

Holger Zimmer

Dr. sc. hum.

Ethylglucuronid – Entwicklung eines Enzymimmunoassays und Festlegung eines Grenzwertes für Alkoholmißbrauch

Geboren am 21.07.1968 in Heidelberg

Reifeprüfung am 19.05.1988 in Heidelberg

Studiengang der Fachrichtung Chemie vom WS 1989 bis WS 1996

Vordiplom am 10.12.1992 an der Universität Heidelberg

Diplom am 18.12.1996 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Rechtsmedizin

Doktorvater: Prof. Dr. rer. nat. R. Aderjan

Ethylglucuronid ist ein hochspezifisches Stoffwechselprodukt des Ethanols. Es bildet sich im menschlichen Körper durch enzymatische Konjugation von Ethanol mit Glucuronsäure.

In der vorliegenden Arbeit sollte neben der Verbesserung der validierten gaschromatographisch-massenspektrometrischen Methode durch Synthese und durch Anwendung eines internen Standards ein einfaches und schnelles Verfahren mit hohem Probendurchsatz zum Nachweis von Ethylglucuronid in Serum und Urin entwickelt werden. Desweiteren sollten Ethylglucuronidkonzentrationen bei Alkoholvergifteten im Serum bestimmt und ein Grenzwert für Alkoholmißbrauch überprüft und festgelegt werden. Weitere Ziele waren der Vergleich von Ethylglucuronid mit gängigen Alkoholmißbrauchsmarkern, die Beschreibung der Konzentrationsverläufe mit einem aus Trinkversuchen entwickelten numerischen Modell sowie der Vergleich der kinetischen Parameter von gesunden Probanden in Trinkversuchen mit denen von Gelegenheitstrinkern und Alkoholikern in der Überwachungsstation.

Es wurde tertiär-Butylglucuronid synthetisiert und bei der Analyse mittels Gaschromatographie und Massenspektrometrie als interner Standard verwendet. Bei 105 Serumproben wurden Doppelbestimmungen durchgeführt und Mittelwerte gebildet. Durch den Vergleich der Auswertungen ohne und mit tertiär-Butylglucuronid zeigte sich, daß durch die Anwendung des internen Standards die mittlere Standardabweichung bzw. der mittlere Variationskoeffizient

von 0,9 mg/L auf 0,7 mg/L bzw. von 10,6 % auf 7,4 % abnahm. Gleichzeitig ergab sich bei der Erstellung der Kalibrationsgeraden ein mittlerer Korrelationskoeffizient von 0,98 bei Berücksichtigung des internen Standards im Gegensatz zu einem Mittelwert von 0,97 ohne internen Standard. Folglich konnte durch die Verwendung von tertiär-Butylglucuronid bei der gaschromatographisch-massenspektrometrischen Analyse von Ethylglucuronid die Methodenpräzision verbessert werden.

In Zusammenarbeit mit der Firma BioGenes GmbH (Berlin) wurde ein Enzymimmunoassay zur Bestimmung von Ethylglucuronid in Serum und Urin entwickelt, validiert und angewendet. Es wurden 622 Seren und 265 Urinproben gaschromatographisch und massenspektrometrisch sowie mittels Enzymimmunoassay untersucht und die beiden Methoden miteinander verglichen. Es ergaben sich im Serum (Urin) 18 % (16 %) falsch negative und 12 % (17 %) falsch positive Resultate bei einem Cutoff-Wert von 0,5 mg/L (1,8 mg/L) bei einer Spezifität von 88 % (83 %), einer Sensitivität von 82 % (84 %) und einer Testeffizienz von 83 % (83 %). Der zwischen den Methoden errechnete Korrelationskoeffizient ergab für Serum (Urin) 0,95 (0,75). Zur Überprüfung eines aus Trinkversuchen abgeleiteten Grenzwertes für Alkoholmißbrauch von 5 mg EtG/L Serum wurden Blutproben von 55 Alkoholintoxikierten gesammelt und gaschromatographisch auf Ethanol sowie gaschromatographisch und massenspektrometrisch auf dessen Glucuronid untersucht. Die bei Blutalkoholkonzentrationen bis 5,42 ‰ im Serum gefundenen EtG-Konzentrationen lagen bei Werten bis 46,6 mg/L und somit weit über dem aus Trinkversuchen bekannten, aber bei Alkoholikern in Entzugsbehandlung gefundenen Bereich. Aufgrund der hohen EtG-Abbaugeschwindigkeit ist einmaliger nicht von chronischem Mißbrauch zu unterscheiden und stark abhängig von der Zeit nach Trinkende: Für Werte über 5 mg/L errechnete sich eine Sensitivität von 82 % und eine Spezifität von 44 % zur Erkennung von chronischem Alkoholmißbrauch. In neun Fällen fanden sich auch zum Zeitpunkt der Entlassung, bei Blutalkoholkonzentrationen unter 1,6 ‰, noch EtG-Konzentrationen über 5 mg/L Serum. Die Modellierung der Konzentrationsverläufe ergab im Mittel höhere Bildungs- und Eliminationskonstanten als bei gesunden Probanden im Trinkversuch.