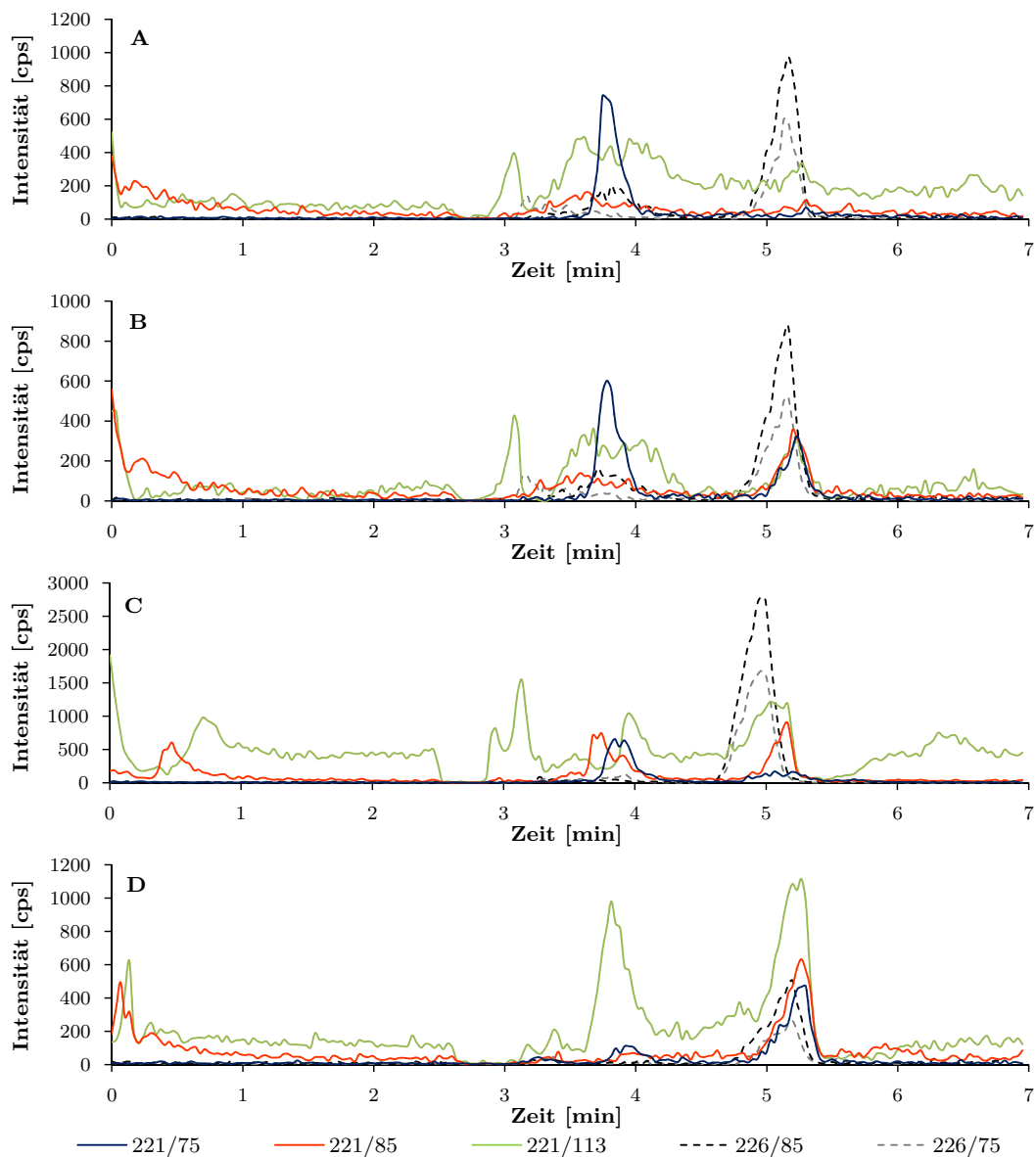


Abbildung 6.6: MRM-Chromatogramme von extrahierten Haarproben analysiert mit Methode 1 (Polar RP) von Leerhaaren (A), einer aufgestockten Probe bei 7 pg/mg (B) sowie von authentischen Haarproben bei denen Störsignale auftauchten (C: nicht eindeutig, D: 22 pg/mg).

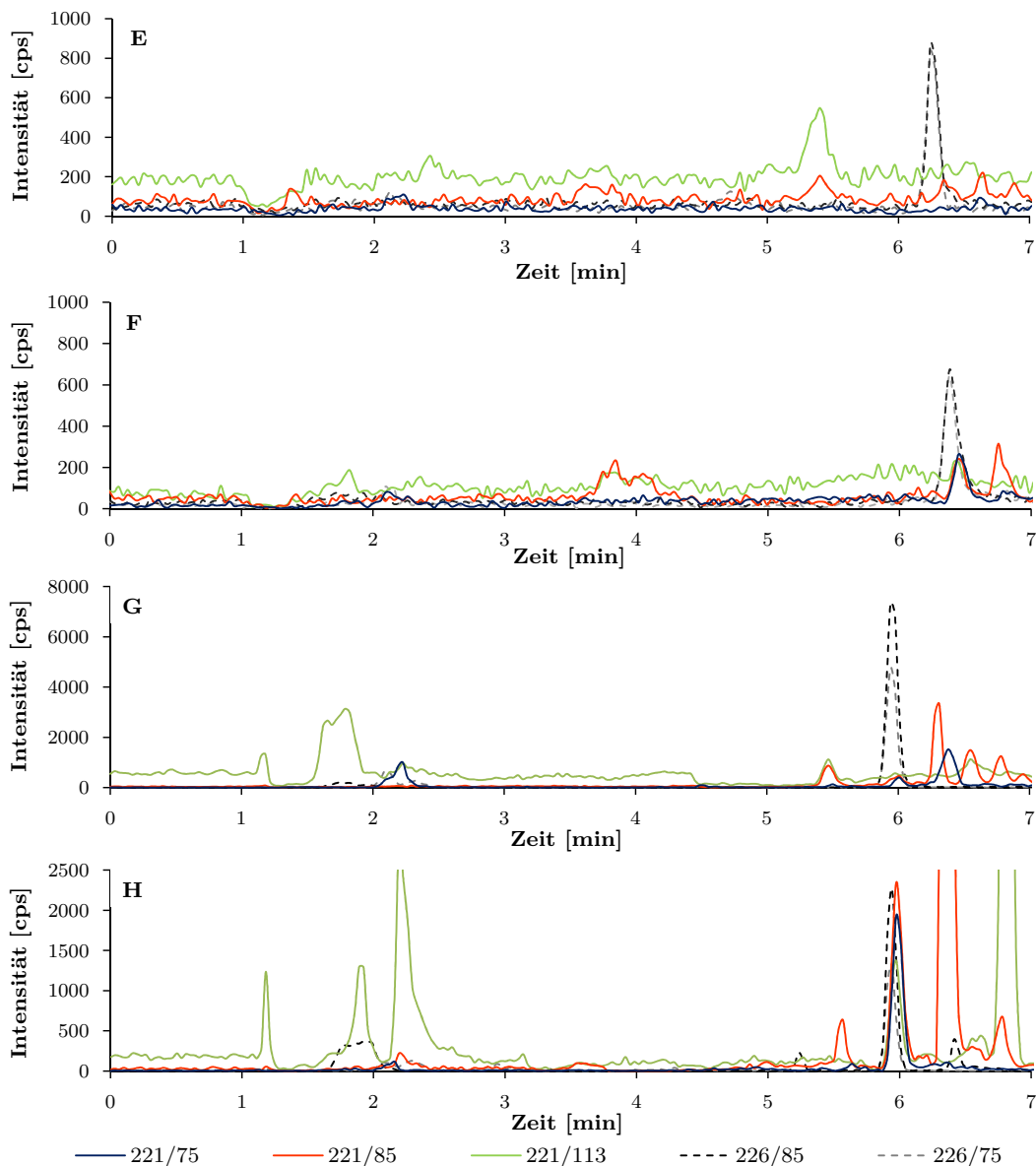


Abbildung 6.7: MRM-Chromatogramme von extrahierten Haarproben analysiert mit Methode 2 (Hypercarb) von Leerhaaren (E), einer aufgestockten Probe bei 7 pg/mg (F) sowie von authentischen Haarproben bei denen Methode 1 zu Störsignalen führte (siehe Abbildung 6.6 C und D) (G: 2,4 pg/mg, H: 24 pg/mg).

Geradengleichungen sowie die nach DIN 32645 [290] berechneten LODs und LOQs sind in Tabelle 6.7 zusammengefasst.

Tabelle 6.7: Mittels Regressionsanalyse ermittelte Geradengleichungen, Bestimmtheitsmaße sowie die LODs und LOQs von beiden validierten Methoden zum Nachweis von EtG in Haaren. Die Methoden sind nach der jeweils verwendeten Säule benannt.

	Polar RP	Hypercarb
Geradengleichung	$y = 0,008 x + 0,016$	$y = 0,045 x - 0,046$
Bestimmtheitsmaß	0,9989	> 0,9999
LOD [pg/mg]	1,0	1,7
LOQ [pg/mg]	4,0	2,3

Präzision und Genauigkeit

Über einen Zeitraum von acht Tagen wurden täglich zwei Qualitätskontrollproben in drei verschiedenen Konzentrationen aufgearbeitet. Für die erste Methode wurden die folgenden über den Kalibrationsbereich verteilten Konzentrationen gewählt: 4, 40 und 400 pg/mg. Bei der optimierten Methode unter Verwendung der Hypercarb-Säule wurden die Konzentrationen der QC-Proben (7, 30 und 150 pg/mg) an die aktuell geltenden Grenzwerte angepasst. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6.8.

Tabelle 6.8: Ermittelte Daten für die Genauigkeit sowie die Intra- und Inter-Day Präzision für beide Methoden, bestimmt bei drei Konzentrationen im unteren, mittleren und oberen Kalibrationsbereich.

	Sollkonz. [pg/mg]	Polar RP			Hypercarb		
		Niedrig 4,00	Mittel 40,0	Hoch 400	Niedrig 7,00	Mittel 30,0	Hoch 150
Kenndaten	Mittelwert	3,94	37,89	386,56	6,65	27,66	142,94
	SD	0,69	2,17	20,02	0,30	1,39	6,40
	RSD [%]	17,56	5,71	5,18	4,50	5,00	4,50
Genauigkeit	Varianz	-0,06	-2,11	-13,44	-0,35	-2,34	-7,06
	Bias [%]	-1,50	-5,27	-3,36	-4,90	-7,80	-4,70
Intra-Day	SD	0,66	1,67	12,92	0,20	1,19	4,53
Präzision	RSD [%]	16,79	4,41	3,34	3,10	4,30	3,20
Inter-Day	SD	0,69	2,20	20,43	0,31	1,40	6,56
Präzision	RSD [%]	17,62	5,80	5,29	4,60	5,10	4,60

Extraktionsausbeute und Matrixeffekte

Zur Bestimmung der Matrixeffekte und Extraktionsausbeuten wurden Reinsubstanzlösungen, aufgestockten Leerhaare sowie aufgestockten Extrakte bei zwei unterschiedlichen Konzentrationen im unteren (7 pg/mg) und oberen (150 pg/mg) Kalibrationsbereich analysiert. Die Ergebnisse für beide Methoden sind in Tabelle 6.9 aufgeführt.

Stabilität von aufgearbeiteten Proben

Zur Bestimmung der Stabilität von aufgearbeiteten Proben wurden für die erste Methode aufgestockte Haarproben bei 15 und 300 pg/mg sowie zwei authentische Haarproben

Tabelle 6.9: Gefundene prozentuale Extraktionsausbeuten und Matrixeffekte für beide Methoden ermittelt bei jeweils zwei verschiedenen Konzentrationen.

c [pg/mg]	Extraktionsausbeute		Matrixeffekte	
	7	150	7	150
Polar RP	99,6%	88,0%	84,2%	77,7%
Hypercarb	97,5%	102,1%	95,1%	99,4%

analysiert. Konzentrationen von 7 und 150 pg/mg wurden bei der zweiten Methode gewählt. Die Analyse der Extrakte direkt nach der Aufarbeitung sowie nach zwei bzw. drei und sieben Tagen bei 10°C im Autosampler ergab eine Variation der relativen Peakflächen im Vergleich zu Tag Null von maximal 14% bei der ersten Methode sowie von maximal 6,5% bei der zweiten Methode.

6.3.5 Ergebnisse der Ringversuche (GTFCh)

Seit Anfang 2010 wird von der GTFCh der Ringversuch „Ethylglucuronid in Haar“ angeboten. Die Bewertungskriterien entsprechen denen für den in Abschnitt 6.2.4 beschriebenen Ringversuch „Ethylglucuronid in Serum und Urin“. Beim ersten Ringversuch (1/10) handelte es sich um einen Pilotringversuch. Alle bisherigen Ergebnisse sind in Tabelle 6.10 zusammengefasst. Die Anforderungen der Ringversuche wurden bei allen Proben mit einer maximalen Abweichung vom Sollwert von 32,7% erfüllt. Mit beiden Methoden konnten dabei übereinstimmende Ergebnisse gefunden werden.

Tabelle 6.10: Ergebnisse der Ringversuche „Ethylglucuronid in Haar“ aus den Jahren 2010 und 2011. Dargestellt sind die ermittelten EtG-Konzentrationen, die Sollwerte, die akzeptierten Bereiche sowie die ermittelten Abweichungen zwischen den gemessenen Konzentrationen und den Sollwerten.

		EtG			
		Sollwert	Bereich	Messwert	Abw.
		[pg/mg]	[pg/mg]	[pg/mg]	[%]
1/10	A	112,3	62,3 - 162,3	145,0	29,1
	B	23,4	10,2 - 36,6	29,0	23,9
2/10	A	12,0	4,6 - 19,4	11,4	-5,0
	B	16,3	6,7 - 25,9	17,1	4,9
	C	17,0	7,0 - 27,0	16,6	-2,4
1/11	A	20,8	8,8 - 32,8	22,1	6,3
	B	39,4	18,8 - 60,0	41,3	4,8
	C	86,3	46,3 - 126,3	73,5	-14,8
2/11	A	57,8	29,4 - 86,2	76,7	32,7
	B	39,8	19,2 - 60,4	47,3	18,8
3/11	A	69,4	36,2 - 106,2	81,2	17,0
	B	71,7	37,5 - 105,9	85,3	19,0

Abw.: Abweichung des Messwerts vom Sollwert, Bereich: akzeptierter Bereich

6.3.6 Diskussion

Es konnten zwei verschiedene Methoden zum Nachweis von EtG in Haaren entwickelt und erfolgreich nach den Richtlinien der GTFCh [297] validiert werden. Durch eine

Variation der chromatographischen Trennung konnte die einfache, schnelle und günstige Extraktion aus der Haarmatrix ohne eine weitere Aufreinigung des Extraktes mittels SPE trotz eines vermehrten Auftretens von Störsignalen bei der Analyse von authentischen Proben beibehalten werden. Bei der nun verwendeten stationären Phase aus porösem Graphit, die besonders für die Analyse von polaren Substanzen geeignet ist, besteht der Retentionsmechanismus im Gegensatz zu dem bei Silika-basierten Phasen (wie z. B. der Polar RP) aus einer Kombination aus dispersiven und ladungsinduzierten Wechselwirkungen. Hierdurch konnte eine Abspaltung der Störsignale erreicht werden. Außer einer Anpassung des Laufmittelgradienten mussten keine weiteren Veränderungen vorgenommen werden, so dass derselbe Haarextrakt mit beiden Methoden untersucht werden konnte. Seit der vollständigen Validierung der zweiten Methode wurde ausschließlich diese für die Analyse von Routineproben eingesetzt.

Eine zeitsparende automatisierte Zerkleinerung der Haare konnte erfolgreich in die Methode integriert werden. Eine Verunreinigung des Extraktes bei der Extraktion gemahlener Haare, die sich vereinzelt in einem verstärktes Grundrauschen in Kombination mit einer verringerten Sensitivität zeigte [2,298], konnte nicht bestätigt werden. Bei einer zu Testzwecken durchgeführten Extraktion mit Methanol wurden jedoch genau wie bei Jurado et al. [179] deutlich mehr Störsignale im Chromatogramm gesichtet. Die durch die feine Zerkleinerung der Haare im Extrakt enthaltenen Schwebstoffe, die sich auch durch mehrfaches Zentrifugieren nicht abscheiden ließen, konnten problemlos und ohne Auswirkungen auf das Messergebnis durch den Gebrauch eines Spritzenvorsatzfilters entfernt werden.

Bereits für die erste Methode konnten trotzdem gute LODs und LOQs erreicht werden, die mit 1 und 4 pg/mg deutlich unterhalb des aktuellen Grenzwertes zum Ausschluss einer Abstinenz von 7 pg/mg [3,4,206] lagen. Während andere Methoden, die z. T. eine schnelle Extraktion mit Mikrowellen [186] oder eine Aufreinigung mittels SPE oder Filtration [183,185,188] beinhalten, deutlich höhere LOQs von 10 pg/mg bzw. sogar 300 pg/mg aufweisen und damit höchstens zum Nachweis exzessiven Konsums geeignet sind, kann diese Methode auch zum Ausschluss einer Abstinenz eingesetzt werden. Die ermittelten LODs und LOQs für die zweite Methode lagen mit 1,7 pg/mg und 2,3 pg/mg deutlich niedriger als bei früher publizierten Methoden mit der gleichen Säule (LOD: 2 und 25 pg/mg, LOQ: 6 und 50 pg/mg) [143,187]. Im Vergleich mit der ersten Methode blieb der LOD etwa gleich und der LOQ konnte weiter gesenkt werden.

Für beide Methoden konnten zufriedenstellende Ergebnisse für die Genauigkeit sowie die Intra- und Inter-Day Präzision mit Abweichungen $< 15\%$ ($< 20\%$ im Bereich der Bestimmungsgrenze) für die erste Methode und Abweichungen $< 5,1\%$ für die zweite Methode gefunden werden. Aufgrund der gefundenen hohen Stabilität von aufgearbeiteten Proben ist es möglich, Proben auch nach mehreren Tagen im gekühlten Autosampler zu analysieren. Die bestimmten hohen Extraktionsausbeuten von $> 88\%$ (Methode 1) bzw. $> 97,5\%$ (Methode 2) beziehen sich ausschließlich auf Verluste während der Aufarbeitung, da eine Extraktion aus der Haarmatrix mit aufgestockten Proben nicht simuliert werden kann. Vergleichsweise hohe Matrixeffekte bei der ersten Methode mit relativen Peakflächenabnahmen von bis zu 22,3% konnten durch den Einsatz von deuteriertem EtG als IS kompensiert werden. Matrixeffekte mit relativen Peakflächen zwischen 30 und 70% wurden bei der Validierung anderer Methoden gefunden [1,101,183]. Durch

die weitere Optimierung der Methode, unter Einsatz der Hypercarbsäule, konnten die Matrixeffekte (5%) deutlich gesenkt werden. Auch die erfolgreiche Teilnahme an allen bisherigen Ringversuchen der GTFCh unterstreicht die hohe Qualität beider Methoden.

Im Vergleich zu den Laufzeiten bisher publizierter Methoden (5–45 min) zum Nachweis von EtG in Urin [122, 125, 143], Blut [109] und Haaren [143, 187] mit der Hypercarbsäule, liegt die benötigte Laufzeit von 20 min im oberen Bereich. Pragst et al. [187] erreichten durch einen höheren Fluss von 0,3 mL/min eine Elution innerhalb von 3,3 min. Hoch polare Substanzen wechselwirken jedoch sehr stark mit dieser stationären Phase. EtS beispielsweise, das ebenfalls im Haar nachweisbar ist, konnte in der für Urin entwickelten Methode nur durch eine zeitweise Verdopplung des Laufmittelflusses (0,2 mL/min → 0,4 mL/min) innerhalb von 15 min eluiert werden. Auf eine Equilibrierung, die bei deutlich kürzeren Laufzeiten erforderlich ist, um alle Matrixbestandteile von der Säule zu entfernen, konnte in der entwickelten Methode zudem verzichtet werden.

6.4 Bestimmung von FAEE in Haaren mittels HS-SPME/GC-MS

Für die quantitative Bestimmung der vier FAEE: Ethylmyristat, Ethylpalmitat, Ethyloleat und Ethylstearat wurde ein Verfahren nach Pragst et al. [2, 206] weiter optimiert und validiert.

6.4.1 Aufarbeitung der Proben

Etwa 40 mg des zu untersuchenden Haarsegments (min. 15 mg) wurde in einem Reagenzglas mit Schliff zweimal mit 3–4 mL *n*-Heptan (60 s vortexen) gewaschen. Im Anschluss wurden die Haare bei Raumtemperatur im Stickstoffstrom ca. 15 min getrocknet, fein geschnitten und 30 mg der Haare in ein 4 mL Schraubdeckelglas eingewogen. Nach der Zugabe von 20 µL IS (0,5 mg/L), 500 µL DMSO und 2 mL *n*-Heptan wurden die Schraubdeckelgläser verschlossen und 15 h bei 25°C geschüttelt. Anschließend wurden die Proben auf –30°C abgekühlt, so dass das DMSO in den festen Aggregatzustand wechselte. Der flüssige *n*-Heptan-Überstand wurde vollständig in ein 10 mL Headspace-Vial überführt und bei 40°C im Stickstoffstrom eingedampft. Abschließend wurde 1 mL des Phosphatpuffers nach Sørensen (siehe Abschnitt 5.3.5) hinzugegeben und die Proben mit einer magnetischen Bördelkappe fest verschlossen. Für die Kalibration verwendete Leerhaare wurden in größeren Portionen gewaschen, zerkleinert und dann in 30 mg-Portionen abgefüllt.

6.4.2 HS-SPME/GC-MS-Methode

Die quantitative Analyse der vier FAEE erfolgte mittels eines HS-SPME/GC-MS Verfahrens. Selektivitätsprobleme durch Bestandteile aus der Haarmatrix sowie aus den verwendeten Dichtscheiben für die SPME-Vials aus Silikon/PTFE wurden durch eine Optimierung des Temperaturgradienten gelöst. Alle Parameter sowie die zur Detektion im SIM-Modus verwendeten *m/z*-Werte sind in Tabelle 6.11 zu finden.

Tabelle 6.11: Parameter für die SPME und die GC-MS-Methode sowie die verwendeten m/z-Werte zum Nachweis der vier FAEE im SIM-Modus. Die verwendeten Quantifizier sind jeweils unterstrichen.

SPME-Parameter	
Temperatur Schüttelofen	90°C
Schüttelfrequenz	250 rpm
Vorheizzeit	5 min
Faserbeschichtung	PDMS/DVB (65 µm)
Einstichtiefe Vial	22 mm
Extraktionszeit	30 min
Einstichtiefe Injektor	54 mm
Desorptionszeit	5 min
Gaschromatograph	
Trägergas	Helium
Flow-rate:	1 mL/min
Injektionsmodus	Splitless
Injektortemperatur	260°C.
Temperaturprogramm	70°C (3 min), 20 K/min auf 200°C, 10 K/min auf 250°C, 30 K/min auf 280°C (4,5 min)
Gesamtlaufzeit	20 min
Massenspektrometer	
Detektortemperatur	280°C.
Modus	SIM-Modus
Ionenspuren (m/z):	
Ethylmyristat	101, 157, <u>256</u>
d ₅ -Ethylmyristat	106, 162, <u>261</u>
Ethylpalmitat	101, 157, <u>284</u>
d ₅ -Ethylpalmitat	106, 162, <u>261</u>
Ethyloleat	101, <u>310</u>
Ethylstearat	101, 157, <u>312</u>
d ₅ -Ethylstearat	106, 162, <u>317</u>

6.4.3 Validierung des Verfahrens

Die Validierung des Verfahrens wurde nach den Anforderungen an die Untersuchung von Haarproben der GTFCh durchgeführt [289, 297].

Selektivität

Es gelang nicht, Haare zu finden, in denen keine FAEE nachgewiesen werden konnten. Selbst in den Haaren von Kindern und abstinenten Personen konnten Summenkonzentrationen der untersuchten FAEE (c_{FAEE}) von bis zu 0,16 ng/mg gefunden werden. Für die Validierung wurden die Haare mit der geringsten FAEE-Konzentration ($c_{FAEE} \approx 0,06$ ng/mg) gewählt. Eine Quantifizierung der FAEE-Konzentrationen über extrahierte Kalibriergeraden war daher nur über ein Standard-Additionsverfahren möglich. Es wurden fünf Nullproben (Leerhaare + IS) aufgearbeitet und die gemittelten Quotienten aus Analyt- und IS-Peakflächen als Korrekturfaktoren verwendet. Abbildung 6.8 zeigt SIM-Chromatogramme von Kinderhaaren (A), von aufgestockten Haaren mit je 0,05 ng/mg (B) sowie von einer positiv getesteten, authentischen Haarprobe ($c_{FAEE} = 0,26$ ng/mg) (C).

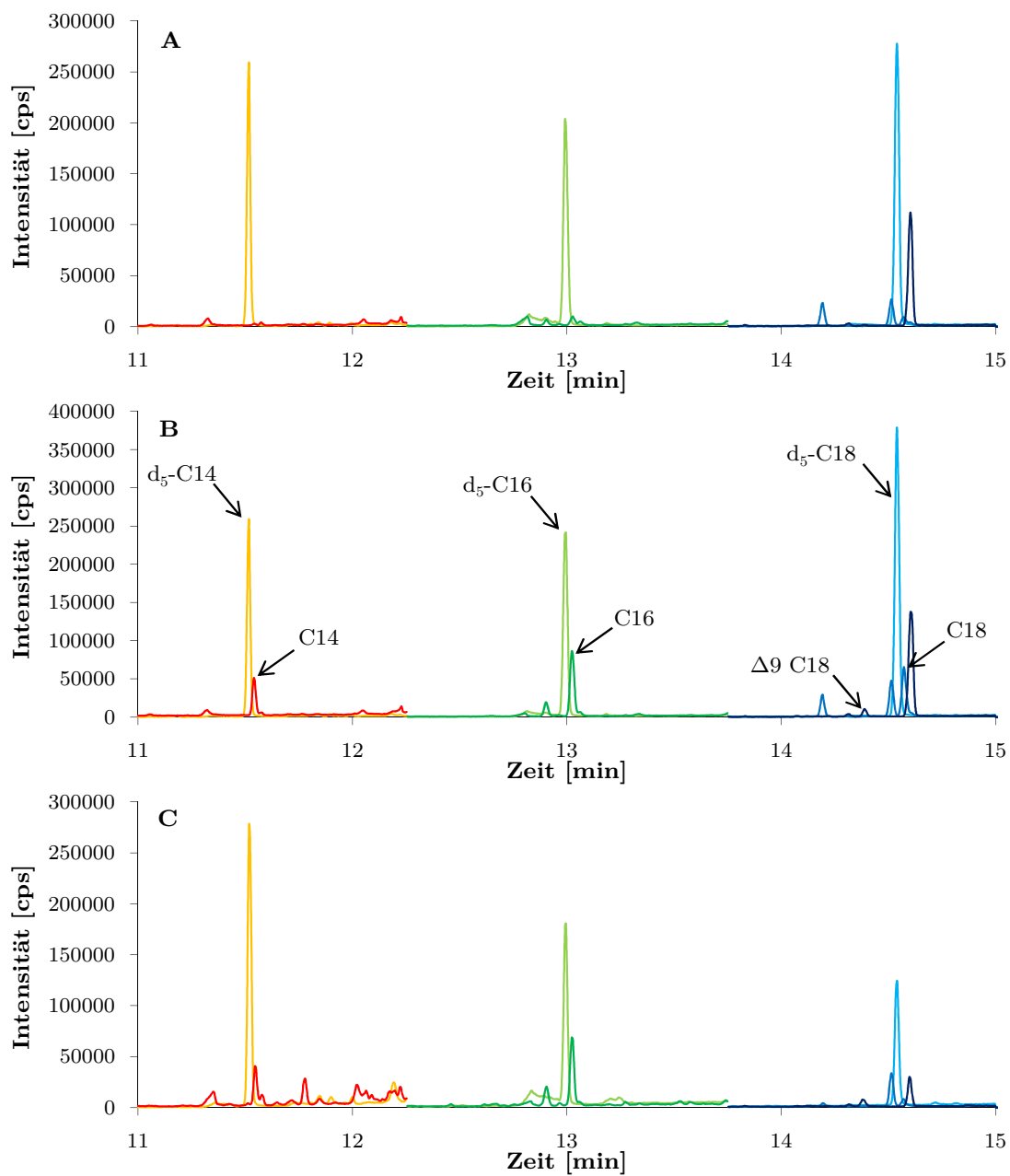


Abbildung 6.8: GC-MS Chromatogramme von Kinderhaaren (A), aufgestockten Haaren mit je 0,05 ng/mg (B) sowie von einer positiv getesteten Haarprobe ($c_{FAEE} = 0,26$ ng/mg) (C).

Kalibration sowie Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Aufgestockte Haarproben bei sieben verschiedenen Konzentrationen (0,02, 0,04, 0,08, 0,16, 0,30, 0,60 und 1,2 ng/mg je FAEE) wurden fünffach extrahiert und analysiert. Für alle vier FAEE konnte eine Linearität über den gesamten Kalibrationsbereich (0,02 – 1,2 ng/mg) nachgewiesen werden. Die LODs lagen zwischen 0,005 und 0,009 ng/mg, die LOQs zwischen 0,016 und 0,025 ng/mg. Die durch Regressionsanalysen ermittelten Kalibriergeraden, die jeweiligen Bestimmtheitsmaße sowie die berechneten LODs und LOQs sind in Tabelle 6.12 zusammengefasst.

Tabelle 6.12: Ermittelte Kalibriergeraden mit Bestimmtheitsmaßen (r^2) sowie die berechneten LODs und LOQs für die vier FAEE.

	Regressionsgerade	r^2	LOD [ng/mg]	LOQ [ng/mg]
Ethylmyristat	$y = 12,754 x + 0,0001$	0,9987	0,008	0,016
Ethylpalmitat	$y = 22,181 x - 0,0800$	0,9985	0,005	0,021
Ethyloleat	$y = 1,7102 x - 0,0037$	0,9980	0,008	0,025
Ethylstearat	$y = 10,710 x + 0,0211$	0,9985	0,009	0,019

Präzision und Genauigkeit

Zur Bestimmung der Präzision und Genauigkeit wurden aufgestockte Haarproben bei 0,05, 0,5 und 1,0 ng/mg je FAEE an fünf aufeinander folgenden Tagen jeweils zweifach aufgearbeitet und analysiert. Alle Ergebnisse sind in Tabelle 6.13 zu finden.

Tabelle 6.13: Zusammenfassung der Ergebnisse für die Genauigkeit und die Intra- und Inter-Day-Präzision für die validierte Methode zur Quantifizierung der FAEE.

	Sollkonz. [ng/mg]	Ethylmyristat			Ethylpalmitat		
		Niedrig 0,05	Mittel 0,1	Hoch 1,0	Niedrig 0,05	Mittel 0,1	Hoch 1,0
Kenndaten	Mittelwert	0,050	0,104	1,006	0,048	0,101	0,991
	SD	0,002	0,005	0,045	0,002	0,003	0,033
	RSD [%]	3,86	5,10	4,50	3,35	3,22	3,33
Genauigkeit	Varianz	0,000	0,004	0,006	-0,002	0,001	-0,009
	Bias [%]	-0,60	3,53	0,06	-3,20	0,75	-0,87
Intra-Day	SD	0,001	0,005	0,025	0,001	0,001	0,011
Präzision	RSD [%]	2,81	4,85	2,45	2,35	1,26	1,13
Inter-Day	SD	0,002	0,005	0,047	0,002	0,003	0,035
Präzision	RSD [%]	3,97	5,14	4,70	3,46	3,38	3,51
	Sollkonz. [ng/mg]	Ethyloleat			Ethylstearat		
		Niedrig 0,05	Mittel 0,1	Hoch 1,0	Niedrig 0,05	Mittel 0,1	Hoch 1,0
Kenndaten	Mittelwert	0,050	0,107	1,002	0,046	0,099	1,003
	SD	0,005	0,005	0,025	0,004	0,006	0,038
	RSD [%]	10,50	4,99	2,48	8,15	5,70	3,81
Genauigkeit	Varianz	0,000	0,007	0,002	-0,004	-0,001	0,003
	Bias [%]	-0,87	7,04	0,19	-7,77	-1,40	0,25
Intra-Day	SD	0,002	0,006	0,013	0,002	0,002	0,012
Präzision	RSD [%]	3,83	5,62	1,33	3,31	1,67	1,23
Inter-Day	SD	0,005	0,006	0,026	0,004	0,006	0,040
Präzision	RSD [%]	11,06	5,62	2,59	8,56	6,01	4,02

Wiederfindung und Extraktionsausbeute

Wiederfindungen sowie Extraktionsausbeuten wurden über den gesamten Kalibrationsbereich untersucht. Zur Bestimmung der Wiederfindung wurden FAEE-Reinsubstanzlösungen sowie extrahierte Haarproben bei fünf verschiedenen Konzentrationen (0,04, 0,08, 0,3, 0,6, 1,2 ng/mg je FAEE) analysiert. Die erhaltenen Peakflächen wurden gegen die entsprechende Konzentration aufgetragen. Aus dem Verhältnis der mittels linearer Regression bestimmten Steigungen wurden Wiederfindungen zwischen 81,1% und 98,2% ermittelt.

Zur Berechnung der Extraktionsausbeute wurden Haare mit bzw. ohne IS aufgearbeitet und die Analyten sowie IS bzw. nur die Analyten in den eingedampften Extrakt gegeben. Die ermittelten Quotienten aus den Peakflächen von Analyt und IS wurden gegen die jeweiligen Konzentrationen aufgetragen. Ein Vergleich der ermittelten Steigungen ergab Extraktionsausbeuten zwischen 58,8 und 77,8%. Die Ergebnisse für die einzelnen FAEE sind in Tabelle 6.14 zusammengefasst.

Tabelle 6.14: Über den gesamten Kalibrationsbereich ermittelte Wiederfindungen und Extraktionsausbeuten für die Extraktion der vier untersuchten FAEE aus Haaren.

	Ethylmyristat	Ethylpalmitat	Ethyloleat	Ethylstearat
Wiederfindung [%]	81,1	97,9	98,2	93,7
Extraktionsausbeute [%]	64,0	77,0	77,8	58,8

Stabilität von aufgearbeiteten Proben

FAEE sind wie alle Ester hydrolyseempfindlich. Bei der Lagerung von aufgearbeiteten Proben nach der Zugabe des Phosphatpuffers besteht die Gefahr, dass es zu einer teilweisen Verseifung der FAEE kommt. Tests sollten zeigen, ob der Zustand, in dem die Proben gelagert werden, einen Einfluss auf die Stabilität der FAEE hat. Dafür wurden vier aufgestockte Haarproben bei zwei Konzentrationen (0,05 und 0,1 ng/mg) aufgearbeitet. Zu vier unterschiedlichen Zeitpunkten wurde die Aufarbeitung gestoppt und die Proben bei -20°C tiefgefroren. Nach einer Woche wurden die Aufarbeitungen entsprechend des Fortschritts zu Ende geführt. Die vier unterschiedlichen Zeitpunkte waren:

- im Schraubdeckelglas direkt nach 15 h Schütteln,
- nach der Überführen der *n*-Heptan-Phase ins 10 mL Headspace-Vial,
- nach dem Eindampfen des *n*-Heptan im 10 mL Headspace-Vial,
- fertig verschlossen im 10 mL Headspace-Vial mit Puffer.

Abbildung 6.9 zeigt die Summen der Peakflächen der vier FAEE bzw. der drei IS, die beim niedrigen Konzentrationslevel um 21,9% bzw. 20,6% und beim hohen Konzentrationslevel um 10,6% bzw. 10,5% voneinander abwichen. Übereinstimmende Trends abhängig von der Lagerung fanden sich jedoch nicht. Die ermittelten FAEE-Konzentrationen wichen um 1,5–3,7% ($c_{\text{FAEE}} = 0,05 \text{ ng/mg}$) bzw. um 0,8–2,2% ($c_{\text{FAEE}} = 1,0 \text{ ng/mg}$) vom Sollwert ab. Zur quantitativen Bestimmung der Stabilität wurden jeweils zehn aufgestockte

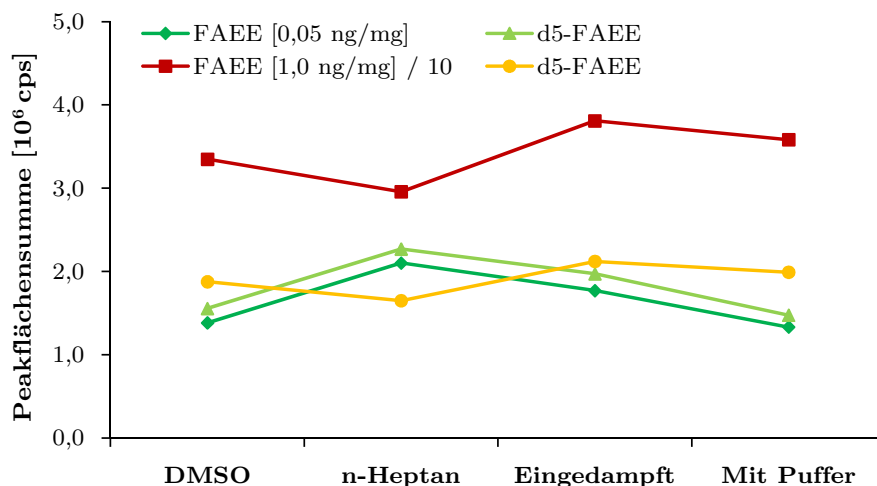


Abbildung 6.9: Vergleich der FAEE-Peakflächen bei zwei verschiedenen Konzentrationen (0,05 und 1,0 ng/mg) nach einer einwöchigen Lagerung bei -20°C : im Extraktionsgefäß mit *n*-Heptan und DMSO (DMSO), des *n*-Heptan Extraktes (*n*-Heptan), nach dem Eindampfen des *n*-Heptan Extraktes (Eingedampft) und nach Zugabe des Phosphatpuffers (Mit Puffer).

Proben bei zwei unterschiedlichen Konzentrationen (0,05 und 0,1 ng/mg) aufgearbeitet. Die Hälfte der Proben wurde sofort analysiert, die andere Hälfte wurde nach Zugabe des Puffers für eine Woche bei -20°C gelagert und dann analysiert. Bei den gelagerten Proben wurden um 2–10% höhere EtG-Konzentrationen gemessen.

6.4.4 Diskussion

Auch die GC-MS-Methode zum Nachweis der vier FAEE: Ethylmyristat, Ethylpalmitat, Ethyloleat und Ethylstearat in Haaren konnte erfolgreich nach den Richtlinien der GTFCh [297] validiert werden. Lediglich die Kriterien für die fünf Leerproben konnten nicht erfüllt werden, da Spuren von FAEE auch in den Haaren von strikt abstinenten Personen enthalten waren. Für extrahierte Kalibrationen musste daher das Standard-Additionsverfahren verwendet werden. Da im Rahmen der Validierung gezeigt werden konnte, dass Lösemittelkalibrationen zu übereinstimmenden Ergebnissen führten, konnten diese für die Analyse authentischer Proben eingesetzt werden.

Bei der Wahl des Kalibrationsbereichs (0,02–1,2 ng/mg) sowie der Kalibratoren wurde ein besonderes Gewicht auf den unteren Konzentrationsbereich gelegt, da mit der Methode vergleichende Untersuchungen im Rahmen von Abstinenzuntersuchungen durchgeführt wurden. Trotz eines Verzichts auf eine Zugabe von Salz zur Erhöhung des Dampfdrucks bei der SPME konnten sehr gute LODs und LOQs zwischen 0,005 und 0,009 ng/mg bzw. zwischen 0,016 und 0,025 ng/mg erreicht werden. Die Summe aus den vier LOQs lag deutlich unterhalb des von der SoHT empfohlenen Grenzwertes zum Ausschluss einer Abstinenz ($c_{\text{FAEE}} = 0,2 \text{ ng/mg}$) [3]. In der Zwischenzeit wurde von Zimmermann et al. [234] eine empfindliche HS-SPME/GC-MS Methode mit einer deutlich verkürzten Extraktions- sowie Analysezeit veröffentlicht. Die Nachteile eines

verunreinigten Haarextraktes, bedingt durch ein Mahlen der Haare sowie durch den Einsatz eines Ultraschallbades, wurden durch den Einsatz eines selektiveren Tandem-Massenspektrometers erreicht.

Sowohl für die Präzisionen und Genauigkeiten als auch für die Wiederfindungen und Extraktionsausbeuten wurden im Rahmen der durchgeführten Validierung gute Resultate erzielt. FAEE sind besonders im basischen Milieu empfindlich gegenüber einer hydrolytischen Spaltung. Stabilitätstests konnten jedoch zeigen, dass es keine Unterschiede macht, in welchem Stadium aufgearbeitete Proben über eine Woche im Gefrierschrank gelagert werden. Durch den Einsatz des neutralen Phosphatpuffers ist auch eine Lagerung der fertigen Probe möglich.

Die absoluten Peakflächen wiesen von Probe zu Probe zum Teil große Unterschiede auf, die durch den Einsatz von deuterierten FAEE als IS ausgeglichen werden konnten. Geringe Devianzen beim Abgießen der *n*-Heptan-Phase sowie unterschiedliche Lipidgehalte der Haare, die die Ad- und Absorption der FAEE an der Faser während der SPME beeinflussen (siehe Abschnitt 4.6.4), können dieses Phänomen erklären.

7 Studien

7.1 Bestimmung von EtG in Haaren im Rahmen von Abstinenzuntersuchungen

Im Vorfeld von medizinisch-psychologischen Untersuchungen zur Wiedererlangung der Fahrerlaubnis ist eine quantitative Bestimmung von EtG in Haaren eine Möglichkeit, den Verzicht auf Alkohol nachzuweisen. Ausschlaggebend ist dabei der 2009 von der SoHT veröffentlichte Grenzwert von 7 pg/mg [10], der in einer Empfehlung der SoHT [3] von 2012 bestätigt wurde und einen wiederholten Konsum von Alkohol zeigt. Eine retrospektive Auswertung der Ergebnisse von Haaranalysen aus dem Zeitraum 10/2009–12/2010 soll zeigen, welche Auswirkung eine Veränderung des Grenzwertes auf die Anzahl der positiv bzw. negativ getesteten Haarproben haben würde.

7.1.1 Einbezogene Proben und durchgeführte Analysen

Die Ergebnisse von 835 Haaranalysen, durchgeführt im Rahmen von Untersuchungen zur Fahreignungsdiagnostik, wurden in diese Studie aufgenommen. Wenn nicht ausdrücklich anders aufgetragen, wurde das proximale 3 cm Segment vom Kopfhaar mittels der in Abschnitt 6.3 beschriebenen, zuerst entwickelten LC-MS/MS-Methode (Polar RP) untersucht. Alle gemessenen Konzentrationen sowie verschiedene hypothetische Grenzwerte sind in Abbildung 7.1 aufgetragen.

7.1.2 Ergebnisse

Die ermittelten EtG-Konzentrationen lagen zwischen 0 und 161 pg/mg. Konzentrationen unterhalb des Grenzwertes von 7 pg/mg wurden in 88% der Proben gefunden. In 50% der Proben konnte gar kein EtG nachgewiesen werden ($c_{\text{EtG}} < \text{LOD}$). Konzentrationen zwischen der LOD (1 pg/mg) und der LOQ (4 pg/mg) wurden in 25% der Proben gefunden. Wurden ausschließlich die negativ bewerteten Proben berücksichtigt, lagen nur 5% der Proben in der Nähe des Grenzwertes zwischen 5,6 und 6,9 pg/mg. Abbildung 7.2 zeigt die Verteilung der gemessenen EtG-Konzentrationen. Konzentrationen zwischen 4 und 7 pg/mg wurden in 1 pg-Schritte aufgetrennt. Die weiteren Konzentrationsbereiche wurden in drei Balken zusammengefasst.

7.1.3 Diskussion

Spätestens die Studie von Kronstrand et al. [1] beweist, dass eine Überprüfung von strikter Abstinenz über eine quantitative Bestimmung von EtG in Haaren nicht möglich ist. Eine Senkung des Grenzwertes wäre eine Möglichkeit, um zumindest eine Verringerung der Anzahl an falsch negativen Befunden zu erreichen. Da hierdurch jedoch das

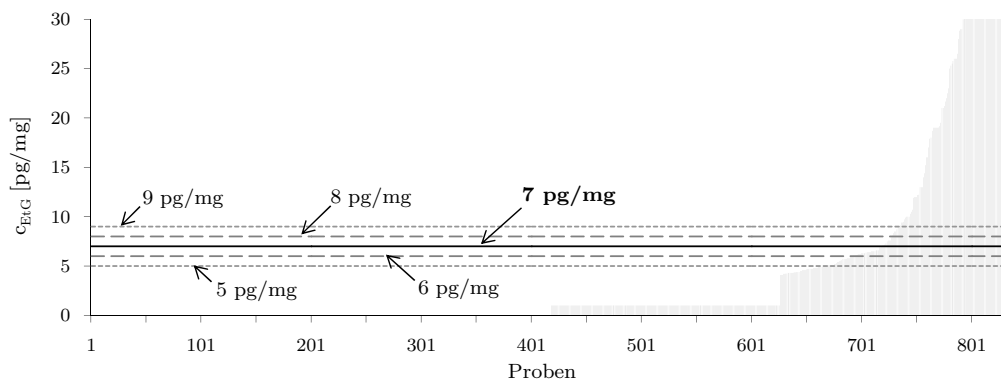


Abbildung 7.1: Gemessene EtG-Konzentrationen in Haaren aus Abstinenzuntersuchungen sowie unterschiedliche Grenzwerte (waagerechte Linien). Neben dem zurzeit verwendeten Wert von 7 pg/mg sind noch hypothetische Grenzwerte von 5, 6, 8 und 9 pg/mg eingetragen. EtG-Konzentrationen $< \text{LOD}$ (1 pg/mg) wurden als 0 pg/mg dargestellt und EtG-Konzentrationen zwischen LOD und LOQ (4 pg/mg) als 1 pg/mg. Die höchsten Konzentrationen wurden für eine übersichtliche Darstellung bei 30 pg/mg abgeschnitten.

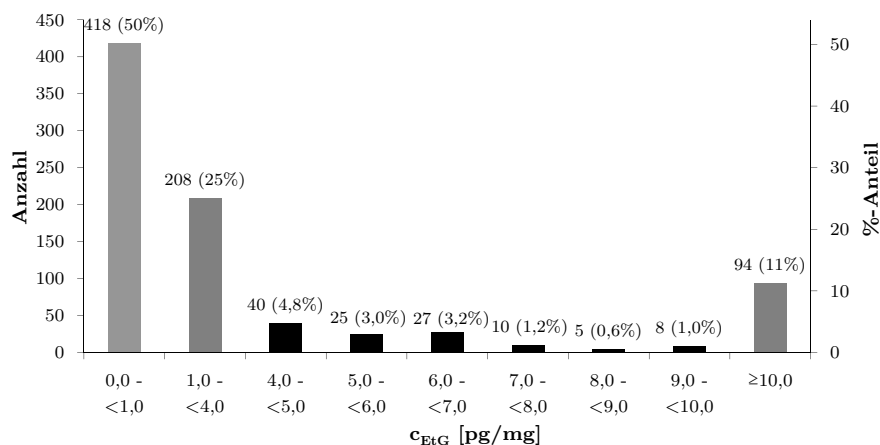


Abbildung 7.2: Verteilung der gemessenen EtG-Konzentrationen aus Abstinenzuntersuchungen. Zwischen 4 und 10 pg/mg sind die Ergebnisse in 1 pg-Schritten aufgetragen. Konzentrationen < 4 und ≥ 10 pg/mg sind in insgesamt drei Balken (grau) zusammengefasst.

Risiko von falsch positiven Befunden, z. B. durch die Verwendung von alkoholhaltigen Kosmetika [23, 24], erhöht werden könnte, ist es lediglich möglich den bestmöglichen Kompromiss zu finden. Eine retrospektive Analyse der Ergebnisse von 835 Haarproben, die im Rahmen von Abstinenzuntersuchungen analysiert wurden, ergab jedoch, dass weder eine leichte Absenkung noch eine Erhöhung des Grenzwertes eine bedeutende Auswirkung auf die Anzahl der positiv getesteten Fälle hätte. In 95% der negativ getesteten Haarproben lag die EtG-Konzentration $< 5,6$ pg/mg. In 3/4 der Fälle wurden sogar Konzentrationen < 4 pg/mg gemessen. EtG-Konzentrationen oberhalb von 10 pg/mg wurden in 80% der positiv getesteten Proben bestimmt. Durch eine Absenkung des Grenzwertes auf 6 pg/mg würden lediglich 27 (3,2%) der Proben zusätzlich positiv bewertet. Eine weitere Minderung um 1 pg/mg würde zu insgesamt 52 (6,2%) zusätzlichen positiven Proben führen. Eine hypothetische Anhebung des Grenzwertes bewirkt noch geringere Veränderungen. Lediglich 10 (1,2%) bzw. 15 (1,8%) der Proben würden bei einer Erhöhung des Grenzwertes auf 8 bzw. 9 pg/mg zusätzlich negativ bewertet.

Die Auswertung der bisherigen Ergebnisse macht deutlich, dass in den meisten negativ getesteten Fällen die EtG-Konzentrationen unterhalb des LOQ lagen. Positive Fälle waren meist deutlich positiv. Auf der Grundlage dieser Auswertung ist eine Variation des Grenzwertes nicht zu empfehlen. Verlässliche Angaben zum Alkoholkonsum der Personen, deren Haarproben analysiert wurden, lagen aufgrund der Herkunft der Proben aus Abstinenzuntersuchungen nicht vor. Eine Überprüfung des Grenzwertes aufgrund eines Vergleiches der gemessenen EtG-Konzentrationen mit Trinkangaben war daher mit diesen Daten nicht möglich.

7.2 Einfluss der Haarzerkleinerung auf die gemessenen EtG-Konzentrationen

Bei der quantitativen Analyse von Haaren ist es entscheidend, die Analyten vollständig aus der Haarmatrix zu lösen. Je nachdem, wie stark die Analyten an die Matrixbestandteile gebunden sind, müssen unterschiedliche Extraktionsverfahren angewandt werden. Rothe und Pragst [299] zeigten bereits 1995, dass die Extraktionsausbeute von Opiaten aus Haarproben stark von dem verwendeten Lösemittel abhängt. Mit polar protischen Lösemitteln, wie Wasser oder Methanol, wurden bei vergleichenden Untersuchungen die besten Ausbeuten gefunden. Es ist naheliegend, dass neben dem Extraktionsmittel auch die Zerkleinerung der Haare einen großen Einfluss auf die ermittelten Konzentrationen hat. Je besser die Haarmatrix aufgeschlossen wird, desto besser und schneller können die Analyten herausgelöst werden. Eine vergleichende Bestimmung von EtG-Konzentrationen in mit einer Schere klein geschnittenen sowie gemahlene Haaren soll zeigen, ob eine starke Abhängigkeit der gemessenen Konzentrationen vom gewählten Zerkleinerungsverfahren besteht.

7.2.1 Einbezogene Proben und durchgeführte Analysen

Ausgewählt wurden 40 Haarsegmente, von denen 35 bereits im Rahmen von Routineanalysen positiv auf EtG ($c_{\text{EtG}} = 10 - 126$ pg/mg) getestet wurden. Nach dem Waschen der Haare wurden die Segmente in zwei Strähnen aufgeteilt. Eine Hälfte der Haare wurde

mit der Schere klein geschnitten (1–5 mm), die andere Hälfte mit dem Homogenisierungssystem zerkleinert. Die weiteren Extraktionsschritte waren identisch (siehe Abschnitt 6.3.2). In 16 Fällen war zu wenig Haar für zwei weitere Analysen vorhanden. Daher wurde das gesamte Haarmaterial gemahlen und die bestimmten EtG-Konzentrationen mit den ursprünglich in geschnittenen Haaren ermittelten Konzentrationen verglichen. Sechs negativ auf EtG getestete Haarsegmente ($c_{\text{EtG}} < 1 \text{ pg/mg}$) wurden zusätzlich gemahlen und analysiert, um eine mögliche Bildung von EtG während des Zerkleinerungsprozesses auszuschließen. Zur Bestimmung der Präzision beider Methoden wurden gewaschene Haarproben von zwei weiteren Personen in jeweils sechs Portionen aufgeteilt. Drei Portionen wurden mit der Schere klein geschnitten und drei wurden gemahlen. Abbildung 7.3 zeigt MRM-Chromatogramme von einer negativ sowie einer positiv getesteten authentischen Haarprobe, jeweils mit der Schere klein geschnitten sowie gemahlen.

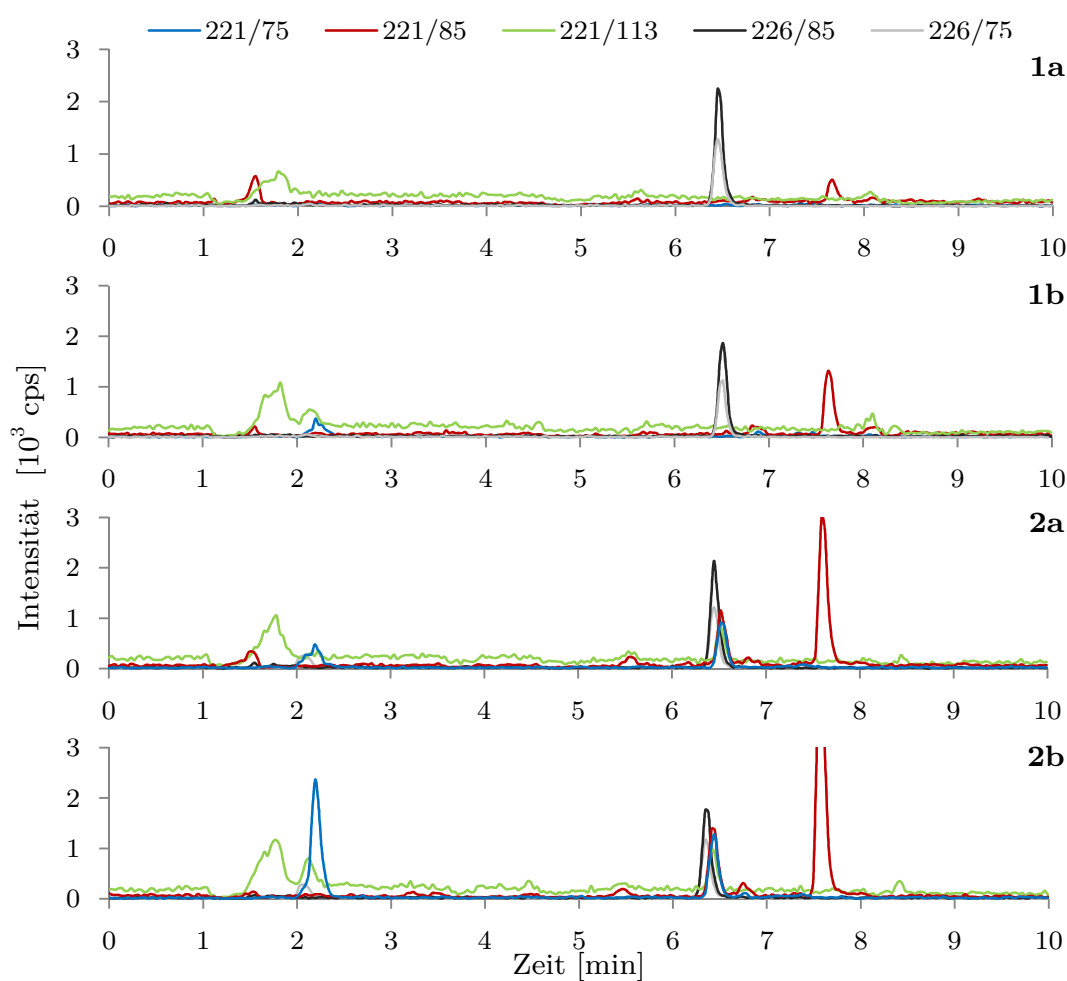


Abbildung 7.3: MRM-Chromatogramme von einer negativ (1) sowie einer positiv (2) getesteten authentischen Haarprobe, analysiert im geschnittenen (a) bzw. im gemahlenden (b) Zustand.

Tabelle 7.1: Alle gemessene EtG-Konzentrationen beim Vergleich von geschnittenen und gemahlten Haaren sowie berechnete Differenzen und prozentuale Abweichungen.

Nr.	Seg. neu [cm]	c _{EtG} gem. [pg/mg]	c _{EtG} ges. [pg/mg]	c _{EtG} gem. - c _{EtG} ges. [pg/mg]	Abw. c _{EtG} gem. [%]	Seg. alt [cm]	c _{EtG} alt [pg/mg]	c _{EtG} gem. - c _{EtG} alt [pg/mg]	Abw. c _{EtG} gem. [%]	c _{EtG} ges. - c _{EtG} alt [pg/mg]	Abw. c _{EtG} ges. [%]
1	0-4	149,2	53,8	95,4	177	0-3	42,0	107,2	255	-	-
2	0-4	104,0	85,3	18,6	22	0-3	56,2	47,7	85	-	-
3	0-3	139,2	108,2	31,0	29	0-3	111,2	28,0	25	-3,0	3
4	0-3	20,0	19,1	0,9	5	0-3	19,0	1,0	5	0,1	0
5	0-1	12,7	12,4	0,3	3	0-1	12,0	0,7	6	0,4	3
6	0-3	88,8	73,6	15,2	21	0-3	78,0	10,8	14	-4,4	-6
7	0-3	135,8	140,3	-4,5	-3	0-4	54,0	81,8	152	-	-
8	0-3	43,0	30,3	12,7	42	0-3	16,0	27,0	169	14,3	89
9	0-3	17,6	17,2	0,4	2	0-3	14,0	3,6	26	3,2	23
10	0-3	14,1	11,2	2,9	26	0-3	18,0	-3,9	-22	-6,8	-38
11	0-3	25,0	14,9	10,0	67	0-3	16,3	8,7	53	-1,4	-9
12	0-3,5	37,3	19,0	18,3	96	0-3,5	16,9	20,4	121	2,1	13
13	0-3,5	30,8	16,0	14,9	93	0-3,5	16,9	13,9	82	-0,9	-5
14	0-2	38,2	24,2	14,1	58	0-2	45,3	-7,1	-16	-21,2	-47
15	0-3	60,0	21,4	38,6	181	0-3	50,5	9,6	19	-29,1	-58
16	0-3	52,0	30,8	21,2	69	0-3	21,7	30,3	139	9,1	42
17	0-3	60,9	43,4	17,4	40	0-3	24,4	36,4	149	19,0	78
18	0-3	42,3	30,0	12,3	41	0-3	24,4	17,9	73	5,6	23
19	0-3	21,9	13,4	8,5	63	0-3	10,6	11,3	107	2,8	27
20	3-5,5	129,7	104,8	25,0	24	-	-	-	-	-	-
21	3-5	74,5	64,0	10,5	16	-	-	-	-	-	-
22	3-6	34,0	18,9	15,1	79	-	-	-	-	-	-
23	3-6	49,9	38,3	11,6	30	-	-	-	-	-	-
24	3-5	46,1	38,6	7,6	20	-	-	-	-	-	-
25	0-3	92,6	-	-	-	0-3	51,0	41,6	82	-	-
26	0-3	28,8	-	-	-	0-3	26,0	2,8	11	-	-
27	0-3	20,7	-	-	-	0-3	15,2	5,5	36	-	-
28	0-3	15,2	-	-	-	0-3	10,8	4,4	41	-	-
29	0-3	68,3	-	-	-	0-3	28,0	40,3	144	-	-
30	0-3	65,7	-	-	-	0-3	65,0	0,7	1	-	-
31	0-3	146,3	-	-	-	0-3	75,0	71,3	95	-	-
32	0-2	62,6	-	-	-	0-2	66,0	-3,4	-5	-	-
33	0-3	16,2	-	-	-	0-3	17,0	-0,8	-5	-	-
34	0-3	30,8	-	-	-	0-3	25,0	5,8	23	-	-
35	0-3	19,1	-	-	-	0-3	10,6	8,5	80	-	-
36	0-3	49,1	-	-	-	0-3	22,1	27,0	122	-	-
37	0-3	66,9	-	-	-	0-3	25,3	41,6	165	-	-
38	0-3	44,1	-	-	-	0-3	45,0	-0,8	-2	-	-
39	0-3	175,4	-	-	-	0-3	129,0	46,4	36	-	-
40	0-3	36,3	-	-	-	0-3	30,0	6,3	21	-	-

Seg. neu: Segmentlängen für die Studie analysiert, **c_{EtG} gem.:** EtG-Konzentration (Konz.) im gemahlten Haar, **c_{EtG} ges.:** EtG-Konz. im geschnittenen Haar, **c_{EtG} gem. - c_{EtG} ges.:** Differenz der EtG-Konz., **Abw. c_{EtG} gem.:** Prozentuale Abweichung der EtG-Konz. im gemahlten Haar, **Seg. alt:** Segmentlängen der vorherig analysierten Haare, **c_{EtG} alt:** EtG-Konz. der vorherig analysierten Haare (geschnitten), **c_{EtG} gem. - c_{EtG} alt:** Differenz der EtG-Konz. in gemahlten Haaren und vorherig bestimmten EtG-Konz., **Abw. c_{EtG} gem.:** Prozentuale Abweichung der EtG-Konz. in gemahlten Haaren von den vorherig bestimmten EtG-Konz., **c_{EtG} ges. - c_{EtG} alt:** Differenz der EtG-Konz. der geschnittenen Haare für die Studie und vorherig analysiert, **Abw. c_{EtG} ges.:** Prozentuale Abweichung der EtG-Konz. in geschnittenen Haaren von den vorherig bestimmten EtG-Konz.

7.2.2 Ergebnisse

Bei 36 der 40 untersuchten Haarsegmente wurden die größeren Konzentrationen in den gemahlten Proben gefunden. Bei den übrigen vier Proben wurden in den mit der Schere zerkleinerten Haaren um 0,8–4,5 pg/mg höhere EtG-Konzentrationen gemessen. Die berechneten prozentualen Abweichungen variierten zwischen 5 und 188% (MW: 47%, Median: 33%). Alle gemessenen Konzentrationen sowie Differenzen und prozentuale Abweichungen sind in Tabelle 7.1 aufgeführt.

Zur Überprüfung der Signifikanz wurde ein Wilcoxon-Test für gepaarte Analysen durchgeführt. Die Berechnung wurde mittels SPSS [300] unter Verwendung eines 95%-Konfidenzintervalls durchgeführt. Ein Signifikanzniveau von $< 0,001$ bedeutet eine hoch signifikante Abhängigkeit der gemessenen EtG-Konzentration von der gewählten Zerkleinerungsmethode. Die Mittelwerte sowie prozentuale Abweichungen der gemessenen Konzentrationen und der bestimmten Differenzen sind in Tabelle 7.2 zusammengefasst.

Tabelle 7.2: Deskriptive Statistik für die ermittelten EtG-Konzentrationen sowie Konzentrationsdifferenzen in geschnittenen und gemahlten Haaren.

		c_{EtG} gem. alle	c_{EtG} ges. alle	c_{EtG} ges. neu	c_{EtG} ges. alt	c_{EtG} gem. - c_{EtG} ges.	c_{EtG} gem. - c_{EtG} neu	c_{EtG} gem. - c_{EtG} alt
Anzahl		40	40	24	35	40	24	32
Bereich	[pg/mg]	13 - 175	11 - 140	11 - 140	11 - 129	-5 - +95	5 - +95	-7 - +71
	Abw. [%]					-5 - +181	-3 - +181	-22 - +169
MW	[pg/mg]	59,1	41,7	42,9	36,8	17,4	16,6	15,8
	Abw. [%]					51,2	50,1	56,1
Median	[pg/mg]	45,1	29,0	30,1	25,0	12,0	13,4	9,1
	Abw. [%]					36,1	35,2	36,1

Abw.: Abweichung, **c_{EtG} gem. alle**: EtG-Konzentrationen (Konz.) aller in die Statistik einbezogenen gemahlten Haare, **c_{EtG} ges. alle**: EtG-Konz. aller in die Statistik einbezogenen geschnittenen Haare, **c_{EtG} ges. neu**: EtG-Konz. der geschnittenen Haare aus der Studie, **c_{EtG} ges. alt**: EtG-Konz. der geschnittenen Haare aus vorherigen Messungen

In 16 Fällen wurden die in gemahlten Haaren bestimmten EtG-Konzentration ausschließlich mit den ursprünglichen Ergebnissen verglichen. Zwischen den direkten Vergleichen (-5–+65%) und den Vergleichen mit ursprünglichen Messungen (-3–+181%) konnten keine großen Unterschiede der prozentualen Abweichungen gefunden werden. Die Mittelwerte (direkter Vergleich: 50%; Vergleich mit ursprünglichen Konzentrationen: 53%) bzw. Mediane (direkter Vergleich: 35%; Vergleich mit ursprünglichen Konzentrationen: 36%) weichen lediglich um 3 bzw. 1% voneinander ab.

In 19 Fällen wurden die EtG-Konzentrationen in klein geschnittenen Haaren sowohl für die Studie als auch im Vorfeld bestimmt. Übereinstimmende Ergebnisse mit Abweichungen $\leq 21\%$ wurden in zehn Fällen gefunden. Große Abweichungen zwischen 29 und 136% wurden bei der wiederholten Analyse von sechs Haarsegmenten erhalten. In den übrigen drei Fällen wurden verschieden lange Segmente analysiert, so dass ein Vergleich der ermittelten Konzentrationen nicht möglich war.

In fünf Fällen wurden zusätzliche Segmente von positiv getesteten Personen analysiert. Vergleichsdaten von vorherigen Messungen existieren nicht.

In keiner der sechs negativ getesteten Haarsegmente konnte nach dem Einsatz des Homogenisationssystems EtG nachgewiesen werden. Die jeweils dreifache Analyse zweier Haarproben ergab um durchschnittlich 48,4 und 83,1% höhere EtG-Konzentrationen in den gemahlten Haaren. Beide Zerkleinerungsmethoden zeigten dabei eine gute Präzision mit Abweichungen $\leq 10,1\%$. Tabelle 7.3 zeigt die gemessenen Konzentrationen sowie die berechneten Standardabweichungen.

Tabelle 7.3: Vergleich der Präzisionen von beiden Zerkleinerungsmethoden durch dreifache Analyse zweier positiv getesteter Haarproben.

	Gemahlen		Geschnitten	
	Nr. 1	Nr. 2	Nr. 1	Nr. 2
$c_{\text{EtG 1}}$ [pg/mg]	10,3	65,7	5,9	42,1
$c_{\text{EtG 2}}$ [pg/mg]	10,2	60,6	6,6	40,1
$c_{\text{EtG 3}}$ [pg/mg]	12,0	63,1	5,4	45,7
MW c_{EtG} [pg/mg]	10,8	63,2	5,9	42,6
SD c_{EtG} [pg/mg]	1,0	2,5	0,6	2,8
RSD c_{EtG} [%]	9,6	4,0	10,1	6,7

7.2.3 Diskussion

Sowohl in den gemahlten als auch in den geschnittenen Haaren konnte EtG ohne größere Probleme nachgewiesen werden. Jedoch wurden z.T. sehr große Unterschiede bei den bestimmten EtG-Konzentrationen mit Abweichungen von bis zu 181% ermittelt. In einem Großteil der Fälle (90%) wurden dabei höhere Konzentrationen in den gemahlten Haaren nachgewiesen. Eine bessere Extraktion aus der deutlich feiner zerkleinerten Haarmatrix ist eine plausible Erklärung für diese Steigerung.

Bisher ist nur eine Studie zum Einfluss der Zerkleinerung von Haaren auf die späteren Ergebnisse veröffentlicht worden. Eser et al. [301] fanden 1997 deutlich höhere Konzentrationen von Opiaten, Kokain und Benzoylcegonin in gemahlten Haaren im Gegensatz zu klein geschnittenen. Zudem konnte in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Rothe und Pragst [299] eine starke Abhängigkeit der Extraktionsausbeuten vom verwendeten Lösemittel nachgewiesen werden. Kronstrand et al. [1] zeigten 2012, dass bei gemahlten Haaren eine vollständige Extraktion des EtG nach 4 h Schütteln erreicht wird. In klein geschnittenen Haaren wurde jedoch erst nach 18 h Schütteln eine Extraktionsausbeute von 85% erreicht. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine zweistündige Extraktion im Ultraschallbad durchgeführt, die nach Kharbouche et al. [184] ebenfalls zu einem nahezu vollständigen Herauslösen des EtG aus der pulverisierten Haarmatrix führt. Eine Bildung von EtG während des Mahlverfahrens konnte durch die zusätzliche Analyse von negativ getesteten Haaren im gemahlten Zustand ausgeschlossen werden.

Eine genauere Betrachtung der Ergebnisse zeigt, dass es keinen großen Unterschied macht, ob ein direkter Vergleich zwischen geschnittenen und gemahlten Haaren angestellt wurde oder ob auf die ursprünglichen Daten zurückgegriffen werden musste. Auffällig ist die große Variation der ermittelten Konzentrationsdifferenzen zwischen -4,5 und 95 pg/mg. Auch bei einem ausschließlichen Vergleich der Ergebnisse von mehrfach analysierten geschnittenen Haarproben wurden in 37,5% der Fälle große Abweichungen festgestellt.

Im Rahmen der Validierung wurden gute Präzisions- und Genauigkeitsdaten für den Nachweis von EtG in Haaren bestimmt (siehe Abschnitt 6.3.4). Zusätzlich durchgeführte Präzisionsuntersuchungen führten bei einer dreifachen Analyse der gleichen Haarprobe, unabhängig von der Einwaage (50–87 mg), sowohl bei gemahlene als auch geschnittenen Haaren zu übereinstimmenden Ergebnissen mit Abweichungen $\leq 10,1\%$. Die ermittelten großen Variationen der gefundenen Differenzen sind daher mit großer Wahrscheinlichkeit auf die Inhomogenität der Haarmatrix zurückzuführen. Wie im theoretischen Teil der Arbeit (Abschnitt 4.5.2) beschrieben wurde, wachsen Haare in einem dreistufigen Zyklus. In entnommenen Haarsträhnen können daher unterschiedliche Anteile von Haare in den drei Wachstumsphasen vorliegen. Während bei direkten Vergleichen ein genau übereinstimmendes Segment untersucht wurde, kann es bei zeitversetzten Analysen zudem zu einem Verschieben der Haare gekommen sein. Beides führt zu einer leichten Änderung des Zeitfensters, welches über das analysierte Haarsegment untersucht wurde. Diese Vermutung konnte durch die Analyse von überschüssigen Haaren, die bereits für die erste Analyse segmentiert und gewaschen wurden, bekräftigt werden. Bei der Bestimmung von EtG in Haaren aus identischen Segmenten konnten deutlich geringere Abweichungen ermittelt werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass die ermittelten EtG-Konzentrationen von der gewählten Zerkleinerungsmethode abhängig sind und durch die Inhomogenität der Haarmatrix stark beeinflusst werden. Eine verlässliche Entnahme sowie Aufarbeitung der Haare von qualifiziertem Fachpersonal ist entscheidend für ein richtiges und reproduzierbares Ergebnis. Methodenabhängige Grenzwerte oder eine Standardisierung des Nachweisverfahrens könnten für eine weitere Verbesserung der diagnostischen Genauigkeit sorgen. Weitere Studien sind nötig, um die Bedeutung sowie die Auswirkungen solcher Vorgehensweisen gänzlich beurteilen zu können.

7.3 Vergleichende Bestimmung von EtG und FAEE in Haaren aus Abstinenzuntersuchungen

Die Bestimmung von EtG in Haaren wird häufig im Rahmen von Abstinenzuntersuchungen sowie zur Unterscheidung von moderatem und exzessivem Alkoholkonsum eingesetzt. Es besteht jedoch ein begründeter Verdacht, dass bestimmte Haarbehandlungen (wie z. B. Bleichen oder Färben [29–31], häufiges Waschen [29, 181, 201] oder die Anwendung alkoholhaltiger Haarwasser [23, 24]) die EtG-Konzentration im Haar beeinflussen können (siehe auch S. 34 und S. 42). Eine Absicherung der Ergebnisse durch einen zweiten, unabhängigen Marker würde die Aussagekraft sowie die Verlässlichkeit der Befunde deutlich erhöhen [24, 196, 201]. Aufgrund der konträren Eigenschaften sowie des abweichenden Bildungsweges und Einlagerungsmechanismus in die Haarmatrix stellt die Bestimmung von FAEE eine potentielle Möglichkeit dar, die EtG-Befunde abzusichern. In der durchgeführten Studie wurden für Haarproben, die im Rahmen von Abstinenzuntersuchungen bereits auf EtG untersucht worden waren, die FAEE-Konzentrationen bestimmt, um den Grad der Übereinstimmung zu ermitteln.

7.3.1 Einbezogene Proben und durchgeführte Analysen

Von den 835 Haarproben, bei denen im Rahmen von Abstinenzuntersuchungen die EtG-Konzentration ermittelt worden waren, wurden 160 Proben aus dem Zeitraum Januar bis Mai 2010 zufällig ausgewählt und zusätzlich die Konzentrationen der vier FAEE: Ethylmyristat, Ethylpalmitat, Ethyloleat und Ethylstearat bestimmt. In einem zweiten Schritt wurden 73 weitere Haarproben mit EtG-Konzentrationen zwischen 4 und 10 pg/mg ausgewählt und auf FAEE untersucht. Die EtG- sowie die FAEE-Konzentrationen wurden mit in den Abschnitten 6.3 und 6.4 beschriebenen Methoden ermittelt. Für die Bestimmung der EtG-Konzentrationen wurde ausschließlich die zuerst entwickelte Methode (Säule: Polar RP) verwendet. Vergleiche der EtG- und FAEE-Konzentrationen mit dem Alkoholkonsum konnten nicht angestellt werden, da die Daten aus Abstinenzuntersuchungen stammten und daher keine verlässlichen Selbstauskünfte zum Alkoholkonsum existierten.

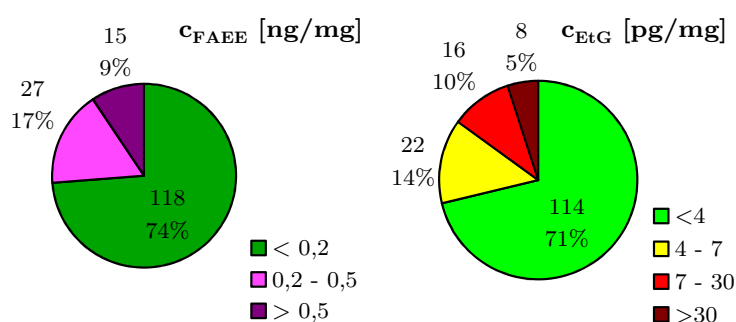


Abbildung 7.4: Verteilung der ermittelten FAEE- (links) und EtG- (rechts) Konzentrationen von 160 im Rahmen von Abstinenzuntersuchungen analysierten Haarproben.

7.3.2 Ergebnisse

85% der 160 Proben wurden negativ auf EtG ($c_{\text{EtG}} < 7 \text{ pg/mg}$) getestet. Bei 71% der Proben wurden Konzentrationen unterhalb von 4 pg/mg gemessen. Lediglich in acht Fällen wurden Konzentrationen $> 30 \text{ pg/mg}$ nachgewiesen, die auf einen Alkoholmissbrauch hindeuten. Ein ähnliches Bild zeigte die Verteilung der FAEE-Konzentrationen. Unter Berücksichtigung des von der SoHT empfohlenen Grenzwertes ($c_{\text{FAEE}} = 0,2 \text{ ng/mg}$) wurden knapp 3/4 der Proben negativ getestet. Die Ergebnisse der restlichen Proben deuteten auf einen moderaten (17%) bzw. exzessiven (9%) Konsum von Alkohol hin. Die Verteilungen der ermittelten Konzentrationen, eingeteilt nach den aktuell geltenden Grenzwerten, sind in Abbildung 7.4 dargestellt. Abbildung 7.5 zeigt einen direkten Vergleich der gemessenen EtG- und FAEE-Konzentrationen sowie eine vergleichende Bewertung der 160 Haarproben als Neunfeldertafel. In 109 Fällen (68%) lagen sowohl die EtG- als auch die FAEE-Konzentration unterhalb der Grenzwerte für Abstinenzuntersuchungen. Ein sicherer Nachweis eines Alkoholkonsums durch beide Marker ist in 15 (9%) Fällen gelungen.

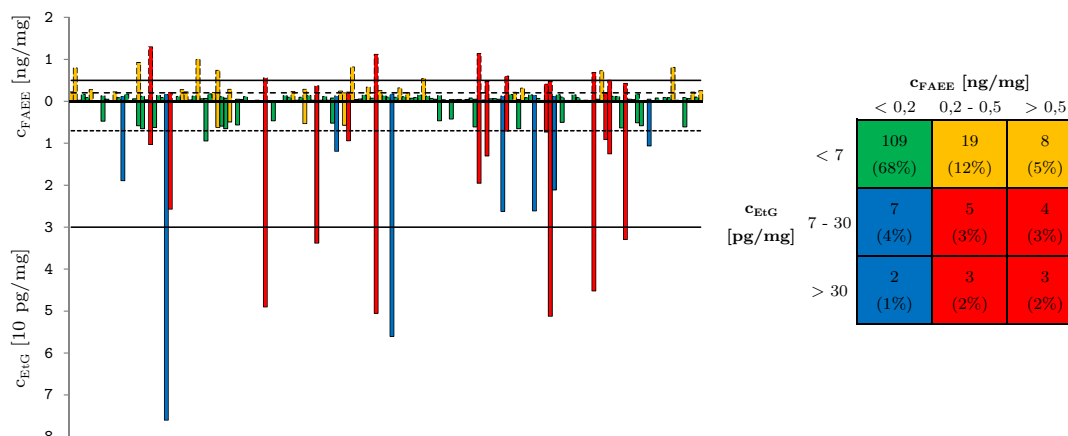


Abbildung 7.5: Links: gemessene EtG- und FAEE-Konzentrationen in den 160 Haarproben aus Abstinenzuntersuchungen. Die waagerechten Linien kennzeichnen die jeweiligen Grenzwerte (EtG: 7 und 30 pg/mg, FAEE: 0,2 und 0,5 ng/mg). Die Balken wurden je nach Einteilung der beiden Marker farblich markiert: grün: beide Marker im Abstinenzbereich, rot: beide Marker positiv getestet, gelb: $c_{EtG} < 7$ pg/mg und $c_{FAEE} > 0,2$ ng/mg, gelb: $c_{EtG} > 7$ pg/mg und $c_{FAEE} < 0,2$ ng/mg. Rechts: Neunfeldertafel mit Vergleichsdaten.

56 der 73 Haarproben mit EtG-Konzentrationen zwischen 4 und 10 pg/mg waren im Vorfeld negativ $c_{EtG} < 7$ pg/mg getestet worden. Übereinstimmende FAEE-Resultate wurden in 53 Fällen (72,6%) gefunden. FAEE-Konzentrationen $> 0,2$ ng/mg ergaben sich in 13 Proben (17,8%), die negativ auf EtG getestet wurden. In sieben Proben (9,5%) konnten EtG-Konzentrationen > 7 pg/mg nachgewiesen werden, die Summe der vier FAEE lag jedoch unterhalb des Grenzwertes von 0,2 ng/mg. Abbildung 7.6 zeigt einen Vergleich der ermittelten EtG- und FAEE-Konzentrationen, sortiert nach den EtG-Konzentrationen sowie eine Kreuztabelle mit den erhaltenen Ergebnissen.

7.3.3 Diskussion

Wie es für Abstinenzuntersuchungen zu erwarten ist, wurden in einem Großteil der 160 Fälle (68%) negative Ergebnisse für beide Marker gefunden. Ein Verzicht auf Alkohol oder ein lediglich sehr geringer Konsum ist höchst wahrscheinlich. Bei den 15 Fällen (9%), in denen beide Marker positiv getestet worden sind, kann ein Konsum von Alkohol als bewiesen angesehen werden. In 53% dieser Fälle konnte eindeutig zwischen einem moderaten und einem exzessiven Konsum unterschieden werden. In 27 Fällen (16,9%) wurden negative EtG-Befunde in Kombination mit FAEE-Konzentrationen $> 0,2$ ng/mg gefunden. Die entgegengesetzte Situation lag in neun Fällen (5,6%) vor. Abbildung 7.7 zeigt die Verteilung der Ergebnisse graphisch dargestellt.

Während in Fällen mit EtG-Konzentrationen unterhalb des LOQ oder weit oberhalb des Grenzwertes von 7 pg/mg eindeutige Ergebnisse vorliegen, ist bei Ergebnissen in der Nähe des Grenzwertes größere Vorsicht geboten. In 72,6% der 73 Fälle mit grenzwertigen EtG-Konzentrationen (4–10 pg/mg) konnten übereinstimmende Ergebnisse erzielt

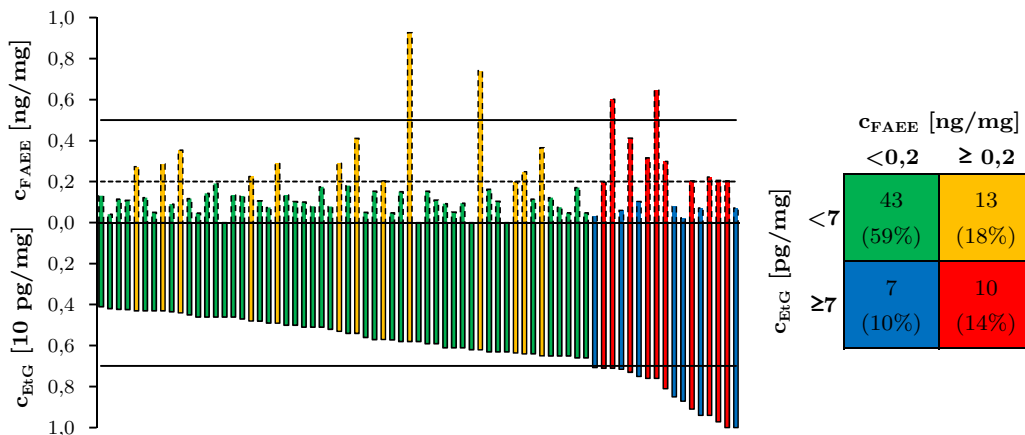


Abbildung 7.6: Vergleichende Untersuchung von Haarproben mit EtG-Konzentrationen zwischen 4 und 10 pg/mg. Links: gemessene EtG- und FAEE-Konzentrationen, sortiert nach den EtG-Konzentrationen; rechts: Vierfeldertafel mit der Anzahl an übereinstimmenden und abweichenden Resultaten.

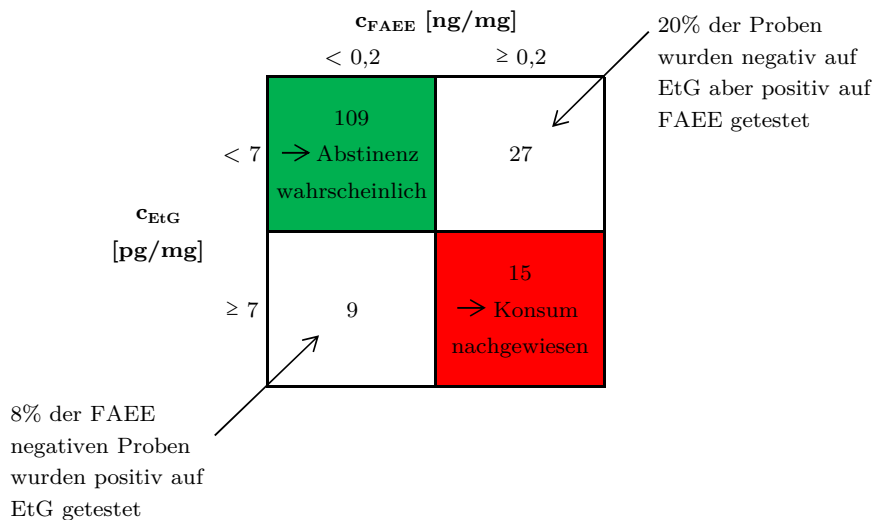


Abbildung 7.7: Verteilung der 160 Fälle in solche, in denen beide Marker übereinstimmen, bzw. in Fälle ohne eindeutiges Ergebnis.

werden. 17,8% wurden negativ auf EtG und positiv auf FAEE getestet sowie 9,5% in der umgekehrten Kombination. Die bestimmten Anteile stimmen mit der gefundenen Verteilung für die 160 zufällig ausgewählten Proben überein. Es scheint keinen großen Unterschied zu machen, ob zufällig ausgewählte Proben oder Proben in einem bestimmten Konzentrationsbereich mit in die vergleichenden Analysen einbezogen werden.

Die festgestellten Ergebnisse stimmen gut mit den Resultaten zweier vorheriger Studien von Pragst et al. [187, 206] überein, die bei einer vergleichenden Bestimmung von EtG und FAEE in 180 bzw. 174 Haarproben zur Fahreignungsbegutachtung übereinstimmende Ergebnisse in 76,6% bzw. 75,3% der Fälle ermitteln konnten, obwohl abweichende Grenzwerte von 25 pg/mg für EtG und 0,5 ng/mg für FAEE zur Bewertung der gefundenen Konzentrationen im proximalen 0–6 cm Segment verwendet wurden.

Während die 77,5% bzw. 72,6% der Fälle, in denen übereinstimmende Resultate ermittelt wurden, kein weiterer Diskussionsbedarf besteht, werden im Folgenden mögliche Gründe für die abweichenden Befunde bei den übrigen Proben dargelegt.

Dass in ca. 1/5 der negativ auf EtG getesteten Proben FAEE-Konzentrationen $> 0,2$ ng/mg gefunden wurden, steht im Einklang mit vorherigen Studien, die zu dem Ergebnis kamen, dass FAEE-Konzentrationen bis zu 0,4 ng/mg [53, 234, 236] auch in den Haaren von abstinenten Personen vorkommen können. Die Einlagerung über das Sebum, die durch eine Zeitdifferenz von acht Tagen zwischen Bildung und Absonderung verzögert stattfindet, könnte dies bei einem kurzzeitig zurückliegenden Abstinenzbeginn erklären [237]. Bis zu 28 Tage nach einem letztmaligen Alkoholkonsum konnten noch erhöhte FAEE-Konzentrationen im Sebum nachgewiesen werden [233].

Eine externe Kontamination ist ein weiterer möglicher Grund für die gefundenen Abweichungen. Wie bereits im theoretischen Teil der Arbeit (Abschnitte 4.3.4 und 4.4.2) beschrieben, können die Konzentrationen beider Marker durch Haarbehandlungen beeinflusst werden. Falsch positive Befunde könnten auf das Verwenden von Alkohol- oder FAEE-haltigen Haarpflegeprodukten zurückzuführen sein [26–28]. Aber auch ein Auswaschen des EtG durch ein Bleichen, Färben [29–31] oder häufiges Shampooieren [29, 181, 201] der Haare könnte einen positiven FAEE-Befund in Kombination mit einem negativen EtG-Ergebnis erzeugen. Aufgrund der genannten äußeren Einflüsse ist ein Ausschluss einer Abstinenz in diesen Fällen nicht möglich.

Schwieriger ist es, die Fälle zu begründen, in denen ein negativer FAEE-Befund mit einer EtG-Konzentration > 7 pg/mg zusammenfällt. Ein Nachweis von EtG ist ein deutlicher Hinweis auf einen wiederholten Konsum von Alkohol [197, 205]. Eine Einlagerung von EtG in die Haare nach dem Konsum von alkoholhaltigen Lebensmitteln konnte bisher nicht nachgewiesen werden [197]. Es existieren widersprüchliche Ergebnisse, ob EtG nach dem regelmäßigen Gebrauch von alkoholhaltigem Haarwasser in den Haaren nachweisbar ist [23–25]. FAEE werden zudem durch Haarbehandlungen wie Färben, Bleichen oder Dauerwellen nur in geringem Maße aus den Haaren entfernt [28]. Eine Abhängigkeit der Konzentrationen in Haaren vom Melaningehalt konnte sowohl für EtG [198, 200] als auch für die FAEE [241] ausgeschlossen werden.

Weitere Gründe für die nicht vorhandenen Übereinstimmungen könnten die unterschiedlichen Bildungswege von EtG und FAEE sowie die verschiedenen Einlagerungsmechanismen in die Haarmatrix sein [29]. Während EtG hauptsächlich in der Leber gebildet wird [66] und über den Schweiß in den proximalen Bereich der Haare eingelagert

wird [29], konnte eine FAEE-Synthase-Aktivität fast überall im Körper nachgewiesen werden [211–214]. Die Einlagerung über das Sebum, dessen Entstehung abhängig von Alter, Geschlecht und Jahreszeit variiert, erfolgt nahezu über die gesamte Haarlänge [236]. Durch Polymorphismen im Genom kann die Bildung beider Marker beeinflusst werden [67, 302]. Zudem gibt es Hinweise, dass ein chronischer Alkoholkonsum die Bildung der FAEE verändert [216, 218]. Diese Unterschiede sowie die möglichen Einflüsse der Haarbehandlungen erklären auch, dass eine Korrelation zwischen den absoluten EtG- und FAEE-Konzentrationen übereinstimmend mit früheren Studien nicht gefunden werden konnte [29, 187].

Trotz einer fehlenden direkten Korrelation zwischen den gemessenen Konzentrationen der beiden Marker konnte eine übereinstimmende Bewertung der EtG- und FAEE-Konzentrationen in ca. 3/4 der Fälle beobachtet werden. Eine vollständige Vermeidung von falsch positiven bzw. falsch negativen Befunden kann aufgrund der vielen Einflussfaktoren nicht erreicht werden. EtG scheint infolge des geringeren Risikos eines falsch positiven Ergebnisses der verlässlichere Marker zu sein, der primär für Abstinenzuntersuchungen verwendet werden sollte. Dass lediglich $\leq 10\%$ Proben negativ auf FAEE, aber positiv auf EtG getestet wurden, verdeutlicht dies. Eine Bestimmung der FAEE-Konzentration kann in unklaren Fällen zur Absicherung des Ergebnisses durchgeführt werden. Von Vorteil sind dabei die konträren Eigenschaften der beiden Marker, wodurch sie sich gut ergänzen. Aufgrund der beschriebenen externen Einflüsse sowie grundsätzlicher Probleme bei der Analyse der sehr inhomogenen Haarmatrix [303–305] können weitere Untersuchungsergebnisse (z. B. klassische Biomarker) sowie Auskünfte der betroffenen Person eine weitere Verbesserung der diagnostischen Genauigkeit bringen [24, 196]. Pragst et al. [306] verdeutlichen die Erfordernis solcher Absicherungen im Zusammenhang mit der Vorstellung eines Falls, in dem eine Frau zwar deutlich positiv auf EtG getestet wurde, einen exzessiven Konsum von Alkohol jedoch vehement abstrikt. Aufgrund der bestehenden Risiken für falsch positive Resultate sowie weiterer negativer Untersuchungsergebnisse (u.a. FAEE, klassische Biomarker) wurde der positive EtG-Befund bei der abschließenden Beurteilung nicht berücksichtigt.

7.4 Vergleichende Bestimmung von EtG- und FAEE-Konzentrationen in Haaren von Alkoholikern

Neben der vergleichenden Bestimmung von EtG und FAEE im Rahmen von Abstinenzuntersuchungen wurden die Konzentrationen der beiden Alkoholmarker in Haaren von Alkoholikern bestimmt und untereinander sowie mit den persönlichen Angaben zum Trinkverhalten verglichen.

7.4.1 Einbezogene Proben

Alle 73 Haarproben stammten von Patienten der Abteilung für Abhängigkeitserkrankungen und Psychotherapie der Rheinischen Landeskliniken in Bonn. Die Proben wurden in einem Zeitraum von fünf Monaten von Patienten entnommen, die sich in einem stationären Alkoholentzug befanden. Persönliche Informationen wurden durch Befragungen

der Patienten erhalten sowie aus den Krankenakten entnommen. Unter den Teilnehmern waren 27 Frauen (37%) und 46 Männer (63%). Eine Übersicht über weitere persönliche Daten der Teilnehmer (Alter, Größe, Gewicht, Body-Mass-Index (BMI) und Haarlänge) ist in Tabelle 7.4 zu finden. Der überwiegende Teil der Haarproben (94,5%) hatte eine braune Farbe mit einer Spanne von hellbraun über rotbraun zu dunkelbraun, z. T. mit einem mehr oder weniger großen Anteil an weißen Haaren. Alle Patienten wurden über die Studie aufgeklärt und nahmen freiwillig an dieser teil. Die Durchführung der Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Bonn genehmigt.

Tabelle 7.4: Persönliche Daten der Patienten aus der Entzugsklinik, die an der Studie teilgenommen haben. Der komplette Datensatz stand nicht von allen Teilnehmern zu Verfügung. Die angegebene Anzahl gibt an, wie viele Daten in die jeweilige Berechnung von Mittelwert und Median einbezogen wurden.

	Anzahl	Bereich	MW	Median
Alter [Jahre]	72	22-60	47,0	46
Größe [cm]	54	152-186	172	172
Gewicht [kg]	54	46-113	72,7	70
BMI [kg/m²]	54	15-34	24,5	24.6
Haarlänge [cm]	73	3-35	11,6	8.5

7.4.2 Durchgeführte Analysen

Alle Haarproben wurden mittels der validierten Methoden (siehe Abschnitte 6.3 und 6.4) auf EtG und FAEE untersucht. Die jeweiligen Segmente wurden in zwei Haarstränge aufgeteilt, welche nach den jeweiligen Vorschriften aufgearbeitet und analysiert wurden. Die Proben wurden in zwei Messreihen analysiert. Zuerst wurden die Proben von 20 Patienten, unterteilt in 80 Segmente zwischen 1 und 15 cm Länge (MW: 2,3 cm, Median: 2,0 cm), untersucht. Bei distalen Segmenten wurden, aufgrund der größeren Unsicherheiten bei den Selbstauskünften sowie der verstärkten Auswirkung von Schwankungen im Haarwachstum, längere Abschnitte gewählt. Haarproben von 53 Teilnehmern, unterteilt in 167 Segmente mit Längen zwischen 2 und 16 cm (MW: 3,8 cm, Median: 3,0 cm), wurden in der zweiten Messreihe analysiert. Während in der ersten Messreihe alle Haare mit der Schere zerkleinert wurden, kam in der zweiten Messreihe das automatische Homogenisationssystem bei der Bestimmung der EtG-Konzentrationen zum Einsatz.

Aus den Angaben der Patienten wurden die jeweiligen Trinkmengen berechnet. Neben Art und Menge des konsumierten Alkohols wurden eventuelle Entzüge und Trinkpausen mit einbezogen. Zusätzlich wurden folgende Annahmen getroffen: Eine Flasche Sekt, Wein oder Spirituosen entspricht 1 L Flüssigkeit. Eine Flasche Bier enthält 0,5 L und eine kleine Flasche Kräuterlikör 20 mL. Als Alkoholgehalte wurden folgende Werte angenommen: Bier 5%, Wein/Sekt 12% und Spirituosen 40%. Mit folgender Formel wurde daraus die durchschnittlich konsumierte Alkoholmenge pro Tag berechnet.

$$m_{\text{EtOH}} = \sigma_{\text{EtOH}} \cdot \rho_{\text{EtOH}} \cdot V_{\text{Alkohol}} \quad (7.1)$$

m_{EtOH} – Durchschnittliche Alkoholmenge pro Tag

σ_{EtOH} – Volumenkonzentration von Ethanol des entsprechenden Getränks

ρ_{EtOH} – Dichte von Ethanol ($0,79 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ (20°C))

V_{Alkohol} – Getrunkenes Volumen pro Tag

Ein Großteil der Patienten (70%) trank unregelmäßig oder mit längeren Pausen. Eine Anpassung des Konsums für jedes analysierte Haarsegment war daher nötig. Aus den Angaben zu Trinkpausen und Entzügen wurde der Anteil von Tagen, an denen die angegebene Alkoholmenge vermutlich konsumiert wurde, berechnet. Einem Haarsegment von 1 cm wurde dabei eine Wachstumszeit von 30 Tagen zugeordnet. Abschließend wurde die berechnete durchschnittliche Alkoholmenge pro Tag mit diesem Faktor multipliziert.

$$A_{\text{getrunken}} = \frac{T_{\text{getrunken}}}{T_{\text{gesamt}}} \quad (7.2)$$

T_{gesamt} – Gesamtzahl der Tage (1 cm \approx 30 Tage)

$T_{\text{getrunken}}$ – Anzahl der Tage, an denen vermutlich Alkohol konsumiert wurde

$A_{\text{getrunken}}$ – Anteil der Tage, an denen vermutlich Alkohol konsumiert wurde

$$m_{\text{EtOH kor.}} = m_{\text{EtOH}} \cdot A_{\text{getrunken}} \quad (7.3)$$

$m_{\text{EtOH kor.}}$ – Durchschnittlich getrunkene Alkoholmenge, korrigiert.

7.4.3 Ergebnisse

247 Haarsegmente von 73 Patienten im Alkoholentzug wurden auf EtG und FAEE untersucht und die Ergebnisse mit den Angaben zum Alkoholkonsum verglichen. 80 Haarproben wurden in der ersten Messreihe analysiert, 167 in einer zweiten. Bei der zweiten Messreihe konnten in 17 Fällen nicht alle Parameter bestimmt werden. Für vier Segmente fehlen die entsprechenden Angaben des Teilnehmers, in einem Fall konnte die EtG-Konzentration nicht bestimmt werden und in zwölf Fällen die FAEE-Konzentrationen. Die Bereiche, Mittelwerte und Mediane der untersuchten Segmentlängen, der korrigierten Angaben zum Alkoholkonsum sowie der gefundenen EtG- und FAEE-Konzentrationen sind in Tabelle 7.5 zusammengefasst. Alle ermittelten EtG- und FAEE-Konzentrationen sind zudem in Abbildung 7.8 graphisch dargestellt.

Tabelle 7.5: Informationen über die untersuchten Segmente, die angegebenen, korrigierten Alkoholmengen sowie die gemessenen EtG- und FAEE-Konzentrationen.

	Anzahl		Segmente/ Teilnehmer	Segmentlänge [cm]		
	Segmente	Teilnehmer		Bereich	MW	Median
1. Messreihe	80	20	4,0	1-15	2,3	2
2. Messreihe	167	53	3,2	2-16	3,8	3
Gesamt	247	73	3,4	1-16	3,3	3

	Alkohol kor. [g/Tag]			c_{EtG} [pg/mg]			c_{FAEE} [ng/mg]		
	Bereich	MW	Median	Bereich	MW	Median	Bereich	MW	Median
1. Messreihe	0-1360	188,6	134,4	< 4-2876	306,4	55,3	0,12-6,56	1,34	0,97
2. Messreihe	0-640	182,3	147,4	< 1-3307	282,4	76,1	0,07-2,72	0,72	0,58
Gesamt	0-1360	184,4	142,2	< 1-3307	290,2	63,0	0,07-6,56	0,93	0,73

kor.: korrigiert

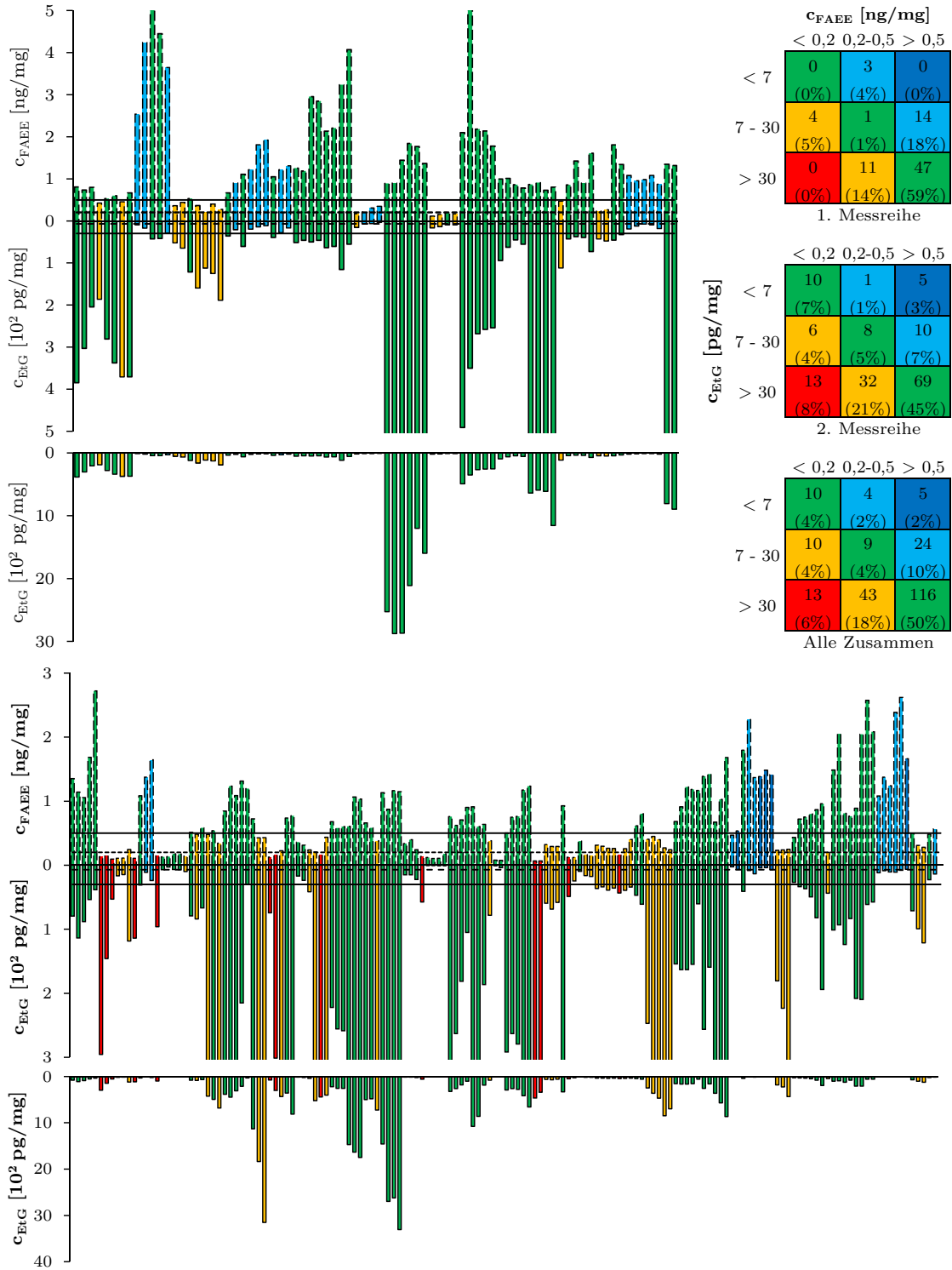


Abbildung 7.8: Gemessene EtG- und FAEE-Konzentrationen (oben: Ergebnisse der 1. Messreihe sowie drei Kreuztabellen mit dem Vergleich der nach aktuellen Grenzwerten bewerteten Ergebnisse; unten: Ergebnisse der 2. Messreihe). Folgende Farbcodierung wurde angewandt: grün: übereinstimmende Ergebnisse, orange: FAEE niedriger eingestuft als EtG, rot: $c_{FAEE} < 0,2$ ng/mg und $c_{EtG} > 30$ pg/mg, hellblau: EtG niedriger eingestuft als FAEE, blau: $c_{EtG} < 7$ pg/mg und $c_{FAEE} > 0,5$ ng/mg. Für die EtG-Konzentrationen wurden der gesamte Konzentrationsbereich und ein Ausschnitt bis 3 bzw. 5 pg/mg dargestellt.

		EtG [pg/mg]								
Alle Segmente		< 7	7 - <30	≥ 30	< 7	7 - <30	≥ 30	< 7	7 - <30	≥ 30
Alkohol [g/Tag]	0	0 (0,0%)	2 (2,5%)	5 (6,3%)	3 (1,9%)	8 (4,9%)	4 (2,5%)	3 (1,2%)	10 (4,1%)	9 (3,7%)
	>0 - <60	1 (1,3%)	6 (7,5%)	5 (6,3%)	2 (1,2%)	2 (1,2%)	16 (9,9%)	3 (1,2%)	8 (3,3%)	21 (8,7%)
	≥ 60	2 (2,5%)	11 (13,8%)	48 (60,0%)	10 (6,2%)	19 (11,7%)	98 (60,5%)	12 (5,0%)	30 (12,4%)	146 (60,3%)
		1. Messreihe			2. Messreihe			Gesamt		
Nur 1. Segment		< 7	7 - <30	≥ 30	< 7	7 - <30	≥ 30	< 7	7 - <30	≥ 30
Alkohol [g/Tag]	0	0 (0,0%)	1 (5,0%)	0 (0,0%)	1 (1,9%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (1,4%)	1 (1,4%)	0 (0,0%)
	>0 - <60	0 (0,0%)	2 (10%)	2 (10%)	1 (1,9%)	2 (3,8%)	8 (15,1%)	1 (1,4%)	4 (5,5%)	10 (13,7%)
	≥ 60	0 (0,0%)	0 (0,0%)	15 (75%)	1 (1,9%)	4 (7,5%)	36 (67,9%)	1 (1,4%)	4 (5,5%)	51 (69,9%)
		1. Messreihe			2. Messreihe			Gesamt		
		FAEE [ng/mg]								
Alle Segmente		< 0,2	0,2-<0,5	≥ 0,5	< 0,2	0,2-<0,5	≥ 0,5	< 0,2	0,2-<0,5	≥ 0,5
Alkohol [g/Tag]	0	1 (1,3%)	1 (1,3%)	5 (6,3%)	6 (4,0%)	4 (2,6%)	4 (2,6%)	7 (3,0%)	5 (2,2%)	9 (3,9%)
	>0 - <60	3 (3,8%)	4 (5,0%)	5 (6,3%)	4 (2,6%)	5 (3,3%)	10 (6,6%)	7 (3,0%)	9 (3,9%)	15 (6,5%)
	≥ 60	0 (0,0%)	10 (12,5%)	51 (63,8%)	15 (9,9%)	33 (21,9%)	70 (46,4%)	15 (6,5%)	43 (18,6%)	121 (52,4%)
		1. Messreihe			2. Messreihe			Gesamt		
Nur 1. Segment		< 0,2	0,2-<0,5	≥ 0,5	< 0,2	0,2-<0,5	≥ 0,5	< 0,2	0,2-<0,5	≥ 0,5
Alkohol [g/Tag]	0	1 (5,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (2,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	2 (2,8%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
	>0 - <60	1 (5,0%)	2 (10,0%)	1 (5,0%)	2 (3,9%)	4 (7,8%)	4 (7,8%)	3 (4,2%)	6 (8,5%)	5 (7,0%)
	≥ 60	0 (0,0%)	3 (15,0%)	12 (60,0%)	7 (13,7%)	11 (21,6%)	22 (43,1%)	7 (9,9%)	14 (19,7%)	34 (47,9%)
		1. Messreihe			2. Messreihe			Gesamt		

Abbildung 7.9: Neun-Felder-Tafeln mit den Ergebnissen des Vergleiches zwischen gemessener EtG-/FAEE-Konzentration und dem angegebenen korrigierten Alkoholkonsum, aufgeteilt in die Daten der ersten und zweiten Messreihe und dem Gesamtergebnis. Dargestellt sind zudem die Ergebnisse bei der ausschließlichen Betrachtung des ersten Segments.

Für die Auswertung wurden die von der SoHT empfohlenen Grenzwerte zum Ausschluss einer Abstinenz von 7 pg/mg für EtG und 0,2 ng/mg für FAEE sowie 30 pg/mg (EtG) und 0,5 ng/mg (FAEE) zur Unterscheidung von moderatem und chronischem Konsum verwendet [3, 11]. Für den Vergleich mit den Selbstauskünften wurden angegebene, korrigierte Alkoholmengen ≥ 60 g/Tag als exzessiver Konsum und > 0 g/Tag – < 60 g/Tag als moderater Konsum bewertet. Abstinenz wurde bei einem kompletten Verzicht auf Alkohol (0 g/Tag) angenommen. Die Abbildungen 7.8 und 7.9 zeigen Neun-Felder-Tafeln mit den Resultaten der EtG- und FAEE-Konzentrationen untereinander verglichen sowie mit den korrigierten Angaben zum Alkoholkonsum. Es sind die Daten der ersten und zweiten Messreihe einzeln sowie das Gesamtergebnis dargestellt. In Abbildung 7.9 sind zusätzlich die Ergebnisse ausschließlich für das jeweils erste Segment aufgeführt.

7.4.4 Diskussion

Noch nie zuvor wurden die gefundenen EtG- und FAEE-Konzentrationen mit den Angaben zum Alkoholkonsum verglichen. In 43,9% der Proben konnte eine übereinstimmende Einteilung aller drei Parameter in die drei Kategorien: abstinent, moderater oder exzessiver Trinker gefunden werden. In 72,9% der übrigen Fälle stimmten mindestens zwei Parameter überein und der dritte wich nur um eine Kategorie ab. Eine richtige Beurteilung des angegebenen Alkoholkonsums mit mindestens einem Marker gelang in 66,7% der Fälle ohne eine komplette Übereinstimmung. In 38,8% dieser Fälle stimmten die gefundenen EtG-Konzentrationen überein und in 27,9% das FAEE-Resultat. Bei einer Auswertung der Ergebnisse des ersten Segments konnte eine Übereinstimmung aller drei Parameter in 49,3% der Fälle beobachtet werden.

Die gefundenen EtG-Konzentrationen zwischen < 1 und 3307 pg/mg (MW: 290 pg/mg, Median: 63 pg/mg) liegen in einem Bereich, der auch in vorherigen Studien bestimmt wurde (siehe Tabelle 4.6, S. 33). Sehr hohe Konzentrationen zwischen 1000 und 3307 pg/mg, die nur in zehn Haarproben nachgewiesen wurden, sorgten für eine deutliche Anhebung des Mittelwerts.

Während die Mittelwerte der EtG-Konzentrationen von der ersten und zweiten Messreihe nur um 8% abwichen, gab es zwischen den Medianen einen Unterschied von 37%, obwohl die täglich konsumierten Alkoholmengen in etwa übereinstimmten. Die höheren EtG-Konzentrationen in der zweiten Messreihe sind jedoch nicht unerwartet, da, im Gegensatz zur ersten Messreihe, die Haare mit der Mühle zerkleinert wurden. Wie die in Abschnitt 7.2 vorgestellten Ergebnisse zeigen, führt ein Mahlen der Haare zu signifikant höheren EtG-Konzentrationen. Die durchschnittlich kürzeren Segmente, die in der ersten Messreihe untersucht wurden (MW: 2,3 cm vs. MW: 3,8 cm), könnten verantwortlich dafür sein, dass der Einfluss des Mahlens weniger ausgeprägt erscheint als bei der durchgeführten Vergleichsstudie. Laut zwei vorheriger Studien [31, 202] werden aufgrund der kopfnahen Einlagerung über den Schweiß signifikant höhere EtG-Konzentrationen bei der Analyse von proximalen Segmenten < 3 cm nachgewiesen als bei längeren Segmenten.

Die ermittelten FAEE-Konzentrationen zwischen 0,07 und 6,56 ng/mg (MW: 0,93 ng/mg, Median: 0,73 ng/mg) gleichen in etwa den Ergebnissen von Wurst et al. [53] ($c_{\text{FAEE}} = 0,39 - 3,19$ ng/mg, MW: 1,09 ng/mg). In Übereinstimmung mit den Ergeb-

nissen von Auwärter et al. [236] war eine Dominanz von Ethyloleat gegenüber den Konzentrationen der anderen FAEE zu beobachten.

In weiteren Studien, die FAEE in den Haaren von Alkoholikern im Entzug untersuchten, wurden deutlich höhere FAEE-Konzentrationen von maximal 11,6 ng/mg [236], 9,09 ng/mg [239] und 20,5 ng/mg [23] festgestellt. Dass im Gegensatz zu einer Studie von Auwärter et al. [239], in der bei Alkoholikern ausschließlich FAEE-Konzentrationen $> 1,0$ ng/mg bestimmt wurden, auch Ergebnisse $< 0,2$ ng/mg nachgewiesen wurden, kann durch die langen Trinkpausen erklärt werden, die bei einigen Teilnehmern mehrere Monate andauerten. Auch andere Studien ermittelten niedrigere FAEE-Konzentrationen in den Haaren von Alkoholikern. Giovanni et al. [233] fanden beispielsweise in nur 83% der untersuchten Proben Konzentrationen $> 0,5$ ng/mg und Yegles et al. [29] kamen zu dem Schluss, dass FAEE-Konzentrationen $> 1,0$ ng/mg auf einen exzessiven Alkoholkonsum hindeuten, Konzentrationen $< 1,0$ ng/mg einen problematischen Alkoholkonsum jedoch nicht ausschließen.

Für die allgemein niedrigeren Konzentrationen können lediglich einige Vermutungen angestellt werden. Eventuell gab es Probleme mit dem für die Extraktion der Haare eingesetzten Thermomixer. Es gibt Hinweise darauf, dass die verwendete Schüttelfrequenz einen großen Einfluss auf die ermittelten FAEE-Konzentrationen hat.

Im Rahmen der zweiten Messreihe wurden nochmals niedrigere Konzentrationen von durchschnittlich 0,72 statt 1,34 ng/mg gefunden. Dies könnte darauf hindeuten, dass trotz einer vor Licht und Feuchtigkeit geschützten Lagerung der Haarproben im Exsikkator ein Abbau der FAEE stattgefunden hat. Auwärter [232] konnte einen solchen Abbau in den Haaren von Verstorbenen beobachten. Dagegen spricht jedoch, dass FAEE bei sehr langen Haaren auch in den distalen Segmenten und sogar in den Haaren von 1000 Jahre alten Mumien [228] nachgewiesen werden konnten.

Bei einem Vergleich der EtG- und FAEE-Konzentrationen wurden übereinstimmende Ergebnisse in 57,7% der Fälle gefunden. Große Abweichungen, die bedeuten, dass einer der Marker auf eine Abstinenz deutet und der andere einen exzessiven Konsum anzeigt, wurden in weniger als 10% der Proben gefunden. Im Gegensatz zu der vergleichenden Studie mit Haaren aus Abstinenzuntersuchungen (siehe Abschnitt 7.3) wurde ein höherer Anteil von Proben (28,2%) gefunden, in denen die ermittelte EtG-Konzentration einen höheren Alkoholkonsum vermuten lässt als die FAEE-Konzentration. Sowohl der Einsatz der Haarmühle für die Bestimmung von EtG bei der zweiten Messreihe, als auch die insgesamt etwas niedrigeren FAEE-Konzentrationen im Vergleich zu vorherigen Studien könnten verantwortlich hierfür sein.

Weitere Gründe für diese Abweichungen sind mit großer Wahrscheinlichkeit die unterschiedlichen Einlagerungsmechanismen von EtG und FAEE in die Haarmatrix sowie das konträre Verhalten gegenüber verschiedenen Haarbehandlungen. Eine ausführliche Beschreibung und Diskussion dieser einflussnehmenden Faktoren sind in den Abschnitten 4.3.4, 4.4.2 und 7.3.3 zu finden. Eine direkte Korrelationen zwischen den EtG- und FAEE-Konzentrationen wurde analog zu den Ergebnissen der vorheriger Studie (siehe Abschnitt 7.3) sowie analog zu den Angaben in der Literatur [29, 187, 206] nicht gefunden.

Bei einem Vergleich der EtG-/FAEE-Konzentrationen mit den angegebenen Alkoholmengen wurden Übereinstimmungen in 64,9% bzw. 59,3% der Fälle gefunden. In

16,5% (EtG) bzw. 12,6% (FAEE) der Fälle war der angegebene Alkoholkonsum niedriger als die Messergebnisse vermuten ließen. In 18,6% (EtG) bzw. 28,1% (FAEE) der Fälle wurde mehr Alkohol konsumiert, als sich aus den Messergebnissen ableiten ließ. Weitere Vergleichsdaten sind in Tabelle 7.6 zu finden.

Tabelle 7.6: Zusammenfassung der Ergebnisse aus dem Vergleich der EtG/FAEE-Konzentrationen und dem angegebenen, korrigierten Alkoholkonsum (EtOH). Angegeben ist der Anteil der übereinstimmenden Ergebnisse sowie der Anteil der Fälle, in denen die ermittelten EtG-/FAEE-Konzentrationen einen höheren oder niedrigeren Alkoholkonsum vermuten ließen, aufgeteilt in die Daten der ersten bzw. zweiten Messreihe sowie die Gesamtdaten.

EtG/EtOH %	Alle Segmente			Nur 1. Segment		
	EtG = EtOH	EtOH < EtG	EtOH > EtG	EtG = EtOH	EtOH < EtG	EtOH > EtG
1. Messreihe	67,5	15,0	17,5	85,0	15,0	0,0
2. Messreihe	63,6	17,3	19,1	73,6	15,1	11,3
Gesamt	64,9	16,5	18,6	76,7	15,1	8,2

FAEE/EtOH %	Alle Segmente			Nur 1. Segment		
	FAEE = EtOH	EtOH < FAEE	EtOH > FAEE	FAEE = EtOH	EtOH < FAEE	EtOH > FAEE
1. Messreihe	70,0	13,8	16,3	75,0	5,0	20,0
2. Messreihe	53,6	11,9	34,4	52,9	7,8	39,2
Gesamt	59,3	12,6	28,1	59,2	7,0	33,8

Neben den bereits genannten Gründen sind die Selbstauskünfte der Teilnehmer eine weitere Fehlerquelle und eine mögliche Erklärung für die z. T. deutlichen Abweichungen. Studien konnten zeigen, dass die Angaben oft unterdimensioniert oder falsch sind, auch wenn die Daten anonym erfasst wurden und keine Konsequenzen für die jeweilige Person hatten [307]. Auffällig ist zudem, dass viele Teilnehmer keinen konstanten Alkoholkonsum angaben. Häufige, kurze Aufenthalte in Entzugskliniken, die z. T. nur wenige Tage auseinander lagen, sowie schwankende Trinkmengen, wie z. B. ein deutlich erhöhter Konsum an den Wochenenden, erschwerten die vergleichende Auswertung. Um derartige Schwankungen zu berücksichtigen, wurde aus den Angaben der Teilnehmer ein korrigierter täglicher Konsum berechnet.

Eine Korrelation zwischen den gemessenen FAEE-Konzentrationen und den Auskünften der Teilnehmer über ihr Trinkverhalten konnte analog zu den Ergebnissen vorheriger Studien [29, 239] und begründet durch eine Einlagerung durch Sebum nicht gefunden werden. Übereinstimmend mit den Untersuchungen von Morini et al. [192] und Paul et al. [188] konnte auch zwischen den EtG-Konzentrationen und dem angegebenen Alkoholkonsum keine Korrelation gefunden werden. Bei anderen Studien, die eine Abhängigkeit zwischen der EtG-Konzentration und den Selbstauskünften nachweisen konnten [30, 191, 194, 195, 198], wurden zum Teil unklare Fälle bei der Auswertung ausgeschlossen [195] oder ein Polynom zweiten Grades an die Messergebnisse angepasst [191]. Unklarheiten aufgrund längerer Trinkpausen, verschiedener Haarbehandlungen sowie weiterer Krankheiten und Suchtproblematiken lagen bei einer Vielzahl der Teilnehmer dieser Studie vor. Appenzeller et al. [195] gaben eine Analyse von kürzeren Haarsegmenten als Grund für eine bessere Übereinstimmung der EtG-Konzentrationen und den angegebenen Trinkmengen im Gegensatz zu anderen Studien an.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden für die erste Messreihe möglichst kurze Segmente gewählt (MW: 2,3 cm; Median: 2,0 cm). Es konnten Übereinstimmungen in 67,5% der Haarsegmente für EtG und in 70,0% für FAEE gefunden werden. Bei einer Beschränkung auf das erste Segment konnten übereinstimmende Ergebnisse sogar in 85,0% (EtG) bzw. 75,0% (FAEE) gefunden werden. In vielen Fällen waren jedoch zu wenige Haare vorhanden, um trotz einer Analyse von nur 1–2 cm langen Segmenten eine ausreichende Menge (30 mg für FAEE und 75 bzw. 100 mg für EtG) für die Bestimmung beider Parameter extrahieren zu können. Während für EtG kein Einfluss der Einwaage auf das Ergebnis gefunden wurde, konnten für die FAEE steigende Extraktionsausbeuten bei einer abnehmenden Haarmenge nachgewiesen werden [232, 241]. Aufgrund der zum Teil sehr geringen Haarmengen, der Vermutung, dass in Segmenten < 3 cm signifikant höhere EtG-Konzentrationen nachgewiesen werden können [31, 202] und der Empfehlung der SoHT, 3–6 cm lange Segmente zu untersuchen, wurden für die Analysen der zweiten Messreihe meist Segmentlängen von 3 cm gewählt (MW: 3,8 cm; Median: 3,0 cm).

Übereinstimmende Ergebnisse wurden bei der zweiten Messreihe in 63,6% der analysierten Segmente für EtG und in 53,6% für FAEE gefunden. Während eine ausschließliche Betrachtung der Ergebnisse des ersten Segments zu einer verbesserten Übereinstimmung für EtG von 73,6% führte, wurden für FAEE keine Veränderungen beobachtet (52,9%). Welcher von den angegebenen Gründen hauptsächlich verantwortlich für die Abweichungen zwischen der ersten und zweiten Messreihe sind, lässt sich nicht sagen. Es wird jedoch deutlich, dass eine Vielzahl von Faktoren einen Einfluss auf die ermittelten EtG- und FAEE-Konzentrationen hat. Individuelle Unterschiede, analytische Probleme oder die abweichenden Eigenschaften der beiden Marker sind nur einige der Gründe für die gefundenen Abweichungen.

Abschließend lässt sich sagen, dass in knapp der Hälfte der Fälle (43,9%) eine Übereinstimmung zwischen beiden Markern und dem angegeben korrigierten Alkoholkonsum gefunden werden konnte. Mit einer Gesamt-Übereinstimmung von 64,9% wurden für EtG bessere Ergebnisse erreicht als für die FAEE. Sowohl für die Übereinstimmung aller drei Parameter (49,3%) als auch für den Vergleich EtG/Alkoholkonsum (76,7%) konnten bessere Ergebnisse erzielt werden, wenn nur die Daten des jeweils ersten Segments einbezogen wurden. Ein Nachweis von EtG im proximalen Haarsegment scheint damit am besten für eine Einschätzung des zurückliegenden Alkoholkonsums geeignet zu sein.

Eine direkte Korrelation zwischen den FAEE- sowie EtG-Konzentrationen und dem angegeben Alkoholkonsum bestand nicht. Eine zeitlich aufgelöste Beurteilung des Trinkverhaltens auf Grund einer segmentweisen Analyse ist daher nicht möglich. Ein stark schwankender Alkoholkonsum, der bei vielen Teilnehmern beobachtet wurde, erschwert zudem eine korrekte Beurteilung, da an Hand der Messergebnisse nicht zwischen einem konstanten, moderaten Konsum und einem begrenzten, exzessiven Konsum unterschieden werden kann.

Aufgrund der vielfältigen Einflussmöglichkeiten sollten die ermittelten EtG- und FAEE-Konzentrationen mit Vorsicht behandelt werden und in Zweifelsfällen die Angaben der betreffenden Person über eventuelle Haarbehandlungen sowie weitere Untersuchungsergebnisse bei der endgültigen Beurteilung berücksichtigt werden.

7.5 Retrospektive Auswertung der EtG-Konzentrationen in Urinen aus Abstinenzuntersuchungen

Seit 2008 wird der Nachweis von EtG in Urin am Institut für Rechtsmedizin Bonn zur Durchführung von Alkoholabstinenzuntersuchungen eingesetzt. Zu Beginn wurden alle Urinproben mit dem validierten LC-MS/MS-Verfahrens analysiert. Seit Beginn 2010 werden die Proben zuerst immunchemisch mit dem in Kapitel 6.1 beschriebenen und überprüften Verfahren semiquantitativ untersucht und lediglich positive getestete Urine mittels des validierten LC-MS/MS-Verfahrens quantifiziert. Insgesamt wurden zwischen 2008 und 2010 EtG-Konzentrationen von 150 Urinproben aus Fällen zur Fahreignungsbegutachtung mittels LC-MS/MS bestimmt. Eine retrospektive Analyse der vorhandenen Ergebnisse aus Routineuntersuchungen soll zeigen, welche Auswirkungen eine Anhebung oder Absenkung des Grenzwertes auf den Anteil an positiv bzw. negativ bewerteten Proben hätte.

7.5.1 Einbezogene Proben und durchgeführte Analysen

150 Urinproben aus Abstinenzuntersuchungen wurden in die Studie einbezogen. Bei allen Proben wurden die EtG-Konzentrationen mittels der validierten LC-MS/MS-Methode bestimmt (siehe Abschnitt 6.2).

7.5.2 Ergebnisse

Die ermittelten EtG-Konzentrationen lagen zwischen 0 und 232 mg/L. Insgesamt wurden 83% der Proben negativ bewertet ($c_{\text{EtG}} < 0,1 \text{ mg/L}$). In fast 60% dieser Proben wurden dabei Konzentrationen $< 0,02 \text{ mg/L}$ gefunden. Grenzwertige Konzentrationen zwischen 0,055 und 0,099 mg/L wurden lediglich in 5% der negativ bewerteten Urine gefunden. Bei den positiv bewerteten Fällen lag der Anteil der Proben mit EtG-Konzentrationen $> 0,15 \text{ mg/L}$ bei 80%. Abbildung 7.10 zeigt die Verteilung der gemessenen Konzentrationen mit einem besonderen Augenmerk auf den Konzentrationsbereich um den Grenzwert von 0,1 mg/L.

7.5.3 Diskussion

Der derzeit angewandte Grenzwert von 0,1 mg/L wird aus unterschiedlichen Gründen bis heute in Frage gestellt. Zum einen führt der Konsum kleiner Mengen Alkohol nach 24 h nicht unbedingt zu einem positiven EtG-Befund (siehe auch Abschnitt 7.7); zum anderen können nach einem übermäßigen Konsum von alkoholhaltigen Lebensmitteln über einen begrenzten Zeitraum EtG-Konzentrationen $> 0,1 \text{ mg/L}$ nachgewiesen werden (siehe auch Abschnitt 7.6). Die durchgeführte retrospektive Auswertung der bisherigen Ergebnisse zeigte jedoch, dass eine Änderung des Grenzwertes nur eine geringe Auswirkung auf den Anteil der positiv bzw. negativ getesteten Proben hätte. Wie es für Abstinenzuntersuchungen zu erwarten ist, wurden über 80% der Urinproben negativ auf EtG getestet. Bei einem Großteil dieser Proben (95%) lagen die Ergebnisse mit Konzentrationen $< 0,055 \text{ mg/L}$ weit entfernt von der Entscheidungsgrenze. Eine hypothetische Absenkung des Grenzwertes auf 0,05 mg/L würde zu lediglich acht weiteren positiven Tests führen.

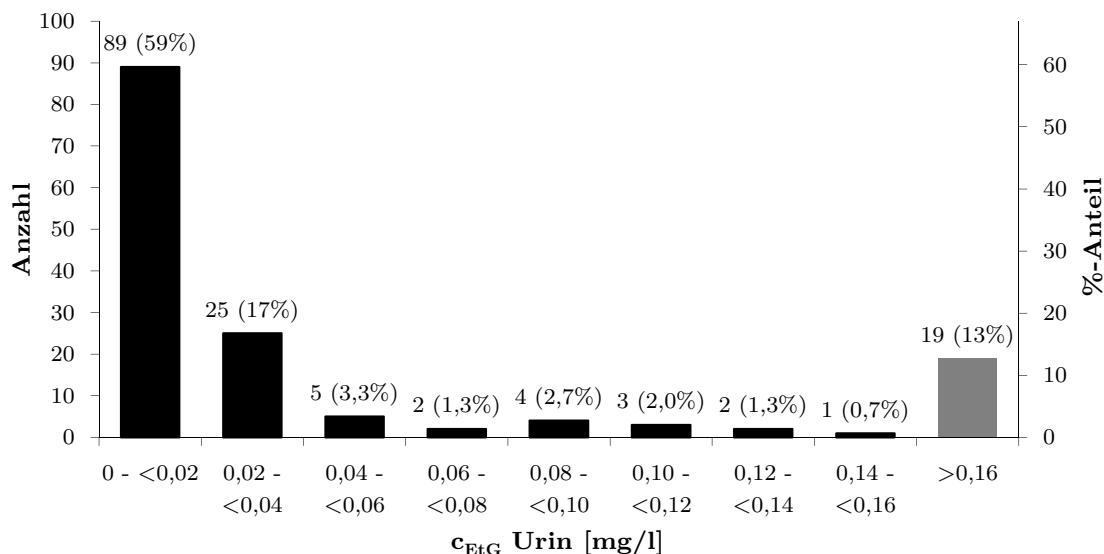


Abbildung 7.10: Verteilung der gemessenen EtG-Konzentrationen von 150 Urinproben aus Abstinenzuntersuchungen. Alle Proben mit EtG-Konzentrationen $> 0,16$ mg/L sind in einem Balken (grau) zusammengefasst.

Fünf Proben würden bei einer Erhöhung des Grenzwertes auf 0,15 mg/L zusätzlich negativ getestet. Eine Anpassung der Entscheidungsgrenze ist daher auf der Grundlage dieser Ergebnisse nicht vonnöten.

7.6 Bestimmung von EtG und EtS in Urinen nach dem Konsum alkoholhaltiger Lebensmittel

Ein Konsum größerer Mengen alkoholhaltiger Lebensmittel wird vereinzelt von Teilnehmern eines Abstinenzprogramms als vermeintlicher Grund für einen positiven EtG-/EtS-Befund angegeben. Um mögliche Überschreitungen des EtG-Grenzwertes nachzuvollziehen und um den Wahrheitsgehalt derartiger Einwände beurteilen zu können, wurden im Rahmen von kontrollierten Trink-/Essversuchen große Mengen unterschiedlicher alkoholhaltiger Lebensmittel in kurzer Zeit konsumiert. Jeweils ein Versuch wurde mit den folgenden Lebensmitteln durchgeführt: Apfelsaft, Traubensaft, Weinsauerkraut, überreife Bananen und alkoholfreies Bier.

Im Vorfeld der Studie wurden verschiedene handelsübliche Apfel- und Traubensäfte auf ihren Alkoholgehalt hin überprüft. Es wurden Bestimmungen direkt nach dem Öffnen des Gebindes sowie nach siebentägiger Lagerung bei Raumtemperatur und bei 2–8 °C im Kühlschrank durchgeführt. Die gemessenen Alkoholgehalte sind in Abbildung 7.11 graphisch dargestellt.

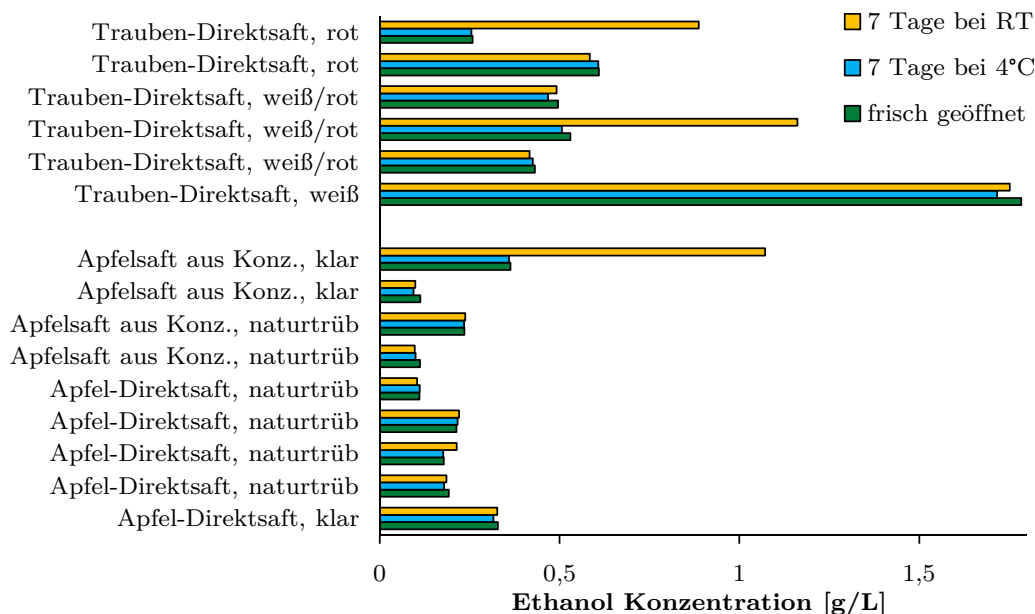


Abbildung 7.11: Gemessene Alkoholkonzentrationen von sechs Trauben- und neun Apfelsäften, direkt nach dem Öffnen des Gebindes, nach sieben Tagen Lagerung bei Raumtemperatur (RT) und bei 2–8°C im Kühlschrank.

7.6.1 Studiendesign

An den einzelnen Versuchen nahmen jeweils fünf bis acht gesunde Freiwillige teil. Insgesamt waren 18 Personen an einem oder mehreren Versuchen beteiligt. Die persönlichen Daten der Teilnehmer sowie die konsumierten Mengen der jeweiligen Lebensmittel sind in Tabelle 7.7 zusammengefasst. Alle Teilnehmer gehörten zur Gruppe der moderaten Trinker und bei keiner der Frauen bestand eine Schwangerschaft. Keiner der Teilnehmer wurde bezahlt und es bestand kein Abhängigkeitsverhältnis zwischen den Teilnehmern und dem Leiter der Studie. Vor den Versuchen durften, über einen Zeitraum von mindestens 80 h, kein Alkohol sowie keine alkoholhaltigen Produkte konsumiert werden. Zur Kontrolle wurde von jedem Teilnehmer vor Beginn jedes Versuchs eine Urinprobe als Leerwert analysiert. Weitere Restriktionen, wie ein Verbot von Zigaretten oder die Vorgabe von standardisierten Mahlzeiten wurden nicht eingeführt, um ein realistisches Bild zu erhalten.

Innerhalb von 1–2 h wurden die entsprechenden Lebensmittel konsumiert und in den folgenden 24–50 h regelmäßig Urinproben gesammelt. Die Abgabe der Proben erfolgte nicht zu vorgeschriebenen Zeitpunkten, jedoch wurden alle Teilnehmer angehalten, in den ersten 8 h regelmäßig alle 1–2 h eine Probe zu sammeln.

7.6.2 Durchgeführte Analysen

EtG- und EtS-Konzentrationen von allen Urinproben wurden mittels des validierten LC-MS/MS-Verfahrens bestimmt. Die Ermittlung der Ethanol-Konzentrationen der

Tabelle 7.7: Persönliche Daten aller Teilnehmer sowie die jeweils konsumierten Mengen der ausgewählten alkoholhaltigen Lebensmittel.

Nr.	Alter [Jahre]	♂/♀	Gewicht [kg]	Größe [cm]	Bier (alk. frei) [L]	Sauerkraut [g]	Apfelsaft [L]	Traubensaft [L]	Bananen geschält [kg]
1	19	w	75	-	2,3	-	-	-	-
2	26	w	75	177	2,5	850	2,0	1,7 (rot)	690
3	23	w	77	-	2,0	-	-	-	-
4	24	w	77	175	2,5	750	-	-	-
5	29	w	55	172	2,5	-	-	-	690
6	23	w	64	169	2,0	750	2,0	-	-
7	26	m	63	-	3,0	-	-	-	-
8	26	w	65	-	2,0	-	-	-	-
9	28	m	86	185	-	1320	-	-	-
10	27	w	78	168	-	750	-	-	-
11	22	w	56	163	-	-	2,0	-	-
12	26	m	78	188	-	-	2,0	2,0 (weiß)	690
13	24	w	52	160	-	-	1,1	-	690
14	29	w	68	160	-	-	-	1,5 (rot)	-
15	27	w	48	156	-	-	-	1,5 (rot)	-
16	31	m	78	178	-	-	-	2,0 (weiß)	-
17	40	m	75	182	-	-	-	2,0 (weiß)	690
18	23	m	83	186	-	-	-	2,0 (weiß)	-

alk. frei: alkoholfrei, m: männlich, w: weiblich

Lebensmittel erfolgte mittels eines routinemäßig zur Ermittlung der BAK eingesetzten GC-FID-Verfahrens. Die Kreatininkonzentrationen der Urinproben wurden mit den vollautomatischen Analyzern nach Jaffé bestimmt.

7.6.3 Ergebnisse

Apfelsaft

Die getesteten, kommerziell erhältlichen Apfelsäfte hatten einen Alkoholgehalt von 0,11 bis 0,37 g/L. Lediglich in einem der neun getesteten Säfte konnte nach einer siebentägigen Lagerung bei Raumtemperatur ein Anstieg des Alkoholgehaltes verzeichnet werden. Für den Versuch wurde der Apfelsaft mit dem größten Alkoholgehalt (0,37 g/L) (siehe Abbildung 7.12 A) gewählt. Bei einer konsumierten Menge von 1,1–2,0 L wurden 0,3–0,6 g Ethanol aufgenommen. Alle ermittelten EtG- und EtS-Konzentrationen lagen unterhalb der ermittelten LOQs (EtG: 0,019 mg/L, EtS: 0,015 mg/L). In den LC-MS/MS-Chromatogrammen einiger Probanden wurde ein Signal in der Nähe des IS-Signals detektiert, welches im zeitlichen Verlauf erst größer wurde und dann langsam wieder verschwand. Eine genauere Untersuchung machte jedoch deutlich, dass sowohl die Retentionszeit (t_R (EtG) = 4,89 min; t_R (Störsignal) = 5,03 min) als auch die relativen Ionenverhältnisse (EtG 221/75 : 221/85 : 221/113 → 100 : 100 : 60; Störsignal 221/75 : 221/85 : 221/113 → 100 : 40 : 25) nicht mit denen von EtG übereinstimmten. Es muss sich daher um ein Störsignal handeln, dass durch einen anderen Inhaltsstoff des Apfelsaftes direkt oder indirekt verursacht wurde.



Abbildung 7.12: Fotos von den verwendeten Lebensmitteln, Apfelsaft (A), roter Traubensaft (B), Weinsauerkraut (C), alkoholfreies Bier (D).

Traubensaft

In den getesteten handelsüblichen Säften wurden Alkoholgehalte zwischen 0,25 und 1,80 g/L gemessen. Nach siebentägiger Lagerung bei Raumtemperatur konnten in zwei Traubensäften um 0,63 g/L höhere Alkoholgehalte, begleitet von einer Schimmelbildung, nachgewiesen werden. Für den Versuch wurde jeweils der rote bzw. weiße Traubensaft mit dem höchsten Alkoholgehalt gewählt (siehe Abbildung 7.12 B). Abhängig von dem gewählten Saft und der jeweiligen Trinkmenge (1,5–2,0 L) wurden 0,9–2,5 g Alkohol konsumiert. In keiner Urinprobe konnten EtG-Konzentrationen oberhalb des LOQ detektiert werden. Die maximalen EtS-Konzentrationen lagen zwischen 0,11 und 0,65 mg/L und wurden 4,5 bis 12,5 h nach Trinkende gemessen. Abbildung 7.13 (links) zeigt den zeitlichen Verlauf der EtS-Konzentrationen. Aufgrund der positiven EtS-Befunde wurden auch die getrunkenen Säfte analysiert. Beide Traubensäfte wurden negativ auf EtG getestet, jedoch konnten EtS-Konzentrationen von 0,03 und 0,12 mg/L in dem weißem bzw. rotem Traubensaft nachgewiesen werden.

Sauerkraut

Weinsauerkraut muss laut den Leitsätzen für Gemüseerzeugnisse mindestens 2% Wein enthalten [308]. Bei einem Konsum von 750–1320 g Sauerkraut entspricht dies einer Alkoholaufnahme von 1,5–2,7 g. Ein Foto des konsumierten Weinsauerkrauts ist in Abbildung 7.12 C dargestellt. Lediglich in den Urinproben von einer Teilnehmerin, die 750 g Weinsauerkraut konsumiert hatte, konnten EtG-Konzentrationen $> 0,1$ mg/L (c_{EtG} max = 0,2 mg/L) bestimmt werden (siehe Abbildung 7.13 (rechts)). Eine Überschreitung des Grenzwertes wurde 1,5 bis 5 h nach Verzehr beobachtet. EtS-Konzentrationen bis zu 0,06 mg/L konnten für 2–5 h detektiert werden.

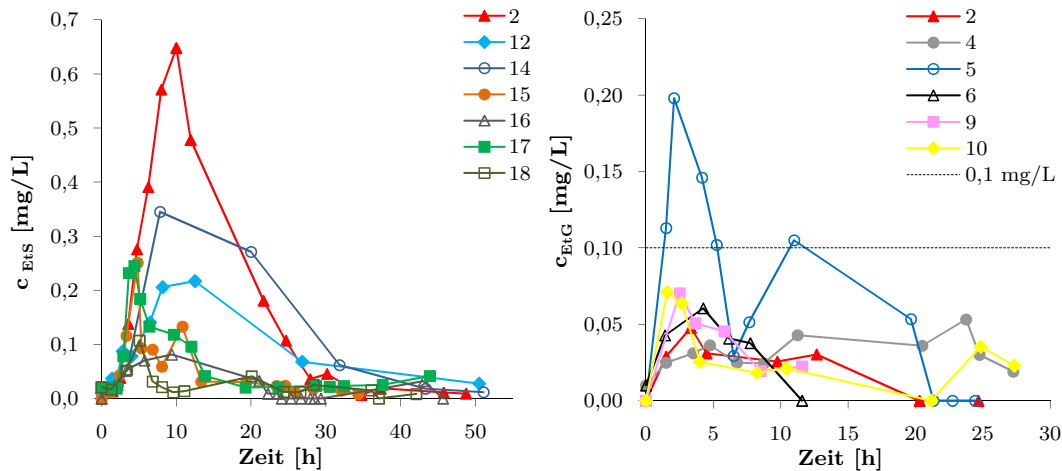


Abbildung 7.13: Zeitlicher Verlauf der gemessenen EtS-Konzentrationen nach dem Trinken von 1,5–2,0 L Traubensaft (links) sowie die gemessenen EtG-Konzentrationen nach dem Verzehr von 750–1320 g Sauerkraut (rechts).

Bananen

Unreife Bananen erhalten nur sehr geringe Mengen an Alkohol. Erst während der Reifung wird der Alkohol in Gärprozessen gebildet. Für den Versuch wurden die gekauften Bananen über neun Tage bei konstanter Temperatur (18–20°C), geschützt vor direkter Sonneneinstrahlung, gelagert. Abbildung 7.14 zeigt die Bananen zu verschiedenen Zeitpunkten. Am Tag des Konsums wurde ein durchschnittlicher Alkoholgehalt von 5 g/kg gemessen, der bei einer konsumierten Menge zwischen 670 und 690 g einer aufgenommenen Alkoholmenge von ca. 3,5 g entsprach.



Abbildung 7.14: Fotos der konsumierten Bananen während der lichtgeschützten Lagerung bei 18–20°C zwei (a), vier (b), sieben (c) und neun (d) Tage nach dem Kauf.

3–8 h nach der Aufnahme wurden maximale Konzentrationen von 0,04–0,12 mg/L EtG und $<LOQ=0,06$ mg/L EtS detektiert. In den Urinen von zwei Teilnehmern wurden 3–10 h nach dem Verzehr Überschreitungen eines Grenzwertes von 0,1 mg/L beobachtet. EtG- bzw. EtS-Konzentrationen $> LOD$ konnten für 5,5–19,25 h bzw. 3,25–

24 h nachgewiesen werden. Bereits 12 h nach dem Verzehr der Bananen konnten EtG- bzw. EtS-Konzentrationen $> \text{LOQ}$ nur noch in den Urinen einer bzw. zweier Person nachgewiesen werden.

In Rahmen dieses Versuches wurde die Auswirkung einer Normierung auf eine Kreatininkonzentration von 100 mg/dL besonders deutlich. Die Unterschiede der in Abbildung 7.15 gezeigten zeitlichen Verläufe der EtG- und EtG100-Konzentrationen sind stark ausgeprägt. Teilnehmerin Nr. 13 trank während des Versuches sehr viel Wasser. Durch eine Normierung wurde die maximale EtG-Konzentration 5 h früher erreicht. Während bei Nr. 2 sehr hohe Kreatininkonzentrationen (126–308 mg/dL) gefunden wurden, lagen bei Nr. 5 alle Werte in einem eher niedrigen Bereich (16–97 mg/dL). Dies führte zu großen Differenzen zwischen den gemessenen und normierten maximalen EtG-Konzentrationen (Nr. 2: $c_{\text{EtG}} = 0,12 \text{ mg/L}$, $c_{\text{EtG}100} = 0,06 \text{ mg/L}$; Nr. 5: $c_{\text{EtG}} = 0,04 \text{ mg/L}$, $c_{\text{EtG}100} = 0,13 \text{ mg/L}$). Die Ergebnisse des fünften Teilnehmers mussten von der Auswertung ausgeschlossen werden, da ein unbedachter Konsum einer rotweinhaltigen Speise am Vorabend zu falsch positiven Ergebnissen führte.

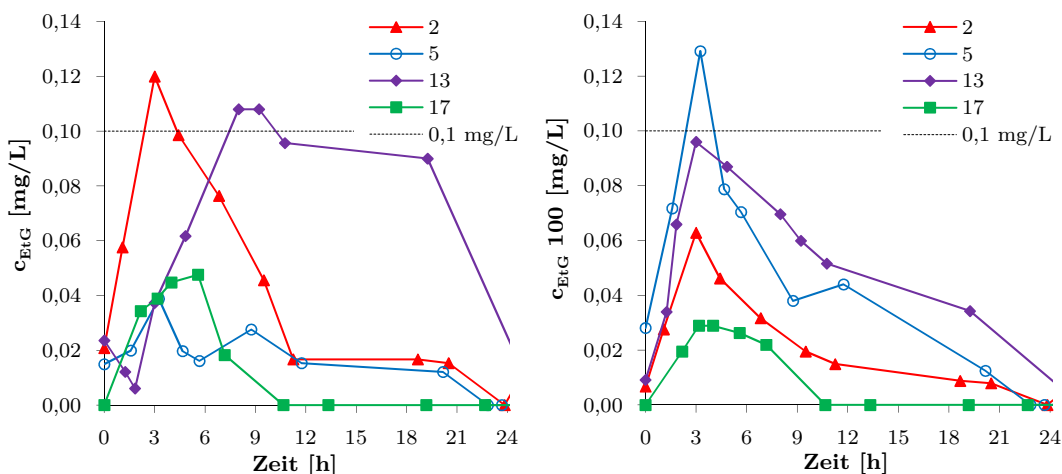


Abbildung 7.15: Zeitlicher Verlauf der gemessenen EtG-Konzentrationen (links) sowie der auf eine Kreatininkonzentration von 100 mg/dL normierten Konzentrationen (rechts) nach dem Konsum von reifen Bananen.

Alkoholfreies Bier

Für den Trinkversuch wurden zwei verschiedene alkoholfreie Biere mit einem Alkoholgehalt von 0,45% ($c_{\text{EtOH}} = 3,6 \text{ g/L}$) gewählt. Abbildung 7.12 D zeigt ein Foto der beiden alkoholfreien Biere. Ein Konsum von 2,0–3,0 L entspricht einer Aufnahme von 7,2–10,8 g Alkohol. Abbildung 7.16 zeigt die zeitlichen Verläufe der gemessenen sowie normierten EtG- und EtS-Konzentrationen. Maximale Konzentrationen an EtG (0,21–0,51 mg/L) und EtS (0,13–0,17 mg/L) wurden 5,0–7,5 h nach Trinkende gefunden. Deutlich früher, 2,5–5,0 h nach Trinkende, erreichten die normierten Konzentrationen Maximalwerte von 0,27–0,79 mg/L (EtG100) bzw. 0,22–0,41 mg/L (EtS100). EtG- und EtS-Konzentrationen oberhalb des LOQ konnten für 26 bzw. 25 h nachgewiesen werden. EtG-Konzentrationen größer 0,1 mg/L wurden in einem Zeitfenster von 3 bis 13 h nach

Trinkende erreicht (1–13 h für EtG100). Bei einem hypothetischen EtG-Grenzwert von 0,5 mg/L würden Urine maximal 5–7 h nach Trinkende positiv bewertet (3–7 h für EtG100).

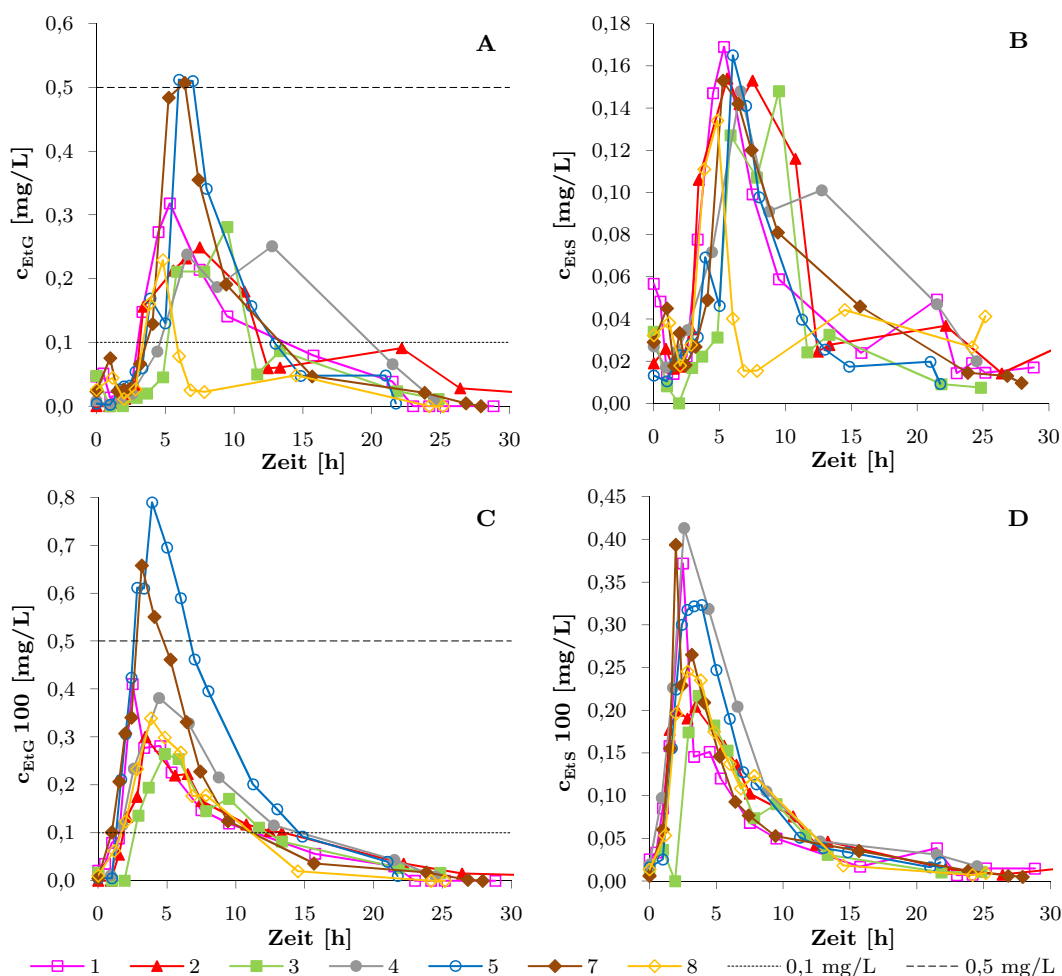


Abbildung 7.16: Zeitlicher Verlauf der gemessenen EtG- (A) und EtS- (B) Konzentrationen sowie der auf eine Kreatininkonzentration von 100 mg/dL normierten EtG- (C) und EtS- (D) Konzentrationen nach dem Konsum von 2–3 L alkoholfreiem Bier.

7.6.4 Diskussion

Alkohol ist nicht nur in Bier, Wein und Spirituosen enthalten, sondern auch in einer Vielzahl anderer Lebensmittel und Getränke. Auch in als „alkoholfrei“ gekennzeichneten Produkten dürfen laut Gesetzgeber geringe Mengen Alkohol vorhanden sein. Bei alkoholfreiem Bier beispielsweise liegt die Grenze bei 0,5%. Fruchtsäfte dürfen laut geltenden Leitlinien [309] bis zu 3 g/L Alkohol enthalten. Für Traubensaft gilt die EG-Verordnung Nr. 1493/1999 [310], die einen Alkoholgehalt von bis zu 7,9 g/L erlaubt.

EtG und EtS sind in Urin bereits nach dem Konsum sehr geringer Alkoholmengen nachweisbar [12, 13]. Dies wirft die Frage auf, ob auch der Konsum von alkoholhaltigen

Lebensmitteln zu einem positiven EtG- oder EtS-Befund führen kann und damit einen Einfluss auf Abstinenzuntersuchungen hat. Kontrollierte Trink- und Essversuche mit stellvertretend ausgewählten alkoholhaltigen Lebensmitteln wurden durchgeführt, um dies zu überprüfen.

Der Konsum von 1–2 L Apfel- oder Traubensaft reichte nicht aus, um im Urin EtG-Konzentrationen oberhalb der LOQ zu erreichen. Jedoch lagen die Alkoholgehalte der getesteten handelsüblichen Säfte (maximal 0,37 bzw. 1,80 g/L) deutlich unter den gesetzlichen Höchstwerten. Wahrscheinlich aufgrund der zugesetzten Konservierungsmittel hatte auch eine längere Lagerung der Säfte nur in Einzelfällen einen Anstieg des Alkoholgehaltes zur Folge, der von einer Schimmelbildung begleitet wurde. Vorsicht ist geboten bei selbst gemachten Säften, die laut geltenden Verordnungen deutlich höhere Alkoholkonzentrationen als die gefundenen aufweisen dürfen. Zudem kann bei Säften ohne Konservierungsmittel eine Bildung von Alkohol durch Gärungsprozesse während der Lagerung nicht ausgeschlossen werden.

Während nach dem Konsum von Apfelsaft auch kein EtS nachgewiesen werden konnte, verursachte der Konsum von Traubensaft EtS-Konzentrationen von bis zu 0,65 mg/L. Im Traubensaft nachgewiesenes EtS erklärt dies. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen ermittelten Høiseth et al. erhöhte EtS-Konzentrationen von maximal 2,15 mg/L nach dem Konsum von alkoholfreiem Wein, in dem ebenfalls EtS und sogar EtG detektiert wurde. Dass nur EtS und kein EtG im Urin gefunden werden konnte, deutet auf eine Bioverfügbarkeit des EtS nach einer oralen Aufnahme hin, die für EtG nicht gegeben ist.

Sowohl der Konsum von Weinsauerkraut als auch der von überreifen Bananen führte nur bei einem bzw. zwei Teilnehmern zu EtG-Konzentrationen $> 0,1$ mg/L. Eine Überschreitung des Grenzwertes war dabei auf einen maximalen Zeitraum von 5 bzw. 10 h begrenzt.

Mit dem alkoholfreien Bier wurden die mit Abstand größten Alkoholmengen aufgenommen. Dies spiegelt sich in den gefundenen maximalen Konzentrationen sowie im gefundenen Nachweisfenster wieder. EtG-Konzentrationen $\geq 0,1$ mg/L wurden für maximal 13 h (EtG100: 13 h) gefunden, Konzentrationen $\geq 0,5$ mg/L für maximal 7 h (EtG100: 6 h). Diese Ergebnisse stehen in guter Übereinstimmung mit denen einer parallel durchgeführten Studie von Thierauf et al. [172], die, bei Ausschluss der unklaren Ergebnisse eines Teilnehmers, EtG100-Konzentrationen $\geq 0,1$ mg/L nach dem Konsum von 2,5 L alkoholfreiem Bier für maximal 14–15 h nachweisen konnten.

Die Resultate der durchgeführten Versuche (siehe auch Tabelle 7.8) verdeutlichen, dass höchstens ein übermäßiger Konsum von alkoholhaltigen Lebensmitteln zu einer zeitlich begrenzten Überschreitung des entscheidenden Grenzwertes von 0,1 mg/L führen kann. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Studien, die sich mit den Auswirkungen von alkoholhaltigen Händedesinfektionsmitteln und Mundwässern auf die EtG-Konzentrationen im Urin auseinandersetzten (siehe auch S. 28). Während die 120-fache Anwendung eines alkoholhaltigen Händedesinfektionsmittels zu hohen EtG-Konzentrationen im Abendurin von maximal 2,0 mg/L führte [17], konnten nach einer täglichen, 20-fachen Anwendung für jeweils 30 s in nur drei von 99 Morgenurinen EtG-Konzentrationen $> 0,1$ mg/L gefunden werden [15]. Auch nach dem Gebrauch einer ganzen Flasche (120 mL) eines

Tabelle 7.8: Zusammengefasste Ergebnisse der durchgeführten Trink- und Essversuche. Angegeben sind jeweils die konsumierten Mengen der Lebensmittel, die damit aufgenommenen Alkoholmengen sowie die maximalen EtG-/EtS-Konzentrationen, die Zeitpunkte der Maxima und die Zeitfenster in denen ein Grenzwert von 0,1 mg/L maximal überschritten wurde.

Nahrungsmittel	Apfelsaft	Traubensaft (rot/weiß)	Sauerkraut	Bananen geschält	Alkoholfreies Bier
Alkoholgehalt	0,3 g/L	0,6/1,25 g/L	2,0 g/kg	5,0 g/kg	3,6 g/L
Konsumierte Menge	2,0 L	1,5-2,0 L	0,75-1,35 kg	0,8 kg	2-3 L
Menge an Alkohol [g]	0,6	0,9-1,2/1,9-2,5	1,5-2,7	3,5	7,2-10,8
c_{EtG} max [mg/L]	< LOQ	< LOQ	0,20	0,12	0,51
Δt (c_{EtG} max) [h]	-	-	2	3-8	5-7,5
Δt_{max} (c_{EtG} > 0,1 mg/L) [h]	-	-	max. 5	max. 4	max. 13
c_{EtS} max [ng/mL]	< LOQ	0,70	0,055	0,06	0,17
Δt (c_{EtS} max) [h]	-	4,5-12,5	2-5	3-8	5-7,5

c_{EtG} max/c_{EtS} max: Maximale EtG-/EtS-Konzentrationen, Δt (c_{EtG} max)/Δt (c_{EtS} max): Zeitpunkt der maximalen EtG-/EtS-Konzentrationen, Δt_{max} (c_{EtG} > 0,1 mg/L): Maximale Zeit für die ein Grenzwert von 0,1 mg/L überschritten wurde

alkoholhaltigen Mundwassers wurde der Grenzwert von 0,1 mg/L für maximal 12 h überschritten (c_{EtG} max = 0,35 mg/L) [20]. Nach dem bestimmungsgemäßen Gebrauch von alkoholhaltigem Mundwässern ist eine Überschreitung des Grenzwertes hingegen sehr unwahrscheinlich [20–22].

Auffällig ist, dass die gefundenen EtG- und EtS-Konzentrationen nicht nur vom Alkoholgehalt sondern auch von der Art der konsumierten Lebensmittel abhängig waren. So konnte EtG nach dem Verzehr des Sauerkraut bzw. der Bananen nachgewiesen werden, jedoch nicht nach dem Trinken des Traubensafts, obwohl vergleichbare Alkoholmengen aufgenommen wurden. Große Unterschiede bei den aufgenommenen Flüssigkeitsvolumina, die, wie in mehreren Studien gezeigt, einen großen Einfluss auf die Ausscheidungskinetik von EtG in Urin haben [149, 163], könnten hierfür eine Erklärung sein. Die großen Abweichungen zwischen den gemessenen und normierten EtG-Konzentrationen nach dem Verzehr der Bananen in Abhängigkeit von den aufgenommenen Flüssigkeitsmengen sowie den gemessenen Kreatininkonzentrationen bekräftigen dies. Høiseth et al. [21] führten ähnliche Ergebnisse nach dem Konsum von 1,8 g Alkohol als alkoholfreien Wein bzw. Wodka auf unterschiedlich lange Trinkperioden zurück.

Es ist daher zu vermuten, dass sich Trink- bzw. Essversuche mit alkoholhaltigen Lebensmitteln nicht gänzlich durch einen Konsum entsprechender Alkoholmengen in Form von Spirituosen simulieren lassen. Dies würde auch erklären, warum beispielsweise EtG (LOD: 0,05 mg/L) nach dem Konsum von 1 bzw. 3 g Alkohol in Form von Sekt oder Whisky bis zu 19 h nachgewiesen werden konnte [13] während die Aufnahme von 0,9–2,5 g Alkohol als Traubensaft zu negativen Ergebnissen führte.

Abschließend lässt sich sagen, dass die Auswirkungen einer unbewussten Aufnahme von Alkohol auf die EtG-/EtS-Konzentrationen im Urin zeitlich sehr begrenzt sind. Bei einer Einbestellung der Teilnehmer von Abstinenzprogrammen für den darauffolgenden Tag sollte auch der übermäßigen Konsum von alkoholhaltigen Lebensmitteln keinen Einfluss

auf das Ergebnis der Tests haben. Anders sieht es bei einem zeitnahen Konsum z.B. von großen Mengen alkoholfreiem Bier aus. 6–7 h (EtG100: 2,8–6 h) nach dem Trinken von 2–3 L konnten sogar EtG-Konzentrationen oberhalb des erhöhten Grenzwertes von 0,5 mg/L, der z.T. zur Vermeidung von falsch positiven Befunden eingesetzt wird [143, 144], nachgewiesen werden.

Es ist daher entscheidend, Teilnehmer von Abstinenzprogrammen ausführlich über den versteckten Alkoholgehalt von einigen Lebensmitteln und Hygieneprodukten aufzuklären. Es muss deutlich gemacht werden, dass bei einem übermäßigen Konsum, z. B. von 3 L alkoholfreiem Bier, mehr Alkohol aufgenommen wird als durch das Trinken eines Glases Wein (0,1 L). Selbst die Aufnahme von geringen Alkoholmengen, z.B. aus Lebensmitteln, widersprechen jedoch dem geforderten strikten Alkoholverbot, so dass Teilnehmer von Abstinenzprogrammen vollständig auf einen Konsum oder Gebrauch von alkoholhaltigen Produkten verzichten sollten.

7.7 Untersuchungen zum Nachweisfenster von EtG und EtS in Urin nach dem Konsum geringer Mengen Alkohol sowie zu Beginn einer Entzugstherapie

Obwohl EtG- und EtS-Bestimmungen in Urin in vielen Laboren mittlerweile zur Routine gehören, gibt es immer noch Diskussionen über den optimalen Grenzwert zur Überwachung von Alkoholabstinenz. Für EtS ist bisher kein endgültiger Grenzwert festgelegt worden. Auslöser für die Diskussionen sind hauptsächlich die Ergebnisse von verschiedenen Studien (siehe S. 27), die besagen, dass auch der Konsum von alkoholhaltigen Lebensmitteln sowie das Verwenden von alkoholhaltigen Händedesinfektionsmitteln oder Mundwässern zu messbaren EtG- und EtS-Konzentrationen im Urin führen können. Die vorherige Studie (Abschnitt 7.6) mit verschiedenen alkoholhaltigen Lebensmitteln konnte zeigen, dass positive Befunde höchstens nach einem übermäßigen Konsum über einen sehr begrenzten Zeitraum zu erwarten sind. Im Gegenzug stellt sich die Frage, ob der aktuelle Grenzwert von 0,1 mg/L in Kombination mit einer Einbestellungsfrist von 24 h geeignet ist, um eine strikte Abstinenz nachzuweisen. Die Ergebnisse eines Trinkversuchs mit geringen, aber realistischen Mengen Alkohol sowie die EtG- und EtS-Konzentrationen im Urin von stark alkoholisierten Patienten nach der Aufnahme für einen stationären Entzug wurden diesbezüglich ausgewertet. Verschiedene Grenzwerte für EtG und EtS wurden auf ihre Effizienz überprüft und ein möglicher Grenzwert für EtS vorgeschlagen.

7.7.1 Studiendesign

Trinkversuch mit kleinen Mengen Alkohol

An dem Trinkversuch nahmen zwölf gesunde Freiwillige (7 Frauen und 5 Männer) zwischen 20 und 41 Jahre (MW: 29 Jahre, Median: 28 Jahre) teil. Die Körpermaße der Teilnehmer waren: Größe: 1,60–1,90 m (MW: 1,75 m Median: 1,77 m), Gewicht: 52–90 kg (MW: 69 kg, Median: 74 kg) und BMI 18,4–27,6 kg/m² (MW: 22,4 kg/m², Median: 22,6 kg/m²). Die Teilnehmer wurden in vier Gruppen aufgeteilt, die ein oder zwei Gläser Weißwein (0,1 oder 0,2 L) bzw. ein oder zwei kleine Flaschen Bier (0,33 L

oder 0,66 L) innerhalb von 45 min konsumierten. Es galten die gleichen Voraussetzungen und Bedingungen wie für die auf S. 120 beschriebenen Trinkversuche. Urinproben wurden für 24–28,5 h in regelmäßigen Abständen gesammelt. Die Daten aller Teilnehmer sowie die konsumierten Mengen an Bier und Wein sind in Tabelle 7.9 zusammengefasst.

Tabelle 7.9: Persönliche Daten der Teilnehmer sowie die Einteilung der Gruppen mit den jeweils konsumierten Mengen an Wein oder Bier.

Nr.	♂/♀	Alter	Größe	Gew.	BMI	Weißwein		Bier		m _{EtOH}	m _{EtOH} /Gew.
		[Jahre]	[cm]	[kg]	[kg/cm ²]	0,1 L	0,2 L	0,33 L	0,66 L	[g]	[g/kg]
1	w	27	165	56	20,6	x				8,2	0,15
2	w	36	168	68	24,1	x				8,2	0,12
3	w	27	177	77	24,6		x			16,4	0,21
4	w	32	168	52	18,4		x			16,4	0,32
5	m	22	177	64	20,4		x			16,4	0,26
6	w	31	172	55	18,6			x		11,6	0,21
7	w	24	160	52	20,3			x		11,6	0,22
8	w	28	168	78	27,6			x		11,6	0,15
9	m	38	181	74	22,6				x	23,1	0,31
10	m	26	188	80	22,6				x	23,1	0,29
11	m	20	190	90	24,9				x	23,1	0,26
12	m	41	182	78	23,5				x	23,1	0,30

Gew.: Körpergewicht, m: männlich, w: weiblich

Proben aus der Entzugsklinik

13 Patienten (vier Frauen und neun Männer) der Abteilung für Abhängigkeitserkrankungen und Psychotherapie der Rheinischen Landeskliniken in Bonn nahmen freiwillig an der Studie teil. Ausgewählt wurden Patienten, die stark alkoholisiert in der Alkoholambulanz erschienen und stationär aufgenommen wurden. Bei der Aufnahme wurde standardmäßig die AAK bestimmt. In Tabelle 7.10 sind die persönlichen Daten der Teilnehmer sowie die gemessenen AAK dargestellt.

Tabelle 7.10: Persönliche Daten der Studienteilnehmer sowie die bei der stationären Aufnahme gemessenen Atemalkoholkonzentrationen (AAK).

Nr.	♂/♀	Alter	Größe	Gewicht	BMI	AAK
		[Jahre]	[cm]	[kg]	[kg/m ²]	[‰]
U01	m	42	182	73	22,0	0,85
U02	m	54	178	70	22,1	2,29
U03	m	30	188	92	26,0	2,8
U04	m	49	-	-	-	2,1
U06	m	43	180	67	20,7	2,6
U07	w	55	158	60	24,0	1,8
U09	m	39	180	82	25,3	3,08
U10	m	46	181	90	27,5	1,7
U13	w	-	170	68	23,5	3,13
U14	m	37	172	77	26,0	1,35
U15	w	39	-	-	-	1,23
U17	m	39	185	75	21,9	2,98
U18	w	42	150	62	27,6	1,8

m: männlich, w: weiblich

Urinproben wurden zum frühestmöglichen Zeitpunkt und danach alle 12 h für maximal sechs Tage gesammelt. Sechs weitere Patienten brachen die Studie zu einem sehr frühen Zeitpunkt ab oder widerriefen die Zustimmung zur Teilnahme. Alle Daten und Ergebnisse von diesen Patienten wurden gelöscht und bei der Auswertung nicht beachtet. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn genehmigt.

7.7.2 Durchgeführte Analysen

Bei allen Urinproben wurden die EtG- sowie EtS-Konzentrationen mit der validierten Methode bestimmt. Zusätzlich wurden die Kreatininkonzentrationen der Urine nach Jaffé und der Alkoholgehalt der konsumierten Getränke bestimmt. Verwendet wurden die in Abschnitt 6.2 beschriebenen Methoden.

7.7.3 Ergebnisse

Trinkversuch mit kleinen Mengen Alkohol

Alle Leerurine wurden negativ auf EtG und EtS getestet. Bereits in der ersten Urinprobe nach Trinkende wurden EtG- und EtS-Konzentrationen zwischen 0,3 und 2,5 mg/L bzw. 0,15 und 1,4 mg/L bestimmt (EtG100: 0,5–9,2 mg/L, EtS100: 0,2–4,1 mg/L). Die maximalen EtG-Konzentrationen wurden 2,8–9,7 h nach Trinkende gemessen und lagen zwischen 1,2 und 36,5 mg/L (MW: 13,0 mg/L, Median: 10,8 mg/L) bzw. zwischen 3,8 und 24,6 mg/L (MW: 11,6 mg/L, Median: 9,7 mg/L) für die normierten EtG100-Konzentrationen. Abbildung 7.17 zeigt den zeitlichen Verlauf der gemessenen sowie der normierten EtG- und EtS-Konzentrationen.

Erwartungsgemäß wurden die höchsten Konzentrationen (36,5 mg/L; EtG100: 24,6 mg/L) nach dem Konsum der größten Menge Alkohol (23,1 g in 0,66 L Bier) gefunden. Auch nach 28 h konnten noch in allen Proben aus dieser Gruppe EtG-Konzentrationen oberhalb der LOQ nachgewiesen werden. Die kleinste Maximalkonzentration (EtG: 3,6 mg/L; EtG100: 6,0 mg/L) wurde nach dem Konsum von 0,1 L Weißwein (8,2 g Alkohol) nachgewiesen. Bereits nach 22 h konnten keine EtG-Konzentrationen $> 0,1$ mg/L mehr gefunden werden. Länger nachweisbar ($> 28,5$ h) war der Konsum von 0,2 L Weißwein ($c_{\text{EtG max}} = 18,7$ mg/L). Zur Beurteilung der Effektivität verschiedener Grenzwerte unter Berücksichtigung einer Wartezeit von 24 h wurde der Anteil der Proben bestimmt, der 24 h nach Trinkende noch positiv zu bewerten wäre (siehe Tabelle 7.11). Hierfür wurden die Proben betrachtet, die 23,5–24,5 h nach Trinkende gesammelt wurden. EtG-Konzentrationen $> 0,5$ mg/L wurden nach 24 h lediglich in den Urinproben von drei Teilnehmern (1 Mal 0,2 L Wein und 2 Mal 0,66 L Bier) gefunden, die alle hohe Kreatininkonzentrationen aufwiesen, so dass eine Normierung zu EtG100-Konzentrationen $< 0,5$ mg/L führte. EtG-Konzentrationen $> 0,1$ mg/L wurden 24 h nach dem Konsum der größeren Menge Bier oder Wein im Urin von fünf der sieben Teilnehmer gefunden, aber nur in dem eines einzigen nach dem Konsum der kleineren Mengen. Nach einer Kreatinin-Normierung wurden bei insgesamt neun Probanden (1 Mal 0,1 L Wein, 2 Mal 0,2 L Wein, 2 Mal 0,33 L Bier, 4 Mal 0,66 L Bier) EtG-Konzentrationen $> 0,1$ mg/L nachgewiesen.

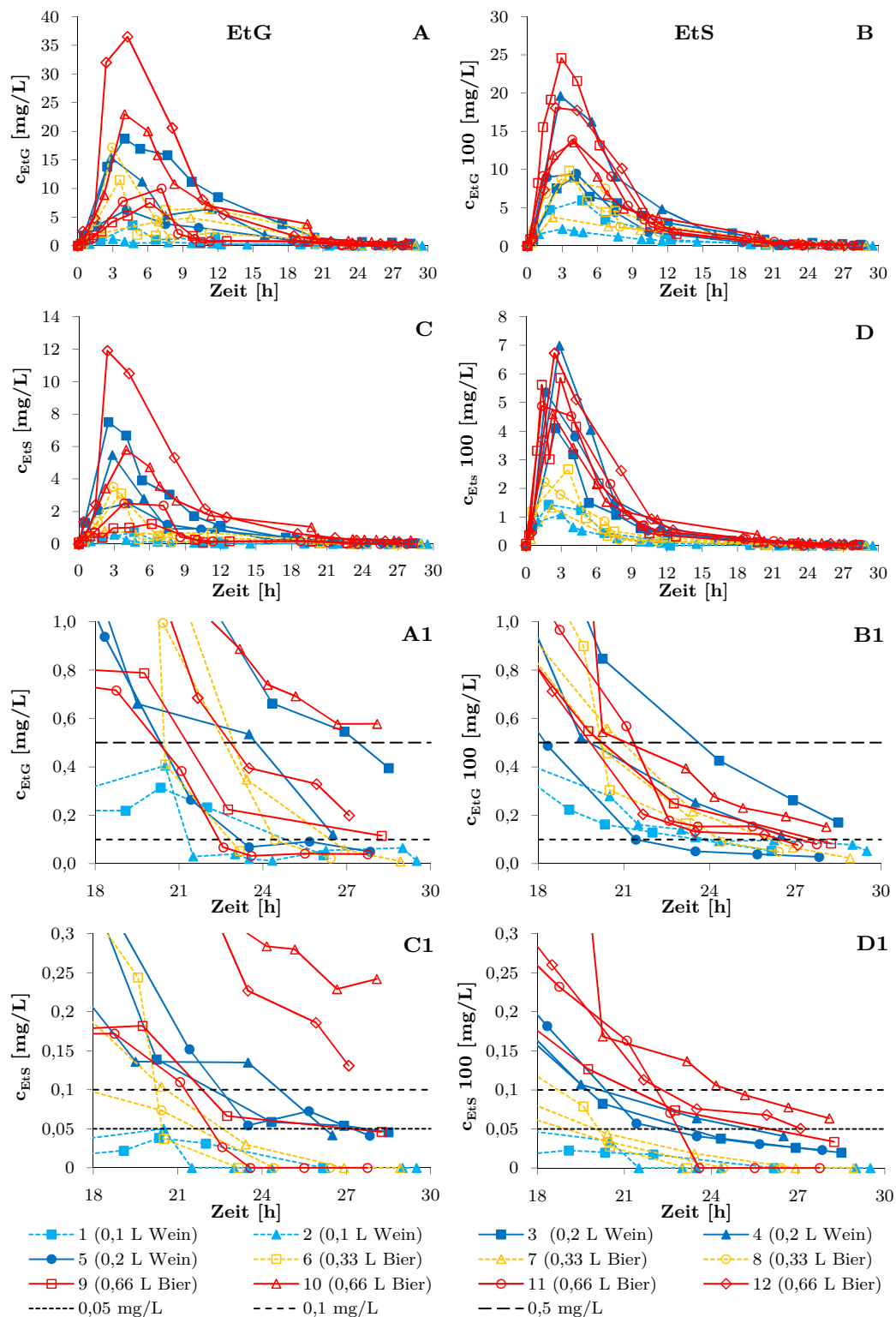


Abbildung 7.17: Zeitlicher Verlauf der EtG- und EtS-Konzentrationen, gemessen (A,C) und auf eine Kreatininkonzentration von 100 mg/dL normiert (B, D) nach dem Konsum von 0,1 bzw. 0,2 L Weißwein oder 0,33 bzw. 0,66 L Bier sowie eine vergrößerte Darstellung des grenzwertigen Bereiches (A1,B1,C1,D1).

Tabelle 7.11: Die maximalen EtG- und EtS-Konzentrationen, die Zeiten bis zu den Maxima, die maximalen Nachweisfenster sowie die Anzahl von Probanden, bei denen die EtG- und EtS-Konzentrationen nach 24 h oberhalb verschiedener Grenzwerte lagen. Bei allen Ergebnissen sind sowohl die gemessenen als auch die Kreatinin-normierten Konzentrationen angegeben. Die Daten für das alkoholfreie Bier stammen aus der Studie mit alkoholhaltigen Lebensmitteln (siehe auch Seite 124).

	Alkoholfreies Bier	Weißwein		Bier	
Konsumiertes Volumen [L]	2-3	0,1	0,2	0,33	0,66
Absolute Ethanolmenge [g]	7,1-10,7	8,2	16,4	11,2	23,1
$c_{\text{EtG max}}$ [mg/L]	0,2-0,5	1,2-3,6	6,3-18,7	4,9-17,2	7,5-36,5
Δt ($c_{\text{EtG max}}$) [h]	4,8-12,8	3,0-4,7	2,8-4,0	2,9-9,7	4,0-7,2
Δt_{max} ($c_{\text{EtG}} > 0,1$ mg/L) [h]	13,0	22,0	>28,5	23,5	>28,0
$c_{\text{EtG 100 max}}$ [mg/L]	0,27-0,79	3,8-6,0	8,9-19,6	3,8-9,9	13,6-24,6
Δt ($c_{\text{EtG 100 max}}$) [h]	2,5-4,8	2,2-4,7	2,8-4,2	2,2-3,6	2,4-4,0
Δt_{max} ($c_{\text{EtG 100}} > 0,1$ mg/L) [h]	13,0	23,5	>28,5	23,5	>28,0
$c_{\text{EtS max}}$ [mg/L]	0,1-0,2	0,7-0,8	2,5-7,5	0,8-3,5	1,2-11,9
Δt ($c_{\text{EtS max}}$) [h]	4,8-9,5	2,2-4,7	2,5-4,2	2,2-3,6	2,4-6,2
Δt_{max} ($c_{\text{EtS}} > 0,05$ mg/L) [h]	12,8	11,8	26,5	20,5	>28,0
$c_{\text{EtS 100 max}}$ [mg/L]	0,2-0,4	1,1-1,4	4,1-7,0	1,3-2,7	4,6-6,7
Δt ($c_{\text{EtS 100 max}}$) [h]	2,0-3,9	1,9-3,0	1,7-2,9	1,6-3,6	1,3-2,9
Δt_{max} ($c_{\text{EtS 100}} > 0,05$ mg/L) [h]	11,7	14,5	23,5	19,5	>28,0
$c_{\text{EtG}} > 0,1$ mg/L (t = 24 h)	0/6	0/2	2/3	1/3	3/4
$c_{\text{EtG 100}} > 0,1$ mg/L (t = 24 h)	0/6	1/2	2/3	2/3	4/4
$c_{\text{EtG}} > 0,5$ mg/L (t = 24 h)	0/6	0/2	2/3	0/3	1/4
$c_{\text{EtG 100}} > 0,5$ mg/L (t = 24 h)	0/6	0/2	0/3	0/3	0/4
$c_{\text{EtS}} > 0,05$ mg/L (t = 24 h)	0/6	0/2	3/3	0/3	3/4
$c_{\text{EtS 100}} > 0,05$ mg/L (t = 24 h)	0/6	0/2	1/3	0/3	3/4
$c_{\text{EtS}} > 0,1$ mg/l (t = 24 h)	0/6	0/2	1/3	0/3	2/4
$c_{\text{EtS 100}} > 0,1$ mg/L (t = 24 h)	0/6	0/2	0/3	0/3	1/4

$c_{\text{EtG max}}/c_{\text{EtS max}}$: Maximale EtG-/EtS-Konzentrationen, Δt ($c_{\text{EtG max}}$)/ Δt ($c_{\text{EtS max}}$): Zeitpunkt der maximalen EtG-/EtS-Konzentrationen, Δt_{max} ($c_{\text{EtG}} > 0,1$ mg/L): Maximale Zeit für die ein Grenzwert von 0,1 mg/L überschritten wurde, $c_{\text{EtG 100}}/c_{\text{EtS 100}}$: auf eine Kreatininkonzentration von 100 mg/dL normierte EtG-/EtS-Konzentrationen

Für EtS wurden deutlich niedrigere Konzentrationen nachgewiesen. Die Maximalkonzentrationen lagen zwischen 0,8 mg/L (EtS100: 1,4 mg/L) 2,5 h nach dem Konsum von 0,1 L Weißwein und 11,9 mg/L (EtS100: 6,7 mg/L) 4,7 h nach der Aufnahme von 0,66 L Bier. Während EtS-Konzentrationen $> 0,05$ mg/L nach dem Konsum von 0,1 L Weißwein bzw. 0,33 L Bier nur für 11,8 bzw. 20,5 h gemessen wurden, konnten nach dem Konsum von 0,66 L Bier EtS-Konzentrationen $> 0,1$ mg/L zum Teil (n = 2) sogar auch noch in der letzten Urinprobe nach über 27 h nachgewiesen werden. Dabei lagen nach 24 h die EtS-Konzentrationen in drei der vier Urinproben $> 0,05$ mg/L und in zwei der vier Proben $> 0,1$ mg/L. 24 h nach dem Konsum von 0,2 L Wein konnten in allen drei Urinproben EtS-Konzentrationen $> 0,05$ mg/L und in einer sogar $> 0,1$ mg/L gefunden werden.

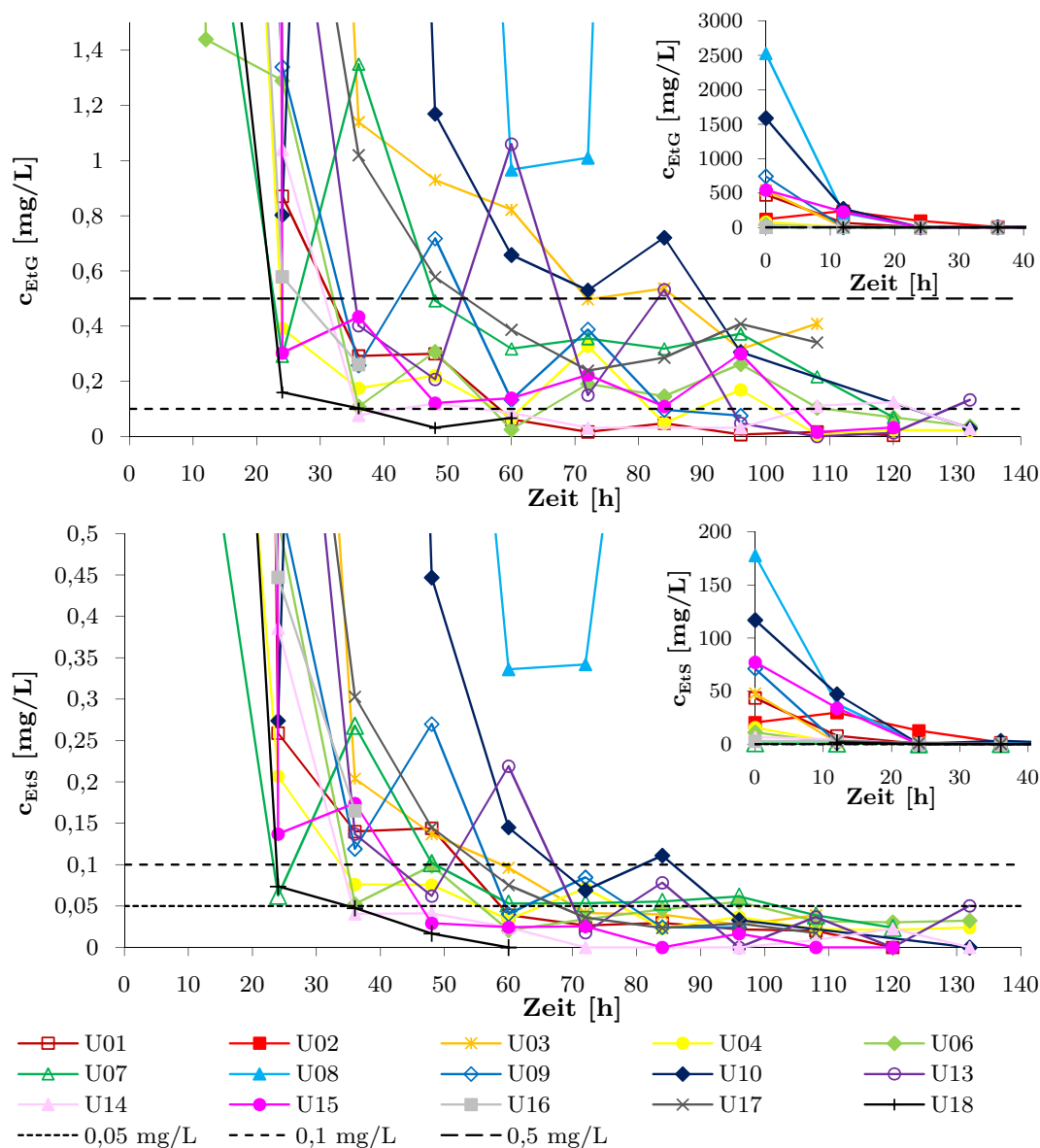


Abbildung 7.18: Gemessene EtG- (oben) und EtS- (unten) Konzentrationen im Urin der Entzugspatienten im Bereich der betrachteten Grenzwerte (waagerechte Linien). Die kleinen Diagramme oben rechts zeigen eine Übersicht über den gesamten Konzentrationsbereich.

Proben aus der Entzugsklinik

Insgesamt wurden 133 Urine von 13 Patienten, die über einen Zeitraum von 36–132 h gesammelt wurden, analysiert. Die größten EtG- und EtS-Konzentrationen von 2500 mg/L bzw. 178 mg/L wurden bei zwölf Patienten in den ersten Proben gefunden. Die gemessenen Konzentrationen im Bereich der betrachteten Grenzwerte sowie eine Übersicht über den gesamten Konzentrationsbereich sind in Abbildung 7.18 dargestellt. Bereits

12 h später wurden bei diesen Patienten deutlich niedrigere Konzentrationen (EtG: 1,4–227 mg/L und EtS: 0,7–47 mg/L) gemessen. Bei einem Patienten (U02) wurden ansteigende EtG- und EtS-Konzentrationen in den ersten 12 h festgestellt. Ein massiver Konsum von Alkohol kurz vor dem Erscheinen in der Alkoholambulanz würde dies erklären. Bei Patient U08 wurden nach 84 h ansteigende EtG- und EtS-Konzentrationen bestimmt, die auf eine heimliche Alkoholaufnahme während des Entzuges hindeuten.

Bei neun der stark alkoholisierten Patienten wurden über 120 h Urinproben gesammelt. Bei zwei bzw. sechs der Patienten konnten in der letzten Probe noch EtG- bzw. EtS-Konzentrationen oberhalb der LOD nachgewiesen werden. Bei Beachtung der Grenzwerte, die bei Abstinenzuntersuchungen zum Einsatz kommen bzw. kommen könnten, wird deutlich, dass je nach Höhe der Grenzwerte bereits nach 24 h einige Patienten als negativ getestet würden. Zu diesem Zeitpunkt wären bei einem Grenzwert von 0,5 mg/L EtG vier von 13 Proben negativ. Nach 36 h wären es bereits acht von 13, wobei bei einer der Probe die EtG-Konzentration sogar unter 0,1 mg/L lag. Alle gemessenen EtS-Konzentrationen lagen nach 24 h oberhalb von 0,05 mg/L. In elf der 13 Urinproben wurden EtS-Konzentrationen $> 0,1$ mg/L nachgewiesen. Nach 36 h wurden in elf von 13 bzw. in neun von 13 EtG-Konzentrationen $> 0,05$ bzw. $> 0,1$ mg/L gefunden.

7.7.4 Diskussion

Erste Studien kamen zu dem Ergebnis, dass EtG bis zu 80 h nach dem letzten Alkoholkonsum im Urin nachgewiesen werden kann [76, 77, 311]. Dadurch entstand der Name „80-Stunden-Test“, der häufig in populärwissenschaftlicher Literatur zu finden ist. Weiterführende Studien konnten jedoch zeigen, dass die Länge des Nachweisfensters stark von der konsumierten Menge des Alkohols abhängig ist (siehe auch S. 24). In den analysierten Urinproben der Entzugspatienten konnte z. T. sogar 120 h nach der stationären Aufnahme noch EtG nachgewiesen werden. Dies steht in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Helander et al. [144], die EtG-Konzentrationen $> 0,5$ mg/L für 40–130 h im Urin von Patienten zu Beginn einer Entzugstherapie fanden. Ein Konsum geringerer Alkoholmengen kann jedoch nur wesentlich kürzer über eine EtG-Bestimmung im Urin nachgewiesen werden.

Für die Bewertung von authentischen Proben ist dabei nicht die Nachweisbarkeit von EtG entscheidend, sondern ob der entsprechende Grenzwert, der für Untersuchungen im Rahmen von Abstinenzprogrammen aktuell bei 0,1 mg/L liegt, überschritten wird. Zwischen der Einbestellung und der Probenahme am nächsten Tag liegt in der Regel eine Zeitdifferenz von ca. 24 h, die den folgenden Auswertungen zu Grunde gelegt wurde.

Lediglich in einer Urinprobe konnte 24 h nach dem Konsum einer kleinen Flasche Bier (0,33 L) oder eines Glases Wein (0,1 L) eine EtG-Konzentration $> 0,1$ mg/L ermittelt werden. Dies zeigt, dass ein negativer Befund trotz der Aufnahme von alkoholischen Getränken in Form der kleinsten aber dennoch gebräuchlichen Gebindegrößen, die z. B. zum Anstoßen konsumiert werden aber deutlich gegen ein striktes Alkoholverbot verstoßen, wahrscheinlich ist. Auch der Konsum der doppelten Mengen (0,66 L Bier oder 0,2 L Wein) führte nicht in allen Fällen zu einem positiven EtG-Befund 24 h nach Trinkende. Lediglich fünf der sieben Teilnehmer (bzw. sechs von sieben bei normierten

EtG-Konzentrationen) würden mit einem Grenzwert von 0,1 mg/L positiv bewertet. EtG-Konzentrationen > 0,5 mg/L (0,66 und 0,74 mg/L) konnten nach 24 h sogar nur in zwei Proben mit hohen Kreatininkonzentrationen (155,5 und 268,4 mg/dL) nachgewiesen werden.

Die ermittelten Ergebnisse sind konform mit den Ergebnissen aus vorherigen, ähnlich gelagerten Studien, die EtG nach einem kontrollierten Konsum von 0,1 bzw. 0,3 g Alkohol/kg Körpergewicht für maximal 6–25 h nachweisen konnten (LOD: 0,1–0,15 mg/L) [12, 122, 123, 152]. Dass der EtG-Grenzwert von 0,1 mg/L nach Konsum von 0,2 L Wein bzw. 0,33 L Bier ca. doppelt so lange überschritten wurde wie nach dem Trinken von 2–3 L alkoholfreiem Bier, obwohl jeweils ca. 10 g Alkohol enthalten waren, bestätigt die Annahme (siehe S. 127), dass neben der Alkoholmenge auch die Art des Lebensmittels bzw. dessen Flüssigkeitsgehalt einen entscheidenden Einfluss auf das Nachweisfenster von EtG hat.

Von den Patienten der Entzugsklinik existieren keine Daten über den Alkoholkonsum der vorangegangenen Tage, so dass nur eine eingeschränkte Bewertung der Ergebnisse möglich ist. Da sich aber alle freiwillig für eine Entgiftung in eine stationäre Behandlung begeben haben, kann davon ausgegangen werden, dass ein exzessiver Alkoholkonsum vorangegangen ist. Die hohen EtG-Konzentrationen in den jeweils ersten Proben von bis zu 2500 mg/L untermauern diesen Verdacht.

Die gemessenen EtG-Konzentrationen fielen jedoch z. T. so schnell ab, dass bereits nach 24 h vier der 13 Patienten mit einem Grenzwert von 0,5 mg/L als abstinent getestet würden. Nach 36 h würde sich die Zahl auf acht negative Befunde erhöhen und ein Patient selbst bei einem Grenzwert von 0,1 mg/L negativ bewertet.

Die Ergebnisse beider Studien verdeutlichen, dass ein EtG-Grenzwert von 0,5 mg/L nicht zur Überwachung einer Alkoholabstinenz geeignet ist, sondern lediglich einen regelmäßigen Alkoholkonsum anzeigt. Zudem wird eindeutig dargelegt, dass sogar der derzeit für Abstinenzuntersuchungen eingesetzte Grenzwert von 0,1 mg/L in Kombination mit einer Einbestellungsfrist von 24 h nicht geeignet ist, um die geforderte strikte Abstinenz zu überwachen. Eine Möglichkeit, die diagnostische Genauigkeit des Tests zu erhöhen, wäre eine verkürzte Einbestellungsfrist. Viele der Teilnehmer müssen jedoch beruflichen Verpflichtungen nachkommen oder eine weite Anreise zurücklegen, so dass eine deutliche Verkürzung schwer zu realisieren ist. Als Alternative käme eine Absenkung des Grenzwertes infrage. Hierdurch würde sich jedoch das Zeitfenster, indem ein übermäßiger Konsum von alkoholhaltigen Lebensmittel oder auch der Gebrauch von alkoholhaltigen Hygieneprodukten zu positiven Ergebnissen führt, verlängern. EtG-Konzentrationen > 0,05 mg/L konnten beispielsweise nach dem Konsum von 2–3 L alkoholfreiem Bier für maximal 22 h (EtG100: 16 h) gefunden werden (siehe S. 124).

Für eine hohe Sensitivität des Tests kombiniert mit einem geringen Risiko von falsch positiven Befunden sollten daher möglichst viele der betroffenen Personen über den Alkoholgehalt von bestimmten Lebensmitteln und Hygieneprodukten aufgeklärt und ein Grenzwert von maximal 0,1 mg/L verwendet werden. Die Anwendung eines zweiten, höheren Grenzwertes, z.B. 0,5 mg/L, für allgemeinen Kontrolluntersuchung, wie unter anderem von Halter et al. [174] vorgeschlagen, verringert zwar bei unaufgeklärten

Personen die Gefahr von falsch positiven Befunden, führt aber gleichzeitig zu einer deutlichen Verschlechterung der diagnostischen Genauigkeit des Alkoholmarkers EtG.

Nach der ausführlichen Diskussion der gefundenen EtG-Konzentrationen gilt es, die gefundenen EtS-Konzentrationen genauer zu betrachten. Obwohl einige Fakten dafür sprechen, dass EtS, aufgrund der gefundenen höhere Stabilität gegenüber Bakterien (siehe S. 27 und [166–168]), der verlässlichere Biomarker ist, wurde bisher kein Grenzwert für Abstinenzuntersuchungen festgelegt.

Aus den gewonnenen Daten konnte 0,05 mg/L als möglicher Grenzwert für EtS ermittelt werden. In sechs von sieben Proben konnten auch 24 h nach dem Konsum von 0,66 L Bier oder 0,2 L Wein noch EtS-Konzentrationen $> 0,05$ mg/L gefunden werden. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen wiesen Wurst et al. [12] EtS nach dem Konsum von 9 bzw. 18 g Alkohol für 19,7–26,3 h bzw. 21,0–29,4 h nach (LOD: 0,05 mg/L; LOQ: 0,1 mg/L).

Dass in allen Urinen der Entzugspatienten 24 h nach Beginn der stationären Therapie EtS-Konzentrationen $> 0,05$ mg/L gefunden wurden, bestärkt einen entsprechenden Grenzwert. Zudem lässt sich ein Grenzwert von 0,05 mg/L gut mit dem ermittelten molaren Verhältnis von EtG und EtS (Median: 2,3) vereinbaren, das mit gefundenen Werten aus vorherigen Studien [123, 144, 154] übereinstimmt.

Der ermittelte Grenzwert von 0,05 mg/L stellt einen Kompromiss zwischen einer möglichst hohen Sensitivität und der gleichzeitigen Vermeidung von falsch positiven Ergebnissen dar, so dass der Beweis einer strikter Abstinenz unter Einbeziehung einer Einbestellungsfrist von 24 h, genau wie bei einem Nachweis von EtG, nicht möglich ist. Nach dem Konsum von 0,1 L Wein oder 0,33 L Bier konnten EtS-Konzentrationen $> 0,05$ mg/L beispielsweise nur für maximal 20,5 h nachgewiesen werden. Ein Blick auf die Daten aus den Versuchen mit alkoholhaltigen Lebensmitteln (siehe Abschnitt 7.6) zeigt gleichzeitig, dass EtS-Konzentrationen $> 0,05$ mg/L sogar nach der Aufnahme der größten getesteten Alkoholmenge (7–10 g), in Form von 2–3 L alkoholfreiem Bier, nur für maximal 13 h nachgewiesen werden konnten. Falsch positive Befunde aufgrund einer „unbewussten“ Alkoholaufnahme sind daher mit einem Grenzwert von 0,05 mg/L und einer Einbestellungsfrist von 24 h nicht zu erwarten.

Problematisch ist jedoch die Möglichkeit von falsch positiven Befunden nach dem Konsum von EtS-haltigen Lebensmitteln. Sowohl der im Rahmen dieser Arbeit getrunkene Traubensaft, der EtS enthielt, als auch der alkoholfreie Wein aus einer Studie von Høiseth et al. [21], in dem sowohl EtG als auch EtS nachgewiesen werden konnte, führte zu erhöhten EtS-Konzentrationen im Urin. Dass EtS auch in weiteren Lebensmitteln enthalten ist und dadurch falsch positive Ergebnisse zufolge hat, kann nicht ausgeschlossen werden.

Die Aussagekraft der Studie ist aufgrund der geringen Anzahl der Teilnehmer sowie der fehlenden Daten über den Alkoholkonsum der Entzugspatienten begrenzt. Bei dem ermittelten Grenzwert für EtS handelt es sich daher um einen Vorschlag, der überprüft und diskutiert werden muss. Weitere Studien mit größeren Datensätzen, die eine statistische Auswertung ermöglichen, sind nötig.

8 Schlussfolgerungen und Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen konnten weitere wichtige Erkenntnisse auf dem Gebiet der direkten Alkoholmarker: EtG, EtS und FAEE liefern. Hochsensitive Analysemethoden zur Quantifizierung von EtG und EtS in Urin sowie von EtG bzw. der vier FAEE: Ethylmyristat, Ethylpalmitat, Ethyloleat und Ethylstearat in Haaren wurden für den Einsatz bei Abstinenzuntersuchungen optimiert und erfolgreich nach den Richtlinien der GTFCh validiert. Im Rahmen von Routineanalysen auftretende Selektivitätsprobleme beim EtG-Nachweis wurden durch eine erneute Verbesserung der chromatographischen Trennung gelöst. Des Weiteren wurden Studien durchgeführt, die unter anderem den Einfluss der Haarzerkleinerung auf die ermittelten EtG-Konzentrationen in Haaren oder die Möglichkeiten von falsch positiven EtG-Befunden in Urin nach einem übermäßigen Konsum von alkoholhaltigen Lebensmitteln erforschten. Neben retrospektiven Auswertungen von ermittelten EtG-Konzentrationen aus routinemäßig durchgeführten Urin- und Haaranalysen, wurden zudem Untersuchungen zur Bewertung des aktuellen EtG-Grenzwertes in Urin für Abstinenzprogramme (0,1 mg/L) sowie vergleichende Bestimmungen der EtG- und FAEE-Konzentrationen in Haaren aus Abstinenztests wie auch von Alkoholikern im stationären Entzug vollzogen.

Hierbei wurde gezeigt, dass bei der Analyse von gemahlten Haaren signifikant höhere EtG-Konzentrationen nachgewiesen werden können als nach einer Zerkleinerung mit der Schere. Aufgrund des gefundenen großen Einflusses der Aufarbeitung auf das spätere Ergebnis, erscheint der Einsatz von methodenabhängigen Grenzwerten oder die Einführung einer standardisierten Methode sinnvoll.

Die vergleichende Bestimmungen der EtG- und FAEE-Konzentrationen in Haaren aus Fällen zur Fahreignungsbegutachtung ergaben, dass EtG, aufgrund der geringen Anzahl an Proben (5%), die positiv auf EtG und gleichzeitig negativ auf FAEE getestet wurden, den besser geeigneten Marker für Abstinenzuntersuchungen darstellt. In kritischen Fällen ist als Absicherung eine zusätzliche Bestimmung der FAEE-Konzentration zu empfehlen. Die z. T. großen Abweichungen der EtG- und FAEE-Konzentrationen verdeutlichen, dass eine Vielzahl von Faktoren, die die Konzentrationen der beiden Marker in Haaren konträr beeinflussen, bei einer Beurteilung der Ergebnisse berücksichtigt werden müssen.

Studien Dritter konnten zeigen, dass EtG-Konzentrationen unterhalb des aktuellen Grenzwertes von 7 pg/mg keine strikte Abstinenz beweisen. Eine retrospektive Auswertung der Ergebnisse aus den durchgeführten EtG-Bestimmungen zur Abstinenzprüfung konnte jedoch zeigen, dass eine hypothetische Senkung des Grenzwertes zur Verbesserung der Sensitivität auf 5 pg/mg nur einen geringen Anstieg der positiven Fälle (6,2%) zur Folge hätte.

Der erstmalig durchgeführte Vergleich von EtG- und FAEE-Konzentrationen in Haaren von Patienten während eines stationären Entzugs mit deren Angaben zum Alkoholkonsum

führte zu übereinstimmenden Ergebnissen aller drei Parameter in 43,9% der Fälle. Die EtG-Konzentration im proximalen Segment scheint dabei mit einer Übereinstimmung von 76,6% am besten für die Einschätzung des Alkoholkonsums geeignet zu sein. Eine Übereinstimmung in über 3/4 der Fälle ist angesichts des Vergleiches mit subjektiven Trinkangaben, die sogenannte „weiche“ Daten darstellen und häufig unvollständig, unterdimensioniert oder falsch sind, zufriedenstellend.

Weitere Faktoren wie z. B. eine externe Kontamination oder ein Auswaschen, die die Ergebnisse von Haaranalysen beeinflussen können, stehen dabei den Vorteilen eines langen Nachweisfensters von mehreren Monaten bis hin zu einem Jahr sowie einer nichtinvasiven Probenahme gegenüber. Die einzige Möglichkeit, weitere Erkenntnisse über die Exaktheit von Alkoholmarkern in Haaren unabhängig von den genannten Faktoren zu bekommen, sind prospektive Studien sowie kontrollierte Trinkversuche, von denen bisher nur jeweils eine von Kharbouche et al. [197] und Kronstrand et al. [1] im Jahr 2012 veröffentlicht worden sind. Bei Haaranalysen im Rahmen von Abstinenzuntersuchungen sind die verzögerte Einlagerung der Alkoholmetaboliten sowie die Anteile an telogenen und katagenen Haaren zu beachten, die einen Abstand zwischen Beginn der Abstinenz und Haarprobenentnahme von mindestens 1–2 Monaten erfordern.

Der Nachweis von EtG in Urin unter Verwendung eines Grenzwertes von 0,1 mg/L mit einer Einbestellungsfrist von 24 h ist ebenfalls nicht zum Beweis, sondern nur zum Ausschluss einer Abstinenz geeignet. Geringe Mengen Alkohol, aufgenommen als Bier oder Wein, führten in einer der durchgeführten Studien zu einer maximalen Dauer der Überschreitung des Grenzwertes von 23,5 h. Ein höherer Grenzwert von 0,5 mg/L würde sogar bei vier von 13 stark alkoholisierten Personen 24 h nach Beginn eines stationären Entzugs zu einem negativen Befund führen. Eine Halbierung des Grenzwertes hätte jedoch nach den vorliegenden Daten aus Routineuntersuchungen nur einen geringen Anstieg von positiven Befunden (5,3%) zur Folge und ist ebenso wie eine Verkürzung der Einbestellungsfrist nicht praktikabel, um die diagnostische Genauigkeit des Tests zu erhöhen.

Die Ergebnisse der durchgeführten Trink- und Essversuche konnten zeigen, dass falsch positive Befunde durch einen Konsum von alkoholhaltigen Lebensmitteln sehr unwahrscheinlich sind. EtG-Konzentrationen $> 0,1$ mg/L wurden allenfalls nach einem übermäßigen Konsum und nur über einen begrenzten Zeitraum, der mit maximal 13 h deutlich unterhalb der Einbestellungsfrist von 24 h liegt, erreicht. Dass jedoch kurzzeitig nach dem Konsum von 2–3 L alkoholfreiem Bier sogar EtG-Konzentrationen $> 0,5$ mg/L gemessen wurden, verdeutlicht die Relevanz einer ausführlichen Aufklärung der Teilnehmer von Abstinenzprogrammen über das Vorkommen von Alkohol in Lebensmitteln und Hygieneprodukten sowie über mögliche Konsequenzen.

In beiden Studien konnte eine beträchtliche Abhängigkeit der EtG- und EtS-Konzentrationen von der Kreatininkonzentration des Urins beobachtet werden. Die normierten Konzentrationsverläufe sind wesentlich glatter und stimmen für die unterschiedlichen Teilnehmer besser überein. Zudem lag eine Abhängigkeit der ermittelten Nachweisfenster für EtG und EtS von der aufgenommenen Flüssigkeitsmenge vor. Dies verdeutlicht, dass aufwändige Trink- und Essversuche mit großen Mengen alkoholhaltiger

Lebensmittel nicht gänzlich durch die Aufnahme einer entsprechenden Menge Alkohol im Form von Spirituosen simuliert werden können.

Für EtS, welches stabiler gegenüber Bakterien zu sein scheint, wurde ein möglicher Grenzwert von 0,05 mg/L ermittelt. Dieser vorläufige Wert, der ebenfalls keinen Nachweis für eine strikte Abstinenz darstellt, ist durch weitere, größere Studien statistisch zu bestätigen. Zu berücksichtigen ist außerdem, dass EtS auch nach dem Konsum von EtS-haltigen Lebensmitteln, z. B. Traubensaft, im Urin zu finden ist.

9 Literaturverzeichnis

- [1] R. Kronstrand, L. Brinkhagen und F. H. Nyström, „Ethyl glucuronide in human hair after daily consumption of 16 or 32g of ethanol for 3 months.“ *Forensic Sci Int*, Vol. 215, Nr. 1-3, S. 51–55, 2012.
- [2] F. Pragst, V. Auwaerter, F. Sporkert und K. Spiegel, „Analysis of fatty acid ethyl esters in hair as possible markers of chronically elevated alcohol consumption by headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS).“ *Forensic Sci Int*, Vol. 121, Nr. 1-2, S. 76–88, 2001.
- [3] Society of Hair Testing (SoHT), „Preliminary proposal for a consensus: Use of alcohol markers in hair for abstinence assessment 2012.“ 2012. URL http://www.soht.org/pdf/Proposal+for+alcohol+markers+_Rome+and+Sevilla_.pdf. Aufgerufen am: 05.03.2012.
- [4] W. Schubert und R. Mattern (Hrsg.), „Beurteilungskriterien: Urteilsbildung in der Medizinisch-Psychologischen Fahreignungsdiagnostik.“ Kirschbaum Verlag (Bonn, Deutschland), 2008. ISBN-13: 978-3781216785.
- [5] Deutsche Hauptstelle für Suchtfragen e.V. (Hrsg.), „Jahrbuch Sucht 2012.“ Pabst Science Publishers (Lengerich, Deutschland), 2012. ISBN-13: 978-3-89967-768-3.
- [6] „Global status report on alcohol and health (2011).“ URL http://www.who.int/substance_abuse/publications/global_alcohol_report/msbgsruprofiles.pdf. ISBN 978 92 4 156415 1 Aufgerufen am: 11.01.2012.
- [7] Bundesministerium des Inneren, „Polizeiliche Kriminalstatistik 2010.“ 2011. URL http://www.bmi.bund.de/SharedDocs/Downloads/DE/Broschueren/2011/PKS2010.pdf?__blob=publicationFile. Aufgerufen am: 02.05.2012.
- [8] „Verkehrsunfälle - Alkoholunfälle im Straßenverkehr (2010).“ 2010. URL <http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Content/Publikationen/Fachveroeffentlichungen/Verkehr/Verkehrsunfaelle/UnfaelleAlkohol15462404107004,property=file.pdf>. Aufgerufen am: 10.01.2012.
- [9] „Über die Hälfte der jungen Fahrer in Deutschland riskiert den Crash.“ 2012. URL http://www.goodyear.eu/de_de/news/119383-ueber-die-Haelfte-der-jungen-Fahrer-in-Deutschland-riskiert-den-Crash/index.htm?to=2012&from=2007. Aufgerufen am 27.04.2012.
- [10] P. Kintz, „Consensus of the Society of Hair Testing on hair testing for chronic excessive alcohol consumption 2009.“ *Forensic Sci Int*, Vol. 196, Nr. 1-3, S. 2, 2010.

- [11] P. Kintz, „Consensus of the Society of Hair Testing on hair testing for chronic excessive alcohol consumption 2011.“ *Forensic Sci Int*, Vol. 218, Nr. 1–3, S. 2, 2012.
- [12] F. M. Wurst, S. Dresen, J. P. Allen, G. Wiesbeck, M. Graf und W. Weinmann, „Ethyl sulphate: a direct ethanol metabolite reflecting recent alcohol consumption.“ *Addiction*, Vol. 101, Nr. 2, S. 204–211, 2006.
- [13] A. Thierauf, C. C. Halter, S. Rana, V. Auwaerter, A. Wohlfarth, F. M. Wurst und W. Weinmann, „Urine tested positive for ethyl glucuronide after trace amounts of ethanol.“ *Addiction*, Vol. 104, Nr. 12, S. 2007–2012, 2009.
- [14] T. P. Rohrig, C. Huber, L. Goodson und W. Ross, „Detection of ethylglucuronide in urine following the application of Germ-X.“ *J Anal Toxicol*, Vol. 30, Nr. 9, S. 703–704, 2006.
- [15] T. G. Rosano und J. Lin, „Ethyl glucuronide excretion in humans following oral administration of and dermal exposure to ethanol.“ *J Anal Toxicol*, Vol. 32, Nr. 8, S. 594–600, 2008.
- [16] S. B. Karch, „Ethanol-based hand cleansers.“ *J Forensic Leg Med*, Vol. 16, Nr. 8, S. 497–498, 2009.
- [17] G. M. Reisfield, B. A. Goldberger, B. O. Crews, A. J. Pesce, G. R. Wilson, S. A. Teitelbaum und R. L. Bertholf, „Ethyl glucuronide, ethyl sulfate, and ethanol in urine after sustained exposure to an ethanol-based hand sanitizer.“ *J Anal Toxicol*, Vol. 35, Nr. 2, S. 85–91, 2011.
- [18] R. L. Bertholf, A. L. Bertholf, G. M. Reisfield und B. A. Goldberger, „Respiratory exposure to ethanol vapor during use of hand sanitizers: is it significant?“ *J Anal Toxicol*, Vol. 35, Nr. 5, S. 319–320, 2011.
- [19] J. T. Jones, M. R. Jones, C. A. Plate und D. Lewis, „Ethyl glucuronide and ethyl sulfate concentrations following use of ethanol containing mouthwash.“ *United States Drug Testing Laboratories Research Monograph*, Vol. 1, S. 1–4, 2006.
- [20] A. Costantino, E. J. Digregorio, W. Korn, S. Spayd und F. Rieders, „The effect of the use of mouthwash on ethylglucuronide concentrations in urine.“ *J Anal Toxicol*, Vol. 30, Nr. 9, S. 659–662, 2006.
- [21] G. Høiseth, B. Yttredal, R. Karinen, H. Gjerde und A. Christophersen, „Levels of ethyl glucuronide and ethyl sulfate in oral fluid, blood, and urine after use of mouthwash and ingestion of nonalcoholic wine.“ *J Anal Toxicol*, Vol. 34, Nr. 2, S. 84–88, 2010.
- [22] G. M. Reisfield, B. A. Goldberger, A. J. Pesce, B. O. Crews, G. R. Wilson, S. A. Teitelbaum und R. L. Bertholf, „Ethyl glucuronide, ethyl sulfate, and ethanol in urine after intensive exposure to high ethanol content mouthwash.“ *J Anal Toxicol*, Vol. 35, Nr. 5, S. 264–268, 2011.

- [23] M. Yegles, S. Schneider und R. Wennig, „The role of ethanol containing lotios on ethyl glucuronide in hair.“ *Toxichem Krimtech*, Vol. 76, S. 117, 2008.
- [24] F. Sporkert, H. Kharbouche, M. P. Augsburger, C. Klemm und M. R. Baumgartner, „Positive EtG findings in hair as a result of a cosmetic treatment.“ *Forensic Sci Int*, Vol. 218, Nr. 1–3, S. 97–100, 2012.
- [25] L. M. Ferreira, T. Binz und M. Yegles, „The influence of ethanol containing cosmetics on ethyl glucuronide concentration in hair.“ *Forensic Sci Int*, Vol. 218, Nr. 1–3, S. 123–125, 2012.
- [26] N. De Giovanni, G. Donadio und M. Chiarotti, „Ethanol contamination leads to fatty acid ethyl esters in hair samples.“ *J Anal Toxicol*, Vol. 32, Nr. 2, S. 156–159, 2008.
- [27] J. Gareri, B. Appenzeller, P. Walasek und G. Koren, „Impact of hair-care products on FAEE hair concentrations in substance abuse monitoring.“ *Anal Bioanal Chem*, Vol. 400, Nr. 1, S. 183–188, 2011.
- [28] S. Hartwig, V. Auwärter und F. Pragst, „Effect of hair care and hair cosmetics on the concentrations of fatty acid ethyl esters in hair as markers of chronically elevated alcohol consumption.“ *Forensic Sci Int*, Vol. 131, Nr. 2-3, S. 90–97, 2003.
- [29] M. Yegles, A. Labarthe, V. Auwärter, S. Hartwig, H. Vater, R. Wennig und F. Pragst, „Comparison of ethyl glucuronide and fatty acid ethyl ester concentrations in hair of alcoholics, social drinkers and teetotallers.“ *Forensic Sci Int*, Vol. 145, Nr. 2-3, S. 167–173, 2004.
- [30] L. Morini, A. Zucchella, A. Poletti, L. Politi und A. Groppi, „Effect of bleaching on ethyl glucuronide in hair: an in vitro experiment.“ *Forensic Sci Int*, Vol. 198, Nr. 1-3, S. 23–27, 2010.
- [31] S. Suesse, F. Pragst, T. Mieczkowski, C. M. Selavka, A. Elian, H. Sachs, M. Hastedt, M. Rothe und J. Campbell, „Practical experiences in application of hair fatty acid ethyl esters and ethyl glucuronide for detection of chronic alcohol abuse in forensic cases.“ *Forensic Sci Int*, Vol. 218, Nr. 1–3, S. 82–91, 2012.
- [32] „RÖMPP Chemie-Enzyklopädie Online (Version 3.19), Eintrag zu Ethanol“ 2011. URL www.roempp.com/prod/. Aufgerufen am 11.01.2012.
- [33] F.-X. Reichel (Hrsg.), „Taschenatlas Toxikologie.“ 3. Aufl. Georg Thieme Verlag (Stuttgart, Deutschland), 2009. ISBN-13: 978-3131089731.
- [34] B. Madea und F. Mußhoff, „Basiswissen Rechtsmedizin.“ Springer Verlag (Berlin, Deutschland), 2007. ISBN-13: 978-3540714286.
- [35] H. P. Krüger und M. Vollrath, *Suchtmedizin*, Kap. Psychotrope Substanzen im Straßenverkehr - Auftreten, Risiken, Maßnahmen. Urban und Fischer (München, Deutschland), 2000. ISBN-13: 9783437217807.

- [36] „Verordnung über die Zulassung von Personen zum Straßenverkehr.“ URL http://www.gesetze-im-internet.de/fev_2010/_13.html. Aufgerufen am 10.01.2012.
- [37] G. Eisenbrand und M. Metzler, „Toxikologie für Chemiker - Stoffe, Mechanismen, Prüfverfahren.“ Georg Thieme Verlag (Stuttgart, Deutschland), 1994. ISBN: 3-13-127001-2.
- [38] A. Schneider, M. V. Singer und S. Teyssen (Hrsg.), „Alkohol und Alkoholfolgekrankheiten: Grundlagen - Diagnostik - Therapie.“ 2. Aufl. Springer Verlag (Berlin, Deutschland), 2005. ISBN-13: 978-3540225522.
- [39] T. Arndt, „Biomarker des Alkoholkonsums.“ *Toxichem Krimtech*, Vol. 78, S. 419–430, 2011.
- [40] K. Peterson, „Biomarkers for alcohol use and abuse—a summary.“ *Alcohol Res Health*, Vol. 28, Nr. 1, S. 30–37, 2004.
- [41] F. M. Wurst, C. Alling, S. Aradottir, F. Pragst, J. P. Allen, W. Weinmann, P. Marmillot, P. Ghosh, R. Lakshman, G. E. Skipper, T. Neumann, C. Spies, M. Javors, B. A. Johnson, N. Ait-Daoud, F. Akhtar, J. D. Roache und R. Litten, „Emerging biomarkers: new directions and clinical applications.“ *Alcohol Clin Exp Res*, Vol. 29, Nr. 3, S. 465–473, 2005.
- [42] M. L. Hannuksela, M. K. Liisanantti, A. E. T. Nissinen und M. J. Savolainen, „Biochemical markers of alcoholism.“ *Clin Chem Lab Med*, Vol. 45, Nr. 8, S. 953–961, 2007.
- [43] A. Thierauf, M. G. Perdekamp, W. Weinmann und V. Auwärter, „Alkoholkonsummarker.“ *Rechtsmedizin*, Vol. 21, S. 69–79, 2011.
- [44] T. Neumann und C. Spies, „Use of biomarkers for alcohol use disorders in clinical practice.“ *Addiction*, Vol. 98 Suppl 2, S. 81–91, 2003.
- [45] K. M. Conigrave, L. J. Degenhardt, J. B. Whitfield, J. B. Saunders, A. Helander, B. Tabakoff und W. H. O. S. B. R. A. S. Group, „CDT, GGT, and AST as markers of alcohol use: the WHO/ISBRA collaborative project.“ *Alcohol Clin Exp Res*, Vol. 26, Nr. 3, S. 332–339, 2002.
- [46] F. Musshoff, „Chromatographic methods for the determination of markers of chronic and acute alcohol consumption.“ *J Chromatogr B*, Vol. 781, Nr. 1-2, S. 457–480, 2002.
- [47] C. J. Eriksson und T. Fukunaga, „Human blood acetaldehyde (update 1992).“ *Alcohol Alcohol Suppl*, Vol. 2, S. 9–25, 1993.
- [48] M. R. Halvorson, J. L. Campbell, G. Sprague, K. Slater, J. K. Noffsinger und C. M. Peterson, „Comparative evaluation of the clinical utility of three markers of ethanol intake: the effect of gender.“ *Alcohol Clin Exp Res*, Vol. 17, Nr. 2, S. 225–229, 1993.

- [49] H. Gnann, C. Engelmann, G. Skopp, M. Winkler, V. Auwärter, S. Dresen, N. Ferreirós, F. M. Wurst und W. Weinmann, „Identification of 48 homologues of phosphatidylethanol in blood by LC-ESI-MS/MS.“ *Anal Bioanal Chem*, Vol. 396, Nr. 7, S. 2415–2423, 2010.
- [50] T. Gunnarsson, A. Karlsson, P. Hansson, G. Johnson, C. Alling und G. Odham, „Determination of phosphatidylethanol in blood from alcoholic males using high-performance liquid chromatography and evaporative light scattering or electrospray mass spectrometric detection.“ *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, Vol. 705, Nr. 2, S. 243–249, 1998.
- [51] S. Aradottir, G. Asanovska, S. Gjerds, P. Hansson und C. Alling, „Phosphatidylethanol (PEth) concentrations in blood are correlated to reported alcohol intake in alcohol-dependent patients.“ *Alcohol Alcohol*, Vol. 41, Nr. 4, S. 431–437, 2006.
- [52] F. M. Wurst, R. Vogel, K. Jachau, A. Varga, C. Alling, A. Alt und G. E. Skipper, „Ethyl glucuronide discloses recent covert alcohol use not detected by standard testing in forensic psychiatric inpatients.“ *Alcohol Clin Exp Res*, Vol. 27, Nr. 3, S. 471–476, 2003.
- [53] F. M. Wurst, S. Alexson, M. Wolfersdorf, G. Bechtel, S. Forster, C. Alling, S. Aradóttir, K. Jachau, P. Huber, J. P. Allen, V. Auwärter und F. Pragst, „Concentration of fatty acid ethyl esters in hair of alcoholics: comparison to other biological state markers and self reported-ethanol intake.“ *Alcohol Alcohol*, Vol. 39, Nr. 1, S. 33–38, 2004.
- [54] S. Hartmann, S. Aradottir, M. Graf, G. Wiesbeck, O. Lesch, K. Ramskogler, M. Wolfersdorf, C. Alling und F. M. Wurst, „Phosphatidylethanol as a sensitive and specific biomarker: comparison with gamma-glutamyl transpeptidase, mean corpuscular volume and carbohydrate-deficient transferrin.“ *Addict Biol*, Vol. 12, Nr. 1, S. 81–84, 2007.
- [55] V. Bianchi, A. Ivaldi, A. Raspagni, C. Arfini und M. Vidali, „Pregnancy and variations of carbohydrate-deficient transferrin levels measured by the candidate reference HPLC method.“ *Alcohol Alcohol*, Vol. 46, Nr. 2, S. 123–127, 2011.
- [56] J. P. Bergström und A. Helander, „HPLC evaluation of clinical and pharmacological factors reported to cause false-positive carbohydrate-deficient transferrin (CDT) levels.“ *Clin Chim Acta*, Vol. 389, Nr. 1-2, S. 164–166, 2008.
- [57] J. Cami, M. Farré, M. L. González, J. Segura und R. de la Torre, „Cocaine metabolism in humans after use of alcohol. clinical and research implications.“ *Recent Dev Alcohol*, Vol. 14, S. 437–455, 1998.
- [58] L. Politi, A. Zucchella, L. Morini, C. Stramesi und A. Poletini, „Markers of chronic alcohol use in hair: comparison of ethyl glucuronide and cocaethylene in cocaine users.“ *Forensic Sci Int*, Vol. 172, Nr. 1, S. 23–27, 2007.

- [59] F. Stetter, H. J. Gaertner, G. Wiatr, K. Mann und U. Breyer-Pfaff, „Urinary dolichol—a doubtful marker of alcoholism.“ *Alcohol Clin Exp Res*, Vol. 15, Nr. 6, S. 938–941, 1991.
- [60] M. A. Javors und B. A. Johnson, „Current status of carbohydrate deficient transferrin, total serum sialic acid, sialic acid index of apolipoprotein J and serum beta-hexosaminidase as markers for alcohol consumption.“ *Addiction*, Vol. 98 Suppl 2, S. 45–50, 2003.
- [61] P. Sillanauke, M. Pönniö und I. P. Jääskeläinen, „Occurrence of sialic acids in healthy humans and different disorders.“ *Eur J Clin Invest*, Vol. 29, Nr. 5, S. 413–425, 1999.
- [62] I. A. Kamil, J. N. Smith und R. T. Williams, „The metabolism of aliphatic alcohols; glucuronide formation.“ *Biochem J*, Vol. 49, Nr. 3, S. xxxviii, 1951.
- [63] I. A. Kamil, J. N. Smith und R. T. William, „A new aspect of ethanol metabolism - isolation of ethyl-glucuronide.“ *Biochem J*, Vol. 51, S. R32–R33, 1952.
- [64] P. I. Jaakonmaki, K. L. Knox, E. C. Horning und M. G. Horning, „The characterization by gas-liquid chromatography of ethyll beta-D-glucosiduronic acid as a metabolite of ethanol in rat and man.“ *Eur J Pharmacol*, Vol. 1, Nr. 1, S. 63–70, 1967.
- [65] G. Schmitt, R. Aderjan, T. Keller und M. Wu, „Ethyl glucuronide: an unusual ethanol metabolite in humans. synthesis, analytical data, and determination in serum and urine.“ *J Anal Toxicol*, Vol. 19, Nr. 2, S. 91–94, 1995.
- [66] R. S. Foti und M. B. Fisher, „Assessment of UDP-glucuronosyltransferase catalyzed formation of ethyl glucuronide in human liver microsomes and recombinant UGTs.“ *Forensic Sci Int*, Vol. 153, Nr. 2-3, S. 109–116, 2005.
- [67] S. N. de Wildt, G. L. Kearns, J. S. Leeder und J. N. van den Anker, „Glucuronidation in humans. Pharmacogenetic and developmental aspects.“ *Clin Pharmacokinet*, Vol. 36, Nr. 6, S. 439–452, 1999.
- [68] R. B. Raftogianis, T. C. Wood und R. M. Weinshilboum, „Human phenol sulfotransferases SULT1A2 and SULT1A1: genetic polymorphisms, allozyme properties, and human liver genotype-phenotype correlations.“ *Biochem Pharmacol*, Vol. 58, Nr. 4, S. 605–616, 1999.
- [69] H. Schneider und H. Glatt, „Sulpho-conjugation of ethanol in humans in vivo and by individual sulphotransferase forms in vitro.“ *Biochem J*, Vol. 383, Nr. Pt. 3, S. 543–549, 2004.
- [70] A. Vestermark und H. Bostrom, „Studies on ester sulfates. V. on the enzymatic formation of ester sulfates of primary aliphatic alcohols.“ *Exp Cell Res*, Vol. 18, S. 174–177, 1959.

- [71] J. E. Manautou und G. P. Carlson, „Ethanol-induced fatty acid ethyl ester formation in vivo and in vitro in rat lung.“ *Toxicology*, Vol. 70, Nr. 3, S. 303–312, 1991.
- [72] E. J. Carlini, R. B. Raftogianis, T. C. Wood, F. Jin, W. Zheng, T. R. Rebbeck und R. M. Weinshilbourn, „Sulfation pharmacogenetics: SULT1A1 and SULT1A2 allele frequencies in Caucasian, Chinese and African-American subjects.“ *Pharmacogenetics*, Vol. 11, Nr. 1, S. 57–68, 2001.
- [73] S. Arslan, „Genetic polymorphisms of sulfotransferases (SULT1A1 and SULT1A2) in a turkish population.“ *Biochem Genet*, Vol. 48, Nr. 11-12, S. 987–994, 2010.
- [74] A. Nalesso, G. Frison, D. Favretto, S. Maietti und S. D. Ferrara, „Synthesis and characterization of ethyl sulfate and d5-ethyl sulfate as reference substances for applications in clinical and forensic toxicology.“ *Rapid Commun Mass Spectrom*, Vol. 19, Nr. 23, S. 3612–3614, 2005.
- [75] F. M. Wurst, C. Kempfer, S. Seidl und A. Alt, „Ethyl glucuronide—a marker of alcohol consumption and a relapse marker with clinical and forensic implications.“ *Alcohol Alcohol*, Vol. 34, Nr. 1, S. 71–77, 1999.
- [76] F. M. Wurst, G. E. Skipper und W. Weinmann, „Ethyl glucuronide – the direct ethanol metabolite on the threshold from science to routine use.“ *Addiction*, Vol. 98 Suppl 2, S. 51–61, 2003.
- [77] S. Seidl, F. M. Wurst und A. Alt, „Ethyl glucuronide—a biological marker for recent alcohol consumption.“ *Addict Biol*, Vol. 6, Nr. 3, S. 205–212, 2001.
- [78] L. Politi, F. Leone, L. Morini und A. Polettini, „Bioanalytical procedures for determination of conjugates or fatty acid esters of ethanol as markers of ethanol consumption: a review.“ *Anal Biochem*, Vol. 368, Nr. 1, S. 1–16, 2007.
- [79] R. B. Palmer, „A review of the use of ethyl glucuronide as a marker for ethanol consumption in forensic and clinical medicine.“ *Semin Diagn Pathol*, Vol. 26, Nr. 1, S. 18–27, 2009.
- [80] N. E. Walsham und R. A. Sherwood, „Ethyl glucuronide.“ *Ann Clin Biochem*, Vol. 49, Nr. Pt 2, S. 110–117, 2012.
- [81] S. Hegstad, L. Johnsen, J. Mørland und A. S. Christophersen, „Determination of ethylglucuronide in oral fluid by ultra-performance liquid chromatography- tandem mass spectrometry.“ *J Anal Toxicol*, Vol. 33, Nr. 4, S. 204–207, 2009.
- [82] C. Schummer, B. M. R. Appenzeller und R. Wennig, „Quantitative determination of ethyl glucuronide in sweat.“ *Ther Drug Monit*, Vol. 30, Nr. 4, S. 536–539, 2008.
- [83] H. Gjerde, A. S. Christophersen, I. S. Moan, B. Yttredal, J. M. Walsh, P. T. Normann und J. Mørland, „Use of alcohol and drugs by Norwegian employees: a pilot study using questionnaires and analysis of oral fluid.“ *J Occup Med Toxicol*, Vol. 5, S. 13, 2010.

- [84] E. Kaufmann und A. Alt, „Detection of ethyl glucuronide in dried human blood using LC-MS/MS.“ *Int J Legal Med*, Vol. 122, Nr. 3, S. 245–249, 2008.
- [85] L. Morini, M. Colucci, M. G. Ruberto und A. Groppi, „Determination of ethyl glucuronide in nails by liquid chromatography tandem mass spectrometry as a potential new biomarker for chronic alcohol abuse and binge drinking behavior.“ *Anal Bioanal Chem*, Vol. 402, Nr. 5, S. 1865–1870, 2012.
- [86] M. J. Reid, K. H. Langford, J. Mørland und K. V. Thomas, „Analysis and interpretation of specific ethanol metabolites, ethyl sulfate, and ethyl glucuronide in sewage effluent for the quantitative measurement of regional alcohol consumption.“ *Alcohol Clin Exp Res*, Vol. 35, Nr. 9, S. 1593–1599, 2011.
- [87] F. M. Wurst, K. M. Dürsteler-MacFarland, V. Auwaerter, S. Ergovic, N. Thon, M. Yegles, C. Halter, W. Weinmann und G. A. Wiesbeck, „Assessment of alcohol use among methadone maintenance patients by direct ethanol metabolites and self-reports.“ *Alcohol Clin Exp Res*, Vol. 32, Nr. 9, S. 1552–1557, 2008.
- [88] F. M. Wurst, P. S. Haber, G. Wiesbeck, B. Watson, C. Wallace, J. B. Whitfield, C. Halter, W. Weinmann und K. M. Conigrave, „Assessment of alcohol consumption among hepatitis C-positive people receiving opioid maintenance treatment using direct ethanol metabolites and self-report: a pilot study.“ *Addict Biol*, Vol. 13, Nr. 3-4, S. 416–422, 2008.
- [89] K. Junghanns, I. Graf, J. Pflüger, G. Wetterling, C. Ziems, D. Ehrental, M. Zöllner, L. Dibbelt, J. Backhaus, W. Weinmann und F. M. Wurst, „Urinary ethyl glucuronide (EtG) and ethyl sulphate (EtS) assessment: valuable tools to improve verification of abstinence in alcohol-dependent patients during in-patient treatment and at follow-ups.“ *Addiction*, Vol. 104, Nr. 6, S. 921–926, 2009.
- [90] F. M. Wurst, N. Thon, M. Yegles, C. Halter, W. Weinmann, B. Laskowska, J. Strasser, G. Skipper, G. A. Wiesbeck und K. Duersteler-Macfarland, „Optimizing heroin-assisted treatment (HAT): assessment of the contribution of direct ethanol metabolites in identifying hazardous and harmful alcohol use.“ *Drug Alcohol Depend*, Vol. 115, Nr. 1-2, S. 57–61, 2011.
- [91] H. Dahl, A. V. Carlsson, K. Hillgren und A. Helander, „Urinary ethyl glucuronide and ethyl sulfate testing for detection of recent drinking in an outpatient treatment program for alcohol and drug dependence.“ *Alcohol Alcohol*, Vol. 46, Nr. 3, S. 278–282, 2011.
- [92] M. J. Kip, C. D. Spies, T. Neumann, Y. Nachbar, C. Alling, S. Aradottir, W. Weinmann und F. M. Wurst, „The usefulness of direct ethanol metabolites in assessing alcohol intake in nonintoxicated male patients in an emergency room setting.“ *Alcohol Clin Exp Res*, Vol. 32, Nr. 7, S. 1284–1291, 2008.
- [93] T. Neumann, A. Helander, H. Dahl, T. Holzmann, B. Neuner, E. Weiss-Gerlach, C. Müller und C. Spies, „Value of ethyl glucuronide in plasma as a biomarker for recent alcohol consumption in the emergency room.“ *Alcohol Alcohol*, Vol. 43, Nr. 4, S. 431–435, 2008.

- [94] Y. Erim, M. Böttcher, U. Dahmen, O. Beck, C. E. Broelsch und A. Helander, „Urinary ethyl glucuronide testing detects alcohol consumption in alcoholic liver disease patients awaiting liver transplantation.“ *Liver Transpl*, Vol. 13, Nr. 5, S. 757–761, 2007.
- [95] I. Webzell, D. Ball, J. Bell, R. A. Sherwood, A. Marsh, J. G. O’Grady und N. D. Heaton, „Substance use by liver transplant candidates: an anonymous urinalysis study.“ *Liver Transpl*, Vol. 17, Nr. 10, S. 1200–1204, 2011.
- [96] K. Staufer, H. Andresen, E. Vettorazzi, N. Tobias, B. Nashan und M. Sterneck, „Urinary ethyl glucuronide as a novel screening tool in patients pre- and post-liver transplantation improves detection of alcohol consumption.“ *Hepatology*, Vol. 54, Nr. 5, S. 1640–1649, 2011.
- [97] R. Agius, T. Nadulski, H.-G. Kahl, J. Schraeder, B. Dufaux, M. Yegles und F. Pragst, „Validation of a headspace solid-phase microextraction-GC-MS/MS for the determination of ethyl glucuronide in hair according to forensic guidelines.“ *Forensic Sci Int*, Vol. 196, Nr. 1-3, S. 3–9, 2010.
- [98] L. Morini, E. Marchei, M. Pellegrini, A. Groppi, C. Stramesi, F. Vagnarelli, O. Garcia-Algar, R. Pacifici und S. Pichini, „Liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection for the measurement of ethyl glucuronide and ethyl sulfate in meconium: new biomarkers of gestational ethanol exposure?“ *Ther Drug Monit*, Vol. 30, Nr. 6, S. 725–732, 2008.
- [99] S. Pichini, L. Morini, E. Marchei, I. Palmi, M. C. Rotolo, F. Vagnarelli, O. Garcia-Algar, O. Vall und P. Zuccaro, „Ethylglucuronide and ethylsulfate in meconium to assess gestational ethanol exposure: preliminary results in two mediterranean cohorts.“ *Can J Clin Pharmacol*, Vol. 16, Nr. 2, S. e370–e375, 2009.
- [100] L. Morini, A. Groppi, E. Marchei, F. Vagnarelli, O. G. Algar, P. Zuccaro und S. Pichini, „Population baseline of meconium ethyl glucuronide and ethyl sulfate concentrations in newborns of nondrinking women in 2 Mediterranean cohorts.“ *Ther Drug Monit*, 2010. DOI: 10.1097/FTD.0b013e3181d5f14a.
- [101] I. Tarcomnicu, A. L. N. van Nuijs, K. Aerts, M. D. Doncker, A. Covaci und H. Neels, „Ethyl glucuronide determination in meconium and hair by hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry.“ *Forensic Sci Int*, Vol. 196, Nr. 1-3, S. 121–127, 2010.
- [102] S. Pichini, E. Marchei, F. Vagnarelli, L. Tarani, F. Raimondi, R. Maffucci, B. Sacher, M. Bisceglia, G. Rapisardi, M. R. Elicio, P. Biban, P. Zuccaro, R. Pacifici, A. Pierantozzi und L. Morini, „Assessment of prenatal exposure to ethanol by meconium analysis: Results of an Italian multicenter study.“ *Alcohol Clin Exp Res*, Vol. 36, Nr. 3, S. 417–424, 2012.
- [103] F. M. Wurst, E. Kelso, W. Weinmann, F. Pragst, M. Yegles und I. S. Poromaa, „Measurement of direct ethanol metabolites suggests higher rate of alcohol use

- among pregnant women than found with the AUDIT—a pilot study in a population-based sample of swedish women.“ *Am J Obstet Gynecol*, Vol. 198, Nr. 4, S. 407.e1–407.e5, 2008.
- [104] V. Kulaga, F. Pragst, N. Fulga und G. Koren, „Hair analysis of fatty acid ethyl esters in the detection of excessive drinking in the context of fetal alcohol spectrum disorders.“ *Ther Drug Monit*, Vol. 31, Nr. 2, S. 261–266, 2009.
- [105] L. Morini, E. Marchei, F. Vagnarelli, O. G. Algar, A. Groppi, L. Mastrobattista und S. Pichini, „Ethyl glucuronide and ethyl sulfate in meconium and hair-potential biomarkers of intrauterine exposure to ethanol.“ *Forensic Sci Int*, Vol. 196, Nr. 1-3, S. 74–77, 2010.
- [106] L. Morini, M. Falcón, S. Pichini, O. Garcia-Algar, P. Danesino, A. Groppi und A. Luna, „Ethyl-glucuronide and ethyl-sulfate in placental and fetal tissues by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry.“ *Anal Biochem*, Vol. 418, Nr. 1, S. 30–36, 2011.
- [107] A. Thierauf, J. Kempf, M. G. Perdekamp, V. Auwärter, H. Gnann, A. Wohlfarth und W. Weinmann, „Ethyl sulphate and ethyl glucuronide in vitreous humor as postmortem evidence marker for ethanol consumption prior to death.“ *Forensic Sci Int*, Vol. 210, Nr. 1-3, S. 63–68, 2011.
- [108] A. Keten, A. R. Tumer und A. Balseven-Odabasi, „Measurement of ethyl glucuronide in vitreous humor with liquid chromatography-mass spectrometry.“ *Forensic Sci Int*, Vol. 193, Nr. 1-3, S. 101–105, 2009.
- [109] G. Høiseth, R. Karinen, A. S. Christophersen, L. Olsen, P. T. Normann und J. Mørland, „A study of ethyl glucuronide in post-mortem blood as a marker of ante-mortem ingestion of alcohol.“ *Forensic Sci Int*, Vol. 165, Nr. 1, S. 41–45, 2007.
- [110] G. Høiseth, R. Karinen, L. Johnsen, P. T. Normann, A. S. Christophersen und J. Mørland, „Disappearance of ethyl glucuronide during heavy putrefaction.“ *Forensic Sci Int*, Vol. 176, Nr. 2-3, S. 147–151, 2008.
- [111] G. Høiseth, L. Kristoffersen, B. Larssen, M. Arnestad, N. O. Hermansen und J. Mørland, „In vitro formation of ethanol in autopsy samples containing fluoride ions.“ *Int J Legal Med*, Vol. 122, Nr. 1, S. 63–66, 2008.
- [112] G. Høiseth, R. Karinen, A. Christophersen und J. Mørland, „Practical use of ethyl glucuronide and ethyl sulfate in postmortem cases as markers of antemortem alcohol ingestion.“ *Int J Legal Med*, Vol. 124, Nr. 2, S. 143–148, 2010.
- [113] A. I. Al-Asmari, R. A. Anderson und P. Appelblad, „Direct determination of ethyl glucuronide and ethyl sulfate in postmortem urine specimens using hydrophilic interaction liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry.“ *J Anal Toxicol*, Vol. 34, Nr. 5, S. 261–272, 2010.
- [114] P. Bendroth, R. Kronstrand, A. Helander, J. Greby, N. Stephanson und P. Krantz, „Comparison of ethyl glucuronide in hair with phosphatidylethanol in whole blood

- as post-mortem markers of alcohol abuse.“ *Forensic Sci Int*, Vol. 176, Nr. 1, S. 76–81, 2008.
- [115] H. Schloegl, T. Rost, W. Schmidt, F. M. Wurst und W. Weinmann, „Distribution of ethyl glucuronide in rib bone marrow, other tissues and body liquids as proof of alcohol consumption before death.“ *Forensic Sci Int*, Vol. 156, Nr. 2-3, S. 213–218, 2006.
- [116] H. Schloegl, S. Dresen, K. Spaczynski, M. Stoertzel, F. M. Wurst und W. Weinmann, „Stability of ethyl glucuronide in urine, post-mortem tissue and blood samples.“ *Int J Legal Med*, Vol. 120, Nr. 2, S. 83–88, 2006.
- [117] L. Politi, L. Morini, F. Mari, A. Groppi und E. Bertol, „Ethyl glucuronide and ethyl sulfate in autopsy samples 27 years after death.“ *Int J Legal Med*, Vol. 122, Nr. 6, S. 507–509, 2008.
- [118] A. Alt, F. M. Wurst und S. Seidl, „Evaluation of the ethyl glucuronide in urine samples with the internal standard d5-ethyl glucuronide.“ *Blutalkohol*, Vol. 34, S. 360–365, 1997.
- [119] I. Janda und A. Alt, „Improvement of ethyl glucuronide determination in human urine and serum samples by solid-phase extraction.“ *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, Vol. 758, Nr. 2, S. 229–234, 2001.
- [120] I. A. Freire, A. M. B. Barrera, P. C. Silva, M. J. T. Duque, P. F. Gómez und P. L. Eijo, „Microwave assisted extraction for the determination of ethyl glucuronide in urine by gas chromatography-mass spectrometry.“ *J Appl Toxicol*, Vol. 28, Nr. 6, S. 773–778, 2008.
- [121] M. Nishikawa, H. Tsuchihashi, A. Miki, M. Katagi, G. Schmitt, H. Zimmer, T. Keller und R. Aderjan, „Determination of ethyl glucuronide, a minor metabolite of ethanol, in human serum by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry.“ *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, Vol. 726, Nr. 1-2, S. 105–110, 1999.
- [122] N. Stephanson, H. Dahl, A. Helander und O. Beck, „Direct quantification of ethyl glucuronide in clinical urine samples by liquid chromatography-mass spectrometry.“ *Ther Drug Monit*, Vol. 24, Nr. 5, S. 645–651, 2002.
- [123] A. Helander und O. Beck, „Ethyl sulfate: a metabolite of ethanol in humans and a potential biomarker of acute alcohol intake.“ *J Anal Toxicol*, Vol. 29, Nr. 5, S. 270–274, 2005.
- [124] Y. Zheng und A. Helander, „Solid-phase extraction procedure for ethyl glucuronide in urine.“ *J Anal Toxicol*, Vol. 32, Nr. 9, S. 778–781, 2008.
- [125] D. Favretto, A. Nalesso, G. Frison, G. Viel, P. Traldi und S. D. Ferrara, „A novel and an effective analytical approach for the LC-MS determination of ethyl glucuronide and ethyl sulfate in urine.“ *Int J Legal Med*, Vol. 124, Nr. 2, S. 161–164, 2010.

- [126] S. Dresen, W. Weinmann und F. M. Wurst, „Forensic confirmatory analysis of ethyl sulfate—a new marker for alcohol consumption—by liquid-chromatography/electrospray ionization/tandem mass spectrometry.“ *J Am Soc Mass Spectrom*, Vol. 15, Nr. 11, S. 1644–1648, 2004.
- [127] W. Weinmann, P. Schaefer, A. Thierauf, A. Schreiber und F. M. Wurst, „Confirmatory analysis of ethylglucuronide in urine by liquid-chromatography/electrospray ionization/tandem mass spectrometry according to forensic guidelines.“ *J Am Soc Mass Spectrom*, Vol. 15, Nr. 2, S. 188–193, 2004.
- [128] G. E. Skipper, W. Weinmann, A. Thierauf, P. Schaefer, G. Wiesbeck, J. P. Allen, M. Miller und F. M. Wurst, „Ethyl glucuronide: a biomarker to identify alcohol use by health professionals recovering from substance use disorders.“ *Alcohol Alcohol*, Vol. 39, Nr. 5, S. 445–449, 2004.
- [129] L. Politi, L. Morini, A. Groppi, V. Poloni, F. Pozzi und A. Polettini, „Direct determination of the ethanol metabolites ethyl glucuronide and ethyl sulfate in urine by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry.“ *Rapid Commun Mass Spectrom*, Vol. 19, Nr. 10, S. 1321–1331, 2005.
- [130] W. Bicker, M. Laemmerhofer, T. Keller, R. Schuhmacher, R. Krska und W. Lindner, „Validated method for the determination of the ethanol consumption markers ethyl glucuronide, ethyl phosphate, and ethyl sulfate in human urine by reversed-phase/weak anion exchange liquid chromatography-tandem mass spectrometry.“ *Anal Chem*, Vol. 78, Nr. 16, S. 5884–5892, 2006.
- [131] L. Morini, L. Politi, A. Zucchella und A. Polettini, „Ethyl glucuronide and ethyl sulphate determination in serum by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry.“ *Clin Chim Acta*, Vol. 376, Nr. 1-2, S. 213–219, 2007.
- [132] R. Kaushik, W. L. Course und B. Levine, „Determination of ethyl glucuronide in urine using reversed-phase HPLC and pulsed electrochemical detection.“ *Anal Chim Acta*, Vol. 25, S. 267–274, 2006.
- [133] R. Shah und W. R. Lacourse, „An improved method to detect ethyl glucuronide in urine using reversed-phase liquid chromatography and pulsed electrochemical detection.“ *Anal Chim Acta*, Vol. 576, Nr. 2, S. 239–245, 2006.
- [134] L. Krivánková, J. Caslavská, H. Malásková, P. Gebauer und W. Thormann, „Analysis of ethyl glucuronide in human serum by capillary electrophoresis with sample self-stacking and indirect detection.“ *J Chromatogr A*, Vol. 1081, Nr. 1, S. 2–8, 2005.
- [135] F. A. Esteve-Turrillas, W. Bicker, M. Lämmerhofer, T. Keller und W. Lindner, „Determination of ethyl sulfate—a marker for recent ethanol consumption—in human urine by CE with indirect UV detection.“ *Electrophoresis*, Vol. 27, Nr. 23, S. 4763–4771, 2006.

- [136] B. Jung, J. Caslavská und W. Thormann, „Determination of ethyl sulfate in human serum and urine by capillary zone electrophoresis.“ *J Chromatogr A*, Vol. 1206, Nr. 1, S. 26–32, 2008.
- [137] M. Nováková und L. Krivánková, „Determination of ethyl glucuronide in human serum by hyphenation of capillary isotachopheresis and zone electrophoresis.“ *Electrophoresis*, Vol. 29, Nr. 8, S. 1694–1700, 2008.
- [138] G. Schmitt, R. Aderjan und H. Kirchner M, Zimmer, „Enzymimmunoassay und GC-MS zur Bestimmung von Ethylglucuronid in Serum und Urin.“ *Blutalkohol*, Vol. 25, S. 428–433, 1998.
- [139] H. Zimmer, G. Schmitt und R. Aderjan, „Preliminary immunochemical test for the determination of ethyl glucuronide in serum and urine: comparison of screening method results with gas chromatography-mass spectrometry.“ *J Anal Toxicol*, Vol. 26, Nr. 1, S. 11–16, 2002.
- [140] C. Bih, S. Mitra, V. Bodepudi, M. Datuin, R. Ruzika und L. Anne, „Development of an homogenous enzyme immunoassay for the detection of ethyl glucuronide in urine and its evaluation on the MGC 240 analyzer.“ *J. Anal. Tox.*, Vol. 30, S. 146, 2006.
- [141] M. Boettcher, O. Beck und A. Helander, „Evaluation of a new immunoassay for urinary ethyl glucuronide testing.“ *Alcohol Alcohol*, Vol. 43, Nr. 1, S. 46–48, 2008.
- [142] D. Favretto, A. Nalesso, G. Frison, G. Viel, P. Traldi und S. D. Ferrara, „No-discharge atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry of ethyl glucuronide and ethyl sulfate.“ *J Mass Spectrom*, Vol. 45, Nr. 1, S. 121–124, 2010.
- [143] M. Concheiro, A. Cruz, M. Mon, A. de Castro, O. Quintela, A. Lorenzo und M. López-Rivadulla, „Ethylglucuronide determination in urine and hair from alcohol withdrawal patients.“ *J Anal Toxicol*, Vol. 33, Nr. 3, S. 155–161, 2009.
- [144] A. Helander, M. Böttcher, C. Fehr, N. Dahmen und O. Beck, „Detection times for urinary ethyl glucuronide and ethyl sulfate in heavy drinkers during alcohol detoxification.“ *Alcohol Alcohol*, Vol. 44, Nr. 1, S. 55–61, 2009.
- [145] R. Scott, E. White, Q. Lam und N. Crinis, „Urinary ethyl glucuronide (EtG) as a marker of ethanol ingestion.“ 2011. URL <http://www.aacb.asn.au/files/File/Posters%20ASC%202010/Urinary%20Ethyl%20Glucuronide%20as%20a%20Marker%20of%20Ethanol%20Ingestion.pdf>. Aufgerufen am 19.04.2012.
- [146] S. C. Turfus, T. Vo, N. Niehaus, D. Gerostamoulos und J. Beyer, „An evaluation of the DRI-ETG EIA method for the determination of ethyl glucuronide concentrations in clinical and post-mortem urine.“ *Drug Test Anal*, 2012. DOI: 10.1002/dta.414.
- [147] M. G. McDonell, D. Srebnik, F. Angelo, A. M. Sugar, D. Howell, C. Rainey, J. Roll, R. Short und R. Ries, „Evaluation of ethyl glucuronide immunoassay urinalysis in five alcohol-dependent outpatients.“ *Am J Addict*, Vol. 20, Nr. 5, S. 482–484, 2011.

- [148] T. Arndt, B. Gierten, B. Güssregen, A. Werle und J. Grüner, „False-positive ethyl glucuronide immunoassay screening associated with chloral hydrate medication as confirmed by LC-MS/MS and self-medication.“ *Forensic Sci Int*, Vol. 184, Nr. 1-3, S. e27–e29, 2009.
- [149] H. Dahl, N. Stephanson, O. Beck und A. Helander, „Comparison of urinary excretion characteristics of ethanol and ethyl glucuronide.“ *J Anal Toxicol*, Vol. 26, Nr. 4, S. 201–204, 2002.
- [150] A. Helander und O. Beck, „Mass spectrometric identification of ethyl sulfate as an ethanol metabolite in humans.“ *Clin Chem*, Vol. 50, Nr. 5, S. 936–937, 2004.
- [151] G. Høiseth, J. P. Bernard, R. Karinen, L. Johnsen, A. Helander, A. S. Christophersen und J. Mørland, „A pharmacokinetic study of ethyl glucuronide in blood and urine: applications to forensic toxicology.“ *Forensic Sci Int*, Vol. 172, Nr. 2-3, S. 119–124, 2007.
- [152] M. H. Wojcik und J. S. Hawthorne, „Sensitivity of commercial ethyl glucuronide (ETG) testing in screening for alcohol abstinence.“ *Alcohol Alcohol*, Vol. 42, Nr. 4, S. 317–320, 2007.
- [153] C. C. Halter, S. Dresen, V. Auwaerter, F. M. Wurst und W. Weinmann, „Kinetics in serum and urinary excretion of ethyl sulfate and ethyl glucuronide after medium dose ethanol intake.“ *Int J Legal Med*, Vol. 122, Nr. 2, S. 123–128, 2008.
- [154] G. Høiseth, J. P. Bernard, N. Stephanson, P. T. Normann, A. S. Christophersen, J. Mørland und A. Helander, „Comparison between the urinary alcohol markers EtG, EtS, and GTOL/5-HIAA in a controlled drinking experiment.“ *Alcohol Alcohol*, Vol. 43, Nr. 2, S. 187–191, 2008.
- [155] G. Høiseth, B. Yttredal, R. Karinen, H. Gjerde, J. Mørland und A. Christophersen, „Ethyl glucuronide concentrations in oral fluid, blood, and urine after volunteers drank 0.5 and 1.0 g/kg doses of ethanol.“ *J Anal Toxicol*, Vol. 34, Nr. 6, S. 319–324, 2010.
- [156] F. M. Wurst, S. Seidl, D. Ladewig, F. Müller-Spahn und A. Alt, „Ethyl glucuronide: on the time course of excretion in urine during detoxification.“ *Addict Biol*, Vol. 7, Nr. 4, S. 427–434, 2002.
- [157] G. Høiseth, L. Morini, A. Polettoni, A. Christophersen und J. Mørland, „Blood kinetics of ethyl glucuronide and ethyl sulphate in heavy drinkers during alcohol detoxification.“ *Forensic Sci Int*, Vol. 188, Nr. 1-3, S. 52–56, 2009.
- [158] P. Droenner, G. Schmitt, R. Aderjan und H. Zimmer, „A kinetic model describing the pharmacokinetics of ethyl glucuronide in humans.“ *Forensic Sci Int*, Vol. 126, Nr. 1, S. 24–29, 2002.
- [159] G. Schmitt, C. C. Halter, R. Aderjan, V. Auwaerter und W. Weinmann, „Computer assisted modeling of ethyl sulfate pharmacokinetics.“ *Forensic Sci Int*, Vol. 194, Nr. 1-3, S. 34–38, 2010.

- [160] G. Schmitt, P. Droenner, G. Skopp und R. Aderjan, „Ethyl glucuronide concentration in serum of human volunteers, teetotalers, and suspected drinking drivers.“ *J Forensic Sci*, Vol. 42, Nr. 6, S. 1099–1102, 1997.
- [161] T. H. Wright und K. E. Ferslew, „Biotransformation of ethanol to ethyl glucuronide in a rat model after a single high oral dosage.“ *Alcohol*, Vol. 46, Nr. 2, S. 159–164, 2012.
- [162] T. Sarkola, H. Dahl, C. J. P. Eriksson und A. Helander, „Urinary ethyl glucuronide and 5-hydroxytryptophol levels during repeated ethanol ingestion in healthy human subjects.“ *Alcohol Alcohol*, Vol. 38, Nr. 4, S. 347–351, 2003.
- [163] M. Goll, G. Schmitt, B. Ganssmann und R. E. Aderjan, „Excretion profiles of ethyl glucuronide in human urine after internal dilution.“ *J Anal Toxicol*, Vol. 26, Nr. 5, S. 262–266, 2002.
- [164] T. Arndt, „Urine-creatinine concentration as a marker of urine dilution: reflections using a cohort of 45,000 samples.“ *Forensic Sci Int*, Vol. 186, Nr. 1-3, S. 48–51, 2009.
- [165] J. Bergström, A. Helander und A. W. Jones, „Ethyl glucuronide concentrations in two successive urinary voids from drinking drivers: relationship to creatinine content and blood and urine ethanol concentrations.“ *Forensic Sci Int*, Vol. 133, Nr. 1-2, S. 86–94, 2003.
- [166] A. Helander und H. Dahl, „Urinary tract infection: a risk factor for false-negative urinary ethyl glucuronide but not ethyl sulfate in the detection of recent alcohol consumption.“ *Clin Chem*, Vol. 51, Nr. 9, S. 1728–1730, 2005.
- [167] A. Helander, I. Olsson und H. Dahl, „Postcollection synthesis of ethyl glucuronide by bacteria in urine may cause false identification of alcohol consumption.“ *Clin Chem*, Vol. 53, Nr. 10, S. 1855–1857, 2007.
- [168] S. Baranowski, A. Serr, A. Thierauf, W. Weinmann, M. G. Perdekamp, F. M. Wurst und C. C. Halter, „In vitro study of bacterial degradation of ethyl glucuronide and ethyl sulphate.“ *Int J Legal Med*, Vol. 122, Nr. 5, S. 389–393, 2008.
- [169] A. Thierauf, A. Serr, C. C. Halter, A. Al-Ahmad, S. Rana und W. Weinmann, „Influence of preservatives on the stability of ethyl glucuronide and ethyl sulphate in urine.“ *Forensic Sci Int*, Vol. 182, Nr. 1-3, S. 41–45, 2008.
- [170] A. H. Redondo, C. Körber, S. König, A. Längin, A. Al-Ahmad und W. Weinmann, „Inhibition of bacterial degradation of EtG by collection as dried urine spots (DUS).“ *Anal Bioanal Chem*, Vol. 402, Nr. 7, S. 2417–2424, 2012.
- [171] C. C. Halter, A. Laengin, A. Al-Ahmad, F. M. Wurst, W. Weinmann und K. Kuemmerer, „Assessment of the stability of the ethanol metabolite ethyl sulfate in standardised degradation tests.“ *Forensic Sci Int*, Vol. 186, Nr. 1-3, S. 52–55, 2009.

- [172] A. Thierauf, H. Gnann, A. Wohlfarth, V. Auwärter, M. G. Perdekamp, K.-J. Buttler, F. M. Wurst und W. Weinmann, „Urine tested positive for ethyl glucuronide and ethyl sulphate after the consumption of non-alcoholic"beer.“ *Forensic Sci Int*, Vol. 202, Nr. 1-3, S. 82–85, 2010.
- [173] A. Thierauf, A. Wohlfarth, V. Auwärter, M. G. Perdekamp, F. M. Wurst und W. Weinmann, „Urine tested positive for ethyl glucuronide and ethyl sulfate after the consumption of yeast and sugar.“ *Forensic Sci Int*, Vol. 202, Nr. 1-3, S. e45–e47, 2010.
- [174] C. C. Halter, A. Thierauf, S. Bunz, F. M. Wurst und W. Weinmann, „Suggesting a cut-off for ethyl glucuronide in urine for forensic proof of ethanol consumption in: Proceedings of the international association of forensic toxicology, 46th annual meeting, martinique, french west indies.“ *Ann Toxicol Anal*, Vol. 20, S. S1–21, 2008.
- [175] F. Pragst, K. Spiegel, F. Sporkert und M. Bohnenkamp, „Are there possibilities for the detection of chronically elevated alcohol consumption by hair analysis? A report about the state of investigation.“ *Forensic Sci Int*, Vol. 107, Nr. 1-3, S. 201–223, 2000.
- [176] H. Sachs, „Drogennachweis in Haaren.“ in *Proceedings of the Symposium "Das Haar als Spur. Spur der Haare"* (H. Kijewski (Hrsg.)), S. 119–133, Schmidt-Roemhild, Luebeck, 1993.
- [177] A. Alt, I. Janda, S. Seidl und F. M. Wurst, „Determination of ethyl glucuronide in hair samples.“ *Alcohol Alcohol*, Vol. 35, Nr. 3, S. 313–314, 2000.
- [178] G. Skopp, G. Schmitt, L. Pötsch, P. Drönner, R. Aderjan und R. Mattern, „Ethyl glucuronide in human hair.“ *Alcohol Alcohol*, Vol. 35, Nr. 3, S. 283–285, 2000.
- [179] C. Jurado, T. Soriano, M. P. Giménez und M. Menéndez, „Diagnosis of chronic alcohol consumption. Hair analysis for ethyl-glucuronide.“ *Forensic Sci Int*, Vol. 145, Nr. 2-3, S. 161–166, 2004.
- [180] L. Morini, L. Politi, A. Groppi, C. Stramesi und A. Poletti, „Determination of ethyl glucuronide in hair samples by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry.“ *J Mass Spectrom*, Vol. 41, Nr. 1, S. 34–42, 2006.
- [181] I. Janda, W. Weinmann, T. Kuehnle, M. Lahode und A. Alt, „Determination of ethyl glucuronide in human hair by SPE and LC-MS/MS.“ *Forensic Sci Int*, Vol. 128, Nr. 1-2, S. 59–65, 2002.
- [182] R. Paul, R. Kingston, L. Tsanaclis, A. Berry und A. Guwy, „Do drug users use less alcohol than non-drug users? A comparison of ethyl glucuronide concentrations in hair between the two groups in medico-legal cases.“ *Forensic Sci Int*, Vol. 176, Nr. 1, S. 82–86, 2008.
- [183] P. Kintz, M. Villain, E. Vallet, M. Etter, G. Salquebre und V. Cirimele, „Ethyl glucuronide: unusual distribution between head hair and pubic hair.“ *Forensic Sci Int*, Vol. 176, Nr. 1, S. 87–90, 2008.

- [184] H. Kharbouche, F. Sporkert, S. Troxler, M. Augsburger, P. Mangin und C. Staub, „Development and validation of a gas chromatography-negative chemical ionization tandem mass spectrometry method for the determination of ethyl glucuronide in hair and its application to forensic toxicology.“ *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, Vol. 877, Nr. 23, S. 2337–2343, 2009.
- [185] F. Lamoureux, J. Michel Gaulier, F.-L. Sauvage, M. Merceroles, C. Vallejo und G. Lachâtre, „Determination of ethyl-glucuronide in hair for heavy drinking detection using liquid chromatography-tandem mass spectrometry following solid-phase extraction.“ *Anal Bioanal Chem*, Vol. 394, Nr. 7, S. 1895–1901, 2009.
- [186] I. Alvarez, A. M. Bermejo, M. J. Tabernero, P. Fernández, P. Cabarcos und P. López, „Microwave-assisted extraction: a simpler and faster method for the determination of ethyl glucuronide in hair by gas chromatography-mass spectrometry.“ *Anal Bioanal Chem*, Vol. 393, Nr. 4, S. 1345–1350, 2009.
- [187] F. Pragst, M. Rothe, B. Moench, M. Hastedt, S. Herre und D. Simmert, „Combined use of fatty acid ethyl esters and ethyl glucuronide in hair for diagnosis of alcohol abuse: interpretation and advantages.“ *Forensic Sci Int*, Vol. 196, Nr. 1-3, S. 101–110, 2010.
- [188] R. Paul, L. Tsanaclis, R. Kingston, A. Berry und A. Guwy, „Simultaneous determination of GHB and EtG in hair using GCMS/MS.“ *Drug Test Anal*, Vol. 3, Nr. 4, S. 201–205, 2011.
- [189] V. Pirro, D. D. Corcia, S. Pellegrino, M. Vincenti, B. Sciutteri und A. Salomone, „A study of distribution of ethyl glucuronide in different keratin matrices.“ *Forensic Sci Int*, Vol. 210, Nr. 1-3, S. 271–277, 2011.
- [190] P. Cabarcos, H. M. Hassan, M. J. Tabernero und K. S. Scott, „Analysis of ethyl glucuronide in hair samples by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS).“ *J Appl Toxicol*, 2012. DOI: 10.1002/jat.1791.
- [191] L. Politi, L. Morini, F. Leone und A. Poletti, „Ethyl glucuronide in hair: Is it a reliable marker of chronic high levels of alcohol consumption?“ *Addiction*, Vol. 101, Nr. 10, S. 1408–1412, 2006.
- [192] L. Morini, L. Politi und A. Poletti, „Ethyl glucuronide in hair. a sensitive and specific marker of chronic heavy drinking.“ *Addiction*, Vol. 104, Nr. 6, S. 915–920, 2009.
- [193] L. Morini, L. Politi, S. Acito, A. Groppi und A. Poletti, „Comparison of ethyl glucuronide in hair with carbohydrate-deficient transferrin in serum as markers of chronic high levels of alcohol consumption.“ *Forensic Sci Int*, Vol. 188, Nr. 1-3, S. 140–143, 2009.
- [194] I. Kerekes, M. Yegles, U. Grimm und R. Wennig, „Ethyl glucuronide determination: head hair versus non-head hair.“ *Alcohol Alcohol*, Vol. 44, Nr. 1, S. 62–66, 2009.

- [195] B. M. R. Appenzeller, R. Agirman, P. Neuberg, M. Yegles und R. Wennig, „Segmental determination of ethyl glucuronide in hair: a pilot study.“ *Forensic Sci Int*, Vol. 173, Nr. 2-3, S. 87–92, 2007.
- [196] V. Pirro, V. Valente, P. Oliveri, A. D. Bernardis, A. Salomone und M. Vincenti, „Chemometric evaluation of nine alcohol biomarkers in a large population of clinically-classified subjects: pre-eminence of ethyl glucuronide concentration in hair for confirmatory classification.“ *Anal Bioanal Chem*, Vol. 401, Nr. 7, S. 2153–2164, 2011.
- [197] H. Kharbouche, M. Faouzi, N. Sanchez, J. B. Daepfen, M. Augsburger, P. Mangin, C. Staub und F. Sporkert, „Diagnostic performance of ethyl glucuronide in hair for the investigation of alcohol drinking behavior: a comparison with traditional biomarkers.“ *Int J Legal Med*, Vol. 126, Nr. 2, S. 243–250, 2012.
- [198] H. Kharbouche, N. Steiner, M. Morelato, C. Staub, B. Boutrel, P. Mangin, F. Sporkert und M. Augsburger, „Influence of ethanol dose and pigmentation on the incorporation of ethyl glucuronide into rat hair.“ *Alcohol*, Vol. 44, Nr. 6, S. 507–514, 2010.
- [199] M. Rothe, F. Pragst, S. Thor und J. Hunger, „Effect of pigmentation on the drug deposition in hair of grey-haired subjects.“ *Forensic Sci Int*, Vol. 84, Nr. 1-3, S. 53–60, 1997.
- [200] B. M. R. Appenzeller, M. Schuman, M. Yegles und R. Wennig, „Ethyl glucuronide concentration in hair is not influenced by pigmentation.“ *Alcohol Alcohol*, Vol. 42, Nr. 4, S. 326–327, 2007.
- [201] L. Tsanaclis, R. Kingston und J. Wicks, „Testing for alcohol use in hair: is ethyl glucuronide (EtG) stable in hair?“ *Ann Toxicol Anal*, Vol. 21, Nr. 2, S. 67–71, 2009.
- [202] R. Agius, L. M. Ferreira und M. Yegles, „Can ethyl glucuronide in hair be determined only in 3cm hair strands?“ *Forensic Sci Int*, Vol. 218, Nr. 1-3, S. 3–9, 2012.
- [203] F. Tagliaro, F. Bortolotti, G. Viel und S. D. Ferrara, „Caveats against an improper use of hair testing to support the diagnosis of chronic excessive alcohol consumption, following the Consensus of the Society of Hair Testing 2009 [Forensic Science International 196 (2010) 2].“ *Forensic Sci Int*, Vol. 207, Nr. 1-3, S. e69–70; author reply e71, 2011.
- [204] P. Kintz, „Reply to letter to the editor: Caveats against an improper use of hair testing to support the diagnosis of chronic excessive alcohol consumption, following the Consensus of the Society of Hair Testing 2009 [Forensic Science International 196 (2010) 2].“ *Forensic Sci Int*, Vol. 207, Nr. 1-3, S. e71, 2011.
- [205] R. Lees, R. Kingston, T. M. Williams, G. Henderson, A. Lingford-Hughes und M. Hickman, „Comparison of ethyl glucuronide in hair with self-reported alcohol consumption.“ *Alcohol Alcohol*, 2012. DOI: 10.1093/alcalc/ags010.

- [206] F. Pragst und M. Yegles, „Determination of fatty acid ethyl esters (FAEE) and ethyl glucuronide (EtG) in hair: a promising way for retrospective detection of alcohol abuse during pregnancy?“ *Ther Drug Monit*, Vol. 30, Nr. 2, S. 255–263, 2008.
- [207] R. Agius, T. Nadulski, H.-G. Kahl und B. Dufaux, „Ethyl glucuronide in hair - a highly effective test for the monitoring of alcohol consumption.“ *Forensic Sci Int*, Vol. 218, Nr. 1–3, S. 10–14, 2012.
- [208] D. S. Goodman und D. Deykin, „Fatty acid ethyl ester formation during ethanol metabolism in vivo.“ *Proc Soc Exp Biol Med*, Vol. 113, S. 65–67, 1963.
- [209] L. G. Lange, S. R. Bergmann und B. E. Sobel, „Identification of fatty acid ethyl esters as products of rabbit myocardial ethanol metabolism.“ *J Biol Chem*, Vol. 256, Nr. 24, S. 12968–12973, 1981.
- [210] P. M. Kinnunen und L. G. Lange, „Identification and quantitation of fatty acid ethyl esters in biological specimens.“ *Anal Biochem*, Vol. 140, Nr. 2, S. 567–576, 1984.
- [211] E. A. Laposata und L. G. Lange, „Presence of nonoxidative ethanol metabolism in human organs commonly damaged by ethanol abuse.“ *Science*, Vol. 231, Nr. 4737, S. 497–499, 1986.
- [212] M. A. Diczfalusy, I. Björkhem, C. Einarsson, C. G. Hillebrant und S. E. Alexson, „Characterization of enzymes involved in formation of ethyl esters of long-chain fatty acids in humans.“ *J Lipid Res*, Vol. 42, Nr. 7, S. 1025–1032, 2001.
- [213] B. S. Kaphalia und G. A. Ansari, „Fatty acid ethyl esters and ethanol-induced pancreatitis.“ *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, Vol. 47, S. OL173–OL179, 2001.
- [214] M. Laposata, „Fatty acid ethyl esters: ethanol metabolites which mediate ethanol-induced organ damage and serve as markers of ethanol intake.“ *Prog Lipid Res*, Vol. 37, Nr. 5, S. 307–316, 1998.
- [215] E. A. Laposata, D. E. Scherrer und L. G. Lange, „Fatty acid ethyl esters in adipose tissue. A laboratory marker for alcohol-related death.“ *Arch Pathol Lab Med*, Vol. 113, Nr. 7, S. 762–766, 1989.
- [216] G. DePergola, C. Kjellström, C. Holm, N. Conradi, P. Pettersson und P. Björntorp, „The metabolism of ethyl esters of fatty acids in adipose tissue of rats chronically exposed to ethanol.“ *Alcohol Clin Exp Res*, Vol. 15, Nr. 2, S. 184–189, 1991.
- [217] K. M. Doyle, D. A. Bird, S. al Salihi, Y. Hallaq, J. E. Cluette-Brown, K. A. Goss und M. Laposata, „Fatty acid ethyl esters are present in human serum after ethanol ingestion.“ *J Lipid Res*, Vol. 35, Nr. 3, S. 428–437, 1994.
- [218] N. P. Gorski, H. Nouraldin, D. M. Dube, F. I. Preffer, D. M. Dombkowski, E. M. Villa, K. B. Lewandowski, R. D. Weiss, C. Hufford und M. Laposata, „Reduced fatty acid ethyl ester synthase activity in the white blood cells of alcoholics.“ *Alcohol Clin Exp Res*, Vol. 20, Nr. 2, S. 268–274, 1996.

- [219] L. Dan und M. Laposata, „Ethyl palmitate and ethyl oleate are the predominant fatty acid ethyl esters in the blood after ethanol ingestion and their synthesis is differentially influenced by the extracellular concentrations of their corresponding fatty acids.“ *Alcohol Clin Exp Res*, Vol. 21, Nr. 2, S. 286–292, 1997.
- [220] K. M. Doyle, J. E. Cluette-Brown, D. M. Dube, T. G. Bernhardt, C. R. Morse und M. Laposata, „Fatty acid ethyl esters in the blood as markers for ethanol intake.“ *JAMA*, Vol. 276, Nr. 14, S. 1152–1156, 1996.
- [221] K. Borucki, J. Dierkes, J. Wartberg, S. Westphal, A. Genz und C. Luley, „In heavy drinkers, fatty acid ethyl esters remain elevated for up to 99 hours.“ *Alcohol Clin Exp Res*, Vol. 31, Nr. 3, S. 423–427, 2007.
- [222] T. G. Bernhardt, P. A. Cannistraro, D. A. Bird, K. M. Doyle und M. Laposata, „Purification of fatty acid ethyl esters by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography.“ *J Chromatogr B Biomed Appl*, Vol. 675, Nr. 2, S. 189–196, 1996.
- [223] C. C. Kulig, T. P. Beresford und G. T. Everson, „Rapid, accurate, and sensitive fatty acid ethyl ester determination by gas chromatography-mass spectrometry.“ *J Lab Clin Med*, Vol. 147, Nr. 3, S. 133–138, 2006.
- [224] E. Mac, M. Pacis, G. Garcia und E. Ostrea Jr., „A marker of fetal exposure to alcohol by meconium analysis.“ *Pediatric Research*, Vol. 36, S. 33A, 1994.
- [225] J. Klein, T. Karaskov und G. Korent, „Fatty acid ethyl esters: a novel biologic marker for heavy in utero ethanol exposure: a case report.“ *Ther Drug Monit*, Vol. 21, Nr. 6, S. 644–646, 1999.
- [226] D. Chan, B. Knie, R. Boskovic und G. Koren, „Placental handling of fatty acid ethyl esters: perfusion and subcellular studies.“ *J Pharmacol Exp Ther*, Vol. 310, Nr. 1, S. 75–82, 2004.
- [227] C. F. Bearer, L. M. Santiago, M. A. O’Riordan, K. Buck, S. C. Lee und L. T. Singer, „Fatty acid ethyl esters: quantitative biomarkers for maternal alcohol consumption.“ *J Pediatr*, Vol. 146, Nr. 6, S. 824–830, 2005.
- [228] D. L. Caprara, J. Klein und G. Koren, „Diagnosis of fetal alcohol spectrum disorder (FASD): fatty acid ethyl esters and neonatal hair analysis.“ *Ann Ist Super Sanita*, Vol. 42, Nr. 1, S. 39–45, 2006.
- [229] D. L. Caprara, K. Nash, R. Greenbaum, J. Rovet und G. Koren, „Novel approaches to the diagnosis of fetal alcohol spectrum disorder.“ *Neurosci Biobehav Rev*, Vol. 31, Nr. 2, S. 254–260, 2007.
- [230] L. Burd und R. Hofer, „Biomarkers for detection of prenatal alcohol exposure: a critical review of fatty acid ethyl esters in meconium.“ *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, Vol. 82, Nr. 7, S. 487–493, 2008.

- [231] D. L. Caprara, J. F. Brien, U. Iqbal, J. N. Reynolds, J. Klein und G. Koren, „A guinea pig model for the identification of in utero alcohol exposure using fatty acid ethyl esters in neonatal hair.“ *Pediatr Res*, Vol. 58, Nr. 6, S. 1158–1163, 2005.
- [232] V. Auwärter, *Fettsäureethylester als Marker exzessiven Alkoholkonsums - Analytische Bestimmung im Haar und in Hautoberflächenlipiden mittels Headspace-Festphasenmikroextraktion und Gaschromatographie-Massenspektrometrie*. Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin, 2006.
- [233] N. De Giovanni, G. Donadio und M. Chiarotti, „The reliability of fatty acid ethyl esters (FAEE) as biological markers for the diagnosis of alcohol abuse.“ *J Anal Toxicol*, Vol. 31, Nr. 2, S. 93–97, 2007.
- [234] C. M. Zimmermann und G. P. Jackson, „Gas chromatography tandem mass spectrometry for biomarkers of alcohol abuse in human hair.“ *Ther Drug Monit*, Vol. 32, Nr. 2, S. 216–223, 2010.
- [235] L. Politi, F. Mari, S. Furlanetto, E. D. Bravo und E. Bertol, „Determination of fatty acid ethyl esters in hair by GC-MS and application in a population of cocaine users.“ *J Pharm Biomed Anal*, Vol. 54, Nr. 5, S. 1192–1195, 2011.
- [236] V. Auwärter, F. Sporkert, S. Hartwig, F. Pragst, H. Vater und A. Diefenbacher, „Fatty acid ethyl esters in hair as markers of alcohol consumption. Segmental hair analysis of alcoholics, social drinkers, and teetotalers.“ *Clin Chem*, Vol. 47, Nr. 12, S. 2114–2123, 2001.
- [237] F. Pragst, V. Auwärter, B. Kiessling und C. Dyes, „Wipe-test and patch-test for alcohol misuse based on the concentration ratio of fatty acid ethyl esters and squalene cFAEE/cSQ in skin surface lipids.“ *Forensic Sci Int*, Vol. 143, Nr. 2-3, S. 77–86, 2004.
- [238] S. Suesse, C. M. Selavka, T. Mieczkowski und F. Pragst, „Fatty acid ethyl ester concentrations in hair and self-reported alcohol consumption in 644 cases from different origin.“ *Forensic Sci Int*, Vol. 196, Nr. 1-3, S. 111–117, 2010.
- [239] V. Auwärter, B. Kiessling und F. Pragst, „Squalene in hair—a natural reference substance for the improved interpretation of fatty acid ethyl ester concentrations with respect to alcohol misuse.“ *Forensic Sci Int*, Vol. 145, Nr. 2-3, S. 149–159, 2004.
- [240] V. Kulaga, J. Gareri, N. Fulga und G. Koren, „Agreement between the fatty acid ethyl ester hair test for alcohol and social workers’ reports.“ *Ther Drug Monit*, Vol. 32, Nr. 3, S. 294–299, 2010.
- [241] V. Kulaga, Y. Velazquez-Armenta, K. Aleksa, Z. Vergee und G. Koren, „The effect of hair pigment on the incorporation of fatty acid ethyl esters (FAEE).“ *Alcohol Alcohol*, Vol. 44, Nr. 3, S. 287–292, 2009.
- [242] M. C. Pérez-Camino, W. Moreda, R. Mateos und A. Cert, „Determination of esters of fatty acids with low molecular weight alcohols in olive oils.“ *J Agric Food Chem*, Vol. 50, Nr. 16, S. 4721–4725, 2002.

- [243] K. A. Goss, R. Alharethi und M. Laposata, „Fatty acid ethyl ester synthesis in the preparation of scotch whiskey.“ *Alcohol*, Vol. 17, Nr. 3, S. 241–245, 1999.
- [244] J. Pino, M. P. Martí, M. Mestres, J. Pérez, O. Busto und J. Guasch, „Headspace solid-phase microextraction of higher fatty acid ethyl esters in white rum aroma.“ *J Chromatogr A*, Vol. 954, Nr. 1-2, S. 51–57, 2002.
- [245] S. Hartwig, V. Auwärter und F. Pragst, „Fatty acid ethyl esters in scalp, pubic, axillary, beard and body hair as markers for alcohol misuse.“ *Alcohol Alcohol*, Vol. 38, Nr. 2, S. 163–167, 2003.
- [246] „RÖMPP Chemie-Enzyklopädie Online (Version 3.19), Eintrag zu Harn“ 2011. URL www.roempp.com/prod/. Aufgerufen am 13.01.2012.
- [247] K. Aktories, U. Förstermann, F. B. Hofmann und K. Starke (Hrsg.), „Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie.“ Urban und Fischer (München, Deutschland), 2004. ISBN-13: 978-3437425219.
- [248] „RÖMPP Chemie-Enzyklopädie Online (Version 3.19), Eintrag zu d-Glucuronsäure“ 2011. URL www.roempp.com/prod/. Aufgerufen am 13.01.2012.
- [249] M. R. Harkey, „Anatomy and physiology of hair.“ *Forensic Sci Int*, Vol. 63, Nr. 1-3, S. 9–18, 1993.
- [250] E. J. Cone, „Mechanisms of drug incorporation into hair.“ *Ther Drug Monit*, Vol. 18, Nr. 4, S. 438–443, 1996.
- [251] B. Madea und F. Musshoff (Hrsg.), „Haaranalytik: Technik und Interpretation in Medizin und Strafrecht.“ Deutscher Ärzte-Verlag (Köln, Deutschland), 2004. ISBN-13: 978-3769104370.
- [252] F. Pragst und M. A. Balikova, „State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse.“ *Clin Chim Acta*, Vol. 370, Nr. 1-2, S. 17–49, 2006.
- [253] P. Kintz, *Drug Testing in Alternate Biological Specimens.*, Kap. Drug Testing in Hair, S. 67–80. Humana Press (New York City, USA), 2008.
- [254] H. Wosicka und K. Cal, „Targeting to the hair follicles: current status and potential.“ *J Dermatol Sci*, Vol. 57, Nr. 2, S. 83–89, 2010.
- [255] A. Franbourg, P. Hallegot, F. Baltenneck, C. Toutain und F. Leroy, „Current research on ethnic hair.“ *J Am Acad Dermatol*, Vol. 48, Nr. 6 Suppl, S. S115–S119, 2003.
- [256] A. M. Baumgartner, P. F. Jones, W. A. Baumgartner und C. T. Black, „Radioimmunoassay of hair for determining opiate–abuse histories.“ *J Nucl Med*, Vol. 20, Nr. 7, S. 748–752, 1979.
- [257] E. Klug, „Zur Morphinbestimmung in Kopfharen.“ *Int J Legal Med*, Vol. 84, S. 189–193, 1980.

- [258] Society of Hair Testing, „Recommendations for hair testing in forensic cases.“ *Forensic Sci Int*, Vol. 145, Nr. 2-3, S. 83–84, 2004.
- [259] T. Porta, C. Grivet, T. Kraemer, E. Varesio und G. Hopfgartner, „Single hair cocaine consumption monitoring by mass spectrometric imaging.“ *Anal Chem*, Vol. 83, Nr. 11, S. 4266–4272, 2011.
- [260] A. C. Springfield, L. W. Cartmell, A. C. Aufderheide, J. Buikstra und J. Ho, „Cocaine and metabolites in the hair of ancient Peruvian coca leaf chewers.“ *Forensic Sci Int*, Vol. 63, Nr. 1-3, S. 269–275, 1993.
- [261] F. Musshoff, W. Rosendahl und B. Madea, „Determination of nicotine in hair samples of pre-Columbian mummies.“ *Forensic Sci Int*, Vol. 185, Nr. 1-3, S. 84–88, 2009.
- [262] P. Kintz, „Bioanalytical procedures for detection of chemical agents in hair in the case of drug-facilitated crimes.“ *Anal Bioanal Chem*, Vol. 388, Nr. 7, S. 1467–1474, 2007.
- [263] D. Thieme, J. Grosse, H. Sachs und R. K. Mueller, „Analytical strategy for detecting doping agents in hair.“ *Forensic Sci Int*, Vol. 107, Nr. 1-3, S. 335–345, 2000.
- [264] Microgenics GmbH, *CEDIA® Amphetamine/Ecstasy Assay*. URL <https://fscimage.thermoscientific.com/images/D13653~.pdf>. Aufgerufen am 25.01.2012.
- [265] Microgenics GmbH, *CEDIA® THC PLUS Assay*. URL <https://fscimage.thermoscientific.com/images/D13662~.pdf>. Aufgerufen am 25.01.2012.
- [266] Microgenics GmbH, *CEDIA® Opiate Assay*. URL <https://fscimage.thermoscientific.com/images/D13650~.pdf>. Aufgerufen am 25.01.2012.
- [267] Microgenics GmbH, *CEDIA® Cocaine Assay*. URL <https://fscimage.thermoscientific.com/images/D13648~.pdf>. Aufgerufen am 25.01.2012.
- [268] Microgenics GmbH, *DRI® Ethylglucuronid-Assay*. URL <https://fscimage.thermoscientific.com/images/D13680~.pdf>. Aufgerufen am 25.01.2012.
- [269] Microgenics GmbH, *CEDIA® Sample Check Assay*. URL <https://static.thermoscientific.com/images/D13616~.pdf>. Aufgerufen am 25.01.2012.
- [270] Microgenics GmbH, *DRI® Creatinine-Detect Test*. URL <https://fscimage.thermoscientific.com/images/D14057~.pdf>. Aufgerufen am 25.01.2012.
- [271] M. Jaffe, „Über den Niederschlag, welchen Pikrinsäure im normalen Harn erzeugt, und über eine neue Reaktion des Kreatinins.“ *Zeitschrift für Physiologische Chemie*, Vol. 10, S. 391–400, 1886.
- [272] „RÖMPP Chemie-Enzyklopädie Online (Version 3.19), Eintrag zu Jaffé-Reaktion“ 2011. URL www.roempp.com/prod/. Aufgerufen am 11.01.2012.

- [273] M. S. Tswett, „Physikalisch-chemische Studien über das Chlorophyll. Die Adsorptionen.“ *Ber Dtsch Botan Ges*, Vol. 24, S. 316–323, 1906.
- [274] M. S. Tswett, „Adsorptionsanalyse und chromatographische Methode. Anwendung auf die Chemie des Chlorophylls.“ *Ber Dtsch Botan Ges*, Vol. 24, S. 384–393, 1906.
- [275] V. R. Meyer und L. S. Ettre, „Early evolution of chromatography: the activities of Charles Dhéré.“ *J Chromatogr A*, Vol. 600, S. 3–15, 1992.
- [276] „RÖMPP Chemie-Enzyklopädie Online (Version 3.19), Eintrag zu Chromatographie“ 2011. URL www.roempp.com/prod/. Aufgerufen am 11.01.2012.
- [277] B. Levine (Hrsg.), „Principles of forensic toxicology.“ 2. Aufl. AACC (Press Washington DC, USA), 2006. ISBN-13: 978-1594250538.
- [278] H. Budzikiewicz und M. Schäfer, „Massenspektrometrie: Eine Einführung.“ 5. Aufl. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co (Weinheim, Deutschland), 2005. ISBN-13: 978-3527308224.
- [279] M. Hesse, H. Meier und B. Zeeh, „Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie.“ 7. Aufl. Georg Thieme Verlag (Stuttgart, Deutschland), 2005. ISBN-13: 978-3135761077.
- [280] A. Poletini (Hrsg.), „Applications of LC-MS in Toxicology.“ Pharmaceutical Press (Grayslake, USA), 2006. ISBN-13: 978-0853696292.
- [281] J. Pawliszyn, B. L. Pawliszyn und M. Pawliszyn, „Solid phase microextraction (SPME).“ *The Chemical Educator*, Vol. 2, Nr. 4, S. 1–7, 1997.
- [282] S. Risticvic, V. H. Niri, D. Vuckovic und J. Pawliszyn, „Recent developments in solid-phase microextraction.“ *Anal Bioanal Chem*, Vol. 393, Nr. 3, S. 781–795, 2009.
- [283] Y. Chen und J. Pawliszyn, „Miniaturization and automation of an internally cooled coated fiber device.“ *Anal Chem*, Vol. 78, Nr. 14, S. 5222–5226, 2006.
- [284] C. Dietz, J. Sanz und C. Cámara, „Recent developments in solid-phase microextraction coatings and related techniques.“ *J Chromatogr A*, Vol. 1103, Nr. 2, S. 183–192, 2006.
- [285] J. Pawliszyn, „Solid phase microextraction: Theory and practice.“ John Wiley & Sons (New York City, USA), 1997. ISBN-13: 978-0471190349.
- [286] T. Górecki, X. Yu und J. Pawliszyn, „Theory of analyte extraction by selected porous polymer spme fibres.“ *Analyst*, Vol. 124, S. 643–649, 1999.
- [287] E. E. Stashenko und J. R. Martinez, „Derivatization and solid-phase microextraction.“ *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 23, Nr. 8, S. 553–561, 2004.
- [288] H. L. Lord, „Strategies for interfacing solid-phase microextraction with liquid chromatography.“ *J Chromatogr A*, Vol. 1152, Nr. 1-2, S. 2–13, 2007.

- [289] F. T. Peters, M. Hartung, M. Herbold, G. Schmitt, T. Daldrup und F. Mußhoff, „Anhang B zur Richtlinie der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen: Anforderungen an die Validierung von Analysemethoden.“ *Toxichem Krimtech*, Vol. 76, Nr. 3, S. 185–208, 2009.
- [290] German Institute for Standardization, „DIN 32645 - chemical analysis - decision limit, detection limit and determination limit under repeatability conditions - terms, methods, evaluation.“ 2008. URL <http://www.nmp.din.de/cmd;jsessionid=7C85462771C5D0B9FD39B5FE1C05D893.4?artid=110729574&bcrumblevel=2&level=tpl-art-detailansicht&committeeid=54738983&languageid=en>. Aufgerufen am 29.11.2011.
- [291] B. K. Matuszewski, M. L. Constanzer und C. M. Chavez-Eng, „Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS.“ *Anal Chem*, Vol. 75, Nr. 13, S. 3019–3030, 2003.
- [292] „AB SCIEX Analyst® 1.4 Software“ 2005. URL <http://www.absciex.com/products/software/analyst-software>.
- [293] „AB SCIEX Analyst® 1.5.1 Software“ 2010. URL <http://www.absciex.com/Documents/Downloads/Software/Analyst-1.5.1-Release-Notes.pdf>.
- [294] „Agilent technologies chemstation“ URL <http://www.chem.agilent.com/en-us/products/software/chromatography/ms/gcmsdchemstation/pages/default.aspx>.
- [295] G. Schmitt, M. Herbold und F. Peters, „VALISTAT - software for method validation in forensic toxicology.“ *Toxichem Krimtech*, Vol. 78, S. 392, 2011.
- [296] H. Gnann, A. Wohlfarth, A. Thierauf, W. Weinmann und C. C. Halter, „Abstracts der Jahrestagung in Dresden, P050: Falsch positiver Ethylglucuronid-Befund mit LC-MS/MS ist vermeidbar.“ *Rechtsmedizin*, Vol. 18, Nr. 4, S. 293–342, 2008.
- [297] F. Musshoff, G. Skopp, F. Pragst, H. Sachs, D. Thieme, L. D. Paul und M. des AK Qualitätssicherung, „Anhang C zur Richtlinie der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen: Anforderungen an die Untersuchung von Haarproben.“ *Toxichem Krimtech*, Vol. 76, Nr. 3, S. 209–216, 2009.
- [298] A. M. Tsatsakis, M. N. Tzatzarakis und M. Tutudaki, „Pesticide levels in head hair samples of Cretan population as an indicator of present and past exposure.“ *Forensic Sci Int*, Vol. 176, Nr. 1, S. 67–71, 2008.
- [299] M. Rothe und F. Pragst, „Solvent optimization for the direct extraction of opiates from hair samples.“ *J Anal Toxicol*, Vol. 19, Nr. 4, S. 236–240, 1995.
- [300] „IBM SPSS Statistics for Windows20.0“ 2011. URL <http://www-01.ibm.com/software/analytics/spss/>. Freigabedatum: 16.08.2011.

- [301] H. P. Eser, L. Pötsch, G. Skopp und M. R. Moeller, „Influence of sample preparation on analytical results: drug analysis [GC/MS] on hair snippets versus hair powder using various extraction methods.“ *Forensic Sci Int*, Vol. 84, Nr. 1-3, S. 271–279, 1997.
- [302] D. P. Agarwal, „Genetic polymorphisms of alcohol metabolizing enzymes.“ *Pathol Biol (Paris)*, Vol. 49, Nr. 9, S. 703–709, 2001.
- [303] F. Musshoff und B. Madea, „Analytical pitfalls in hair testing.“ *Anal Bioanal Chem*, Vol. 388, Nr. 7, S. 1475–1494, 2007.
- [304] F. Pragst, „Pitfalls in hair analysis.“ *Toxichem Krimtech*, Vol. 71, Nr. 2, S. 69–83, 2004.
- [305] M. A. LeBeau, M. A. Montgomery und J. D. Brewer, „The role of variations in growth rate and sample collection on interpreting results of segmental analyses of hair.“ *Forensic Sci Int*, Vol. 210, Nr. 1-3, S. 110–116, 2011.
- [306] F. Pragst, „Interpretation problems in a forensic case of abstinence determination using alcohol markers in hair.“ *Forensic Sci Int*, Vol. 217, Nr. 1–3, S. e4–e7, 2012.
- [307] T. Johnson und M. Fendrich, „Modeling sources of self-report bias in a survey of drug use epidemiology.“ *Ann Epidemiol*, Vol. 15, Nr. 5, S. 381–389, 2005.
- [308] Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV), „Leitsätzen für Gemüseerzeugnisse.“ 2008. URL http://www.bmelv.de/SharedDocs/Downloads/Ernaehrung/Lebensmittelbuch/LeitsaetzeGemueseerzeugnisse.pdf;jsessionid=D9DDF9BD4A60A4733F78A4315D4A1883.2_cid245?__blob=publicationFile. Aufgerufen am 08.05.2012.
- [309] „Leitsätze für Fruchtsäfte.“ 2002. URL http://www.bmelv.de/SharedDocs/Downloads/Ernaehrung/Lebensmittelbuch/LeitsaetzeFruchtsaefte.pdf?__blob=publicationFile. Aufgerufen am 01.05.2012.
- [310] „Verordnung (EG) Nr. 1493/1999 des Rates über die gemeinsame Marktorganisation für Wein.“ 1999. URL <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:1999:179:0001:0001:DE:PDF>. Aufgerufen am 01.05.2012.
- [311] F. M. Wurst, C. Kempter, J. Metzger, S. Seidl und A. Alt, „Ethyl glucuronide: a marker of recent alcohol consumption with clinical and forensic implications.“ *Alcohol*, Vol. 20, Nr. 2, S. 111–116, 2000.