

Aus dem Institut für Rechts- und Verkehrsmedizin
des Universitätsklinikums Heidelberg
(Ärztliche Direktorin: Prof. Dr. med. univ. Kathrin Yen)

**Entwicklung und Validierung einer Multimethode zur Bestimmung der Alkoholbiomarker
Ethylglucuronid, Ethylsulfat, N-Acetyltaurin und Phosphatidylethanol sowie deren
Anwendung in der Forensik**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doctor scientiarum humanarum (Dr. sc. hum.)
an der
Medizinischen Fakultät der Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

Vorgelegt von
Vanessa Hofmann
aus
Ronsberg

2022

Dekan: Prof. Dr. med. Hans-Georg Kräusslich

Doktormutter: Prof. Dr. med. univ. Kathrin Yen

Gewidmet aus Liebe und Dankbarkeit: Meinen Eltern und Anne & Walter

Alle Dinge sind Gift, und nichts ist ohne Gift. Allein die Dosis macht, daß ein Ding kein Gift ist.

-Paracelsus-

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	VI
Tabellenverzeichnis.....	X
1 Einleitung.....	1
1.1 Charakteristika des Moleküls Ethanol.....	3
1.2 Pharmakokinetik von Ethanol.....	4
1.3 Pharmakodynamik von Ethanol.....	6
1.4 Alkoholmissbrauch und -abhängigkeit.....	8
1.4.1 Schädlichkeit des Alkoholkonsums.....	8
1.4.2 Konsumklassen.....	11
1.4.3 Lebersteifigkeit.....	11
1.5 Alkoholbiomarker.....	12
1.5.1 Ethylglucuronid.....	14
1.5.2 Ethylsulfat.....	17
1.5.3 N-Acetyltaurin.....	20
1.5.4 Phosphatidylethanole.....	21
1.6 Matrices für den Nachweis von direkten Alkoholbiomarkern - State of the art.....	25
1.7 Pharmakokinetik der Alkoholbiomarker.....	28
1.8 Instrumentelle Analytik.....	29
1.8.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie.....	30
1.8.2 Tandem-Massenspektrometrie.....	32
1.9 Etablierte Multimethoden zum Nachweis der vier Alkoholbiomarker.....	38
1.10 Zielsetzung.....	39
2 Material und Methoden.....	41

2.1	Material	41
2.1.1	Verbrauchsmaterial.....	41
2.1.2	Geräte und Software	44
2.2	Methodenentwicklung	47
2.2.1	Probenaufarbeitung	48
2.2.2	LC-MS/MS-Parameter	49
2.2.3	Laufmittel und Gradient.....	51
2.2.4	Synthese von NAcT-D ₄	52
2.3	Validierung der entwickelten Methode	52
2.3.1	Selektivität.....	52
2.3.2	Linearität der Kalibration	53
2.3.3	Präzision und Richtigkeit	53
2.3.4	Stabilität	54
2.3.5	Analytische Grenzen.....	54
2.3.6	Wiederfindung und Matrixeffekte	55
2.4	Erweiterte Validierung: Postmortale Proben	56
2.4.1	Fallbeispiel.....	56
2.5	Studienablauf und Details der durchgeführten Trinkversuche.....	57
2.6	Analytik von EtG und EtS in Urin	61
2.7	Analytik zur Bestimmung der BAK in Serum.....	62
2.8	Kreatininbestimmung in Urin	62
2.9	Kooperation mit dem Krankenhaus Salem.....	63
2.10	Proben und Probenlagerung	63
2.11	Auswertung.....	64
2.11.1	Statistische Auswertung.....	64
2.11.2	Statistische Visualisierung der Konzentrationen der einzelnen Biomarker.....	66

2.11.3	Pharmakokinetische Parameter	67
3	Ergebnisse	69
3.1	Methodenentwicklung	69
3.1.1	Chromatographische Trennung und Extraktionsverfahren	69
3.1.2	Festlegung des Rücklösemittels und Injektionsvolumens	74
3.1.3	Retentionszeiten und Chromatogramm einer authentischen Probe	75
3.1.4	Synthese von NAcT-D ₄	76
3.2	Validierung.....	77
3.2.1	Selektivität.....	77
3.2.2	Linearität	78
3.2.3	Präzision und Richtigkeit	79
3.2.4	Stabilität	79
3.2.5	Grenzwerte.....	80
3.2.6	Matrixeffekte und Wiederfindung.....	80
3.3	Erweiterte Validierung: Postmortale Proben	81
3.3.1	Gesamtes Kollektiv und Alkoholbiomarker	81
3.3.1	BAK-Eingruppierung und Alkoholbiomarker	82
3.3.2	Fallbeispiel.....	83
3.4	Trinkversuche	85
3.4.1	Pharmakokinetiken der einzelnen Alkoholbiomarker	85
3.4.2	Darstellung der Urinausscheidung von EtG und EtS	104
3.4.3	Blutalkoholkonzentration im Verlauf der Trinkversuche.....	106
3.4.4	Auftragung der gemessenen Werte der einzelnen Alkoholbiomarker gegen die ermittelten EtG- und EtS-Konzentrationen in Urin.....	108
3.4.5	Auftragung der gemessenen Werte der einzelnen Alkoholbiomarker gegen die ermittelten BAK-Werte	110

3.4.6	Auftragung der BAK gegen die gemessenen Werte von EtG und EtS im Urin.	112
3.4.7	Bestimmung des endogenen Levels für NAcT.....	112
3.5	Ergebnisse aus der Kooperation mit dem Krankenhaus Salem.....	113
3.5.1	Die Biomarker im Entzugskontext.....	113
3.5.2	Zusammenhang zwischen Entgiftung, Biomarkern und Lebersteifigkeit	116
4	Diskussion	119
4.1	Methodenentwicklung	119
4.1.1	Chromatographische Auftrennung und Extraktionsverfahren	119
4.1.2	Festlegung des Rücklösemittels und Injektionsvolumens	121
4.1.3	Retentionszeiten und Chromatogramm einer authentischen Probe	122
4.2	Validierung.....	123
4.2.1	Selektivität.....	123
4.2.2	Linearität	123
4.2.3	Präzision und Richtigkeit	124
4.2.4	Stabilität	124
4.2.5	Grenzwerte.....	124
4.2.6	Matrixeffekte und Wiederfindung.....	125
4.3	Erweiterte Validierung: Postmortale Proben	126
4.3.1	Gesamtes Kollektiv und Alkoholbiomarker.....	126
4.3.2	BAK-Eingruppierung und Alkoholbiomarker	128
4.3.3	Fallbeispiel.....	129
4.4	Trinkversuche	131
4.4.1	Pharmakokinetiken der einzelnen Alkoholbiomarker	131
4.4.2	Darstellung der Urinausscheidung von EtG und EtS	144
4.4.3	Blutalkoholkonzentration im Verlauf der Trinkversuche.....	145

4.4.4	Auftragung der gemessenen Werte der einzelnen Alkoholbiomarker gegen die ermittelten EtG- und EtS-Konzentrationen in Urin.....	146
4.4.5	Auftragung der gemessenen Werte der einzelnen Alkoholbiomarker gegen die ermittelten BAK-Werte	149
4.4.6	Auftragung der BAK gegen die gemessenen Werte von EtG und EtS im Urin.	151
4.4.7	Bestimmung des endogenen Grundlevels für NAcT	152
4.5	Ergebnisse aus der Kooperation mit dem Krankenhaus Salem.....	153
4.5.1	Die Biomarker im Entzugskontext.....	153
4.5.2	Zusammenhang zwischen Entgiftung, Biomarkern und Lebersteifigkeit	154
4.6	Schlussfolgerung, Limitationen und Ausblick.....	156
5	Zusammenfassung	161
6	Literaturverzeichnis	164
7	Publikationen	182
8	Anhang.....	184
9	Lebenslauf.....	229
10	Danksagung	230
11	Eidesstattliche Versicherung.....	231

Abkürzungsverzeichnis

Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
ACN	Acetonitril
ADH	Alkoholdehydrogenase
ALDH	Aldehyddehydrogenase
ALT	Alanin-Aminotransferase
Å	Ångström
APCI	<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i>
AST	Aspartat-Aminotransferase
AUDIT	<i>Alcohol Use Disorders Identification Test</i>
BAK	Blutalkoholkonzentration
BRD	Bundesrepublik Deutschland
CAD	<i>Collisionally Activated Dissociation</i>
CDT	<i>Carbohydrate-Defficient-Transferrin</i>
CE	<i>Collision Energy</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COVID-19	<i>Coronavirus Disease 2019</i>
CTU-Kriterien	Chemisch-Toxikologische Untersuchungskriterien
CUR	<i>Curtain Gas</i>
CXP	<i>Collision Exit Potential</i>
DAD	Diodenarray-Detektor
DBS	<i>Dried Blood Spot</i>
DC	Dünnschichtchromatographie
DIN	Deutsches Institut für Normung

dL	Deziliter
DP	<i>Declustering Potential</i>
EP	<i>Entrance Potential</i>
ESI	<i>Electrospray Ionisation</i> (Elektronenspray-Ionisation)
EtG	Ethylglucuronid
EtOH	Ethanol
EtP	Ethylphosphate
EtS	Ethylsulfat
F3	Fortgeschrittene Fibrose
F4	Leberzirrhose
FA	<i>Formic Acid</i> (Ameisensäure)
FAEE	Fettsäureethylester
FID	Flammenionisationsdetektor
g	Gramm
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GC	Gaschromatographie
GGT	Gamma-Glutamyltransferase
GS 1	<i>Nebulizer Gas</i>
GS 2	<i>Heater Gas</i>
GTFCh	Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie
h	Stunde(n)
H ₂ O	Wasser
HiC	<i>High Control</i>
HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)

ICD	<i>International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems</i> (Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme)
iProp	iso-Propanol (2-Propanol)
IRVM	Institut für Rechts- und Verkehrsmedizin Heidelberg
IS	Ionenspray Spannung
ISO	Internationale Organisation für Normung
ISTD	interner Standard
k_e	Eliminationskonstante
kg	Kilogramm
kPA	Kilopascal
L	Liter
LC-MS/MS	Hochleistungsflüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie
LoC	<i>Low Control</i>
LOD	<i>Limit of Detection</i> (Nachweisgrenze)
LOQ	<i>Limit of Quantification</i> (Bestimmungsgrenze)
m/z	Masse/Ladungsverhältnis eines Ions
MCV	<i>Mean Corpuscular Volume</i> (Mittleres Erythrozyteneinzelvolumen)
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
MiC	<i>Middle Control</i>
min	Minuten
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MRM	<i>Multiple Reaction Monitoring</i>

MS	Massenspektrometer
MS/MS	Tandem-Massenspektrometer
N	Anzahl
NAcT	N-Acetyltaurin
NAD(H)	Nicotinamidadenindinukleotid
nb	nicht bestimmbar
ng	Nanogramm
NIS	Neutralverlust-Scan
nm	Nanometer
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> (Kernmagnetische Resonanz)
nn	nicht nachweisbar
NP	Normalphase
PEth	Phosphatidylethanol(e)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PLD	Phospholipase D
ppm	<i>Parts per Million</i>
PreIS	Vorläufer-Ionen-Scan
ProIS	Produkt-Ionen-Scan
Q	Quadrupol
QC	<i>Quality Control</i>
r	Reduktionsfaktor
R ²	Bestimmtheitsmaß
RP	<i>Reversed Phase</i> (Umkehrphase)
RSD	relative Standardabweichung
R _T	Retentionszeit

Abkürzungsverzeichnis - V

RVO	Reichsversicherungsordnung
SARS-CoV-2	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Type 2</i>
SD	Standardabweichung
SIM	<i>Selected Ion Monitoring</i>
$t_{1/2}$	Eliminationshalbwertszeit
TEM	<i>Temperature</i> (Temperatur)
v/v	Volumenprozent
WHO	<i>World Health Organization</i> (Weltgesundheitsbehörde)
μg	Mikrogramm
μL	Mikroliter
μm	Mikrometer

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Unter Alkoholeinfluss stehende an einem Verkehrsunfall beteiligte Pkw-Fahrer mit Personenschaden aus dem Jahr 2018, Aufschlüsselung nach der BAK (Statistisches Bundesamt 2019)	2
Abbildung 2: Metabolismus des Ethylalkohols in der Leber (Seidel et al. 2019)	5
Abbildung 3: Metaboliten nach der Aufnahme von Ethanol.....	14
Abbildung 4: Strukturformel von Ethylglucuronid.....	14
Abbildung 5: Strukturformel von Ethylsulfat.....	18
Abbildung 6: Strukturformel von N-Acetyltaurin	20
Abbildung 7: Strukturformel des Grundgerüsts der PEth-Homologe. R ¹ und R ² stehen stellvertretend für die charakteristischen Fettsäurereste.....	22
Abbildung 8: Schematischer Aufbau einer HPLC-Anlage mit Detektor.....	31
Abbildung 9: Schematischer Aufbau eines Tandem-Massenspektrometers	33
Abbildung 10: Schematischer Ablauf der Taylor-Konusbildung (Gross 2013).....	33
Abbildung 11: Schematischer Aufbau eines Quadrupols (Schwedt et al. 2016).....	35
Abbildung 12: Schematische Darstellung der verschiedenen Scan-Modi eines Tandem-Massenspektrometers (Reimann 2018).....	36
Abbildung 13: Grafische Darstellung des verwendeten Gradienten.....	51
Abbildung 14: Chromatogramm der Reinsubstanzen (jeweils 100 ng/mL) in MeOH auf der HILIC-Z-Säule, inklusive einer Detaildarstellung für EtS.....	71
Abbildung 15: Chromatogramm einer extrahierten Vollblutprobe (100 ng/mL pro Alkoholbiomarker) auf der HILIC-Z-Säule.....	72
Abbildung 16: Chromatogramm der Reinsubstanzen (jeweils 100 ng/mL) in MeOH auf der Luna Omega Sugar-Säule.....	73
Abbildung 17: Chromatogramme der einzelnen Alkoholbiomarker nach einer Extraktion aus Vollblut mit den entsprechenden Konzentrationen 25, 250 und 1000 ng/mL auf der Luna Omega Sugar-Säule	74

Abbildung 18: Chromatogramme von NAcT bei den Injektionsvolumina 3 und 10 μ L.....	75
Abbildung 19: Beispielhaftes Chromatogramm eines Probanden aus dem ersten Trinkversuch	76
Abbildung 20: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von NAcT-D ₄	77
Abbildung 21: Box-Plot-Diagramm für den Alkoholbiomarker EtG unter Berücksichtigung der verschiedenen Gruppierungen: Gruppe 1 (N = 4), Gruppe 2 (N = 9), Gruppe 3 (N = 11) und Gruppe 4 (N = 6).....	82
Abbildung 22: Box-Plot-Diagramm für den Alkoholbiomarker EtS unter Berücksichtigung der verschiedenen Gruppierungen: Gruppe 1 (N = 3), Gruppe 2 (N = 9), Gruppe 3 (N = 9), Gruppe 4(N = 6).....	83
Abbildung 23: Box-Plot-Diagramm für den Alkoholbiomarker PEth unter Berücksichtigung der verschiedenen Gruppierungen: Gruppe 1 (N = 3), Gruppe 2 (N = 9), Gruppe 3 (N = 9), Gruppe 4 (N = 6).....	83
Abbildung 24: Individuelle Konzentrationsverläufe des Alkoholbiomarkers EtG im Blut im ersten Trinkversuch (Ziel-BAK 0,8 ‰), inklusive einer Detaildarstellung des ersten Versuchstages.....	87
Abbildung 25: Box-Plot-Diagramm von EtG im ersten Trinkversuch	88
Abbildung 26: Individuelle Konzentrationsverläufe des Alkoholbiomarkers EtS im Blut im ersten Trinkversuch (Ziel-BAK 0,8 ‰), inklusive einer Detaildarstellung des ersten Versuchstages.....	89
Abbildung 27: Box-Plot-Diagramm von EtS im ersten Trinkversuch	89
Abbildung 28: Individuelle Konzentrationsverläufe des Alkoholbiomarkers NAcT im Blut im ersten Trinkversuch (Ziel-BAK 0,8 ‰), inklusive einer Detaildarstellung des ersten Versuchstages.....	91
Abbildung 29: Box-Plot-Diagramm von NAcT im ersten Trinkversuch.....	91
Abbildung 30: Individuelle Konzentrationsverläufe des Alkoholbiomarkers PEth im Blut im ersten Trinkversuch (Ziel-BAK 0,8 ‰), inklusive einer Detaildarstellung des ersten Versuchstages.....	93
Abbildung 31: Box-Plot-Diagramm von PEth im ersten Trinkversuch.....	93

Abbildung 32: Mittelwerte der einzelnen Biomarker im ersten Trinkversuch.....	95
Abbildung 33: Individuelle Konzentrationsverläufe des Alkoholbiomarkers EtG im Blut im zweiten Trinkversuch (Ziel-BAK 0,4 ‰), inklusive einer Detaildarstellung des ersten Versuchstages.....	96
Abbildung 34: Box-Plot-Diagramm von EtG im zweiten Trinkversuch	97
Abbildung 35: Individuelle Konzentrationsverläufe des Alkoholbiomarkers EtS im Blut im zweiten Trinkversuch (Ziel-BAK 0,4 ‰), inklusive Detaildarstellung des ersten Versuchstages	98
Abbildung 36: Box-Plot-Diagramm von EtS im zweiten Trinkversuch.....	99
Abbildung 37: Individuelle Konzentrationsverläufe des Alkoholbiomarkers NAcT im Blut im zweiten Trinkversuch (Ziel-BAK 0,4 ‰), inklusive einer Detaildarstellung des ersten Versuchstages.....	100
Abbildung 38: Box-Plot-Diagramm von NAcT im zweiten Trinkversuch	101
Abbildung 39: Individuelle Konzentrationsverläufe des Alkoholbiomarkers PEth im Blut im zweiten Trinkversuch (Ziel-BAK 0,4 ‰), inklusive einer Detaildarstellung des ersten Versuchstages.....	102
Abbildung 40: Box-Plot-Diagramm von PEth im zweiten Trinkversuch	102
Abbildung 41: Mittelwerte der einzelnen Biomarker im zweiten Trinkversuch	104
Abbildung 42: Ausscheidungskinetiken von EtG und EtS in Urin im ersten Trinkversuch (nach Normierung).....	105
Abbildung 43: Ausscheidungskinetiken von EtG und EtS in Urin im zweiten Trinkversuch (nach Normierung).....	106
Abbildung 44: Box-Plot-Diagramm des BAK-Verlaufs im ersten Trinkversuch	107
Abbildung 45: Box-Plot-Diagramm des BAK-Verlaufs im zweiten Trinkversuch.....	108
Abbildung 46: Darstellung der einzelnen Biomarkerkonzentrationen in Blut gegen die normierten EtG- und EtS-Konzentrationen in Urin aus dem ersten Trinkversuch	109
Abbildung 47: Darstellung der einzelnen Biomarkerkonzentrationen in Blut gegen die normierten EtG- und EtS-Konzentrationen in Urin aus dem zweiten Trinkversuch.....	110

Abbildung 48: Darstellung der einzelnen Biomarkerkonzentrationen in Blut gegen die BAK aus dem ersten Trinkversuch.....	111
Abbildung 49: Darstellung der einzelnen Biomarkerkonzentrationen in Blut gegen die BAK aus dem zweiten Trinkversuch	111
Abbildung 50: Auftragung der EtG- und EtS-Konzentrationen im Urin gegen die BAK zu den definierten Abnahmezeitpunkten in beiden Trinkversuchen	112
Abbildung 51: Box-Plot der ermittelten NAcT-Werte in ng/mL aus den erhobenen Leerproben (N = 17)	113
Abbildung 52: Box-Plot-Diagramm für den Alkoholbiomarker EtG im Entzugskontext.....	114
Abbildung 53: Box-Plot-Diagramm für den Alkoholbiomarker EtS im Entzugskontext	115
Abbildung 54: Box-Plot-Diagramm für den Alkoholbiomarker PEth im Entzugskontext	115
Abbildung 55: Box-Plot-Diagramm des Zusammenhangs zwischen Lebersteifigkeit und dem PEth-Abbau.....	117
Abbildung 56: Zusammenhang zwischen dem individuellen täglichen PEth-Abbau in Abhängigkeit von der Aufenthaltsdauer im Entzugsprogramm und dem Grad der Lebersteifigkeit.....	118

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Alkoholbedingte Ausfallerscheinungen im Zusammenhang mit der entsprechenden BAK [%] (Dekant und Vamvakas 2017)	8
Tabelle 2: Gesundheitliche Folgen durch den Konsum von Alkohol (N = Anzahl) (Seitz et al. 2013).....	10
Tabelle 3: Die häufigsten PEth-Homologe und deren prozentualer Anteil am gesamten PEth-Vorkommen (Helander und Zheng 2009; Wozniak et al. 2019)	23
Tabelle 4: Mögliche Matrices zum Nachweis der einzelnen Biomarker (Andresen-Streichert et al. 2018; Aradottir et al. 2004b; Hoiseith et al. 2010a; Hoiseith et al. 2009b; Luginbühl et al. 2017; Luginbühl et al. 2016).....	25
Tabelle 5: Verschiedene Anwendungsbereiche für die dargestellten Alkoholbiomarker und deren Zeitfenster zwischen Benachrichtigung und Probennahme zum Abstinenznachweis (Andresen-Streichert et al. 2018).....	26
Tabelle 6: Pipettierschema für die Kalibration der Multimethode	49
Tabelle 7: Auflistung der substanzspezifischen Einstellungen an der LC-MS/MS.....	50
Tabelle 8: Auflistung der quellenspezifischen Einstellungen an der LC-MS/MS.....	50
Tabelle 9: Darstellung des verwendeten Gradienten.....	51
Tabelle 10: Darstellung des benötigten Probenmaterials, geplanter Analyse und dem Mindestvolumen	58
Tabelle 11: Verbrauchsmaterialien für den Trinkversuch	61
Tabelle 12: Pipettierschema für die Bestimmung von EtG und EtS im Urin.....	61
Tabelle 13: Retentionszeiten der einzelnen Alkoholbiomarker	75
Tabelle 14: Regressionsgleichungen, Bestimmtheitsmaße und Wichtung der einzelnen Alkoholbiomarker.....	78
Tabelle 15: Wiederholpräzision der einzelnen Alkoholbiomarker in der Form RSD [%].....	79
Tabelle 16: Laborpräzision der einzelnen Alkoholbiomarker in der Form der RSD [%]	79

Tabelle 17: Richtigkeit der einzelnen Alkoholbiomarker dargestellt in der Form des Bias [%]	79
Tabelle 18: Stabilitäten der ermittelten Messwerte für die einzelnen Biomarker und deren Low und High Control in Prozent.....	80
Tabelle 19: LOD und LOQ für die verschiedenen Alkoholbiomarker.....	80
Tabelle 20: Wiederfindung für die einzelnen Biomarker	81
Tabelle 21: Matrixeffekte für die einzelnen Biomarker.....	81
Tabelle 22: Darstellung der Ergebnisse für die Alkoholbiomarker EtG, EtS und PEth aus den Messungen der postmortalen Blutproben (nb = nicht bestimmbar)	81
Tabelle 23: Mediane, Mittelwerte, sowie Minima und Maxima der gemessenen BAKs in der GC- und ADH-Analytik für die ausgewählten postmortalen Proben (N = 31).....	82
Tabelle 24: Begleitstoffmuster der gemessenen Leichenblutprobe. Die Bezeichnung Amylalkohole beinhaltet 2- und 3-Methylbutanol	84
Tabelle 25: Messergebnisse aus den Alkoholbiomarkerbestimmungen in zwei postmortalen Blutproben und Urin (nn = nicht nachweisbar).....	84
Tabelle 26: Beispieldaten des Probanden 1 aus dem Trinkversuch II	85
Tabelle 27: Übersichtstabelle zur Darstellung verschiedener individueller Parameter aus dem ersten Teil des Trinkversuches ($p(\text{EtOH}) = 0,8 \text{ g/mL}$).....	86
Tabelle 28: Darstellung der Parameter Median, Mittelwert, Standardabweichung, relative Standardabweichung, Minima und Maxima für EtG im ersten Trinkversuch.....	88
Tabelle 29: Pharmakokinetische Parameter c_{max} und t_{max} für EtG im ersten Trinkversuch aller Probanden	88
Tabelle 30: Darstellung der Parameter Median, Mittelwert, Standardabweichung, relative Standardabweichung, Minima und Maxima für EtS im ersten Trinkversuch	90
Tabelle 31: Pharmakokinetische Parameter c_{max} und t_{max} für EtS im ersten Trinkversuch aller Probanden.....	90
Tabelle 32: Darstellung der Parameter Median, Mittelwert, Standardabweichung, relative Standardabweichung, Minima und Maxima für NAcT im ersten Trinkversuch.....	92

Tabelle 33: Darstellung der Parameter Median, Mittelwert, Standardabweichung, relative Standardabweichung, Minima und Maxima für PEth im ersten Trinkversuch.....	94
Tabelle 34: Pharmakokinetische Parameter c_{max} , t_{max} , k_e und $t_{1/2}$ für PEth im ersten Trinkversuch von mindestens vier Probanden.....	94
Tabelle 35: Übersichtstabelle zur Darstellung verschiedener individueller Parameter aus dem zweiten Trinkversuch (ρ (EtOH) = 0,8 g/mL)	95
Tabelle 36: Darstellung der Parameter Median, Mittelwert, Standardabweichung, relative Standardabweichung, Minima und Maxima für EtG im zweiten Trinkversuch	97
Tabelle 37: Pharmakokinetische Parameter c_{max} und t_{max} für EtG im zweiten Trinkversuch aller Probanden	97
Tabelle 38: Darstellung der Parameter Median, Mittelwert, Standardabweichung, relative Standardabweichung, Minima und Maxima für EtS im zweiten Trinkversuch.....	99
Tabelle 39: Pharmakokinetische Parameter c_{max} und t_{max} für EtS im zweiten Trinkversuch aller Probanden.....	99
Tabelle 40: Darstellung der Parameter Median, Mittelwert, Standardabweichung, relative Standardabweichung, Minima und Maxima für NAcT im zweiten Trinkversuch	101
Tabelle 41: Darstellung der Parameter Median, Mittelwert, Standardabweichung, relative Standardabweichung, Minima und Maxima für PEth im zweiten Trinkversuch.....	103
Tabelle 42: Pharmakokinetische Parameter c_{max} , t_{max} , k_e und $t_{1/2}$ für PEth im zweiten Trinkversuch	103
Tabelle 43: Ermittelte Konzentrationen von EtG und EtS in Urin, sowie der Kreatinin-Konzentration mit anschließender Normung auf 100 mg/dL Kreatinin von Proband 1 im ersten Trinkversuch	105
Tabelle 44: Messwerte der BAK des Probanden 1 aus dem ersten Trinkversuch.....	106
Tabelle 45: Kenngrößen c_{max} , t_{max} , Abbauraten und Resorptionsende für die BAK im ersten Trinkversuch	107
Tabelle 46: Kenngrößen c_{max} , t_{max} , Abbauraten und Resorptionsende für die BAK im ersten Trinkversuch	108

Tabelle 47: Median, Mittelwert, SD, RSD, Minimum und Maximum für den Biomarker EtG bezüglich des Beginns und Endes des Entzuges.....	114
Tabelle 48: Median, Mittelwert, SD, RSD, Minimum und Maximum für den Biomarker EtS bezüglich des Beginns und Endes des Entzuges.....	115
Tabelle 49: Median, Mittelwert, SD, RSD, Minimum und Maximum für den Biomarker PEth bezüglich des Beginns und Endes des Entzuges.....	116
Tabelle 50: Zusammenfassung der Parameter Median, Mittelwert, SD, RSD, Minima und Maxima für die einzelnen Kategorien der Lebersteifigkeit bezüglich der Konzentrationsabnahme von PEth.....	117
Tabelle 51: Zusammenfassung der Parameter Median, Mittelwert, SD, RSD, Minima und Maxima für die einzelnen Kategorien der Lebersteifigkeit bezüglich der Konzentrationsabnahme von PEth pro Tag	118

1 Einleitung

Alkohol ist ein Genussmittel, welches sehr eng mit der Geschichte der Menschheit verbunden ist. Was ursprünglich mit dem Verzehr von vergorenen Früchten begann, hat heute in fast allen Ländern weltweit einen festen gesellschaftlichen Stellenwert. Insbesondere in der Bundesrepublik Deutschland (BRD), welche als „Hochkonsumland“ im internationalen Vergleich gelistet wird, ist ein pro Kopf Konsum von 10,5 Litern Reinalkohol im Jahr 2017 zu verzeichnen. (John et al. 2020) Dennoch gehen mit Alkoholkonsum auch negative Folgen einher, die sich besonders im gesundheitlichen und sozialen Sektor abzeichnen. Aufgrund seiner Legalität ist Alkohol die beliebteste missbräuchlich konsumierte Substanz, wodurch schlussendlich direkt und indirekt ein volkswirtschaftlicher Schaden von ca. 57 Milliarden Euro pro Jahr in der BRD entsteht. (Effertz 2020) Daten des statistischen Bundesamtes aus dem Jahr 2017 zeigten einen missbräuchlichen Konsum von Alkohol bei etwa 3,0 Millionen Menschen in Deutschland auf, wobei eine Abhängigkeit bei 1,6 Millionen festgestellt werden konnte. (Atzendorf et al. 2019) Als risikoarmer Konsum gilt bei Frauen eine Aufnahme von bis zu 12 g Reinalkohol, bei Männern beläuft sich die Menge auf 24 g täglich. (Seitz et al. 2008)

In vielen Fällen führt der Konsum von Alkohol zu einer Abhängigkeit, die durch ein simples bio-psycho-soziales Modell beschrieben werden kann. Die Initiierung des Konsums ist oftmals durch die individuelle psychische Verfassung, das soziale Umfeld und die spezifische Wirkungsweise des Alkohols bedingt. Bei Konstellationen entsprechender Parameter kann dies bei einem Individuum zu einem regelmäßigen Alkoholkonsum führen, welcher sich zu einer Sucht entwickeln kann. Der Suchtverlauf ist hierbei hauptsächlich durch neurobiologische Faktoren beeinflusst, da das exzessiver werdende Trinkverhalten, trotz der daraus resultierenden gesundheitlichen sowie sozialen Problemen, aufrechterhalten wird. Schlussendlich ist der Konsum nicht mehr steuerbar und es kommt zu einem Kontrollverlust. (Seitz et al. 2013)

Durch den chronischen Konsum von Alkohol entwickeln sich Folgeerkrankungen, die entsprechend therapiert werden müssen. Hierzu gehören sowohl somatische als auch psychische Beschwerden, die sich im Laufe der Zeit immer mehr manifestieren. Die dritthäufigste Einzeldiagnose für stationäre Krankenhausaufenthalte waren 2017 mit fast 230000 behandelten Patienten „Psychische und Verhaltensstörungen durch Alkohol“ (ICD-

10). (Schelhase 2019) Neben den psychischen Folgen sind die alkoholische Lebererkrankung, Malignomerkrankungen und Pankreatitis die am zahlreichsten auftretenden Beschwerden als Resultat eines chronischen Alkoholkonsums. Die Leber ist hierbei das am häufigsten geschädigte Organ, wobei es zu einer Fettleber, Alkoholhepatitis oder Leberzirrhose kommen kann. (Seitz et al. 2013) Ein Bericht der WHO von 2018 schätzt die weltweite Anzahl der aufgrund von Alkohol induzierten Todesfälle auf etwa 3,0 Millionen im Jahr 2016. (World Health Organisation 2018) Ein unbedachter Alkoholkonsum hat nicht selten gravierende Folgen im Straßenverkehr, da durch die direkten negativen Auswirkungen des Alkohols das Unfallrisiko steigt, was durch einen Bericht des Statistischen Bundesamtes aus dem Jahr 2018 unterstrichen wurde, in dem von 35658 polizeilich erfassten alkoholbedingten Unfällen die Rede war. (Statistisches Bundesamt 2019) Zwischen Alkoholisierung bzw. Blutalkoholkonzentration (BAK) und der Häufigkeit von Unfällen besteht ein direkter Zusammenhang, wobei allein schon ein geringer Alkoholeinfluss das Aufkommen von Unfällen signifikant erhöht (Abbildung 1).

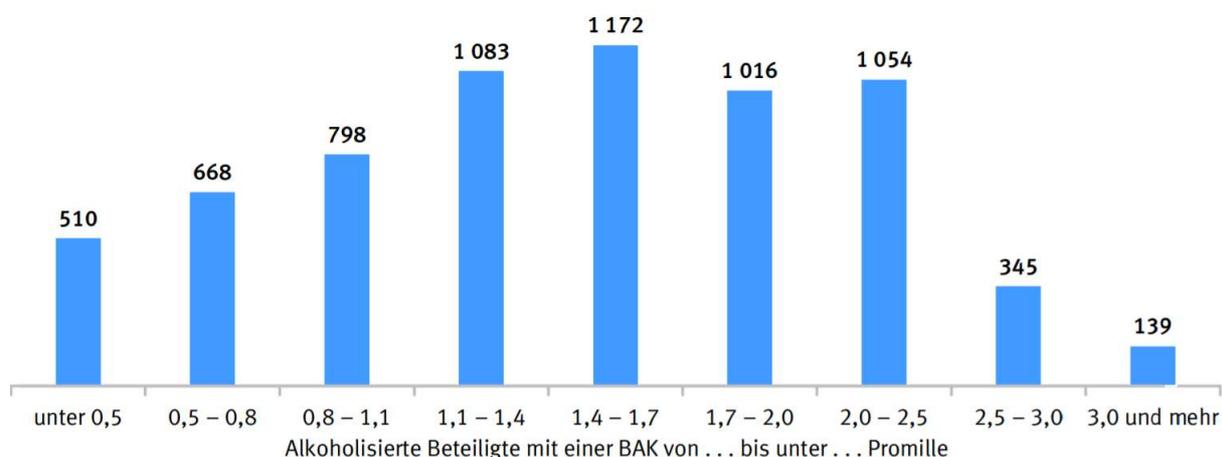


Abbildung 1: Unter Alkoholeinfluss stehende an einem Verkehrsunfall beteiligte Pkw-Fahrer mit Personenschaden aus dem Jahr 2018, Aufschlüsselung nach der BAK (Statistisches Bundesamt 2019)

Bei Unfällen mit Personenschaden kann nicht nur die alkoholisierte Person verletzt worden sein, sondern auch Unbeteiligte Schaden genommen haben. Für das Jahr 2012 existiert eine Übersicht der Straftaten, bei welchen ein besonders hoher Anteil der Beschuldigten unter Alkoholeinfluss stand. Am häufigsten war der Tatbestand „Widerstand gegen die Staatsgewalt“ mit 63,7 % vertreten, gefolgt von dem Vorwurf der „Gewaltkriminalität“ mit 32,1 % (u.a. Totschlag und Tötungen auf Verlangen, Mord, Sachbeschädigung). (Egg 2014)

Diese Zahlen zeigen, dass die Prävalenz von Alkohol in der heutigen Gesellschaft stark ausgeprägt ist und sowohl im klinischen als auch forensisch-toxikologischen Bereich Bedarf für die Messung und Interpretation von Alkoholbefunden besteht. Neben der strafrechtlichen Verfolgung ist auch im Entzugskontext oder in der Abstinenzkontrolle eine analytische Herangehensweise an die Alkoholproblematik erforderlich. Hierbei gestaltet es sich oftmals schwierig die gegebene Fragestellung rein über eine gemessene BAK zu beantworten, da ein länger zurückliegender Konsum nicht mehr erfasst werden kann. Um dieser Problematik zu begegnen, wird auf Abbauprodukte des Alkohols, so genannte Alkoholbiomarker, zurückgegriffen, die in verschiedenen Matrices und über einen deutlich längeren Zeitraum nachgewiesen werden können. (Andresen-Streichert et al. 2018; Cabezas et al. 2016; Wozniak et al. 2019) In Deutschland wird bei forensisch-toxikologischen Fragestellungen hauptsächlich die Konzentration des Metaboliten Ethylglucuronid in Blut, Urin und Haaren untersucht. (Heier et al. 2016; Schmitt et al. 1997) Zur Erhöhung der Sensitivität kann zusätzlich der Metabolit Ethylsulfat in Urin- und Blutproben bestimmt werden, da dieses über einen anderen enzymatischen Stoffwechselweg im Körper gebildet wird. (Wurst et al. 2006) Mit N-Acetyltaurin ist ein weiterer möglicher Biomarker im Gespräch, welcher in Blut sowie Urin nachweisbar ist und bisher nur wenig erforscht wurde. (Luginbühl et al. 2017; Luginbühl et al. 2016) Einer Reihe von Phospholipiden wird besondere Aufmerksamkeit zuteil: die Phosphatidylethanole. Diese Substanzen werden durch die Phospholipase D aus Phosphatidylcholinen mit unterschiedlich langen und gesättigten Fettsäureresten ausschließlich in der Anwesenheit von Ethanol gebildet. (Gnann et al. 2010; Gnann et al. 2009; Varga und Alling 2002)

1.1 Charakteristika des Moleküls Ethanol

Der gewöhnliche Trinkalkohol, Ethanol (EtOH) oder Ethylalkohol genannt, besitzt die Summenformel C_2H_5OH . Es handelt sich um eine klare, würzig riechende Flüssigkeit, die brennend schmeckt, leicht entzündlich und hygroskopisch ist. Das molekulare Gewicht beträgt 46 g/mol und der Siedepunkt liegt bei 78,32 °C. Der Begriff „Alkohol“ umfasst eine größere Stoffgruppe, die sich in der Anzahl ihrer Kohlenstoffatome und oftmals auch der Hydroxylgruppen unterscheidet. Im allgemeinen Sprachgebrauch bezeichnet Alkohol aber den

oben beschriebenen Ethylalkohol. Dieses organische Molekül ist aufgrund der Hydroxylgruppe und dem geringen Kohlenstoffanteil insgesamt als hydrophil zu werten und somit gut mit anderen Flüssigkeiten mischbar. Die Herstellung von Alkohol wird durch die Gärung von zucker- oder stärkehaltigen Grundstoffen unter dem Einsatz von Hefepilzen bewerkstelligt. Hierbei können Getränke produziert werden, die bis zu 15 Vol.-% Alkohol aufweisen. Für die Produktion von höherprozentigen Alkoholika wird auf die Destillation zurückgegriffen. (Dekant und Vamvakas 2017; Gilg 2005)

1.2 Pharmakokinetik von Ethanol

Die Resorption von Ethanol nach einer oralen Aufnahme findet überwiegend im Dünndarm statt, wobei geringere Mengen auch über den Magen und die Schleimhäute aufgenommen werden können. Wie schnell der aufgenommene Alkohol vom Körper resorbiert wird, hängt sowohl von der Fülle des Magen-Darm-Trakts sowie der Art des konsumierten alkoholischen Getränkes ab. Da die Löslichkeit von Ethanol in Wasser sehr hoch ist, verteilt sich dieser schnell in allen Körperflüssigkeiten, wobei maximale Blutalkoholkonzentrationen nach etwa zwei Stunden erreicht werden. Im Unterschied zu anderen Xenobiotika weist Alkohol eine konstante konzentrationsunabhängige Eliminationsgeschwindigkeit auf, wodurch über weite Bereiche ein linearer Abbau der Blutalkoholkonzentration mit einer mittleren stündlichen Abbaurate von 0,15 ‰ angenommen werden kann. Hierdurch kann auf die BAK zu einem gewissen Zeitpunkt, z.B. eines Unfalls, zurückgerechnet werden, wenn die Blutprobe während der postabsorptiven Phase erhoben wurde. Zusätzlich kann der Endpunkt der Elimination einer bekannten Menge Alkohol berechnet werden. Die lineare Eliminationscharakteristik ist auf eine Absättigung der alkoholabbauenden Enzyme zurückzuführen. In der Leber oxidiert die Alkoholdehydrogenase (ADH) Ethanol mit dem Cofaktor Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD) in ihrem katalytischen Zentrum zu Acetaldehyd (Abbildung 2). Über ADH werden etwa 90 % des aufgenommenen Alkohols umgesetzt, wohingegen ca. 6 % über das Cytochrom P450-abhängige Enzymsystem zu Acetaldehyd oxidiert werden. Anschließend erfolgt eine weitere Oxidation des Acetaldehyds zu Essigsäure bzw. Acetat vorwiegend durch die Aldehyddehydrogenase (ALDH) und weniger über die Aldehydoxidase. Schließlich wird Acetyl-CoA gebildet, welches überwiegend für die Biosynthese von Fettsäuren und Triglyceriden

verwendet wird, aber auch in den Citratzyklus eingeschleust werden kann. Über den Citratzyklus entsteht schlussendlich Wasser (H₂O) und Kohlenstoffdioxid (CO₂). (Dekant und Vamvakas 2017; Gilg 2005; Seidel et al. 2019)

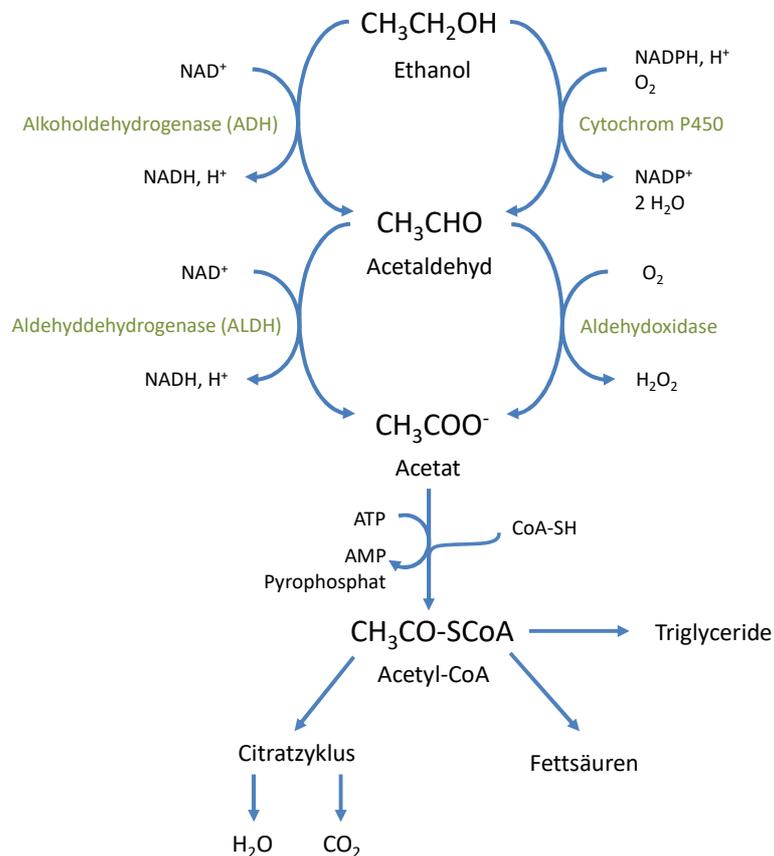


Abbildung 2: Metabolismus des Ethylalkohols in der Leber (Seidel et al. 2019)

Im Falle einer Alkoholabhängigkeit wird Cytochrom P450 induziert, wodurch 80 bis 90 % des Alkohols in Acetaldehyd umgewandelt werden. Der Anteil von Ethanol, der unverändert oder nach einer Konjugation (Glucuronidierung oder Sulfatierung) ausgeschieden wird, beläuft sich auf unter 10 %. (Seidel et al. 2019) Neben diesen Konjugaten gibt es zusätzlich Addukte mit Fettsäuren und Phospholipiden.

Aufgrund der beschriebenen charakteristischen Pharmakokinetik von Ethanol, ist es möglich, die theoretisch zu erwartende Blutalkoholkonzentration (BAK) zu berechnen. Hierbei ist von Bedeutung, dass sich Ethanol nur im wasserhaltigen Anteil des Körpers verteilt, weshalb die so genannte Widmark-Formel, einen Verteilungs- bzw. Reduktionsfaktor (r) beinhaltet. Dieser

ist geschlechts- und konstitutionsabhängig und beträgt im Schnitt für Männer 0,7 (\cong 70 %) und für Frauen 0,6 (\cong 60 %). Im Falle einer Fettleibigkeit fällt dieser geringer aus und hat in Extremfällen eine Spannbreite von 0,5 bis 0,95. Die Widmark-Formel setzt sich wie folgt zusammen:

$$BAK [\text{‰}] = \frac{A}{r \times m}$$

Berechnet wird die zu erwartende BAK in Promille, über den Quotienten der Menge des aufgenommenen Alkohols in g (A) und dem reduzierten Körpergewicht in kg. Dieses berechnet sich aus dem Reduktionsfaktor (r) und dem tatsächlichen Körpergewicht in kg (m). Die aufgenommene Menge Alkohol wird durch die Dichte von Ethanol (0,8 g/mL), dem aufgenommenem Volumen und dem dazugehörigen Vol.-%-Anteil berechnet. (Wehner 2003)

1.3 Pharmakodynamik von Ethanol

Eine eindeutige Aufklärung des molekularen Wirkmechanismus von Ethanol ist bis heute nicht gelungen. Rezeptorgekoppelte Ionenkanäle (GABA_A-, NMDA-, 5HT₃-Rezeptoren und spannungsabhängige Calciumkanäle vom L-Typ), sowie Dopamin-, Opioid- und Adenosin-Rezeptoren zählen zu den Targets des Ethanols. Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass auch Rezeptoren und Signalwege von Glutamat, GABA und Acetylcholin involviert sind. Eine Störung des Gleichgewichts von exzitatorischen und inhibitorischen Impulsen im zentralen Nervensystem kann ebenfalls zur zentralen Wirkung beitragen. Hierbei steht die Interaktion von Ethanol und dem GABA_A-Rezeptor im Verdacht, kognitive Störungen, Gangunsicherheit und Sedierung auszulösen. Außerdem führt die Aufnahme von Alkohol zu einer gesteigerten GABA-Freisetzung, wodurch die neuronale Erregbarkeit vermindert wird. Hierdurch wird u.a. eine anxiolytische Wirkung erzeugt und Spannungszustände reduziert. Weitere gut charakterisierte neuronale Rezeptoren in Bezug auf die Wirkung von Alkohol stellen die α 4 β 2-Nicotin-Rezeptoren dar. Bezüglich der glutamatergen synaptischen Übertragungsvorgänge sind besonders NMDA- und Kainat-Rezeptoren durch die hemmende Wirkung von Ethanol betroffen, wohingegen die AMPA-Rezeptoren nicht beeinflusst werden. Nach einer Hemmung des NMDA-Rezeptors durch Ethanol kann kein Calcium in die Nervenzelle einströmen. Unter alkoholfreien Bedingungen wird der genannte Ionenkanal durch L-Glutamat aktiviert. Bei

akuter Alkoholgabe wird die NMDA-Rezeptor-Aktivität gedrosselt, wodurch die neuronale Erregbarkeit signifikant abnimmt und folglich eine Sedierung begünstigt und die Krampfschwelle erhöht ist. Bei chronischer Alkoholaufnahme nimmt die Anzahl der NMDA-Rezeptoren zu, wobei die Zusammensetzung der Kanalwand bildenden Proteinketten und folglich die pharmakologische Erregbarkeit verändert ist. Die erhöhte Empfindlichkeit steht im Verdacht, die erniedrigte Schwelle für Krampfanfälle während des Entzugs zu verursachen, da die Rezeptoren nicht mehr durch Ethanol blockiert werden. Diese Annahme wurde experimentell sowohl mit *in vitro*- und *in vivo*-Versuchen bekräftigt. Der Neurotransmitter Glutamat wird aus der Präsynapse freigesetzt und trifft auf die vermehrt exprimierte NMDA-Rezeptoren. Hierdurch ist der Einstrom von Calcium in das postsynaptische Effektorneuron nach einer synaptischen Aktivierung erhöht. Bei wiederholten Entzügen kann als extreme Konsequenz der Zelltod eintreten, da durch die erhöhte intraneuronale Calciumkonzentration einige zelluläre Prozesse aktiviert werden, die nicht dem physiologischen Zustand entsprechen. Ein weiterer Rezeptortyp, welcher während eines Entzuges erhöht ist, sind die spannungsabhängigen Calciumkanäle des L-Typs, welche durch eine chronische Alkoholaufnahme vermehrt exprimiert werden. Weitere betroffene Neurotransmitterrezeptoren, die zusätzlich an der Ausprägung und Aufrechterhaltung des süchtigen Verhaltens beteiligt sind, zeigen Bindestellen für z.B. Acetylcholin, Serotonin, Endorphine und Arachidonsäure-Derivate. (Lobo und Harris 2008; Seitz et al. 2013; Wirkner et al. 1999)

Aus dem Konsum von Alkohol resultieren charakteristische Vergiftungssymptome, welche eine starke Dosisabhängigkeit zeigen (Tabelle 1). Dennoch spielt auch eine gewisse Gewöhnung eine Rolle, da die Ausfallerscheinungen bei Alkoholikern erst bei weitaus höheren Dosen und BAKs festzustellen sind. (Dekant und Vamvakas 2017; Huckenbeck und Bonte 2003; Seitz et al. 2013)

Tabelle 1: Alkoholbedingte Ausfallerscheinungen im Zusammenhang mit der entsprechenden BAK [‰] (Dekant und Vamvakas 2017)

BAK [‰]	Ausfallerscheinungen
0,3	erste Gangstörungen
0,4	Vigilätseinschränkung messbar, Gesichtsfeld leicht eingeschränkt
0,5	Blindzielbewegungen gestört (Finger-Finger-Versuch), Romberg-Versuch positiv, Grenze der Fahr- und Verkehrstüchtigkeit
0,6	Reaktionszeit verlängert, leichte Sprachstörungen
0,7	leichter Nystagmus
1,0	mäßiger Rauschzustand
1,4	kräftiger Rausch, Grenze für koordinierte Reaktionen
2,0	Bewusstsein stark eingetrübt, Erinnerungsvermögen aufgehoben
4,0-5,0	tödliche Grenzkonzentration

Die aufgezeigten Ausfallerscheinungen sind dennoch interindividuell zu beurteilen. Hierzu gehören Faktoren wie Gewöhnung, Geschlecht, Gewicht und Füllung des Magens. Weitere Auswirkungen reichen von Übelkeit über Erbrechen, Hyperventilation bis hin zu einer heißen, trockenen Haut, wobei entgegen dem subjektivem Empfinden, die Körpertemperatur sinkt. Hinzu kommt eine verringerte Muskelleistung und ein zwar mäßiger, aber schon bei geringen Mengen Alkohol induzierter Blutdruckanstieg. Bei vielen Konsumenten kann aufgrund einer Vasodilatation eine gerötete Haut festgestellt werden, die oftmals auch von einer gesteigerten Diurese begleitet wird. (Dekant und Vamvakas 2017) Um den Grad der Alkoholisierung besser definieren zu können, kann eine Eingrenzung in verschiedene Stadien des Rausches in Abhängigkeit von den Symptomen vorgenommen werden: leicht, mittelgradig, schwer und atypisch. (Gilg 2005)

1.4 Alkoholmissbrauch und -abhängigkeit

1.4.1 Schädlichkeit des Alkoholkonsums

Aufgrund der hohen Prävalenz und der Legalität lag der pro Kopf Konsum bei den über 15-Jährigen 2017 in Deutschland bei etwa 10,5 Litern Reinalkohol pro Jahr. Damit gehört Deutschland immer noch zu einem Hochkonsumland, obwohl der Alkoholkonsum im Vergleich zu dem Jahr 1970 mit einem Mittelwert von 14,4 Litern Reinalkohol pro Kopf, deutlich

abgesunken ist. (John et al. 2020) Nichtsdestotrotz handelt es sich bei Alkohol um ein Zellgift, welches vor allem durch sein Abbauprodukt Acetaldehyd alle inneren Organe, insbesondere die Leber, schädigt. (Seitz 2019) Der so genannte Alkoholismus ist seit 1968 in Deutschland laut der Reichsversicherungsordnung (RVO) als Krankheit gelistet. (Seitz et al. 2013) Weitere Erkrankungen, die durch den Alkoholkonsum begünstigt werden können, sind Herz-Kreislauf-Krankheiten, wie beispielsweise bluthochdruckbedingte Herzkrankheiten, Kardiomyopathie, Herzinsuffizienz, und einzelne Arten des Schlaganfalls. Ebenfalls erhöht ist das Risiko für diverse Krebserkrankungen, wie z.B. Rachen-, Leber- oder Darmkrebs. Außerdem werden durch einen chronischen Alkoholkonsum Atemwegserkrankungen, neuropsychiatrische Krankheiten, u.a. auch die Alkoholabhängigkeit und einige andere chronische Krankheiten (z.B. Diabetes mellitus) begünstigt. (John et al. 2019; Seitz et al. 2013; Singer und Teysen 2005) Einige Krankheiten können nur auf einen Alkoholkonsum als Auslöser zurückgeführt werden; dazu gehören alkoholbedingte Störungen des Nervensystems, alkoholische Erkrankungen der Leber und Bauchspeicheldrüse sowie das fötale Alkoholsyndrom. Besondere Aufmerksamkeit kommt der Alkoholabhängigkeit entgegen, da insbesondere bei dieser Krankheit psychische, soziale und körperliche Auswirkungen eindeutig zu erkennen sind. Auch die direkten Begleiterscheinungen eines Alkoholkonsums können durch das Verursachen von Verkehrsunfällen und unbeabsichtigte Verletzungen zur Schädigung des Betroffenen oder seiner Umwelt führen. Außerdem führen ein erhöhtes Aggressionspotential und eine eingeschränkte Beurteilungsfähigkeit oftmals zu körperlichen und psychischen Schäden sowohl bei den Konsumenten als auch bei deren sozialen Umfeld. (John et al. 2019) Definiert ist eine Alkoholabhängigkeit als psychiatrische Erkrankung, welche sich durch den häufig dominanten und unausweichlichen Druck äußert, Alkohol zu konsumieren. Zusätzlich steht der Alkoholkonsum im Mittelpunkt des Denkens des Betroffenen, wobei oftmals die Kontrolle über die konsumierte Menge Alkohol eingeschränkt ist. Hierbei handelt es sich um eine psychische Abhängigkeit, die meistens mit einer Toleranzentwicklung und Entzugserscheinungen einhergeht. Liegt ein schädlicher Gebrauch von Alkohol vor, findet sich bei den Betroffenen eine erkennbare physische oder psychische Schädigung, da mit dem Konsum von großen Mengen Alkohol ein positives Glücksgefühl assoziiert wird. Die daraus direkt unter dem Einfluss von Alkohol resultierenden spezifischen Störungsbilder manifestieren sich beispielsweise in einem rauschartigen Zustand, welcher begleitet ist von starker Euphorie, Benommenheit und einer Alkoholintoxikation. Weiterführend kann es zu

einem Alkoholentzugssyndrom, affektiven Störungen, psychotischen Störungen, sexuellen Funktionsstörungen sowie Schlafstörungen kommen. (Seitz et al. 2013; Singer und Teysen 2005) Um einen riskanten Konsum zu beurteilen, wurden geschlechterspezifisch tägliche Obergrenzen für die Aufnahme von Alkohol pro Tag festgelegt, ab welchen die statistische Wahrscheinlichkeit erhöht ist, an einer spezifischen alkoholinduzierten Störung zu erkranken. Bei Frauen liegt diese Grenze bei über 12 g reinen Alkohol und bei Männern bei mehr als 24 g pro Tag. (Seitz et al. 2013)

In Tabelle 2 werden die gesundheitlichen Folgen in Deutschland durch den Konsum von Alkohol dargestellt.

Tabelle 2: Gesundheitliche Folgen durch den Konsum von Alkohol (N = Anzahl) (Seitz et al. 2013)

	Männer	Frauen	Gesamt
Schädlicher Gebrauch (18- bis 64-Jährige) [2006]			
Prozent der Bevölkerung	6,40 %	1,20 %	3,80 %
Hochrechnung, N	1.670.000	300.000	1.980.000
Abhängigkeit (18- bis 64-Jährige) [2006]			
Prozent der Bevölkerung	3,40 %	1,40 %	2,40 %
Hochrechnung, N	890.000	370.000	1.260.000
Stationäre Behandlungen aufgrund psychischer & Verhaltensstörungen durch Alkohol (alle Altersgruppen) [2010]			
Prozent der Bevölkerung	2,80 %	0,90 %	1,80 %
Hochrechnung, N	244.494	88.863	333.357
Stationäre Behandlungen wegen akuter Alkoholintoxikation (alle Altersgruppen) [2010]			
Hochrechnung, N	81.175	34.261	115.436

Im Jahr 2012 berichtete die Deutsche Hauptstelle für Suchtfragen, dass etwa 1,3 Millionen Menschen eine Alkoholabhängigkeit aufweisen und ca. 2,0 Millionen Alkohol missbräuchlich konsumieren. (Bartsch und Merfert-Diete 2013) Bezüglich der mit Alkohol verbundenen Mortalität werden in den meisten Statistiken nur die beiden Erkrankungen Leberzirrhose und Alkoholabhängigkeitssyndrom ausgewertet, da diese direkt auf den Konsum von Alkohol zurückzuführen sind. Die Dunkelziffer für Fälle, bei denen Alkohol in Kombination mit anderen

äußeren Umständen zum Tod geführt hat, werden in diesen Statistiken nicht aufgenommen. (John und Hanke 2002)

1.4.2 Konsumklassen

Die Schädlichkeit von Alkohol ist allgemein bekannt. Für die Ermittlung des individuellen Risikos für jeden Betroffenen wurde eine Kategorisierung in Konsumklassen vorgenommen (Kraus et al. 2009):

- Risikoarmer Konsum: bis 24 g Reinalkohol für Männer, bis 12 g pro Tag für Frauen
- Riskanter Konsum: zwischen 24 und 60 g Reinalkohol pro Tag für Männer, für Frauen 12 bis 40 g
- Gefährlicher Konsum: zwischen 60 und 120 g Reinalkohol pro Tag für Männer, für Frauen 40 und 80 g
- Hochkonsum: über 120 g Reinalkohol pro Tag bei Männern, über 80 g bei Frauen

Zusätzlich wird in dem Suchtsurvey aus dem Jahr 2009 die Kategorisierung „Rauschtrinken“ mit einem Konsum von mindestens fünf Gläsern Alkohol (jeweils etwa 40 g Reinalkohol) zu einer Gelegenheit in den letzten 30 Tagen angeführt. Auf Grundlage des „Alcohol Use Disorders Identification Test“ (AUDIT) wird außerdem ein „problematischer Alkoholkonsum“ aufgeführt. (Pabst et al. 2010) Durch die stetige wissenschaftliche Forschung konnte über die Jahre hinweg gezeigt werden, dass es keinen risikofreien Konsum von Alkohol gibt. Ab einer bestimmten Konzentration Alkohol wird jeder Körperteil in Mitleidenschaft gezogen, wobei für die weibliche Brust schon bei unter zehn Gramm Alkohol pro Tag ein erhöhtes Brustkrebsrisiko zu verzeichnen ist. Eine weitere Kategorie stellt der „moderate Alkoholkonsum“ dar, welcher definiert ist als konsumierte Alkoholmenge, bei welcher die Morbiditäts- und Mortalitätsrate minimal ist. Im Jahr 1997 legte die Weltgesundheitsorganisation (WHO) diesen Wert auf 10 g Reinalkohol pro Tag für Frauen und 30 g für Männer fest. (Seitz et al. 2013)

1.4.3 Lebersteifigkeit

Bei der Lebersteifigkeit handelt es sich um einen neuartigen, nichtinvasiv bestimmbar Parameter zur Beurteilung der Leberkonstitution. Hierbei wird eine Ultraschall-Technik benutzt, welche als FibroScan® bezeichnet wird. Die Ergebnisse werden in vier verschiedene

Klassen eingeteilt, wobei ein Wert unter 6 kPa als normal angesehen wird und nicht davon ausgegangen werden kann, dass eine Erkrankung der Leber vorliegt. Der Bereich zwischen 6 und 8 kPa ist nicht genauer definiert. Ein Wert zwischen 8 und 12,5 kPa legt eine fortgeschrittene Fibrose (F3) nahe und Werte über 12,5 kPa deuten auf eine Leberzirrhose (F4) hin. (Mueller und Sandrin 2010)

1.5 Alkoholbiomarker

Der Begriff „Biomarker“ beschreibt messbare, biologische Parameter, welche dem Gutachter Informationen über physiologische und pathophysiologische Abläufe im Körper und dem Zustand eines Individuums oder einer Population geben. (Strimbu und Tavel 2010) Eine weitere Definition beschreibt Biomarker als Kollektiv aller Substanzen und Stoffwechselprodukte, durch deren Messung zuverlässig auf eine Krankheit geschlossen werden kann oder eine korrekte Aussage über den Status einer Erkrankung gewährleisten. (Kumar und Sarin 2009) Um einen vorangegangenen Alkoholkonsum auch noch über einen längeren Zeitraum nachweisbar zu machen, wird auf so genannte „Alkoholbiomarker“ zurückgegriffen, die auch nach dem kompletten Abbau des Alkohols im Blut in Proben der betroffenen Person zu finden sind. Hierbei sind drei Gruppen zu unterscheiden:

- Trait-Marker
- State-Marker
- Assoziationsmarker

Bei all diesen Markern handelt es sich um biologische Indikatoren des Alkoholkonsums. Charakteristisch für die Trait-Marker ist deren Zeitunabhängigkeit und Vererbbarkeit, da bei einem Nachweis dieser Substanzen eine erhöhte Disposition für gewisse Krankheiten, in diesem Fall der Alkoholabhängigkeit, besteht. Es findet eine gekoppelte Vererbung der Krankheit und der Indikatoren in betroffenen Familien statt. Bezüglich der State-Marker lässt sich eine Abhängigkeit von der Zeit und dem Zustand, in dem sich der Betroffene während seiner Erkrankung befindet, feststellen. Außerdem lassen diese Marker nur einen Rückschluss auf exzessives Trinkverhalten zu und werden deshalb vorwiegend in der Kontrolle von Entzugspatienten genutzt. Die letzte Gruppe stellen die Assoziationsmarker dar, bei denen es

sich um serologische und genetische Merkmale handelt, die bei alkoholkranken Menschen häufiger festzustellen sind als in der gesunden Bevölkerung. (Huckenbeck und Bonte 2003)

Für die klinische Labordiagnostik sind nur die State-Marker geeignet, welche sich wiederum in 2 Untergruppen aufteilen lassen:

- **Direkte Marker:** Diese Biomarker werden durch enzymatische Prozesse aus Ethanol gebildet und enthalten Fragmente mit zwei Kohlenstoffatomen aus dem Alkoholmolekül. Beispiele hierfür sind: Ethylglucuronid, Ethylsulfat, Ethylphosphat, Phosphatidylethanole und Fettsäureethylester (nicht-oxidativ), sowie Acetaldehyd, dessen Addukte und Essigsäure (oxidativ) (Pragst und Yegles 2006)
- **Indirekte Marker:** Bei diesen Markern ist charakteristisch, dass der längerfristige Konsum von Alkohol zu pathologischen Veränderungen in einigen physiologischen Stoffwechselprozessen führt. Hierbei sind besonders die Funktionalität und Struktur von Zellen betroffen und in extremen Fällen können sogar ganze Organe, wie beim Alkohol die Leber, in Mitleidenschaft gezogen sein. Beispiele hierfür sind: Gamma-Glutamyltransferase (GGT), Aspartat-Aminotransferase (AST), Alanin-Aminotransferase (ALT), das *Mean Corpuscular Erythrocyte Volume* (MCV) und das *Carbohydrate-Deficient-Transferrin* (CDT) (Czech und Hartleb 2002)

In der Analytik wurde meist auf das *Carbohydrate-Deficient-Transferrin* (CDT) zurückgegriffen, dessen pathologische Konzentrationsveränderung wie oben beschrieben, besonders häufig bei alkoholkranken Patienten auftritt. Gerade die direkten Marker finden immer mehr den Weg in die Routine-Diagnostik, da sie einige Vorteile mit sich bringen, welche individuell im Folgenden noch genauer beleuchtet werden. Insbesondere die gebildeten Metabolite des Ethanols im oxidativen Abbaumechanismus (Phase-I-Metabolismus) und dessen Konjugate sowie Addukte (Phase-II-Metabolismus) zeigen großes Potenzial für die forensisch-toxikologische Analytik (Abbildung 3).

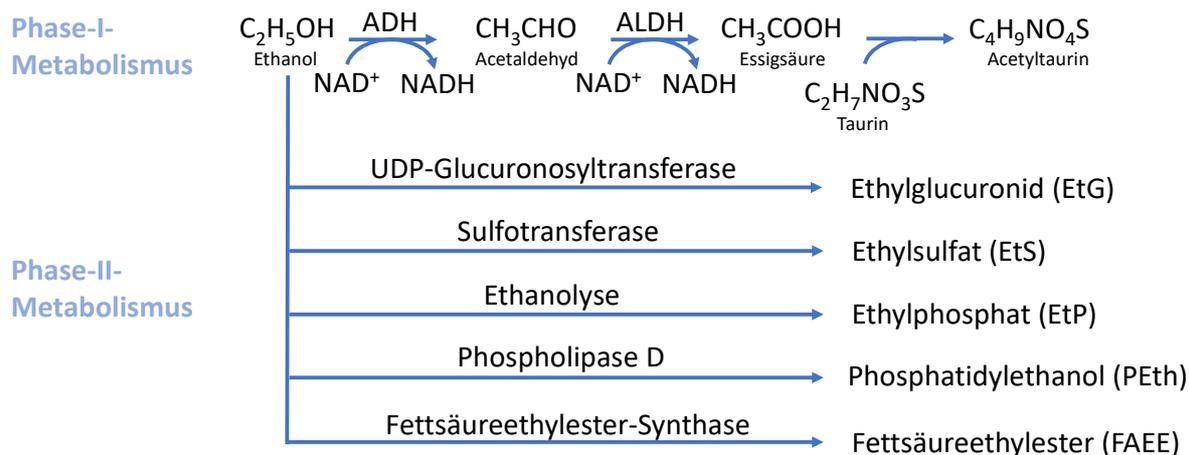


Abbildung 3: Metaboliten nach der Aufnahme von Ethanol

Die in dieser Arbeit untersuchten direkten Biomarker (Ethylglucuronid, Ethylsulfat, N-Acetyltaurin und 16:0/18:1 Phosphatidylethanol) werden im Folgenden genauer charakterisiert.

1.5.1 Ethylglucuronid

Ethyl-β-D-glucuronid, oder vereinfacht Ethylglucuronid (EtG) (Abbildung 4), wurde 1995 erstmals von Schmitt et al. beschrieben und ist heute der häufigste genutzte Alkoholbiomarker in der Abstinenzkontrolle. (Palmer 2009; Schmitt et al. 1995; Walsham und Sherwood 2012) Nur ein sehr geringer Prozentsatz von etwa 0,6 – 1,5 % des aufgenommenen Alkohols wird in dieser Art verstoffwechselt, wobei einige Wissenschaftler von einem noch kleineren Anteil ausgehen (< 0,1 %, oder sogar nur 0,02 – 0,06 %). (Czech und Hartleb 2002; Kugelberg und Jones 2007)

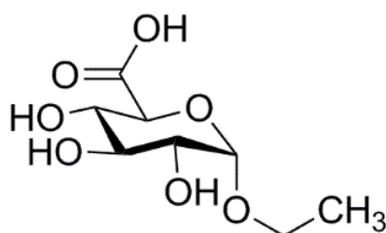


Abbildung 4: Strukturformel von Ethylglucuronid

Auch wenn für den Abbau von Ethanol hauptsächlich der oxidative Abbau zu Acetat stattfindet, wird ein geringer Anteil im Phase-II-Metabolismus verstoffwechselt, aus welchem beispielsweise Ethylglucuronid gebildet wird. EtG ist in verschiedenen Matrices wie Urin, Blut und Haaren nachweisbar und wird nur nach der Aufnahme von Alkohol im Körper gebildet, ist also nicht endogen vorhanden. Die Bildung des direkten Metaboliten von Ethanol findet in der Leber statt und wird durch die UDP-Glucuronosyltransferase katalysiert. Diese ist mitochondrial-membrangebunden und konjugiert Ethanol im Phase-II-Metabolismus enzymatisch an Glucuronsäure. (Foti und Fisher 2005; Walsham und Sherwood 2012) Nach der Bildung wird EtG von der Leber über das Blut in die Nieren transportiert und mit dem Urin ausgeschieden (ca. 0,04 % der aufgenommenen Alkoholmenge). (Goll et al. 2002) Nach dem Konsum von Alkohol finden sich die maximalen Konzentrationen von EtG etwa nach vier Stunden im Blut. (Halter et al. 2008; Hoiseth et al. 2007a; Schmitt et al. 1997) Dennoch variieren die Konzentrationen interindividuell und es besteht keine Korrelation zwischen der BAK und der Kinetik von EtG, welche einen Rückschluss auf die konsumierte Alkoholmenge oder den Alkoholisierungsgrad zu einem bestimmten Zeitpunkt zulassen würde. (Halter et al. 2008) In verschiedenen Studien wurde die mittlere Halbwertszeit von EtG im Blut bestimmt, welche zwischen zwei und vier Stunden angegeben wurde. (Droenner et al. 2002; Hoiseth et al. 2007a; Hoiseth et al. 2009a) Da sich EtG hauptsächlich im wässrigen Anteil des Blutes befindet fallen in Vollblut gemessene EtG-Konzentrationen etwa 40% geringer aus als in Serum. (Hoiseth et al. 2009b) Um die breitere Datenbasis von EtG-Konzentrationen in Serum bei der Bewertung von EtG-Messwerten im Vollblut zu berücksichtigen, kann daher eine Umrechnung auf die Serum-Konzentration mittels des postulierten Serum-Vollblut-Faktors von 1,69 erfolgen. Hierbei sollte ebenfalls beachtet werden, dass es in seltenen Fällen zu falsch-negativen Ergebnissen kommen könnte, welche jedoch durch die Etablierung eines zur individuellen Fragestellung passenden Grenzwertes vermieden werden können. Ein Nachweis von EtG im Urin ist bei Konsum größerer Alkoholmengen zwischen 72 und 90 h nach der Alkoholaufnahme möglich. (Walsham und Sherwood 2012) In einer Studie aus dem Jahr 2004 konnten Parameter aufgezeigt werden, welche einen Einfluss auf die EtG-Konzentration im Urin haben: Alter, Geschlecht, Cannabis-Konsum, die gesamt aufgenommene Alkoholmenge im vorherigen Monat und Erkrankungen der Nieren. Einige Parameter zeigten keine Korrelation mit der EtG-Konzentration: Ethnie, Tabakkonsum, Body Mass Index, absoluter Körperwasseranteil, Leberzirrhose und der Beginn eines regelmäßigen Alkoholkonsums.

(Wurst et al. 2004) Bei Urin handelt es sich zwar um eine nichtinvasiv gewonnene Probe, jedoch können die Ergebnisse durch die Aufnahme von erhöhten Mengen Flüssigkeit verfälscht werden. Um diese Problematik zu umgehen, wird empfohlen, das Verhältnis von EtG zu Kreatinin zu verwenden. (Dahl et al. 2002; Goll et al. 2002) EtG in Urin zeigt bei Raumtemperatur eine hohe Stabilität, was die Anwendung als Biomarker in der forensisch-toxikologischen Analytik zusätzlich bekräftigt. (Schloegl et al. 2006a) Einige Studien setzen sich mit dem Zeitfenster für einen Nachweis von EtG in gesunden Probandengruppen auseinander. Hierbei wurde eine individuelle Alkoholmenge zwischen 0,1 – 0,85 g/kg Körpergewicht konsumiert, wobei ein Nachweis von EtG noch zwischen 24 und 48 h möglich war. (Dahl et al. 2002; Halter et al. 2008; Hoiseth et al. 2007a; Wojcik und Hawthorne 2007) In einer Studie wurde die Alkoholdosis mit über 1 g/kg noch höher gesetzt, wodurch sich das Nachweisfenster auf 39 bis 102 h ausdehnen ließ. (Borucki et al. 2005) Trotz der vielen Vorteile die EtG als Abstinenzmarker mit sich bringt, gibt es dennoch Störanfälligkeiten, die zu einem falsch-positiven oder falsch-negativen Ergebnis führen können. Die größte Problematik stellen hierbei bakterielle Verunreinigungen in Urinproben dar, da durch die bakterielle Hydrolyse, z.B. von *Escherichia coli* und *Clostridium sordelli*, der Biomarker abgebaut wird. (Helander und Dahl 2005) Da Infektionen des Harntraktes mit *E. coli* relativ häufig diagnostiziert werden, sollte die zusätzliche Analyse eines anderen direkten Biomarkers, wie z.B. Ethylsulfat (EtS), der keine signifikante Anfälligkeit für den bakteriellen Abbau zeigt, erfolgen. (Helander und Dahl 2005) Weitere Studien sehen einen jeweils exzessiven Gebrauch von alkoholhaltigen Mundwässern (Costantino et al. 2006; Hoiseth et al. 2010b; Reisfield et al. 2011b), Desinfektionsmittel (Reisfield et al. 2011a) und „alkoholfreien“ Getränken (Musshoff et al. 2010; Thierauf et al. 2010) als kritisch, da in den angewendeten Studiendesigns einige der erhobenen Urinproben positiv auf EtG getestet wurden. Nach dem europäischen Lebensmittelrecht (Verordnung Nr. 1169/2011) werden Getränke mit maximal 0,5-Vol.% Ethanol als „alkoholfrei“ bezeichnet und Getränke mit 0,0 Vol.-% Alkohol mit dem Vermerk „ohne Alkohol“ versehen. (Europäisches Parlament und europäischer Rat 2018) Musshoff et al. haben die Bildung von EtG nach dem Konsum von Sauerkraut und gereiften Bananen untersucht, wobei ebenfalls positive Befunde verzeichnet wurden. (Musshoff et al. 2010) Analytisch wird beim Nachweis von EtG bevorzugt auf die Technik der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit massenspektrometrischer Detektion (LC-MS) zurückgegriffen. (Walsham und Sherwood 2012) Um eine noch hochwertigere Analytik zu

ermöglichen, kann die Detektion mit einem Tandem-Massenspektrometer (MS/MS) durchgeführt werden. Bei dieser Technik kann neben dem *Selected Ion Monitoring* (SIM) auch der *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) Modus genutzt werden. (Walsham und Sherwood 2012) Diese Techniken werden im Teil der instrumentellen Analytik noch einmal genauer charakterisiert.

Der Nachweis von EtG wird zur Beantwortung von einigen verschiedenen Fragestellungen herangezogen. Im Folgenden sind diverse Beispiele aufgeführt: Überwachung der Abstinenz im Entzugskontext (Dahl et al. 2011a; Dahl et al. 2011b; Junghanns et al. 2009; Wurst et al. 1999), Überwachung der Abstinenz im Strafvollzug und der Bewährungszeit (Thierauf-Emberger et al. 2016), Bewilligung einer Lebertransplantation bzw. der Kontrolle von bereits transplantierten Patienten mit einer vorangegangenen alkoholischen Lebererkrankung (Andresen-Streichert et al. 2015; Erim et al. 2007; Staufer et al. 2011; Webzell et al. 2011), Bewertung des Trinkverhaltens während der Schwangerschaft und daraus resultierenden Spätfolgen für das ungeborene Kind über postnatale Analysen (u.a. in Kombination mit Fettsäureethylestern) (Bakdash et al. 2010; Morini et al. 2010; Pichini et al. 2009) und die Kontrolle des Alkoholkonsums während der Schwangerschaft. (Wurst et al. 2008) Im Falle der Leichentoxikologie stellt sich oftmals die Frage, ob eine gemessene EtOH-Konzentration durch postmortale Prozesse und/oder mikrobiologische Aktivität gebildet wurde, oder ob der/die Verstorbene zum Todeszeitpunkt alkoholisiert gewesen ist. Hierbei kann die Bestimmung von EtG hilfreich sein, da dieses nicht postmortal gebildet wird und für die Beurteilung der Blutalkoholbestimmung herangezogen werden kann. (Hegstad et al. 2017; Hoiseth et al. 2010a; Hoiseth et al. 2007b; O'Neal und Poklis 1996) Durch die variablen Anwendungsbereiche, dem Nachweis in verschiedenen Matrices und die hohe Sensitivität und Selektivität hat sich EtG in den letzten Jahren zu einem etablierten Parameter in der forensischen Toxikologie entwickelt. Der verlässliche Nachweis auch eines exzessiveren, einmaligen Trinkgeschehens, das Zeitfenster für einen Nachweis von etwa 48 bis 72 h im Urin und die nichtinvasive Gewinnung von Proben sind nur einige Vorteile gegenüber der direkten Messung von Ethanol oder CDT und GGT im Blut.

1.5.2 Ethylsulfat

Ethylsulfat (EtS) (Abbildung 5) zählt wie Ethylglucuronid zu den direkten Biomarkern, welche im Phase-II-Metabolismus gebildet werden.

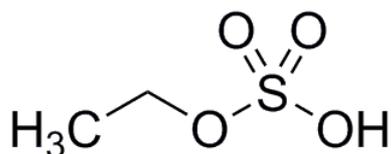


Abbildung 5: Strukturformel von Ethylsulfat

Erstmals wurde diese Substanz im Jahr 1959 im Urin von Ratten nachgewiesen, welche Alkohol ausgesetzt waren. Etwa 0,1 % des aufgenommenen Alkohols bildet Konjugate mit Sulfaten, wobei diese Reaktion von einer Superfamilie cytosolischer Sulfotransferasen (SULT) katalysiert wird. (Helander und Beck 2005; Maenhout et al. 2013; Vestermark und Boström 1959) Bei dieser Art von Enzymen existieren genetische Polymorphismen, welche zu interindividuellen Schwankungen in deren Aktivität führen. Hierdurch wird eine Rückrechnung auf die konsumierte Menge Alkohol auf der Grundlage der gemessenen EtS-Konzentration stark erschwert. (Carlini et al. 2001) Ähnlich wie bei EtG wird nur ein extrem kleiner Anteil von 0,010 bis 0,016 % des aufgenommenen Ethanols als EtS mit dem Urin ausgeschieden. Dennoch sind der analytische Nachweis und eine Quantifizierung auch mit dieser Menge möglich. (Wurst et al. 2006) Aufgrund der Pharmakokinetik von EtS zeigt sich dieser Biomarker etwa 45 Minuten nach einem Alkoholkonsum erstmals im Blut, nach etwa zwei bis drei Stunden mit maximalen Konzentrationen, und nach vier bis sechs Stunden mit einer maximalen Konzentration im Urin. (Halter et al. 2008) Das Zeitfenster für einen Nachweis ist immer abhängig von der aufgenommenen Alkoholmenge, wobei dieses im Blut für etwa 10 bis 14 h und im Urin zwei bis vier Tage gegeben ist. Damit sind die Zeitfenster von EtS und EtG nahezu deckungsgleich, obwohl beide in unterschiedlichen physiologischen Prozessen gebildet werden. Der größte Teil des gebildeten EtS wird in den ersten 12 h über den Urin ausgeschieden, wodurch nach 24 h fast 99 % verschwunden sind. Dieser Abbau erfolgt über eine enzymatische Spaltung durch eine Sulfatase, wodurch sich Probleme bei dem Nachweis eines Alkoholkonsums ergeben. (Halter et al. 2008; Helander und Beck 2004; Wurst et al. 2006) In verschiedenen Trinkstudien konnte gezeigt werden, dass bei einigen Probanden interindividuelle Unterschiede bei der Bildung und Ausscheidung von EtS und EtG auftreten. Bei diesen war gegen Ende der Studie jeweils nur einer der beiden Biomarker nachweisbar, weshalb es sinnvoll ist, beide Substanzen zu bestimmen und zusammen zu interpretieren. (Dresen et al. 2004; Helander und Beck 2005; Wurst et al. 2006) Durch die sehr ähnlichen Charakteristika

von EtS und EtG, sind diese derzeit in der forensischen-toxikologischen Analytik die sensitivsten Kurzzeitmarker für einen Alkoholkonsum. Die hohe Sensitivität ist dennoch abhängig von einigen Parametern, wie dem festgelegten Grenzwert der angewendeten Methode, der konsumierten Alkoholmenge und dem Zeitfenster zwischen Konsum und Probennahme. (Albermann et al. 2012; Jatlow et al. 2014; Staufer et al. 2011) Im Serum vermessene EtS-Konzentrationen fallen etwa um den Faktor 1,30 höher aus als im Vollblut, da sich EtS aufgrund seiner Hydrophilie hauptsächlich im wässrigen Anteil des Blutes befindet. (Hoiseh et al. 2009b) Aufgrund der nichtinvasiven Gewinnung und der längeren Nachweisbarkeit, wird EtS meist im Urin und nicht im Serum oder Vollblut bestimmt. Insbesondere Messungen in Serum werden meist zu Forschungszwecken durchgeführt, bei welchen jedoch der zuvor genannte Serum-Vollblut-Faktor mit einbezogen werden sollte, handelt es sich bei der gewählten Matrix um Vollblut. Gerade bei Fragestellungen dieser Art ist es von großer Bedeutung, einen adäquaten Grenzwert zu wählen, um falsch-negative Befunde aufgrund der unterschiedlichen Verteilung in Serum und Vollblut zu vermeiden. Bei der Analytik von Urin kann es ebenso zu falsch-negativen Ergebnissen kommen, da der Urin durch ein erhöhtes Trinkvolumen des Probanden verdünnt und somit das Ergebnis der Bestimmung verfälscht wird. Auch bei dem Nachweis von EtS wird empfohlen, die Konzentration des im Urin enthaltenen Kreatinin miteinzubeziehen. Dies könnte entweder durch die Normierung auf einen vorgegebenen Kreatinin-Wert oder durch die Festlegung eines minimalen Grenzwertes für die Kreatinin-Konzentration erfolgen. (Dahl et al. 2002; Goll et al. 2002) Trotz der hohen Sensitivität gibt es bei EtS und auch bei EtG einen bedeutenden Nachteil, der im vorherigen Kapitel bereits erwähnt wurde: Durch die alleinige Bestimmung von EtS und EtG ist es nicht möglich zwischen einem exzessiven, weiter zurückliegenden Konsum und einem geringen, kürzlich erfolgten Konsum zu differenzieren. Eine weitere bereits angesprochene Problematik stellen alkoholhaltige Mundwässer und Desinfektionsmittel dar, da es hierbei zu einer ungewollten und oft auch unbewussten Aufnahme von Alkohol kommen kann, was insbesondere bei einer Exposition wenige Stunden vor der Probennahme zu einem positiven Ergebnis führen kann. Auch hierbei ist keine Unterscheidung zwischen einem gewollten Konsum und einer zufälligen Aufnahme möglich. (Reisfield et al. 2011a; Reisfield et al. 2011b) Nachdem eine Deklarationspflicht für alkoholische Getränke erst ab einer Konzentration von 0,5 Vol.-% Ethanol besteht, kann auch ein erhöhter Konsum von „alkoholfreiem“ Bier zu einer Bildung von EtS führen. Weiterhin

kann auch der Verzehr von Lebensmitteln wie Sauerkraut oder sehr reifen Bananen die Ergebnisse verfälschen. (Musshoff et al. 2010; Thierauf et al. 2010) Ein bedeutender Vorteil von EtS gegenüber EtG ist, dass EtS bei einer Infektion des Harntraktes nicht zu falsch-negativen Ergebnissen führt, da kein bakterieller Abbau des Analyten stattfindet. (Helander und Dahl 2005) Unter anderem von Hoiseth et al. konnte aufgezeigt werden, dass die Bestimmung von EtS auch im Kontext einer postmortalen Analyse Vorteile bringt, da der Analyt insgesamt weniger anfällig für verschiedene mikrobielle Auf- oder Abbaumechanismen ist. (Baranowski et al. 2008; Helander und Dahl 2005; Helander et al. 2007; Hoiseth et al. 2010a) Abschließend ist festzuhalten, dass EtS genauso wie EtG, als Kurzzeitmarker anwendbar ist, wobei die Sensitivität der angewandten Methode deutlich steigt, wenn beide Biomarker zusammen bestimmt werden.

1.5.3 N-Acetyltaurin

Bei N-Acetyltaurin (NAcT) handelt es sich um einen neueren Alkoholbiomarker, der erst seit ein paar Jahren im Gespräch für die Verwendung in der Abstinenzkontrolle ist. Dieses Molekül (Abbildung 6) ist ein endogenes Stoffwechselprodukt, welches in seiner Konzentration durch den Konsum von Alkohol erhöht sein kann. Auch diese Substanz ist ein direkter Alkoholbiomarker und wird im oxidativen Mechanismus des Alkoholabbaus gebildet.

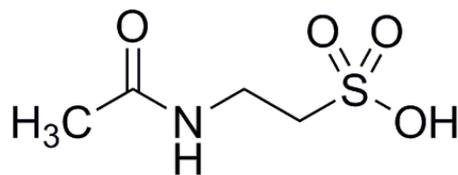


Abbildung 6: Strukturformel von N-Acetyltaurin

Der Zusammenhang einer erhöhten Bildung von NAcT und dem Konsum von Alkohol wurde erstmals 2012 von Shi et al. beschrieben, da die Substanz in dem Urin von Mäusen nach deren Exposition mit Alkohol in einer erhöhten Konzentration nachweisbar war. Die Bildung dieses endogenen Stoffwechselproduktes erfolgt durch die Acetylierung von Taurin mit den Substraten Acetyl-CoA oder Acetat (Shi et al. 2012), die beide in direkten Zusammenhang mit der Metabolisierung von Ethanol im menschlichen Körper stehen. (Cederbaum 2012) Taurin - eine nichtproteinogene Aminosäure - ist der breiten Öffentlichkeit meist besser bekannt als

Inhaltsstoff von Energydrinks. (Birdsall 1998) Diese β -Aminosulfonsäure hat vielfältige physiologische Funktionen, insbesondere im zentralen Nervensystem, wie z.B. die Regulierung des Zellvolumens und der Bildung von Gallensalzen. Obwohl Taurin eine der häufigsten Aminosäuren im Körper ist und sie nicht zu den essentiellen Aminosäuren zählt, hat sie Einfluss auf die Zellentwicklung, die Ernährung und das Überleben. Bei einem Taurin-Mangel können schwere pathologische Erkrankungen auftreten, wie beispielsweise der Verlust von retinalen Photorezeptoren, eine renale Dysfunktion, Pankreas- β -Zell-Dysfunktion und Kardiomyopathie. (Huxtable et al. 1987; Ripps und Shen 2012) Durch die Aufnahme von Alkohol ist die Umsetzung von Taurin mit den durch den Konsum vermehrt auftretenden Substraten Acetat und Acetyl-CoA begünstigt und die Konzentration von NAcT folglich erhöht. Dennoch ist NAcT auch ohne Alkoholkonsum im Urin und Blut nachweisbar, was die Analytik erschwert. Dies ist damit zu erklären, dass alle Edukte für die Bildung von NAcT auch ohne Alkoholkonsum im Körper vorhanden sind und die Bildung so endogen möglich ist. (Luginbühl et al. 2017; Luginbühl et al. 2016; Shi et al. 2012) Insbesondere bei der Ausübung von Ausdauersport ist ein erhöhter NAcT-Spiegel in Blut und Urin nachweisbar. Dies ist auf den ketogenen Status zurückzuführen, welcher durch exzessiven Ausdauersport im menschlichen Körper erreicht wird. Hierbei wird Acetat gebildet, welches die Bildung von NAcT unterstützt. (Miyazaki et al. 2015) Die Studienlage zu NAcT als direkter Alkoholbiomarker ist mit zwei Trinkversuchen inklusive der zusätzlichen Messung von authentischen Proben aus forensischen Fällen und einer Vorarbeit zu der Substanz im Allgemeinen sehr begrenzt. (Jokiel und Skopp 2015; Luginbühl et al. 2017; Luginbühl et al. 2016) Für eine Anwendung von NAcT als Alkoholbiomarker muss zunächst ein physiologischer Grundwert für die Matrices Urin und Blut gefunden werden, um endogene Konzentrationen von erhöhten Konzentrationen klar abgrenzen zu können. Hierbei spielen vor allem die Matrixeffekte eine übergeordnete Rolle, da durch interindividuelle Schwankungen aufgrund des endogenen Charakters des Moleküls Probleme in der Analytik und anschließenden Beurteilung auftreten könnten.

1.5.4 Phosphatidylethanole

Bei den Phosphatidylethanolan (PEth) handelt es sich um eine Gruppe von anormalen Phospholipiden in der Zellmembran (Grundstruktur siehe Abbildung 7), welche ausschließlich nach dem Konsum von Ethanol gebildet werden. (Alling et al. 1983) Diese Reaktion wird durch die Phospholipase D (PLD) katalysiert, welche normalerweise die Hydrolyse von

Phosphatidylcholin zu Phosphatidsäure gewährleistet. Die Affinität der PLD zu kurzkettigen Alkoholen ist jedoch 100- bis 1000-mal höher als zum eigentlichen Substrat Wasser. In der Anwesenheit von Ethanol findet eine Transphosphatidierungsreaktion statt, wobei PEth gebildet werden. (Gustavsson 1995; Gustavsson und Alling 1987; Gustavsson et al. 1991; Kobayashi und Kanfer 1987; Mueller et al. 1988) Die Bildung von PEth wird durch die Isoformen des Enzyms PLD1 und PLD2 katalysiert und findet u.a. in den Zellmembranen von Erythrozyten, Granulozyten und dem Leber- sowie Gehirngewebe statt. (Colley et al. 1997; Gustavsson 1995; Lundqvist et al. 1994; Magai und Shukla 2001; Shukla et al. 2001; Steed et al. 1998; Vinggaard und Hansen 1993) Auch *in vitro* konnte die Bildung von PEth in Vollblut nachgewiesen werden. Hierzu wurden verschiedene Ethanolkonzentrationen in Vollblut über 24 h inkubiert, wobei in Abhängigkeit zur Alkoholkonzentration PEth gebildet wurden. (Aradottir et al. 2004a) Wie anfangs schon erwähnt, ist PEth eine Gruppe von Phospholipid-Homologen, welche ein gemeinsames Phosphoethanol-Fragment besitzen, an welchem ein Glycerol mit zwei längeren Fettsäure-Seitenketten in Position *sn-1* und *sn-2* konjugiert ist. Durch diese können die einzelnen Homologe untereinander unterschieden werden, da sie zwischen 14 und 22 Kohlenstoffatome besitzen und einen spezifischen Sättigungsgrad (0 – 6 Doppelbindungen) aufweisen. (Gnann et al. 2010; Helander und Zheng 2009; Holbrook et al. 1992; Maenhout et al. 2013; Morrill et al. 2000)

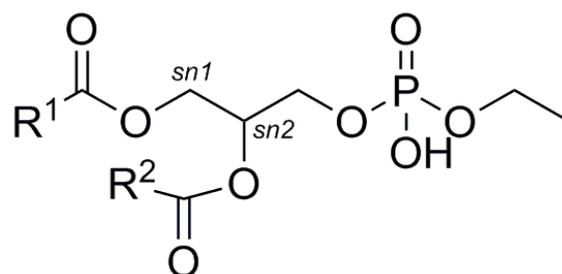


Abbildung 7: Strukturformel des Grundgerüsts der PEth-Homologe. R¹ und R² stehen stellvertretend für die charakteristischen Fettsäurereste

Die Schreibweise zur Darstellung der einzelnen Homologe wird wie folgt vorgenommen: PEth A:B/C:D. Die Buchstaben A und C geben die Anzahl der Kohlenstoffatome in den Seitenketten an der *sn1*- und *sn2*-Position an, wohingegen B und D die Anzahl der Doppelbindungen beschreiben. (Isaksson et al. 2011) In Tabelle 3 sind die häufigsten Homologe aufgezeigt.

Tabelle 3: Die häufigsten PEth-Homologe und deren prozentualer Anteil am gesamten PEth-Vorkommen (Helander und Zheng 2009; Wozniak et al. 2019)

Fettsäurereste [sn1-/sn2-Position]	Anteil PEth gesamt [%]
16:0/18:1	37
16:0/18:2	25
16:0/24:0	13
18:1/18:1 und 18:0/18:2	12
16:0/20:3 und 18:1/18:2	8

In Studien mit starken Alkoholikern wurden die 16:0/18:1- und 16:0/18:2-Homologe als die beiden häufigsten Moleküle nachgewiesen. (Helander und Zheng 2009; Nalesso et al. 2011) Eine interindividuelle Schwankung in den Anteilen der Homologen kann durch die Ernährung bedingt sein. Aber auch Faktoren wie genetische Disposition, Trinkverhalten und metabolische Krankheiten stehen im Verdacht einen Einfluss auf die individuellen Verhältnisse zu haben. (Viel et al. 2012) Nachdem das 16:0/18:1-Homolog das häufigste ist, wird in aktuellen Analysen und Studien insbesondere auf dieses zurückgegriffen. (Helander und Zheng 2009; Kechagias et al. 2015)

Auch in dieser Arbeit wurde dieses Homolog verwendet, weshalb im Folgenden das Kürzel „PEth“ mit dem 16:0/18:1 Phosphatidylethanol gleichzusetzen ist.

Für die Analytik von PEth wird Vollblut verwendet, da der Analyt in der Lipidmembran der Erythrozyten lokalisiert ist. Durch vorhandenes Ethanol in der Probe kann über die PLD weiterhin PEth *in vitro* gebildet werden, weshalb die Lagerung der Probe bei -80 °C erfolgen sollte. (Aradottir et al. 2004a; Isaksson et al. 2011; Varga und Alling 2002) Neben einer Studie von Aradottir et al. in der Ethanol dem Blut künstlich zugesetzt wurde, ist die Datenlage zur *in vitro* Bildung von PEth, insbesondere in diversem authentischem Material, bei Temperaturen von -20 °C und -80 °C insgesamt gering und zeigt unterschiedliche Resultate. (Aradottir et al. 2004a; Lakso et al. 2019; Liu et al. 2018) Bei einer abschließenden Beurteilung sollten daher die Probenlagerung und eine mögliche Verfälschung durch vorhandenes Ethanol immer kritisch hinterfragt und berücksichtigt werden. Eine weitere Möglichkeit zur Vorbeugung von Fehlern bei der Beurteilung ist der Einbezug von anderen Alkoholbiomarkern wie EtG oder EtS, welche keine *in vitro* Veränderungen z.B. in postmortalem Material bei tiefen Lagerungstemperaturen, zeigen. (Liu et al. 2018)

PEth akkumuliert in den Erythrozyten, da der Biomarker dort aufgrund des Fehlens der Phosphocholinphospholipase nicht abgebaut wird. (Aradottir et al. 2004a; Lopez-Cruzan et al. 2018) Eine neuere und sehr vielversprechende Methodik für den Nachweis von PEth ist die *Dried Blood Spot*-Technik. Hierbei wird ein definiertes Volumen auf speziell dafür gefertigte Papierkarten aufgetragen, getrocknet und anschließend entsprechend aufgearbeitet. (Faller et al. 2011; Kummer et al. 2016; van Nguyen und Fitzpatrick 2019) In der aktuellen Forschung zu *Dried Blood Spots* ist eine zusätzliche Bestimmung des Hämatokrit-Wertes im Gespräch, da sich die Anzahl der Erythrozyten in einer Probe auf die PEth-Konzentration auswirken kann, wenn z.B. die Verteilung der Blutprobe auf dem verwendeten Filterpapier inhomogen ist. Eine solche Bestimmung wird in Vollblut aufgrund einer volumetrischen Methodik nicht angewendet. (Aboutara et al. 2021; Kummer et al. 2016; Luginbühl et al. 2021; Marques et al. 2011) In Trinkstudien konnte PEth schon nach 30 Minuten nachgewiesen werden, wobei die höchsten Werte nach etwa 90 bis 120 Minuten erkennbar waren. (Heier et al. 2016) Anwendung findet PEth beispielsweise in der Abstinenzkontrolle, da auch einmalige Alkoholaufnahmen über einen längeren Zeitraum nachgewiesen werden können. Weitere Anwendungsbeispiele sind die Überwachung eines aktuellen Konsums oder die Entzugskontrolle von Alkoholabhängigen. Hierbei ist die Aussagekraft gegenüber dem indirekten Marker CDT etwas erhöht. Lediglich die Analyse von EtG in Haaren deckt einen längeren Zeitraum für die Abstinenzkontrolle bzw. eine grobe Beurteilung des Trinkverhaltens ab. Eine Änderung des Trinkverhaltens soll besser über die Bestimmung von PEth in mehreren Blutproben über einen längeren Zeitraum als durch die Bestimmung von EtG in der Haaranalytik festgestellt werden. (Andresen-Streichert et al. 2017; Andresen-Streichert et al. 2018; Kummer et al. 2016) Hierüber ermöglicht der Nachweis von PEth eine Unterscheidung zwischen einer geringen Alkoholaufnahme und dem Konsum von über 60 g Ethanol, wodurch Patienten mit einem Alkoholproblem („gefährlicher Konsum“) einfacher identifiziert werden können. (Viel et al. 2012) In Schweden (Grenzwert: 35 ng/mL) und Belgien (Grenzwert: 20 ng/mL) wird PEth trotz der anspruchsvollen Analytik schon im Bereich der Abstinenzkontrolle routinemäßig quantifiziert. Auch in Deutschland wird seit einigen Jahren über die Einführung eines analytischen Nachweises und Festlegung eines Grenzwertes („Cut-Off“) für die PEth-Bestimmung diskutiert. (Dumitrascu et al. 2021; Van Uytfanghe et al. 2021) Aus einer Studie von Helander und Hansson wurde mit einer Detektionsgrenze von 35 ng/mL ein moderater Alkoholkonsum für eine Spanne von 35 bis 210 ng/mL festgelegt. Ab einem Wert > 210 ng/mL

wird ein exzessiver Alkoholkonsum angenommen. (Helander und Hansson 2013) Gerade wegen den vielfältigen Einsatzmöglichkeiten des Biomarkers ist eine Etablierung in die in Deutschland angewendeten Chemisch-Toxikologischen Untersuchungskriterien (CTU-Kriterien), welche im Bereich der Beurteilung der Fahreignung angewendet werden, äußerst wünschenswert.

1.6 Matrices für den Nachweis von direkten Alkoholbiomarkern - State of the art

Jeder der einzelnen direkten Biomarker ist in verschiedenen Matrices nachweisbar, was wiederum individuelle Stärken und Schwächen bei der Nachweisbarkeit der Substanzen mit sich bringt (Tabelle 4).

Tabelle 4: Mögliche Matrices zum Nachweis der einzelnen Biomarker (Andresen-Streichert et al. 2018; Aradottir et al. 2004b; Hoiseith et al. 2010a; Hoiseith et al. 2009b; Luginbühl et al. 2017; Luginbühl et al. 2016)

Matrix	Biomarker	Vorteile	Nachteile
Urin	EtG, EtS, NAcT	nichtinvasiv, längere Nachweisbarkeit als in Blut	anfällig für Betrug
Blut/Serum	EtG, EtS, NAcT	Beurteilung der Beeinträchtigung, Betrug ausgeschlossen	invasiv, nur wasserlösliche Bestandteile
Vollblut	EtG, EtS, NAcT, PEth	s. Blut/Serum, auch fettlösliche Bestandteile	Matrixeffekte
Haare	EtG	langes Nachweisfenster	Gewinnung von Haarlänge abhängig, aufwändige Aufarbeitung
Organe	EtG, EtS, PEth	Einsatz bei fortgeschrittener Verwesung möglich	aufwändige Aufarbeitung

Bei unterschiedlichen Fragestellungen und Abständen bis zur Probengewinnung ergeben sich durch die unterschiedlichen Vor- und Nachteile der Biomarker in den nutzbaren Matrices jeweils charakteristische Anwendungsbereiche (Tabelle 5).

Tabelle 5: Verschiedene Anwendungsbereiche für die dargestellten Alkoholbiomarker und deren Zeitfenster zwischen Benachrichtigung und Probenahme zum Abstinenznachweis (Andresen-Streichert et al. 2018)

Fragestellung	geeignete Biomarker
chronisch exzessiver Konsum	PEth, EtG (Haare)
Abstinenz	EtG/EtS (Urin, Blut, Haare), PEth (Vollblut)
Ausmaß des Konsums	EtG (Haare)
Postmortale Fäulnisprozesse	EtG (Blut)
Probengewinnung	geeignete Biomarker
Termin längere Zeit vorher bekannt	EtG (Haare), PEth (Vollblut)
sehr kurzfristig (1-2 Tage)	PEth (Vollblut), EtG/EtS (Urin)
spontane Überprüfung	EtG/EtS (Blut, Urin)

Da NAcT bisher keinen Platz in der Analytik von Alkoholbiomarkern hat und die derzeitige Studienlage nicht ausreichend Informationen zu einer Eingruppierung zulässt, ist dieser Biomarker in der Tabelle 5 nicht gelistet.

Ein weiterer interessanter Aspekt im Hinblick von PEth im Routinealltag ist die Verwendung von *Dried Blood Spots* (DBS), welche einige Vorteile gegenüber Vollblutproben besitzen. Zunächst ist bei dieser Probengewinnung ärztliches Personal nicht nötig, da auch geschulte Mitarbeiter das Kapillarblut aus der Fingerbeere gewinnen können. Die Lagerung ist durch das Aufbringen des gewünschten Volumens an Vollblut auf eigens dafür hergestelltes DBS-Papier vereinfacht und der dafür benötigte Platz ist im Vergleich zu Blutröhrchen extrem reduziert. Außerdem ist durch das Trocknen des Blutes keine Kühlung mehr nötig, wodurch der Versand erleichtert wird. Die Infektiosität von Hepatitis- und HI-Viren geht durch den Trocknungsprozess verloren, wodurch ein Ansteckungsrisiko ausgeschlossen werden kann. Ein immenser Vorteil im Vergleich zu Vollblutproben ist, dass durch die DBS-Technik die Neubildung von PEth in Anwesenheit von Ethanol verhindert wird, da die Konzentration in Blutröhrchen nur bei einer Lagerung bei -80 °C stabil bleibt. Auch im Vergleich von Vollblut, DBS-Proben aus Vollblut und aus Kapillarblut konnten vergleichbare Ergebnisse erzielt werden, wodurch alle drei Möglichkeiten des Probenhandlings als verlässlich eingestuft werden können. (Bakhireva et al. 2016; Kummer et al. 2016; Liu et al. 2018) Nachteile finden sich in der direkten Auftragung des Kapillarblutes auf das entsprechende DBS-Kärtchen, da für eine Reproduzierbarkeit und Quantifizierung ein definiertes Volumen abgenommen und aufgetragen werden muss. (Capiou et al. 2018; Kummer et al. 2016) Außerdem ist das aufgetragene Probenvolumen meist sehr gering (10 bis 20 µL), weshalb die Analytik

anspruchsvoll ist und nur in geeigneten Laboratorien durchgeführt werden kann. (Catala et al. 2018; Luginbühl et al. 2019; van Nguyen und Fitzpatrick 2019) Wie zuvor schon erwähnt, besitzt PEth einige charakteristische Vorteile gegenüber den gängigeren Indikatoren wie EtG und EtS, weshalb eine Anwendung in der forensisch-toxikologischen Analytik auch in Deutschland angestrebt werden sollte.

Bezüglich der Biomarker EtG und EtS gibt es neben den Abstinenzkontrollen im Rahmen von Fahreignungsbegutachtungen, Jugendamtsangelegenheiten oder Bewährungsaufgaben noch weitere Anwendungsbereiche, welche in den letzten Jahren vermehrt Aufmerksamkeit generieren konnten. Beide werden im Entzugs- und Alkoholentwöhnungskontext in Spezialkliniken angewendet, um einen Rückfall der Patienten zeitnah aufdecken und dementsprechende Maßnahmen einleiten zu können. (Armer et al. 2017; Concheiro et al. 2009) Ein weiteres Anwendungsgebiet ist die forensisch-toxikologische Beurteilung von postmortalen Alkoholkonzentrationen, die auf einen Alkoholkonsum, aber auch auf eine Verwesung des Leichnams zurückzuführen sein können. (Kugelberg und Jones 2007; O'Neal und Poklis 1996) Hierbei sollen EtG und EtS eine Hilfestellung leisten, um zu beurteilen, ob vor dem Tod eine Alkoholisierung des Verstorbenen vorgelegen haben könnte. (Hoiseith et al. 2010a; Krabseth et al. 2014; Santunione et al. 2018) Diese beiden Biomarker werden nicht durch postmortale Prozesse gebildet, und EtS im Gegensatz zu EtG nicht durch mikrobielle Abbauprozesse verringert. (Baranowski et al. 2008; Helander und Dahl 2005; Hoiseith et al. 2010a) EtG wurde zusätzlich in weiteren biologischen Matrices als ausschließlich im Leichenblut postmortal nachgewiesen: u.a. Rippenknochenmark, Muskel-, Leber-, Fettgewebe, Urin und Galle (Schloegl et al. 2006a; Schloegl et al. 2006b) Eine postmortale Bestimmung von PEth wurde ebenfalls in einigen Veröffentlichungen beschrieben. (Krabseth et al. 2014; Liu et al. 2018; Santunione et al. 2018; Thompson et al. 2016)

Für NAcT als potenzieller Biomarker ist die Studienlage derzeit noch sehr dünn und muss deshalb noch erweitert werden. Im Kontext der Alkoholbiomarkerforschung gibt es bisher nur zwei Veröffentlichungen aus Bern, welche sich mit der Kinetik von NAcT in Blut und Urin auseinandersetzen. (Luginbühl et al. 2017; Luginbühl et al. 2016)

1.7 Pharmakokinetik der Alkoholbiomarker

Ethanol als Muttersubstanz zeigt im Vergleich zu den gebildeten Alkoholbiomarkern eine deutlich andere Pharmakokinetik, da es sich in diesem Fall um eine Kinetik 0. Ordnung handelt. Dies bedeutet, dass nach dem Erreichen der maximalen Konzentration c_{\max} eine lineare Elimination aus dem Körper stattfindet. Der korrespondierende Parameter hierzu ist die Zeitspanne, zwischen Aufnahme der Muttersubstanz und dem Erreichen von c_{\max} : t_{\max} . Da es sich um eine Kinetik 0. Ordnung handelt verringert sich in einem definierten Zeitintervall die Konzentration immer in gleichen Teilen.

Die im Vorfeld vorgestellten Alkoholbiomarker werden, abgesehen von NAcT, exklusiv nach einer Ethanol-Aufnahme gebildet, weswegen eine Aufnahme in den Körper nicht stattfindet. Nichtsdestotrotz existieren entsprechende Studien zur Pharmakokinetik von EtG, EtS und PEth vor, welche zeigen, dass in deren Fall eine Kinetik 1. Ordnung vorliegt. Dies bedeutet, dass keine feste Abbaurate pro Zeiteinheit wie bei Ethanol besteht, sondern sich die vorliegende Konzentration innerhalb eines definierten Zeitintervalls halbiert. Der zugehörige Parameter ist in diesem Fall die Eliminationshalbwertszeit $t_{1/2}$. Graphisch berechnet werden kann $t_{1/2}$ mit Hilfe der Eliminationskonstante k_e . Dieser Parameter ergibt sich aus der Geschwindigkeit aller Prozesse, welche nötig sind, um den Wirkstoff aus dem Blut auszuschleiden. Weitere wichtige pharmakokinetische Parameter stellen die Bioverfügbarkeit, das Verteilungsvolumen und die Clearance dar. Die Bioverfügbarkeit beschreibt die tatsächliche Verfügbarkeit eines Wirkstoffes nach der Aufnahme in den Körper. Aufgrund einer unvollständigen Resorption im Darm und der Metabolisierung in der Leber, kommen nicht 100 % der aufgenommenen Dosis im Blutkreislauf an. Das Verteilungsvolumen beschreibt das eigentlich nötige Flüssigkeitsvolumen, um die gegebene Dosis in Abhängigkeit von der im Blut gemessenen Konzentration vollständig auflösen zu können. Bei der Clearance handelt es sich um eine besondere Kenngröße der Elimination, da diese zusammenfasst die Blut- bzw. Plasmamenge angibt, welche von dem Wirkstoff geklärt wird. Die gesamte Clearance setzt sich aus den einzelnen Werten für die beteiligten Organe zusammen: den Nieren und der Leber.

Die Pharmakokinetik der Biomarker EtG, EtS und PEth wurde in diversen Veröffentlichungen schon charakterisiert, wohingegen die Datenlage zu NAcT sehr gering ist. Im Rahmen der

vorliegenden Arbeit soll diesbezüglich geklärt werden, inwieweit pharmakokinetische Parameter im Falle dieser endogenen Substanz bestimmt werden können.

In zwei Studien wurden überwachte Trinkversuche durchgeführt, um die Pharmakokinetik von EtG und EtS bei sozialen Trinkern zu untersuchen. (Halter et al. 2008; Hoiseth et al. 2007a) In beiden Studien wurde klar ersichtlich, dass die Nachweisbarkeit von EtG und EtS deutlich über der der Muttersubstanz Ethanol lag und die entsprechenden Werte für t_{\max} ebenfalls höher waren.

Zu NAcT liegen bisher nur zwei sehr unterschiedliche Einschätzungen zweier Arbeitsgruppen vor, ob sich NAcT als Alkoholbiomarker eignet. (Jokiel und Skopp 2015; Luginbühl et al. 2017; Luginbühl et al. 2016)

Bezüglich PEth ist insbesondere eine deutlich längere Nachweisbarkeit im Vergleich zu den anderen vorgestellten Biomarkern auffällig. In zwei Studien, in denen die Kinetik von jeweils zwei PEth-Homologen untersucht wurde zeigten sich sehr individuelle Unterschiede bezüglich des möglichen Nachweisfensters, t_{\max} und c_{\max} . Jedoch ist zu beachten, dass die zugehörigen angestrebten Blutalkoholkonzentrationen innerhalb der Studiendesigns unterschiedlich waren. (Javors et al. 2016; Schröck et al. 2017) Aus diesem Grund wurde das dominante PEth-Homolog 16:0/18:1 in der vorliegenden Arbeit im Rahmen zweier Trinkversuche untersucht.

1.8 Instrumentelle Analytik

Die ersten chromatographischen Auftrennungen erfolgten über die Technik der Dünnschicht-Chromatographie (DC), bei welcher die Verteilung der einzelnen Substanzen auf chemisch-physikalische Wechselwirkungen zwischen der mobilen Phase, in welcher die DC-Platte steht, und der stationären Phase, welche das Material der DC-Platte darstellt, zurückzuführen ist. Aus dieser ursprünglichen Technik entstanden später die Flüssigchromatographie (LC) und Gaschromatographie (GC), bei denen die Detektion der gesuchten Substanzen über verschiedene Detektorsysteme erfüllt werden kann. Beispiele für entsprechende Detektoren sind Diodenarray-Detektoren (DAD), Flammenionisationsdetektoren (FID) und massenspektrometrische Detektoren (MS). Diese einzelnen Detektionssysteme wurden über die Jahre immer weiter modernisiert und ausgebaut, da sich individuelle Vor- und Nachteile

ergaben. Insbesondere die massenspektrometrische Detektion wird stetig verbessert, weshalb sich für den sensitiven Nachweis von diversen Analyten die Messtechnik einer Kopplung aus Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit anschließender Detektion via Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) anbietet. Diese setzt sich aus drei verschiedenen Elementen zusammen:

- HPLC: Chromatographische Auftrennung der Analyten
- Interface: Ionisation der Analyten beispielsweise mittels Elektronenspray-Ionisation (ESI) oder chemischer Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI)
- MS/MS: Detektion der Analyten via Tripel Quadrupol-MS

Die Funktionsweisen der Geräte und die möglichen einzustellenden Modi werden in den folgenden Kapiteln näher erläutert.

1.8.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Bei der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl.: *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) handelt es sich um eine spezifische und weitverbreitete Analytentechnik, wobei das Trennprinzip auf der chemischen und physikalischen Interaktion der in einer flüssigen Phase gelösten Analyten mit einer festen Phase beruht. Über die Wahl der passenden stationären und mobilen Phase soll eine entsprechend scharfe Auftrennung von Analyten gewährleistet werden (schematische Darstellung in Abbildung 8).

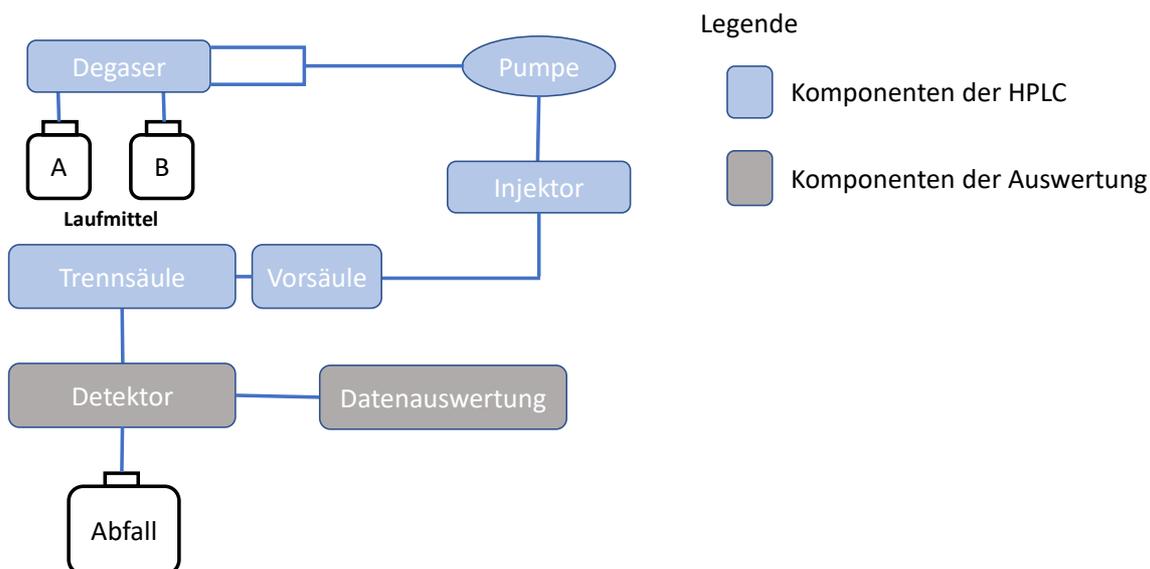


Abbildung 8: Schematischer Aufbau einer HPLC-Anlage mit Detektor

Bei der mobilen Phase handelt es sich um eine mischbare Flüssigkeitszusammensetzung (Laufmittel), welche entsprechend der angewandten Methode definiert ist. Meistens wird eine Komponente mit niedriger Elutionskraft und eine Komponente mit höherer Elutionskraft in einem definierten Verhältnis verwendet. Wird die Zusammensetzung des Laufmittels während der gesamten Analyse konstant gehalten, handelt es sich um eine isokratische Elution. Bei Analyten mit sehr unterschiedlicher Polarität bietet sich eine Gradientelution an, indem die Laufmittelzusammensetzung mit der Zeit verändert wird. Hierdurch können Analyten mit unterschiedlichen chemischen Charakteristika spezifisch analytisch voneinander getrennt werden. Neben der Laufmittelzusammensetzung kann auch die Laufgeschwindigkeit der mobilen Phase (Fluss) variiert werden, um eine optimale Auftrennung zu erzielen.

Generell spielt zusätzlich die Beschaffenheit der stationären Phase eine ausschlaggebende Rolle, wobei es sich hauptsächlich um das Packmaterial der Analysensäule handelt. Mit diesem können die zu bestimmenden Analyten wechselwirken und zeigen entsprechend der Beschaffenheiten der einzelnen Phasen eine charakteristische Zeit, bis sie vom nachgeschalteten Detektor erfasst werden. Dieser Parameter wird als Retentionszeit (R_T) bezeichnet. Abhängig von der Polarität der stationären Phase wird entweder von einer Normalphasen- (NP) oder einer Umkehrphasen (engl.: *Reversed Phase*, RP)-Chromatographie gesprochen. Bei einer NP-Chromatographie ist die stationäre Phase polar wodurch polare

Analyte länger auf der Säule retardieren und unpolare Substanzen die Säule schneller passieren. Bei der RP-Chromatographie werden die polaren Substanzen hingegen aufgrund der geringeren Wechselwirkungen mit der stationären Phase schneller eluieren.

In Abbildung 8 ist zusätzlich eine Vorsäule aufgezeigt, welche die Trennsäule vor Verunreinigungen aus der Probe schützen soll. Der Injektor der HPLC-Anlage entnimmt aus der zu untersuchenden Probe ein definiertes Volumen und injiziert dieses anschließend in das Analysensystem. Hierbei wird die Probe mittels einer Probenschleife in das Laufmittel geleitet und durchläuft die Vor- und Trennsäule mit der stationären Phase. Hierbei findet eine Auftrennung der Probe aufgrund von Verteilungs- und Adsorptionsprozessen zwischen der stationären und mobilen Phase statt, wonach aufgrund der unterschiedlichen Retention, die Einleitung der einzelnen Komponenten in den Detektor erfolgt. Im folgenden Kapitel wird die Art des Detektors genauer beleuchtet.

1.8.2 Tandem-Massenspektrometrie

Um eine verlässliche Detektion der gesuchten Analyte zu ermöglichen, wurde über die Jahre hinweg die massenspektrometrische Detektion immer weiter verbessert. Eine der modernsten Techniken stellt die Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) dar. Der Fokus liegt hierbei darauf, die in Lösung gebrachten Analyte zu ionisieren und entsprechend ihrem Masse-Ladungs-Verhältnisses (m/z) aufzutrennen. Dadurch ist es möglich, einen Stoff aus einem Substanzgemisch qualitativ und quantitativ zu bestimmen. Maßgeblich für die Tandem-Massenspektrometrie ist die Technik der Triple-Quadrupole. Diese Quadrupole bestehen aus vier parallel liegenden Stabelektroden, die durch ihre erzeugte Wechsellspannung eine Selektierung aufgrund des m/z -Verhältnisses ermöglichen. Folglich können nur Ionen mit einem spezifischen m/z -Verhältnis die Quadrupole passieren. Ein Tandem-Massenspektrometer (Abbildung 9) ist zusammengesetzt aus einer Ionenquelle, dem Quadrupol 0 (Q0) oder Octapol, dem Massenanalysator 1 (Q1), der Kollisionszelle (Q2) und dem Massenanalysator 2 (Q3). Q0 fokussiert die in der Ionenquelle erzeugten Ionen, welche in Q1, je nach eingestelltem Scan-Modus, selektiert werden. Anschließend werden die Ionen, die passieren konnten, in Q2 mit einem inerten Gas beschossen, um eine spezifische Fragmentierung zu erzeugen. Die daraus resultierenden Fragmentationen werden im Q3 erneut selektiert und schlussendlich im Detektor erfasst.

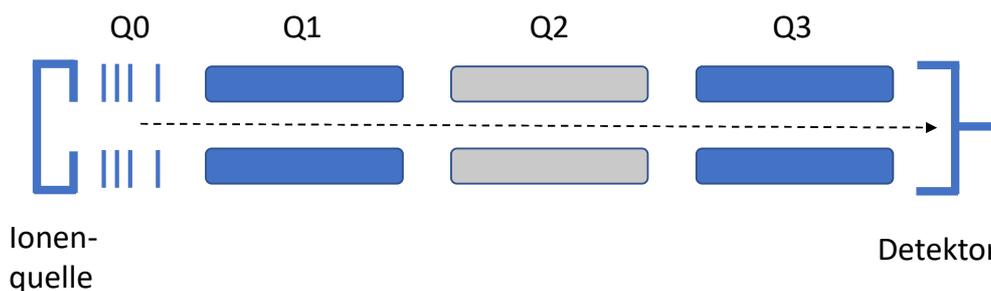


Abbildung 9: Schematischer Aufbau eines Tandem-Massenspektrometers

- Interface bzw. Ionenquelle

Im Folgenden wird die Funktionsweise der Ionenquelle bzw. des Interfaces ausführlicher dargestellt. Der am häufigsten genutzte Modus ist die Elektronenspray-Ionisation (ESI), welche zu den Atmosphärendruck-Ionisationsmethoden gehört. Dies bedeutet, dass ein kontinuierlicher Fluss aus dem Umgebungsdruck in das Vakuum eines Massenanalysators, in diesem Fall Q1, vorhanden ist. Abbildung 10 zeigt den Ablauf einer Taylor-Konus-Bildung, welche für eine ESI im positiven Modus erforderlich ist.

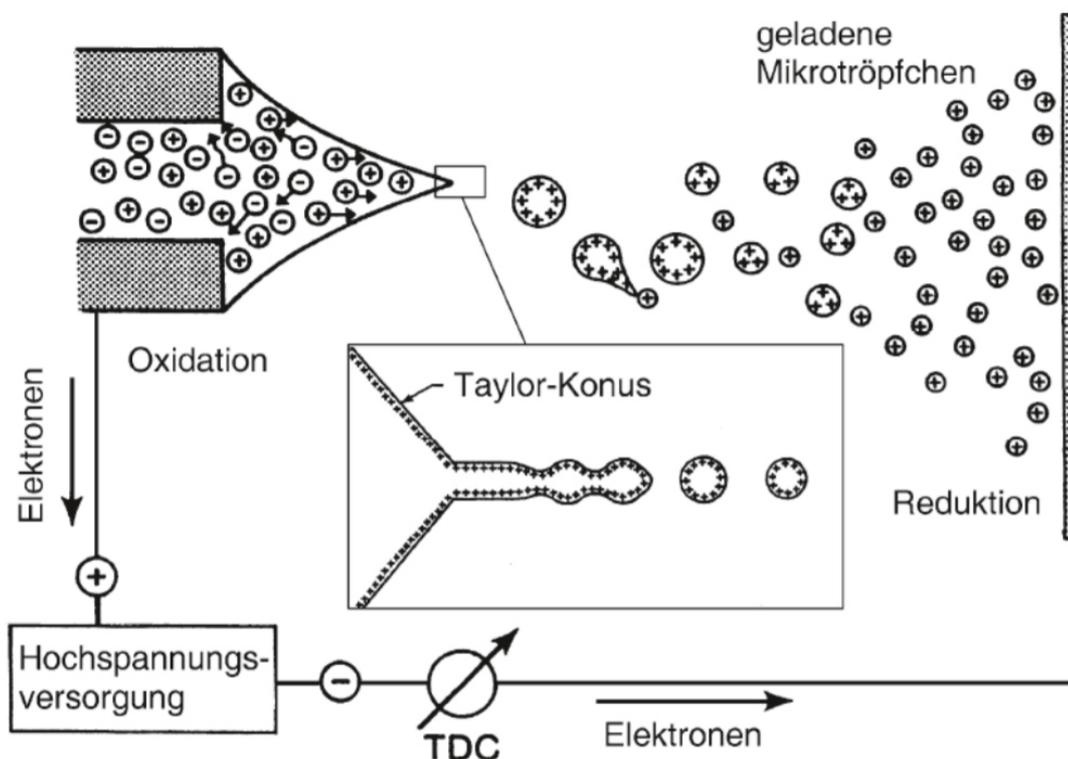


Abbildung 10: Schematischer Ablauf der Taylor-Konusbildung (Gross 2013)

Das Proben-Laufmittel-Gemisch wird über die vorgeschaltete HPLC in das Massenspektrometer überführt, wodurch im Interface eine Oxidation, also eine Elektronenabgabe der Substanzen aus dem aufgetrennten Gemisch, erfolgt. Hierdurch entsteht ein Überschuss an Kationen. Im Falle des negativen Ionisierungsmodus werden Elektronen durch das Analysensystem zugeführt, um einen Überschuss an Anionen zu erzeugen. Diese Vorgänge werden durch den Parameter der Ionenspray Spannung (IS) reguliert, da diese entsprechend dem Modus positiv oder negativ angelegt wird. Weitere Einstellungen, wie beispielsweise des *Nebulizer Gas* (GS1) und *Heater Gas* (GS2), verstärken die Tröpfchenbildung des Gemisches und unterstützen das Verdampfen des Laufmittels. Die Tröpfchenbildung wird durch das Phänomen des Taylor-Konus begünstigt, das bedeutet, eine Flüssigkeit verformt sich entsprechend ihrer Oberflächenladung kegelförmig in einem elektrischen Feld. Hierdurch bildet sich an der Spitze der Kapillare ein Überschuss an gleich geladenen Tröpfchen, die sich gegeneinander abstoßen. Nach der Tröpfchenbildung wird die enthaltene Flüssigkeit verdampft, wodurch die Dichte der einzelnen Ionen in den Tröpfchen immer größer wird und folglich die Abstoßung der Teilchen untereinander zunimmt. Ist hierbei der Grenzwert für die maximale Anzahl aufnehmbarer, gleicher Ladung überschritten, explodieren die Tröpfchen regelrecht, was als Coulomb Explosion bezeichnet wird. Ein weiterer einstellbarer Parameter, das Abschirmgas (CUR), verhindert, dass nicht ionisierte Teilchen in den Detektor eindringen können. Über den Skimmer werden die geladenen Teilchen ins Vakuum überführt und anschließend findet die massenspektrometrische Detektion der Ionen mittels der Quadrupole statt.

- Funktionsweise der Triple-Quadrupole

Ist die Ionisierung über das Interface abgeschlossen, erfolgt die Detektion mittels der Triple-Quadrupole. Dieses Bauteil ist in einem Triple-Quadrupol-MS dreifach hintereinander geschaltet und sorgt dafür, dass die Ionen gemäß ihres m/z -Ladungsverhältnisses getrennt werden. Ein Quadrupol (Abbildung 11) besteht aus vier parallel angeordneten Metallstäben (Elektroden), welche eine um 180° phasenverschobene Hochspannung in Form von Gleichspannung aufweisen.

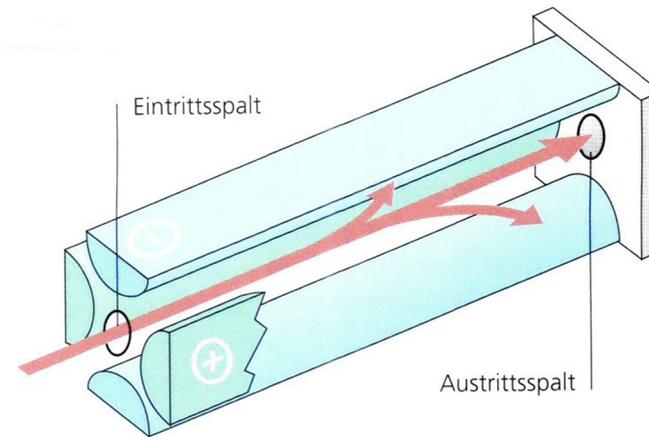


Abbildung 11: Schematischer Aufbau eines Quadrupols (Schwedt et al. 2016)

Die angelegte Spannung sorgt dafür, dass die erzeugten Ionen eine spiralförmige Bahn innerhalb des Quadrupols zurücklegen. Aufgrund des Verhältnisses, das sich zwischen der angelegten Gleichspannung und der Wechselspannung ergibt, können nur solche Ionen den Quadrupol passieren, welche die zuvor speziell angegebene Masse besitzen. Ionen mit einem nicht passenden m/z -Verhältnis werden von der Bahn abgelenkt und passieren den Quadrupol nicht.

- Scan-Modi

Durch die Technik der Triple-Quadrupol-MS können verschiedene Scan-Modi, wie z.B. das *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) genutzt werden (Abbildung 12).

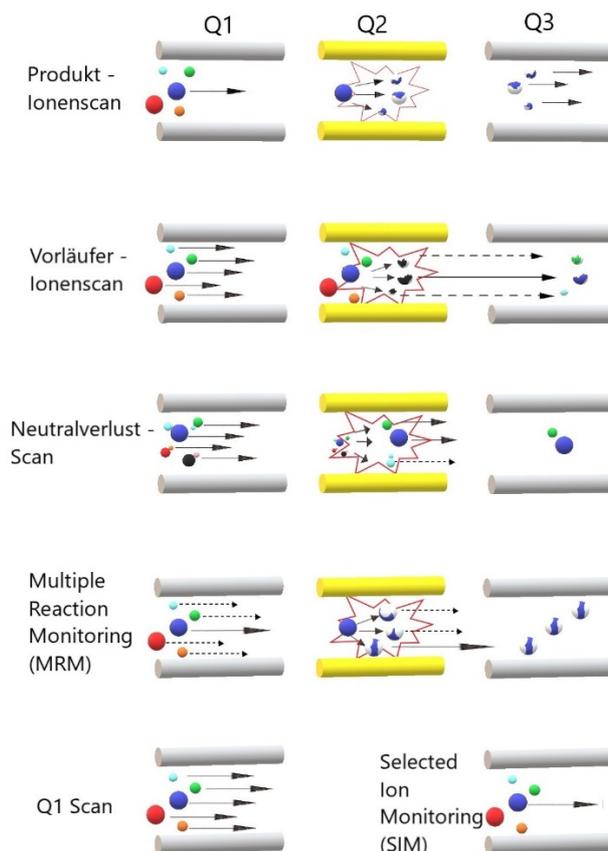


Abbildung 12: Schematische Darstellung der verschiedenen Scan-Modi eines Tandem-Massenspektrometers (Reimann 2018)

Der Produkt-Ionen-Scan (ProIS) befähigt den Detektor, Substanzen zu identifizieren, welche allein durch einen Q1-Scan nicht eindeutig nachgewiesen werden können. Dies gelingt durch die Trennung der Fragmentionen aus einem spezifischen Vorläuferion im Q3 und die nachfolgende Detektion.

Durch den Vorläufer-Ionen-Scan (PreIS) wird ein definierter Massenbereich über den Q1 detektiert. Die Fragmentierung der Vorläuferionen erfolgt wie gewohnt durch den Q2 mithilfe des Kollisionsgases, wodurch im Q3 durch die Auswahl eines charakteristischen Fragmentions nach der Detektion eine Zuordnung der spezifischen Masse zu einem bestimmten Vorläuferion erfolgen kann.

Der Neutralverlust-Scan (NIS) dient dazu, eine Massendifferenz festzustellen. Für Q1 und Q3 werden zwei unterschiedliche Massenbereiche für die Detektion festgelegt, wodurch

Ionenpaare detektiert werden, die sich dann durch die entsprechende Massendifferenz unterscheiden.

Besonders das *Multiple Reaction Monitoring (MRM)* findet sehr häufig in der LC-MS/MS-Analytik Anwendung. Hierbei wird für den Vorläuferionen-Scan im Q1 eine Masse festgelegt, welche selektiert werden soll. Anschließend wird das Ion im Q2 fragmentiert, wobei die intensivsten Fragmente im Q3 passend zum Vorläuferion selektiert und detektiert werden. Diese Technik bietet sich besonders bei dem Verdacht von aufkommenden Matrixeffekten an.

Die Modi Q1 Scan (*Full-Scan*) und *Selected Ion Monitoring (SIM)* finden in einfachen Massenspektrometern Verwendung, können aber auch bei einem Tandem-Massenspektrometer angewendet werden. Der *Full-Scan*-Modus dient dazu, unbekannte Substanzen zu identifizieren, da alle gebildeten Ionen detektiert werden. Der SIM-Modus dient der Detektion von Substanzen bzw. Ionen mit bekannter Masse, die das Massenspektrometer ohne Fragmentierung durchlaufen.

- Weitere Parameter für die Optimierung der massenspektrometrischen Detektion:

Declustering Potential (DP): Dieses gewählte Potential dient dazu, die Zusammenlagerung von Ionen zwischen Ionisierung und Q0 zu verhindern.

Temperature (TEM): Die Erhöhung der Temperatur führt zu einer schnelleren Verdampfung des Lauf-/Lösungsmittels.

Collisionally Activated Dissociation (CAD): Dieser Parameter verbessert die Kollision der Vorläuferionen aus dem Q1 mit dem inerten Gas in Q2.

Collision Cell Potential (CXP): Hierbei wird die Energie festgelegt, mit der die Ionen bei dem Eintritt von Q2 in Q3 belegt sind.

Entrance Potential (EP): Dieses Potential dient der Fokussierung der Ionen bevor sie in Q1 eintreten.

Collision Energy (CE): Dies ist die Energie, die die Ionen besitzen sollten, um aus Q1 in Q2 zu beschleunigen.

1.9 Etablierte Multimethoden zum Nachweis der vier Alkoholbiomarker

Eine kombinierte analytische Methode zum Nachweis der vier in dieser Arbeit vorgestellten Alkoholbiomarker (EtG, EtS, NAcT und PEth) ist bisher nicht bekannt. Es gibt eine Vielzahl von LC-MS/MS-Methoden für den kombinierten Nachweis von EtG und EtS in diversen Matrices. (Albermann et al. 2012; Halter et al. 2008; Hoiseith et al. 2010a; Hoiseith et al. 2010b; Morini et al. 2010) NAcT findet sich einzig kombiniert mit EtG in einer validierten Methode für den Nachweis beider Substanzen in Blut. (Luginbühl et al. 2017) Eine Multimethode, die immerhin drei der vier präsentierten Biomarker abdeckt, wurde von Zhang et al. für die Matrix Blut entwickelt und beinhaltet EtG, EtS, PEth sowie u.a. Fettsäureethylester. (Zhang et al. 2017) Methoden, die mehr als zwei der Alkoholbiomarker parallel nachweisen können, sind insgesamt sehr gering vertreten, was vor allem auf die analytischen Probleme hinsichtlich ihrer unterschiedlichen chemischen Eigenschaften zurückzuführen ist.

1.10 Zielsetzung

Durch die große gesellschaftliche Akzeptanz von Alkohol und die hieraus resultierenden sozialen und gesundheitlichen Probleme ist der sichere Nachweis eines Konsums unumgänglich. Hierbei gewinnen insbesondere Alkoholbiomarker immer mehr an Bedeutung, da diese die Möglichkeit bieten, ein sehr breites Spektrum von verschiedenen Fragestellungen abzudecken. Beispiele können die straf- und verwaltungsrechtliche Ahndung sowie Rehabilitationsmaßnahmen im Kontext der Behandlung eines Alkoholmissbrauchs darstellen.

Das primäre Ziel der hier vorgelegten Arbeit war die Entwicklung, Etablierung und Validierung einer chromatographisch geeigneten Methode zur Bestimmung der Alkoholbiomarker Ethylglucuronid, Ethylsulfat, N-Acetyltaurin und des Phosphatidylethanol-Homologs 16:0/18:1 in Vollblut. Die parallele Bestimmung mit einer Methode trotz ihrer sehr unterschiedlichen chemischen Eigenschaften und die Verwendung der Matrix Vollblut stellen hierbei eine große Herausforderung dar. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit eine robuste Methode entwickelt werden, welche den hohen analytischen Standards für die forensisch-toxikologische Analytik gerecht wird.

Zur Verifizierung der neu entwickelten Methode sollten authentische Proben gemessen werden, wodurch auch weiterführende Fragestellungen beantwortet werden sollten. Hieraus folgten drei umfangreichere Projekte:

Im ersten Projekt sollte eine erweiterte Validierung durch die Anwendung der Methode für postmortale Proben durchgeführt werden. Hierbei sollte die entwickelte Methode eine sinnvolle Hilfestellung bei der Beurteilung von postmortal gemessenen Alkoholkonzentrationen darstellen, um zu klären, ob dieser Befund durch postmortale Prozesse generiert wurde oder eine Alkoholisierung zum Todeszeitpunkt vorlag.

Im zweiten Projekt sollten authentische Proben aus zwei am Institut für Rechts- und Verkehrsmedizin durchgeführten Trinkversuchen mit der entwickelten Methode untersucht werden. In den organisierten Studien wurden von Probanden individuelle Mengen Alkohol aufgenommen, um jeweils unterschiedliche maximale Blutalkoholkonzentrationen zu erzielen. Das Monitoring erfolgte über die Abgabe von Blut- und Urinproben nach einer einmaligen Alkoholaufnahme am Versuchstag und den Folgetagen. Die Blutproben sollten

mittels der neu entwickelten Methode untersucht werden und deren Ergebnisse zur Beurteilung der Pharmakokinetik der einzelnen Alkoholbiomarker im Vollblut bei verschiedenen aufgenommenen Alkoholmengen verwendet werden. Außerdem sollte im Rahmen der Trinkversuche die Eignung von N-Acetyltaurin als Alkoholbiomarker abschließend überprüft werden.

Im dritten anwendungsbezogenen Teil der Arbeit sollten in Kooperation mit dem Krankenhaus Salem Proben von Alkoholentzugspatienten akquiriert werden, welche zu Beginn und Ende des Klinikaufenthaltes erhoben wurden. Diese Proben sollten mit Hilfe der neu entwickelten Methode untersucht werden, um das Verhalten der einzelnen Alkoholbiomarker im Entzugskontext bei Alkoholikern bewerten zu können. Zusätzlich sollte eine Betrachtung der Lebersteifigkeit und dessen Einfluss auf den Biomarkerabbau erfolgen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verbrauchsmaterial

Carbosynth Ltd. (Berkshire, Großbritannien)

- Acetyltaurin 100 mg

Carl Roth GmbH + Co KG (Karlsruhe, Deutschland)

- 2-Propanol ROTISOLV® ≥99,95 %, LC-MS-Grade
- Acetonitril ROTISOLV® HPLC
- Ammoniumformiat ≥95 %, reinst
- Methanol ROTISOLV® HPLC

DiaSys Diagnostic Systems GmbH (Holzheim, Deutschland)

- Ethanol Standard FS 0,5 mg/mL
- Ethanol Standard FS 1,0 mg/mL
- Ethanol Standard FS 2,0 mg/mL
- Ethanol Standard FS 3,0 mg/mL
- Ethanol Standard FS 4,0 mg/mL

Echelon Biosciences Inc. (Salt Lake City, UT, Vereinigte Staaten von Amerika)

- 16:0/18:1 Phosphatidylethanol-D₅ 1 mg

Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)

- Eppendorf Combitips advanced® 0,5 mL
- Eppendorf Combitips advanced® 1,0 mL
- Eppendorf Safe-Lock Tubes, 2 mL Volumen
- Eppendorf Pipettenspitzen für 10 – 100 µL und 100 – 1000 µL Volumina

Vollblutproben

- Diverse Mitarbeiter des IRVM

Fresenius Kabi Deutschland GmbH (Bad Homburg vor der Höhe, Deutschland)

- Ampuwa (destilliertes Wasser)

Honeywell Deutschland Holding GmbH (Offenbach Am Main, Deutschland)

- Essigsäureanhydrid ≥ 99 % (GC)
- Methanol $\geq 99,8$ %

Klaus Ziemer GmbH (Langerwehe, Deutschland)

- Flasche R20, klar/HS

Lipomed GmbH (Weil am Rhein, Deutschland)

- Ethylglucuronid 1,0 mg/mL in Methanol
- Ethylglucuronid-D₅ 1,0 mg/mL in Methanol
- Ethylsulfat 1,0 mg/mL in Methanol
- Ethylsulfat-D₅ 1,0 mg/mL in Methanol

MEDICHEM® Diagnostica GmbH & Co. KG (Steinenbronn, Deutschland)

- Medidrug® Ethanol W020
- Medidrug® Ethanol S300
- Medidrug® Ethanol S130
- Medidrug® Ethanol S050

Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)

- Ameisensäure 98 – 100 % pro analysis
- *tert*-Butanol pro analysis

Phenomenex LTD (Aschaffenburg, Deutschland)

- Strata™-X 33 µm Polymeric Reversed Phase, 200 mg/3 mL Tubes
- Strata™-X-AW 33 µm Polymeric Weak Anion, 30 mg/1 mL Tubes
- Phree™ Phospholipid Removal 1 mL, 1 mL Tube

Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland)

- Probengefäß 2 mL für Hitachi
- Röhre 13 mL, 95 x 16,8 mm, PP
- Übergriffstopfen, farblos

Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)

- 16:0/18:1 Phosphatidylethanol (Natriumsalz) 25 mg
- Pyridin ReagentPlus™ ≥99 %

Thermo Fisher Scientific Inc. (Rockwood, TN, Vereinigte Staaten von Amerika)

- Micro-Spin-Filter Tubes

Toronto Research Chemicals Inc. (North York, Kanada)

- Taurin-D₄ 2,5 mg

WICOM Germany GmbH (Heppenheim, Deutschland)

- 20 mm Alu Crimp Kappen mit 10 mm Loch ohne Septum
- 20 mm Butylgummi-Stopfen für 20 mL Headspace-Flaschen (grau)
- Micro Insert, 250 µL Volumen, L = 30 mm, AD = 6 mm, Spitz = 15 mm
- 11 mm Alu Crimp Caps (Alu Boerdelkappen) mit Septum aus Gummi/PFTE
- 2 mL Autosampler Vials (klar) mit 11 mm Rollrand in DAB-10 Qualität

2.1.2 Geräte und Software

Analysensäulen

- Luna® Omega 5 µm PS C18 100 Å, 150 x 2,1 mm
(Phenomenex LTD; Aschaffenburg, Deutschland)
- Poroshell 120 HILIC-Z 2,7 µm, 50 x 2,1 mm
(Agilent Technologies, Inc.; Waldbronn, Deutschland)
- Luna® 5 µm Phenyl-Hexyl 100 Å, 150 x 2 mm
(Phenomenex LTD; Aschaffenburg, Deutschland)
- Luna® Omega 3µm SUGAR 100 Å, 150 x 2,1 mm
(Phenomenex LTD; Aschaffenburg, Deutschland)

Vorsäulen und Vorsäulenhalter

- SecurityGuard™ Guard Cartridge Kit (Phenomenex LTD; Aschaffenburg, Deutschland)
- SecurityGuard™ Cartridges: SUGAR, 4 x 2,0 mm ID (Phenomenex LTD; Aschaffenburg, Deutschland)
- SecurityGuard™ Ultra Cartridge (Phenomenex LTD; Aschaffenburg, Deutschland)
- SecurityGuard™ Ultra Cartridges: UHPLC Fully Porous PS C18 2,1 mm ID (Phenomenex LTD; Aschaffenburg, Deutschland)
- SecurityGuard™ Cartridges: Phenyl, 4 x 2,0 mm ID (Phenomenex LTD; Aschaffenburg, Deutschland)
- Agilent HILIC-Z 2,1 mm x 5 mm, 2,7 µm (Agilent Technologies, Inc.; Waldbronn, Deutschland)

LC-MS/MS-System

- HPLC-System mit Autosampler: Agilent 1100/1200 Series (Agilent Technologies, Inc.; Waldbronn, Deutschland)
- Tandem-Massenspektrometer: API 4000 (Applied Biosystems Sciex, Darmstadt, Deutschland)
- ESI Turbolon Spray: Turbo V™ Ion Source (Applied Biosystems Sciex, Darmstadt, Deutschland)

GC-FID-System

- Autosampler: TurboMatrix 110 (PerkinElmer Inc., Rodgau, Deutschland)
- Gaschromatograph: AutoSystem XL (PerkinElmer Inc., Rodgau, Deutschland)

Immunoassay

- AU 480 Chemistry Analyzer (Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland)
- DRI® Creatinine-Detect® Test (Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland)
- DRI® Creatinine-Detect® 7,5 mg/dL Control (Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland)
- DRI® Creatinine-Detect® 23,0 mg/dL Control (Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland)
- DRI® Ethyl Glucuronide Negative Calibrator 25 mL
- DRI® Ethyl Glucuronide Assay

Software

- LC-MS/MS-System: Analyst 1.4 (Applied Biosystems Sciex, Darmstadt, Deutschland)
- GC-MS-System: TotalChrom Workstation (PerkinElmer Inc., Rodgau, Deutschland)
- Microsoft Excel 365 Pro Plus (Microsoft Corporation, Redmond, WA, Vereinigte Staaten von Amerika)
- VALISTAT 2.0 (ARVECON GmbH, Walldorf, Deutschland)
- MestReNova Software Version 9.0.1 (Mestrelab Research, Santiago de Compostela, Spanien)

Proben-Konzentrator

- Techne® Dri-Block® DB-3 (Cole-Parmer, Staffordshire, Großbritannien)

Spritzenpumpe

- Harvard Apparatus (Holliston, MS, Vereinigte Staaten von Amerika)

pH-Meter

- Portamess 751 Calimatic (Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland)

Feinwaage

- MC1 Analytic AC 210 S (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland)

Zentrifugen

- Heraeus Fresco 21 Centrifuge (Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland)
- Rotina 420R (Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland)

Hamilton-Spritze

- Gastight® #1001 (Hamilton Co., Reno, NV, Vereinigte Staaten von Amerika)

Elektronische Bördelzange

- 11 mm Electronic Crimper (Agilent Technologies, Inc., Waldbronn, Deutschland)

Multipette

Eppendorf Multipette® M4 (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)

NMR-System

- Varian NMR Instrument 300 MHz (Varian Medical Systems Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland)

Rotationsverdampfer

- Heidolph Rotationsverdampfer (Heidolph Instruments GmbH & CO. KG, Schwabach, Deutschland)

2.2 Methodenentwicklung

Für die Methodenentwicklung wurde eine LC-MS/MS-Anlage verwendet. Bevor die eigentliche Methode erstellt werden konnte, mussten die idealen Einstellungen am Tandem-Massenspektrometer für jeden einzelnen Parameter mit seinen individuellen Charakteristika bestimmt werden. Dieser Vorgang wird Tuning genannt.

Hierzu wurden Lösungen der einzelnen Analyten EtG, EtS, NAcT, PEth, sowie deren deuterierte Standards zu einer Konzentration von 100 ng/mL in Methanol (MeOH) hergestellt. Diese Lösungen wurden einzeln über eine Hamilton-Spritze und Spritzenpumpe mit einem Fluss von etwa 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ in das Tandem-Massenspektrometer injiziert. Über die voreingestellte Funktion des *Component Tuning* konnte der Scan-Modus für das Tuning festgelegt werden, welcher in diesem Fall der *Negative Ionisation Mode* war. Beim Vorgang des Tunings wird zunächst ein Q1-Scan des gesuchten Analyten durchgeführt. In den vorherigen Einstellungen wird hierzu die neutrale Masse hinterlegt. Bei dem ersten Scan werden die Ring- und Orificespannungen für das erzeugte Signal durch den gesuchten Analyten so optimiert, dass die höchstmögliche Intensität des deprotonierten Molpeaks $[\text{M-H}]^-$ generiert wird. Im zweiten Scan, dem Q3-Scan, wird das Signal der intensivsten Fragmentionen angepasst. Zu diesen Parametern gehören *Heater*, *Nebulizer*, *Collision* und *Curtain Gas*, ebenso wie die Ionenspray Spannung. Dieser Vorgang wird so lange wiederholt, bis schlussendlich die optimale Intensität der verschiedenen Parameter erreicht worden ist.

Für die Methodenentwicklung im chromatographischen Bereich wurden vier verschiedene analytische Säulen getestet:

- Luna[®] Omega 5 μm PS C18 100 Å, 150 x 2,1 mm
(Phenomenex LTD; Aschaffenburg, Deutschland)
- Poroshell 120 HILIC-Z 2,7 μm , 50 x 2,1 mm
(Agilent Technologies, Inc.; Waldbronn, Deutschland)
- Luna[®] 5 μm Phenyl-Hexyl 100 Å, 150 x 2 mm
(Phenomenex LTD; Aschaffenburg, Deutschland)
- Luna[®] Omega 3 μm SUGAR 100 Å, 150 x 2,1 mm
(Phenomenex LTD; Aschaffenburg, Deutschland)

Für die Entwicklung der Methode wurde zunächst auf eine Reinsubstanzlösung aller Analyten in Methanol zurückgegriffen (100 ng/mL pro Substanz). Um eine optimale chromatographische Auftrennung zu erzielen, wurden verschiedene Gradienten und Laufmittelzusammensetzungen getestet. Hierbei wurden Ammoniumacetat-, sowie Ammoniumformiatpuffer mit verschiedenen Konzentrationen und pH-Werten eingesetzt. Bei Ammoniumformiat betrug die Spanne der verschiedenen Konzentrationen 5 mM bis 25 mM und unter der Zuhilfenahme von Ameisensäure (FA) wurden pH-Werte von 2,0 bis 6,0 eingestellt. Im Falle des Ammoniumacetats wurden Pufferlösungen mit einer Konzentration von 4 mM bis 100 mM getestet und mit der Hilfe von konzentrierter Essigsäure pH-Werte von 3,2 bis 6,0 eingestellt. Zusätzlich wurden die Analysen mit verschiedenen Flussraten von 150 bis 300 $\mu\text{L}/\text{min}$ durchgeführt. Als organische Komponenten wurden verschiedene Zusammensetzungen von Acetonitril (ACN), MeOH, iso-Propanol (iProp), teilweise mit einem Anteil von 1 % der wässrigen Komponente, oder dem Zusatz von 0,1 % FA eingesetzt.

2.2.1 Probenaufarbeitung

Als Matrix wurde Vollblut ausgewählt, da alle vier Biomarker nach einem Alkoholkonsum in dieser nachgewiesen werden sollten. Das Vollblut war frei von drei der vier Biomarker, durch eine minimale Alkoholabstinenz von zwei Wochen vor der Blutabnahme. N-Acetyltaurin war in einem endogenen Level vorhanden, welches nicht auf einen Alkoholkonsum zurückzuführen war.

Für die einzelnen Biomarker wurde ein Bereich von 10 bis 1000 ng/mL abgedeckt, wobei der Probeneinsatz bei 150 μL der Vollblutprobe lag. Das hierfür benutzte Pipettierschema ist in Tabelle 6 dargestellt. Aus den in Kapitel „2.1 Material“ beschriebenen Mutterlösungen wurden mit MeOH die entsprechend verdünnten Stammlösungen erstellt. Der interne Standard (ISTD) hatte eine Ausgangskonzentration von 4,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Stammlösung) für jeden einzelnen der deuterierten Standards und wurde in MeOH angesetzt. Die Zielkonzentration des internen Standards sollte bei jeder Probe 300 ng/mL betragen.

Tabelle 6: Pipettierschema für die Kalibration der Multimethode

Zielkonzentration [ng/mL]	Volumen [µL]	Stockkonzentration [µg/mL]	Interner Standard [µL]
0 ohne ISTD	-	-	
0 mit ISTD	-	-	10
10	1,5	1,0	10
25	3,75	1,0	10
50	7,5	1,0	10
100	1,5	10	10
250	3,75	10	10
500	7,5	10	10
1000	15	10	10

150 µL Vollblut wurden mit 750 µL MeOH versetzt und etwa 1 Minute gevortext. Anschließend wurden die Proben für 10 Minuten bei 2,1 x 1000 g zentrifugiert, der organische Überstand in Injektionsfläschchen (Vials) überführt und bei 40 °C unter einem konstanten Strom von Stickstoff getrocknet. Anschließend wurde der Rückstand in 75 µL Rücklöseflüssigkeit (MeOH/Ethylacetat 50:50) resuspendiert. Die Suspension wurde zur Abtrennung von Schwebstoffen 3 Minuten bei 2,1 x 1000 g in Micro-Spin-Filtern zentrifugiert und die resultierende Lösung wurde in Vial Micro-Inserts für die anschließende Messung überführt.

2.2.2 LC-MS/MS-Parameter

Die Messungen erfolgten im negativen *Multiple Reaction Monitoring* (MRM). In der folgenden Tabelle 7 sind die verschiedenen Übergänge mit den zugehörigen substanzspezifischen Parametern dargestellt: *Declustering Potential* (DP), *Collision Energy* (CE) und *Collision Cell Exit Potential* (CXP). Die verschiedenen Einstellungen wurden für die jeweiligen ersten (markiert mit 1 $\hat{=}$ *Target Ion*) und zweiten (markiert mit 2 $\hat{=}$ *Qualifier Ion*) Übergänge dargestellt.

Tabelle 7: Auflistung der substanzspezifischen Einstellungen an der LC-MS/MS

Bezeichnung	Q1 [amu]	Q3 [amu]	Dwell Time [msec]	DP [V]	CE [V]	CXP [V]
EtG 1	221,026	75,008	50	-50,00	-20,00	-11,00
EtG 2	221,026	85,059	50	-50,00	-24,00	-13,00
EtG-D ₅ 1	225,962	75,050	50	-65,00	-26,00	-1,00
EtG-D ₅ 2	225,962	85,054	50	-65,00	-26,00	-3,00
EtS 1	124,871	96,891	50	-55,00	-22,00	-3,00
EtS 2	124,871	79,915	50	-55,00	-46,00	-11,00
EtS-D ₅ 1	129,990	97,926	50	-45,00	-22,00	-17,00
EtS-D ₅ 2	129,990	79,928	50	-45,00	-48,00	-1,00
NAT 1	165,940	79,964	50	-50,00	-32,00	-5,00
NAT 2	165,940	106,951	50	-50,00	-26,00	-15,00
NAT-D ₄ 1	169,938	79,925	50	-55,00	-40,00	-3,00
NAT-D ₄ 2	169,938	105,993	50	-55,00	-26,00	-17,00
PEth 1	701,429	281,208	50	-120,00	-46,00	-15,00
PEth 2	701,429	255,256	50	-120,00	-52,00	-19,00
PEth-D ₅ 1	705,797	281,185	50	-20,00	-48,00	-13,00
PEth-D ₅ 2	705,797	255,179	50	-20,00	-56,00	-15,00

Neben den substanzspezifischen Parametern gibt es die quellenspezifischen Parameter: *Entrance Potential (EP)*, *Collision Gas (CAD)*, *Curtain Gas (CUR)*, *Nebulizer Gas (GS 1)*, *Heater Gas (GS 2)*, *Ion Spray Voltage (IS)* und die *Temperature (TEM)*. In Tabelle 8 sind die genannten Parameter mit den zugehörigen Werten dargestellt.

Tabelle 8: Auflistung der quellenspezifischen Einstellungen an der LC-MS/MS

Parameter [Einheit]	Wert
EP [V]	10,0
CAD [L/min]	8,00
CUR [L/min]	25,0
GS 1 [L/min]	35,0
GS 2 [L/min]	35,0
IS [V]	-4250
TEM [°C]	650

2.2.3 Laufmittel und Gradient

Ein 25 mM Ammoniumformiat-Puffer mit pH 3,3 diente als wässriges Laufmittel (A). Für die Herstellung von 1 L Puffer wurden 1,58 g Ammoniumformiat ($M = 63,06 \text{ g/mol}$) eingewogen und mit 900 mL Ampuwa Wasser gelöst. Der pH-Wert von 3,3 wurde mit konzentrierter Ameisensäure (98 – 100 %) und einem pH-Meter eingestellt. Anschließend wurde dem Puffer so viel Wasser zugegeben, dass ein Volumen von 1 L erreicht wurde. Das organische Laufmittel (B) bestand aus 85 Teilen ACN und 15 Teilen iProp. Zusätzlich wurde dem Lösungsmittelgemisch konzentrierte Ameisensäure (Endkonzentration 0,1 %) zugesetzt. Das Injektionsvolumen betrug 7 μL .

Die Gesamtlaufzeit der Methode belief sich auf 22 Minuten mit einem Fluss von 300 $\mu\text{L}/\text{min}$. In Tabelle 9 und in Abbildung 13 ist der verwendete Gradient abgebildet.

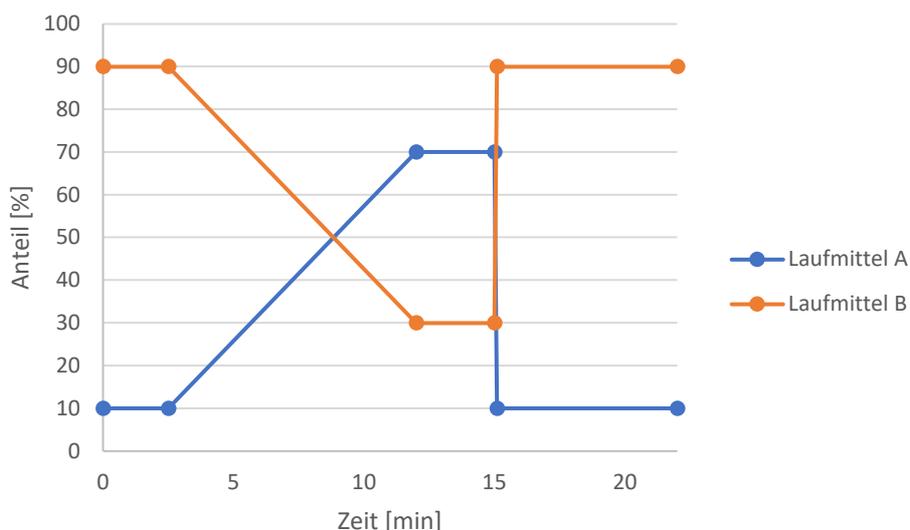


Abbildung 13: Grafische Darstellung des verwendeten Gradienten

Tabelle 9: Darstellung des verwendeten Gradienten

Zeit [min]	A [%]	B [%]
0	10	90
2,5	10	90
12	70	30
15	70	30
15,1	10	90
22	10	90

2.2.4 Synthese von NAcT-D₄

Die Synthese des deuterierten internen Standards von NAcT erfolgte nach der Vorschrift von Luginbühl et al. (Luginbühl et al. 2016) Hierbei wurden 2,5 mg Taurin-D₄ in 500 µL Wasser aufgelöst und anschließend nach der Zugabe von 179 µL Pyridin und 144 µL Essigsäureanhydrid 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Um das Lösungsmittel abzdampfen, wurden 60 °C und Vakuum an einem Rotationsverdampfer angelegt. Die Reinheitsprüfung und Kontrolle des Syntheseproduktes fanden vor dem Rücklösen mittels ¹H-Kernspinresonanzspektroskopie und der Zuhilfenahme von Methanol-D₄ als deuteriertes Lösungsmittel statt. Der interne Standard wurde anschließend in 2,5 mL MeOH rückgelöst und bei -20 °C gelagert.

2.3 Validierung der entwickelten Methode

Um die Verlässlichkeit bzw. Validität der analytischen Methode zu prüfen wurde auf den „Anhang B zur Richtlinie der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen Anforderungen an die Validierung von Analysemethoden“ (Peters et al. 2009), sowie die ISO 5725 zurückgegriffen. Die Auswertung erfolgte über das Programm VALISTAT 2.0 (ARVECON GmbH, Walldorf, Deutschland) ein Programm basierend auf Excel, welches die Ergebnisse mit den zuvor genannten Anforderungen abgleicht. Im Folgenden werden die einzelnen zu prüfenden Parameter kurz vorgestellt.

2.3.1 Selektivität

Eine ausreichende Selektivität der Methode liegt vor, wenn der Analyt ohne störende Signale der Matrix oder anderer endogener oder exogener Substanzen in der Probe eindeutig nachweisbar ist.

Die Messung der Selektivität erfolgte über die Auswertung von Blank-Proben ohne Analyt und internen Standard, Nullproben mit internem Standard und Leerproben, welche mit folgenden 27 Substanzen zu jeweils 100 ng/mL versetzt wurden: Amitriptylin, Bisoprolol, Bupropion, Clomethiazol, Citalopram, Diphenhydramin, Doxepin, Duloxetin, Fluoxetin, Gabapentin, Ibuprofen, Lamotrigin, Levetiracetam, Levomethadon, Methadon, Mirtazapin, Norketamin,

Olanzapin, Pregabalin, Paracetamol, Quetiapin, Sertralin, Tilidin, Tramadol, Trimipramin, Venlafaxin, Verapamil.

2.3.2 Linearität der Kalibration

Hierbei wird ein Messbereich gewählt, in welchem realistische Konzentrationen der gesuchten Analyten zu erwarten sind. Die gemessenen Ergebnisse (in diesem Fall das Verhältnis zwischen Peakfläche des Analyten und der Fläche des internen Standards) aus dieser Kalibrationsreihe müssen direkt proportional zur Konzentration des Analyten sein. Die genaueren statistischen Parameter können der Quelle (Peters et al. 2009) entnommen werden.

Zur Bestimmung der Linearität wurden sieben dotierte Leerproben an sechs verschiedenen Tagen entsprechend der beschriebenen Methode aufgearbeitet und gemessen. Zusätzlich wurden jeweils eine Null- und Leerprobe vorbereitet und gemessen. Der Kalibrationsbereich erstreckte sich von 10 ng/mL bis 1000 ng/mL für jeden der einzelnen Analyten.

Um die Linearität der Methode auch für Proben über dem Bereich von 10 – 1000 ng/mL zu gewährleisten, wurden zusätzlich Stützpunkte für alle Substanzen vermessen. Als Stützpunkte wurden Proben mit Konzentrationen von EtG, EtS, NAcT und PEth zu jeweils 2000, 5000, 10000, 20000 und 40000 ng/mL als Duplikate vorbereitet, entsprechend aufgearbeitet und gemessen.

2.3.3 Präzision und Richtigkeit

Systematische und zufällige Fehler können zu einer Streuung um den Sollwert führen. Dieser Abstand definiert die Genauigkeit.

Die Präzision gibt das Maß der Streuung einzelner gemessener Werte um den Mittelwert an und wird meist als „Impräzision“ angegeben, welche sich aus den Messergebnissen bzw. deren Standardabweichung ergibt. Hierdurch kann die zufällige Fehlerkomponente einer quantitativen Analysenmethode ausgedrückt werden. Es gibt zwei Arten der Präzision:

- **Wiederholpräzision (*Intraday Precision*):** Hierbei werden unabhängige Messergebnisse einer Probe unter einheitlichen Bedingungen (Personal, Messmethode, etc.) und innerhalb eines kurzen Zeitintervalls erzeugt.

- Laborpräzision/Tagesverschiedene Präzision (*Interday Precision*): Bei der Bestimmung der Laborpräzision wird bewusst ein Parameter verändert. Hierbei wird meist auf den Faktor „Zeit“ zurückgegriffen, wodurch sich die tagesverschiedene Präzision ergibt.

Die Bestimmung der aufgezeigten Parameter erfolgte zeitgleich. Zunächst wurden drei Pools erstellt, die den Anforderungen einer *Quality Control*-Probe (QC-Probe) gerecht wurden: eine *Low Control* (LoC), eine *Middle Control* (MiC) und *High Control* (HiC) relativ zum definierten Kalibrationsbereich. Für die LoC wurde eine Konzentration von 30 ng/mL, für die MiC 300 ng/mL und für die HiC 800 ng/mL gewählt, was für alle Biomarker so gehandhabt wurde. Die Pools wurden direkt aliquotiert und bei lagerungsüblichen Temperaturen (-20 °C) eingefroren. Gemessen wurde an acht verschiedenen Tagen, wobei zu jedem Set der eingefrorenen QC-Proben eine entsprechende Kalibration zusätzlich aufgearbeitet wurde (Probenaufarbeitung s. Punkt 2.1.1).

2.3.4 Stabilität

Hierbei wird die chemische und analytische Stabilität der Analyte in einer bestimmten Matrix unter laborüblichen Bedingungen und Zeitintervallen geprüft.

Für die Bestimmung wurden LoC- und HiC-Proben erstellt, aufgearbeitet und anschließend gepoolt. Aus diesen Pools wurden wiederum jeweils sechs Aliquote hergestellt, die über einen definierten Zeitraum in das Analysensystem injiziert wurden. Die Injektion erfolgte zu den Zeitpunkten 0, 2, 4, 6, 8 und 12 h. Für die Auswertung wurden die absoluten Peakflächen herangezogen.

2.3.5 Analytische Grenzen

- Nachweisgrenze (*Limit of Detection*, LOD): Die Nachweisgrenze stellt die niedrigste Konzentration dar, bei welcher die Identifizierungskriterien nach DIN 32645 erfüllt sind. (Deutsches Institut für Normung e.V. 2008) Für die Bestimmung wird das schwächere Ion (*Qualifier Ion*) verwendet.
- Bestimmungsgrenze (*Limit of Quantification*, LOQ): Die Bestimmungsgrenze gibt die niedrigste Konzentration an, die mit einer vorgegebenen relativen Ergebnisunsicherheit bestimmt werden kann. Die genaueren Kriterien werden

durch die DIN 32645 festgelegt. (Deutsches Institut für Normung e.V. 2008) Für die Bestimmung wird das stärkere Ion (*Target Ion*) verwendet.

Für die Bestimmung der beiden Parameter wurden sieben von Null verschiedene, dotierte Proben mit den Konzentrationen 5; 7,5; 10; 12,5 15; 20 und 25 ng/mL gemessen und entsprechend ausgewertet. Diese Messung wurde dreimal wiederholt.

Da für NAcT als endogene Substanz das Verfahren mittels DIN 32645 nicht optimal geeignet ist, wurde zusätzlich eine Abschätzung des LOD und LOQ mittels des Signal-Rausch-Verhältnisses vorgenommen. (Hess et al. 2018)

2.3.6 Wiederfindung und Matrixeffekte

- **Wiederfindung (*Recovery*):** Die Wiederfindung ist ein Maß für den Transfer des Analyten aus der untersuchten Probe in die zu messende Lösung.
- **Matrixeffekte:** Matrixeffekte sind definiert als eine direkte oder indirekte Veränderung des Signals, verursacht durch andere Analyten oder matrixeigene Substanzen. Hierbei kann es zu einer Signalverstärkung (*Ion Enhancement*) oder einer -unterdrückung (*Ion Suppression*) kommen.

Die Bestimmung erfolgte durch die Messung von jeweils sechs LoC- und HiC-Proben (30 und 800 ng/mL), die nach dem Protokoll extrahiert wurden. Hierfür wurden sechs verschiedene Leermatrices verwendet. Als Referenzwert wurden jeweils sechs Reinsubstanzlösungen mit denselben entsprechenden Konzentrationen hergestellt ($\cong 100\%$) und gemessen. Zusätzlich wurden die sechs verschiedenen Leermatrices ohne Analyten aufgearbeitet und die Extrakte entsprechend der gewählten Konzentrationen dotiert. Zur Berechnung wurden die absoluten Signale (Peakfläche) verwendet. Für die Messungen bezüglich NAcT wurde jeweils für jede Leermatrix eine Probe mit internem Standard aufgearbeitet und gemessen. Die daraus resultierenden Signale wurden von den im eigentlichen Versuch gemessenen Proben, die Proben in Laufmittel ausgeschlossen, abgezogen und für die Kalkulationen verwendet.

2.4 Erweiterte Validierung: Postmortale Proben

Zur Überprüfung der Anwendbarkeit der Methode auch bei der Nutzung von postmortalen Asservaten wurde ein Kollektiv von 31 postmortalen Blutproben von Fällen mit nachgewiesenem Alkoholkonsum gemessen. Die entsprechenden Proben wurden am Institut für Rechts- und Verkehrsmedizin (IRVM) bei rechtsmedizinischen Obduktionen entnommen, pseudonymisiert und anschließend bei -20 °C in herkömmlichen Plastikröhrchen gelagert. Die Einschlusskriterien für dieses Kollektiv sehen eine postmortale BAK > 1,0 ‰, sowie vorhandenes Schenkelvenen- oder Herzblut mit einem Mindestvolumen von 500 µL vor. Außerdem sollte der Verstorbene zum Todeszeitpunkt das 18. Lebensjahr vollendet haben. Zusätzlich sollte die vorgeschriebene Lagerungsdauer der Proben von 2 Jahren überschritten gewesen und das zugehörige Verfahren nicht offen sein.

Die Proben wurden im Rahmen der Validierung der Methode für postmortale Asservate durch den Ethikantrag mit dem Zeichen S-724/2020 (Nutzung der Asservate von Verstorbenen im Rahmen der Entwicklung und Validierung von forensisch-toxikologischer Analytik in biologischen Matrices) benutzt.

Die Probenaufarbeitung erfolgte analog wie bei allen anderen Versuchsanordnungen (siehe Kapitel 2.1.1) und für die Kalibration wurden Vollblutproben verwendet. Wie auch in den folgenden Anwendungen wurde für die Quantifizierung ein Grenzwert von 10 ng/mL (kleinster Kalibrationspunkt) gewählt. Darunter gemessene Werte wurden als nicht nachweisbar bzw. für die Statistik als 0 ng/mL ausgewiesen.

2.4.1 Fallbeispiel

Um die Anwendungsbezogenheit dieses Aspektes der Methode darzustellen, wird unter dem Punkt 3.3.3 ein Fallbeispiel vorgestellt, in welchem die Verwendung der entwickelten Multimethode in Kombination mit weiteren am IRVM etablierten Methoden notwendig war, um die Anfrage bezüglich der gemessenen Alkoholkonzentration im Leichenblut und Muskelgewebe des Verstorbenen zu beantworten. Hierbei wurde Oberschenkelgefäßblut, welches am IRVM in der rechtsmedizinischen Obduktion entnommen wurde, Leichenblut aus einem anderen Institut und der dort entnommene Urin untersucht. Neben der Multimethode wurden weitere Analysen auf das Begleitstoffmuster und dem EtG-, sowie EtS-Gehalt in Urin durchgeführt, um die Frage zu klären, ob der Verstorbene vor dem Tod Alkohol konsumiert

habe oder ob sich die gemessenen Konzentrationen auf postmortale Prozesse zurückführen lassen konnten.

2.5 Studienablauf und Details der durchgeführten Trinkversuche

Unter dem Zeichen S-520/2020 und dem Titel „Bestimmung der Alkoholbiomarkerkonzentrationen von Ethylglucuronid, Ethylsulfat, N-Acetyltaurin und Phosphatidylethanol im Rahmen von Trinkversuchen“ wurde von der Ethikkommission des Universitätsklinikums Heidelberg die Erlaubnis zur Durchführung zweier Selbstversuche mit Ethanol erteilt. Im Folgenden wird die Durchführung dieser Studien genauer erläutert.

Für die Studien wurden insgesamt 17 Personen rekrutiert, welche selbst einen moderaten Alkoholkonsum pflegen. Weitere Kriterien für die Teilnahme waren u.a. die Freiwilligkeit der Teilnahme, Volljährigkeit, unterzeichnete Einwilligungserklärung und ein siebentägiger Verzicht auf den Konsum von Alkohol und die Verwendung von alkoholhaltigen Produkten vor den eigentlichen Trinkversuchen. Die Planung der Studien hatte anfangs 20 Teilnehmer vorgesehen. Aufgrund der Einschränkungen durch die aktuelle SARS-CoV-2-Pandemie war es nicht allen Probanden möglich, an der Studie teilzunehmen. Zu den Ausschlusskriterien gehörten eine bestehende oder zurückliegende Drogen- und/oder Alkoholabhängigkeit, infektiöse oder chronische Erkrankungen, eine Schwangerschaft oder eine Interaktion von Alkohol mit einer bestehenden Medikation. Außerdem handelte es sich bei den durchgeführten Studien um prospektive, hypothesengenerierende Studien, welche nicht randomisiert, kontrolliert und offen durchgeführt wurden.

Zur Rekrutierung der Studienteilnehmer wurde eine Ausschreibung geschaltet. Eine Teilnahme war erst möglich, nachdem die Probanden detailliert informiert sowie über Inhalt, Wesen und Tragweite der Studien aufgeklärt wurden. Ebenso musste die unterschriebene Einwilligungserklärung vorliegen. Als Risiken, welche durch die Teilnahme an den Studien auftreten konnten, ergaben sich leichte Schmerzen bei den Blutentnahmen, wobei es in seltenen Fällen zu örtlichen Reizungen, Infektionen, Blutungen sowie Blutergüssen kommen konnte. Zusätzlich bestand die Gefahr einer Nervenentzündung mit oberflächlichen

Gefühlsstörungen. In Tabelle 10 sind die verschiedenen Probenarten, die benötigten Materialien, die geplanten Analysen sowie das benötigte Mindestvolumen dargestellt.

Tabelle 10: Darstellung des benötigten Probenmaterials, geplanter Analyse und dem Mindestvolumen

Probenart	Material	Analytik	Mindestvolumen
Vollblut	Lithium-Heparin-Röhrchen	Multimethode auf Biomarker	0,150 mL
Serum	Serum-Röhrchen	Blutalkoholkonzentration (GC-FID)	0,200 mL
Urin	Urin-Monovette	EtG/EtS (LC-MS/MS)	0,100 mL

Die genauen Produktinformationen bezüglich des verwendeten Materials sind am Ende dieses Kapitels detailliert aufgeführt (Tabelle 11). Für die Analytik benötigtes Material findet sich in dem gleichnamigen Kapitel 2.1.

Die Studien wurden jeweils in unterschiedlichen Zeiträumen durchgeführt, in welchen die Pharmakokinetiken der Alkoholbiomarker untersucht wurden. Die Probanden mussten an zwei unterschiedlichen Versuchstagen eine berechnete Menge Alkohol zu sich nehmen, um eine BAK von etwa 0,4 ‰ oder 0,8 ‰ zu erreichen. Am Tag des Konsums wurden Blut- und Urinproben entnommen, um die Kinetik detailliert darlegen zu können. In den darauffolgenden sieben Tagen wurden jeweils drei weitere Blut- und Urinproben erhoben. Neben der Einwilligungserklärung mussten zusätzlich ein Fragebogen zur sportlichen Aktivität in den Tagen vor dem Trinkversuch ausgefüllt werden, da N-Acetyltaurin endogen erhöht nach Ausdauersport im Körper vorhanden sein kann. Zusätzlich musste der AUDIT-Bogen (Saunders et al. 1993) zur Beurteilung des jeweiligen Trinkverhaltens, und der Fragebogen „COVID-19“ des Universitätsklinikums Heidelberg ausgefüllt werden. Der erwähnte AUDIT-Fragebogen findet sich im Anhang dieser Arbeit.

Die aufzunehmende Menge Alkohol wurde individuell über die Widmark-Formel für jeden Teilnehmer berechnet. Hierbei wurde zusätzlich der Abbau direkt nach dem Konsum, die Zeit, in welcher der Alkoholkonsum stattfinden sollte und die Art des aufgenommenen Alkohols berücksichtigt. Als Beispiel diene hier eine weibliche Person mit einem Gewicht von 55 kg. Bei einem Konsum von Wein mit 11 Vol-% innerhalb einer 0,5 h muss für das Erreichen einer maximalen BAK von 0,4 ‰ zwischen 0,17 und 0,21 L getrunken werden.

Vor dem Trinkbeginn wurde jedem Teilnehmer ein Venenverweilkatheter in eine periphere Vene gelegt und jeweils eine Leerprobe Blut abgenommen und eine Leerprobe Urin abgegeben. Das Legen der Kanülen und die Blutentnahmen wurden von dem diensthabenden Arzt oder einer ausgebildeten medizinisch-technischen Assistentin durchgeführt. Die Desinfektion der Haut wurde mit einem EtOH-freien Desinfektionsmittel durchgeführt. Vor jeder Blutentnahme wurde ein kleines Volumen Blut verworfen, um eine Verfälschung der eigentlichen Probe durch koaguliertes oder verdünntes Blut zu vermeiden. Um die Koagulation in den Venenverweilkathetern zu vermindern, wurde mit Natriumchlorid-Lösung gespült. Am Ende des ersten Versuchstages wurde abschließend der Venenverweilkatheter entfernt. Innerhalb einer halben Stunde sollte die berechnete Menge Alkohol von jedem Teilnehmer aufgenommen werden. Die Abnahme bzw. Abgabezeiten für jeweils eine Vollblut-, Serum- und Urinprobe sahen wie folgt aus: Zeitpunkt 0; 0,5, 1; 2; 3 und 4 h nach Trinkende. In der darauffolgenden Woche wurden die Probanden angehalten, weiterhin keinen Alkohol zu konsumieren und keine alkoholhaltigen Produkte zu verwenden. An den Tagen zwei, vier und sieben, wobei der Tag des Trinkversuches als erster Tag gesehen wird, kamen die Teilnehmer erneut an das IRVM, um eine Vollblut-, Serum- und Urinprobe abzugeben. Das entnommene Blut- und Urinvolumen belief sich auf etwa 7 mL mit interindividuellen Schwankungen.

Die Serumröhrchen wurden nach einem Tag 15 Minuten zentrifugiert (bei 4 °C) und das dadurch abgetrennte Serum in entsprechende Eppendorf-Gefäße überführt. Der Blutkuchen wurde verworfen. Wie auch für die Urinproben fand eine weitere Lagerung bei -20 °C statt. Die Vollblutproben in den Lithium-Heparin-Röhrchen wurden bei -80 °C gelagert.

Wurden alle erforderlichen Kriterien durch die Teilnehmer erfüllt, konnten die Proben in die Studien aufgenommen und durch die Mitarbeiter pseudonymisiert werden. War der Einwilligungserklärung zu entnehmen, dass eine weitere Verwendung der Proben außerhalb der genannten Studie widersprochen wurde, so wurden die Proben nach dem Abschluss der Studie entsorgt.

Die Messungen erfolgten jeweils mit den am IRVM validierten Methoden zur Bestimmung der BAK in Serum (Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektor (GC-FID)), EtG und EtS in Urin (LC-MS/MS) und der neu etablierten Multimethode zum Nachweis von EtG, EtS, NAcT

und PEth in Vollblut. Für letztere wurde ein Grenzwert für alle Biomarker von 10 ng/mL verwendet. Niedrigere Konzentrationen wurden als nicht nachweisbar bzw. für die Statistik als 0 ng/mL ausgewiesen.

Die Konzentrationen von EtOH, EtG, EtS, NAcT und PEth wurden in den entnommenen Blutproben bestimmt, sowie die EtG- und EtS-Konzentrationen in Urin. Um die Pharmakokinetikstudie entsprechend statistisch auswerten zu können, wurden die initialen Konzentrationen mit denen im weiteren Studienverlauf nach der Aufnahme von Alkohol verglichen. Anhand dieser Daten wurde geklärt, inwieweit der Konsum von Alkohol einen Einfluss auf die Bildung von Alkoholbiomarkern im gegebenen Kontext hat. Folgende pharmakokinetische Parameter wurden, insofern aufgrund der Datenlage möglich, bestimmt: c_{\max} , t_{\max} , k_e und $t_{1/2}$. Hierzu wurden Maße der empirischen Verteilung (Mittelwert, Standardabweichung, Median, Quantile, Minima und Maxima) gebildet. Eine Bestimmung aller genannter pharmakokinetischer Kenngrößen wurde nur dann durchgeführt, wenn mindestens die Hälfte der Probanden drei oder mehr messbare Konzentrationen (> 10 ng/mL) der Biomarker nach c_{\max} aufwiesen. Ansonsten wurden nur c_{\max} und t_{\max} bestimmt. Im Rahmen der Berechnungen zur BAK wurde neben c_{\max} und t_{\max} der mittlere Abbau pro Stunde und das Ende der Resorptionszeit bestimmt.

Die Dokumentation der Daten und die statistischen sowie pharmakokinetischen Auswertungen wurden mit Excel (Microsoft Excel 365 Pro Plus) ausgeführt und standen im Einklang mit den geltenden rechtlichen Voraussetzungen und der Deklaration von Helsinki.

Im Folgenden ist das benötigte Verbrauchsmaterial für die Durchführung der Trinkstudie in Tabelle 11 aufgeführt. Genauere Angaben zur Analytik und Verbrauchsmaterialien, welche nicht rein für die Durchführung der Studie verwendet wurden, finden sich im Kapitel „2.1 Material“.

Tabelle 11: Verbrauchsmaterialien für den Trinkversuch

Bezeichnung	Hersteller	Standort	Land
S-Monovette® 7.5 mL LH-Gel	Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht	Deutschland
S-Monovette® 7.5 mL Z	Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht	Deutschland
Urin-Monovette® 8,5 mL	Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht	Deutschland
Vasofix® Safety 20 G	B. Braun AG	Melsungen	Deutschland
NaCl 0,9 %	B. Braun AG	Melsungen	Deutschland
Cosmopor® I.V.	Paul Hartmann AG	Heidenheim	Deutschland
Combination Cap	Fresenius Kabi AG	Bad Homburg	Deutschland
Cutasept® F	Bode Chemie GmbH	Hamburg	Deutschland
Discardit™ II	Becton Dickinson GmbH	Heidelberg	Deutschland
Multi-Adapter	Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht	Deutschland
Leukoplast® Soft	BSN medical GmbH	Hamburg	Deutschland
Sterican® 0,45 x 12 mm	B. Braun AG	Melsungen	Deutschland
Safety-Multifly® 21G 200 mm lang	Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht	Deutschland
Safety-Multifly® 21G tube 200 mm	Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht	Deutschland
Urinbecher mit rotem Deckel	Paul Boettger GmbH & Co. KG	Bodenmais	Deutschland

2.6 Analytik von EtG und EtS in Urin

Die Konzentrationen von EtG und EtS aus den durchgeführten Trinkversuchen wurden zusätzlich via einer validierten LC-MS/MS-Methode am IRVM in Urin bestimmt. Hierzu wurden 100 µL des zu untersuchenden Urins mit einem internen Standard-Mix von EtG-D₅ und EtS-D₅ (1 µg/mL) versetzt. Zusätzlich wurden Proben in Leerurin für eine Kalibration mit dem in Tabelle 12 dargestellten Pipettierschema erstellt.

Tabelle 12: Pipettierschema für die Bestimmung von EtG und EtS im Urin

Zielkonzentration [ng/mL]	Volumen [µL]	Konzentration Stammlösung [µg/mL]	Interner Standard [µL]
0 ohne IS	-	-	
0 mit IS	-	-	10
10	1,5	1,0	10
25	3,75	1,0	10
50	7,5	1,0	10
100	1,5	10	10
250	3,75	10	10
500	7,5	10	10
1000	15	10	10

Nach der Zugabe des ISTD und darauffolgendem Mischen, wurde zu jeder Probe 250 µL MeOH gegeben und erneut für etwa eine Minute gevortext. Anschließend wurden die Proben bei 2,1 x 1000 g zentrifugiert und der resultierende, organische Überstand in HPLC-Gläschen überführt und anschließend unter Stickstoff zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wurde daraufhin in 50 µL des Laufmittel A rückgelöst. Für die chromatographische Trennung wurden als Laufmittel 5 mM Ammoniumformiat, pH 3,3 (A) und MeOH + 0,1 % FA (B), sowie eine oben aufgezeigte Luna® Omega 5 µm PS C18-Säule verwendet. Eine Auftrennung der Analyte erfolgte mittels einer Gradientenelution. Weitere Details sind der Arbeitsvorschrift *AM-FT-137* zu entnehmen. Für die Herstellung des Laufmittel A wurden 0,32 g Ammoniumformiat in 900 mL Ampuwa Wasser gelöst und mit konzentrierter Ameisensäure auf einen pH-Wert von 3,3 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung auf ein Volumen von 1000 mL mit dem zuvor genutzten Wasser aufgefüllt.

2.7 Analytik zur Bestimmung der BAK in Serum

Für diese Analytik wurde die Technik der Gaschromatographie mittels Dampfphaseanalyse unter der Zuhilfenahme eines Flammenionisationsdetektors (HS-GC-FID) angewendet. Die Kalibration wurde mit wässrigen Standardlösungen der Konzentrationen 0,2; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 und als Stützpunkt 4,0 g/L EtOH erstellt. Die Auswertung der generierten Daten erfolgte in Promille ‰. Das benötigte Probenvolumen (Serum) belief sich auf 200 µL, wobei die Probe mit 1,5 mL der Lösung des internen Standards (1 g/L *tert.*-Butanol in Wasser) verdünnt wurde. Die befüllten und verschlossenen Headspacegläschen wurden auf den beheizbaren Autosampler gestellt. Nach einer Inkubation bei 65 °C wurde ein Teil des Gemisches aus dem Dampfraum entnommen und auf einer GC-Säule injiziert. Anschließend erfolgte eine chromatographische Auftrennung und Detektion mittels FID.

2.8 Kreatininbestimmung in Urin

Da die Urinproben aus dem Trinkversuch durch die übermäßige Aufnahme von alkoholfreien Getränken stark verdünnt sein könnten, wurden für die Messungen von EtG und EtS in Urin zusätzlich die Kreatininkonzentrationen bestimmt um eine Normierung (100 mg/dL)

durchführen zu können. Die Bestimmung erfolgt kolorimetrisch unter der Zuhilfenahme der Jaffé-Reaktion, welche die Grundlage für den DRI® Creatinine-Detect-Test darstellt. Durch die Zugabe eines alkalischen Pikrats bildet sich mit Kreatinin ein roter Kreatinin-Pikrat-Komplex (Meisenheimer-Komplex). Durch die resultierende Farbänderung kann direkt proportional zur Farbintensität die Kreatininkonzentration bei 505 nm bestimmt werden. Die Messungen erfolgten an einem AU480-Gerät.

2.9 Kooperation mit dem Krankenhaus Salem

Eine Kooperation mit der Abteilung Innere Medizin des Krankenhauses Salem, die jährlich hunderte Entgiftungen von Alkoholabhängigen durchführt, wurde initiiert. Prof. Dr. med. Sebastian Müller leitet die Abteilung für die Koordination der Entzugsklinik. Im Rahmen eines gemeinschaftlichen Projekts, wurden die Proben von 100 Patienten zu Beginn (A) und Ende (E) des Aufenthaltes untersucht. Die Daten wurden von den Verantwortlichen für die Studie pseudonymisiert und an das IRVM weitergegeben. Zur stationären Aufnahme der Probanden wurden weitere Daten aufgenommen, wie beispielsweise das Alter, Gewicht, Geschlecht, Diagnose und andere Erkrankungen. Außerdem wurden einige weitere Parameter zu Beginn und Ende des Entzugs gemessen, wie die GGT-Konzentration, Lebersteifigkeit und Leberverfettung.

Die Blutproben für die Messung wurden mit Hilfe von EDTA K-Monovetten (Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht) entnommen, später in Safe-Lock Tubes überführt und bei -20 °C gelagert. Wie auch in den anderen Anwendungen wurde für die Quantifizierung ein Grenzwert von 10 ng/mL (kleinster Kalibrationspunkt) gewählt. Darunter gemessene Werte wurden als nicht nachweisbar bzw. für die Statistik als 0 ng/mL ausgewiesen.

2.10 Proben und Probenlagerung

- Vollblutproben (Studienteilnehmer, Probanden Salem-Krankenhaus)
- Serumproben (Studienteilnehmer)
- Urinproben (Studienteilnehmer)

- Oberschenkelgefäßblut (Sektionsfälle IRVM)

Die Lagerung von Vollblut-, Serum- und Urinproben als auch von Oberschenkelgefäßblut erfolgt in der Regel bei labortypischen Temperaturen von -20°C.

Um einen Nachweis aller vier Alkoholbiomarker zu ermöglichen, wurde als Matrix Vollblut gewählt. Da eine *in vitro* Bildung von PEth in Anwesenheit von Ethanol auch bei normalen Kühltemperaturen eintreten kann, sollten Vollblutproben für eine Vermessung von PEth unmittelbar nach der Abnahme bei -80°C gelagert werden. Während diese Vorgaben für die Vollblutproben aus den beiden Trinkversuchen eingehalten wurden, waren die nicht explizit für die entwickelte Analytik erhobenen Blutproben im Rahmen der Fragestellungen zur Leichentoxikologie und Lebersteifigkeit (Salem-Krankenhaus) bei labortypischen Bedingungen von -20 °C gelagert.

2.11 Auswertung

Für die allgemeine Auswertung der einzelnen anwendungsbezogenen Teile dieser Arbeit, wurden für alle gemessenen Alkoholbiomarker die Ergebnisse aus den ersten Übergängen verwendet.

2.11.1 Statistische Auswertung

Arithmetisches Mittel

Bei dem arithmetischen Mittel \bar{x} , auch arithmetischer Mittelwert genannt, handelt es sich um die Summe aller Einzelwerte x_i aus einer Datenreihe, welche durch die Anzahl der Einzelwerte n dividiert wird. Die Formel wird im Folgenden dargestellt:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

Median

Durch den Median \tilde{x} wird die geordnete Reihe der Messwerte in die unteren und oberen 50 Prozent unterteilt. Folglich finden sich unterhalb und oberhalb des Median exakt gleich viele Messwerte. Die zugehörige Formel ist im Folgenden abgebildet:

$$\tilde{x} = \begin{cases} \frac{x_{n+1}}{2} & \text{für } n \text{ ungerade} \\ \frac{1}{2} \left(x_{\frac{n}{2}} + x_{\frac{n}{2} + 1} \right) & \text{für } n \text{ gerade} \end{cases}$$

Standardabweichung und relative Standardabweichung

Die Formel für die Standardabweichung (SD) ist im Folgenden dargestellt:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Hierbei stellt x_i alle Einzelwerte und \bar{x} den Mittelwert dieser Einzelwerte dar. Die Anzahl der Freiheitsgrade ist definiert als die Differenz $n - 1$. Somit ergibt sich die SD durch die Wurzel der quadrierten Differenz von x_i und \bar{x} dividiert durch die Freiheitsgrade.

Abgeleitet aus der SD wird vor allem in analytischen Bereichen die relative Standardabweichung (RSD) in % verwendet. Mit dieser Darstellungsform können Streuungen verschiedener Parameter, z.B. von Konzentrationen, dargestellt werden. Zur Bestimmung der RSD wird die zuvor berechnete SD durch das arithmetischen Mittel \bar{x} dividiert und anschließend mit dem Faktor 100 multipliziert. Die zugehörige Formel ist im Folgenden abgebildet:

$$RSD [\%] = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100$$

Konfidenzintervall

Nachdem der exakte Wert einer Messung nie absolut getroffen wird, wird ein Vertrauensbereich bzw. Konfidenzintervall definiert, in welchem der wahre Werte zu finden ist. Im Falle des 95 %-Konfidenzintervalls wird der Bereich definiert, in welchem der wahre Wert zu 95 % auffindbar ist.

Korrelationsanalyse

Um den Zusammenhang einzelner Variablen zueinander zu überprüfen wird die Korrelationsanalyse verwendet. Hierbei wird der Korrelationskoeffizient R als Maß benutzt, um die Richtung und Stärke der gesamten Analyse darzustellen. R variiert zwischen -1 und 1 , wobei die Korrelation am stärksten ist, je näher der Wert bei 1 liegt. Wird R durch den Wert 0 beschrieben, besteht keine Korrelation.

Ein weiterer Parameter ist das Bestimmtheitsmaß R^2 , welches in Regressionsanalysen verwendet wird, um einen linearen Zusammenhang darzustellen.

Regressionsanalyse

Diese Methode dient der Darstellung eines Zusammenhangs zwischen einer abhängigen und einer unabhängigen Variablen, definiert durch x - und y -Werte. Kann dieser Zusammenhang in der Form $y = bx + a$ dargestellt werden, handelt es sich um eine lineare Regression, wobei a den Ordinatenabschnitt definiert und b die Steigung der Geraden darstellt. Die daraus resultierende Regressionsgerade ist die Gerade, welche eine Minimierung der quadrierten Vorhersagefelder bedingt.

2.11.2 Statistische Visualisierung der Konzentrationen der einzelnen Biomarker

Box-Whisker-Plot

Zur übersichtlicheren visuellen Darstellung wird auf die Verwendung eines Box-Whisker-Plots, kurz Box-Plot, zurückgegriffen. Diese Darstellungsform basiert auf einem Fünf-Punkt-Diagramm, in welchem als erste Parameter der Median sowie das zugehörige Minimum und Maximum des gesamten Datensatzes ermittelt werden. Danach erfolgt die Festlegung der Quantile Q_1 und Q_3 . Ersteres beschreibt die 25 % der Werte unterhalb und zweiteres die 25 %

oberhalb des Medians. Diese Parameter stellen jeweils die Grenzen der Box dar, wobei der Median als Strich in der Box markiert wird. Das Minimum und Maximum des Datensatzes werden als entfernteste Ausreißer dargestellt.

Kruskal-Wallis-Test

Um die Mediane untereinander zu vergleichen, wird auf den parameterfreien Kruskal-Wallis-Test zurückgegriffen. Dieser hilft dabei festzustellen, ob die Messwerte einer gemeinsamen Grundgesamtheit zuzuordnen sind, oder ob ein signifikanter Unterschied besteht. Für die hier vorliegende Fragestellung wurde ein Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ festgelegt und die Nullhypothese H_0 wurde mit $\tilde{x}_1 = \tilde{x}_2$ definiert, wobei $\tilde{x}_{1,2}$ die Mediane der zu untersuchenden Datensätze beschreibt. Um die Hypothese zu prüfen wurde zunächst der Prüfwert (H-Wert) bestimmt und mit dem zugehörigen Wert aus der Chi-Tabelle verglichen. War ersterer geringer als der Prüfwert aus der Tabelle, so konnte die Nullhypothese angenommen werden und folglich gab es keinen Unterschied zwischen den beiden Medianen.

2.11.3 Pharmakokinetische Parameter

C_{\max} und t_{\max}

Bei C_{\max} handelt es sich um eine pharmakokinetische Kenngröße mit welcher die höchste erreichte Konzentration während der aufgezeichneten Zeitspanne beschrieben wird. Korrespondierend dazu beschreibt t_{\max} den Zeitpunkt, zu welchem die maximale Konzentration nach der Aufnahme bzw. dem Beginn der Bildung erreicht wurde. Für diese beiden Kenngrößen wurde, insofern möglich, der maximale Wert jedes Teilnehmers innerhalb einer Versuchskohorte bestimmt. Anschließend wurden die oben aufgeführten Parameter des Medians, Mittelwerts, der Standardabweichung und der relativen Standardabweichung berechnet, um die Ergebnisse adäquat vergleichen zu können.

Eliminationskonstante k_e

Aus den unterschiedlichen Geschwindigkeiten für die einzelnen Prozesse, mit denen die aufgenommene Substanz aus dem Blut ausgeschieden wird, ergibt sich die Eliminationskonstante k_e . Diese wurde, wenn möglich, mit der Einheit $[h^{-1}]$ für die betreffenden Teilnehmer bestimmt, insofern mindestens drei messbare Konzentrationen in

der Eliminationsphase vorlagen. Die betreffenden Konzentrationen wurden logarithmiert und gegen die Zeit aufgetragen. Aus der daraus resultierenden Geraden ($\log[c]$ gegen die Zeit) konnte mit linearer Regression eine Geradengleichung abgeleitet werden. Mit Hilfe der beinhalteten Steigung (m) war es möglich k_e zu berechnen:

$$k_e = \ln(10) \times m$$

Aus den daraus resultierenden Einzelwerten wurden wie zuvor beschrieben die Parameter Median, Mittelwert, Standardabweichung und relative Standardabweichung berechnet.

Eliminationshalbwertszeit $t_{1/2}$

Mit Hilfe der Eliminationskonstanten k_e konnten abschließend die individuellen Eliminationshalbwertszeiten $t_{1/2}$ berechnet und anschließend wieder statistisch ausgewertet werden. Diese Kenngröße gibt an, in welchem Zeitintervall sich die vorhandene Konzentration jeweils halbiert. Für die Berechnung der Eliminationshalbwertszeit $t_{1/2}$ wurde folgende Formel verwendet:

$$t_{\frac{1}{2}} = \frac{\ln(2)}{k_e}$$

3 Ergebnisse

Im folgenden Kapitel wird zunächst die Methodenentwicklung und -validierung aufgezeigt. Anschließend werden die Ergebnisse der erweiterten Validierung in postmortalen Blutproben dargestellt, wobei zusätzlich ein Fallbeispiel aufgezeigt wird. Außerdem wurde die Anwendung der Methode durch die Analytik von authentischen Proben aus zwei Trinkversuchen und Patienten einer Alkoholentzugsklinik verifiziert.

3.1 Methodenentwicklung

Die Entwicklung der Methode erfolgte anfangs mit reinen Analyten in MeOH, um eine passende Säule zu finden, welche den analytischen Standards genügen konnte die chemisch sehr unterschiedlichen Substanzen voneinander zu trennen. Zusätzlich wurden in diesem Stadium der Methodenentwicklung verschiedene Laufmittel und Gradienten getestet, um die chromatographische Separierung zu verbessern. Anschließend musste eine adäquate Extraktion für die Analyten aus der Matrix Vollblut entwickelt werden, um durch die massenspektrometrische Detektion intensive Signale zu generieren. Schließlich musste nach der Festlegung des Extraktionsverfahrens ein passendes Lösungsmittel für das Rücklösen des Probenrückstandes gefunden werden, um alle Substanzen nachweisen zu können. Ebenso war es notwendig, ein Injektionsvolumen festzulegen, welches für alle Analyten eine gute Intensität und Peakform garantierte.

3.1.1 Chromatographische Trennung und Extraktionsverfahren

Zunächst wurde für die Methodenentwicklung eine Luna Omega PS C18-Säule erprobt, da diese für die etablierte und validierte Methode zum Nachweis von EtG und EtS in Serum und Urin am IRVM verwendet wird. Hierbei wurden verschiedene Gradienten, Flussgeschwindigkeiten und Laufmittel getestet. Zunächst wurden Gradienten mit einem überwiegend wässrigen Anteil als Startbedingung angewendet, die nach jedem Lauf durch eine ausreichende Equilibrierungsphase wiedereingestellt wurden. Innerhalb des Gradienten fand eine kontinuierliche Steigerung des organischen Anteils statt. Hierbei wurde der organische Anteil zum Start sukzessive erhöht, mit dem Ziel PEth besser von der chromatographischen Säule zu lösen. Am aussichtsreichen waren Gradienten mit erhöhtem

organischen Anteil als Startbedingungen, einer kurzen Phase, in welcher der wässrige Anteil zunimmt, gefolgt von einer stetigen Wiedereinstellung der organischen Ausgangszusammensetzung. Allerdings konnten die Komponenten zu keinem Zeitpunkt zufriedenstellend aufgetrennt werden. Die einzelnen Peaks waren auch durch die Verwendung von verschiedenen Puffersystemen, welche sich aus Ammoniumacetat oder Ammoniumformiat mit verschiedenen pH-Werten zusammensetzten, nicht ohne Überschneidungen voneinander zu trennen. Insbesondere PEth oder EtG zeigten ein Tailing in verschiedenen Laufmittelkonstitutionen und Gradienten auf. Insgesamt war mit diesem Säulentyp eine zufriedenstellende Elution des Analyten PEth bei gleichzeitiger chromatographischer Trennung von NAcT, EtG und EtS nicht realisierbar.

Nach einer kurzen Versuchsreihe mit einer Phenyl-Hexyl-Säule stellte sich heraus, dass dieser Säulentyp insbesondere für die hydrophilen Moleküle eine unzureichende Retention aufwies und eine Auftrennung der drei hydrophilen Biomarker EtG, EtS und NAcT nicht möglich war.

Da die generierten Ergebnisse nicht zufriedenstellend für eine verlässliche chemisch-toxikologische Analytik waren, wurde auf eine HILIC-Z-Säule gewechselt. Bei dieser Säule wurden die zuvor beschriebenen Gradienten mit einem hauptsächlich organischen Anteil mit kurzer wässriger Phase genutzt. Die ersten Testungen erfolgten jeweils mit ACN und MeOH mit dem Zusatz von 0,1 % Ameisensäure. Als Puffersalz wurde auf Ammoniumformiat zurückgegriffen, da Ammoniumacetat und Wasser, jeweils mit einem sauren Zusatz, Probleme bei der Analytik von EtS generierten. Die Wahl fiel schlussendlich auf einen 15 mM Ammoniumformiat-Puffer mit 0,1 % Ameisensäure (Laufmittel A) und ACN mit 0,1 % Ameisensäure (Laufmittel B). Der Gradient begann mit einem Verhältnis von 30:70 (A:B, v/v), wurde für eine Minute gehalten und dann über 11 Minuten zu einer Zusammensetzung von 1:99 (A:B, v/v) verändert. Nach einem anschließenden Plateau von einer Minute bei diesen Bedingungen, wurden die Ausgangsbedingungen über fünf Minuten wiedereingestellt. Mit dieser Methode konnte eine ausreichende Auftrennung der Analyten erzielt werden. Die Retentionszeiten ergaben wie folgt aus: EtG: 1,82 min, EtS: 5,33 min, NAcT: 5,14 min und PEth: 3,71 min. Ein entsprechendes Chromatogramm der Reinsubstanzen, mit einer Konzentration von 100 ng/mL je Analyt in MeOH, ist in Abbildung 14 dargestellt.

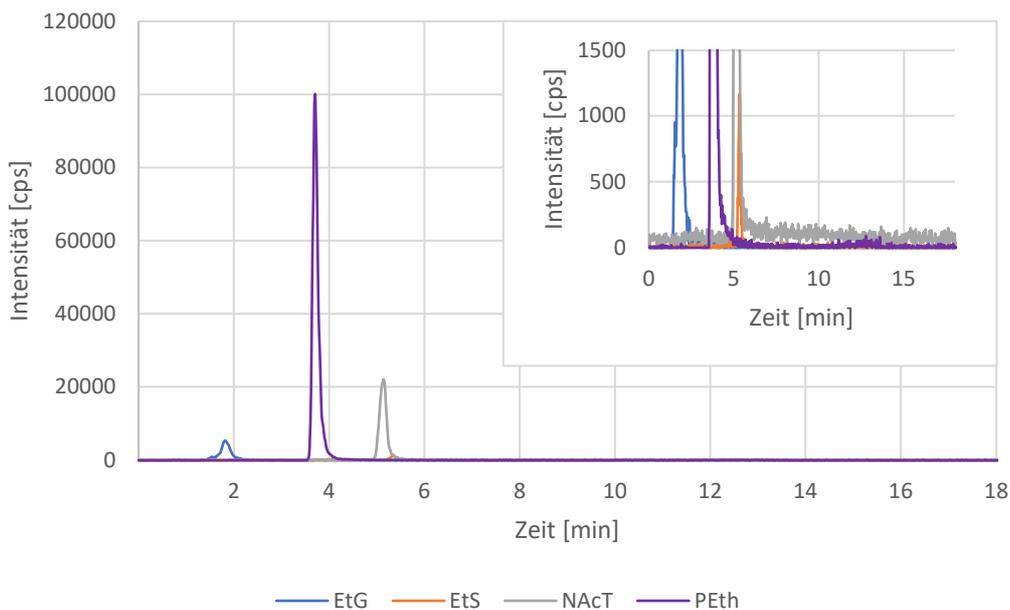


Abbildung 14: Chromatogramm der Reinsubstanzen (jeweils 100 ng/mL) in MeOH auf der HILIC-Z-Säule, inklusive einer Detaildarstellung für EtS

Im Folgenden wurden daher unterschiedliche Probenaufarbeitungen von Vollblut durchgeführt und modifiziert. (Faller et al. 2011; Luginbühl et al. 2019) Hierbei wurden Fällungen mit verschiedenen Lösungsmittelzusammensetzungen und Festphasenextraktionen mit diversen Säulenmaterialien getestet (Strata™-X, Strata™-X-AW, Phree™). Durch die verschiedenen Aufarbeitungsvorschriften war es nicht möglich, die Analyte in den untersuchten Probenlösungen nachzuweisen. In weiteren Versuchsreihen stellte sich heraus, dass dies nicht in der Probenaufarbeitung begründet lag, sondern, dass die HILIC-Phase für die Matrix Vollblut unter den gegebenen Bedingungen nicht geeignet war. Insbesondere PEth konnte von den anderen Phospholipiden in der Probenlösung nicht ausreichend chromatographisch aufgetrennt werden und war aufgrund von Ionensuppression nicht detektierbar. Ein beispielhaftes Chromatogramm für ein durchgeführtes Extraktionsverfahren ist in Abbildung 15 dargestellt.

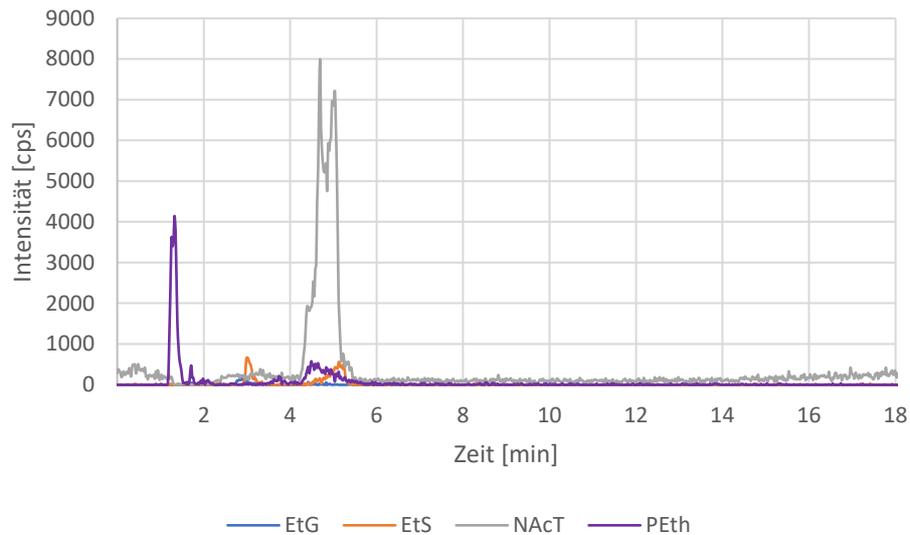


Abbildung 15: Chromatogramm einer extrahierten Vollblutprobe (100 ng/mL pro Alkoholbiomarker) auf der HILIC-Z-Säule

Daraufhin musste ein neues Säulenmaterial gefunden werden, welches mit der Matrix Vollblut kompatibel war und die sehr unterschiedlichen Analyten auftrennen konnte. Schließlich fiel die Wahl auf eine Luna Omega Sugar-Säule, welche eine neuartige HILIC-Technologie mit thermisch modifizierten vollporösen Partikeln kombiniert, wodurch Komponenten mit verschiedenen chemischen Charakteristika aufgetrennt werden können, insofern die Beschaffenheit der mobilen Phase entsprechend angepasst wird. (Phenomenex 2018) Die mobile Phase musste den Ansprüchen der einzelnen Analyten genügen, weshalb für die beschriebene Säule ein spezieller Gradient gewählt wurde. Hierbei zeigte MeOH als organische Komponente des Laufmittels das geringste Potential, wohingegen eine Kombination aus ACN und iProp (85:15, v/v) mit einem 0,1 % Zusatz von Ameisensäure dazu führte, dass alle Substanzen mit ausreichender Intensität, scharfer Peakform und guter Retention nachweisbar waren. Bei der Wahl des wässrigen Puffers zeigte Ammoniumformiat klare Vorteile gegenüber Ammoniumacetat als Puffersalz, da bei Nutzung von Ammoniumacetat der Analyt EtG nicht mehr nachweisbar war. Eine Konzentration von 25 mM Ammoniumformiat in Wasser bei einem pH-Wert von 3,3 lieferte die besten Ergebnisse. Ein Chromatogramm der einzelnen Alkoholbiomarker mit jeweils einer Konzentration von 100 ng/mL in MeOH ist in Abbildung 16 dargestellt.

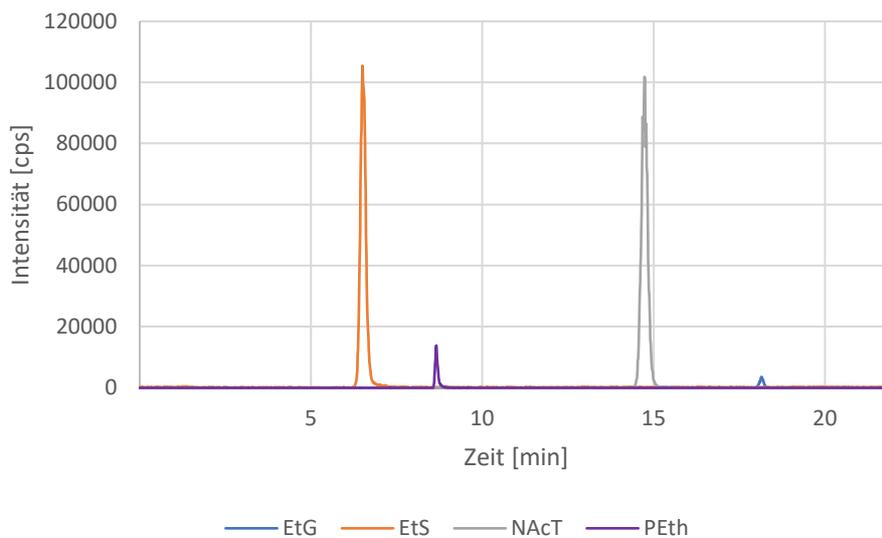


Abbildung 16: Chromatogramm der Reinsubstanzen (jeweils 100 ng/mL) in MeOH auf der Luna Omega Sugar-Säule

Durch eine simple Fällung mit MeOH war es möglich, alle zu bestimmenden Substanzen aus der Matrix Vollblut zu extrahieren und mit der entwickelten Methode analytisch nachzuweisen. In Abbildung 17 sind hierzu alle Substanzen mit den Konzentrationen 25, 250 und 1000 ng/mL aus aufgestockten und extrahierten Vollblutproben dargestellt.

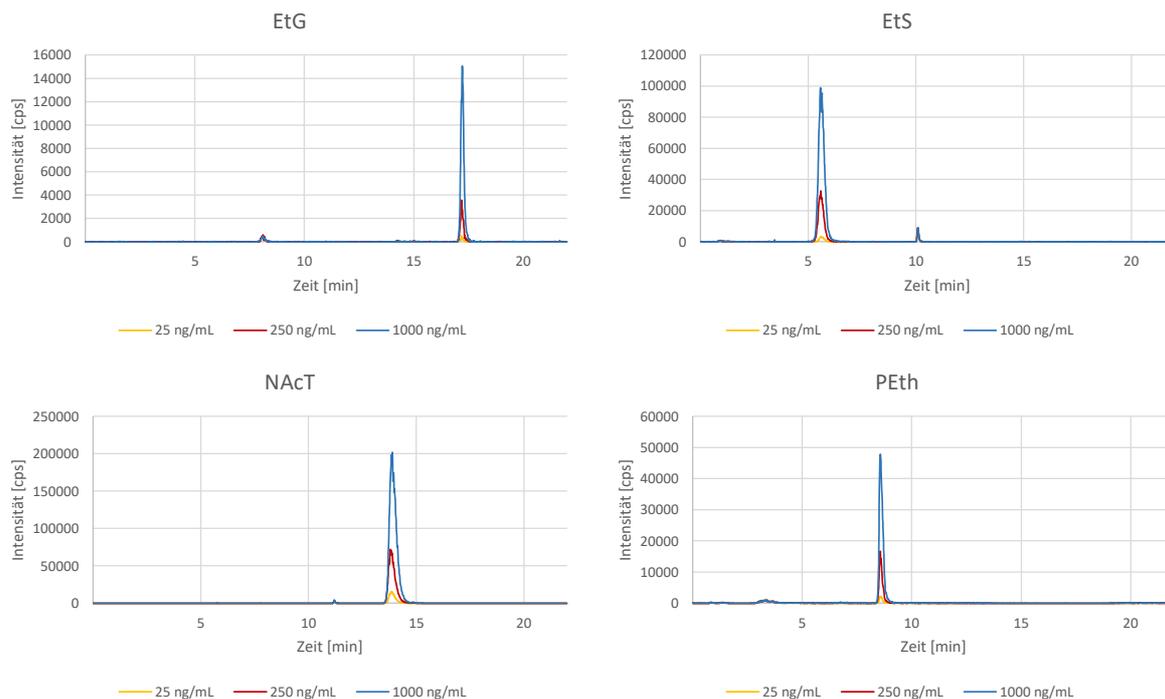


Abbildung 17: Chromatogramme der einzelnen Alkoholbiomarker nach einer Extraktion aus Vollblut mit den entsprechenden Konzentrationen 25, 250 und 1000 ng/mL auf der Luna Omega Sugar-Säule

3.1.2 Festlegung des Rücklösemittels und Injektionsvolumens

Die Intensität aller vier Alkoholbiomarker in Reinform war in dem zur Entwicklung der Methode verwendeten Lösungsmittel zufriedenstellend. Nach dem Wechsel in die Matrix Vollblut sank die Intensität von EtG drastisch ab, da die bisherige Zusammensetzung des Lösungsmittels zum Nachweis aller Biomarker in Reinform nicht fähig war, EtG adäquat aus dem getrockneten Probenrückstand zu lösen. Nach mehreren Versuchen mit verschiedenen Lösungsmittel- und Pufferzusammensetzungen fiel die Wahl auf eine Mischung von Ethylacetat/MeOH (50:50, v/v) mit einem Volumen von 75 μ L, da hierbei die besten Ergebnisse bezüglich der Intensitäten der Analyten generiert werden konnten. Danach wurde das Injektionsvolumen angepasst, wobei insbesondere für NAcT und EtG ein Kompromiss gefunden werden musste. Bei einem höheren Volumen war die Intensität von EtG verstärkt, jedoch war die Peakform und -breite von NAcT nicht zufriedenstellend. Bei einem zu geringen Injektionsvolumen war zwar die Peakform für NAcT ansprechend, jedoch die Intensität von EtG nicht ausreichend. Bei einem Volumen von 7 μ L konnte der beste Kompromiss gefunden

werden. Zum Vergleich ist in Abbildung 18 ein Chromatogramm der Substanz NAcT bei den Injektionsvolumina von 3 und 10 μL abgebildet.

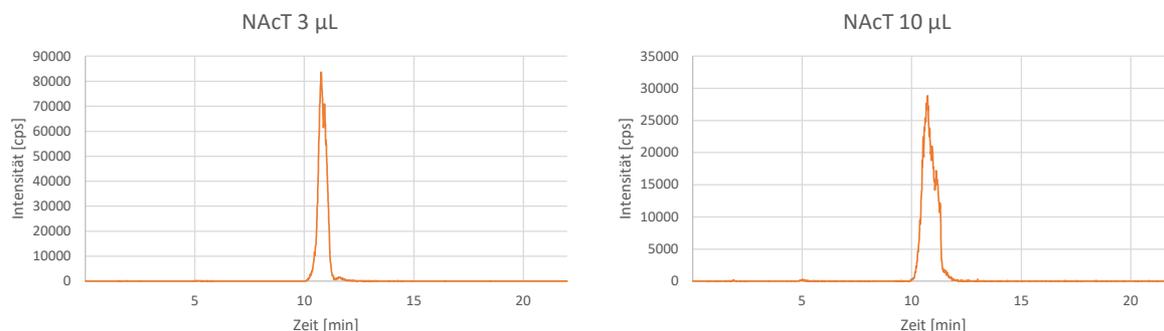


Abbildung 18: Chromatogramme von NAcT bei den Injektionsvolumina 3 und 10 μL

3.1.3 Retentionszeiten und Chromatogramm einer authentischen Probe

Nach Abschluss der Methodenentwicklung konnten die in Tabelle 13 gelisteten Retentionszeiten für die einzelnen Alkoholbiomarker festgestellt werden. Da es sich bei den internen Standards der Methode um die deuterierten Analyten (EtG-D₅, EtS-D₅, NAcT-D₄, PEth-D₅) handelt, waren die Retentionszeiten mit denen der zugehörigen Alkoholbiomarker identisch.

Tabelle 13: Retentionszeiten der einzelnen Alkoholbiomarker

Biomarker	Retentionszeit [min]
EtG	16,7
EtS	5,1
NAcT	13,3
PEth	8,5

Beispielhaft ist ein Chromatogramm abgebildet, um die Retentionszeiten der einzelnen Biomarker in einer authentischen Probe darzustellen (Abbildung 19). Hierbei handelt es sich um die Blutprobe des Probanden 6 aus dem ersten Trinkversuch zum Zeitpunkt 4 h.

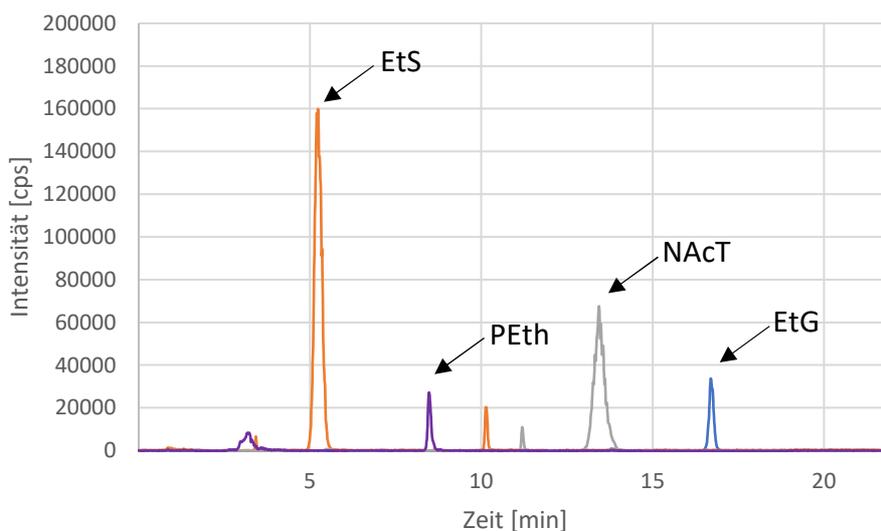


Abbildung 19: Beispielhaftes Chromatogramm eines Probanden aus dem ersten Trinkversuch

3.1.4 Synthese von NAcT-D₄

Die Reinheitsprüfung und Kontrolle des Syntheseproduktes fand mittels ¹H-Kernspinresonanzspektroskopie (¹H-NMR, Abbildung 20) statt. Das Spektrum wurde auf einem Varian Mercury (300 MHz) NMR System aufgenommen. Hierfür wurden etwa 2 mg NAcT-D₄ in 45 mL MeOH-D₄ gelöst und in ein 1,7 mm NMR-Röhrchen überführt. Das Spektrum wurde mit MestReNova Software (Version 9.0.1) ausgewertet. Die chemischen Verschiebungen (*Chemical Shifts*; δ) sind in *Parts per Million* (ppm) angegeben und das deuterierte Lösungsmittel (CD₃OD δ = 3.31 ppm) wurde als interner Referenzpeak benutzt. Das Spektrum wurde mit automatischem Phasing und einer Basislinienkorrektur behandelt. Die Auswertung des in Abbildung 15 gezeigten Protonen-NMR ergab folgende Signalverteilung: ¹H NMR (300 MHz, Methanol-D₄): δ = 2,00 (s, 3H). Die chemischen Verschiebungen im aufgenommenen ¹H-NMR stimmen mit den Vorhersagen und den Angaben in der Literatur für NAcT-D₄ überein. (Luginbühl et al. 2016)

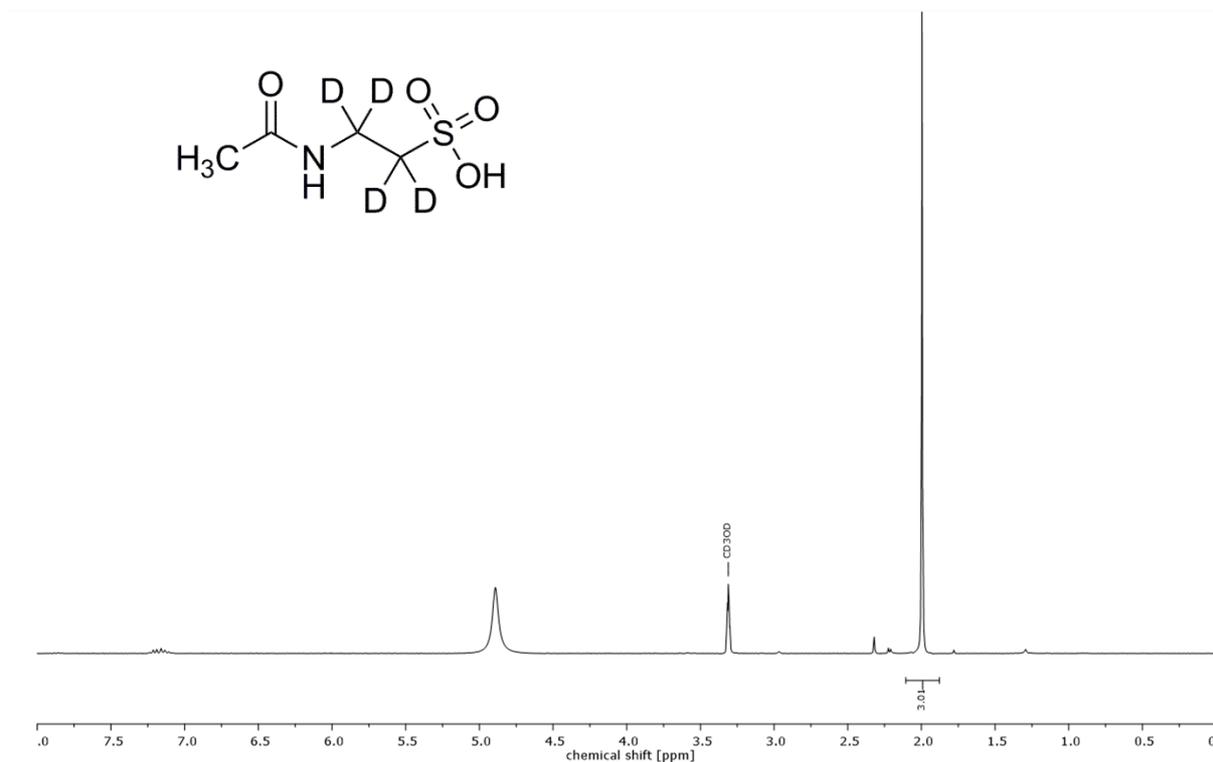


Abbildung 20: ^1H -NMR Spektrum von NAcT-D₄

3.2 Validierung

Um die Qualität und Vergleichbarkeit von Analyseergebnissen zu gewährleisten, muss eine analytische Methode vor dem Einsatz in der forensischen Toxikologie validiert werden. Hierfür bietet beispielsweise die GTFCh einen entsprechenden Leitfaden. (Peters et al. 2009) Diese Vorgehensweise dient dazu eine entwickelte Methode auf ihre Eignung für den vorgesehenen Bestimmungszweck zu testen. Hierdurch bieten Analysenbefunde, welche durch eine validierte Methode erhoben wurden, die Basis für eine verlässliche Interpretation und sind zusätzlich im Zweifelsfall schwer anfechtbar.

Die Rohdaten zu sämtlichen folgenden Ergebnissen finden sich im Anhang der Arbeit.

3.2.1 Selektivität

Um die Selektivität der Methode für die gesuchten Parameter zu bestätigen, wurde Leermatrix ohne internen Standard (Blank-Proben), Leermatrix mit internem Standard (Nullproben) und Leerproben, welche mit 27 anderen Substanzen versetzt wurden, gemessen. Im Falle der Leerproben zeigten sich keine Störsignale im Bereich der definierten Retentionszeiten von

EtG, EtS und PEth. Für EtG konnten keine matrixbedingten Signale in den gemessenen Proben detektiert werden. Bei EtS und PEth erzeugten die verwendeten Matrices zwar Störsignale, jedoch konnte durch die chromatographische Auftrennung erreicht werden, dass die eigentlichen Peaks der Analyten dadurch nicht überlagert wurden. NAcT war in allen Proben (Leerproben, Nullproben und aufgestockte Proben) nachweisbar. In den Nullproben waren alle internen Standards (EtG-D₅, EtS-D₅, NAcT-D₄ und PEth-D₅) in einer ausreichenden Intensität zu erkennen und EtG, EtS und PEth nicht nachweisbar. Für die 27 getesteten Substanzen konnten keine Interferenzen mit den vier untersuchten Alkoholbiomarkern festgestellt werden.

3.2.2 Linearität

Für alle vier Alkoholbiomarker wurde ein Kalibrationsbereich mit den Punkten 10, 25, 50, 100, 250, 500 und 1000 ng/mL definiert, über welchen die Linearität der Methode getestet wurde. In Tabelle 14 sind die entsprechenden Biomarker mit ihren Regressionsgleichungen, dem dazugehörigem Bestimmtheitsmaß R^2 und der Wichtung für den ersten Übergang dargestellt. Der erste Übergang wurde entsprechend mit einer „1“ und der zweite mit „2“ markiert.

Tabelle 14: Regressionsgleichungen, Bestimmtheitsmaße und Wichtung der einzelnen Alkoholbiomarker.

Biomarker	Regressionsgleichung	Bestimmtheitsmaß R^2	Wichtung
EtG 1	$y = 0,00358x + 0,00684$	0,9999	$1/x^2$
EtG 2	$y = 0,00469x + 0,01849$	1,0000	
EtS 1	$y = 0,00450x + 0,02483$	0,9999	$1/x$
EtS 2	$y = 0,00340x + 0,01710$	0,9999	
NAcT 1	$y = 0,00073x + 0,01364$	0,9998	$1/x$
NAcT 2	$y = 0,00254x + 0,05135$	0,9999	
PEth 1	$y = 0,00903x + 0,00033$	0,9999	$1/x^2$
PEth 2	$y = 0,01060x - 0,05090$	0,9992	

Die Untersuchung von Stützpunkten mit Konzentrationen von EtG, EtS, NAcT und PEth zu jeweils 2000, 5000, 10000, 20000 und 40000 ng/mL konnte zeigen, dass die Linearität der Methode auch über dem Arbeitsbereich der Methode hinaus besteht. Alle Stützpunkte von EtG wurden mit einer Kalibration im Arbeitsbereich mit einer Genauigkeit von 91,7 – 112 % ermittelt. Ebenfalls war dies für EtS mit 92,8 – 107 % und NAcT mit 88,9 – 108 % der Fall. Lediglich im Falle von PEth konnte die Linearität nur für Stützpunkte bis 10000 ng/mL mit einer

Genauigkeit von 83,7 – 120 % ermittelt werden. In der forensischen Analytik gelten die Kriterien für eine valide Konzentrationsmessung als erfüllt, wenn die Abweichung $\pm 30\%$ nicht überschreitet. Die Rohdaten für die Linearitätstestung oberhalb des Kalibrationsbereiches finden sich im Anhang (s. Seite 206).

3.2.3 Präzision und Richtigkeit

Die Wiederholpräzision, Laborpräzision und Richtigkeit der einzelnen Biomarker sind in den Tabellen 15, 16 und 17 dargestellt. Die Präzision wird als Impräzision in Form der relativen Standardabweichung RSD angegeben.

Tabelle 15: Wiederholpräzision der einzelnen Alkoholbiomarker in der Form RSD [%]

Biomarker	Low Control RSD [%]	Middle Control RSD [%]	High Control RSD [%]
EtG	8,3	4,6	3,5
EtS	8,0	6,6	2,7
NAcT	3,5	9,4	3,2
PEth	8,6	10,7	8,6

Tabelle 16: Laborpräzision der einzelnen Alkoholbiomarker in der Form der RSD [%]

Biomarker	Low Control RSD [%]	Middle Control RSD [%]	High Control RSD [%]
EtG	10,1	7,5	8,5
EtS	8,0	7,5	5,7
NAcT	3,5	10,2	8,4
PEth	9,9	10,7	9,4

Tabelle 17: Richtigkeit der einzelnen Alkoholbiomarker dargestellt in der Form des Bias [%]

Biomarker	Low Control Bias [%]	Middle Control Bias [%]	High Control Bias [%]
EtG	-2,7	-2,8	-1,3
EtS	-0,5	-5,4	+0,5
NAcT	+9,0	-2,1	-1,0
PEth	-0,6	-3,0	-3,4

3.2.4 Stabilität

Die Stabilitäten der einzelnen Alkoholbiomarker sind der Tabelle 18 in Prozent zu entnehmen.

Tabelle 18: Stabilitäten der ermittelten Messwerte für die einzelnen Biomarker und deren Low und High Control in Prozent

Biomarker	Low Control Stabilität [%]	High Control Stabilität [%]
EtG	86	91
EtS	78	89
NAcT	78	76
PEth	80	83

3.2.5 Grenzwerte

Für die Ermittlung der verschiedenen Grenzwerte einer Methode wurde gemäß den Richtlinien der GTFCh im Fall der Nachweisgrenze (LOD) das schwächere Ion (*Qualifier*) und für die Bestimmungsgrenze (LOQ) das stärkere Ion (*Target*) verwendet. Die ermittelten Werte für die einzelnen Alkoholbiomarker finden sich in Tabelle 19.

Tabelle 19: LOD und LOQ für die verschiedenen Alkoholbiomarker

Biomarker	LOD [ng/mL]	LOQ [ng/mL]
EtG	2,60	7,70
EtS	4,72	8,33
NAcT	12,5	28,9
PEth	6,93	12,0

Eine Abschätzung des LOD und LOQ für NAcT mittels des Signal-Rausch-Verhältnisses (S/N-ratio) zeigte, dass bei der kleinsten untersuchten Konzentration von 5 ng/mL ein S/N-ratio von 85,2 für den Quantifier und 15,6 für den Qualifier besteht, wodurch eine Nachweisgrenze unter 5 ng/mL für NAcT angenommen werden kann.

3.2.6 Matrixeffekte und Wiederfindung

Zum Abschätzen der Effektivität der Extraktion der Analyten aus der Probenmatrix wurden die Parameter der Wiederfindung und Matrixeffekte ermittelt (Tabellen 20 und 21).

Tabelle 20: Wiederfindung für die einzelnen Biomarker

Biomarker	Low Control [%]	Low Control SD [%]	High Control [%]	High Control SD [%]
EtG	102,0	4,0	92,6	6,4
EtS	111,5	17,9	97,0	7,5
NAcT	115,4	21,5	104,9	12,0
PEth	92,4	7,3	96,3	15,1

Tabelle 21: Matrixeffekte für die einzelnen Biomarker

Biomarker	Low Control [%]	Low Control SD [%]	High Control [%]	High Control SD [%]
EtG	91,2	19,9	90,3	14,2
EtS	82,7	13,3	90,4	11,9
NAcT	83,0	16,3	84,2	15,0
PEth	90,6	21,4	89,2	11,4

3.3 Erweiterte Validierung: Postmortale Proben

3.3.1 Gesamtes Kollektiv und Alkoholbiomarker

Für eine erweiterte Validierung der Methode in Leichenblut wurden 31 Proben von Verstorbenen am IRVM gemessen. Hierbei wurden nur Fälle berücksichtigt, deren Schenkelvenen- oder Herzblut in den ADH- und GC-Messungen über 1,0 ‰ EtOH aufwies und den weiteren in Abschnitt 2.3 aufgezeigten Einschlusskriterien genügte. Für die Auswertung wurden nur die drei Biomarker EtG, EtS und PEth berücksichtigt. Für die Beurteilung der einzelnen Biomarker im Kontext der postmortalen Messungen wurden die Parameter Median, Mittelwert, Minimum und Maximum über das gesamte Probenkollektiv bestimmt (Tabelle 22). Außerdem wurde ermittelt, in wie vielen Proben ein Nachweis der zugesetzten internen Standards nicht möglich war (nicht bestimmbar = nb) und die Methode damit keine verwertbaren Ergebnisse erzielte.

Tabelle 22: Darstellung der Ergebnisse für die Alkoholbiomarker EtG, EtS und PEth aus den Messungen der postmortalen Blutproben (nb = nicht bestimmbar)

Parameter	Median [ng/mL]	Mittelwert [ng/mL]	Minimum [ng/mL]	Maximum [ng/mL]	Proben nb [N]	Proben nb [%]
EtG	ca. 9855	ca. 13596	ca. 1210	ca. 55400	1	3,23
EtS	ca. 1390	ca. 1679	420	ca. 5710	4	12,9
PEth	ca. 1740	ca. 1960	0	ca. 7620	4	12,9

Zusätzlich sind die BAK-Werte aus den Alkoholbestimmungen der Verstorbenen kollektiv zusammengefasst und in der Tabelle 23 aufgeschlüsselt.

Tabelle 23: Mediane, Mittelwerte, sowie Minima und Maxima der gemessenen BAKs in der GC- und ADH-Analytik für die ausgewählten postmortalen Proben (N = 31)

Parameter	Median [‰]	Mittelwert [‰]	Minimum [‰]	Maximum [‰]
BAK GC	1,99	2,13	1,10	3,74
BAK ADH	2,07	2,11	1,14	3,78

3.3.1 BAK-Eingruppierung und Alkoholbiomarker

Für eine genauere Begutachtung, inwiefern die Alkoholbiomarkerkonzentrationen mit den BAKs zusammenhängen, wurden die Proben in weitere Untergruppierungen aufgeteilt: Gruppe 1: 1,01 – 1,50 ‰, Gruppe 2: 1,51 – 2,00 ‰, Gruppe 3: 2,01 – 2,50 ‰, Gruppe 4: > 2,51 ‰. Diese Gruppierungen wurden auf die Verteilung der Alkoholbiomarker in Form von Box-Blot-Diagrammen angewendet (Abbildungen 21, 22 und 23). Waren die Analyten jeweils nicht bestimmbar, so wurden sie für die Erstellung der Diagramme nicht mit einbezogen. Die Rohdaten hierzu finden sich im Anhang. Zwei Proben wurden im Fall von EtG in der Darstellung auf den bzgl. der Linearität maximalen Wert von 40000 ng/mL gesetzt, da die gemessenen Konzentrationen > 40000 ng/mL waren.

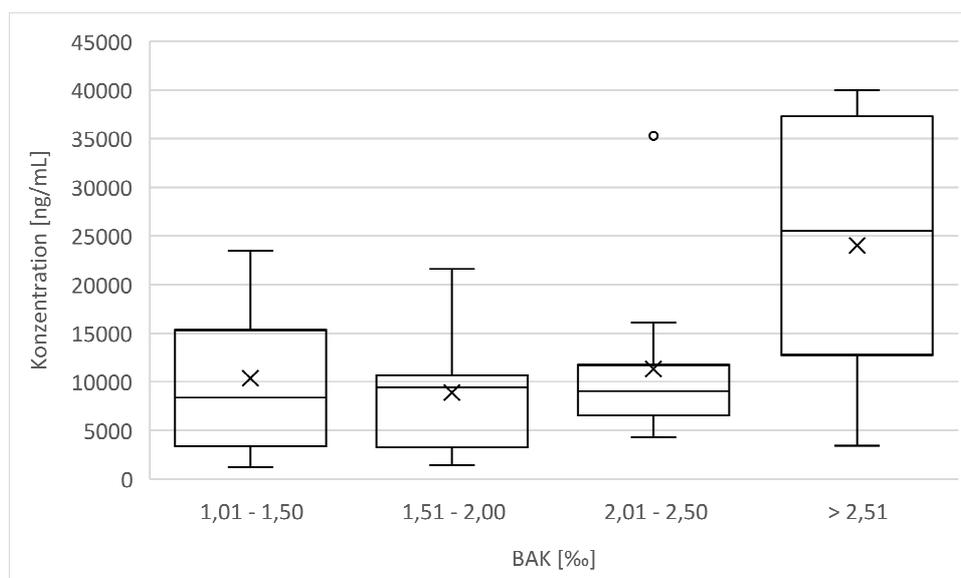


Abbildung 21: Box-Plot-Diagramm für den Alkoholbiomarker EtG unter Berücksichtigung der verschiedenen Gruppierungen: Gruppe 1 (N = 4), Gruppe 2 (N = 9), Gruppe 3 (N = 11) und Gruppe 4 (N = 6)

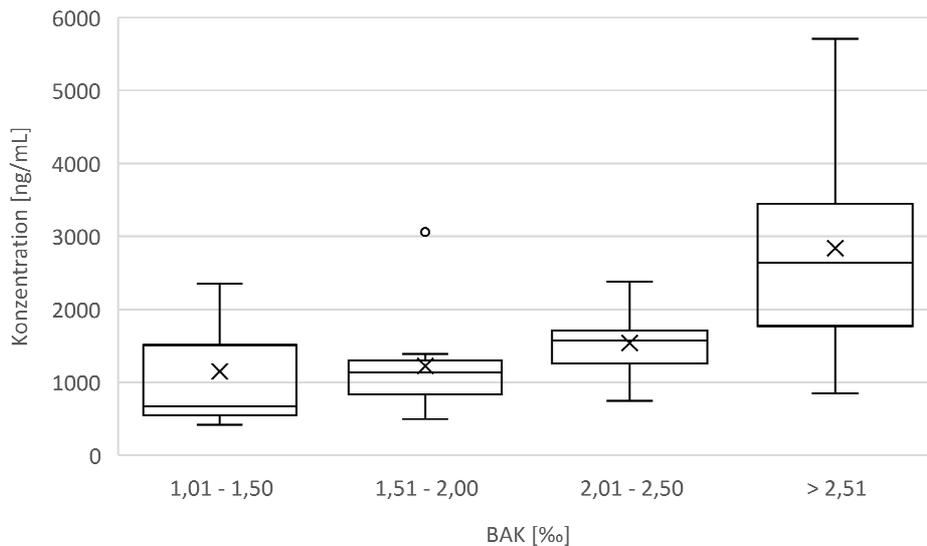


Abbildung 22: Box-Plot-Diagramm für den Alkoholbiomarker Ets unter Berücksichtigung der verschiedenen Gruppierungen: Gruppe 1 (N = 3), Gruppe 2 (N = 9), Gruppe 3 (N = 9), Gruppe 4 (N = 6)

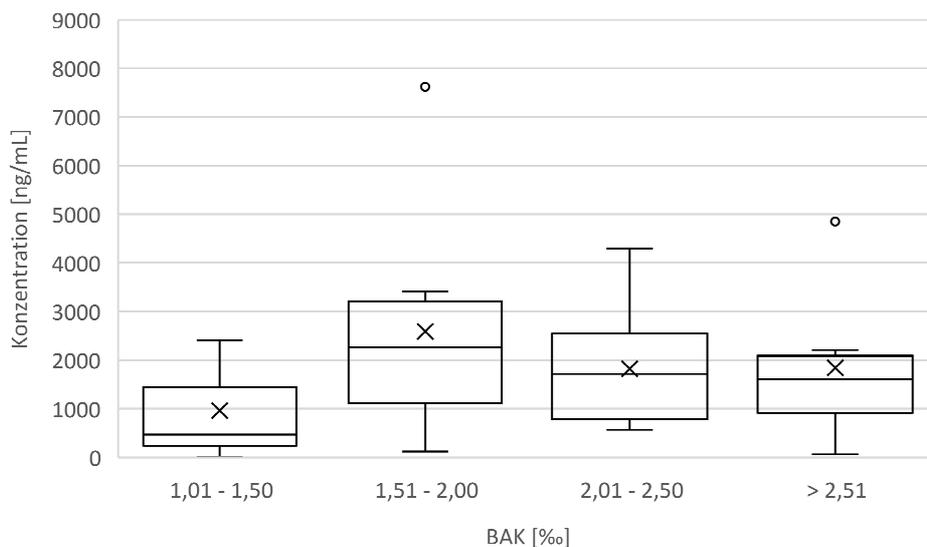


Abbildung 23: Box-Plot-Diagramm für den Alkoholbiomarker PEth unter Berücksichtigung der verschiedenen Gruppierungen: Gruppe 1 (N = 3), Gruppe 2 (N = 9), Gruppe 3 (N = 9), Gruppe 4 (N = 6)

3.3.2 Fallbeispiel

In einem etwas umfangreicheren Fall am IRVM aus den Jahren 2019-2020 wurde die Anfrage an das Institut gerichtet, ob die ermittelten postmortalen BAKs auf einen Alkoholkonsum vor dem Todeseintritt zurückzuführen waren, da der Verstorbene laut den Ermittlungen

alkoholabstinent lebte. In den Proben, die am IRVM asserviert wurden, ergab sich ein durchschnittlicher Mittelwert von 0,33 ‰ EtOH im Oberschenkelvenenblut und ein Wert von 0,03 ‰ in einer Muskelprobe. Zusätzlich wurde das Leichenblut, welches während der ersten Obduktion an einem anderen rechtsmedizinischen Institut entnommen wurde, auf die BAK untersucht, wobei sich ein Wert von 0,14 ‰ ergab. Die ermittelten Werte zeigten in diesem Fall kontroverse Ergebnisse, weshalb zusätzlich eine am IRVM gängige Analyse zum Nachweis von Begleitstoffen aus alkoholischen Getränken und Fäulnisalkoholen durchgeführt wurde (Tabelle 24). Für die Analyse wurde das Leichenblut aus dem anderen rechtsmedizinischen Institut verwendet.

Tabelle 24: Begleitstoffmuster der gemessenen Leichenblutprobe. Die Bezeichnung Amylalkohole beinhaltet 2- und 3-Methylbutanol

Begleitstoff	Konzentration [mg/L]
Methanol	0,83
1-Propanol	ca. 11,0
Isobutanol	0,11
1-Butanol	0,11
Amylalkohole	ca. 0,74

Zur ergänzenden Klärung der Fragestellung wurden verschiedene Matrices auch auf enthaltene Alkoholbiomarker EtG, EtS und PEth untersucht (Tabelle 25). Während in den untersuchten Proben die zugesetzten internen Standards (EtG-D₅, EtS-D₅ und PEth-D₅) klar erfasst werden konnten, waren die Alkoholbiomarker EtG, EtS und PEth nicht nachweisbar (nn).

Tabelle 25: Messergebnisse aus den Alkoholbiomarkerbestimmungen in zwei postmortalen Blutproben und Urin (nn = nicht nachweisbar)

Matrix	Ursprung	Methodik	Biomarker	Ergebnis
Schenkelvenenblut	IRVM	Multimethode	EtG	nn
			EtS	nn
			PEth	nn
Leichenblut	anderes Institut	Multimethode	EtG	nn
			EtS	nn
			PEth	nn
Urin	anderes Institut	EtG & EtS (LC-MS/MS)	EtG	nn
			EtS	nn

Die durch die aufgeführten analytischen Ergebnisse generierten Schlussfolgerungen werden im Kapitel 4.3.3 der Diskussion vorgestellt.

3.4 Trinkversuche

3.4.1 Pharmakokinetiken der einzelnen Alkoholbiomarker

Durch die zwei Trinkversuche wurde versucht, die Pharmakokinetik der einzelnen Biomarker zu bestimmen und die Kinetiken bei verschiedenen Ziel-BAKs zu vergleichen. In Tabelle 26 sind beispielhaft die ermittelten Parameter des Probanden 1 aus dem zweiten Trinkversuch dargestellt. Bei der Abbildung und Auswertung der dargestellten Proben wurden Werte, die über der Kalibration lagen, als vollwertig betrachtet, jedoch mit einem „ca.“ versehen. In den Statistiken wurden sie aufgrund der gegebenen Linearität bis 40000 ng/mL für EtG, EtS und NAcT sowie bei PEth bis 10000 ng/mL mit einbezogen. Aufgrund der unterschiedlichen Grenzwerte und dem Umstand, dass NAcT auch endogen gebildet wird, ist die Definition eines Grenzwertes für die Auswertung der Ergebnisse in den Trinkversuchen erforderlich. (Luginbühl et al. 2017) Für alle Alkoholbiomarker wurde daher der niedrigste Kalibrator des Arbeitsbereiches mit einer Konzentration von 10 ng/mL gewählt. Lagen die ermittelten Konzentrationen unter diesem Wert oder die Substanz war nicht nachweisbar, wurden diese mit „0 ng/mL“ angegeben.

Tabelle 26: Beispieldaten des Probanden 1 aus dem Trinkversuch II

Zeitpunkt [h]	EtG 1 [ng/mL]	EtG 2 [ng/mL]	EtS 1 [ng/mL]	EtS 2 [ng/mL]	NAcT 1 [ng/mL]	NAcT 2 [ng/mL]	PEth 1 [ng/mL]	PEth 2 [ng/mL]
Leer	0	0	0	0	15,4	14,6	0	0
0	159	181	39,5	41,1	28,3	29,4	38,8	25,3
0,5	435	407	80,2	77,6	33,9	35,4	35,5	27,0
1,0	636	639	106	98,7	43,8	41,7	38,3	17,1
2,0	823	837	119	118	39,6	38,4	14,9	11,4
3,0	851	826	93,0	92,2	46,7	46,2	0	0
4,0	809	756	68,0	64,8	41,0	42,7	0	0
24	0	0	0	0	33,2	33,5	0	0
48	0	0	0	0	40,2	40,4	0	0
168	0	0	0	0	42,0	39,0	0	0

Die weiteren Daten der einzelnen Probanden finden sich im Anhang der Arbeit.

Im Folgenden wurden die Kinetiken der einzelnen Biomarker in Abhängigkeit von den entsprechenden Ziel-BAKs dargestellt. Für die Darstellung wurde pro Zeitpunkt der Blutentnahmen ein Box-Plot für die verschiedenen Blutentnahmen erstellt. Die Darstellung der Quantile wurde inklusive des Medians durchgeführt.

Trinkversuch I (Ziel-BAK 0,8 ‰)

In einer Übersichtstabelle (Tabelle 27) wurden verschiedene Angaben zu den individuellen Parametern der einzelnen Probanden zusammengestellt. Hierbei werden das Geschlecht, Gewicht, die maximale BAK (BAK_{max}), die maximalen Konzentrationen der Alkoholbiomarker (EtG_{max} , EtS_{max} , $NACt_{max}$, $PEth_{max}$), die aufgenommene Menge Alkohol und die Auswertung des AUDIT-Fragebogens dargestellt.

Tabelle 27: Übersichtstabelle zur Darstellung verschiedener individueller Parameter aus dem ersten Teil des Trinkversuches (ρ (EtOH) = 0,8 g/mL)

Nr.	Geschlecht [w/m]	Gewicht [kg]	BAK_{max} [‰]	EtG_{max} [ng/mL]	EtS_{max} [ng/mL]	$NACt_{max}$ [ng/mL]	$PEth_{max}$ [ng/mL]	EtOH [g]	AUDIT [Punkte]
1	w	55	0,93	629	302	50,8	0	32	6
2	w	64	0,78	421	222	66,2	31	40	4
3	w	70	0,97	ca. 3230	342	66,9	39,3	44	8
4	m	97	0,84	ca. 3010	347	83,1	40,2	72	4
5	m	74	0,92	ca. 2460	230	44,3	98,3	48	6
6	m	100	0,84	ca.3000	535	64,3	164	80	6
7	m	75	0,93	ca.2880	320	72,7	69,3	56	4
8	m	102	1,00	ca. 3050	338	61,8	39,3	72	4
9	m	78	1,09	ca. 2920	341	47,5	28,1	56	6

Für jeden Alkoholbiomarker wurden die individuellen Konzentrationsverläufe gegen die Zeit aufgetragen, um die Schwankungen zwischen den einzelnen Probanden besser darzustellen. Zusätzlich wurde der zum Analyten gehörende und zuvor in der Validierung ermittelte LOD-Wert mit in die Abbildung übernommen. Weiterhin wurde der „Leerwert“ in diesen Diagrammen mit der Bezeichnung „-1 h“ dargestellt. Zur Beurteilung der Pharmakokinetik der einzelnen Biomarker und der Stabilität der entwickelten Methode wurde jeweils ein Box-Plot-Diagramm erstellt, um die Verteilung der gemessenen Werte über die Zeit darzustellen. Um die einzelnen zugehörigen Daten noch einmal aufzuschlüsseln, wurde für jeden Biomarker

ergänzend eine Tabelle erstellt, in welcher die Parameter Median, Mittelwert, SD, RSD, Minimum und Maximum zu jedem Entnahmezeitpunkt dargestellt wurden.

- EtG (Trinkversuch I)

Als erster Biomarker wurde EtG bei einer Ziel-BAK von 0,8 ‰ behandelt und im Folgenden abgebildet (Abbildung 24 und 25, und Tabelle 28).

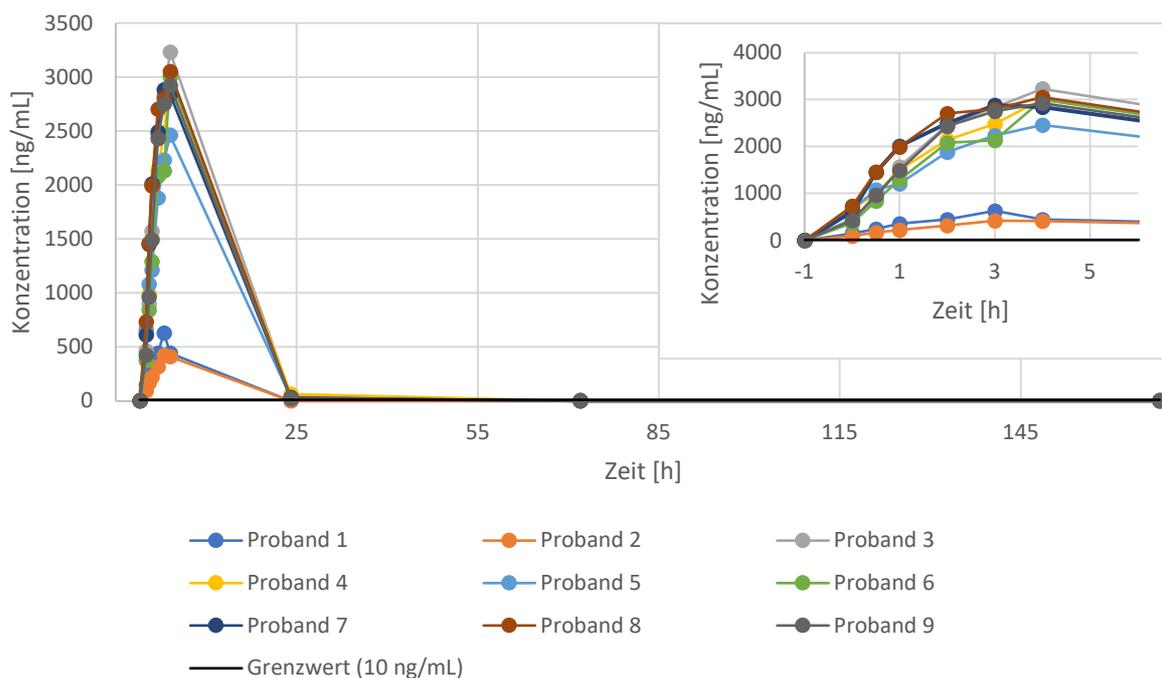


Abbildung 24: Individuelle Konzentrationsverläufe des Alkoholbiomarkers EtG im Blut im ersten Trinkversuch (Ziel-BAK 0,8 ‰), inklusive einer Detaildarstellung des ersten Versuchstages

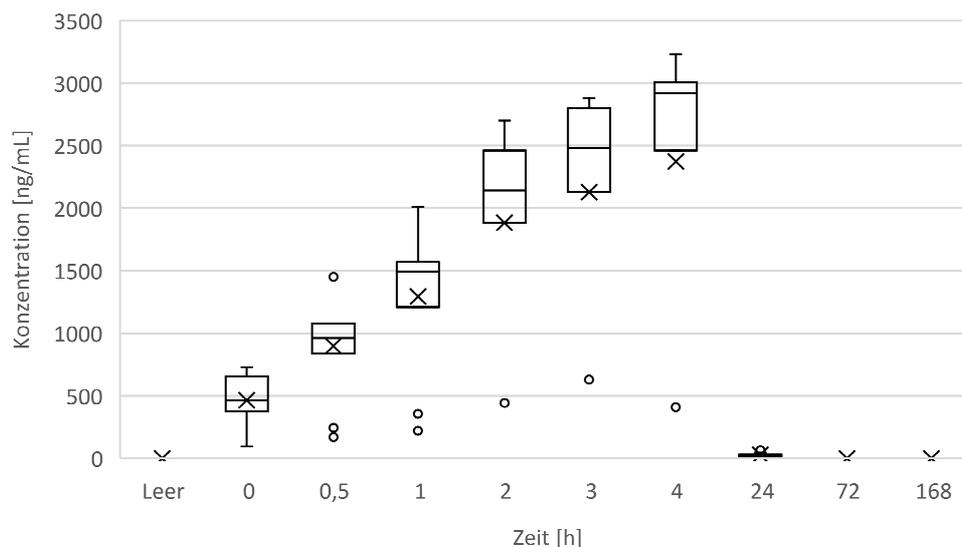


Abbildung 25: Box-Plot-Diagramm von EtG im ersten Trinkversuch

Tabelle 28: Darstellung der Parameter Median, Mittelwert, Standardabweichung, relative Standardabweichung, Minima und Maxima für EtG im ersten Trinkversuch

Zeit [h]	Median [ng/mL]	Mittelwert [ng/mL]	SD [ng/mL]	RSD [%]	Minimum [ng/mL]	Maximum [ng/mL]
Leer	0	0	0	-	0	0
0	462	463	216	46,7	92,9	730
0,5	962	899	426	47,3	168	ca. 1460
1,0	ca. 1490	ca. 1293	596	46,1	220	ca. 2010
2,0	ca. 2140	ca. 1882	837	44,5	316	ca. 2700
3,0	ca. 2480	ca. 2128	894	42,0	421	ca. 2880
4,0	ca. 2920	ca. 2373	ca. 1059	44,6	409	ca. 3230
24	25,7	25,9	18,8	72,5	0	63,5
72	0	0	0	-	0	0
168	0	0	0	-	0	0

Aus den erhaltenen Daten aller Probanden wurden, insofern möglich, pharmakokinetische Parameter ermittelt. Die Ergebnisse der Größen c_{\max} und t_{\max} zu EtG finden sich in Tabelle 29.

Tabelle 29: Pharmakokinetische Parameter c_{\max} und t_{\max} für EtG im ersten Trinkversuch aller Probanden

Parameter	Median	Mittelwert	SD	RSD [%]
c_{\max} [ng/mL]	ca. 2920	ca. 2400	ca. 1022	42,6
t_{\max} [h]	4,00	3,67	0,471	12,9

- EtS (Trinkversuch I)

Dieses Vorgehen wurde für EtS entsprechend wiederholt und im Folgenden dargestellt. (Abbildung 26, Abbildung 27, Tabelle 30)

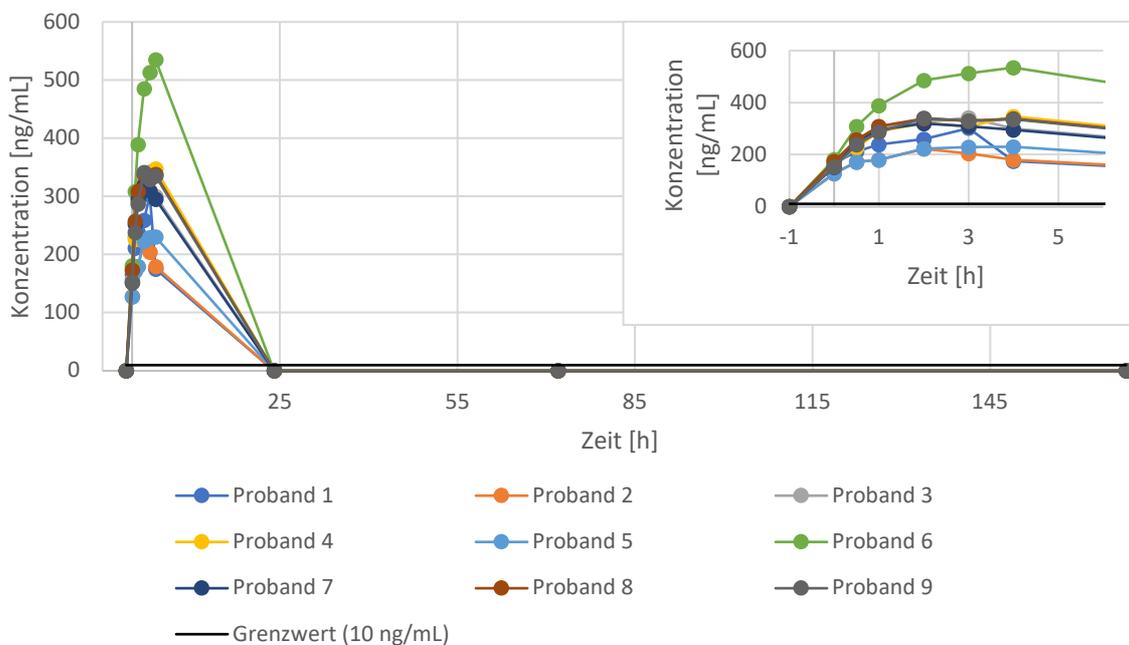


Abbildung 26: Individuelle Konzentrationsverläufe des Alkoholbiomarkers EtS im Blut im ersten Trinkversuch (Ziel-BAK 0,8 ‰), inklusive einer Detaildarstellung des ersten Versuchstages

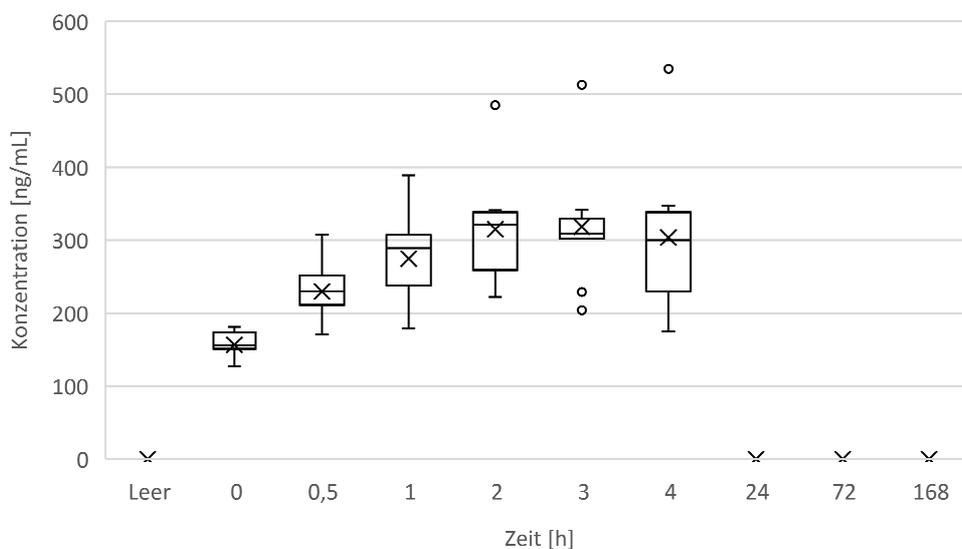


Abbildung 27: Box-Plot-Diagramm von EtS im ersten Trinkversuch

Tabelle 30: Darstellung der Parameter Median, Mittelwert, Standardabweichung, relative Standardabweichung, Minima und Maxima für EtS im ersten Trinkversuch

Zeit [h]	Median [ng/mL]	Mittelwert [ng/mL]	SD [ng/mL]	RSD [%]	Minimum [ng/mL]	Maximum [ng/mL]
Leer	0	0	0	-	0	0
0	156	157	18	11,7	127	181
0,5	230	229	40	17,5	171	308
1,0	289	275	63	22,9	179	389
2,0	321	315	75	23,8	222	485
3,0	309	319	82	25,7	204	513
4,0	300	304	103	33,9	175	535
24	0	0	0	-	0	0
72	0	0	0	-	0	0
168	0	0	0	-	0	0

Aus den erhaltenen Daten aller Probanden wurden, insofern möglich, pharmakokinetische Parameter ermittelt. Die Ergebnisse der Größen c_{\max} und t_{\max} zu EtS finden sich in Tabelle 31.

Tabelle 31: Pharmakokinetische Parameter c_{\max} und t_{\max} für EtS im ersten Trinkversuch aller Probanden

Parameter	Median	Mittelwert	SD	RSD [%]
c_{\max} [ng/mL]	338	331	85,1	25,7
t_{\max} [h]	3,00	2,89	0,875	30,3

- NAcT (Trinkversuch I)

Ebenfalls für NAcT sind die individuellen Konzentrationsverläufe (Abbildung 28) und die zugehörige Verteilung als Box-Plot-Diagramm (Abbildung 29) mit den entsprechenden Parametern abgebildet (Tabelle 32)

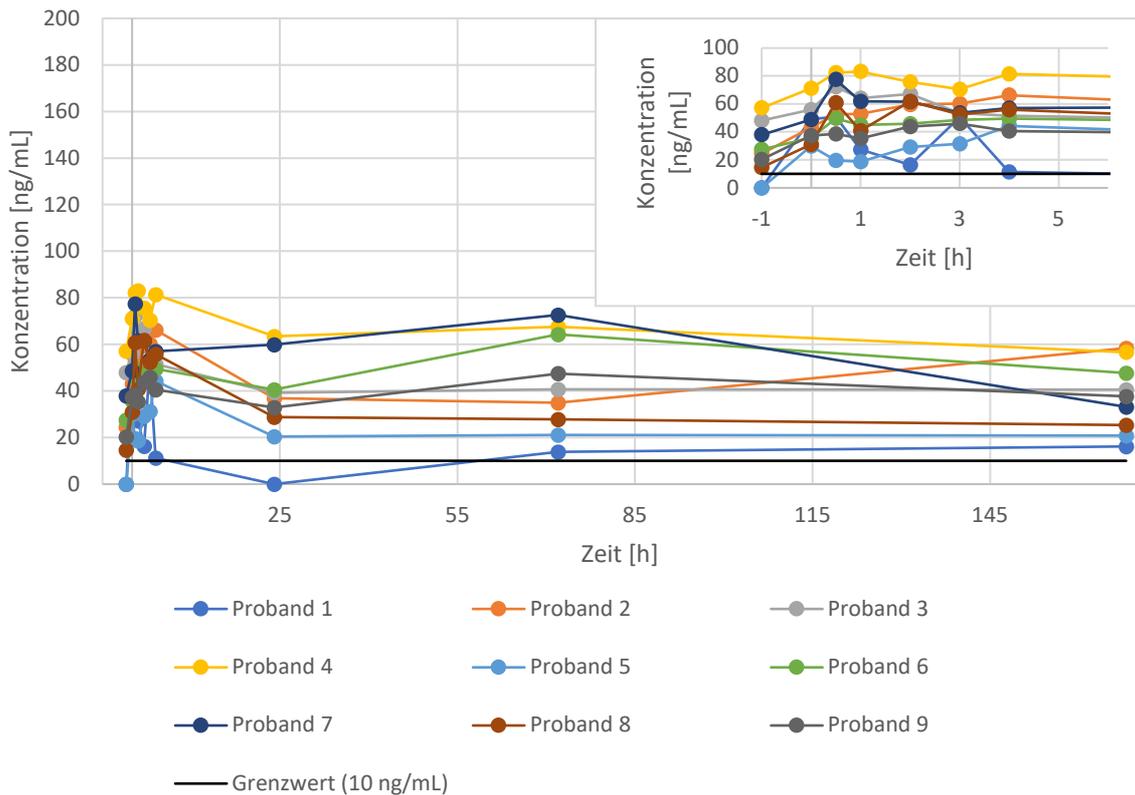


Abbildung 28: Individuelle Konzentrationsverläufe des Alkoholbiomarkers NAcT im Blut im ersten Trinkversuch (Ziel-BAK 0,8 ‰), inklusive einer Detaildarstellung des ersten Versuchstages

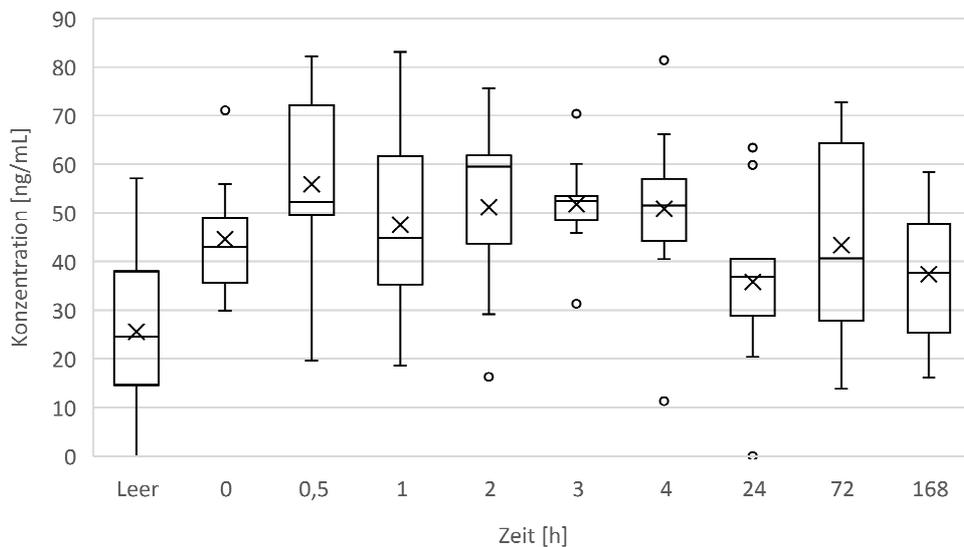


Abbildung 29: Box-Plot-Diagramm von NAcT im ersten Trinkversuch

Tabelle 32: Darstellung der Parameter Median, Mittelwert, Standardabweichung, relative Standardabweichung, Minima und Maxima für NAcT im ersten Trinkversuch

Zeit [h]	Median [ng/mL]	Mittelwert [ng/mL]	SD [ng/mL]	RSD [%]	Minimum [ng/mL]	Maximum [ng/mL]
Leer	24,5	25,6	18,6	72,8	0	57,1
0	43,0	44,6	12,5	28,0	29,9	71,1
0,5	52,3	55,9	18,7	33,4	19,6	82,2
1,0	44,8	47,6	18,9	39,8	18,6	83,1
2,0	59,5	51,2	18,0	35,2	16,3	75,7
3,0	52,4	51,8	9,94	19,2	31,3	70,4
4,0	51,5	50,8	18,1	35,6	11,3	81,4
24	36,8	35,8	18,1	50,6	0	63,4
72	40,7	43,4	20,0	46,0	13,8	72,7
168	37,7	37,4	14,2	38,0	16,2	58,4

Für NAcT war es nicht möglich pharmakokinetische Parameter zu bestimmen.

- PEth (Trinkversuch I)

Schließlich wurden die individuellen Konzentrationsverläufe für PEth zusammengefasst (Abbildung 30) und ein weiterer Box-Plot erstellt (Abbildung 31), wobei die zugehörigen Werte nachfolgend dargestellt sind (Tabelle 33).

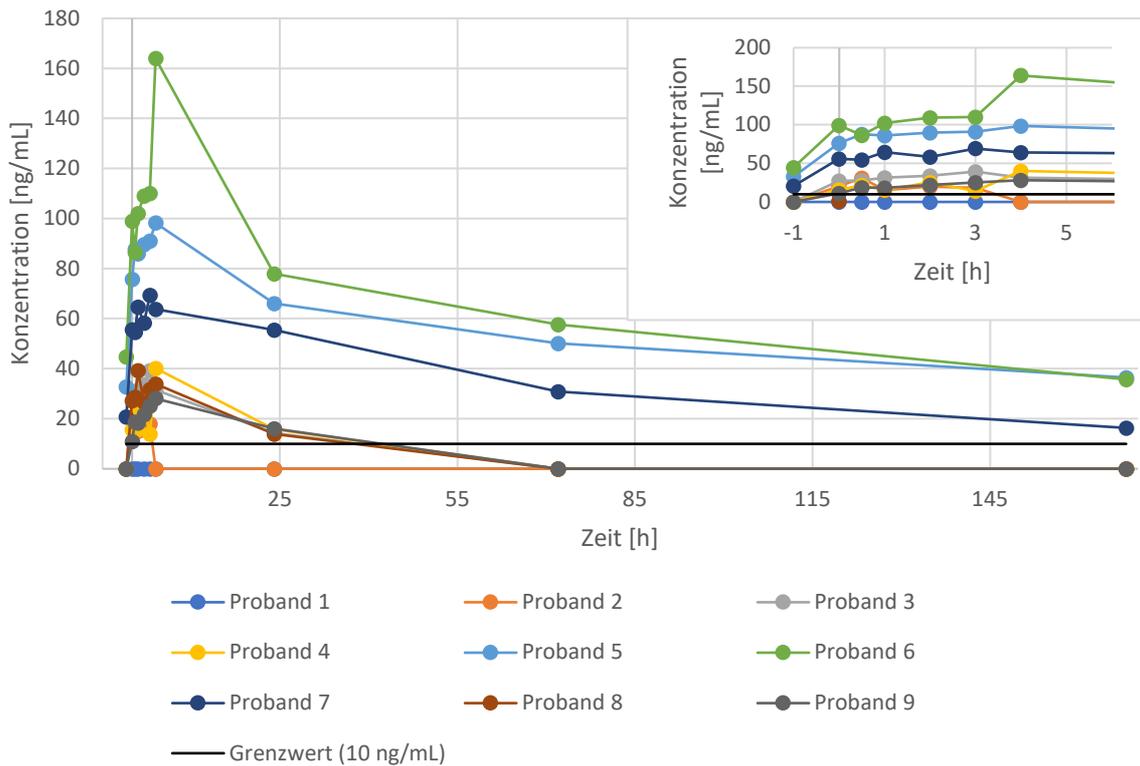


Abbildung 30: Individuelle Konzentrationsverläufe des Alkoholbiomarkers PEth im Blut im ersten Trinkversuch (Ziel-BAK 0,8 ‰), inklusive einer Detaildarstellung des ersten Versuchstages

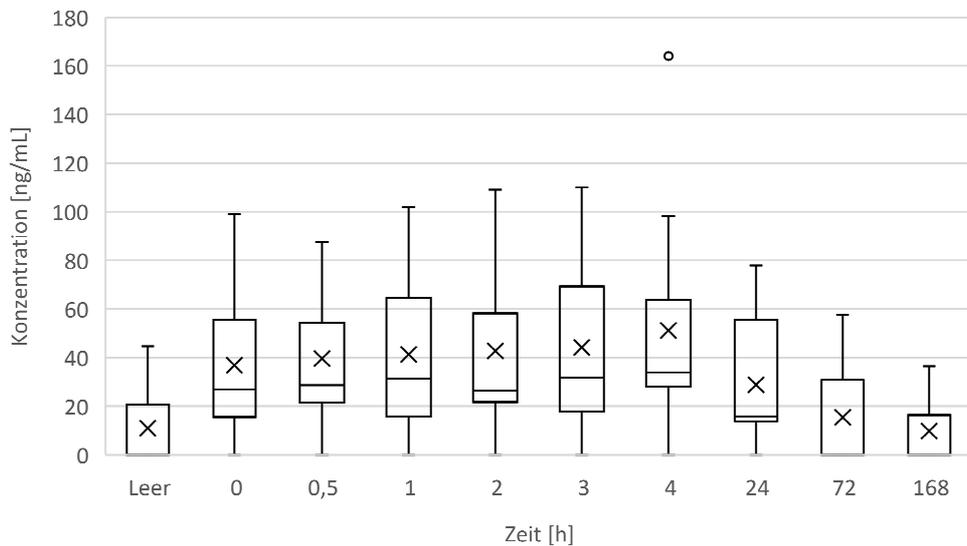


Abbildung 31: Box-Plot-Diagramm von PEth im ersten Trinkversuch

Tabelle 33: Darstellung der Parameter Median, Mittelwert, Standardabweichung, relative Standardabweichung, Minima und Maxima für PEth im ersten Trinkversuch

Zeit [h]	Median [ng/mL]	Mittelwert [ng/mL]	SD [ng/mL]	RSD [%]	Minimum [ng/mL]	Maximum [ng/mL]
Leer	0	10,9	16,4	151	0	45,0
0	27,0	36,8	31,1	84,4	0	99,0
0,5	28,7	39,6	28,7	72,4	0	87,7
1,0	31,4	41,4	33,2	80,2	0	10,2
2,0	26,5	42,7	33,8	79,2	0	109
3,0	31,7	44,2	35,4	79,9	0	110
4,0	33,9	51,1	49,1	96,1	0	164
24	15,8	28,8	27,8	96,3	0	77,9
72	0	15,4	22,7	148	0	57,6
168	0	9,8	14,9	152	0	36,4

Aus den erhaltenen Daten aller Probanden wurden, insofern möglich, pharmakokinetische Parameter ermittelt. Die Ergebnisse der Größen c_{\max} , t_{\max} , k_e und $t_{1/2}$ zu PEth finden sich in Tabelle 34. Für die ersten beiden Kenngrößen wurde Proband 1 nicht berücksichtigt. Für k_e und $t_{1/2}$ wurde auf die Probanden 1, 2, 4, 5 und 7 verzichtet, da diese nach c_{\max} nicht mindestens drei bestimmbare Konzentrationen in der Eliminationsphase vorweisen konnten.

Tabelle 34: Pharmakokinetische Parameter c_{\max} , t_{\max} , k_e und $t_{1/2}$ für PEth im ersten Trinkversuch von mindestens vier Probanden

Parameter	Median	Mittelwert	SD	RSD [%]
c_{\max} [ng/mL] (N=8)	39,8	63,7	43,8	68,8
t_{\max} [h] (N=8)	3,50	2,94	1,33	45,4
k_e [h⁻¹] (N=4)	0,007	0,014	0,013	98,2
$t_{1/2}$ [h] (N=4)	106	100,7	57,0	56,6

- Zusammenfassung Trinkversuch I

Abschließend wurde ein Diagramm erstellt, welches die Mittelwerte der jeweiligen Biomarker zu den entsprechenden Entnahmezeiten darstellt (Abbildung 32). Aufgrund der sehr unterschiedlichen Konzentrationsspannen wurden zwei y-Achsen eingefügt, wobei die linksbündige die Konzentrationen von EtG und EtS widerspiegelt. Die Skalierung für NAcT und PEth findet sich auf der rechtsbündigen y-Achse.

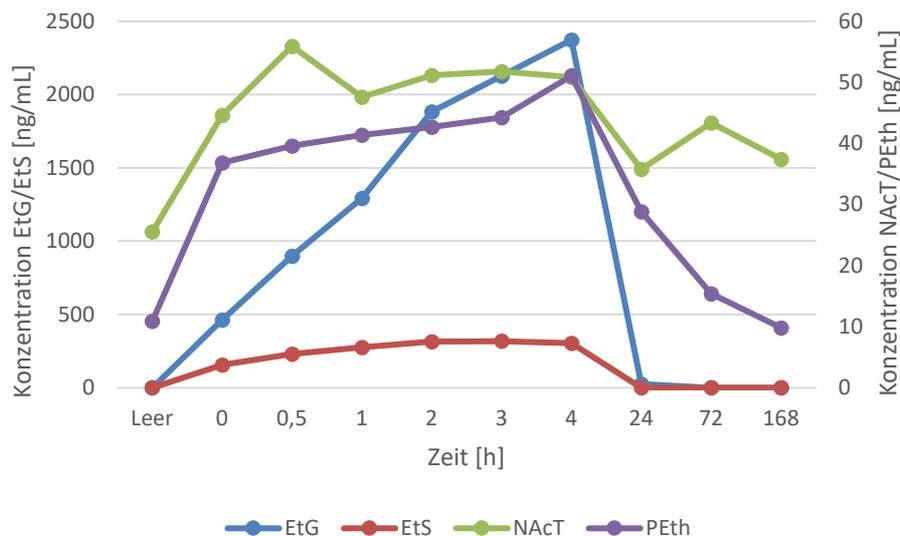


Abbildung 32: Mittelwerte der einzelnen Biomarker im ersten Trinkversuch

Trinkversuch II (Ziel-BAK 0,4 ‰)

Zur Darstellung der individuellen Parameter, die sich aufgrund der Heterogenität der Probandenkohorte ergab, wurde eine Übersichtstabelle für den zweiten Teil des Trinkversuches erstellt (Tabelle 35). Diese beinhaltet Angaben zum Geschlecht, Gewicht, maximalen BAK-Wert (BAK_{max}), maximale Konzentrationswerte der Biomarker (EtG_{max}, EtS_{max}, NAcT_{max}, PEth_{max}), der Menge des aufgenommenen Alkohols und die Auswertung des AUDIT-Fragebogens.

Tabelle 35: Übersichtstabelle zur Darstellung verschiedener individueller Parameter aus dem zweiten Trinkversuch (ρ (EtOH) = 0,8 g/mL)

Nr.	Geschlecht	Gewicht	BAK _{max}	EtG _{max}	EtS _{max}	NAcT _{max}	PEth _{max}	EtOH	AUDIT
	[w/m]	[kg]	[‰]	[ng/mL]	[ng/mL]	[ng/mL]	[ng/mL]	[g]	[Punkte]
1	w	55	0,47	851	119	46,7	38,8	18	6
2	w	64	0,41	771	106	86,8	60,8	19	3
3	w	80	0,34	945	153	39,6	72,6	25	2
4	w	64	0,39	886	123	57,4	38,6	20	2
5	m	74	0,29	621	66,8	39,8	107	28	5
6	m	98	0,37	916	110	40,9	98,8	35	3
7	m	75	0,49	ca. 1160	127	70,5	88,7	25	4
8	m	102	0,36	ca. 1320	155	87,4	90,6	35	3

Auch in diesem Abschnitt wurden die individuellen Konzentrationsverläufe der Probanden mit der Angabe des zugehörigen LOD und Box-Plots der einzelnen Alkoholbiomarker und die zugehörigen Parameter wie Median, Mittelwert, SD, RSD, sowie die Minima und Maxima in einer Tabelle dargestellt. Weiterhin wurde der „Leerwert“ in den individuellen Konzentrationsverläufen mit der Bezeichnung „-1 h“ dargestellt.

- EtG (Trinkversuch II)

Zunächst wurde der Konzentrationsverlauf (Abbildung 33) und die Pharmakokinetik von EtG (Abbildung 34) betrachtet. Anschließend sind die zugehörigen Werte aus der Box-Plot-Abbildung noch einmal tabellarisch dargestellt (Tabelle 36).

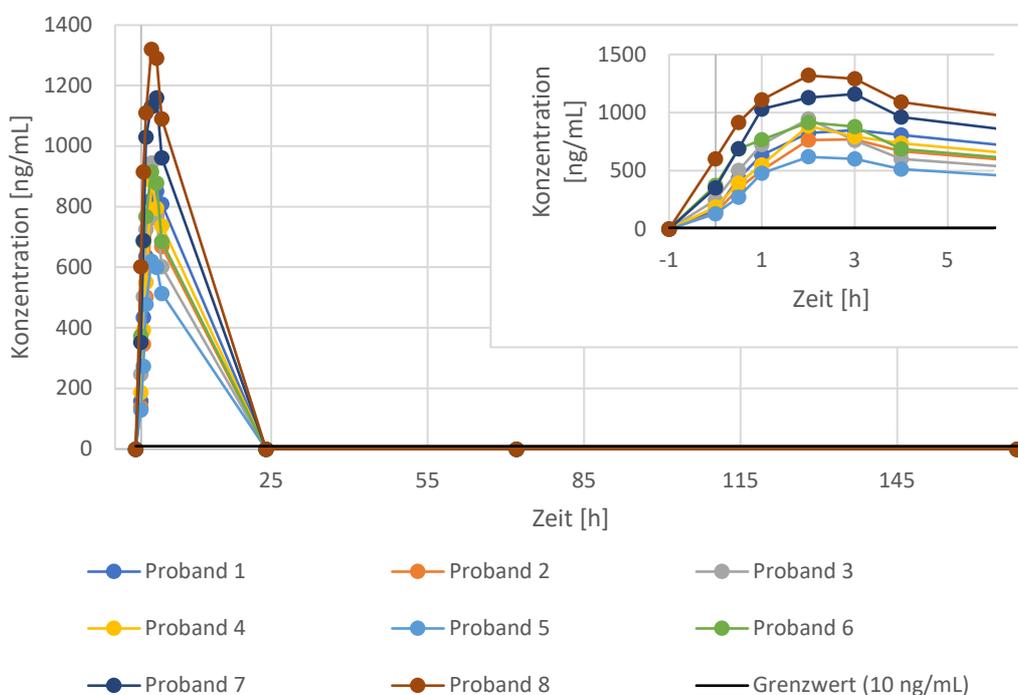


Abbildung 33: Individuelle Konzentrationsverläufe des Alkoholbiomarkers EtG im Blut im zweiten Trinkversuch (Ziel-BAK 0,4 ‰), inklusive einer Detaildarstellung des ersten Versuchstages

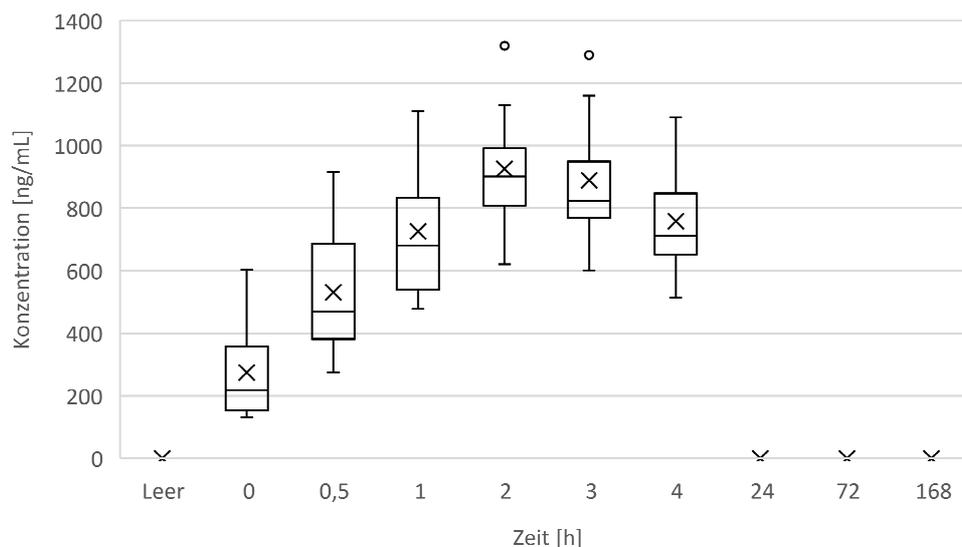


Abbildung 34: Box-Plot-Diagramm von EtG im zweiten Trinkversuch

Tabelle 36: Darstellung der Parameter Median, Mittelwert, Standardabweichung, relative Standardabweichung, Minima und Maxima für EtG im zweiten Trinkversuch

Zeit [h]	Median [ng/mL]	Mittelwert [ng/mL]	SD [ng/mL]	RSD [%]	Minimum [ng/mL]	Maximum [ng/mL]
Leer	0	0	0	-	0	0
0	218	274	152	55,4	130	603
0,5	470	531	202	38,1	274	916
1,0	681	725	221	30,5	478	ca. 1110
2,0	901	926	203	21,9	621	ca. 1320
3,0	823	889	211	23,8	601	ca. 1290
4,0	712	759	177	23,4	514	ca. 1090
24	0	0	0	-	0	0
72	0	0	0	-	0	0
168	0	0	0	-	0	0

Aus den erhaltenen Daten aller Probanden wurden, insofern möglich, pharmakokinetische Parameter ermittelt. Die Ergebnisse der Größen c_{\max} und t_{\max} zu EtG finden sich in Tabelle 37.

Tabelle 37: Pharmakokinetische Parameter c_{\max} und t_{\max} für EtG im zweiten Trinkversuch aller Probanden

Parameter	Median	Mittelwert	SD	RSD [%]
c_{\max} [ng/mL]	901	934	204	21,9
t_{\max} [h]	2,00	2,38	0,484	20,4

- EtS (Trinkversuch II)

Die Ergebnisse für EtS wurden ebenfalls in Form eines Konzentrationsverlaufes (Abbildung 35) und Box-Plot-Diagramms (Abbildung 36) dargestellt. Eine tabellarische Darstellung der zu Abbildung 36 gehörenden Werte ist nachfolgend abgebildet (Tabelle 38).

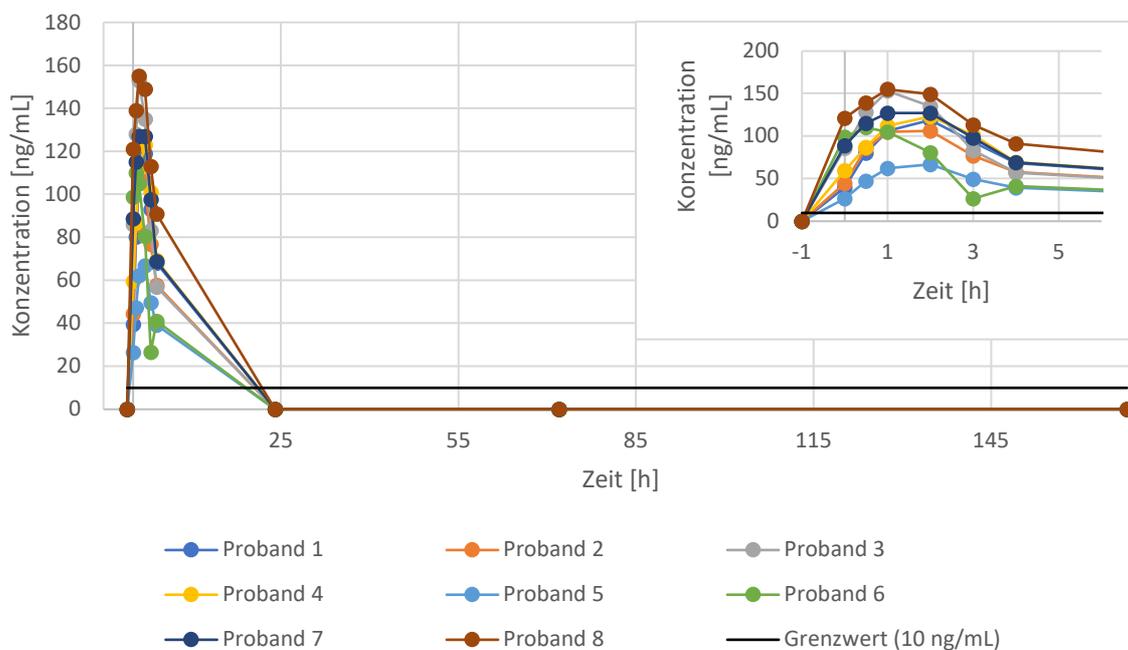


Abbildung 35: Individuelle Konzentrationsverläufe des Alkoholbiomarkers EtS im Blut im zweiten Trinkversuch (Ziel-BAK 0,4 ‰), inklusive Detaildarstellung des ersten Versuchstages

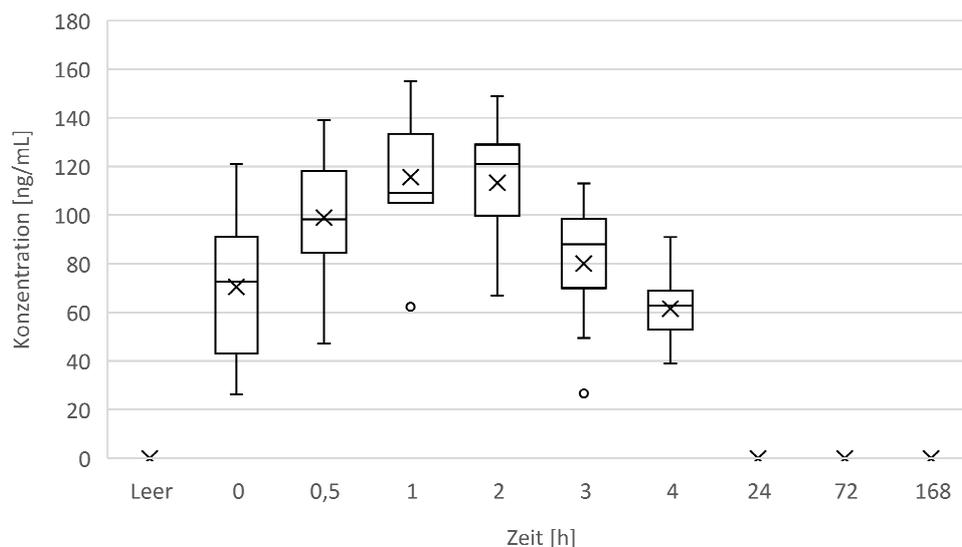


Abbildung 36: Box-Plot-Diagramm von EtS im zweiten Trinkversuch

Tabelle 38: Darstellung der Parameter Median, Mittelwert, Standardabweichung, relative Standardabweichung, Minima und Maxima für EtS im zweiten Trinkversuch

Zeit [h]	Median [ng/mL]	Mittelwert [ng/mL]	SD [ng/mL]	RSD [%]	Minimum [ng/mL]	Maximum [ng/mL]
Leer	0	0	0	-	0	0
0	72,7	70,5	30,9	43,8	26,4	121
0,5	98,4	99,0	27,8	28,1	47,2	139
1,0	109	116	28,0	24,2	62,2	155
2,0	121	113	25,9	22,8	66,8	149
3,0	88,1	80,1	27,0	33,7	26,6	113
4,0	62,9	61,5	15,7	25,6	39,1	90,9
24	0	0	0	-	0	0
72	0	0	0	-	0	0
168	0	0	0	-	0	0

Aus den erhaltenen Daten aller Probanden wurden, insofern möglich, pharmakokinetische Parameter ermittelt. Die Ergebnisse der Größen c_{\max} und t_{\max} zu EtS finden sich in Tabelle 39.

Tabelle 39: Pharmakokinetische Parameter c_{\max} und t_{\max} für EtS im zweiten Trinkversuch aller Probanden

Parameter	Median	Mittelwert	SD	RSD [%]
c_{\max} [ng/mL]	121	120	26,2	21,9
t_{\max} [h]	2,00	1,56	0,583	37,3

- NAcT (Trinkversuch II)

Für den Biomarker NAcT wurden ebenfalls ein Konzentrationsverlauf (Abbildung 37) und Box-Plot-Diagramm (Abbildung 38) mit zugehöriger tabellarischer Aufschlüsselung (Tabelle 40) erstellt.

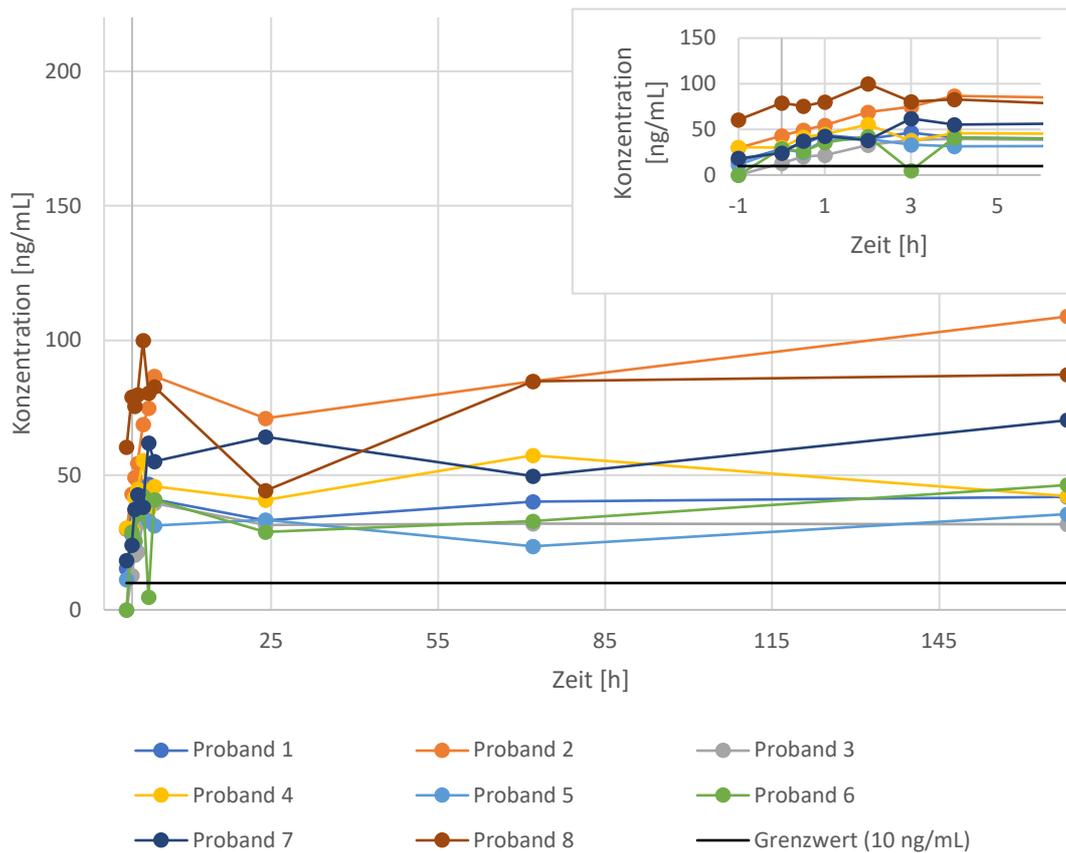


Abbildung 37: Individuelle Konzentrationsverläufe des Alkoholbiomarkers NAcT im Blut im zweiten Trinkversuch (Ziel-BAK 0,4 ‰), inklusive einer Detaildarstellung des ersten Versuchstages

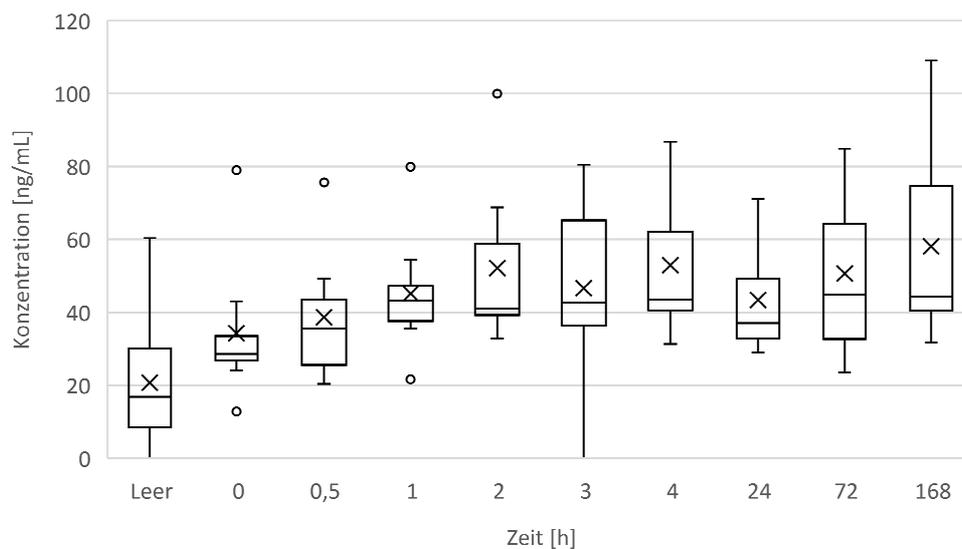


Abbildung 38: Box-Plot-Diagramm von NAcT im zweiten Trinkversuch

Tabelle 40: Darstellung der Parameter Median, Mittelwert, Standardabweichung, relative Standardabweichung, Minima und Maxima für NAcT im zweiten Trinkversuch

Zeit [h]	Median [ng/mL]	Mittelwert [ng/mL]	SD [ng/mL]	RSD [%]	Minimum [ng/mL]	Maximum [ng/mL]
Leer	16,9	20,7	18,5	89,2	0	60,4
0	28,6	34,3	18,6	54,2	12,8	79,0
0,5	35,6	38,6	16,6	42,9	20,4	75,6
1,0	43,3	45,2	15,8	35,0	21,6	79,9
2,0	41,1	52,1	21,1	40,5	32,8	100
3,0	42,6	46,6	24,2	51,9	0	80,5
4,0	43,5	52,9	19,5	36,8	31,3	86,8
24	37,1	43,4	14,8	34,2	28,9	71,1
72	44,9	50,7	22,1	43,5	23,6	84,9
168	44,3	58,1	26,1	44,9	31,7	109

Für NAcT konnten keine pharmakokinetischen Parameter berechnet werden.

- PEth (Trinkversuch II)

Der Konzentrationsverlauf (Abbildung 39) von PEth und der zugehörige Box-Plot (Abbildung 40) wurden ebenfalls dargestellt und die Messgrößen tabellarisch aufgeschlüsselt (Tabelle 41).

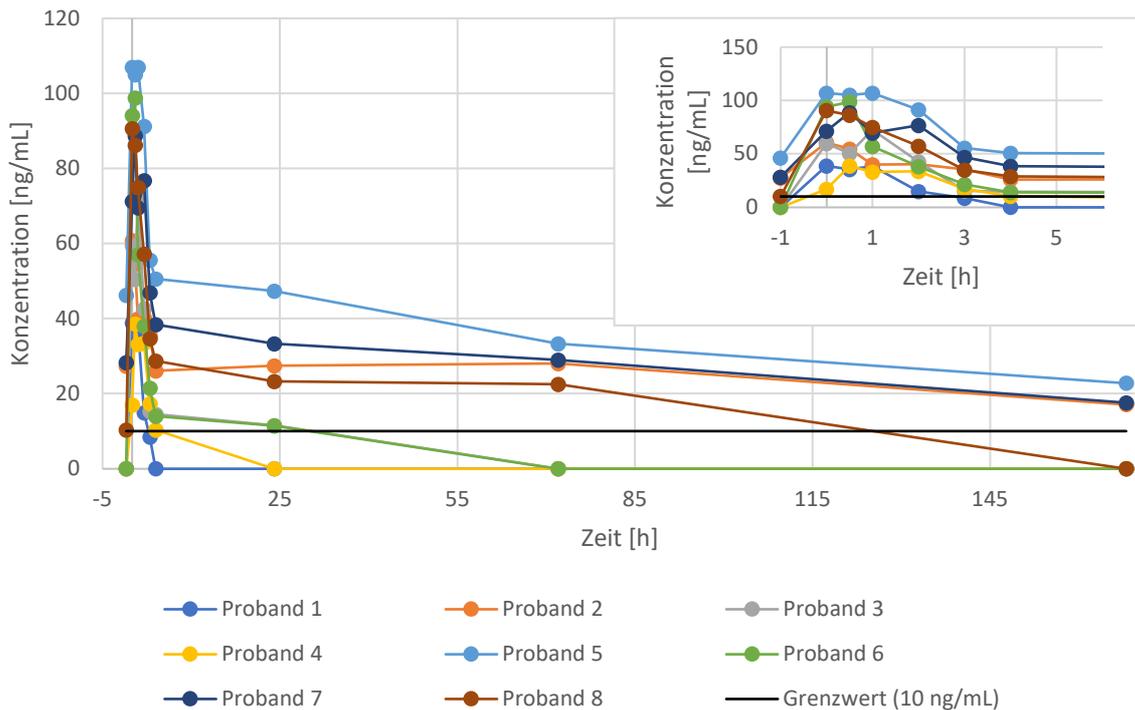


Abbildung 39: Individuelle Konzentrationsverläufe des Alkoholbiomarkers PEth im Blut im zweiten Trinkversuch (Ziel-BAK 0,4 ‰), inklusive einer Detaildarstellung des ersten Versuchstages

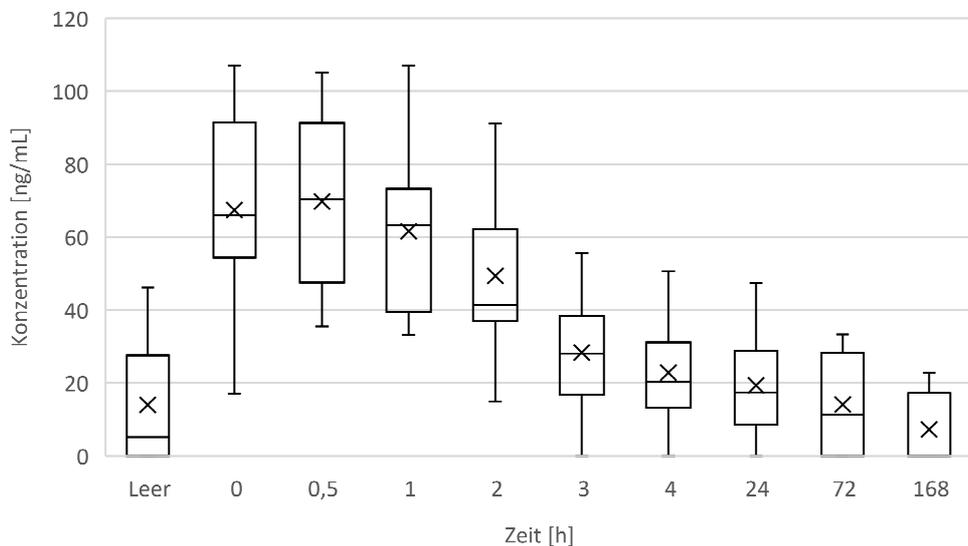


Abbildung 40: Box-Plot-Diagramm von PEth im zweiten Trinkversuch

Tabelle 41: Darstellung der Parameter Median, Mittelwert, Standardabweichung, relative Standardabweichung, Minima und Maxima für PEth im zweiten Trinkversuch

Zeit [h]	Median [ng/mL]	Mittelwert [ng/mL]	SD [ng/mL]	RSD [%]	Minimum [ng/mL]	Maximum [ng/mL]
Leer	5,15	14,0	16,6	119	0	46,2
0	66,0	67,4	28,1	41,6	17,0	107
0,5	70,4	69,7	26,1	37,5	35,5	105
1,0	63,3	61,6	23,1	37,5	33,1	107
2,0	41,4	49,3	23,1	46,8	14,9	91,2
3,0	28,1	28,3	17,0	60,1	0	55,6
4,0	20,3	22,8	15,3	67,2	0	50,6
24	17,4	19,3	15,5	80,6	0	47,3
72	11,3	14,1	14,4	102	0	33,3
168	0	7,19	9,41	131	0	22,8

Aus den erhaltenen Daten aller Probanden wurden die pharmakokinetischen Parameter ermittelt. Die Ergebnisse der Größen c_{\max} , t_{\max} , k_e und $t_{1/2}$ zu PEth finden sich in Tabelle 42. Zusätzlich wurde die terminale Halbwertszeit ($t_{1/2}$ terminal) für PEth aus den Ergebnissen ab 4,0 h für die Probanden 2 bis 8 berechnet.

Tabelle 42: Pharmakokinetische Parameter c_{\max} , t_{\max} , k_e und $t_{1/2}$ für PEth im zweiten Trinkversuch

Parameter	Median	Mittelwert	SD	RSD [%]
c_{\max} [ng/mL]	80,7	74,5	24,7	33,1
t_{\max} [h]	0,250	0,313	0,348	111
k_e [h⁻¹]	0,023	0,146	0,227	156
$t_{1/2}$ gesamt [h]	36,2	55,4	52,0	93,8
$t_{1/2}$ terminal [h] (N=8)	145	149	71,8	48,2

- Zusammenfassung Trinkversuch II

Wie auch schon für den ersten Teil des Trinkversuches wurde ein Diagramm erstellt, welches die Mittelwerte der einzelnen Alkoholbiomarker in Abhängigkeit von den Blutentnahmezeiten zusammenfasst (Abbildung 41). Da die Spannbreite der Konzentrationswerte zwischen den einzelnen Analyten stark variierte, wurde auf die linksbündige y-Achse eine separate Skalierung für EtG und EtS angewendet und rechtsbündig für NAcT und PEth eingerichtet.

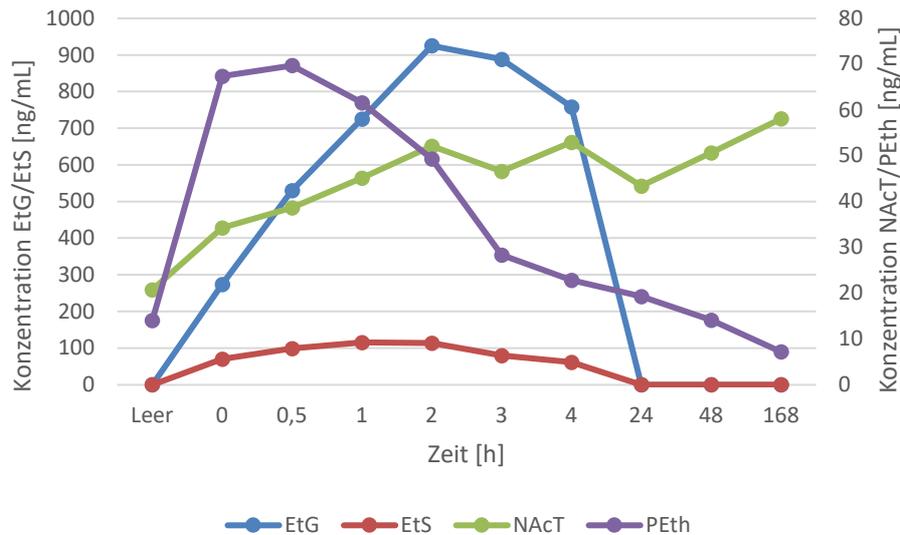


Abbildung 41: Mittelwerte der einzelnen Biomarker im zweiten Trinkversuch

3.4.2 Darstellung der Urinausscheidung von EtG und EtS

Eine am IRVM etablierte LC-MS/MS-Methode zum Nachweis von EtG und EtS in Urin wurde verwendet, um die Ausscheidung beider Biomarker in einer zusätzlichen Matrix zu bestimmen. Da aufgrund der individuellen Flüssigkeitsaufnahme während der Trinkversuche der abgegebene Urin in seiner Konzentration variierte, wurde ergänzend der Kreatinin-Wert jeder Probe bestimmt. Anschließend wurden die ermittelten Kreatinin-Konzentrationen auf 100 mg/dL genormt und der daraus resultierende Faktor auf die gemessenen EtG- und EtS-Werte angewendet. Beispielhaft sind die Werte von Proband 1 aus dem zweiten Trinkversuch in Tabelle 43 dargestellt, um zu zeigen welche Parameter verwendet wurden. Neben der Kreatinin-Konzentration wurde auf dem AU 480 zusätzlich die zugehörige EtG-Konzentration über einen Immunoassay gemessen. Erreichten die gemessenen Konzentrationen Werte über dem Kalibrationsbereich, wurde als Messwert 9999 ng/mL ausgegeben. Ergaben sich Werte unter dem Grenzwert von 100 ng/mL im Falle der AU 480-Messung sind diese in Tabelle 43 mit dem Wert „0 ng/mL“ versehen.

Tabelle 43: Ermittelte Konzentrationen von EtG und EtS in Urin, sowie der Kreatinin-Konzentration mit anschließender Normung auf 100 mg/dL Kreatinin von Proband 1 im ersten Trinkversuch

Zeit [h]	EtG [ng/mL]	EtS [ng/mL]	Kreatinin [mg/dL]	EtG AU [ng/mL]	Verhältnis Kreatinin	C _{end} EtG [ng/mL]	C _{end} EtS [ng/mL]
Leer	0	0	294	0	0,340	0	0
0	6610	3290	267	9999	0,375	2476	1232
0,5	24200	13500	155	9999	0,645	15613	8710
1,0	7880	3270	22	9999	4,55	35818	14864
2,0	6540	2450	15	9999	6,67	43600	16333
3,0	20000	6230	42	9999	2,38	47619	14833
4,0	18000	4920	46	9999	2,17	39130	10696
24	640	124	156	364	0,641	410	79
72	0	0	78	0	1,28	0	0
168	0	0	183	0	0,546	0	0

Die ausführlichen Daten aller Probanden finden sich im Anhang der Arbeit.

Trinkversuch I (Ziel-BAK 0,8 ‰)

Aus den gemessenen und errechneten Werten wurden ebenfalls für EtG und EtS Box-Plots erstellt (Abbildung 42), wobei für die Darstellung die genormten Werte verwendet wurden. Bei den Probanden 1, 4, 7 und 9 konnten nicht zu allen Zeitpunkten Urinabgaben durchgeführt werden, weshalb die fehlenden Proben nicht in die Berechnung mit einbezogen wurden.

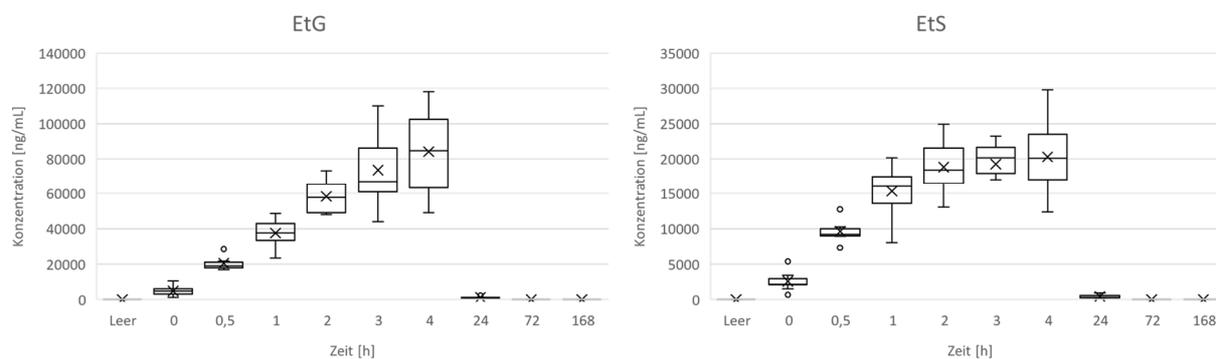


Abbildung 42: Ausscheidungskinetiken von EtG und EtS in Urin im ersten Trinkversuch (nach Normierung)

Trinkversuch II (Ziel-BAK 0,4 ‰)

Im zweiten Trinkversuch konnten zu allen Zeitpunkten Urinproben asserviert werden. Auch für die Auswertung dieser Proben wurden Box-Plot-Diagramme aus den genormten Konzentrationen der gemessenen Werte von EtG und EtS erstellt (Abbildung 43).

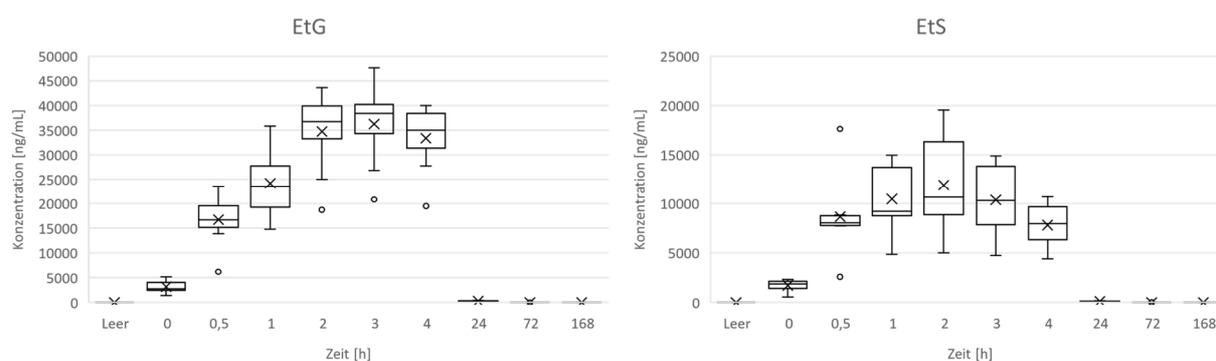


Abbildung 43: Ausscheidungskinetiken von EtG und EtS in Urin im zweiten Trinkversuch (nach Normierung)

3.4.3 Blutalkoholkonzentration im Verlauf der Trinkversuche

Zu jeder Blutentnahme wurde zusätzlich ein Serum-Röhrchen entnommen, um anschließend den Verlauf der BAK der einzelnen Probanden zu visualisieren. Exemplarisch wurde der Verlauf für Proband 1 aus dem ersten Trinkversuch dargestellt (Tabelle 44). Die Werte der anderen Probanden finden sich im Anhang.

Tabelle 44: Messwerte der BAK des Probanden 1 aus dem ersten Trinkversuch

<u>Zeitpunkt [h]</u>	<u>BAK [‰]</u>
Leer	0,00
0	0,91
0,5	0,93
1,0	0,84
2,0	0,62
3,0	0,37
4,0	0,16
24	0,00
72	0,00
168	0,00

Für den Verlauf der BAK im ersten Trinkversuch wurde ein Box-Plot-Diagramm erstellt (Abbildung 44), welches die BAKs aller Probanden zusammengefasst darstellt.

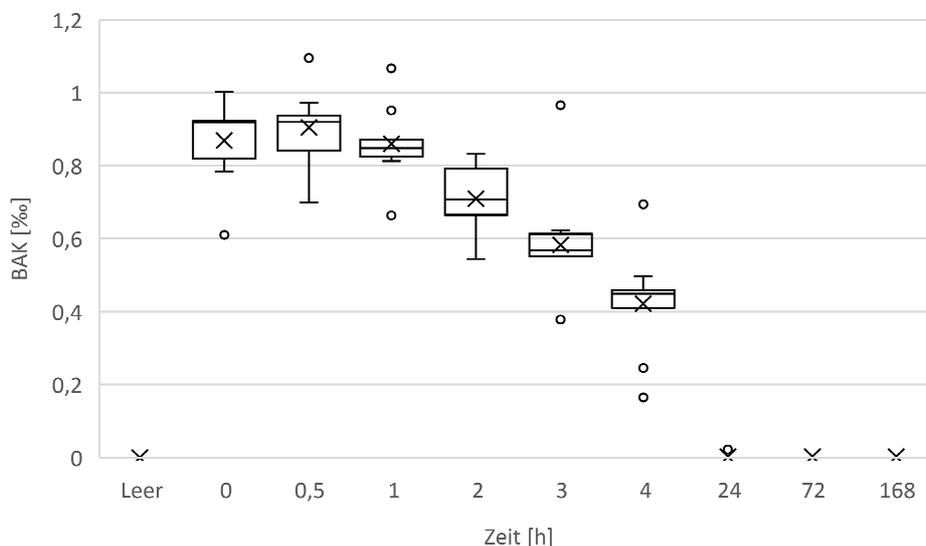


Abbildung 44: Box-Plot-Diagramm des BAK-Verlaufs im ersten Trinkversuch

In Tabelle 45 sind verschiedene Kenngrößen der linearen Elimination von EtOH im ersten Trinkversuch dargestellt. Diese beinhaltet die durchschnittliche maximale Konzentration (c_{\max}), die Zeit zu der diese erreicht wurde (t_{\max}), die mittlere Eliminationsrate und den Zeitpunkt, zu dem durchschnittlich die Resorption vollständig abgeschlossen war.

Tabelle 45: Kenngrößen c_{\max} , t_{\max} , Abbaurrate und Resorptionsende für die BAK im ersten Trinkversuch

Parameter	Median	Mittelwert	SD	RSD [%]
c_{\max} [‰]	0,932	0,926	0,088	9,56
t_{\max} [h]	0,500	0,444	0,283	63,7
Abbaurrate [‰/h]	0,148	0,153	0,025	16,4
Resorptionsende [h]	1,00	1,00	0,624	62,4

Dieselbe Vorgehensweise wurde ebenfalls für den zweiten Trinkversuch angewendet (Abbildung 45).

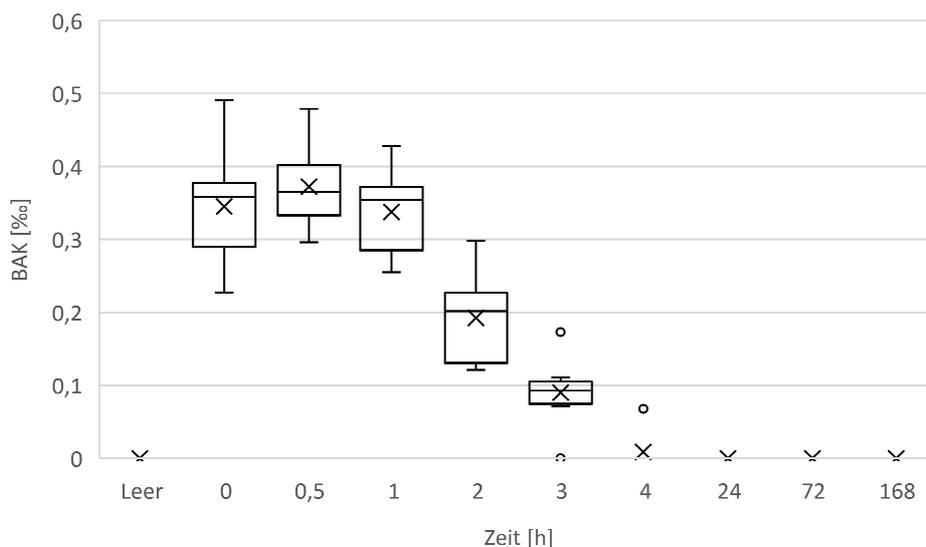


Abbildung 45: Box-Plot-Diagramm des BAK-Verlaufs im zweiten Trinkversuch

In Tabelle 46 finden sich die zugehörigen Kenngrößen der Elimination im zweiten Trinkversuch.

Tabelle 46: Kenngrößen c_{\max} , t_{\max} , Abbaurrate und Resorptionsende für die BAK im ersten Trinkversuch

Parameter	Median	Mittelwert	SD	RSD [%]
c_{\max} [‰]	0,384	0,394	0,062	15,6
t_{\max} [h]	0,500	0,375	0,331	88,2
Abbaurrate [‰/h]	0,134	0,134	0,027	20,1
Resorptionsende [h]	1,00	0,750	0,354	47,1

3.4.4 Auftragung der gemessenen Werte der einzelnen Alkoholbiomarker gegen die ermittelten EtG- und EtS-Konzentrationen in Urin

Um die Ausscheidung von EtG und EtS in Urin mit der Bildung und dem Abbau der einzelnen Biomarker in Blut zu vergleichen, sind in den folgenden Abbildungen die in Blut gemessenen Alkoholbiomarker-Konzentrationen gegen die ermittelten EtG- und EtS-Konzentrationen in Urin aufgetragen. Auf der linksseitigen y-Achse ist die Konzentration des entsprechenden Biomarkers in ng/mL aufgetragen, wohingegen die rechtsseitige Achse die EtG- und EtS-Konzentration in Urin, ebenfalls in ng/mL, darstellt. In Abbildung 46 sind die einzelnen Diagramme für den ersten Trinkversuch abgebildet und Abbildung 47 zeigt die Ergebnisse für

den zweiten Versuch. Zur übersichtlicheren Darstellung wurden für alle Abbildungen die Mittelwerte zu den entsprechenden Zeitpunkten gebildet und ohne SD dargestellt.

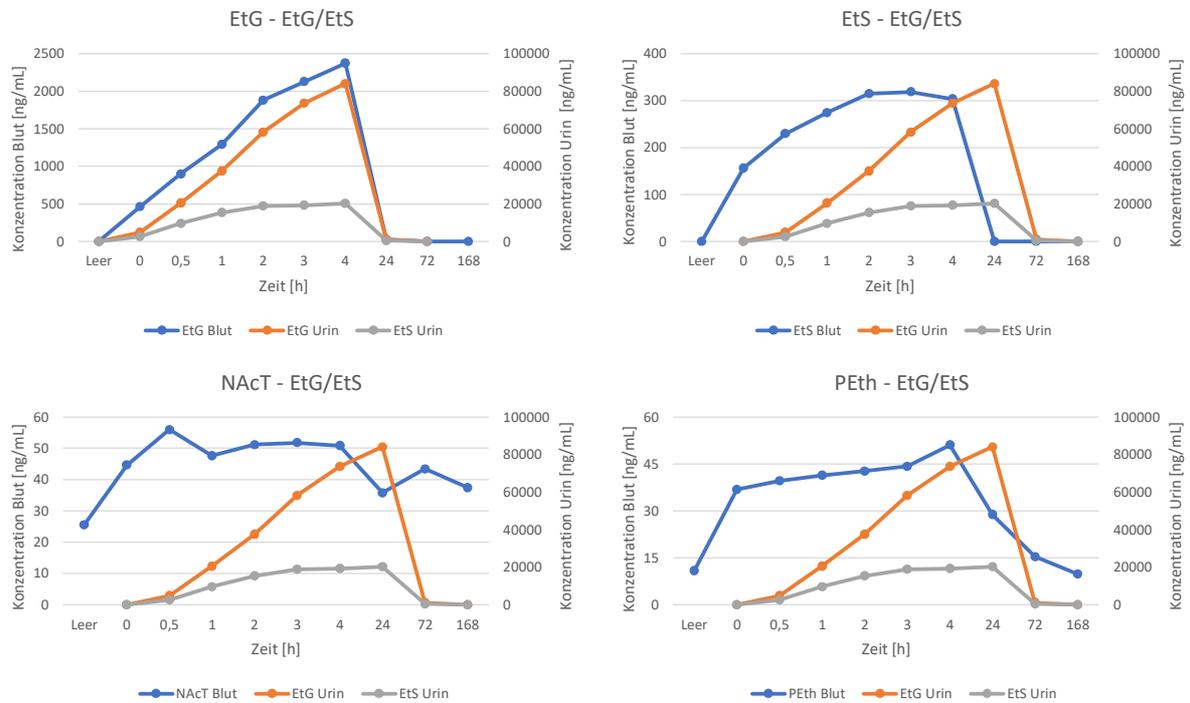


Abbildung 46: Darstellung der einzelnen Biomarkerkonzentrationen in Blut gegen die normierten EtG- und EtS-Konzentrationen in Urin aus dem ersten Trinkversuch

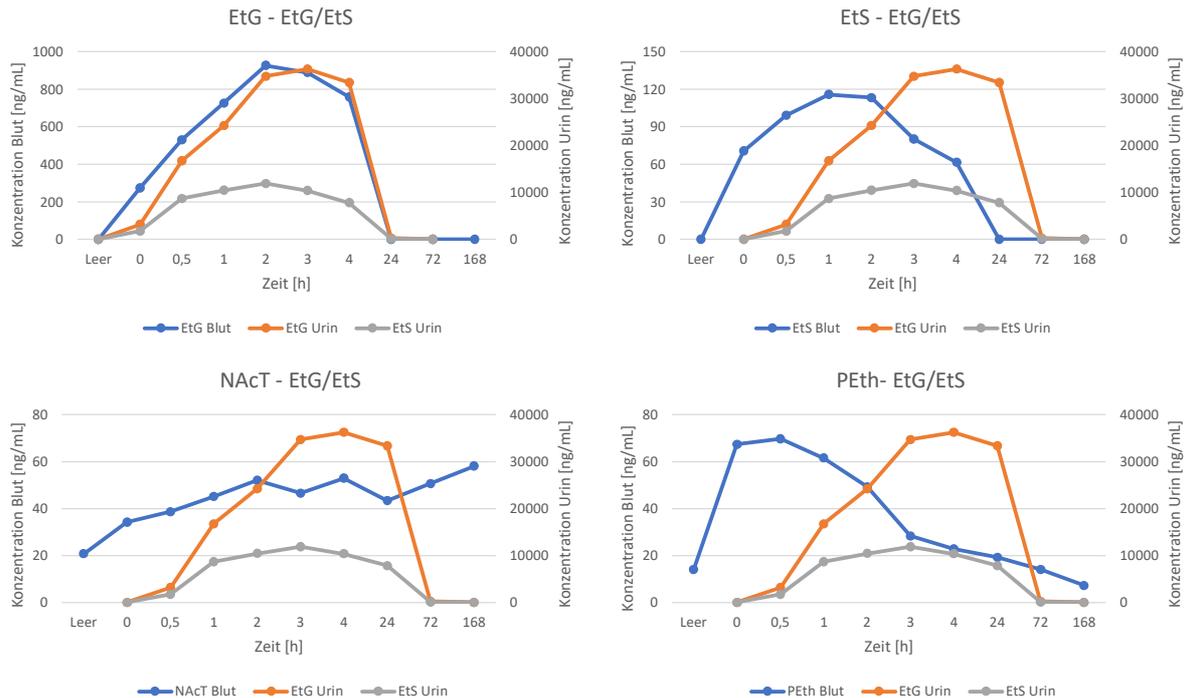


Abbildung 47: Darstellung der einzelnen Biomarkerkonzentrationen in Blut gegen die normierten EtG- und EtS-Konzentrationen in Urin aus dem zweiten Trinkversuch

3.4.5 Auftragung der gemessenen Werte der einzelnen Alkoholbiomarker gegen die ermittelten BAK-Werte

Zu jedem Zeitpunkt der Blutentnahmen in den Trinkversuchen wurde zusätzlich ein Serum-Röhrchen Blut entnommen, um den Verlauf der BAK zu dokumentieren. In den folgenden beiden Abbildungen sind die ermittelten Alkoholbiomarker-Konzentrationen gegen die gemessenen BAK-Werte zu den entsprechenden Zeitpunkten in den beiden Trinkversuchen aufgetragen. Die linksbündige y-Achse gibt die Konzentration des Alkoholbiomarkers in ng/mL an, wohingegen rechtsbündig die BAK in % dargestellt ist. In den Abbildungen 48 und 49 sind die entsprechenden Diagramme aufgezeigt, wobei zur übersichtlicheren Darstellung die Mittelwerte der einzelnen Proben ermittelt und auf die Einbindung der SD verzichtet wurde.

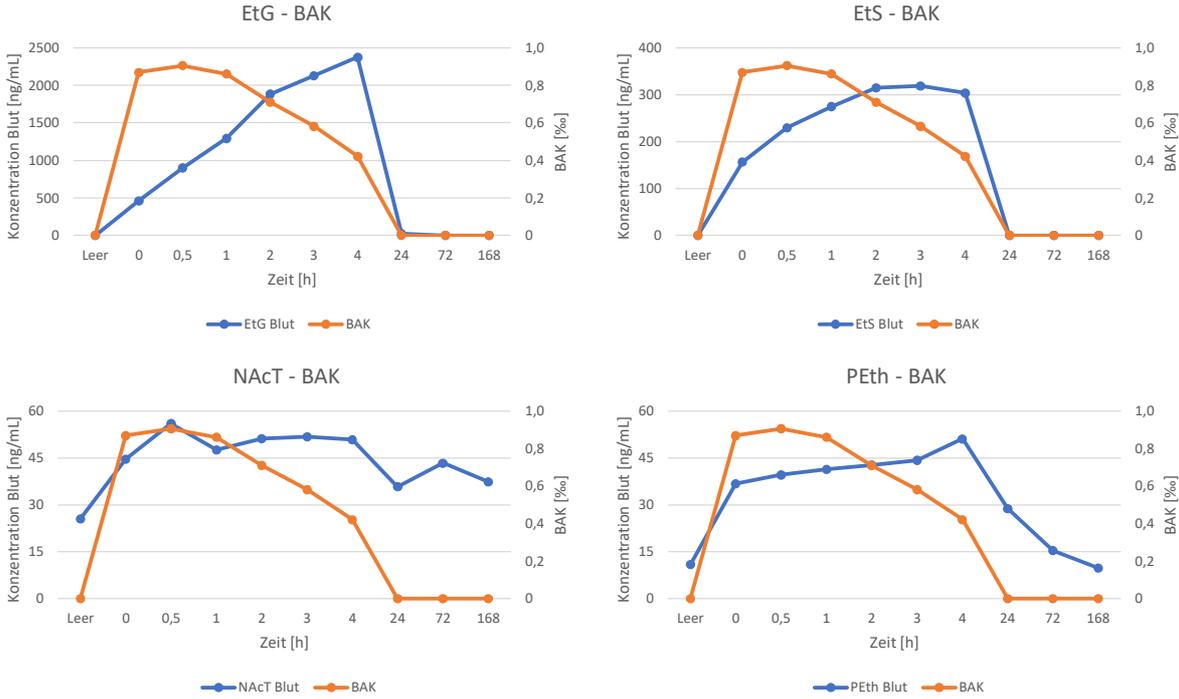


Abbildung 48: Darstellung der einzelnen Biomarkerkonzentrationen in Blut gegen die BAK aus dem ersten Trinkversuch

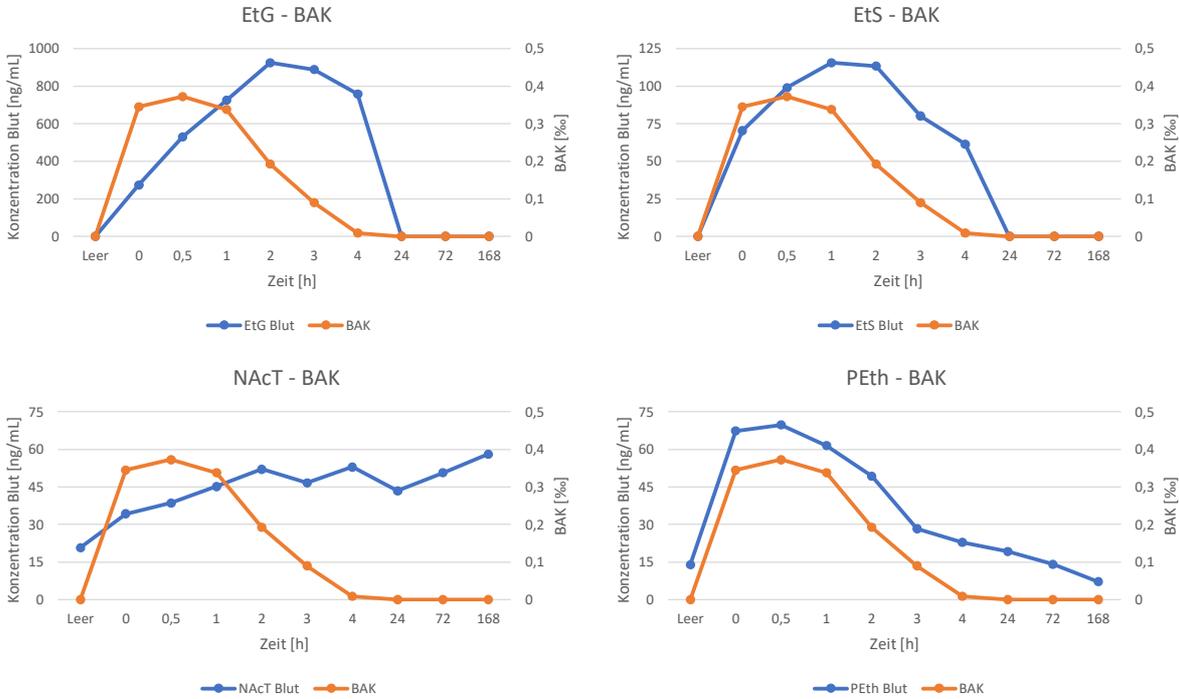


Abbildung 49: Darstellung der einzelnen Biomarkerkonzentrationen in Blut gegen die BAK aus dem zweiten Trinkversuch

3.4.6 Auftragung der BAK gegen die gemessenen Werte von EtG und EtS im Urin

Um den Verlauf der BAK mit der Ausscheidung von EtG und EtS in Urin zu vergleichen, sind die Mittelwerte der ausgewerteten Blutserum- und Urinproben in zwei Abbildungen dargestellt (Abbildung 50). Die linksbündige y-Achse zeigt die Konzentration von EtG und EtS in Urin ng/mL und die rechtsbündige Achse zeigt die zugehörigen BAK-Werte in ‰.

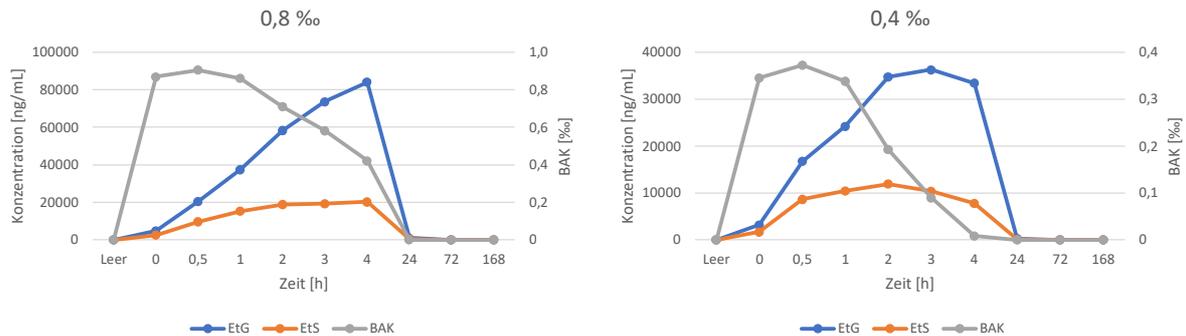


Abbildung 50: Auftragung der EtG- und EtS-Konzentrationen im Urin gegen die BAK zu den definierten Abnahmezeitpunkten in beiden Trinkversuchen

3.4.7 Bestimmung des endogenen Levels für NAcT

Für die Auswertung des Trinkversuches und die Etablierung von NAcT als Alkoholbiomarker ist aufgrund der physiologischen Bildung die Bestimmung eines endogenen Grundwertes zwingend erforderlich. Für die anderen drei Alkoholbiomarker war dies nicht nötig, da diese nur in Anwesenheit von Alkohol im menschlichen Körper gebildet werden. Um die Verteilung der endogenen Konzentrationen von NAcT in den 17 Proben vor Trinkbeginn darzustellen, wurde ein Box-Plot-Diagramm erstellt (Abbildung 51). In diesem wurde die Varianz der einzelnen NAcT-Werte in den entnommenen Leerproben der Probanden bestimmt und dargestellt. Für die Erstellung der zugehörigen Kalibrationsgeraden wurde in allen Fällen dieselbe Charge Blut verwendet.

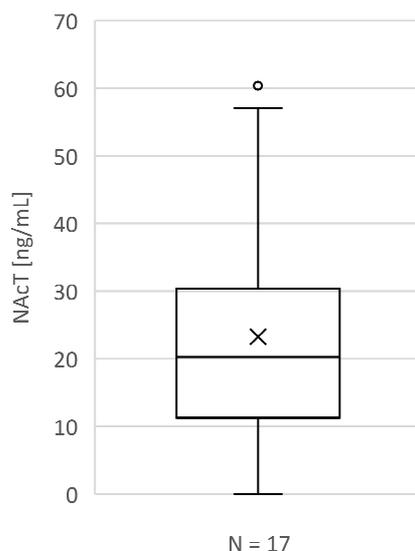


Abbildung 51: Box-Plot der ermittelten NAcT-Werte in ng/mL aus den erhobenen Leerproben (N = 17)

Der Median der Werte wurde mit 20,3 ng/mL und der Mittelwert mit 23,3 ng/mL ermittelt. Die Standardabweichung belief sich auf 18,7 ng/mL, woraus sich eine relative Standardabweichung von 80,3 % ergab. Der minimale Wert lag bei 0 ng/mL und das Maximum war bei 60,4 ng/mL zu finden.

3.5 Ergebnisse aus der Kooperation mit dem Krankenhaus Salem

3.5.1 Die Biomarker im Entzugskontext

Durch eine Kooperation mit dem Krankenhaus Salem konnten Blutproben von 100 Probanden untersucht werden, welche jeweils vor dem Beginn und dem Ende des Entzuges bei den Patienten entnommen wurden. Die Probanden hatten ein Durchschnittsalter von 51 Jahren (SD = 11,7 Jahre). Die Kohorte bestand zu 28 % aus Frauen und 72 % aus Männern. Nicht bei allen Probanden wurden beide Proben entnommen (N = 8). Die vorhandenen Proben wurden aber dennoch in die Kalkulation und Statistik miteinbezogen. Werte über dem Kalibrationsbereich wurden mit dem Vermerk „ca.“ versehen und bei der Erstellung der Statistiken als valide Messwerte angenommen. Im Folgenden sind die Box-Plots für die Alkoholbiomarker EtG (Abbildung 52), EtS (Abbildung 53) und PEth (Abbildung 54) der teilnehmenden Probanden zu Beginn und Ende des Entzuges abgebildet. In den Darstellungen

erfolgte die Quantilberechnung wiederum inklusive Median. Ein Entzug in diesem Kontext dauerte zwischen 0 und 21 Tagen (N = 99, Mittelwert: 5,82 Tage, SD = 2,54 Tage). Zusätzlich zu jedem Box-Plot wurden die Parameter Median, Mittelwert, SD, RSD, Minima und Maxima (Tabellen 47, 48 und 49) abgebildet.

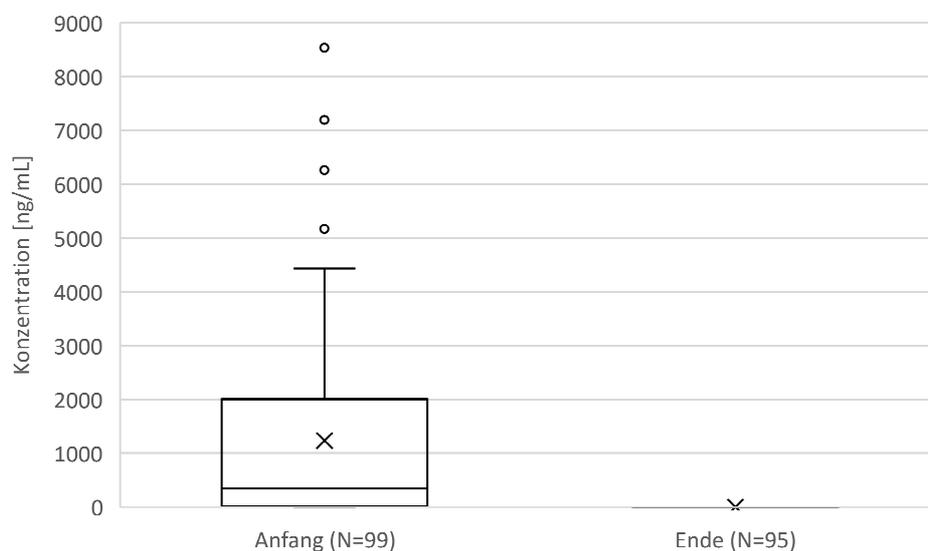


Abbildung 52: Box-Plot-Diagramm für den Alkoholbiomarker EtG im Entzugskontext

Tabelle 47: Median, Mittelwert, SD, RSD, Minimum und Maximum für den Biomarker EtG bezüglich des Beginns und Endes des Entzuges

Zeitpunkt	Median [ng/mL]	Mittelwert [ng/mL]	SD [ng/mL]	RSD [%]	Minimum [ng/mL]	Maximum [ng/mL]
Anfang	350	ca. 1233	1695	137	0	ca. 8530
Ende	0	0	0	-	0	0

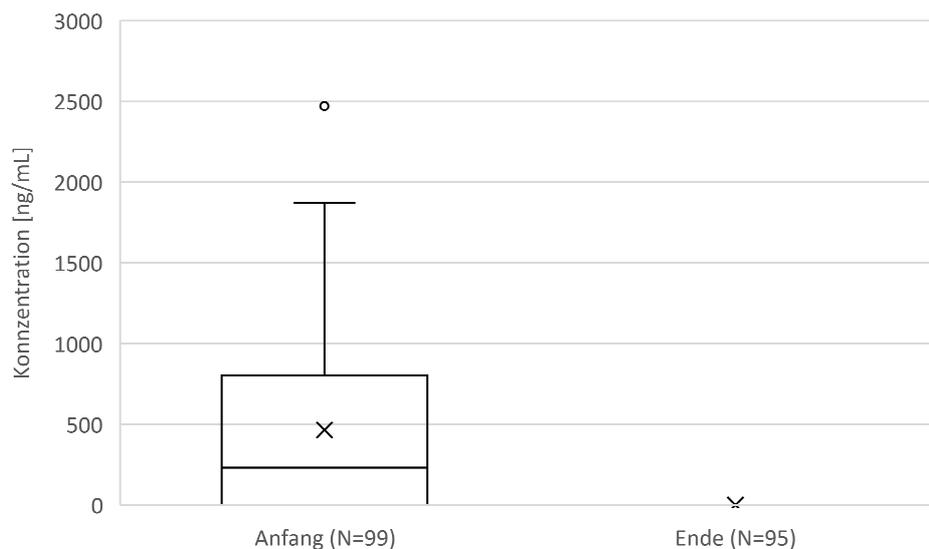


Abbildung 53: Box-Plot-Diagramm für den Alkoholbiomarker EtS im Entzugskontext

Tabelle 48: Median, Mittelwert, SD, RSD, Minimum und Maximum für den Biomarker EtS bezüglich des Beginns und Endes des Entzuges

Zeitpunkt	Median [ng/mL]	Mittelwert [ng/mL]	SD [ng/mL]	RSD [%]	Minimum [ng/mL]	Maximum [ng/mL]
Anfang	232	464	562	121	0	ca. 2470
Ende	0	0	0	-	0	0

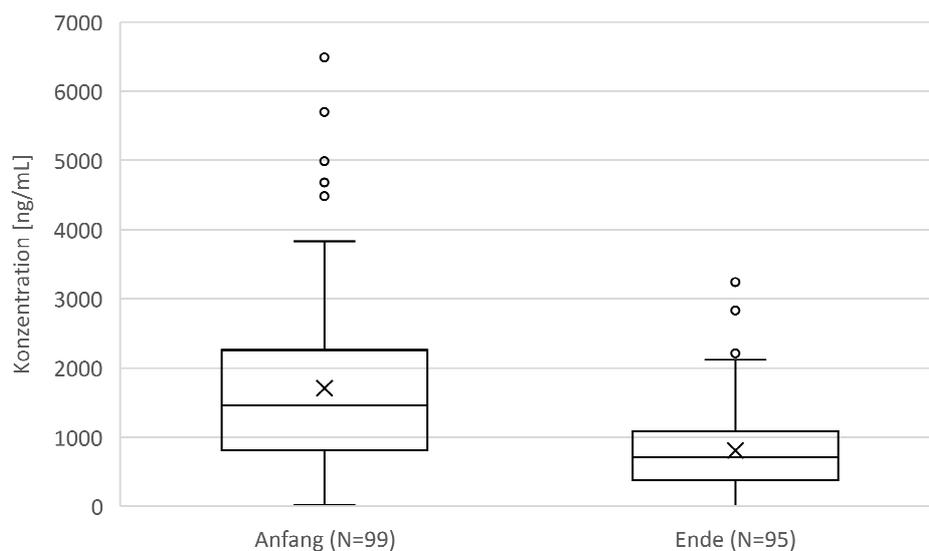


Abbildung 54: Box-Plot-Diagramm für den Alkoholbiomarker PEth im Entzugskontext

Tabelle 49: Median, Mittelwert, SD, RSD, Minimum und Maximum für den Biomarker PEth bezüglich des Beginns und Endes des Entzuges

Zeitpunkt	Median [ng/mL]	Mittelwert [ng/mL]	SD [ng/mL]	RSD [%]	Minimum [ng/mL]	Maximum [ng/mL]
Anfang	ca. 1460	ca. 1708	ca. 1282	75	23	ca. 6490
Ende	704	810	590	72,9	0	ca. 3240

3.5.2 Zusammenhang zwischen Entgiftung, Biomarkern und Lebersteifigkeit

Um zu prüfen, ob es einen Zusammenhang zwischen dem Parameter der Lebersteifigkeit und der Ausscheidung bzw. dem Abbau der einzelnen Alkoholbiomarker gab, wurde die Differenz aus den Werten, welche in den Proben zum Zeitpunkt der Aufnahme und der Entlassung gemessen wurden, gebildet und in das Verhältnis zu den Kategorien der Lebersteifigkeit gesetzt. Von Müller und Sandrin wurden hierfür über den FibroScan® vier Kategorien definiert: bis 6 kPa wird die Leber als gesund angesehen, zwischen 6 und 8 kPa ist die Kategorisierung nicht weiter definiert. Ab 8 bis 12,5 kPa wird von einer fortgeschrittenen Fibrose (F3) ausgegangen und ab einem Wert von 12,5 kPa lautet die Diagnose Zirrhose (F4). (Mueller und Sandrin 2010) Die folgenden Auswertungen wurden nur für diejenigen Probanden vorgenommen, welche eine Blutprobe zu Beginn und Ende des Entzuges abgegeben hatten und deren PEth-Konzentrationen nach dem Klinikaufenthalt unter denen zu Beginn lagen (N = 91). Hierfür wurde ein Box-Plot-Diagramm erstellt, welches die Lebersteifigkeit in Abhängigkeit zu der Differenz des Biomarkers PEth angibt. Dargestellt ist dieser Zusammenhang in Abbildung 55. In den Fällen von EtG und EtS fand während des Entzuges ein 100 %iger Abbau statt, weshalb eine zusammenfassende Korrelation graphisch nicht darzustellen war.

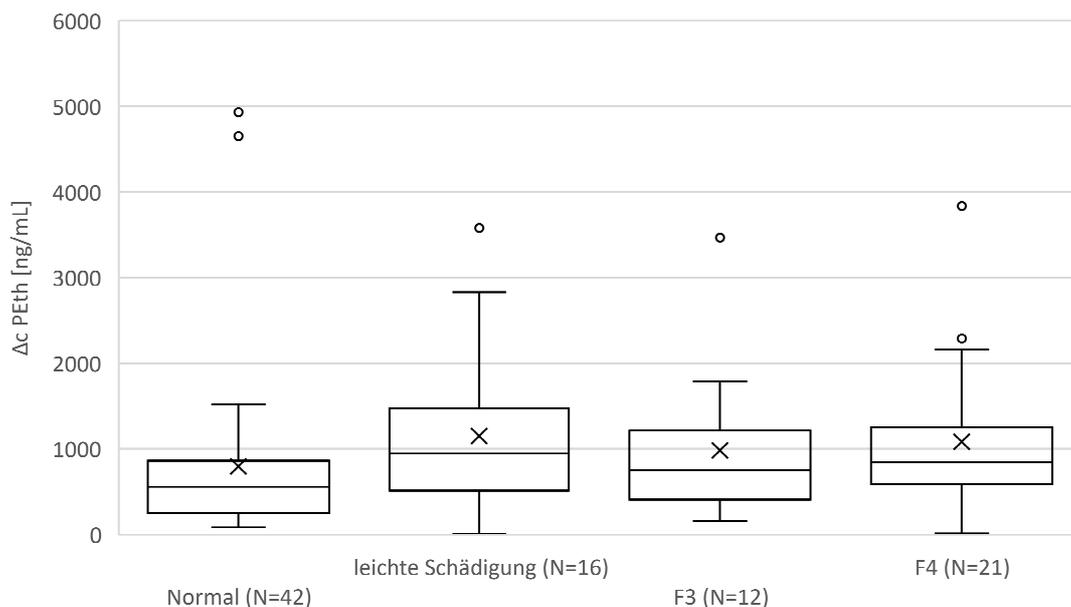


Abbildung 55: Box-Plot-Diagramm des Zusammenhangs zwischen Lebersteifigkeit und dem PETH-Abbau

Zusätzlich sind die entsprechenden Parameter, wie Median, Mittelwert, SD, RSD, Minima und Maxima in der Tabelle 50 zusammengefasst.

Tabelle 50: Zusammenfassung der Parameter Median, Mittelwert, SD, RSD, Minima und Maxima für die einzelnen Kategorien der Lebersteifigkeit bezüglich der Konzentrationsabnahme von PETH

Kategorie	Median [ng/mL]	Mittelwert [ng/mL]	SD [ng/mL]	RSD [%]	Minimum [ng/mL]	Maximum [ng/mL]
Normal	559	796	978	123	84	ca. 4930
Leichte Schädigung	946	ca. 1151	976	84,8	4,2	ca. 3580
F3	754	984	884	89,8	159	ca. 3466
F4	850	ca. 1082	868	80,2	13,5	ca. 3836

Um zu testen, ob zwischen der Lebersteifigkeit und dem entsprechenden Abbau von PETH ein signifikanter Zusammenhang besteht, wurde der Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Bezüglich dieses Tests fand sich bei einem Konfidenzintervall von 95 % und unter Einbezug eines Korrekturfaktors ein H-Wert von 6,44 was kleiner ist als der Chi-Quadrat-Wert bei 3 Freiheitsgraden.

Um einen noch genaueren Blick in die individuellen Abbauraten in Abhängigkeit von der Lebersteifigkeit für den Alkoholbiomarker PETH zu bekommen, wurde durch Einbezug der

individuellen Aufenthaltsdauer in der Entzugsklinik der tägliche PEth-Abbau der einzelnen Patienten berechnet. Für die statistische Auswertung wurden Probanden ausgespart, welche die Klinik am selben Tag wieder verließen (N = 2) und deren PEth-Konzentration zu Ende des Aufenthaltes höher als zu Beginn war (N = 2). Die Einteilung erfolgte wiederum in die vier zuvor dargestellten Gruppierungen der Lebersteifigkeit (Abbildung 56 und Tabelle 51).

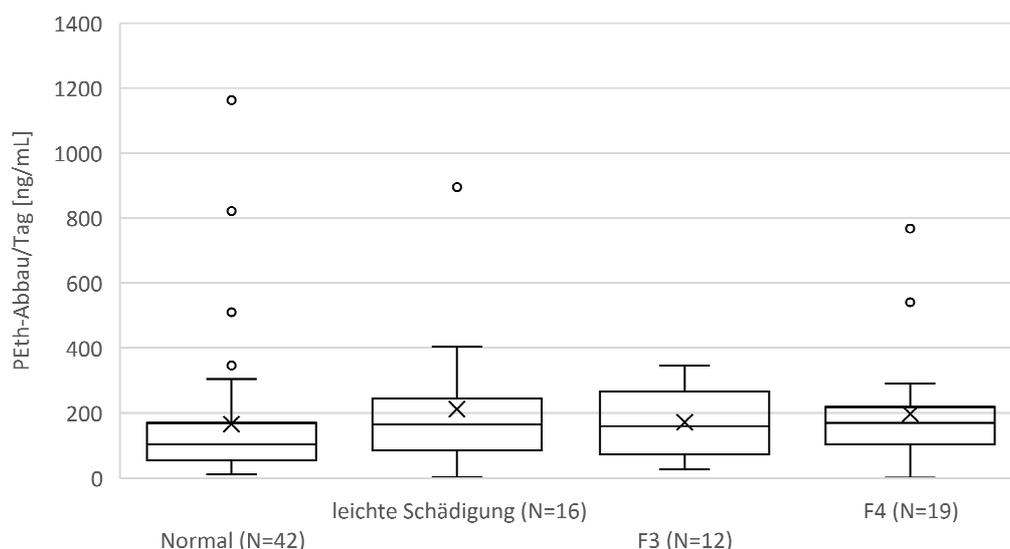


Abbildung 56: Zusammenhang zwischen dem individuellen täglichen PEth-Abbau in Abhängigkeit von der Aufenthaltsdauer im Entzugsprogramm und dem Grad der Lebersteifigkeit

Tabelle 51: Zusammenfassung der Parameter Median, Mittelwert, SD, RSD, Minima und Maxima für die einzelnen Kategorien der Lebersteifigkeit bezüglich der Konzentrationsabnahme von PEth pro Tag

Kategorie	Median [ng/mL]	Mittelwert [ng/mL]	SD [ng/mL]	RSD [%]	Minimum [ng/mL]	Maximum [ng/mL]
Normal	103	166	216	130	11	ca. 1163
Leichte Schädigung	165	211	204	97	1	895
F3	160	171	113	66	26	347
F4	170	197	179	91	1	767

Für diese Verteilung wurde ebenfalls der Kruskal-Wallis-Test hinsichtlich der Frage durchgeführt, ob der individuelle tägliche Abbau von PEth im Zusammenhang zum Grad der Lebersteifigkeit steht. Hierbei ergab sich nach dem Einbezug eines Korrekturfaktors ein H-Wert von 3,26. Der Chi-Quadrat-Wert liegt bei 3 Freiheitsgraden und einem Konfidenzintervall von 95 % bei einem Wert von 7,81.

4 Diskussion

Nachfolgend werden die im Rahmen dieser Arbeit generierten Ergebnisse individuell und im Vergleich zu bekannter Literatur diskutiert. Die Methodenentwicklung und -validierung als Hauptthema der Arbeit wird direkt zu Beginn behandelt, gefolgt von der erweiterten Validierung in postmortalem Blut. Anschließend wird die Anwendung der Methode im Zusammenhang mit den ermittelten Pharmakokinetiken der einzelnen Alkoholbiomarker näher erläutert. Schließlich werden die Ergebnisse aus der Kooperation mit dem Salem Krankenhaus in Heidelberg in verschiedenen Kontexten bezüglich der Lebersteifigkeit diskutiert.

4.1 Methodenentwicklung

4.1.1 Chromatographische Auftrennung und Extraktionsverfahren

Die unterschiedlichen chemischen Beschaffenheiten der einzelnen Alkoholbiomarker, insbesondere der große Polaritätsunterschied zwischen den drei polaren Biomarkern EtG, EtS und NAcT und dem lipophilen Marker PEth, waren bei der Entwicklung der Methode eine große Herausforderung. Sowohl analytische Säulen mit stark lipophilem Packmaterial (Phenyl-Hexyl-Phase), die insbesondere für die Quantifizierung von PEth genutzt werden (Gnann et al. 2010; Schröck et al. 2017), sowie polare oder modifizierte unpolare Packmaterialien, die für die Quantifizierung von EtG und EtS genutzt werden (Halter et al. 2008; Hoiseth et al. 2009a), konnten den gestellten Anforderungen für die simultane Quantifizierung aller Biomarker nicht genügen. Auch neuartige modifizierte Säulen, wie die Luna Omega PS C18-Säule, konnten einen Nachweis von allen Analyten nicht garantieren. Oftmals war es nicht möglich alle Analyten von der Säule zu eluieren oder stärkere organische Elutionsmittel führten zu verringerten Retentionszeiten und unscharfen Peaks. Spätestens beim Wechsel von Reinstofflösungen auf die Matrix Vollblut war trotz mannigfaltiger Probenaufarbeitung ein Nachweis der einzelnen Biomarker gestört. Insbesondere auf der HILIC-Säule war ein Nachweis im Vollblut nicht länger möglich (siehe Abbildung 15), obwohl dies mit der Reinstofflösung (siehe Abbildung 14) noch gelang und Versuche mit anderen Säulen zeigten, dass in den Proben alle Substanzen vorhanden waren. Sowohl bei polaren als auch unpolaren Substanzen kann eine massenspektrometrische Detektion durch Ionensuppression auftreten.

(Annesley 2003) Aus diesem Grund benötigt die erfolgreiche Analytik von PEth in biologischen Matrices eine Abtrennung anderer Phospholipide bei der Probenvorbereitung oder eine gewisse chromatographische Auftrennung der einzelnen Phospholipide. (Ullah et al. 2017)

Daher ist auch nicht jedes Säulenmaterial mit jeder beliebigen Matrix kompatibel. Diese Problematik, welche ebenfalls auf die unterschiedlichen chemischen Beschaffenheiten der einzelnen Alkoholbiomarker zurückzuführen ist, konnte durch die Verwendung einer Luna Omega Sugar-Säule gelöst werden. Dieses Packmaterial vereint lipophile sowie hydrophile Eigenschaften, welche durch die Verwendung verschiedener Laufmittel entsprechend verstärkt oder abgeschwächt werden können, um die parallele Detektion von Molekülen mit unterschiedlichen Beschaffenheiten zu ermöglichen. (Phenomenex 2018) Zur Ermittlung der idealen analytischen Bedingungen für alle Substanzen wurden verschiedene Laufmittelzusammensetzungen getestet. Hierbei setzte sich die Anwendung eines 25 mM Ammoniumformiat-Puffers mit einem pH von 3,3 als wässriges Laufmittel und eine Mischung aus ACN/iProp (85:15, v/v) mit dem Zusatz von 0,1 % Ameisensäure als organisches Laufmittel durch. In der Literatur sind für die einzelnen Analyten, je nach Säulenmaterial, unterschiedliche Pufferarten und -konzentrationen beschrieben. Auffällig hierbei war der häufige Gebrauch von Ammoniumacetat-Puffern (mit ACN-Anteil) in Kombination mit iProp für den Nachweis von PEth (Helander und Zheng 2009; Schröck et al. 2017). Im Vergleich dazu wurde für die Analytik von EtG und EtS meistens auf Wasser mit einem Ameisensäure-Zusatz als wässriges und einem organischen Laufmittel wie MeOH oder ACN zurückgegriffen. (Halter et al. 2008; Hegstad et al. 2017; Hoiseth et al. 2007b) Im Falle von NAcT in Blut waren die Laufmittel 10 mM Ammoniumacetat und ACN mit 0,1 % Ameisensäure. (Luginbühl et al. 2017) Dahingegen finden sich in den Applikationen von Phenomenex für die Luna Omega Sugar-Säule meist Wasser und ACN als Laufmittel. (Phenomenex 2018) Hierdurch zeigen sich die individuellen Ansprüche, welche zur analytischen Separierung der einzelnen Biomarker berücksichtigt werden mussten. Bei der Verwendung von Wasser und ACN auf der neuartigen Säule, entsprechend der angegebenen Applikationen, konnte bei der Detektion keine ausreichende Ionisierung der einzelnen Analyten erzielt werden, was sich in einer unzureichenden Peakform, Separierung und Intensität widerspiegelte. Dies ist durch das Fehlen eines Puffersalzes und eines sauren Zusatzes im Laufmitteln zu erklären, da diese Parameter die Stabilität der Analyten innerhalb der chromatographischen Trennung und

späteren Ionisierung erhöhen. Zunächst wurde Ammoniumacetat als Puffersalz verwendet, da dieses in den vorgestellten Publikationen am häufigsten verwendet wurde. Dies führte zu einer unzureichenden Separierung der einzelnen Analyten und zum Tailing der Substanzpeaks. Ein anderes gängiges Puffersalz ist Ammoniumformiat, welches durch den Zusatz von Ameisensäure auf einen entsprechenden pH-Wert eingestellt werden kann. Aufgrund des kleineren Anions im Vergleich zu Ammoniumacetat konnten die bestehenden säulenspezifischen Charakteristika für die Trennung der einzelnen Analyten besser genutzt werden. Die chemische Beschaffenheit von Ammoniumformiat führte zu einer deutlichen Verbesserung der Intensität, Ionisierung und Peakformen der Biomarker. Die Verwendung dieser Zusammensetzung könnte, aufgrund der höheren Säurestärke von Ameisensäure, die Oberflächenbeschaffenheit der stationären Phase so polar gestalten, dass insbesondere die Retention der kleineren, hydrophilen Moleküle (EtS und NAcT) erhöht wurde. Hinzukommt, dass ein höherer Salzgehalt die Elution, insbesondere für den Parameter EtG verstärkte, da dieser aufgrund seines Glucuronid-Anteils die längste Retention auf der Säule zeigte. Mit einer Konzentration von 25 mM Ammoniumformiat konnte der beste Kompromiss für eine ausreichende Retention von EtS und NAcT auf der Säule erzielt und EtG dennoch von der Säule eluiert werden (siehe Abbildungen 16 und 17). Dieser Salzzusatz sorgt dafür, dass die Interaktionen mit der stationären Phase variiert werden können. Mit zunehmender Konzentration verringern sich die Interaktionen der Analyten mit der stationären Phase. Weiterhin tragen Salzgehalt und Ameisensäurezusatz zu einer verbesserten Ionisierung der Analyten bei, da durch einen sauren pH-Wert eine Protonierung der Analyten begünstigt ist, wodurch insbesondere die Intensität und Fragmentierung verbessert wird.

4.1.2 Festlegung des Rücklösemittels und Injektionsvolumens

Auch hier können die beschriebenen Schwierigkeiten auf die großen Polaritätsunterschiede zwischen den drei polaren Biomarkern EtG, EtS und NAcT und dem lipophilen Marker PEth zurückgeführt werden. Die verwendeten Laufmittelkomponenten konnten weder einzeln noch in verschiedenen Mischverhältnissen gewährleisten, dass alle vier Biomarker in ausreichenden Mengen aus dem Probenrückstand nach der Aufarbeitung gelöst werden konnten. Insbesondere EtG, als großer polarer Biomarker, zeigte eine sehr geringe Intensität, weshalb ein Gemisch gefunden werden musste, welches einen Konsens für alle Substanzen darstellte. Eine Erklärung, weshalb diese Problematik insbesondere bei EtG aufgetreten ist,

könnte der Säurezusatz in den verwendeten Lösungsmitteln sein, da dieser eine Protonierung der Substanz bewirken könnte. Bei EtG finden sich vermehrt funktionale Gruppen, welche eine Protonierung begünstigen (u.a. Hydroxylgruppen und eine Säurefunktion). Hierdurch wird insbesondere die Löslichkeit in organischen, unpolaren Laufmitteln erniedrigt. Um eine Lösung hierfür zu finden, wurden verschiedene Lösungsmittel- und Pufferzusammensetzungen getestet, wobei sich ein Gemisch aus Ethylacetat/MeOH (50:50, v/v) als vielversprechendste Variante herausstellte. Hierdurch war es möglich sowohl lipophile als auch hydrophile Substanzen nach dem Einengen zurückzulösen, um zufriedenstellende Intensitäten in der Analyse zu erreichen und Probleme durch die unterschiedliche Viskosität zwischen Rücklösegemisch und Laufmittel zu minimieren. Hinzukommt, dass EtG eine sehr gute Löslichkeit in MeOH zeigt und in der vorgestellten Zusammensetzung mit einer guten Intensität nachweisbar war. Ein weiterer wichtiger Parameter ist das zu verwendende Injektionsvolumen, da bei zu geringen Volumina die Intensität von EtG nicht ausreichend für die Analytik war und bei zu hohen Volumina die Peakform und -breite von NAcT nicht mehr den Ansprüchen genügen konnte, was in Abbildung 18 dargestellt ist. Hierbei scheint ein höheres Injektionsvolumen zu einer Überladung der Säule zu führen. Nach der Testung von verschiedenen Injektionsvolumina wurde der beste Konsens bei einem Volumen von 7 µL gefunden, weshalb dieses für die Methode verwendet wurde.

4.1.3 Retentionszeiten und Chromatogramm einer authentischen Probe

Abbildung 19 zeigt ein Chromatogramm einer authentischen Probandenprobe aus dem Trinkversuch. Alle vier Analyten konnten komplett voneinander getrennt und somit auch unabhängig voneinander identifiziert bzw. quantitativ bestimmt werden. Die gezeigten Peaks entsprechen den chromatographischen Anforderungen mit einer ausreichenden Intensität und einer scharfen Peakform. Nicht markierte Peaks sind matrixbedingt und treten in den Chromatogrammen der zweiten Übergänge nicht auf. Die Methode bleibt mit einer Messdauer von 22 Minuten in einem akzeptablen Rahmen, um Analyten mit den entsprechenden chemischen Charakteristika verlässlich aufzutrennen. Herausfordernd war insbesondere eine reproduzierbare Auftrennung der Analyten in der Methodenentwicklung zu erreichen. Die sehr späte Elution von EtG bei 16,7 min erklärt sich mit dessen Hydrophilie und der starken Interaktion des Glucuronid-Anteils und der chromatographischen Säule. EtS

und NAcT sind jeweils hydrophile und sehr kleine Moleküle mit dementsprechend geringerer Retentionszeit. Bei PEth handelt es sich um ein sehr großes, lipophiles Molekül, wodurch die Anforderungen an die Auftrennung nochmals erschwert wurden. Durch die speziellen Eigenschaften der Luna Omega Sugar-Säule konnte eine ausreichende Retentionszeit von 8,5 min für PEth erreicht werden. Alle Analyten konnten somit mit dem entsprechenden Anspruch der analytischen Chemie aufgetrennt werden, wobei es keine Überschneidung der einzelnen Peaks gab und die Retentionszeiten entsprechend charakteristisch waren. Schlussendlich wurde auf diese Weise eine robuste und verlässliche Methode entwickelt, welche für den parallelen Nachweis aller vier Alkoholbiomarker angewandt werden konnte. Nach erfolgreicher Entwicklung der Multimethode wurde eine anschließende Validierung durchgeführt, welche in den folgenden Kapiteln genauer diskutiert wird.

4.2 Validierung

4.2.1 Selektivität

Für die Alkoholbiomarker EtG, EtS und PEth fanden sich keine Störsignale resultierend aus der verwendeten Matrix (Vollblut). Dahingegen konnte NAcT auch in der Leermatrix nachgewiesen werden, da diese Substanz endogen im Körper gebildet wird. Auch nach der Zugabe der einzelnen deuterierten internen Standards zeigte lediglich NAcT ein Signal zur entsprechenden Retentionszeit. Schließlich konnte zwischen den verwendeten 27 Substanzen und den vier gesuchten Biomarkern keine Interferenz festgestellt werden, weshalb die Methode den Anforderungen der GTFCh bezüglich der Selektivität für drei von vier Komponenten genügt. (Peters et al. 2009)

4.2.2 Linearität

Die Anforderungen für eine zufriedenstellende Linearität über den definierten Kalibrationsbereich wurden für alle Analyten in beiden Übergängen erfüllt. Auch die Bestimmtheitsmaße genügen den Anforderungen der GTFCh und bei den separaten Messpunkten konnten keine Ausreißer festgestellt werden. Hierdurch wurde die Linearität der Methode über den festgelegten Bereich bestätigt. Darüber hinaus wurde eine Vermessung von Stützpunkten über dem Arbeitsbereich durchgeführt, die zeigte, dass EtG, EtS und NAcT

bis Konzentrationen von 40000 ng/mL und PEth bis Konzentrationen von 10000 ng/mL mit hoher Genauigkeit ermittelt werden können.

4.2.3 Präzision und Richtigkeit

Um diese Parameter zu bestimmen, wurden an acht verschiedenen Tagen Kontrollen mit niedriger, mittlerer und hoher Konzentration gemessen, welche demselben Pool entstammten und bei -20 °C gelagert wurden. Schlussendlich konnten durch diesen Versuchsansatz die Wiederholpräzision, Laborpräzision und die Richtigkeit für die einzelnen Analyten der Methode ermittelt werden. Hierbei sind Grenzen von $RSD \leq 15\%$ im Falle der Labor- und Wiederholpräzision definiert, wobei die Angabe in Kapitel 3.2.3 in Form der Impräzision erfolgte. Der Bias der Richtigkeit durfte ebenfalls einen Wert von $\leq 15\%$ nicht überschreiten. Die genannten Bedingungen wurden von allen gemessenen Analyten erfüllt, weshalb die Anforderungen an die Präzision und Richtigkeit einer forensisch-toxikologischen Methode eingehalten wurden.

4.2.4 Stabilität

Zur Bestimmung dieses Parameters wurden Pools mit den entsprechend hohen und niedrigen Konzentrationen relativ zum Kalibrationsbereich vorbereitet. Anschließend wurden sechs Aliquote erstellt, welche gleichzeitig aufgearbeitet und anschließend zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessen wurden. Die fertigen Proben wurden unter den gegebenen äußeren Bedingungen des Analysenlabors bei Raumtemperatur in dem Probengeber der HPLC abgestellt. Für die Auswertung wurden die gemessenen Peakflächen und nicht das Verhältnis aus der Fläche des Analyten zum internen Standard verwendet, wobei eine Abweichung von maximal 25 % annehmbar ist. Alle Analyten erfüllten diese Anforderung, weshalb auch dieser Punkt der Validierung bestanden wurde.

4.2.5 Grenzwerte

Die Validierungsvorschrift gibt für diesen Punkt lediglich die Vorgehensweise der Bestimmung vor, legt aber keinen Bereich fest, in dem sich die ermittelten Grenzwerte befinden sollten. Hierbei wurde durch eine Doppelbestimmung der Konzentrationen 5; 7,5; 10; 12,5; 15; 20 und 25 ng/mL jedes Analyten die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen ermittelt. Für alle vier Parameter konnten entsprechend niedrige Grenzwerte bestimmt werden, weshalb die

Methode eine hohe Sensitivität vorweisen kann. Diese wird durch den Vergleich mit anderen Methoden welche EtG und EtS in Blut nachweisen, zusätzlich unterstrichen, da die Grenzwerte in der hier dargestellten Methode niedriger liegen. In den Arbeiten von Hoiseith et al. wurde für EtG ein LOD von 20 ng/mL und LOQ von 60 ng/mL festgestellt. (Hoiseith et al. 2007b) Die Grenzwerte für EtS wurden in einer weiteren Studie mit einem LOD von 13 ng/mL und 28 ng/mL angegeben. (Hoiseith et al. 2009b) Für NAcT gibt es nur eine Vergleichsstudie, in welcher die Substanz in Blut nachgewiesen wurde. (Luginbühl et al. 2017) Hierbei wurde ein *Lower Limit of Quantification* von 2,5 ng/mL angegeben, was im Vergleich zu dem hier bestimmten LOQ von 28,9 ng/mL deutlich niedriger ist. Dies ist damit zu erklären, dass Luginbühl et al. die Validierung von NAcT nicht in Blut durchgeführt haben, sondern mit einer wässrigen Lösung, wodurch matrixbedingte Effekte vermieden wurden. Eine Abschätzung des LOD über das Signal-Rausch-Verhältnis konnte zeigen, dass für die hier vorgestellte Methode für NAcT ein LOD unter 5 ng/mL angenommen werden kann. Als Beispiel für die Grenzwerte in Vollblut bezüglich des Alkoholbiomarkers PEth dient die Publikation von Schröck et al. In dieser wurde der LOD des verwendeten PEth-Homologs 16:0/18:1 mit 10,0 ng/mL und der LOQ mit 11,3 ng/mL angegeben. (Schröck et al. 2017) Insbesondere für die Analyten EtG (LOD: 2,60 ng/mL und LOQ: 7,70 ng/mL) und EtS (LOD: 4,72 ng/mL und LOQ: 8,33 ng/mL) liegen die in dieser Arbeit ermittelten Grenzwerte in Blut deutlich unter der vergleichbaren Literatur, was die Sensibilität der entwickelten Methode unterstreicht. Im Falle von PEth (LOD: 6,93 ng/mL und LOQ: 12,0 ng/mL) liegt der LOQ geringfügig über dem zuvor dargestellten Wert in der Arbeit von Schröck et al. Hierbei muss jedoch erwähnt werden, dass die Bestimmung über das Signal-Rausch-Verhältnis erfolgte und der Probeneinsatz mit 200 µL höher lag als in der hier dargestellten Arbeit mit 150 µL Vollblut. Weiterhin liegt der LOD deutlich unter dem Wert aus der Vergleichsarbeit, was auch im Falle des Analyten PEth für eine gute Nachweisbarkeit im Vergleich mit anderen Methoden spricht.

4.2.6 Matrixeffekte und Wiederfindung

Für die Ermittlung der Matrixeffekte und der Wiederfindung einer analytischen Methode entsprechend der Richtlinien der GTFCh wurden wiederum jeweils eine niedrige und eine hohe Konzentration der einzelnen Alkoholbiomarker relativ zum Kalibrationsbereich gemessen, wobei diese unter der Zuhilfenahme von sechs Vollblutproben verschiedenen Ursprungs erfolgte, welche alle frei von den nachweisbaren Analyten (abgesehen von NAcT)

waren. Die Ermittlung erfolgte durch die Messung von Stocklösungen in Laufmittel ohne Extraktion, extrahierter Matrix mit anschließender Zugabe der Analyten und den entsprechend der Probenaufarbeitung behandelten QC-Kontrollen. Für die Wiederfindung gilt eine Spanne von maximal $\pm 50\%$ und die zugehörigen Matrixeffekte lassen eine Abweichung von $75 - 125\%$ zu, wobei die Standardabweichung nicht größer als 25% sein sollte. Die zu untersuchenden Parameter erfüllten all diese Anforderungen entsprechend den genannten Akzeptanzintervallen aus der Vorschrift der GTFCh.

Schließlich ergibt sich durch die Erfüllung aller erforderlichen Ansprüche eine robuste und valide Methode, welche den Anforderungen der GTFCh genügt und in einem forensisch-toxikologischen Labor Anwendung finden kann.

4.3 Erweiterte Validierung: Postmortale Proben

4.3.1 Gesamtes Kollektiv und Alkoholbiomarker

Um eine breitere forensische Anwendung der entwickelten Methodik zu etablieren, wurde eine erweiterte Validierung mit postmortalen Blutproben am IRVM Heidelberg durchgeführt. Ziel hiervon sollte primär eine über die gängige Validierung hinaus beständige Prüfung der entwickelten Analytik sein, da postmortale Blutproben einige Schwierigkeiten bei den Messungen verursachen können. Die Messung der Proben aus dem Trinkversuch wurde vor den postmortalen Proben durchgeführt, weshalb auf eine Quantifizierung von NAcT verzichtet wurde. Eine ausführliche Diskussion diesbezüglich findet sich im Kapitel 4.4.7. Im Rahmen dieser erweiterten Validierung wurden 31 Proben von verstorbenen Personen untersucht, welche eine BAK $> 1,0\%$ aufwiesen. Im gesamten Kollektiv konnte EtG in einem Fall nicht quantifiziert werden, wodurch dementsprechend eine Bestimmung in $96,8\%$ der Proben gelang. Die Biomarker EtS und PEth konnten in $87,1\%$ der Proben bestimmt werden. In den Proben, in welchen ein qualitativer und quantitativer Nachweis nicht möglich war, konnte neben den Biomarkern, auch der deuterierte Standard nicht nachgewiesen werden. Dieser Sachverhalt stellt eine geringfügige Einschränkung der Anwendung für die Analytik von postmortalen Proben dar. Eine plausible Erklärung hierfür könnte die Beschaffenheit der verwendeten Proben sein, da aufgrund von postmortalen Verwesungsprozessen, die Konsistenz und Beschaffenheit der Blutproben stark variieren

kann. (Butzbach 2010) Ein weiterer Parameter könnte der individuelle Fettgehalt der Blutproben darstellen, wodurch die Extraktion nicht den gewünschten Effekt erzielen konnte. Aufgrund individueller Einflüsse durch die Matrix wird in der Forensik bei postmortalen Blutproben statt auf eine externe Kalibration meist auf das Standard-Additionsverfahren zurückgegriffen. Jedoch können auch hierbei dieselben beschriebenen Schwierigkeiten auftreten, dass, bei einer postmortalen Blutprobe mit entsprechend hohem Zersetzungsgrad oder Fettgehalt die Analytik gestört und damit eine Beurteilung im Rahmen der erhobenen Fragestellung nicht möglich ist.

Der fehlende Nachweis des zugegebenen internen Standards kann daher ein sehr guter Hinweis sein, dass eine Probe für die Vermessung nicht geeignet ist. Dennoch zeigte die entwickelte Methode eine sehr gute Zuverlässigkeit bzgl. dem Nachweis der zu messenden Biomarker.

Die Beurteilung von gemessenen PEth-Konzentrationen in postmortalen Blutproben stellt eine besondere Herausforderung dar, da die Lagerungsbedingungen bis zur Abnahme in der rechtsmedizinischen Sektion sehr variabel ausfallen können und oftmals Alkohol vor dem Tod konsumiert wurde. Dieser kann gemäß Literatur bei Lagerungsbedingungen von -20 °C zu einer *in vitro* Bildung von PEth führen. (Aradottir et al. 2004a; Liu et al. 2018) In den im Rahmen dieser Arbeit gemessenen Proben konnte in allen Fällen eine erhöhte BAK festgestellt werden, weshalb eine *in vitro* Bildung von PEth nicht ausgeschlossen werden kann. Insbesondere in der Veröffentlichung von Liu et al. 2018 konnte eine Zunahme der PEth-Konzentration innerhalb der ersten Tage in postmortalem Blut beobachtet werden. Innerhalb des Untersuchungsintervalls von sieben Tagen nahm diese gegen Ende jedoch wieder ab und war annähernd auf dem Ausgangsniveau. (Liu et al. 2018) Insgesamt ist davon auszugehen, dass die ermittelten PEth-Werte aufgrund des enthaltenen Ethanol in den Proben höher ausfallen als zum eigentlichen Todeszeitpunkt. Als Grenze für einen chronischen und hohen Alkoholkonsum wurde in der Literatur 210 ng/mL postuliert. (Helander und Hansson 2013) Bis auf drei durchgeführte Messungen übersteigen alle Messergebnisse, insofern die Auswertung möglich war, diesen Wert. Aufgrund der ermittelten EtG-, EtS- und BAK-Werte können die zum Todeszeitpunkt vorhandenen PEth-Konzentrationen als verhältnismäßig hoch eingeschätzt werden. Deshalb kann im Rahmen der vorgestellten Ergebnisse der Einfluss von *in vitro* gebildetem PEth als gering eingeschätzt werden.

4.3.2 BAK-Eingruppierung und Alkoholbiomarker

Das Probenkollektiv zeigte eine Spanne von 1,10 – 3,74 ‰ bzgl. der GC-Werte und 1,14 – 3,78 ‰ im Falle der ADH-Messungen. Die meisten Proben lagen im mittleren Wertebereich, weshalb zusätzlich eine Betrachtung des Verteilungsmusters der einzelnen Alkoholbiomarkerkonzentrationen in Abhängigkeit zur gemessenen BAK angestrebt wurde. Hierzu wurden vier BAK-Gruppen definiert; Gruppe 1: 1,01 – 1,50 ‰, Gruppe 2: 1,51 – 2,00 ‰, Gruppe 3: 2,01 – 2,50 ‰ und Gruppe 4: > 2,51 ‰. In den Abbildungen 21, 22, 23 sind die zugehörigen Box-Plots der einzelnen Alkoholbiomarkerkonzentrationen in Relation zu den BAK-Gruppen dargestellt. Auffällig ist hierbei im Falle von EtG (Abbildung 21), dass die Konzentration in Abhängigkeit von der BAK anzusteigen scheint. Die Mittelwerte und Mediane der ersten drei Gruppen liegen in einem homogenen Konzentrationsbereich, wohingegen diese in der vierten Gruppe mit über 2,51 ‰ deutlich erhöht sind. Ein ähnliches Muster zeigt sich für die Verteilung für den Biomarker EtS (Abbildung 22). Hierbei ist auffällig, dass bzgl. der Mediane und Mittelwerte ein leichter Konzentrationsanstieg proportional zur gemessenen BAK zu verzeichnen ist. Dennoch zeigen sich auch hier deutlich höhere Werte in der vierten Gruppierung. Bei Betrachtung der Verteilung für PEth (Abbildung 23) zeigt sich kein eindeutiger Trend für die Konzentrationsverteilung. Hierbei ist lediglich eine leichte Erhöhung der Mediane und Mittelwerte für die Gruppen 2 und 3 festzustellen, wobei die Werte im Vergleich zu den anderen Alkoholbiomarkern eine verhältnismäßig gute Homogenität über die definierten Gruppen aufweisen. Schließlich scheinen EtG und EtS in einer Abhängigkeit zur aufgenommenen Alkoholmenge und folglich der vorhandenen BAK zu stehen. Auch in einer anderen Studie zur Interpretation von EtG und EtS in postmortalen Blutproben konnte ein Zusammenhang zwischen der gemessenen BAK und den beiden Biomarkern festgestellt werden, wobei hier auch Proben mit einer BAK unter 1,0 ‰ untersucht wurden. (Krabseth et al. 2014) Ein ähnliches Muster war für PEth durch die gezeigten Diagramme nicht erkennbar. Studien, in denen PEth in postmortalen Blutproben mit der gemessenen BAK korreliert wurden, sind bisher nicht bekannt. Eine Betrachtung von PEth in postmortalen Blutproben fand sich in Korrelation mit der EtG-Konzentration in Haaren und in einer Querschnittsstudie zum Nachweis eines vorangegangenen exzessiven Trinkverhaltens. (Bendroth et al. 2008; Hansson et al. 2001) Des Weiteren existiert eine Studie, in welcher postmortale PEth-Konzentrationen in diversen Gehirngeweben gegen die gemessene Alkoholkonzentration in Serum zum Todeszeitpunkt korreliert wurden. Hierbei wurden Proben von Verstorbenen mit

einer diagnostizierten Alkoholkrankheit untersucht. (Thompson et al. 2016) Die Einteilung der Testpersonen erfolgte in drei Gruppen: die erste zeigte positive EtOH-Befunde im Serum, in der zweiten konnte kein EtOH nachgewiesen werden und die dritte diente als Kontrollgruppe. Innerhalb der dritten Gruppe gab es keine diagnostizierte Alkoholkrankheit und kein nachweisbares EtOH im Serum. Die aufgezeigten Studien sind jedoch nicht mit den hier dargestellten Ergebnissen vergleichbar, da die aufgezeigten Einschlusskriterien und untersuchten Matrices stark variieren.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die entwickelte Methode trotz geringfügiger Einschränkungen für die Messung von postmortalen Blutproben geeignet ist und bei geeignetem Probenmaterial verwertbare Ergebnisse liefert.

4.3.3 Fallbeispiel

Für einen Fall aus dem Jahr 2019/2020 sollte die Fragestellung geklärt werden, ob der postmortal gemessene Alkoholbefund von 0,33 ‰ aus dem Oberschenkelgefäßblut (IRVM) auf Leichenerscheinungen zurückzuführen war. Dieser Fall wurde in zwei unterschiedlichen Instituten unabhängig voneinander untersucht. In der Blutprobe des weiteren Instituts (im Folgenden immer als „Leichenblut“ bezeichnet) ergab sich eine BAK von 0,14 ‰. Am IRVM wurde in einer zweiten Obduktion ein Muskelstück entnommen, welches kaum Verwesungserscheinungen aufzeigte. Die Messung dieser Probe ergab einen Alkoholwert von etwa 0,03 ‰ EtOH. Aufgrund der kontroversen Ergebnisse wurden weitere Untersuchungen durchgeführt, um zu klären, ob der Verstorbene zum Todeszeitpunkt alkoholisiert gewesen sei. Zunächst wurde das Leichenblut durch eine am IRVM etablierte Methode auf typische Fäulnisalkohole und gängige Begleitstoffe in alkoholischen Getränken untersucht. Aus Tabelle 24 wird ersichtlich, dass insbesondere für 1-Propanol eine hohe Konzentration von etwa 11,0 mg/L nachgewiesen wurde. Ebenfalls quantifizierbar waren Amylalkohole mit einer Konzentration von etwa 0,74 mg/L. Diese Befunde legen eine postmortale Bildung von EtOH nahe, da es sich nicht um ein gängiges Begleitstoffmuster nach dem Konsum von Alkohol handelt, sondern um typische Fäulnisalkohole. (Schulz et al. 2005) Um diese Behauptung noch weiter zu untermauern, wurden Analysen zum Nachweis dreier Alkoholbiomarker in den Matrices Leichenblut und Urin, sowie einer Oberschenkelgefäßblutprobe aus dem IRVM durchgeführt. In Tabelle 25 sind die zugehörigen Befunde abgebildet, wobei keiner der Biomarker EtG, EtS in Blut oder Urin nachweisbar war. Auch eine Analyse beider Blutproben

hinsichtlich der Substanz PEth ergab keinen positiven Befund. Wie im vorherigen Kapitel gezeigt, ist es möglich, die genannten Alkoholbiomarker in postmortalen Blutproben nachzuweisen, wobei die Untersuchung bei insgesamt 4 von 31 Proben zumindest teilweise erfolglos war. In diesen vier Proben war jedoch neben einem fehlenden Signal für die Analyten auch der interne Standard nicht nachweisbar. Im vorliegenden Fall konnten jedoch alle zugehörigen internen Standards eindeutig identifiziert werden, weshalb angenommen werden kann, dass die Ergebnisse der Proben valide sind. Eine Limitation stellen die BAKs im zuvor beschriebenen Versuchsteil dar, da diese mit $> 1.0 \text{ ‰}$ deutlich über der hier gemessenen BAK lagen. Nichtsdestotrotz legt der Nachweis der internen Standards nahe, dass die Methode auch im Rahmen von geringeren BAKs valide Ergebnisse hervorbringt. In den in Kapitel 3.3.1 untersuchten postmortalen Blutproben waren die gemessenen Alkoholbiomarkerkonzentrationen im Verhältnis zu den gemessenen BAKs sehr hoch und bewegten sich überwiegend in einem Bereich über dem höchsten Kalibrator mit 1000 ng/mL . Zudem ist das Nachweisfenster von EtG und EtS im Urin nochmals deutlich größer als in Blut. Dieser Sachverhalt ist durch diverse Literaturquellen (Halter et al. 2008; Hoiseth et al. 2007a; Hoiseth et al. 2010c) und den in dieser Arbeit dargestellten Trinkversuchen belegt. Weiterhin ist die Stabilität beider Biomarker in der Matrix Urin hoch. (Dresen et al. 2004; Schloegl et al. 2006a) Abschließend ist die gemessene BAK von $0,33 \text{ ‰}$ im Oberschenkelgefäßblutes (IRVM) durch fäulnisbedingte Prozesse erklärbar. Die nachträglich gemessene BAK von $0,14 \text{ ‰}$ im Leichenblut und von etwa $0,03 \text{ ‰}$ im Muskelgewebe sind als vergleichsweise gering einzuschätzen. Die Begleitstoffanalyse zeigte zudem kein typisches Muster für einen Alkoholkonsum, sondern wies insbesondere durch die hohe Konzentration von 1-Propanol und die nachgewiesenen Amylalkohole auf eine fäulnisbedingte Bildung von EtOH hin. Hinzukommt, dass der Nachweis der typischen Alkoholkonsummarker EtG, EtS und PEth nicht möglich war. Diese drei Alkoholbiomarker werden nur in Anwesenheit von EtOH im lebenden Organismus gebildet und wurden schon in anderen Publikationen zur Beurteilung einer Alkoholisierung zum Todeszeitpunkt herangezogen. (Hansson et al. 2001; Hoiseth et al. 2010a)

4.4 Trinkversuche

4.4.1 Pharmakokinetiken der einzelnen Alkoholbiomarker

Um den verschiedenen Anforderungen an die einzelnen zu beantwortenden Fragestellungen gerecht zu werden, wurden in dem Abschnitt 3.4.1 verschiedene Diagrammtypen verwendet. Für die Darstellung der einzelnen individuellen Pharmakokinetiken der Probanden, wurde die x-Achse so skaliert, dass die unterschiedlichen Zeitintervalle zwischen den Probenahmen eindeutig ersichtlich waren. Dies sollte dazu dienen, einen Überblick über den eigentlichen Zeitrahmen und die individuelle Nachweisbarkeit und Kurvenverläufe zu gewinnen. Im Falle der Box-Plots und kombinierten Diagramme der Trinkversuche ist die x-Achse gleichmäßig skaliert, da es sich schlussendlich um zusammenfassende Abbildungen handelt, die insbesondere Unterschiede in den mittleren Konzentrationsverläufen und Nachweisbarkeiten darstellen sollen.

Trinkversuch I (Ziel-BAK 0,8 ‰)

Für diesen Trinkversuch mussten die Probanden individuell eine gewisse Menge Bier oder Wein innerhalb einer halben Stunde konsumieren, um eine vorgegebene BAK von 0,8 ‰ zu erreichen. Zu den Zeitpunkten vor (Leerwert) und nach der Aufnahme: 0 h, sowie 0,5; 1, 2, 3 und 4 h wurden jeweils Vollblut- und Serumproben entnommen und, falls möglich, eine Urinprobe abgegeben. Zusätzlich wurden 24 h, 72 h und 168 h nach der einmaligen Alkoholaufnahme äquivalent zwei Blutproben und eine Urinprobe erhoben.

- EtG (Trinkversuch I)

In der Betrachtung der individuellen Konzentrationsverläufe für den Alkoholbiomarker EtG (Abbildung 24) konnte eine Homogenität zwischen den einzelnen Probanden festgestellt werden. Auffällig waren lediglich die Kinetiken der Probanden 1 und 2, da deren Konzentrationen um einen Faktor von 5 bis etwa 6 im Vergleich zu den anderen Probanden erniedrigt waren. Hierbei handelte es sich um die Probanden, welche verglichen mit den anderen Studienteilnehmern am wenigsten EtOH aufgenommen haben (vgl. Tabelle 27). Außerdem pflegen beide Probanden einen vegetarischen bzw. veganen Ernährungsstil, was einen Einfluss auf die Enzymaktivität haben könnte. Alle Probanden zeigten spätestens 72 h nach der Alkoholaufnahme einen EtG-Befund unter dem angegebenen Grenzwert von 10

ng/mL. Nur zwei Probanden lagen 24 h nach der Alkoholaufnahme unter dem Grenzwert, was einer Nachweiswahrscheinlichkeit von 77,8 % entspricht. Verglichen mit einem anderen Trinkversuch (Hoiseh et al. 2007a) ist die Nachweisbarkeit von EtG im Blut länger möglich, da in der benannten Studie spätestens nach 14 h kein EtG mehr nachweisbar (entspricht einer Konzentration unter dem LOD von 20 ng/mL) war. Jedoch muss hierbei beachtet werden, dass Proben in der Studie von Hoiseh et al. nur innerhalb eines Zeitraums von 15 h erhoben wurden und die aufgenommene Alkoholmenge geringer als in der für diese Arbeit durchgeführten Studie war. Hinzukommt, dass der Grenzwert in dieser Arbeit mit einer Konzentration von 10 ng/mL deutlich niedriger lag als in der Vergleichsstudie, weshalb der Nachweis von EtG nach 24 h noch möglich war. Um die Verteilung und Pharmakokinetik innerhalb der Kohorte zu testen, wurde ein Box-Plot mit zugehörigen Parametern (Abbildung 25 und Tabelle 28) erstellt, wodurch bei den erhobenen Proben das Maximum zum Zeitpunkt 4 h festgestellt wurde. Da diese Proben allerdings die letzten entnommenen Proben am ersten Versuchstag darstellen, kann ein Erreichen der Maximalkonzentration von EtG im Blut auch erst nach der letzten Probenahme erfolgt sein. Bei einigen Teilnehmern, wie Proband 7, deutet sich ein Erreichen dieses Maximums bereits nach 3 h an. Diese Befunde decken sich mit den Angaben in der Literatur, in welcher für EtG ein Erreichen der Maximalkonzentration nach etwa 4 h beschrieben wurde. (Halter et al. 2008; Hoiseh et al. 2007a) Der Kurvenverlauf von EtG zeigte eine stetige Zunahme, wobei die Konzentrationen im Vergleich zu den anderen Alkoholbiomarkern am höchsten war. Insgesamt konnte für den Biomarker EtG eine nachvollziehbare Pharmakokinetik über den getesteten Zeitraum festgestellt werden. Dennoch waren die Nachweisfenster für EtG bei allen Probanden ähnlich und auch die Darstellungen der gesamten Kohorte über einen Box-Plot zeigte eine homogene Verteilung der Mittelwerte und Mediane. Hierdurch lässt sich annehmen, dass die individuellen Schwankungen bzgl. der Bildung und des Nachweises von EtG keinen signifikanten Einfluss auf die Anwendung als Alkoholbiomarker haben.

- EtS (Trinkversuch I)

Die individuellen Konzentrationsverläufe wurden ebenfalls für EtS aufgezeichnet und dargestellt (Abbildung 26). Bei der Auswertung dieser Konzentrationen befanden sich die Ergebnisse für alle Probanden in einem ähnlichen Rahmen. Lediglich Proband 6 zeigte Werte auf, die etwa 1,5-mal so hoch waren wie die der anderen Teilnehmer. Die Beobachtung

derartiger Abweichungen wird durch zwei Publikationen gestützt (Helander und Beck 2005; Schneider und Glatt 2004), die von individuellen Unterschieden bei der Bildung von EtS durch Sulfokonjugation berichten. Bei keinem der Probanden war es möglich, EtS 24 h nach der Alkoholaufnahme mit einem Wert über dem Grenzwert von 10 ng/mL nachzuweisen. Dieses Ergebnis deckt sich mit der Pharmakokinetikstudie von Halter et al., in welcher EtS nach 10 bis 11 h bei 15 % der Probanden nachweisbar war. (Halter et al. 2008) Verglichen mit EtG zeigte EtS im Box-Plot einen abrupteren Anstieg und ein nachfolgendes Plateau, welches zwischen 2 und 3 h erkennbar war (Abbildung 27 und Tab. 29). In diesem Bereich befand sich auch das zugehörige Maximum, wobei der Abbau des Biomarkers ab 4 h erkennbar war. Diese Beobachtung ist ebenfalls konform mit der Studie von Halter et al., in welcher die maximale EtS-Konzentration in Blut bei etwa 3 h zu verzeichnen war. (Halter et al. 2008) Auch dieser Biomarker zeigt bei allen Probanden eine nachvollziehbare Pharmakokinetik über den Testzeitraum, wobei das Nachweisfenster in Blut verglichen mit EtG etwas kürzer ausfällt. Das Box-Plot-Diagramm zeigt, dass die Homogenität für die Kurvenverläufe über das Testkollektiv gegeben war. Ebenso war die Nachweisbarkeit bei allen Probanden vergleichbar und im Einklang mit den Randbedingungen aus der mehrmals erwähnten Studie von Halter et al. (Halter et al. 2008)

- NAcT (Trinkversuch I)

Die individuelle Auftragung der Konzentrationen aller Probanden (Abbildung 28) zeigte einen inhomogenen Verlauf. Lediglich Proband 1 lag zum Zeitpunkt 24 h unter dem Grenzwert von 10ng/mL. Eine nachvollziehbare Pharmakokinetik war hierbei nicht ersichtlich und die interindividuellen Schwankungen waren enorm. Der aus diesen Werten generierte Box-Plot und die dazugehörigen Daten zeigten einen geringen Anstieg nach der Alkoholaufnahme (Abbildung 29 und Tab. 30), wobei die zugehörige Abnahme nicht eindeutig ersichtlich war, da die interindividuellen Schwankungen mit RSD-Werten zwischen 19,2 und 72,8 % über alle Messtage hinweg stark variierten. Bisher existiert nur eine weitere Studie, die sich mit der Bildung von NAcT im Blut nach einer Alkoholaufnahme beschäftigt. (Luginbühl et al. 2017) In dieser Studie wurde ein leichter Anstieg der NAcT-Konzentration durch die Verstoffwechslung des EtOH festgestellt, jedoch zeigten sich ebenfalls große individuelle Unterschiede in der Bildung und Eliminierung der Substanz.

- PEth (Trinkversuch I)

Bei den individuell aufgezeigten Pharmakokinetiken der einzelnen Probanden für den Biomarker PEth konnte ebenfalls eine Homogenität in den Kurvenverläufen festgestellt werden (Abbildung 30). Proband 6 zeigte die höchsten Werte und einen geringfügig abweichenden Verlauf, da die maximale Konzentration bei 4 h im Vergleich zu den anderen Probanden sprunghaft erreicht wurde. Im Gegensatz zu den anderen Probanden konnte bei Proband 1 praktisch kein PEth nachgewiesen werden. Diese reduzierte Umsetzung von EtOH zu PEth kann auf eine verminderte Aktivität der Phospholipase D hinweisen. Da diese u.a. auch in Stresssignalwegen innerhalb des Körpers involviert ist, könnte das ermittelte Ergebnis auf eine hohe Stressbelastung des Probanden zum Zeitpunkt des Trinkversuches hinweisen (Wang 2002) Der Nachweis von PEth mit einer Konzentration über dem Grenzwert von 10 ng/mL war zum Zeitpunkt 72 h nach der Alkoholaufnahme bei drei Probanden möglich ($\cong 33,3$ %). Ebenfalls zum Zeitpunkt 168 h wiesen dieselben drei Probanden eine Konzentration über dem Grenzwert auf ($\cong 33,3$ %). Schröck et al. haben eine ähnliche Trinkstudie durchgeführt (Ziel-BAK: 1,0 ‰, LOD = 10 ng/mL), wobei ein mittleres Nachweisfenster von $9,3 \pm 3$ Tagen festgestellt wurde. (Schröck et al. 2017) Dennoch sind die Ergebnisse beider Studien in Anbetracht der etwas abweichenden Rahmenbedingungen sehr konsistent und bestätigen die Fähigkeit von PEth, als Biomarker für den Nachweis eines Alkoholkonsums zu dienen. In der Box-Plot-Darstellung stieg die Konzentration von PEth direkt stark an und erreichte stetig ein Maximum bei der nach 4 h erhobenen Probe (Abbildung 31 und Tabelle 33). Da diese Proben allerdings die letzten entnommenen Proben am ersten Versuchstag darstellen, kann ein Erreichen der Maximalkonzentration von PEth im Blut auch erst nach der letzten Probenahme erfolgt sein. In anderen Trinkversuchen ist ein Erreichen der Maximalkonzentration nach 8 h bei einer Ziel-BAK von 1,0 ‰, beschrieben worden. (Schröck et al. 2017) Weiterhin fiel auf, dass nicht für alle Probanden ein Abstinenzzeitraum von sieben Tagen ausreichend war, um PEth-freies Vollblut zu generieren, da auch in der Leerprobe vor dem eigentlichen Alkoholkonsum PEth gefunden werden konnte. Dies wird in Abbildung 30 ersichtlich, da der Start der Kurven nicht bei allen Probanden bei 0 ng/mL lag. Deshalb ergab sich für die RSD aus den eigentlich leeren ersten Proben ein Wert von 151 %. Auch der letzte Wert ist auf individuelle Schwankungen zwischen den einzelnen Probanden zurückzuführen. PEth war dennoch bei einigen Probanden nach 168 h noch nachweisbar. Auch für den Biomarker PEth

war eine nachvollziehbare und homogene Konzentrationsverteilung über den untersuchten Zeitraum festzustellen. Auffällig war jedoch, dass gerade bezüglich des Nachweisfensters und der maximalen Konzentrationen erhebliche individuelle Unterschiede festzustellen waren. Diese Beobachtung wird ebenfalls durch die schon genannte Studie von Schröck et al. bestärkt, da die einzelnen in die Studie einbezogenen Probanden enorme Varianzen in den unterschiedlichen Nachweisfenstern (3 bis 12 Tage) und den individuellen Höchstkonzentrationen (37,2 bis 122 ng/mL) zeigten. (Schröck et al. 2017) In den Ländern Belgien und Schweden wird PEth schon als Marker zum Nachweis eines Alkoholkonsums mit Grenzwerten von 20 bzw. 35 ng/mL verwendet. (Dumitrascu et al. 2021; Van Uytfanghe et al. 2021) In Deutschland ist die Etablierung des Biomarkers für die Beurteilung eines Konsums von Alkohol noch in der Diskussion, wobei hier die Bestimmung eines geeigneten Grenzwertes im Fokus steht.

- Zusammenfassung Trinkversuch I

Im Vergleich zwischen EtG und EtS fallen die Konzentrationen von EtS insgesamt geringer aus als die von EtG (Abbildung 32), weshalb die Annahme nahe liegt, dass Glucuronidierung und Sulfatierung in einer Konkurrenzreaktion zueinanderstehen. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in einer Trinkstudie von Halter et al. beschrieben. (Halter et al. 2008) Weiterhin wurde belegt, dass durch eine Alkoholaufnahme die Aktivität der Glucuronyltransferase UGT1A1 in Rattenleberzellen induziert wird. (Kardon et al. 2000) Die einzelnen Alkoholbiomarker waren schon in der ersten entnommenen Blutprobe nach der Alkoholaufnahme nachweisbar (0 h), und folgten bis auf NAcT einer charakteristischen Kinetik. Wie zuvor erwähnt, waren die Nachweisfenster von EtG und EtS ähnlich und zeigten wenige individuelle Schwankungen. Dies deckt sich auch mit den Ergebnissen aus anderen Pharmakokinetikstudien der beiden Substanzen. (Halter et al. 2008; Hoiseth et al. 2007a) Für EtG und EtS waren die Parameter c_{\max} und t_{\max} bestimmbar, aber die weiteren Kenngrößen k_e und $t_{1/2}$ konnten nicht ermittelt werden, da nicht genug Messpunkte für eine Berechnung zur Verfügung standen. Die Zeitspanne am ersten Tag des Trinkversuches war nicht ausreichend, um genügend Messwerte für eine adäquate Berechnung zu generieren bzw. besteht für EtG die Möglichkeit, dass die maximale Konzentration bei einigen Probanden erst nach den aufgezeichneten vier

Stunden erreicht worden wäre. Im Falle von EtG zeigt sich bezüglich t_{\max} ein Wert von 4 h, was im Einklang mit den Ergebnissen aus zwei Vergleichsstudien ist. (Halter et al. 2008; Hoiseth et al. 2007a) In der Studie von Halter et al. finden sich Berechnungen für EtS, welche ebenfalls einen Medianwert von 3 h für t_{\max} festgestellt haben. (Halter et al. 2008)

Für NAcT war es nicht möglich pharmakokinetische Parameter zu bestimmen, da kein eindeutiges Maximum und kein nachvollziehbarer Kurvenverlauf festgestellt werden konnte. Eine Aufnahme in die Diagnostik weiterhin nicht sinnvoll erscheint. Diese Beurteilung wurde auch von einer Forschungsgruppe aus Bern ausgesprochen. (Luginbühl et al. 2017)

PEth zeigte im Vergleich zu den anderen Biomarkern EtG und EtS eine deutlich längere Nachweisdauer, da einige Probanden sogar nach 168 h noch eine eindeutig quantifizierbare Konzentration aufwiesen. Jedoch zeigte dieses maximale Nachweisfenster eindeutige individuelle Schwankungen, welche auch in anderen Studien festzustellen waren. (Javors et al. 2016; Schröck et al. 2017) Die Cut-Off-Werte für PEth in anderen Ländern (35 und 20 ng/mL) liegen deutlich über dem angewendeten Grenzwert von 10 ng/mL der hier etablierten Methode. (Dumitrascu et al. 2021; Van Uytfanghe et al. 2021) Durch höhere Cut-Off-Werte soll verhindert werden, dass individuelle Unterschiede für einige Probanden Nachteile generieren und ebenso die Wahrscheinlichkeit von falsch-negativen Ergebnissen minimiert wird. Eine Bestimmung aller pharmakokinetischen Parameter war im ersten Trinkversuch nur für PEth möglich, wobei auch hier nur die Daten von vier Probanden für die Ermittlung von k_e und $t_{1/2}$ berücksichtigt werden konnten. Proband 1 wurde aus der Berechnung komplett herausgenommen, da kein c_{\max} bestimmt werden konnte. In der Vergleichsstudie von Javors et al. bezüglich der Pharmakokinetik von PEth konnte eine mittlere Halbwertszeit $t_{1/2}$ von $4,6 \pm 3,5$ Tage bestimmt werden. Während des ersten Trinkversuches wurde eine mittlere Halbwertszeit von $4,2 \pm 2,3$ Tagen festgestellt, obwohl die Alkoholdosis deutlich höher war als in der Vergleichsstudie. Eine mögliche Erklärung ist unter anderem, dass Javors et al. zwei PEth-Homologe gemessen haben und es deshalb in den Tagen nach der Alkoholaufnahme zu mehr positiven Messergebnissen gekommen ist. (Javors et al. 2016)

Trinkversuch II (Ziel-BAK 0,4 ‰)

Der Ablauf des zweiten Trinkversuchs erfolgte analog zum ersten, wobei die Ziel-BAK bei 0,4 ‰ lag. Hierzu wurde von den Teilnehmern entsprechend viel Alkohol aufgenommen und die Entnahmen wurden identisch durchgeführt.

- EtG (Trinkversuch II)

Die individuelle Auftragung der einzelnen Probandenkonzentrationen zeigte einen ebenfalls homogenen Verlauf über die dargestellte Zeitspanne (Abbildung 33), wobei keine signifikanten Ausreißer bezüglich der Konzentrationsverläufe festgestellt werden konnten. Diese Beobachtung deckt sich mit einer ähnlichen Trinkstudie aus Norwegen, in welcher die Ziel-BAK bei 0,5 ‰ lag und die Pharmakokinetiken der Probanden ebenfalls sehr ähnlich ausfielen. (Hoiseth et al. 2007a) Der Nachweis des Analyten war bei allen Probanden schon nach der 24 h entnommenen Probe nicht mehr möglich, was mit den Ergebnissen der zuvor erwähnten Studie übereinstimmt. In dieser wurden die Proben innerhalb von 14 h nach der Alkoholaufnahme erhoben, wobei bei allen Teilnehmern ein Nachweis von EtG spätestens in der letzten erhobenen Probe nicht mehr möglich war. (Hoiseth et al. 2007a) In der Box-Plot-Darstellung, welche alle Werte der Probanden zusammenfasst, konnte der maximale Wert für EtG zum Zeitpunkt 2 h festgestellt werden, wobei der Anstieg wiederum stetig und der folgende Abbau direkt zu erkennen war (Abbildung 34 und Tabelle 36). Hier variieren die erhobenen Daten im Vergleich zu zwei anderen Trinkstudien geringfügig, da in diesen Studien, maximale Konzentrationen von EtG nach etwa 3 bis 4 h festzustellen waren. (Halter et al. 2008; Hoiseth et al. 2007a) Die angestrebte Ziel-BAK lag bei 0,5 ‰, wodurch eine marginal höhere Alkoholmenge als in dem hier beschriebenen Studienablauf aufgenommen wurde. Dies könnte einen Einfluss auf das spätere Erreichen der maximalen Konzentrationen gehabt haben, ebenso wie geringfügige Unterschiede in den individuellen Probandengruppen für die einzelnen Trinkversuche. Der Nachweis von EtG war, wie zuvor erwähnt, aufgrund der geringeren aufgenommenen Alkoholmenge im Vergleich zum ersten Trinkversuch, schon ab 24 h nicht mehr möglich. Auch in diesem Teil des Trinkversuches zeigte der Konzentrationsverlauf des Biomarkers EtG eine gute Homogenität und die einzigen erkennbaren individuellen Schwankungen lagen in den gebildeten Mengen des Biomarkers.

- EtS (Trinkversuch II)

Die probandenabhängigen Pharmakokinetiken zeigten auch für die geringere aufgenommene Alkoholmenge einen nachvollziehbaren, homogenen Kurvenverlauf (Abbildung 35). Einzig bei Proband 6 konnte ein Einbruch des Kurvenverlaufes zum Zeitpunkt 3 h festgestellt werden, wobei dies vermutlich auf eine Messungenauigkeit („Ausreißer“) zurückzuführen ist. Im Vergleich zu den anderen Probanden waren die Konzentrationen von Proband 5 etwas erniedrigt, was wiederum auf individuelle Unterschiede bezüglich der Sulfokonjugation zurückzuführen sein kann. (Schneider und Glatt 2004) Über die Darstellung in Form eines Box-Plot-Diagrammes konnte der ebenfalls früh einsetzende Abbau schon während des ersten Versuchstages gezeigt werden (Abbildung 36 und Tabelle 38). Die maximale Konzentration für diese Substanz ergab sich etwa bei 2 h nach Trinkende, nachdem der Anstieg sehr rapide ausfiel und wiederum ein Plateau zwischen 1 und 2 h feststellbar war. In einer Vergleichsstudie von Halter et al. konnte bei einer Ziel-BAK von 0,5 ‰ die maximale Konzentration etwa bei 3 h nach der Alkoholaufnahme festgestellt werden. (Halter et al. 2008) Dies ist einmal mit der etwas geringeren aufgenommenen Alkoholmenge in dem in dieser Arbeit dargestellten zweiten Trinkversuch zu erklären und der individuellen Aktivität der Sulfotransferasen bei den einzelnen Probanden. (Helander und Beck 2005; Schneider und Glatt 2004) Der Nachweis von EtS war nach 24 h nicht mehr möglich. In einer vergleichbaren Studie war in den letzten erhobenen Blutproben 10 bis 11 h nach einer einzelnen Alkoholaufnahme lediglich noch in 15 % der Proben ein Nachweis von EtS möglich. (Halter et al. 2008) Die Darstellungen der individuellen Pharmakokinetiken und des Box-Plots für alle Probanden zeigen, dass für EtS eine gute Homogenität über den beobachteten Zeitraum festzustellen war und die Nachweisfenster bei allen Probanden sehr konform ausfielen.

- NAcT (Trinkversuch II)

Durch die Darstellung der verschiedenen Konzentrationsverläufe der einzelnen Probanden (Abbildung 37) konnte kein einheitliches Muster für den Auf- und Abbau von NAcT festgestellt werden. Die Ausgangskonzentrationen vor Trinkbeginn schwankten enorm und auch aus der Auswertung der einzelnen Werte in Form eines Box-Plots war für NAcT keine nachvollziehbare Pharmakokinetik ersichtlich. (Abbildung 38 und Tabelle 40). Diese Ergebnisse unterstreichen nochmals, dass NAcT nicht als Alkoholbiomarker in der Diagnostik geeignet ist. Zu einem

ähnlichen Ergebnis führte auch eine Studie aus Bern, in welcher keine einheitliche Pharmakokinetik festgestellt werden konnte und die Anwendung von NAcT in der Routineanalytik als fraglich eingeordnet wurde. (Luginbühl et al. 2017)

- PEth (Trinkversuch II)

In den individuell gemessenen Konzentrationen für die Probanden zeigte sich ein homogenes Muster für den Konzentrationsverlauf (Abbildung 39). Lediglich bei Proband 3 zeigte sich ein kurzer Einbruch während des Anstiegs zur maximalen Konzentration zum Zeitpunkt 0,5 h, welcher auf eine Messungenauigkeit („Ausreißer“) zurückzuführen war. Weiterhin zeigten die Probanden 1, 2 und 4 insgesamt etwas kleinere Konzentrationen, was mit der geringeren aufgenommenen Alkoholmenge zusammenhängen könnte. (vgl. Tabelle 35) Weiterhin handelte es sich bei allen drei Probanden um Vegetarier bzw. Veganer, was ebenfalls einen Einfluss auf die Enzymaktivität der PLD haben könnte. Bisherige Vorarbeiten zu Faktoren, welche die Aktivität der PLD beeinflussen, deuten auf sehr individuelle Enzymaktivitäten hin. (Wang 2002) In der Zusammenschau der Pharmakokinetiken in Form eines Box-Plots konnte eine nachvollziehbare Homogenität der Kurvenverläufe festgestellt werden (Abbildung 40 und Tabelle 41). Der Anstieg erfolgte sehr steil mit dem Erreichen der maximalen Konzentration bei 0,5 h. Die darauffolgende Abnahme der PEth-Konzentration erstreckte sich auf bis zu 168 h nach der Alkoholaufnahme, wobei in der letzten Blutentnahme nur noch für einzelne Probanden ein Nachweis von PEth möglich war (N = 3). Eine vergleichbare Studie, in welcher die Homologe PEth 16:0/18:1 und 16:0/18:1 untersucht wurden, wurde von Javors et al. durchgeführt. (Javors et al. 2016) In dieser Studie wurden zwei Gruppen untersucht, welche jeweils eine Ziel-BAK von 0,25 oder 0,5 ‰ erreichen sollten. Der Nachweis (beide Homologe kombiniert) war im Mittel für etwa 4,6 Tage (1,0 bis 13,1 Tage) möglich. Diese Ergebnisse sind ähnlich zu denen in dieser durchgeführten Studie, in welcher bei 50 % der Probanden an Tag 7 noch ein Nachweis möglich war. Ebenfalls auffällig für PEth im zweiten Trinkversuch war der deutlich stärkere Abfall der PEth-Konzentration in den ersten Stunden nach t_{max} . Dieser flacht jedoch immer weiter ab, wodurch sich der entsprechend kleine Wert für $t_{1/2}$ in der Gesamtschau ergibt. Aufgrund dessen wurden neben den Eliminationshalbwertszeiten über den gesamten Zeitraum die terminalen Eliminationshalbwertszeiten ab 4,0 Stunden für die Probanden 2 bis 8 bestimmt. Bei Proband 1 war zum Zeitpunkt 4,0 Stunden bereits kein PEth mehr nachweisbar, weshalb die zugehörigen Daten ausgeschlossen wurden. Hieraus ergibt

sich eine deutlich höhere Eliminationshalbwertszeit $t_{1/2}$ als unter Zugrundelegung der gesamten Daten. Dieses Phänomen zeigt sich ebenfalls in der Vergleichsstudie von Javors et al. (Javors et al. 2016) Wie auch im ersten Trinkversuch wurde bei einigen Probanden schon vor der Alkoholaufnahme positive PEth-Befunde vermerkt. Auch hier scheint eine Abstinenzdauer von sieben Tagen vor Studienbeginn nicht ausreichend gewesen zu sein, um PEth restlos aus dem Körper auszuscheiden. Die interindividuellen Unterschiede zeigten sich folglich insbesondere bei den ermittelten Konzentrationen der Proben des Leerwertes und von Tag 7 mit RSD-Werten von 119 und 131 % sehr deutlich.

- Zusammenfassung Trinkversuch II

Alle vier Biomarker konnten zur ersten Blutentnahme nach der Alkoholaufnahme nachgewiesen werden und zeigten abgesehen von NAcT eine charakteristische Kinetik, entsprechend der geringeren Alkoholaufnahme (Abbildung 41). Die Nachweisfenster für EtG und EtS waren auch bei einer geringeren aufgenommenen Alkoholmenge sehr ähnlich, wobei wiederum die Konkurrenzreaktion der Glucuronidierung gegenüber der Sulfatierung festzustellen war, da EtS in einem geringeren Umfang als EtG gebildet wurde. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Beobachtungen aus einer vergleichbaren Trinkstudie mit einer etwas höheren aufgenommenen Alkoholmenge. (Halter et al. 2008) Bei der Ermittlung von pharmakokinetischen Parametern war es für EtG und EtS wiederum nur möglich, c_{max} und t_{max} zu bestimmen. Die Zeit von vier Stunden war nicht ausreichend, um genügend Messwerte nach t_{max} zu erhalten. Die Schwankungen bezüglich t_{max} sind wiederum auf interindividuelle Unterschiede zwischen den einzelnen Probanden zurückzuführen, was auch in anderen Studien ersichtlich wird. (Halter et al. 2008; Hoiseth et al. 2007a)

Weiterhin wird auch in diesem Versuchsaufbau die Einschätzung einer Berner Arbeitsgruppe unterstützt, dass NAcT im Blut nicht für die Anwendung in der Analytik zum Nachweis eines Alkoholkonsums geeignet ist. (Luginbühl et al. 2017) Eine Berechnung pharmakokinetischer Kenngrößen war für NAcT, wie im ersten Trinkversuch, nicht möglich, da keine eindeutigen Maximalwerte und Kurvenverläufe festgestellt werden konnten.

In dem hier aufgezeigten Studiendesign zeigte PEth das längste Nachweisfenster, da bei 33,3 % der Probanden ein Nachweis 168 h nach der Alkoholaufnahme möglich war, wohingegen EtG und EtS in der 24 h-Probe schon unter dem Grenzwert lagen. Im Falle von

PEth konnten alle gewünschten pharmakokinetischen Parameter mit den Daten des gesamten Kollektives des zweiten Trinkversuches ermittelt werden. Dabei ergab sich eine Halbwertszeit $t_{1/2}$ von im Mittel 55,4 h was umgerechnet 2,31 Tagen entspricht. Zusätzlich wurde jedoch wie bei Javors et al. die terminale Eliminationshalbwertszeit ab 4,0 Stunden berechnet, wodurch sich deutlich höhere Werte ($149 \pm 71,8$ h) ergaben. (Javors et al. 2016) Aufgrund der zu Beginn sehr raschen Elimination von PEth fällt der berechnete Wert für die gesamte Versuchszeit deutlich geringer aus. Deshalb bietet sich die terminale Eliminationshalbwertszeit besser für den Vergleich mit den anderen Studien und dem ersten Trinkversuch an.

Vergleich der Trinkversuche I und II

Bei näherer Betrachtung der einzelnen Biomarker im Kontext der Trinkversuche fiel auf, dass die höchsten Konzentrationen für EtG erreicht wurden. Danach folgten EtS, PEth und mit der geringsten Konzentration NAcT. Dies ergab sich aus den durchschnittlichen Differenzen zwischen den Leerwerten und den entsprechenden höchsten Mittelwerten. Bei EtG und EtS lagen die jeweiligen Leerwerte unter dem Grenzwert. Bei NAcT schwankte die Konzentration des Leerwertes stark. Bei PEth ergaben sich geringe Schwankungen im Leerwert, die auf Probanden zurückzuführen sind, bei welchen die Abstinenzspanne von einer Woche vor dem Trinkversuch nicht ausreichend war, um PEth komplett abzubauen. Um diese Fragestellung weiterführend zu klären, wurden die von den Probanden ausgefüllten AUDIT-Fragebögen ausgewertet, wobei bei den betroffenen Probanden kein Zusammenhang zwischen dem gewöhnlichen Alkoholkonsum und dem positiven PEth-Befund vor Trinkbeginn zu verzeichnen war. Ab einer Punktzahl von 8 besteht der Verdacht für eine alkoholbezogene Störung, wobei dieser Wert von den betroffenen Probanden nicht überschritten wurde. (Saunders et al. 1993) Weiterhin fiel im Vergleich der einzelnen Biomarker auf, dass PEth am längsten nachweisbar war. Dies ist darauf zurückzuführen, dass PEth im Blut bzw. in den Membranen von Erythrozyten akkumuliert und daher besonders langsam vom Körper abgebaut wird. (Aradottir et al. 2004a; Viel et al. 2012) Auch bei den Blutabnahmen nach 24, 72 und 168 h war der Biomarker in Abhängigkeit von der aufgenommenen Alkoholmenge und der individuellen Konstitution bei einigen Probanden noch nachweisbar. Diese Ergebnisse zeigen, dass der Gebrauch von PEth für den Nachweis von chronischem Konsum sehr gut geeignet ist.

Auch der Nachweis einer einmaligen, exzessiveren Alkoholaufnahme kann durch die Bestimmung von PEth nachgewiesen werden, wobei in Blut im Vergleich zu den anderen Biomarkern das längste Zeitfenster für eine Bestimmung zu verzeichnen war. Die einmalig aufgenommene Menge schien keinen signifikanten Einfluss auf die Konzentrationen von PEth zu haben, hinsichtlich der Proben, welche an den Tagen nach dem Trinkversuch erhoben wurden.

Auffallend ist zudem, dass das Erreichen der Maxima der einzelnen Trinkversuche variierte, was insbesondere durch den Vergleich der pharmakokinetischen Parameter c_{\max} und t_{\max} ersichtlich wird. Im ersten Trinkversuch mit der Ziel-BAK von 0,8 ‰ wurden die maximalen Konzentrationen der Alkoholbiomarker erst später erreicht: EtG: $t_{\max} = 3,67 \pm 0,471$ h ($c_{\max} = 2400 \pm 1022$ ng/mL), EtS: $t_{\max} = 2,89 \pm 0,875$ h ($c_{\max} = 331 \pm 85,0$ ng/mL), und PEth: $t_{\max} = 3,50 \pm 2,94$ h ($c_{\max} = 63,7 \pm 43,8$ ng/mL). Dahingegen zeigten die Biomarker im zweiten Trinkversuch mit der Ziel-BAK von 0,4 ‰ einen etwas nach vorn verschobenen Verlauf, wobei der Abbau der einzelnen Komponenten schon während der Blutabnahmen am Versuchstag klar ersichtlich war: EtG: $t_{\max} = 2,38 \pm 0,484$ h ($c_{\max} = 934 \pm 204$ ng/mL), $t_{\max} = 1,56 \pm 0,583$ h ($c_{\max} = 120 \pm 26,0$ ng/mL), und PEth: $t_{\max} = 0,313 \pm 0,348$ h ($c_{\max} = 74,5 \pm 24,7$ ng/mL). Entsprechend der Erwartungen war auffällig, dass durch die geringere aufgenommene Alkoholmenge das Maximum früher und mit einer weniger hohen Konzentration erreicht wurde. Ein ähnlicher Versuchsaufbau wurde für die Bestimmung von zwei PEth-Homologen (16:0/18:1 und 16:0/18:2) in einer Trinkstudie mit Ziel-BAKs von 0,25 und 0,5 ‰ durchgeführt, wobei auch hier bei der geringeren Alkoholaufnahme die Kinetiken leicht nach vorn verschoben waren. (Javors et al. 2016) Für die anderen Alkoholbiomarker gibt es bisher keine vergleichbaren Trinkstudien. Durch das in geringerer Konzentration vorliegende Substrat EtOH zeigt sich das Konzentrationsmaximum schon früher, wodurch, wie zuvor schon erwähnt, der Abbau früher einsetzte. Dennoch konnten aussagekräftige Konzentrationen der einzelnen Biomarker in den Tagen nach der Alkoholaufnahme nur bei PEth gemessen werden, was wiederum die Verwendung dieses Parameters zum Nachweis eines Alkoholkonsums bestärkt. Hinzukommt, dass die Beurteilung von PEth in dieser Arbeit mit Hilfe des festgelegten Grenzwertes von 10 ng/mL stattfand, welcher deutlich unter bereits etablierten Grenzwerten liegt. In den Ländern Belgien und Schweden wird PEth schon in der Analytik mit deutlich höheren Grenzwerten (20 und 35 ng/mL) verwendet. (Dumitrascu et al. 2021; Van Uytfanghe et al.

2021) Aufgrund dessen ist eine einheitliche Lösung für einen akzeptablen Grenzwert in Deutschland wünschenswert. Ebenso wie bei EtG im Urin, sollte ein Grenzwert gewählt werden, welcher über dem eigentlichen LOQ der angewandten Methode liegt, um falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden und im Falle des Falles *in dubio pro reo* etwas Spielraum zu gewährleisten. Deshalb scheint auf Grundlage der im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse und unter Zugrundelegung der verwendeten Literatur ein Grenzwert von 25 ng/mL als sinnvoll. Nichtsdestotrotz sollte auch in einer umfangreichen Diskussion über die Etablierung eines Grenzwertes für PEth in Deutschland für die Fahreignungsdiagnostik über den Einbezug des individuellen Hämatokrit-Wertes nachgedacht werden, um die erhaltenen Ergebnisse besser beurteilen zu können.

Eine eindeutige Limitation des angewendeten Studiendesigns zeigt sich insbesondere beim ersten Trinkversuch. Das verwendete Zeitintervall für die Probennahme am ersten Tag ist geringfügig zu kurz gewählt, da nicht auszuschließen ist, dass PEth, EtG und EtS ihre maximale Konzentration auch später hätten erreichen können. Für EtS gilt dies für den zweiten Trinkversuch nicht, da eine geringe Abnahme auch am ersten Tag des Trinkversuches festzustellen ist. Für eine Berechnung der weiteren pharmakokinetischen Parameter war dies jedoch auch nicht ausreichend. Insbesondere zeigt sich diese Limitation in den c_{\max} -Werten von PEth im Vergleich vom ersten zum zweiten Trinkversuch. Die Werte sind recht ähnlich, wobei ein maximaler Wert im ersten Trinkversuch nicht eindeutig zu identifizieren ist. Im zweiten ist dies jedoch möglich, weshalb eine pharmakokinetische Berechnung von k_e und $t_{1/2}$ bei allen Probanden durchgeführt wurde. Hierdurch wurde gezeigt, dass die Bestimmbarkeit von PEth bei einer einmaligen Aufnahme in gegebenen Fällen bis zu einer Woche gegeben war. Mit der terminalen Eliminationshalbwertszeit von im Mittel $149 \pm 71,8$ h (Trinkversuch II) und der gesamten Eliminationshalbwertszeit von 101 ± 57 h (Trinkversuch I) zeigt sich eine deutlich erhöhte Nachweisbarkeit im Vergleich zu anderen Alkoholbiomarkern. (Andresen-Streichert et al. 2018; Halter et al. 2008; Hoiseth et al. 2007a; Javors et al. 2016) Ebenso sind die Werte bezüglich der Eliminationshalbwertszeit im selben Rahmen wie bei den Vergleichsstudien. (Javors et al. 2016; Schröck et al. 2017) Eine Berechnung der pharmakokinetischen Parameter für NAcT war in beiden Trinkversuchen nicht möglich, da kein eindeutiger Kurvenverlauf festgestellt werden konnte.

Interindividuelle Schwankungen fanden sich für alle Biomarker, wobei die einzelnen Diagramme zeigen, dass der Trend dennoch für EtG, EtS und PEth, je nach Konstitution der Probanden, dieselben Tendenzen aufzeigte. Beispielsweise liegen die individuellen Konzentrationen der Probanden 1 und 2 im ersten Teil des Trinkversuches deutlich unter den Messwerten der anderen Teilnehmer. Dennoch zeigt der zugehörige Box-Plot eine homogene Pharmakokinetik über den erhobenen Messzeitraum, weshalb individuelle Abweichungen den mittleren Konzentrationsverlauf nicht ausschlaggebend stören.

Insgesamt zeigt sich bei genauerer Betrachtung der generierten Ergebnisse ein großer Vorteil der entwickelten Methode, da EtG und EtS als Kurzzeitmarker und PEth als Langzeitmarker für einen zuvor stattgefundenen Alkoholkonsum dienen. Hierdurch ist es möglich, das Konsumverhalten einer Person oder den Zeitpunkt des letzten Alkoholkonsums besser abschätzen zu können. Nichtsdestotrotz müssen hierzu weitere Studien durchgeführt werden, um statistisch z.B. durch multivariate Statistik zugehörige Schemata identifizieren zu können.

4.4.2 Darstellung der Urinausscheidung von EtG und EtS

Während der Trinkversuche sollte zu jedem Zeitpunkt einer Blutentnahme ebenfalls eine Urinprobe von den Probanden abgegeben werden. Dass Urin je nach aufgenommener Flüssigkeitsmenge in seiner Konzentration starken Schwankungen unterliegt, wurde schon in anderen Publikationen beschrieben (Dahl et al. 2002; Goll et al. 2002), weshalb Konzentrationen für eine bessere Vergleichbarkeit auf einen Kreatininwert von 100 mg/dL normiert wurden. Neben der Ermittlung des Kreatininwertes wurde die EtG-Konzentration über den am IRVM etablierten Immunoassay bestimmt. Der Vergleich der beiden Trinkversuche zeigte, dass EtG in höheren Konzentrationen nachweisbar war, der Anstieg verlief jedoch im Vergleich zu EtS langsamer und fand sein Maximum erst später (Abbildung 42 und 43). Das insbesondere im ersten Teil des Trinkversuches festgestellte Plateau von EtS zwischen 2 bis 4 h nach der Alkoholaufnahme, welches sich aus den individuellen Maxima der Probanden ergibt, deutet auf eine Sättigung der cytosolischen Sulfotransferasen zu diesem Zeitpunkt hin. Dieses Plateau konnte nicht nur in den Box-Plot-Darstellungen festgestellt werden, sondern auch in den individuellen Konzentrationen der Probanden. Die zugehörigen Daten sind im Anhang aufgeführt. Zwischen den beiden Trinkversuchen fanden sich auch in der renalen Ausscheidung Unterschiede, da im ersten Teil beide Biomarker in der Abgabe 24 h nach der Alkoholaufnahme noch eindeutig nachweisbar waren, wohingegen bei der

geringeren Alkoholmenge im zweiten Teil des Trinkversuches keiner der beiden Biomarker im Urin nachweisbar war. Insbesondere EtS zeigte schon während des ersten Tages 3 h nach der Alkoholaufnahme eine abnehmende Konzentration. EtG hingegen stagnierte in der Konzentration zwischen 2 und 4 h, wobei eine leichte Abnahme zum Ende ersichtlich war. Hierdurch konnte wiederum gezeigt werden, dass auch bei der Messung von EtG und EtS in Urin eine Abhängigkeit von der aufgenommenen Menge EtOH festzustellen war und gerade EtG über die Messung in Urin ein verlässlicher Alkoholbiomarker in der Abstinenzkontrolle ist. In einer Studie von Helander und Beck konnten interindividuelle Unterschiede bezüglich der Ausscheidung von EtG und EtS aufgezeigt werden. (Helander und Beck 2005) Die Konzentrationen von EtG sind zwar insgesamt in Blut ebenso wie in Urin höher als die von EtS, jedoch fanden sich einige Urinproben in der genannten Studie, in welchen nur einer der beiden Biomarker nachgewiesen werden konnte. Da dies auch aus einer weiteren Trinkstudie zu beiden Alkoholbiomarkern hervorgeht (Halter et al. 2008), sollte eine gleichzeitige Bestimmung von EtG und EtS in Urin angestrebt werden. Eine weitere Erklärung, weshalb EtG länger als EtS im Urin nachweisbar ist, sind die unterschiedlichen Molekülgrößen bzw. chemische Strukturen. Hierdurch kommt es zu Konzentrationsunterschieden in den verschiedenen Körperflüssigkeiten, wodurch das kleinere Molekül EtS leichter ausgeschieden werden kann. (Hoiseith et al. 2007a)

4.4.3 Blutalkoholkonzentration im Verlauf der Trinkversuche

Die vorgegebenen Ziel-BAKs wurden von den teilnehmenden Probanden weitestgehend erreicht und teilweise, vor allem im ersten Trinkversuch, sogar überschritten. Dies ist durch die interindividuellen Schwankungen zwischen den Probanden zu erklären und den unterschiedlich aufgenommenen Alkoholmengen. Weiterhin haben die Menge und Art der sich im Magen befindenden Nahrung einen Einfluss bezüglich der Resorption des aufgenommenen Alkohols. (Vollenbruck 1937) Hinzukommt das Geschlecht als weiterer Faktor, der aber durch die Berücksichtigung des Verteilungsvolumens bei der Ermittlung der zu trinkenden Menge einberechnet wurde. Auffällig ist zudem, dass beim ersten Trinkversuch die BAKs im Mittel immer noch bei knapp 0,42 ‰ lagen, dahingegen war nach 4 h im zweiten Trinkversuch, im Mittel nur noch 0,01 ‰ im Blut der Teilnehmer aufzufinden (Abbildung 44 und 45). Bei näherer Betrachtung der anzunehmenden Abbauraten des EtOH von 0,1 bis 0,2 ‰ pro Stunde waren die ermittelten Werte allerdings im zu erwartenden Bereich.

(Dettling et al. 2012) Die Abbauraten von Ethanol lagen beim ersten und zweiten Trinkversuch trotz unterschiedlichem Probandenkollektiv sehr nah beieinander. Es zeigte sich, dass bei einer kleineren aufgenommenen Alkoholmenge der Abbau etwas verringert zu sein scheint. Ebenfalls wurde die Resorptionsphase im zweiten Trinkversuch etwas schneller abgeschlossen als bei der höheren aufgenommenen Alkoholmenge.

4.4.4 Auftragung der gemessenen Werte der einzelnen Alkoholbiomarker gegen die ermittelten EtG- und EtS-Konzentrationen in Urin

Die Auftragung der einzelnen Biomarker erfolgte mit zwei unterschiedlich skalierten y-Achsen, da die Konzentrationsbereiche sehr unterschiedlich waren und anderweitig die Diagramme unübersichtlich geworden wären. Die folgende Diskussion wurde in den ersten und zweiten Trinkversuch aufgeteilt, wobei auf eine ausführlichere Kurvendiskussion verzichtet wurde, da diese in den Kapiteln zuvor schon für die einzelnen Biomarker in den entsprechenden Matrices erfolgte.

Trinkversuch I (Ziel-BAK 0,8 ‰)

Die Kurven für EtG in Blut und EtG in Urin aus Abbildung 46 zeigen trotz der unterschiedlichen Matrices einen sehr ähnlichen Verlauf der Konzentrationen zu den verschiedenen Zeitpunkten. Die Konzentration von EtG im Urin war etwa 40-mal höher als in Blut und der Anstieg war in beiden Fällen stetig, und hatte ein Maximum zum Zeitpunkt 4 h nach der Alkoholaufnahme. Nach 24 h war EtG nicht mehr im Blut, aber in der Matrix Urin noch deutlich nachweisbar. Diese Ergebnisse decken sich mit den Beobachtungen aus einer ähnlichen Trinkversuchsstudie aus Norwegen. (Hoise et al. 2007a) Der Kurvenverlauf von EtS im Urin verglichen mit EtG im Blut zeigte keinen vergleichbar starken Anstieg, sondern stagnierte schon ab etwa 2 h. Wie auch bei EtG in Urin, war EtS am Tag nach dem Trinkversuch in Urin noch eindeutig nachweisbar.

Im Falle von EtS in Blut und Urin verhielten sich beide Kurven in unterschiedlichen Matrices sehr homogen. Die Konzentration in Urin war circa 65-mal höher als in Blut. Der Anstieg von EtS in Blut und Urin war nicht so rapide wie bei EtG, stagnierte jedoch über einen längeren Zeitraum innerhalb des Versuchstages. Ebenso wie EtG war EtS am Tag nach dem Trinkversuch nicht mehr in Blut, aber immer noch im Urin nachweisbar. Eine ähnliche Studie wurde von

Halter et al. durchgeführt, wobei sich die in der hier dargestellten Studie generierten Daten mit der Vergleichsstudie decken. (Halter et al. 2008) Wie auch bei EtG ist Urin die Matrix, welche für EtS das längste Nachweisfenster der beiden Biomarker in den Körperflüssigkeiten zeigte. Auch hier erklärt sich das längere Nachweisfenster der beiden Biomarker in Urin durch die charakteristischen Eigenschaften der Matrix. Dieses Phänomen findet sich ebenfalls bei Medikamenten, Drogen und deren Abbauprodukte. Die Verweildauer von Urin in der Blase ist höher, während Blut permanent in einem zyklischen Vorgang gereinigt wird. Urin hingegen ist für den Abtransport von Abfallprodukten aus dem Stoffwechsel zuständig. Die renalen Exkretionen von EtG und EtS unterscheiden sich, da sie eine unterschiedliche Molekülgröße aufweisen (EtG: 222 g/mol, EtS: 126 g/mol) und ihre Verteilung in den unterschiedlichen Körperflüssigkeiten von äußeren Faktoren wie bspw. dem pH-Wert abhängig ist (Hoiseith et al. 2007a)

Der Biomarker NAcT zeigte auch in diesem Kontext keinen eindeutigen Zusammenhang. Dies bestärkt die Annahme, dass dieser Biomarker für den Nachweis von Alkohol nicht anwendbar ist.

Im Vergleich zu EtG und EtS in Urin zeigte PEth in Blut eine etwa 1600 bzw. 400-mal geringere Konzentration. Verglichen mit den anderen Alkoholbiomarkern EtG und EtS im Urin, konnte PEth im Blut ein deutlich längeres Nachweisfenster aufweisen (Aradottir et al. 2004a) Hierdurch zeigte sich erneut die Fähigkeit von PEth einen nicht exzessiveren Konsum von Alkohol auch noch sieben Tage nach dem eigentlichen Trinkgeschehen nachzuweisen, wodurch sich ein deutlicher Vorteil gegenüber EtG und EtS als Alkoholbiomarker in Urin ergibt.

Trinkversuch II (Ziel-BAK 0,4 ‰)

Insgesamt zeigten EtG in Blut und Urin einen wiederum konformen Kurvenverlauf, wobei die Konzentration im Blut um einen Faktor von etwa 40 erniedrigt war (Abbildung 47). Der Abbau der EtG-Konzentration im Urin begann ab 3 h, wobei der Cut-Off-Wert von 100 ng/mL in der Abstinenzkontrolle in der Urinprobe 24 h nach der Alkoholaufnahme immer noch deutlich (248 ng/mL) überschritten wurde. EtS war am Tag nach der Alkoholaufnahme nur noch mit 108 ng/mL nachweisbar. Diese Beobachtungen decken sich mit zwei sehr ähnlichen

Trinkversuchen (Halter et al. 2008; Hoiseth et al. 2007a), wobei in diesen das Erreichen der maximalen Konzentrationen in Blut und Urin etwas später, etwa bei 4 h zu verzeichnen war. In den genannten Studien wurde jedoch eine etwas höhere Alkoholmenge konsumiert, was diese Beobachtung erklären könnte.

Schon in der ersten Blutentnahme nach dem Trinkbeginn kann im Vergleich zur Leerprobe eine signifikante Konzentration von EtS im Blut festgestellt werden, wohingegen im Urin eine deutliche Zunahme von EtS erst ab etwa 0,5 h zu beobachten war. Dementsprechend begann der Abbau von EtS im Blut schon ab ca. 2 h, wohingegen in Urin die erste geringe Konzentrationsabnahme ab 3 h festzustellen war. Die Konzentration von EtS im Urin gegenüber dem Wert in Blut war zum Zeitpunkt von 1 h etwa um den Faktor 90 erhöht. Diese Abweichung (Faktor von 65 im ersten Trinkversuch) könnte auf eine vergleichbare, renale Exkretion hindeuten, wobei die Bildung von EtG und EtS durch die geringere aufgenommene Menge vermindert ist. Diese Beobachtung wird durch die Vergleichsstudie von Halter et al. unterstützt, da auch in diesen Proben das Erreichen der maximalen EtS-Konzentration in Urin später als in Blut erreicht wurde. (Halter et al. 2008)

Ein Anstieg von NAcT war in einem geringen Ausmaß zu erkennen, jedoch fand sich kein erkennbarer Trend, welcher auf den Biomarker selbst anzuwenden gewesen wäre oder im Einklang mit den anderen beiden Alkoholbiomarkern in Urin stand. Dies zeigt erneut, dass die Messung von NAcT als Indikator für Alkoholkonsum nicht ausreichend aussagekräftig ist.

Im Vergleich zu EtG und EtS in Urin verlief die Konzentrationszunahme von PEth im Blut sehr abrupt und zeigte das zugehörige Maximum bereits nach 0,5 h. Hieran schloss sich direkt eine sehr langsame Abnahme an, welche auch an Tag 7 noch zu positiven PEth-Ergebnissen im niedrigeren Konzentrationsbereich führte. Die Maxima für EtG und EtS in Urin wurden jeweils erst bei etwa 3 h und 2 h erreicht und der letzte positive Befund beider Biomarker war in der Urinprobe an Tag 2. Danach war es nicht mehr möglich EtG und EtS nachzuweisen. Diese Ergebnisse decken sich mit den Erkenntnissen aus dem ersten Trinkversuch wodurch das Potential von PEth für den Nachweis einer Alkoholaufnahme auch bei noch geringeren Mengen dargestellt werden konnte. Um die Vorteile dieses Alkoholbiomarkers in der Analytik erfolgreich zu nutzen, ist es allerdings essenziell, einen entsprechenden Grenzwert zu definieren, wie es in Schweden und Belgien schon der Fall ist. (Herzog et al. 2019)

Zusammenfassung und Vergleich der Trinkversuche I und II

Im ersten Trinkversuch zeigte sich für die Biomarker EtG und EtS eine deutlich später einsetzende Konzentrationsabnahme in beiden Matrices, was auf die geringere aufgenommene Alkoholmenge im zweiten Trinkversuch zurückzuführen ist. In einer vergleichbaren Studie konnte ebenfalls festgestellt werden, dass EtS im Vergleich zu EtG früher die maximale Konzentration in beiden Matrices erreicht und die Ausscheidung über den Urin schneller erfolgt. (Halter et al. 2008) Aufgrund des Größenunterschiedes verteilen sich beide Moleküle unterschiedlich in den Körperflüssigkeiten, was zusätzlich durch andere Faktoren wie den Salzgehalt beeinflusst sein kann. EtS ist im Vergleich zu EtG kleiner, aber dennoch ähnlich gut in wässrigen Komponenten löslich, weshalb die renale Elimination über den Urin schneller erfolgt. (Hoiseith et al. 2007a) NAcT zeigte auch in der Ausscheidung der Biomarker EtG und EtS in keinem der beiden Trinkversuche einen Zusammenhang. Schließlich konnte PEth in beiden Versuchen das längste Nachweisfenster auch im Vergleich zu EtG und EtS im Urin aufweisen. Dieses längere Nachweisfenster kommt durch die Akkumulation dieser Molekülgruppe in den Membranen von Erythrozyten zustande. (Aradottir et al. 2004a) Wie zuvor schon erwähnt, beweist PEth auch in diesem Zusammenhang die Möglichkeit einen chronischen oder einmaligen Konsum nachzuweisen. Die in diesen Studien generierten Ergebnisse decken sich ebenfalls mit dem Übersichtsartikel von Andresen-Streichert et al., in welchem insbesondere die Vor- und Nachteile von EtG, EtS in Urin gegenüber der Anwendung von PEth in Blut diskutiert wurden. (Andresen-Streichert et al. 2018)

4.4.5 Auftragung der gemessenen Werte der einzelnen Alkoholbiomarker gegen die ermittelten BAK-Werte

Um die Bildung der Alkoholbiomarker entsprechend der aktuellen BAK zu beurteilen, wurden die einzelnen Konzentrationen mit zwei angepassten y-Achsen gegeneinander aufgetragen. Auf eine ausführliche Kurvendiskussion hinsichtlich der Alkoholbiomarker in Blut und der BAK wird im Folgenden verzichtet, da diese schon in den Kapiteln 4.4.1 und 4.4.3 erfolgte.

Trinkversuch I (Ziel-BAK 0,8 ‰)

Die BAK erreichte ihr Maximum von 0,90 ‰ durch die bereits fortgeschrittene Resorption zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme (0 h) bei 60 Minuten nach Trinkbeginn. (Abbildung 48).

Die einzelnen Biomarker erreichten ihre maximalen Konzentrationen, wie zuvor schon beschrieben, erst zu späteren Zeitpunkten: EtG und PEth während der abgebildeten Zeitspanne bei etwa 4 h und EtS etwa nach 3 h. Wie auch in den Kapiteln zuvor erwähnt, fand sich bei NAcT ein geringfügiger Anstieg der Konzentration nach einer Alkoholaufnahme. Jedoch zeigte sich bei den dargestellten Konzentrationskurven von NAcT kein eindeutiger Trend, welcher mit der BAK in Einklang gebracht werden könnte. Die Abnahme der BAK war im Vergleich zu den anderen Biomarkern am ersten Versuchstag deutlich zu erkennen, weshalb ein Nachweis nach 24 h für EtOH nicht mehr möglich war. Diesbezüglich bieten sich die dargestellten Biomarker EtG, EtS und PEth besser an, einen Alkoholkonsum zu belegen, da die Nachweisfenster im Vergleich zu EtOH deutlich länger sind. Diese Ergebnisse zeigten sich ebenfalls in anderen Trinkstudien, in denen die gemessenen Alkoholbiomarker gegen die BAK aufgetragen wurden. (Halter et al. 2008; Hoiseth et al. 2007a; Javors et al. 2016; Schröck et al. 2017)

Trinkversuch II (Ziel-BAK 0,4 ‰)

Wie zuvor bei dem ersten Teil des Trinkversuches zeigte die BAK direkt nach der Resorptionsphase einen starken Anstieg mit einem Maximum 30 Minuten nach Trinkende (Abbildung 49). Die Alkoholbiomarker EtG (2 h) und EtS (1 h) erreichten ihre maximalen Konzentrationen erst später und konnten im Vergleich zur BAK ebenfalls über einen längeren Zeitraum nachgewiesen werden. Auch hier fand sich kein ersichtlicher Zusammenhang zwischen der NAcT-Konzentration und der Alkoholaufnahme. Trotz einer geringfügig erhöhten Konzentration durch die BAK, zeigte sich kein nachvollziehbares Muster im Abbau, was wiederum den Einsatz dieser Substanz im Abstinenzkontext in Frage stellt. Wie auch EtOH konnte die maximale Konzentration von PEth nach 0,5 h festgestellt werden, wobei die Nachweisbarkeit von PEth über einen deutlich längeren Zeitraum im Vergleich zur BAK zu verzeichnen war. Wie auch bei den anderen Biomarkern diskutiert, lieferte die BAK an Tag 2 keinen Hinweis auf eine Alkoholaufnahme am Vortag, wohingegen die Konzentrationen von PEth bei einigen Probanden auch an Tag 7 noch den initialen Alkoholkonsum am ersten Versuchstag beweisen konnten.

Zusammenfassung und Vergleich der Trinkversuche I und II

In beiden Trinkversuchen konnte dargestellt werden, dass die BAK als Marker eines länger zurückliegenden Alkoholkonsums nicht geeignet ist. NAcT zeigte auch im Zusammenhang mit der BAK kein nachvollziehbares Bildungsmuster, weshalb dies wiederum die Anwendung in der Diagnostik ausschließt. Der Nachweis der anderen drei Alkoholbiomarker war im Vergleich zur gemessenen BAK länger möglich. Die besten Ergebnisse konnten hierbei durch die Messung von PEth erzielt werden, da das Nachweisfenster aufgrund der Akkumulation des Biomarkers in den Membranen der Erythrozyten am längsten ist. (Aradottir et al. 2004a) Diesbezüglich bieten sich die gezeigten Biomarker EtG, EtS und PEth für den Nachweis eines Alkoholkonsums an. Diese Ergebnisse zeigten sich ebenfalls in anderen Trinkstudien, in denen die gemessenen Alkoholbiomarker gegen die BAK aufgetragen wurden. (Halter et al. 2008; Hoiseth et al. 2007a; Javors et al. 2016; Schröck et al. 2017)

4.4.6 Auftragung der BAK gegen die gemessenen Werte von EtG und EtS im Urin

Abschließend wurde die Ausscheidung von EtG und EtS über den Urin mit der gemessenen BAK verglichen. In der Abbildung 50 sind die einzelnen Parameter aufgrund der unterschiedlichen Einheiten mithilfe zweier y-Achsen skaliert. Auf eine ausführlichere Kurvendiskussion wird im Folgenden verzichtet, da die aufgezeigten Kurven in anderen Kapiteln (s. 4.4.2 und 4.4.3) schon genauer charakterisiert wurden. Der Abbau der drei Substanzen zeigt eine eindeutige Konzentrationsabhängigkeit, der bei einer Ziel-BAK von 0,4 ‰ deutlich früher beginnt. Weiterhin wurden die Maxima der einzelnen Kurven früher erreicht und zeigen eine geringere Konzentration als im ersten Trinkversuch. Ein Nachweis einer aussagekräftigen BAK war in beiden Fällen ab dem 24 h-Wert nicht mehr möglich. Auch die Beurteilung einer ausreichenden BAK im zweiten Trinkversuch ist zum Zeitpunkt 4 h fraglich und individuell von den einzelnen Probanden abhängig. Dahingegen können EtG und EtS verlässlich nach 24 h im Urin der Probanden aus dem ersten Trinkversuch nachgewiesen werden. Ein Nachweis beider Substanzen ist im zweiten Trinkversuch ebenso möglich, jedoch sind die Konzentrationen deutlich niedriger. Hierbei zeigt sich erneut die Fähigkeit von EtG und EtS einen kürzlich zuvor erfolgten Alkoholkonsum nachzuweisen, weshalb die Anwendung in der Abstinenzkontrolle sinnvoll erscheint. (Junghanns et al. 2009) Ein Nachweis für beide Analyten ist in Urin deutlich länger als in Blut möglich. Dies wurde auch in anderen Trinkversuchsstudien belegt. (Halter et al. 2008; Helander und Beck 2005; Hoiseth et al. 2007a)

4.4.7 Bestimmung des endogenen Grundlevels für NAcT

Da es sich bei NAcT um ein endogen im Körper gebildetes Molekül handelt, war es nötig festzustellen, ab welchem physiologischen Wert es möglich ist, von einem erhöhten Spiegel aufgrund eines Alkoholkonsums auszugehen. Um einen entsprechenden Grenzwert zu ermitteln, wurden die Leerwerte aller 17 Probanden miteinander verglichen, um die Varianz der einzelnen Konzentrationen beurteilen zu können. Die Quantifizierung der einzelnen Werte erfolgte auf Grundlage mehrerer Kalibrationsgeraden, welche mit derselben Charge Vollblut hergestellt wurden. Im Vorfeld wurde eine Bestimmungsgrenze von 10 ng/mL für alle Biomarker im Rahmen der vorgelegten Arbeit definiert, weshalb gemessene Werte unterhalb dieser Konzentration mit 0 ng/mL in die Auswertung miteinbezogen wurden. Die Streuung der Leerwerte rangiert von einem Minimum von 0 ng/mL bis zu einem Maximum bei 60,4 ng/mL und weisen eine RSD von 80,3 % auf. Der Median (20,3 ng/mL) und Mittelwert (23,3 ng/mL) in dieser Betrachtung zeigen eine erhebliche Differenz zum maximal gemessenen Wert (60,4 ng/mL) auf, weshalb es nicht möglich war, einen hinreichenden Grenzwert festzulegen. Weiterhin zeigen die Kinetiken von NAcT in den Abbildungen 29 und 38, dass die Konzentrationen bezüglich der Bildung des Biomarkers keinen typischen pharmakokinetischen Verlauf aufweisen, da die Unterschiede zu den einzelnen Entnahmezeitpunkten nicht signifikant waren. Ein eindeutiger Trend zu einer induzierten Bildung während der Alkoholaufnahme sowie einem entsprechenden Anstieg und anschließendem Abbau konnte nicht verzeichnet werden. (Miyazaki et al. 2015)

Abschließend sollte in der vorliegenden Arbeit nochmals der Nutzen von NAcT in der Forensik überprüft werden, da die Forschungsergebnisse aus dem IRVM Heidelberg und die Arbeiten von Luginbühl et al. widersprüchliche Aussagen vertreten. (Jokiel und Skopp 2015; Luginbühl et al. 2017; Luginbühl et al. 2016) Im Trinkversuch von Luginbühl et al. wurde NAcT mit seinen Charakteristika als nicht hinreichend für die Anforderungen eingestuft, die an einen Alkoholbiomarker in der Analytik gestellt werden. (Luginbühl et al. 2017) Dieses Fazit wird durch die in diesen Trinkversuchen generierten Daten und Auswertungen gestützt.

4.5 Ergebnisse aus der Kooperation mit dem Krankenhaus Salem

Im Rahmen einer Kooperation mit dem Krankenhaus Salem in Heidelberg konnte eine Kohorte an Proben zu Beginn und Ende der entsprechenden Entzugsprogramme gemessen werden. Dabei wurden die drei Alkoholbiomarker EtG, EtS und PEth in den vorliegenden Blutproben untersucht.

4.5.1 Die Biomarker im Entzugskontext

Bei 99 von insgesamt 100 Patienten lag eine Blutprobe vor, die zu Beginn der Therapie erhoben wurde. Bei der Entlassung konnten Proben von 95 Patienten erhoben werden. Wie in den Abbildungen 52 und 53 ersichtlich, konnten die Alkoholbiomarker EtG und EtS nach dem Entzug bei keinem der Probanden im Blut nachgewiesen werden, wobei sich die Dauer der einzelnen Entzüge zwischen 0 und 21 Tagen bewegte. Alle Proben wurden in die Statistik miteinbezogen, obwohl wie zuvor beschrieben, nicht für jeden Patienten die zwei erforderlichen Proben entnommen wurden. Bei den untersuchten Alkoholbiomarkern zeigten EtG und EtS auch im Kontext der zwei Trinkversuche die schnellste Abbaurate, was ebenfalls hier bestätigt werden konnte. Die ermittelten Daten in Abbildung 54 zeigen, dass PEth über einen sehr langen Zeitraum nachgewiesen werden konnte und der Abbau nur sehr langsam erfolgte, weshalb diese Substanz bei jedem Patienten, bis auf einen, zum Ende des Aufenthaltes noch im Blut nachweisbar war. Diese Beobachtung wird durch weitere Veröffentlichungen gestützt. (Hansson et al. 1997; Wurst et al. 2010) Durch den lipophilen Charakter von PEth kann davon ausgegangen werden, dass sich dieses in den Membranen von Erythrozyten einlagert und ein Abbau dort aufgrund des Fehlens der entsprechenden Phospholipase nur sehr langsam stattfindet. (Aradottir et al. 2004a; Lopez-Cruzan et al. 2018) Die ermittelten Werte der einzelnen Biomarker zu Beginn des Entzuges schwanken stark (RSD-Werte: EtG: 137 %, EtS: 121 % und PEth: 75 %), was durch die Heterogenität des Probenkollektivs, unterschiedliche Trinkmengen und Abstinenzzeiträume vor Beginn des Entzuges, aber auch durch interindividuelle Schwankungen erklärt werden kann. Insbesondere die aufgenommene Trinkmenge vor dem Entzugsbeginn kann abhängig von der eigenen Motivation und äußeren Umständen, aber auch dem Gewöhnungsgrad sehr unterschiedlich ausfallen. In allen Proben, welche am Ende der Behandlung erhoben wurden, konnten EtG und EtS nicht mehr nachgewiesen werden. Die Eliminierung von EtG und EtS aus dem Blut

erfolgt relativ rasch, was sowohl in den beiden Trinkversuchen dieser Arbeit und einer anderen Vergleichsstudie gezeigt wurde. (Halter et al. 2008)

Jedoch ist anzumerken, dass die einzelnen Aufenthalte in ihrer Dauer schwankten und zwischen Beginn und Ende keine weiteren Proben für ein Monitoring erhoben wurden. Nachdem der Wert für PEth nur in einem Fall bis zum Ende der Therapie auf null sank, wurde im Folgenden untersucht, ob der Parameter der Lebersteifigkeit Einfluss auf den Abbau von PEth hatte. Bei zwei Probanden stand die Frage im Raum, ob sie es geschafft hatten, während ihres Aufenthaltes an eine größere Menge Alkohol zu kommen und diese etwa ein bis zwei Tage vor der Entlassung zu konsumieren. Die Ergebnisse der PEth-Bestimmung legen dies nahe, da die Patienten zur Entlassung höhere Werte aufzeigten als bei der Aufnahme. EtG und EtS konnten bei diesen Patienten jedoch nicht nachgewiesen werden, wodurch ein eventueller Konsum deutlich vor der Probenabgabe bei der Entlassung (> 24 h) erfolgt sein muss. Andere Erklärungen für diese Befunde bei PEth könnte eine Umverteilung von PEth aus dem Gewebe in das Blut sein oder eine vorangegangene nicht sachgerechte Lagerung der Proben. Ein möglicher weiterer Einflussfaktor könnte auch ein schwankender Hämatokrit-Wert während der Zeit der Entgiftung sein. Im Falle dieser Blutproben ist nicht davon auszugehen, dass eine *in vitro* Formation von PEth stattgefunden hat, da die Probenlagerung adäquat erfolgte und zu Beginn des Entzuges und insbesondere am Ende des Klinikaufenthaltes nicht von einer Alkoholisierung der Probanden auszugehen ist.

4.5.2 Zusammenhang zwischen Entgiftung, Biomarkern und Lebersteifigkeit

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die vier Gruppen der Lebersteifigkeit und der Zusammenhang des Abbaus von PEth bzgl. der Leberbeschaffenheit untersucht (Abbildung 55 und Tabelle 50). Da die Biomarker EtG und EtS von allen Probanden komplett ausgeschieden wurden, konnte kein Zusammenhang festgestellt werden. PEth fand sich auch nach dem Entzug weiterhin im Blut der Patienten, allerdings zumeist in einer geringeren Konzentration. In zwei Fällen war die PEth-Konzentration zur Entlassung höher als zur Aufnahme in die Klinik, was zuvor schon diskutiert wurde. Der Zusammenhang zwischen dem Abbau von PEth und der Lebersteifigkeit wurde über einen Kruskal-Wallis-Test geprüft. Hierbei ergab sich ein H-Wert von 6,44, welcher kleiner als der zugehörige Chi-Quadrat-Wert von 7,81 ist, wodurch gezeigt wurde, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen zu finden waren. Ergänzend wurden die individuellen Differenzen zwischen Beginn und Ende des

Entzuges auf die Aufenthaltsdauer in Tagen normiert (Abbildung 56 und Tabelle 51). Auch hierfür wurde der Kruskal-Wallis-Test angewendet, um zu testen, ob ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem PEth-Abbau pro Tag und dem Grad der Lebersteifigkeit besteht. Es ergab sich ein korrigierter H-Wert von 3,26 welcher ebenfalls geringer als der Chi-Quadrat-Wert von 7,81 ist, woraus sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen den Parametern des PEth-Abbaus pro Tag und der Lebersteifigkeit ergibt. Das bedeutet, dass der Grad der Lebersteifigkeit keinen Einfluss auf den Abbau von PEth hatte.

Zusammenfassend konnten erste Erkenntnisse über einen möglichen Zusammenhang zwischen den Alkoholbiomarkern EtG, EtS und PEth und der Lebersteifigkeit insbesondere im Rahmen einer Entgiftung gewonnen werden. Als Schwäche dieser Studie ist jedoch aufzuführen, dass lediglich die Proben zu Beginn und Ende des Entzuges untersucht werden konnten, da im Rahmen der Erhebungen durch das Krankenhaus Salem kein komplettes Monitoring über den gesamten Entzugszeitraum geplant war. In zukünftigen Studien sollte daher der Entzugszeitraum durch die Erhebung mehrerer Blutproben über den gesamten Klinikaufenthalt umfänglicher abgedeckt werden, um eine vollständige Pharmakokinetik aufzuzeigen.

4.6 Schlussfolgerung, Limitationen und Ausblick

Zusammenfassend konnte im Rahmen dieser Arbeit eine verlässliche und valide Multimethode zum Nachweis der Substanzen Ethylglucuronid, Ethylsulfat, N-Acetyltaurin und 16:0/18:1 Phosphatidylethanol entwickelt und etabliert werden. Durch die Erfüllung aller Anforderungen an eine Validierung entsprechend der Richtlinien der GTFCh kann die Methode in der forensisch-toxikologischen Analytik verlässliche und zuverlässige Ergebnisse liefern. Ergänzend wäre eine Integration weiterer Alkoholbiomarker in die bestehende Methode möglich.

In der erweiterten Validierung mit postmortalen Blutproben lieferte die entwickelte Multimethode verlässliche Ergebnisse. Lediglich 4 der 31 gemessenen Proben waren aufgrund der Beschaffenheit der Proben bzw. Matrixeffekte nicht auswertbar. Die gängigste Variante, um durch die Matrix verursachte Interferenzen zu minimieren, ist das Standard-Additionsverfahren, bei welchem eine definierte Menge des gesuchten Analyten auf verschiedene Aliquote der zu untersuchenden Probe gegeben und vermessen werden. Jedoch zeigt auch dieses Verfahren Limitationen, da eine große Menge der Probe benötigt wird und bei einer zu anspruchsvollen Matrix ebenfalls der Nachweis des Analyten und des zugehörigen internen Standards eingeschränkt bzw. nicht möglich ist. Neben dieser Limitierung stellt insbesondere die Beurteilung von PEth in postmortalen Blutproben eine Herausforderung dar, da hier die Lagerungsbedingungen nicht optimal ausfallen und im Blut vorhandener Alkohol auch nach dem Tod zu einer *in vitro* Bildung von PEth führen kann. (Aradottir et al. 2004b; Liu et al. 2018) In den in dieser Arbeit untersuchten Proben wurden gezielt postmortale Blutproben mit einer BAK > 1,0 ‰ verwendet und das postmortale Intervall nicht in die Auswertung miteinbezogen, wodurch die Beurteilung der PEth-Konzentration nur eingeschränkt erfolgen kann. Zur Erforschung möglicher Störfaktoren und der Auswirkung der Lagerungsbedingungen sollte zukünftig ein größeres Probenkollektiv untersucht werden. Hierbei sollten auch Proben ohne nachweisbare Alkoholmengen und mit geringen BAKs unter 1,0 ‰ beinhaltet sein, um die Auswirkung von geringeren BAKs im Kontext einer postmortalen Ethanolbildung beurteilen zu können und zu prüfen, inwiefern sich geringe postmortale BAKs auf eine *in vitro* Bildung von PEth auswirken. Bei der Untersuchung der Auswirkung der Lagerungsbedingungen sollten sowohl das postmortale Intervall als auch der Einfluss von laborüblichen Lagerungsbedingungen bei -20 °C auf die Proben gezielt untersucht werden.

Ebenso sollten weitere Untersuchungen zur *in vitro* Formation von PEth durchgeführt werden, um beispielsweise das Verhältnis zwischen der BAK und PEth über einen gewissen Zeitraum zu beobachten und dadurch auch nicht durchgehend sachgerecht gelagerte Proben nachträglich beurteilen zu können. Die in dieser Arbeit vorgestellte Methode kann eine noch umfangreichere Interpretation von postmortalen Probenmaterial ermöglichen. Durch weitere Studien und der Verwendung von multivariater Datenanalyse könnten z.B. Biomarkerprofile und -cluster ermittelt werden, die eine genauere Beurteilung des Alkoholkonsums vor dem Tod zulassen können.

Durch die Verwendung der neu entwickelten Methode war es möglich die Blutproben aus zwei Trinkversuchen am IRVM verlässlich zu messen, auszuwerten und zu beurteilen. Ein substanzielles Ziel dieses Teiles der Arbeit war die Eignung von NAcT als Alkoholbiomarker zu überprüfen. Auf Grundlage der generierten Ergebnisse konnte die negative Einschätzung von Luginbühl et al. (Luginbühl et al. 2017; Luginbühl et al. 2016) bestätigt werden und die Eignung von NAcT als Alkoholbiomarker klar verneint werden. Mitunter konnte diese Arbeit zeigen, dass sich weder ein endogener Grundspiegel noch eine nachvollziehbare Kinetik aufzeigen ließ. Die individuellen Schwankungen bzgl. des endogenen Levels waren derart hoch, dass eine Anwendung in der klinischen und forensischen Analytik nicht sinnvoll erscheint. Für die anderen Teile dieser Arbeit (erweiterte Validierung und Proben aus dem Krankenhaus Salem) wurde daher auf eine weitere Quantifizierung dieser Substanz verzichtet. Durch die parallele Bestimmung der Alkoholbiomarker EtG, EtS und PEth im Vollblut konnten individuelle Vor- und Nachteile der einzelnen Substanzen herausgearbeitet werden. Hierbei zeigte PEth in Vollblut das längste Nachweisfenster, weshalb eine Etablierung in der forensisch-toxikologischen Analytik in Deutschland weiterhin diskutiert werden sollte. Die Festlegung von Grenzwerten für eine Verwendung im Rahmen der klinischen und forensischen Diagnostik müsste entsprechend den zu beantwortenden Fragestellungen diskutiert und an einem größeren Probandenkollektiv getestet werden. Für die Beurteilung der vorerst rein im wissenschaftlichen Kontext generierten Daten und der sehr unterschiedlichen Probandengruppen lässt sich ein Grenzwert von 10 ng/mL wie in dieser Arbeit gezeigt gut anwenden, um die Diskussion für eine Neubewertung der Grenzkonzentrationen zu unterstützen. Für EtG und EtS im Vollblut gibt es in der Literatur keine postulierten Grenzwerte, da eine Quantifizierung meist im wissenschaftlichen Kontext erfolgt. Ein

Grenzwert von 10 ng/mL ist im Vergleich zu anderen Methoden im Blut als recht niedrig einzustufen. (Hoiseh et al. 2009a) Gerade im Rahmen von pharmakokinetischen Studien können über niedrigere Grenzwerte umfangreichere Auswertungen durchgeführt werden. Durch Helander und Hansson wurden für PEth Konzentrationsbereiche postuliert, die für eine Eingrenzung des Konsumverhaltens herangezogen werden können. Beispielsweise zeigen Konzentrationen über den von Helander und Hansson postulierten Grenzwert von 210 ng/mL für PEth verlässlich eine Alkoholabhängigkeit an, weshalb eine Verwendung beispielsweise bei Fragestellungen in einem Kollektiv von Personen mit einem hohen Alkoholkonsum denkbar wäre. (Helander und Hansson 2013) In Belgien und Schweden gelten bereits definierte Grenzwerte von 35 und 20 ng/mL für die Fahreignungsdiagnostik. (Dumitrascu et al. 2021; Van Uytfanghe et al. 2021) Auf Grundlage der eigenen und bereits bestehenden Ergebnisse und Studien erscheint ein Grenzwert von 25 ng/mL für die Fahreignungsdiagnostik als angemessen, um in der forensischen Routine angewendet zu werden.

Für eine klinische Anwendung der vorgestellten Analytik und im Rahmen einer forensischen Begutachtung sollten einige weitere klinische Parameter Beachtung finden und in weiterführenden Studien untersucht werden. Da PEth hauptsächlich in den Erythrozyten akkumuliert sollte die Berücksichtigung der individuellen Hämatokrit-Werte, wie sie schon bei *Dried Blood Spots* praktiziert wird (Aboutara et al. 2021; Luginbühl et al. 2021), auch für die Untersuchung von Vollblutproben kritisch diskutiert werden. Aufgrund individueller Schwankungen könnte dies zu einer Verfälschung des gemessenen PEth-Wertes führen. In der vorliegenden Arbeit wurde auf individuelle Analysen der Hämatokrit-Werte verzichtet, da dies in der aktuellen forensischen Forschung und der Fahreignungsbeurteilung in anderen Ländern in Vollblutproben nicht praktiziert wird. (Andresen-Streichert et al. 2018; Dumitrascu et al. 2021; Javors et al. 2016; Kummer et al. 2016; Marques et al. 2011) Dieser Einfluss wurde jedoch bisher nur in kleineren Probenkohorten bei Kummer et al. und Aboutara et al. untersucht, wobei kein signifikanter Einfluss durch das Hämatokrit-Level bei der DBS-Analytik festgestellt werden konnte. (Aboutara et al. 2021; Kummer et al. 2016) Nichtsdestotrotz sollte ein möglicher Einfluss durch den Hämatokrit-Wert in der PEth-Analytik untersucht werden. Insbesondere bei der Etablierung eines entsprechenden Grenzwertes im Rahmen der Fahreignungsdiagnostik in Deutschland sollte unabhängig von einer Vollblut- oder DBS-Analytik der Hämatokrit-Wert bei der Beurteilung, ähnlich wie der Creatinin-Wert bei EtG im

Urin, miteinbezogen werden. Da es sich bei EtG und EtS um sehr hydrophile, kleine Moleküle handelt sollte nur von einem geringen Einfluss durch den Hämatokrit-Wert ausgegangen werden.

Zudem kann die individuelle Nieren- und Leberfunktion einen Einfluss auf die Eliminierung der den Alkoholbiomarkern haben, so dass Einschränkungen der Funktion oder gewisse Erkrankungen einen großen Einfluss haben können. In einer Studie von Wurst et al. führte eine Erkrankung der Niere zu einem erhöhten EtG-Wert im Urin. (Wurst et al. 2004) Hoiseth et al. konnten in einem konkreten Fall (Erkrankung der Niere und Leber) im Rahmen einer Studie auffällig erhöhte EtG-Konzentrationen im Blut feststellen. (Hoiseth et al. 2009a) Jedoch ist in beiden Studien nicht bekannt, welche Erkrankungen konkret vorlagen und wie deren individuelle Ausprägung sich auf die Messwerte ausgewirkt haben könnte. In der Trinkstudie welche in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde, ist bei keinem der Teilnehmer eine Leber- oder Nierenerkrankung bekannt gewesen, weshalb individuelle Schwankungen als gering einzuschätzen sind. Dies ist auch konform mit den Ergebnissen aus den beiden zuvor genannten Studien, bei denen keine Unterschiede zwischen den gesunden Probanden feststellbar waren. (Hoiseth et al. 2009a; Wurst et al. 2004) Des Weiteren könnten andere interindividuelle Unterschiede wie eine variable Aktivität cytosolischer Sulfotransferasen und einer möglichen Sättigung dieser Enzyme sowie der Einfluss einer fleischlosen Ernährung auf die Bildung der Biomarker interessante Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen darstellen. Neben der Analytik von Vollblut, könnte die in dieser Arbeit entwickelte Methode auch bei neuartigen Probennahme- und Aufarbeitungsstrategien, wie z.B. *Dried Blood Spots*, Anwendung finden und deren Analytik verbessern und vereinfachen.

In der letzten Anwendung wurde die entwickelte Methode für die Bestimmung der Biomarker EtG, EtS und PEth im Entzugskontext verwendet. Hierbei konnte gezeigt werden, dass EtG, EtS und PEth unabhängig von dem Grad der Lebersteifigkeit abgebaut und ausgeschieden werden. Jedoch war auffällig, dass die Nachweisbarkeit von PEth bei Alkoholikern im Vergleich zu Personen mit einem moderaten Konsum deutlich erhöht war. Ebenfalls untersucht wurde, ob es eine Abhängigkeit des individuellen PEth-Abbaus von dem Grad der Lebersteifigkeit gibt, wobei kein Zusammenhang festgestellt werden konnte. Weiterführend könnten Untersuchungen durchgeführt werden, ob andere Faktoren bei alkoholkranken Personen einen Einfluss auf die Kinetik der Alkoholbiomarker haben. Zur Beantwortung dieser Frage

könnte ein Monitoring über den gesamten Klinikaufenthalt stattfinden, um individuelle Unterschiede besser feststellen zu können. Zusätzlich wäre es wünschenswert für eine umfassendere Anwendung der Methode auch den Status der Leber und der Niere konsequenter mit einzubeziehen, um klinische Parameter auffindig zu machen, welche einen signifikanten Einfluss auf die Analytkonzentrationen und anschließende Befundung haben könnten. Im Falle der Lebersteifigkeit und EtG im Entzugskontext sollten etwaige Leber- oder Nierenerkrankungen in weiterführenden pharmakokinetischen Studien mit in die Beurteilung einbezogen werden, um eine Verfälschung diesbezüglich zu vermeiden. Im Rahmen der hier dargestellten Ergebnisse wurden ausschließlich Proben vom Beginn und Ende der Entgiftung untersucht, weshalb bei einer kompletten Elimination von EtG bis zum Ende der Therapie kein Einfluss auf die erhaltenen Ergebnisse zu erwarten ist.

Ein problematischer Faktor für die Anwendbarkeit der Methode zur Vermessung von PEth im klinischen Kontext ist die laborübliche Lagerung von Proben bei -20 °C. Kann eine Alkoholabstinenz der zu untersuchenden Personen gewährleistet werden, sollten sich keine Probleme bzgl. der Präanalytik (s. Ergebnisse zur Lebersteifigkeit) ergeben, da ohne vorhandenes Ethanol in der zu untersuchenden Blutprobe keine *in vitro* Formation von PEth stattfinden kann. (Aradottir et al. 2004a) Ist diese Alkoholabstinenz jedoch nicht gegeben, gibt es verschiedene Möglichkeiten, um eine Verfälschung der Proben zu vermeiden: Einmal wurde in mehreren Veröffentlichungen gezeigt, dass bei einer nur kurzen Zeitspanne bis zur Analytik eine Lagerung bei 4 °C möglich ist, ohne einen signifikanten Effekt auf die PEth-Konzentration zu beobachten. (Aradottir et al. 2004a; Dumitrascu et al. 2021; Liu et al. 2018) Hierbei muss jedoch von Anfang an klar sein, dass PEth für die Beantwortung der im Raum stehenden Fragestellung gemessen werden muss. Falls Proben nachträglich untersucht werden sollen, welche über einen längeren Zeitraum bei -20 °C gelagert wurden, können insbesondere durch die Anwendung der in dieser Arbeit vorgestellten Methodik zwei weitere Alkoholbiomarker, EtG und EtS, untersucht werden, welche weder durch in der Probe vorhandenes Ethanol noch durch die Lagerungsbedingungen beeinflusst werden. (Liu et al. 2018) In weiterführenden Studien könnten genau diese Zusammenhänge zwischen vorhandenem Ethanol in authentischen Blutproben, Lagerungsbedingungen und daraus resultierenden Verhältnissen zwischen EtG, EtS und PEth untersucht werden.

5 Zusammenfassung

Die Prävalenz von Alkohol in der heutigen Gesellschaft ist unumstritten, wodurch sich vielfältige Fragestellungen ergeben, welche oftmals nicht alleinig durch die Messung einer Blutalkoholkonzentration beantwortet werden können. Aufgrund dessen nahm die Bedeutung von spezifischen Abbauprodukten des Ethanols, auch Alkoholbiomarker genannt, in den letzten Jahren stetig zu, da ein Alkoholkonsum durch deren Messung deutlich länger nachweisbar ist. Dafür ist eine verlässliche und robuste Analytik der verschiedenen Biomarker zur Beantwortung diverser Fragestellungen, z.B. im Rahmen der Abstinenzkontrolle, unerlässlich.

Aus diesem Grund war das Ziel dieser Arbeit die Entwicklung, Etablierung, Validierung und Anwendung einer neuartigen und spezifischen Multimethode zum Nachweis diverser Alkoholbiomarker wie Ethylglucuronid, Ethylsulfat, N-Acetyltaurin und 16:0/18:1 Phosphatidylethanol. Nach einer erfolgreichen Methodenentwicklung und -validierung entsprechend der Richtlinien der GTFCh konnten alle vier Biomarker mit einer sehr guten Intensität und Reproduzierbarkeit qualitativ nachgewiesen und quantitativ bestimmt werden. Anschließend wurde die Methode im Rahmen verschiedener Studien angewendet, um forensisch und analytisch verwertbare Ergebnisse zu gewinnen. Es ergaben sich Anwendungsgebiete aus der Leichentoxikologie, Pharmakokinetik sowie der klinischen Diagnostik. Zusätzlich wurde geklärt, inwieweit eine Anwendung von NAcT als Alkoholbiomarker sinnvoll ist, wobei die erhaltenen Ergebnisse eine Anwendung nicht unterstützen.

Um die Eignung der Methode zur Untersuchung von postmortalem Blut zu testen, wurden 31 Proben gemessen, in denen zuvor hohe Blutalkoholkonzentrationen nachgewiesen werden konnten. Die hierdurch ermittelten Ergebnisse bestätigten die Anwendbarkeit der Methode für postmortales Probenmaterial. Aufgrund der Bestimmung mehrerer Alkoholbiomarker kann eine Alkoholisierung vor dem Tod von einer durch postmortal gebildetes EtOH verursachten Verfälschung der BAK unterschieden werden. Durch die parallele Bestimmung der drei Alkoholbiomarker Ethylglucuronid, Ethylsulfat und 16:0/18:1 Phosphatidylethanol steigt die Aussagekraft der erhobenen Ergebnisse.

Zusätzlich wurden zwei Trinkversuche am Institut für Rechts- und Verkehrsmedizin in Heidelberg durchgeführt, in welchem Probanden eine individuelle Alkoholmenge aufgenommen haben, um eine vorgegebene Blutalkoholkonzentration zu erreichen. Über den ersten Versuchstag und einem Zeitfenster von sieben Tagen wurden in definierten Abständen Blut- und Urinproben erhoben, um die Verlässlichkeit der entwickelten Multimethode und die Pharmakokinetiken der einzelnen Biomarker zu untersuchen. Ein weiteres Ziel dieses Studiendesigns war die Ermittlung eines physiologischen Grundwertes für N-Acetyltaurin, da diese Substanz im menschlichen Körper endogen gebildet wird. Es konnte belegt werden, dass N-Acetyltaurin den Ansprüchen eines Biomarkers zum Nachweis eines Alkoholkonsums nicht gerecht werden kann, da die individuellen Schwankungen zu stark sind und keine nachvollziehbare Pharmakokinetik aufgezeigt werden konnte. Im Gegensatz hierzu konnte für die bereits etablierten Biomarker Ethylglucuronid und Ethylsulfat erneut bestätigt werden, dass diese in der Matrix Urin eine entsprechend gute Möglichkeit bieten, in Abhängigkeit von der aufgenommenen Dosis, einen vorangegangenen Alkoholkonsum verlässlich nachzuweisen. Der Biomarker 16:0/18:1 Phosphatidylethanol, welcher nur in Vollblut nachgewiesen werden kann, deckt ein noch größeres Nachweisfenster ab und kann auch ein einmaliges, länger zurückliegendes Trinkgeschehen belegen. Dieser Biomarker ist bisher in der forensisch-toxikologischen Analytik in Deutschland zum Nachweis einer Alkoholabstinenz nicht etabliert. Mittels der im Rahmen dieser Arbeit validierten Methode ist es nun möglich, den Biomarker 16:0/18:1 Phosphatidylethanol im Rahmen des Abstinenzprogrammes am IRVM analytisch zu bestimmen und in die Beurteilung mit einfließen zu lassen.

In einem weiteren Projekt wurde die neu entwickelte Methode zum Nachweis der drei anwendbaren Biomarker im Entzugskontext verwendet. Das Kollektiv bestand aus Blutproben, die zu Beginn und Ende eines Entzugsaufenthaltes im Krankenhaus Salem abgenommen und auf ihre Biomarkerkonzentrationen untersucht wurden. Dabei konnte gezeigt werden, dass Ethylglucuronid und Ethylsulfat innerhalb der Klinikaufenthalte unabhängig von dem Parameter der Lebersteifigkeit im Blut komplett abgebaut wurden. Da Phosphatidylethanol in den Erythrozytenmembranen akkumuliert und nur sehr langsam abgebaut wird, war dieser Biomarker auch zum Ende des Entzugs bei nahezu allen Patienten nachweisbar. Im Falle dieses Alkoholbiomarkers konnte durch einen Kruskal-Wallis-Test gezeigt werden, dass es keinen Zusammenhang zwischen dem Abbau und der Lebersteifigkeit gab.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die in dieser Arbeit entwickelte analytische Multimethode vielfältige Möglichkeiten bietet, um ein sehr breites Spektrum von Fragestellungen im Bereich der Forensischen Toxikologie beantworten zu können.

6 Literaturverzeichnis

- Aboutara, N., Jungen, H., Szewczyk, A., Sterneck, M., Müller, A. und Iwersen-Bergmann, S. (2021). **Analysis of six different homologues of phosphatidylethanol from dried blood spots using liquid chromatography-tandem mass spectrometry.** *Drug Test Anal* 13, 140-147, doi: 10.1002/dta.2910.
- Albermann, M. E., Musshoff, F., Doberentz, E., Heese, P., Banger, M. und 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* 126, 757-764, doi: 10.1007/s00414-012-0725-3.
- Alling, C., Gustavsson, L. und Anggard, E. (1983). **An abnormal phospholipid in rat organs after ethanol treatment.** *FEBS Lett* 152, 24-28, doi: 10.1016/0014-5793(83)80474-8.
- Andresen-Streichert, H., Beres, Y., Weinmann, W., Schrock, A., Müller, A., Skopp, G., Pischke, S., Vettorazzi, E., Lohse, A., Nashan, B. und Sterneck, M. (2017). **Improved detection of alcohol consumption using the novel marker phosphatidylethanol in the transplant setting: results of a prospective study.** *Transpl Int* 30, 611-620, doi: 10.1111/tri.12949.
- Andresen-Streichert, H., Müller, A., Glahn, A., Skopp, G. und Sterneck, M. (2018). **Alcohol Biomarkers in Clinical and Forensic Contexts.** *Dtsch Arztebl Int* 115, 309-315, doi: 10.3238/arztebl.2018.0309.
- Andresen-Streichert, H., von Rothkirch, G., Vettorazzi, E., Müller, A., Lohse, A. W., Frederking, D., Seegers, B., Nashan, B. und Sterneck, M. (2015). **Determination of Ethyl Glucuronide in Hair for Detection of Alcohol Consumption in Patients After Liver Transplantation.** *Ther Drug Monit* 37, 539-545, doi: 10.1097/FTD.000000000000160.
- Annesley, T. M. (2003). **Ion suppression in mass spectrometry.** *Clin Chem* 49, 1041-1044, doi: 10.1373/49.7.1041.
- Aradottir, S., Moller, K. und Alling, C. (2004a). **Phosphatidylethanol formation and degradation in human and rat blood.** *Alcohol Alcohol* 39, 8-13, doi: 10.1093/alcalc/agh003.
- Aradottir, S., Seidl, S., Wurst, F. M., Jonsson, B. A. und Alling, C. (2004b). **Phosphatidylethanol in human organs and blood: a study on autopsy material and influences by storage conditions.** *Alcohol Clin Exp Res* 28, 1718-1723, doi: 10.1097/01.alc.0000145687.41646.e5.

- Armer, J. M., Gunawardana, L. und Allcock, R. L. (2017). **The Performance of Alcohol Markers Including Ethyl Glucuronide and Ethyl Sulphate to Detect Alcohol Use in Clients in a Community Alcohol Treatment Programme.** *Alcohol Alcohol* 52, 29-34, doi: 10.1093/alcalc/agw072.
- Atzendorf, J., Rauschert, C., Seitz, N. N., Lochbuhler, K. und Kraus, L. (2019). **The Use of Alcohol, Tobacco, Illegal Drugs and Medicines.** *Dtsch Arztebl Int* 116, 577-584, doi: 10.3238/arztebl.2019.0577.
- Bakdash, A., Burger, P., Goecke, T. W., Fasching, P. A., Reulbach, U., Bleich, S., Hastedt, M., Rothe, M., Beckmann, M. W., Pragst, F. und Kornhuber, J. (2010). **Quantification of fatty acid ethyl esters (FAEE) and ethyl glucuronide (EtG) in meconium from newborns for detection of alcohol abuse in a maternal health evaluation study.** *Anal Bioanal Chem* 396, 2469-2477, doi: 10.1007/s00216-010-3474-5.
- Bakhireva, L. N., Shrestha, S., Gutierrez, H. L., Berry, M., Schmitt, C. und Sarangarm, D. (2016). **Stability of Phosphatidylethanol in Dry Blood Spot Cards.** *Alcohol Alcohol* 51, 275-280, doi: 10.1093/alcalc/agv120.
- Baranowski, S., Serr, A., Thierauf, A., Weinmann, W., Grosse Perdekamp, M., Wurst, F. M. und Halter, C. C. (2008). **In vitro study of bacterial degradation of ethyl glucuronide and ethyl sulphate.** *Int J Legal Med* 122, 389-393, doi: 10.1007/s00414-008-0229-3.
- Bartsch, G. und Merfert-Diete, C. (2013). **Alkoholabhängigkeit und riskanter Alkoholkonsum.** In: *Fehlzeiten-Report 2013: Verdammt zum Erfolg – die süchtige Arbeitsgesellschaft?*, Hrsg. Badura, B., Ducki, A., Schröder, H., et al., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, S. 67-73.
- Bendroth, P., Kronstrand, R., Helander, A., Greby, J., Stephanson, N. und Krantz, P. (2008). **Comparison of ethyl glucuronide in hair with phosphatidylethanol in whole blood as post-mortem markers of alcohol abuse.** *Forensic Sci Int* 176, 76-81, doi: 10.1016/j.forsciint.2007.09.012.
- Birdsall, T. C. (1998). **Therapeutic applications of taurine.** *Altern Med Rev* 3, 128-136.
- Borucki, K., Schreiner, R., Dierkes, J., Jachau, K., Krause, D., Westphal, S., Wurst, F. M., Luley, C. und Schmidt-Gayk, H. (2005). **Detection of recent ethanol intake with new markers: comparison of fatty acid ethyl esters in serum and of ethyl glucuronide and the ratio of 5-hydroxytryptophol to 5-hydroxyindole acetic acid in urine.** *Alcohol Clin Exp Res* 29, 781-787, doi: 10.1097/01.alc.0000164372.67018.ea.

- Butzbach, D. M. (2010). **The influence of putrefaction and sample storage on post-mortem toxicology results.** *Forensic Sci Med Pathol* 6, 35-45, doi: 10.1007/s12024-009-9130-8.
- Cabezas, J., Lucey, M. R. und Bataller, R. (2016). **Biomarkers for monitoring alcohol use.** *Clin Liver Dis (Hoboken)* 8, 59-63, doi: 10.1002/cld.571.
- Capiau, S., Wilk, L. S., De Kesel, P. M. M., Aalders, M. C. G. und Stove, C. P. (2018). **Correction for the Hematocrit Bias in Dried Blood Spot Analysis Using a Nondestructive, Single-Wavelength Reflectance-Based Hematocrit Prediction Method.** *Anal Chem* 90, 1795-1804, doi: 10.1021/acs.analchem.7b03784.
- Carlini, E. J., Raftogianis, R. B., Wood, T. C., Jin, F., Zheng, W., Rebbeck, T. R. und Weinshilboum, R. M. (2001). **Sulfation pharmacogenetics: SULT1A1 and SULT1A2 allele frequencies in Caucasian, Chinese and African-American subjects.** *Pharmacogenetics* 11, 57-68, doi: 10.1097/00008571-200102000-00007.
- Catala, A., Culp-Hill, R., Nemkov, T. und D'Alessandro, A. (2018). **Quantitative metabolomics comparison of traditional blood draws and TAP capillary blood collection.** *Metabolomics* 14, 100, doi: 10.1007/s11306-018-1395-z.
- Cederbaum, A. I. (2012). **Alcohol metabolism.** *Clin Liver Dis* 16, 667-685, doi: 10.1016/j.cld.2012.08.002.
- Colley, W. C., Sung, T.-C., Roll, R., Jenco, J., Hammond, S. M., Altshuler, Y., Bar-Sagi, D., Morris, A. J. und Frohman, M. A. (1997). **Phospholipase D2, a distinct phospholipase D isoform with novel regulatory properties that provokes cytoskeletal reorganization.** *Current Biology* 7, 191-201, doi: 10.1016/s0960-9822(97)70090-3.
- Concheiro, M., Cruz, A., Mon, M., de Castro, A., Quintela, O., Lorenzo, A. und Lopez-Rivadulla, M. (2009). **Ethylglucuronide determination in urine and hair from alcohol withdrawal patients.** *J Anal Toxicol* 33, 155-161, doi: 10.1093/jat/33.3.155.
- Costantino, A., Digregorio, E. J., Korn, W., Spayd, S. und Rieders, F. (2006). **The effect of the use of mouthwash on ethylglucuronide concentrations in urine.** *J Anal Toxicol* 30, 659-662, doi: 10.1093/jat/30.9.659.
- Czech, E. und Hartleb, M. (2002). **Non-oxidative metabolism of ethanol and its influence on the metabolic pathway of serotonin and transferrin.** *Z Zagadnien Nauk Sadowych* 52, 37-51.

- Dahl, H., Hammarberg, A., Franck, J. und Helander, A. (2011a). **Urinary ethyl glucuronide and ethyl sulfate testing for recent drinking in alcohol-dependent outpatients treated with acamprosate or placebo.** *Alcohol Alcohol* 46, 553-557, doi: 10.1093/alcalc/agr055.
- Dahl, H., Stephanson, N., Beck, O. und Helander, A. (2002). **Comparison of Urinary Excretion Characteristics of Ethanol and Ethyl Glucuronide.** *Journal of Analytical Toxicology* 26, 201-204, doi: 10.1093/jat/26.4.201.
- Dahl, H., Voltaire Carlsson, A., Hillgren, K. und Helander, A. (2011b). **Urinary ethyl glucuronide and ethyl sulfate testing for detection of recent drinking in an outpatient treatment program for alcohol and drug dependence.** *Alcohol Alcohol* 46, 278-282, doi: 10.1093/alcalc/agr009.
- Dekant, W. und Vamvakas, S. (2017). **Alkohole.** In: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, Hrsg. Aktories, K., Förstermann, U., Hofmann, F., et al., Elsevier, München, S. 991-998.
- Detting, A., Haffner, H.-T., Schmitt, G., Schuff, A. und Skopp, G. (2012). **Forensische Toxikologie.** In: Begutachtung im Verkehrsrecht, Hrsg. Haffner, H.-T., Skopp, G. und Graw, M., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Deutsches Institut für Normung e.V. (2008). **DIN 32645:2008-11: Chemische Analytik - Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze unter Wiederholbedingungen - Begriffe, Verfahren, Auswertung** (Deutsches Institut für Normung e.V., Berlin, Deutschland).
- Dresen, S., Weinmann, W. und Wurst, F. M. (2004). **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* 15, 1644-1648, doi: 10.1016/j.jasms.2004.08.004.
- Droenner, P., Schmitt, G., Aderjan, R. und Zimmer, H. (2002). **A kinetic model describing the pharmacokinetics of ethyl glucuronide in humans.** *Forensic Science International* 126, 24-29, doi: 10.1016/s0379-0738(02)00025-7.
- Dumitrascu, C., van de Lavoie, M. C. A., Neels, H., Covaci, A., Jacobs, W., D'Hondt, D. und van Nuijs, A. L. N. (2021). **Stability of phosphatidylethanol 16:0/18:1 in authentic and spiked whole blood.** *Drug Test Anal* 13, 1219-1222, doi: 10.1002/dta.2995.

- Effertz, T. (2020). **Die volkswirtschaftlichen Kosten von Alkohol- und Tabakkonsum in Deutschland.** In: DHS Jahrbuch Sucht 2020, Hrsg. Deutsche Hauptstelle für Suchtfragen e.V., Pabst Science Publishers, Lengerich.
- Egg, R. (2014). **Delikte unter Alkoholeinfluss.** In: Jahrbuch Sucht 2014, Hrsg. Deutsche Hauptstelle für Suchtfragen e.V., Pabst Science Publishers, Lengerich, S. 154-168.
- Erim, Y., Bottcher, M., Dahmen, U., Beck, O., Broelsch, C. E. und Helander, A. (2007). **Urinary ethyl glucuronide testing detects alcohol consumption in alcoholic liver disease patients awaiting liver transplantation.** *Liver Transpl* 13, 757-761, doi: 10.1002/lt.21163.
- Europäisches Parlament und europäischer Rat (2018). **Verordnung (EU) Nr. 1169/2011.**
- Faller, A., Richter, B., Kluge, M., Koenig, P., Seitz, H. K., Thierauf, A., Gnann, H., Winkler, M., Mattern, R. und Skopp, G. (2011). **LC-MS/MS analysis of phosphatidylethanol in dried blood spots versus conventional blood specimens.** *Anal Bioanal Chem* 401, 1163-1166, doi: 10.1007/s00216-011-5221-y.
- Foti, R. S. und Fisher, M. B. (2005). **Assessment of UDP-glucuronosyltransferase catalyzed formation of ethyl glucuronide in human liver microsomes and recombinant UGTs.** *Forensic Sci Int* 153, 109-116, doi: 10.1016/j.forsciint.2004.12.003.
- Gilg, T. (2005). **Rechtsmedizinische Aspekte von Alkohol und Alkoholismus.** In: Alkohol und Alkoholfolgekrankheiten, Hrsg. Singer, M. V. und Teyssen, S., Springer-Verlag, Heidelberg, S. 551-576.
- Gnann, H., Engelmann, C., Skopp, G., Winkler, M., Auwarter, V., Dresen, S., Ferreiros, N., Wurst, F. M. und Weinmann, W. (2010). **Identification of 48 homologues of phosphatidylethanol in blood by LC-ESI-MS/MS.** *Anal Bioanal Chem* 396, 2415-2423, doi: 10.1007/s00216-010-3458-5.
- Gnann, H., Weinmann, W., Engelmann, C., Wurst, F. M., Skopp, G., Winkler, M., Thierauf, A., Auwarter, V., Dresen, S. und Ferreiros Bouzas, N. (2009). **Selective detection of phosphatidylethanol homologues in blood as biomarkers for alcohol consumption by LC-ESI-MS/MS.** *J Mass Spectrom* 44, 1293-1299, doi: 10.1002/jms.1608.
- Goll, M., Schmitt, G., Ganssmann, B. und Aderjan, R. E. (2002). **Excretion profiles of ethyl glucuronide in human urine after internal dilution.** *J Anal Toxicol* 26, 262-266, doi: 10.1093/jat/26.5.262.

- Gross, J. H. (2013). **Massenspektrometrie**, 1. Aufl., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Gustavsson, L. (1995). **ESBRA 1994 Award Lecture. Phosphatidylethanol formation: specific effects of ethanol mediated via phospholipase D**. *Alcohol Alcohol* 30, 391-406.
- Gustavsson, L. und Alling, C. (1987). **Formation of phosphatidylethanol in rat brain by phospholipase D**. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 142, 958-963, doi: 10.1016/0006-291x(87)91507-5.
- Gustavsson, L., Moehren, G. und Hoek, J. B. (1991). **Phosphatidylethanol formation in rat hepatocytes**. *Ann N Y Acad Sci* 625, 438-440, doi: 10.1111/j.1749-6632.1991.tb33873.x.
- Halter, C. C., Dresen, S., Auwaerter, V., Wurst, F. M. und Weinmann, W. (2008). **Kinetics in serum and urinary excretion of ethyl sulfate and ethyl glucuronide after medium dose ethanol intake**. *Int J Legal Med* 122, 123-128, doi: 10.1007/s00414-007-0180-8.
- Hansson, P., Caron, M., Johnson, G., Gustavsson, L. und Alling, C. (1997). **Blood phosphatidylethanol as a marker of alcohol abuse: levels in alcoholic males during withdrawal**. *Alcohol Clin Exp Res* 21, 108-110.
- Hansson, P., Varga, A., Krantz, P. und Alling, C. (2001). **Phosphatidylethanol in post-mortem blood as a marker of previous heavy drinking**. *Int J Legal Med* 115, 158-161, doi: 10.1007/s004140100206.
- Hegstad, S., Kristoffersen, L., Liane, V. H. und Spigset, O. (2017). **EtG and EtS in Autopsy Blood Samples With and Without Putrefaction Using UPLC-MS-MS**. *J Anal Toxicol* 41, 107-113, doi: 10.1093/jat/bkw123.
- Heier, C., Xie, H. und Zimmermann, R. (2016). **Nonoxidative ethanol metabolism in humans-from biomarkers to bioactive lipids**. *IUBMB Life* 68, 916-923, doi: 10.1002/iub.1569.
- Helander, A. und Beck, O. (2004). **Mass spectrometric identification of ethyl sulfate as an ethanol metabolite in humans**. *Clin Chem* 50, 936-937, doi: 10.1373/clinchem.2004.031252.
- Helander, A. und Beck, O. (2005). **Ethyl sulfate: a metabolite of ethanol in humans and a potential biomarker of acute alcohol intake**. *J Anal Toxicol* 29, 270-274, doi: 10.1093/jat/29.5.270.

- Helander, A. und Dahl, H. (2005). **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* 51, 1728-1730, doi: 10.1373/clinchem.2005.051565.
- Helander, A. und Hansson, T. (2013). **National harmonization of the alcohol biomarker PEth.** *Lakartidningen* 110, 1747-1748.
- Helander, A., Olsson, I. und Dahl, H. (2007). **Postcollection synthesis of ethyl glucuronide by bacteria in urine may cause false identification of alcohol consumption.** *Clin Chem* 53, 1855-1857, doi: 10.1373/clinchem.2007.089482.
- Helander, A. und Zheng, Y. (2009). **Molecular species of the alcohol biomarker phosphatidylethanol in human blood measured by LC-MS.** *Clin Chem* 55, 1395-1405, doi: 10.1373/clinchem.2008.120923.
- Herzog, J., Skopp, G. und Musshoff, F. (2019). **Phosphatidylethanol als Biomarker in der Fahreignungsdiagnostik - Vorstellung eines neuen Alkoholbiomarkers.** *Zeitschrift für Verkehrssicherheit* 66, 5.
- Hess, C., Sydow, K., Kueting, T., Kraemer, M. und Maas, A. (2018). **Considerations regarding the validation of chromatographic mass spectrometric methods for the quantification of endogenous substances in forensics.** *Forensic Sci Int* 283, 150-155, doi: 10.1016/j.forsciint.2017.12.019.
- Hoiseth, G., Bernard, J. P., Karinen, R., Johnsen, L., Helander, A., Christophersen, A. S. und Morland, J. (2007a). **A pharmacokinetic study of ethyl glucuronide in blood and urine: applications to forensic toxicology.** *Forensic Sci Int* 172, 119-124, doi: 10.1016/j.forsciint.2007.01.005.
- Hoiseth, G., Karinen, R., Christophersen, A. und Morland, J. (2010a). **Practical use of ethyl glucuronide and ethyl sulfate in postmortem cases as markers of antemortem alcohol ingestion.** *Int J Legal Med* 124, 143-148, doi: 10.1007/s00414-009-0393-0.
- Hoiseth, G., Karinen, R., Christophersen, A. S., Olsen, L., Normann, P. T. und Morland, J. (2007b). **A study of ethyl glucuronide in post-mortem blood as a marker of ante-mortem ingestion of alcohol.** *Forensic Sci Int* 165, 41-45, doi: 10.1016/j.forsciint.2006.02.045.
- Hoiseth, G., Morini, L., Polettoni, A., Christophersen, A. und Morland, J. (2009a). **Blood kinetics of ethyl glucuronide and ethyl sulphate in heavy drinkers during alcohol detoxification.** *Forensic Sci Int* 188, 52-56, doi: 10.1016/j.forsciint.2009.03.017.

- Hoiseth, G., Morini, L., Poletini, A., Christophersen, A. S., Johnsen, L., Karinen, R. und Morland, J. (2009b). **Serum/whole blood concentration ratio for ethylglucuronide and ethyl sulfate.** *J Anal Toxicol* 33, 208-211, doi: 10.1093/jat/33.4.208.
- Hoiseth, G., Yttredal, B., Karinen, R., Gjerde, H. und Christophersen, A. (2010b). **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* 34, 84-88, doi: 10.1093/jat/34.2.84.
- Hoiseth, G., Yttredal, B., Karinen, R., Gjerde, H., Morland, J. und Christophersen, A. (2010c). **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* 34, 319-324, doi: 10.1093/jat/34.6.319.
- Holbrook, P. G., Pannell, L. K., Murata, Y. und Daly, J. W. (1992). **Molecular species analysis of a product of phospholipase D activation. Phosphatidylethanol is formed from phosphatidylcholine in phorbol ester- and bradykinin-stimulated PC12 cells.** *J Biol Chem* 267, 16834-16840.
- Huckenbeck, W. und Bonte, W. (2003). **Ethanol.** In: Handbuch gerichtliche Medizin 2, Hrsg. Madea, B. und Brinkmann, B., Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, S. 379-519.
- Huxtable, R. J., Franconi, F. und Giotti, A. (1987). **The biology of taurine: methods and mechanisms,** Bd. 217, Springer Science & Business Media.
- Isaksson, A., Walther, L., Hansson, T., Andersson, A. und Alling, C. (2011). **Phosphatidylethanol in blood (B-PEth): a marker for alcohol use and abuse.** *Drug Test Anal* 3, 195-200, doi: 10.1002/dta.278.
- Jatlow, P. I., Agro, A., Wu, R., Nadim, H., Toll, B. A., Ralevski, E., Nogueira, C., Shi, J., Dziura, J. D., Petrakis, I. L. und O'Malley, S. S. (2014). **Ethyl glucuronide and ethyl sulfate assays in clinical trials, interpretation, and limitations: results of a dose ranging alcohol challenge study and 2 clinical trials.** *Alcohol Clin Exp Res* 38, 2056-2065, doi: 10.1111/acer.12407.
- Javors, M. A., Hill-Kapturczak, N., Roache, J. D., Karns-Wright, T. E. und Dougherty, D. M. (2016). **Characterization of the Pharmacokinetics of Phosphatidylethanol 16:0/18:1 and 16:0/18:2 in Human Whole Blood After Alcohol Consumption in a Clinical Laboratory Study.** *Alcohol Clin Exp Res* 40, 1228-1234, doi: 10.1111/acer.13062.
- John, U. und Hanke, M. (2002). **Alcohol-attributable mortality in a high per capita consumption country - Germany.** *Alcohol Alcohol* 37, 581-585, doi: 10.1093/alcalc/37.6.581.

- John, U., Hanke, M., Freyer-Adam, J., Baumann, S. und Meyer, C. (2020). **Alkohol**. In: DHS Jahrbuch Sucht 2020, Hrsg. Deutsche Hauptstelle für Suchtfragen e.V., Pabst Science Publishers, Lengerich, S. 33-48.
- John, U., Meyer, C., Baumann, S., Rumpf, H.-J. und Freyer-Adam, J. (2019). **Alkoholkonsum - Bedeutung für Prävention und Gesundheitsförderung**. In: Prävention und Gesundheitsförderung, Hrsg. Tiemann, M. und Mohokum, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, S. 1-17.
- Jokiel, M. und Skopp, G. (2015). **N-Acetyltaurine-preliminary work to prove its potential as a marker of alcohol consumption**. *Toxichem Krimtech*, 5.
- Junghanns, K., Graf, I., Pfluger, J., Wetterling, G., Ziems, C., Ehrenthal, D., Zollner, M., Dibbelt, L., Backhaus, J., Weinmann, W. und Wurst, F. M. (2009). **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* 104, 921-926, doi: 10.1111/j.1360-0443.2009.02566.x.
- Kardon, T., Coffey, M. J., Bánhegyi, G., Conley, A. A., Burchell, B., Mandl, J. und Braun, L. (2000). **Transcriptional induction of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase by ethanol in rat liver**. *Alcohol* 21, 251-257, doi: 10.1016/s0741-8329(00)00095-1.
- Kechagias, S., Dernroth, D. N., Blomgren, A., Hansson, T., Isaksson, A., Walther, L., Kronstrand, R., Kagedal, B. und Nystrom, F. H. (2015). **Phosphatidylethanol Compared with Other Blood Tests as a Biomarker of Moderate Alcohol Consumption in Healthy Volunteers: A Prospective Randomized Study**. *Alcohol Alcohol* 50, 399-406, doi: 10.1093/alcalc/agn038.
- Kobayashi, M. und Kanfer, J. N. (1987). **Phosphatidylethanol formation via transphosphatidylolation by rat brain synaptosomal phospholipase D**. *J Neurochem* 48, 1597-1603, doi: 10.1111/j.1471-4159.1987.tb05707.x.
- Krabseth, H., Morland, J. und Hoiseith, G. (2014). **Assistance of ethyl glucuronide and ethyl sulfate in the interpretation of postmortem ethanol findings**. *Int J Legal Med* 128, 765-770, doi: 10.1007/s00414-014-1031-z.
- Kraus, L., Pabst, A., Piontek, D. und Müller, S. (2009). **Kurzbericht Epidemiologischer Suchtsurvey 2009. Tabellenband: Prävalenz von Alkoholkonsum, episodischem Rauschtrinken und problematischem Alkoholkonsum nach Geschlecht und Alter im Jahr 2009**. URL: https://www.esa-survey.de/fileadmin/user_upload/Literatur/Berichte/ESA_2009_Alkohol-Kurzbericht_Praevalenz.pdf [Stand:02.10.2020].

- Kugelberg, F. C. und Jones, A. W. (2007). **Interpreting results of ethanol analysis in postmortem specimens: a review of the literature.** *Forensic Sci Int* 165, 10-29, doi: 10.1016/j.forsciint.2006.05.004.
- Kumar, M. und Sarin, S. (2009). **Biomarkers of diseases in medicine.** *Curr Trends Sci* 70, 403-417.
- Kummer, N., Ingels, A. S., Wille, S. M., Hanak, C., Verbanck, P., Lambert, W. E., Samyn, N. und Stove, C. P. (2016). **Quantification of phosphatidylethanol 16:0/18:1, 18:1/18:1, and 16:0/16:0 in venous blood and venous and capillary dried blood spots from patients in alcohol withdrawal and control volunteers.** *Anal Bioanal Chem* 408, 825-838, doi: 10.1007/s00216-015-9169-1.
- Lakso, H. A., Wuolikainen, A., Sundkvist, A., Johansson, I. und Marklund, S. L. (2019). **Long-term stability of the alcohol consumption biomarker phosphatidylethanol in erythrocytes at -80 degrees C.** *Clin Mass Spectrom* 11, 37-41, doi: 10.1016/j.clinms.2018.12.002.
- Liu, Y., Zhang, X., Li, J., Huang, Z., Lin, Z., Wang, J., Zhang, C. und Rao, Y. (2018). **Stability of Ethyl Glucuronide, Ethyl Sulfate, Phosphatidylethanols and Fatty Acid Ethyl Esters in Postmortem Human Blood.** *Journal of Analytical Toxicology* 42, 346-352, doi: 10.1093/jat/bky010.
- Lobo, I. A. und Harris, R. A. (2008). **GABA(A) receptors and alcohol.** *Pharmacol Biochem Behav* 90, 90-94, doi: 10.1016/j.pbb.2008.03.006.
- Lopez-Cruzan, M., Roache, J. D., Hill-Kapturczak, N., Karns-Wright, T. E., Dougherty, D. M., Sanchez, J. J., Koek, W. und Javors, M. A. (2018). **Pharmacokinetics of Phosphatidylethanol 16:0/20:4 in Human Blood After Alcohol Intake.** *Alcohol Clin Exp Res* 42, 2094-2099, doi: 10.1111/acer.13865.
- Luginbühl, M., Gaugler, S. und Weinmann, W. (2019). **Fully Automated Determination of Phosphatidylethanol 16:0/18:1 and 16:0/18:2 in Dried Blood Spots.** *J Anal Toxicol* 43, 489-496, doi: 10.1093/jat/bkz035.
- Luginbühl, M., König, S., Schurch, S. und Weinmann, W. (2017). **Evaluation of N-acetyltaurine as an ethanol marker in human blood.** *Alcohol* 65, 11-18, doi: 10.1016/j.alcohol.2017.05.007.
- Luginbühl, M., Rutjens, S., König, S., Furrer, J. und Weinmann, W. (2016). **N-Acetyltaurine as a novel urinary ethanol marker in a drinking study.** *Anal Bioanal Chem* 408, 7529-7536, doi: 10.1007/s00216-016-9855-7.

- Luginbühl, M., Stoth, F., Weinmann, W. und Gaugler, S. (2021). **Fully automated correction for the hematocrit bias of non-volumetric dried blood spot phosphatidylethanol analysis.** *Alcohol* 94, 17-23, doi: 10.1016/j.alcohol.2021.04.002.
- Lundqvist, C., Alling, C., Aradottir, S. und Gustavsson, L. (1994). **Agonist-stimulated and basal phosphatidylethanol formation in neutrophils from alcoholics.** *Alcohol Clin Exp Res* 18, 580-586, doi: 10.1111/j.1530-0277.1994.tb00913.x.
- Maenhout, T. M., De Buyzere, M. L. und Delanghe, J. R. (2013). **Non-oxidative ethanol metabolites as a measure of alcohol intake.** *Clin Chim Acta* 415, 322-329, doi: 10.1016/j.cca.2012.11.014.
- Magai, R. M. und Shukla, S. D. (2001). **Metabolic fate of [14C]-ethanol into endothelial cell phospholipids including platelet-activating factor, sphingomyelin and phosphatidylethanol.** *J Biomed Sci* 8, 143-150, doi: 10.1007/BF02255983.
- Marques, P., Hansson, T., Isaksson, A., Walther, L., Jones, J., Lewis, D. und Jones, M. (2011). **Detection of phosphatidylethanol (PEth) in the blood of drivers in an alcohol ignition interlock program.** *Traffic Inj Prev* 12, 136-141, doi: 10.1080/15389588.2010.544048.
- Miyazaki, T., Ishikura, K., Honda, A., Ra, S. G., Komine, S., Miyamoto, Y., Ohmori, H. und Matsuzaki, Y. (2015). **Increased N-acetyltaurine in serum and urine after endurance exercise in human.** *Adv Exp Med Biol* 803, 53-62, doi: 10.1007/978-3-319-15126-7_5.
- Morini, L., Marchei, E., Vagnarelli, F., Garcia Algar, O., Groppi, A., Mastrobattista, L. und Pichini, S. (2010). **Ethyl glucuronide and ethyl sulfate in meconium and hair-potential biomarkers of intrauterine exposure to ethanol.** *Forensic Sci Int* 196, 74-77, doi: 10.1016/j.forsciint.2009.12.035.
- Morrill, G., Ma, G. und Kostellow, A. (2000). **Molecular species analysis of 1,2-diacylglycerol released in response to progesterone binding to the amphibian oocyte plasma membrane.** *Cellular Signalling* 12, 787-796, doi: 10.1016/s0898-6568(00)00132-7.
- Mueller, G. C., Fleming, M. F., LeMahieu, M. A., Lybrand, G. S. und Barry, K. J. (1988). **Synthesis of phosphatidylethanol - a potential marker for adult males at risk for alcoholism.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 9778-9782, doi: 10.1073/pnas.85.24.9778.
- Mueller, S. und Sandrin, L. (2010). **Liver stiffness: a novel parameter for the diagnosis of liver disease.** *Hepat Med* 2, 49-67, doi: 10.2147/hmer.s7394.

- Musshoff, F., Albermann, E. und 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, doi: 10.1007/s00414-010-0511-z.
- Nalesso, A., Viel, G., Cecchetto, G., Mioni, D., Pessa, G., Favretto, D. und Ferrara, S. D. (2011). **Quantitative profiling of phosphatidylethanol molecular species in human blood by liquid chromatography high resolution mass spectrometry.** *J Chromatogr A* 1218, 8423-8431, doi: 10.1016/j.chroma.2011.09.068.
- O'Neal, C. L. und Poklis, A. (1996). **Postmortem production of ethanol and factors that influence interpretation: a critical review.** *Am J Forensic Med Pathol* 17, 8-20, doi: 10.1097/00000433-199603000-00002.
- Pabst, A., Piontek, D., Kraus, L. und Müller, S. (2010). **Substanzkonsum und substanzbezogene Störungen.** *Sucht* 56, 327-336, doi: 10.1024/0939-5911/a000044.
- Palmer, R. B. (2009). **A review of the use of ethyl glucuronide as a marker for ethanol consumption in forensic and clinical medicine.** *Semin Diagn Pathol* 26, 18-27, doi: 10.1053/j.semmp.2008.12.005.
- Peters, F. T., Hartung, M., Herbold, M., Schmitt, G., Daldrup, T. und Mußhoff, F. (2009). **Anhang B zur Richtlinie der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensich-toxikologischen Untersuchungen - Anforderungen an die Validierung von Analysemethoden.** *Toxichem Krimtech* 76, 23.
- Phenomenex, I. (2018). **Luna Omega SUGAR LC Column.** URL: <https://phenomenex.blob.core.windows.net/documents/c5307b71-fdb1-48b6-900a-636b2d6f7756.pdf> [Stand:19.01.2021].
- Pichini, S., Morini, L., Marchei, E., Palmi, I., Rotolo, M. C., Vagnarelli, F., Garcia-Algar, O., Vall, O. und Zuccaro, P. (2009). **Ethylglucuronide and ethylsulfate in meconium to assess gestational ethanol exposure: preliminary results in two Mediterranean cohorts.** *Can J Clin Pharmacol* 16, e370-375.
- Pragst, F. und Yegles, M. (2006). **Alcohol markers in hair.** In: Analytical and practical aspects of drug testing in hair, Hrsg. Kintz, P., CRC Press, Boca Raton, S. 287-323.
- Reimann, A. (2018) **Entwicklung einer forensisch-analytischen Methode zur Bestimmung Ethylglucuronid im Haar.** Bachelor Thesis.

- Reisfield, G. M., Goldberger, B. A., Crews, B. O., Pesce, A. J., Wilson, G. R., Teitelbaum, S. A. und Bertholf, R. L. (2011a). **Ethyl glucuronide, ethyl sulfate, and ethanol in urine after sustained exposure to an ethanol-based hand sanitizer.** *J Anal Toxicol* 35, 85-91, doi: 10.1093/anatox/35.2.85.
- Reisfield, G. M., Goldberger, B. A., Pesce, A. J., Crews, B. O., Wilson, G. R., Teitelbaum, S. A. und Bertholf, R. L. (2011b). **Ethyl glucuronide, ethyl sulfate, and ethanol in urine after intensive exposure to high ethanol content mouthwash.** *J Anal Toxicol* 35, 264-268, doi: 10.1093/anatox/35.5.264.
- Ripps, H. und Shen, W. (2012). **Review: taurine: a "very essential" amino acid.** *Mol Vis* 18, 2673-2686.
- Santunione, A. L., Verri, P., Marchesi, F., Rustichelli, C., Palazzoli, F., Vandelli, D., Licata, M. und Silingardi, E. (2018). **The role of ethyl glucuronide in supporting medico-legal investigations: Analysis of this biomarker in different postmortem specimens from 21 selected autopsy cases.** *J Forensic Leg Med* 53, 25-30, doi: 10.1016/j.jflm.2017.10.009.
- Saunders, J. B., Aasland, O. G., Babor, T. F., de la Fuente, J. R. und Grant, M. (1993). **Development of the Alcohol Use Disorders Identification Test (AUDIT): WHO Collaborative Project on Early Detection of Persons with Harmful Alcohol Consumption - II.** *Addiction* 88, 791-804, doi: 10.1111/j.1360-0443.1993.tb02093.x.
- Schelhase, T. (2019). **Statistische Krankenhausdaten: Diagnosedaten der Krankenhauspatienten 2017.** In: *Krankenhaus-Report 2019*, Hrsg. Jürgen Klauber, Max Geraedts, Jörg Friedrich, et al., Springer Open, S. 284.
- Schloegl, H., Dresen, S., Spaczynski, K., Stoertzel, M., Wurst, F. M. und Weinmann, W. (2006a). **Stability of ethyl glucuronide in urine, post-mortem tissue and blood samples.** *Int J Legal Med* 120, 83-88, doi: 10.1007/s00414-005-0012-7.
- Schloegl, H., Rost, T., Schmidt, W., Wurst, F. M. und Weinmann, W. (2006b). **Distribution of ethyl glucuronide in rib bone marrow, other tissues and body liquids as proof of alcohol consumption before death.** *Forensic Sci Int* 156, 213-218, doi: 10.1016/j.forsciint.2005.03.024.
- Schmitt, G., Aderjan, R., Keller, T. und Wu, M. (1995). **Ethyl glucuronide: an unusual ethanol metabolite in humans. Synthesis, analytical data, and determination in serum and urine.** *J Anal Toxicol* 19, 91-94, doi: 10.1093/jat/19.2.91.

- Schmitt, G., Droenner, P., Skopp, G. und Aderjan, R. (1997). **Ethyl glucuronide concentration in serum of human volunteers, teetotalers, and suspected drinking drivers.** *J Forensic Sci* 42, 1099-1102.
- Schneider, H. und Glatt, H. (2004). **Sulpho-conjugation of ethanol in humans in vivo and by individual sulphotransferase forms in vitro.** *Biochem J* 383, 543-549, doi: 10.1042/bj20040925.
- Schröck, A., Thierauf-Emberger, A., Schurch, S. und Weinmann, W. (2017). **Phosphatidylethanol (PEth) detected in blood for 3 to 12 days after single consumption of alcohol-a drinking study with 16 volunteers.** *Int J Legal Med* 131, 153-160, doi: 10.1007/s00414-016-1445-x.
- Schulz, K., Teske, J., Gilg, T., Aderjan, R. und Herbold, M. (2005). **Bestandsaufnahme der Begleitstoffanalyse und Ergebnisse erster Ringversuche.** *Toxichem Krimtech* 72, 5.
- Schwedt, G., Schmidt, T. C. und Schmitz, O. J. (2016). **Molekülspektrometrische Methoden.** In: *Analytische Chemie*, 3. Aufl., Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Seidel, A., Lampen, A. und Steinberg, P. (2019). **Ethanol/Ethylalkohol.** In: *Toxikologie*, Hrsg. Marquardt, H., Schäfer, S. G. und Barth, H., 4. Aufl., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, S. 595-599.
- Seitz, H. K. (2019). **Die alkoholische Lebererkrankung: Natürlicher Verlauf, Risikofaktoren und die Bedeutung des Alkoholstoffwechsels in der Pathogenese.** In: *Alkoholische Leber- und Krebserkrankungen*, Hrsg. Seitz, H. K. und Müller, S., De Gruyter, Berlin, S. 41-66.
- Seitz, H. K., Bühringer, G. und Mann, K. (2008). **Grenzwerte für den Konsum alkoholischer Getränke: Empfehlungen des wissenschaftlichen Kuratoriums der DHS.** In: *Jahrbuch Sucht 2008*, Hrsg. Deutsche Hauptstelle für Suchtfragen e.V., Neuland-Verlag, Geesthacht, S. 205-209.
- Seitz, H. K., Lesch, O. M., Spanagel, R., Beutel, M. und Redecker, T. (2013). **Alkoholabhängigkeit.** In: *Suchtmedizinische Reihe*, Hrsg. Deutsche Hauptstelle für Suchtfragen e.V.
- Shi, X., Yao, D. und Chen, C. (2012). **Identification of N-acetyltaurine as a novel metabolite of ethanol through metabolomics-guided biochemical analysis.** *J Biol Chem* 287, 6336-6349, doi: 10.1074/jbc.M111.312199.

- Shukla, S. D., Sun, G. Y., Gibson Wood, W., Savolainen, M. J., Alling, C. und Hoek, J. B. (2001). **Ethanol and lipid metabolic signaling**. *Alcohol Clin Exp Res* 25, 33S-39S, doi: 10.1097/00000374-200105051-00006.
- Singer, M. V. und Teyssen, S. (2005). **Alkohol und Alkoholfolgekrankheiten: Grundlagen-Diagnostik-Therapie**, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Statistisches Bundesamt (2019). **Verkehrsunfälle**. In Unfälle unter dem Einfluss von Alkohol oder anderen berauschenden Mitteln im Straßenverkehr 2018, Hrsg. Statistisches Bundesamt (Destatis).
- Staufner, K., Andresen, H., Vettorazzi, E., Tobias, N., Nashan, B. und Sternecker, M. (2011). **Urinary ethyl glucuronide as a novel screening tool in patients pre- and post-liver transplantation improves detection of alcohol consumption**. *Hepatology* 54, 1640-1649, doi: 10.1002/hep.24596.
- Steed, P. M., Clark, K. L., Boyar, W. C. und Lasala, D. J. (1998). **Characterization of human PLD2 and the analysis of PLD isoform splice variants**. *FASEB J* 12, 1309-1317, doi: 10.1096/fasebj.12.13.1309.
- Strimbu, K. und Tavel, J. A. (2010). **What are biomarkers?** *Curr Opin HIV AIDS* 5, 463-466, doi: 10.1097/COH.0b013e32833ed177.
- Thierauf-Emberger, A., Franz, A., Auwarter, V. und Huppertz, L. M. (2016). **Detection of the ethanol consumption markers ethyl glucuronide and ethyl sulfate in urine samples from inmates of two German prisons**. *Int J Legal Med* 130, 387-391, doi: 10.1007/s00414-015-1222-2.
- Thierauf, A., Gnann, H., Wohlfarth, A., Auwarter, V., Perdekamp, M. G., Buttler, K. J., Wurst, F. M. und Weinmann, W. (2010). **Urine tested positive for ethyl glucuronide and ethyl sulphate after the consumption of "non-alcoholic" beer**. *Forensic Sci Int* 202, 82-85, doi: 10.1016/j.forsciint.2010.04.031.
- Thompson, P. M., Hill-Kapturczak, N., Lopez-Cruzan, M., Alvarado, L. A., Dwivedi, A. K. und Javors, M. A. (2016). **Phosphatidylethanol in Postmortem Brain and Serum Ethanol at Time of Death**. *Alcohol Clin Exp Res* 40, 2557-2562, doi: 10.1111/acer.13254.
- Ullah, S., Helander, A. und Beck, O. (2017). **Identification and quantitation of phosphatidylethanol in oral fluid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry**. *Clin Chem Lab Med* 55, 1332-1339, doi: 10.1515/cclm-2016-0752.

- Van Nguyen, V. L. und Fitzpatrick, M. (2019). **Should phosphatidylethanol be currently analysed using whole blood, dried blood spots or both?** *Clin Chem Lab Med* 57, 617-622, doi: 10.1515/cclm-2018-0667.
- Van Uytfanghe, K., Ramirez Fernandez, M. D. M., De Vos, A., Wille, S. M. und Stove, C. P. (2021). **Quantitation of phosphatidylethanol in dried blood after volumetric absorptive microsampling.** *Talanta* 223, 121694, doi: 10.1016/j.talanta.2020.121694.
- Varga, A. und Alling, C. (2002). **Formation of phosphatidylethanol in vitro in red blood cells from healthy volunteers and chronic alcoholics.** *J Lab Clin Med* 140, 79-83, doi: 10.1067/mlc.2002.125292.
- Vestermark, A. und Boström, H. (1959). **Studies on ester sulfates.** *Experimental Cell Research* 18, 174-177, doi: 10.1016/0014-4827(59)90302-7.
- Viel, G., Boscolo-Berto, R., Cecchetto, G., Fais, P., Nalesso, A. und Ferrara, S. D. (2012). **Phosphatidylethanol in blood as a marker of chronic alcohol use: a systematic review and meta-analysis.** *Int J Mol Sci* 13, 14788-14812, doi: 10.3390/ijms131114788.
- Vinggaard, A. M. und Hansen, H. S. (1993). **Bradykinin and vasopressin activate phospholipase D in rat Leydig cells by a protein kinase C-dependent mechanism.** *J Endocrinol* 136, 119-126, doi: 10.1677/joe.0.1360119.
- Vollenbruck, H. (1937). **Untersuchungen über den Alkoholgehalt im Blut und im Speichel des menschlichen Körpers.** *Naunyn-Schmiedebergs Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie* 187, 731-736, doi: 10.1007/BF01971990.
- Walsham, N. E. und Sherwood, R. A. (2012). **Ethyl glucuronide.** *Ann Clin Biochem* 49, 110-117, doi: 10.1258/acb.2011.011115.
- Wang, X. (2002). **Phospholipase D in hormonal and stress signaling.** *Curr Opin Plant Biol* 5, 408-414, doi: 10.1016/s1369-5266(02)00283-2.
- Webzell, I., Ball, D., Bell, J., Sherwood, R. A., Marsh, A., O'Grady, J. G. und Heaton, N. D. (2011). **Substance use by liver transplant candidates: an anonymous urinalysis study.** *Liver Transpl* 17, 1200-1204, doi: 10.1002/lt.22370.

- Wehner, H.-D. (2003). **Alkohol**. In: Praxis Rechtsmedizin, Hrsg. Madea, B., Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, S. 409-431.
- Wirkner, K., Poelchen, W., Köles, L., Mühlberg, K., Scheibler, P., Allgaier, C. und Illes, P. (1999). **Ethanol-induced inhibition of NMDA receptor channels**. *Neurochem Int* 35, 153-162, doi: 10.1016/s0197-0186(99)00057-1.
- Wojcik, M. H. und Hawthorne, J. S. (2007). **Sensitivity of commercial ethyl glucuronide (ETG) testing in screening for alcohol abstinence**. *Alcohol Alcohol* 42, 317-320, doi: 10.1093/alcalc/agg014.
- World Health Organisation (2018). **Global status report on alcohol and health 2018**.
- Wozniak, M. K., Wierowski, M., Namiesnik, J. und Biziuk, M. (2019). **Biomarkers of Alcohol Consumption in Body Fluids - Possibilities and Limitations of Application in Toxicological Analysis**. *Curr Med Chem* 26, 177-196, doi: 10.2174/0929867324666171005111911.
- Wurst, F. M., Dresen, S., Allen, J. P., Wiesbeck, G., Graf, M. und Weinmann, W. (2006). **Ethyl sulphate: a direct ethanol metabolite reflecting recent alcohol consumption**. *Addiction* 101, 204-211, doi: 10.1111/j.1360-0443.2005.01245.x.
- Wurst, F. M., Kelso, E., Weinmann, W., Pragst, F., Yegles, M. und Sundstrom Poromaa, I. (2008). **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* 198, 407 e401-405, doi: 10.1016/j.ajog.2007.10.801.
- Wurst, F. M., Kempter, C., Seidl, S. und Alt, A. (1999). **Ethyl glucuronide - a marker of alcohol consumption and a relapse marker with clinical and forensic implications**. *Alcohol Alcohol* 34, 71-77, doi: 10.1093/alcalc/34.1.71.
- Wurst, F. M., Thon, N., Aradottir, S., Hartmann, S., Wiesbeck, G. A., Lesch, O., Skala, K., Wolfersdorf, M., Weinmann, W. und Alling, C. (2010). **Phosphatidylethanol: normalization during detoxification, gender aspects and correlation with other biomarkers and self-reports**. *Addict Biol* 15, 88-95, doi: 10.1111/j.1369-1600.2009.00185.x.
- Wurst, F. M., Wiesbeck, G. A., Metzger, J. W. und Weinmann, W. (2004). **On sensitivity, specificity, and the influence of various parameters on ethyl glucuronide levels in urine - results from the WHO/ISBRA study**. *Alcohol Clin Exp Res* 28, 1220-1228, doi: 10.1097/01.alc.0000134230.21414.11.

Zhang, X., Zheng, F., Lin, Z., Johansen, S. S., Yu, T., Liu, Y., Huang, Z., Li, J., Yan, J. und Rao, Y. (2017). **Simultaneous determination of ethanol's four types of non-oxidative metabolites in human whole blood by liquid chromatography tandem mass spectrometry.** *Anal Chim Acta* 963, 68-75, doi: 10.1016/j.aca.2017.01.040.

7 Publikationen

Originalbeiträge

Hofmann V., Landmann A., Schmitt G., Krauskopf A., Bartel M.

A Fatal Case of Aconite Poisoning: Accidental intake of a monkshood extract

Forensic Toxicology 38, 511 – 516 (2020)

Hofmann V., Sundermann T. R., Landmann A., Rechtsteiner S., Schmitt G., Bartel M.

Simultaneous determination of 5- and 6-APB in blood, other body fluids, hair, and various tissues by HPLC-MS/MS

Journal of Analytical Toxicology (online bereits verfügbar: DOI: 10.1093/jat/bkab018)

Hofmann V., Sundermann T. R., Schmitt G., Bartel M.

Development and validation of an analytical method for the simultaneous determination of the alcohol biomarkers ethyl glucuronide, ethyl sulfate, N-acetyltaurine, and 16:0/18:1-phosphatidylethanol in human blood

Drug Testing and Analysis 14 (1), 92 – 100 (2022)

Publizierte Abstracts, Präsentationen

Hofmann V., Landmann A., Schmitt G., Bartel M.

Analytical separation of 5- and 6-APB and their distribution in the human body

Vortrag, XXI. Symposium der Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie (GTFCh), Mosbach, 11. – 13.04.2019

Hofmann V., Landmann A., Schmitt G., Bartel M.

Tödliche Verwechslung: Vergiftung mit einem Eisenhutextrakt

Vortrag, 98. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin (DGRM), Hamburg, 17. – 21.09.2019

Hofmann V., Schiffer S., Sundermann T. R., Schmitt G., Bartel M.

Etrinkungstod im LSD-Rausch

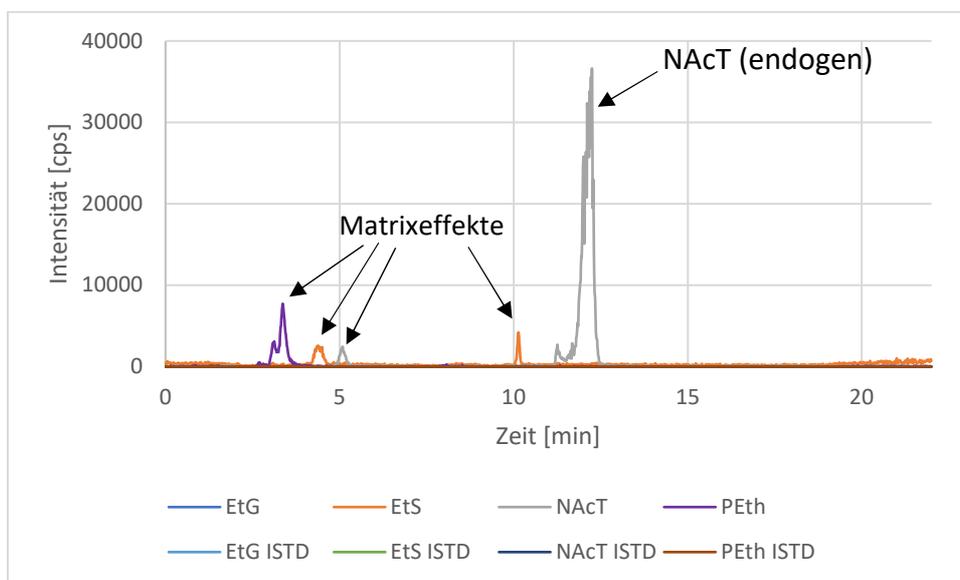
Poster, 99. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin (DGRM), Luzern, 01. – 04.09.2020

8 Anhang

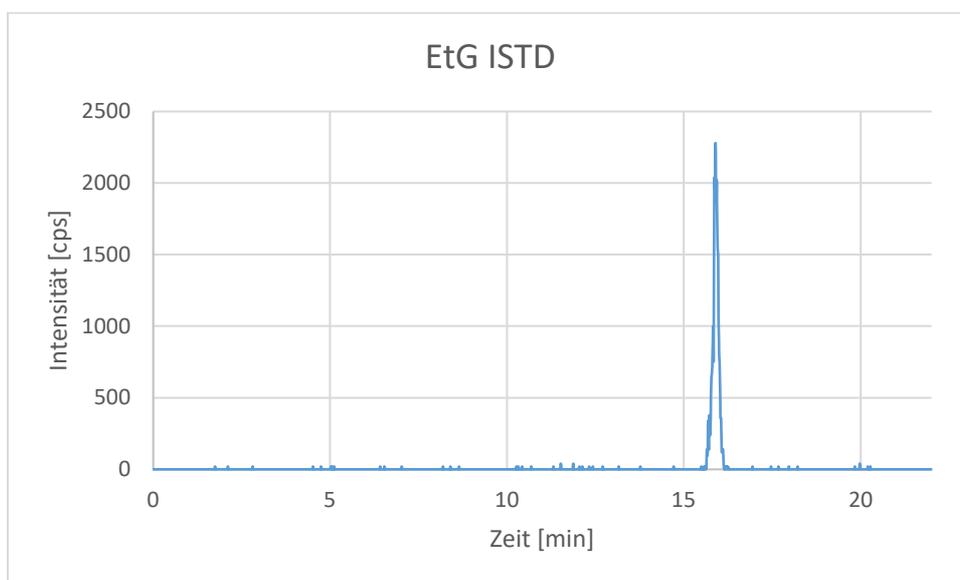
Rohdaten für die Validierung aus ValistatAlle vier Biomarker

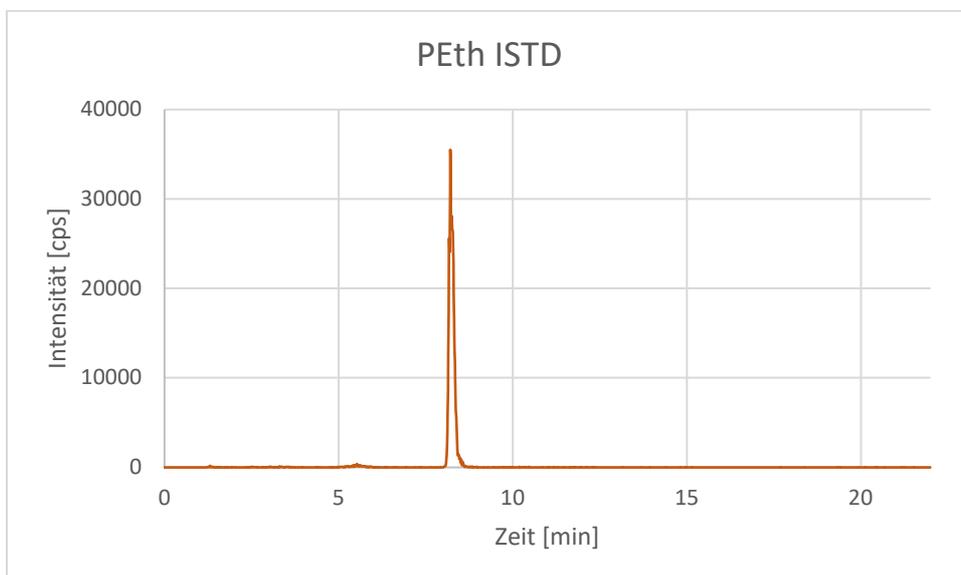
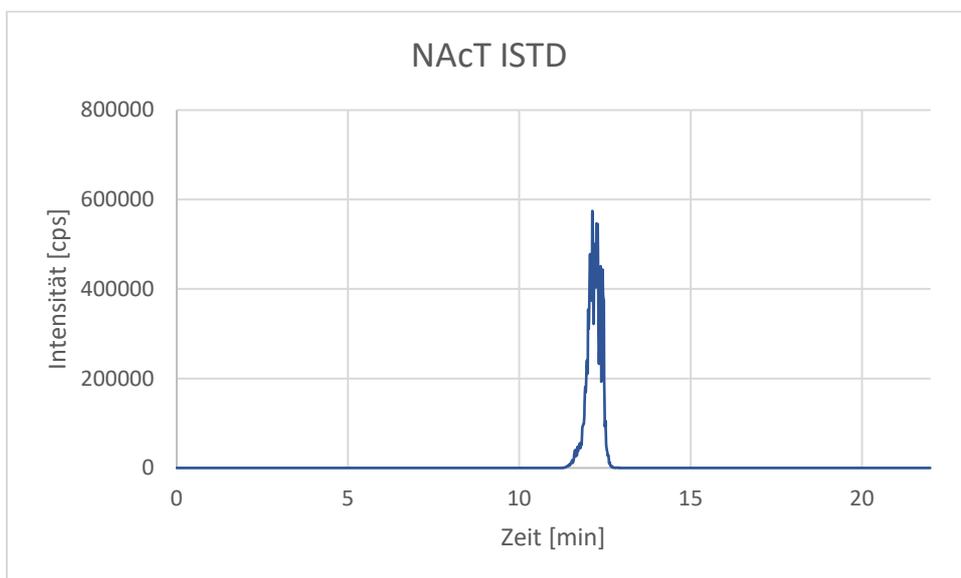
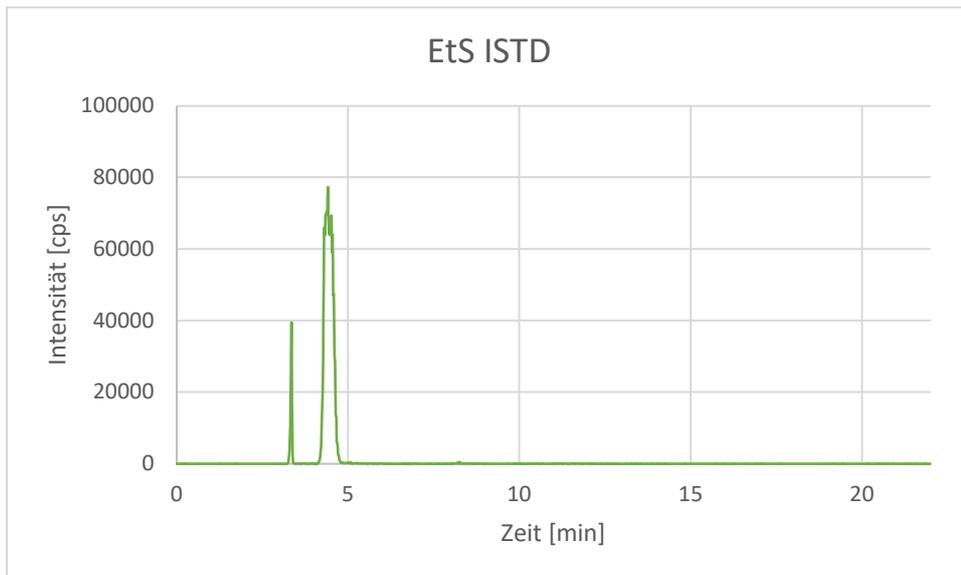
Selektivität

Beispielchromatogramm: Blank-Probe 2



Beispielchromatogramme: Nullprobe 2 (nur Interne Standards)





EtG

Linearität

1. Arbeitsbereich und Kalibrationsmodell

1.1 TARGET

		Messsignal: EtG1				Messgrösse: arearatio		Einheit: ng/mL			
Konzentration		10,0	25,0	50,0	100,0	250,0	500,0	1000,0			
MESSUNG	1	0,049	0,092	0,17	0,397	0,974	1,99	3,71			
	2	0,043	0,114	0,181	0,386	0,966	1,86	3,7			
	3	0,035	0,069	0,149	0,397	1,01	1,97	3,91			
	4	0,038	0,093	0,173	0,362	0,925	1,91	3,78			
	5	0,04	0,076	0,147	0,37	0,85	1,47	3,16			
	6	0,045	0,077	0,164	0,34	0,864	1,59	3,23			
Mittelwert		0,041	0,087	0,164	0,375	0,932	1,798	3,582			
SD		0,005	0,0165	0,0136	0,0224	0,0639	0,2162	0,3095			
Varianz		0,0	0,0003	0,0002	0,0005	0,0041	0,0467	0,0958			
Werte		6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0			
Ausreisser-Test nach Grubbs											
Extremwert		0,049	0,114	0,147	0,34	0,85	1,47	3,16			
Prüfwert		1,408	1,652	1,253	1,578	1,276	1,519	1,362			
Signifikanz 95%											
Tabellenwert		1,822	1,822	1,822	1,822	1,822	1,822	1,822			
Straggler?		nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein			
Signifikanz 99%											
Tabellenwert		1,944	1,944	1,944	1,944	1,944	1,944	1,944			
Ausreißer?		nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein			
Cochran-Test (Varianzhomogenität) (Signifikanz 99%)		Mandel-F-Test auf Linearität (Signifikanz 99%)			Lineare Kalibrationsfunktion $Y = a \cdot x + b$			Quadratische Kalibrationsfunktion $Y = A \cdot x^2 + B \cdot x + C$			
Prüfwert		0,6491	Prüfwert		1,82	a		0,00358	A		0,0
Tabellenwert		0,4866	Tabellenwert		21,19	b		0,00684	B		0,003675
Bestanden?		nein	Bestanden?		ja	R		0,9999	C		-0,000864
						Rest-SD		0,0178	R		0,9999
									Rest-SD		0,0165

1.2 QUALIFIER

		Messsignal: EtG2				Messgrösse: arearatio		Einheit: ng/mL			
Konzentration		10,0	25,0	50,0	100,0	250,0	500,0	1000,0			
MESSUNG	1	0,068	0,147	0,209	0,472	1,170	2,080	4,290			
	2	0,070	0,146	0,229	0,520	1,280	2,380	4,770			
	3	0,059	0,146	0,250	0,516	1,150	2,480	4,890			
	4	0,047	0,130	0,219	0,488	1,230	2,420	4,990			
	5	0,067	0,139	0,244	0,500	1,190	2,460	4,700			
	6	0,070	0,140	0,256	0,505	1,200	2,250	4,610			
Mittelwert		0,063	0,141	0,235	0,5	1,203	2,345	4,708			
SD		0,009	0,007	0,019	0,018	0,046	0,153	0,245			
Varianz		0,0	0,0	0,0	0,0	0,002	0,024	0,06			
Werte		6	6	6	6	6	6	6			
Extremwert											
Prüfwert		0,047	0,130	0,209	0,472	1,280	2,080	4,290			
Prüfwert		1,810	1,743	1,377	1,570	1,655	1,728	1,705			
Tabellenwert											
Straggler?		nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein			
Tabellenwert											
Ausreißer?		nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein			
Cochran-Test (Varianzhomogenität) (Signifikanz 99%)		Mandel-F-Test auf Linearität (Signifikanz 99%)			Lineare Kalibrationsfunktion $Y = a \cdot x + b$			Quadratische Kalibrationsfunktion $Y = A \cdot x^2 + B \cdot x + C$			
Prüfwert		0,6947	Prüfwert		0,09	a		0,004686	A		0,0
Tabellenwert		0,4866	Tabellenwert		21,19	b		0,01849	B		0,004666
Bestanden?		nein	Linear?		ja	R		1,0000	C		0,020129
						Rest-SD		0,0142	R		1,0
									Rest-SD		0,0157

Präzision

QC-Sollwert: <input type="text" value="30"/>		Einheit: <input type="text" value="ng/mL"/>											
		Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8	Tag 9	Tag 10		
MESSUNG	1	26,4	25,3	29,7	34,7	29,1	30,5	28,6	25,1				
	2	29,9	24,2	30,5	29,3	30	33,9	28,5	31,3				
	3												
	4												
	5												
	6												
	7												
	8												
	9												
	10												
Mittelwert		28,15	24,75	30,10	32,00	29,55	32,20	28,55	28,20				
BIAS, %		-6,2	-17,5	0,3	6,7	-1,5	7,3	-4,8	-6,0				
SD		2,47	0,78	0,57	3,82	0,64	2,40	0,07	4,38				
RSD, %		8,8	3,1	1,9	11,9	2,2	7,5	0,2	15,5				

Kenndaten	OK	Wiederholpräzision	Laborpräzision
MW (ges.)	29,19	SD	2,42
SD	2,91	RSD, %	8,3
RSD, %	10,0		
		SD	2,94
		RSD, %	10,1

Richtigkeit	95%-Intervall	OK
Abw.	-0,81	Faktor
Bias, %	-2,7	β-Toleranz
		Prüfbereich (30%)
		Prüfbereich (40%)

QC-Sollwert: <input type="text" value="300"/>		Einheit: <input type="text" value="ng/mL"/>											
		Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8	Tag 9	Tag 10		
MESSUNG	1	288,0	315,0	295,0	311,0	281,0	259,0	291,0	268,0				
	2	320,0	328,0	314,0	280,0	275,0	259,0	296,0	284,0				
	3												
	4												
	5												
	6												
	7												
	8												
	9												
	10												
Mittelwert		304,00	321,50	304,50	295,50	278,00	259,00	293,50	276,00				
BIAS, %		1,3	7,2	1,5	-1,5	-7,3	-13,7	-2,2	-8,0				
SD		22,63	9,19	13,44	21,92	4,24	0,00	3,54	11,31				
RSD, %		7,4	2,9	4,4	7,4	1,5	0,0	1,2	4,1				

Kenndaten	OK	Wiederholpräzision	Laborpräzision
MW (ges.)	291,50	SD	13,3041347
SD	21,39158713	RSD, %	4,6
RSD, %	7,3		
		SD	21,85504192
		RSD, %	7,5

Richtigkeit	95%-Intervall	OK
Abw.	-8,50	Faktor
Bias, %	-2,8	β-Toleranz
		Prüfbereich (30%)

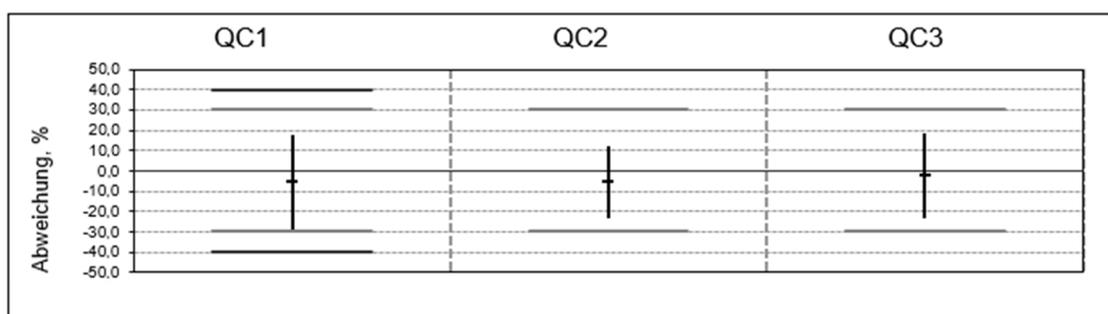
QC-Sollwert: Einheit:

	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8	Tag 9	Tag 10
1	851,0	850,0	831,0	837,0	764,0	743,0	714,0	677,0		
2	876,0	835,0	768,0	889,0	799,0	760,0	706,0	732,0		
3										
4										
5										
6										
7										
8										
9										
10										

Mittelwert	863,5	842,5	799,5	863,0	781,5	751,5	710,0	704,5		
BIAS, %	7,9	5,3	-0,1	7,9	-2,3	-6,1	-11,3	-11,9		
SD	17,68	10,61	44,55	36,77	24,75	12,02	5,66	38,89		
RSD, %	2,0	1,3	5,6	4,3	3,2	1,6	0,8	5,5		

Kenndaten	OK	Wiederholpräzision		Laborpräzision	
MW (ges.)	789,50	SD	27,53	SD	67,07
SD	65,19	RSD, %	3,5	RSD, %	8,5
RSD, %	8,3				

Richtigkeit		95%-Intervall	OK
Abw.	-10,5	Faktor	2,502
Bias, %	-1,3	β -Toleranz	611,30 bis 946,97
		Prüfbereich (30%)	560,00 bis 1040,00

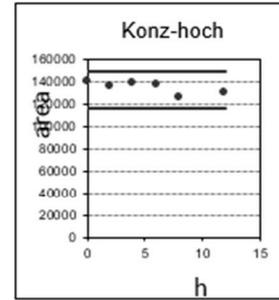
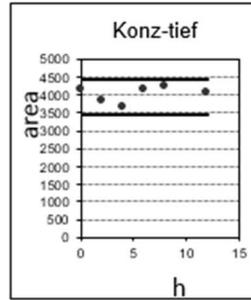


Zusammenfassung	QC1	QC2	QC3
β -Toleranz	21,40 bis 35,39	230,06 bis 336,42	611,30 bis 946,97
%	-28,7 bis 18,0	-23,3 bis 12,1	-23,6 bis 18,4
Prüfbereich (30%)	21,00 bis 39,00	210,00 bis 390,00	560,00 bis 1040,00
Prüfbereich (40%)	18,00 bis 42,00		

Stabilität

MESSUNG	Konz-tief		Konz-hoch	
	Zeit	QC-Pool	Zeit	QC-Pool
	h	area	h	area
	0,00	4130	0,00	139000
	2,00	3850	2,00	135000
	4,00	3640	4,00	138000
	6,00	4140	6,00	137000
	8,00	4240	8,00	126000
	12,00	4070	12,00	129000

Werte	6		6	
min. Wert	3640	area	126000	area
max. Wert	4240	area	139000	area
Spanne	600	area	13000	area
Spanne, %	14,2	%	9,4	%
Prüfwert	25,0	%	25,0	%
Steigung	0,0059		-0,0006	
Abschnitt	-18,4957		89,5619	
R	0,30759		-0,76984	
Beurteilung	OK		OK	



Kriterium: Spanne < Prüfwert

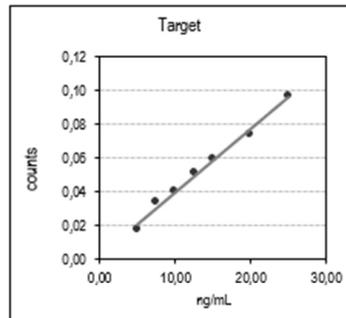
Grenzwerte

Einheit	Kalibrator ng/mL	Target Konzentration	Qualifizier Konzentration
1	5,0	0,018	0,037
2	7,5	0,034	0,050
3	10,0	0,040	0,058
4	12,5	0,051	0,077
5	15	0,059	0,086
6	20	0,074	0,103
7	25	0,097	0,128
8			
9			
10			

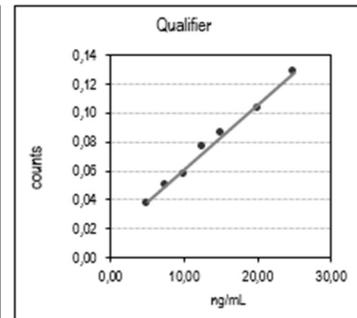
Messungen	2	2
Signifikanz	99	99
k-Wert	3	3

Ausreißer-F-Test		
Kalibrator Nr.	1	4
Prüfwert	5,62	3,64
Krit.-Wert 99%	21,19	21,19
Ausreißer	nein	nein

Linearitäts-Mandel-Test		
Prüfwert	0,29	0,57
Krit.-Wert 99%	21,19	21,19
Bestanden?	ja	ja



Lineare Kalibration
 $Y = 0,00373 \cdot X + 0,00255$



Lineare Kalibration
 $Y = 0,00448 \cdot X + 0,01622$

a	0,003733	0,004479
b	0,002547	0,016221
R	0,9954	0,9961
Rest-SD	0,003	0,0031

	Grenzwerte	
Nachweisgrenze	2,81	2,60
Erfassungsgrenze	5,62	5,19
Bestimmungsgrenze	7,70	7,22

Matrixeffekte und Wiederfindung

	QC1	30	ng/mL	QC2	800	ng/mL
	Reinsubstanz	Extrakt	Matrix	Reinsubstanz	Extrakt	Matrix
	Konzentration	Konzentration	Konzentration	Konzentration	Konzentration	Konzentration
MESSUNG	0,118	0,1	0,107	2,31	1,98	1,88
	0,105	0,0984	0,0956	2,74	2,31	1,87
	0,0913	0,108	0,113	2,03	2,13	2,0
	0,132	0,125	0,131	2,12	2,2	2,02
	0,105	0,119	0,119	2,13	2,19	2,09
	0,172	0,109	0,107	2,82	1,97	1,97
Mittelwert	0,12055	0,1099	0,1121	2,358333	2,13	1,971667
SD	0,028719	0,010445	0,012082	0,339966	0,133417	0,084715
Varianz	0,000825	0,000109	0,000146	0,115577	0,0178	0,007177
Anzahl	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
Wiederfindung, %	102,0			92,6		
RSD, %	4,0			6,4		
Matrixeffekt, %	91,2			90,3		
RSD, %	19,9			14,2		
Beurteilung	Ok			Ok		
Kriterium:	Recovery >=50%					
	SD <=25%					
	Matrixeffekte: 75-125%					

Ets

Linearität

1. Arbeitsbereich und Kalibrationsmodell

1.1 TARGET		Messsignal: EIS1						Messgröße: arearatio		Einheit: ng/mL	
Konzentration		10,0	25,0	50,0	100,0	250,0	500,0	1000,0			
MESSUNG	1	0,076	0,126	0,223	0,543	1,16	2,19	4,44			
	2	0,063	0,14	0,211	0,47	1,15	2,18	4,37			
	3	0,086	0,13	0,233	0,523	1,25	2,39	4,68			
	4	0,059	0,125	0,214	0,505	1,13	2,29	4,5			
	5	0,076	0,119	0,219	0,512	1,18	2,3	4,46			
	6	0,053	0,118	0,206	0,45	1,22	2,22	4,66			
	Mittelwert	0,069	0,126	0,218	0,501	1,182	2,262	4,518			
	SD	0,0126	0,0081	0,0096	0,0345	0,0454	0,0804	0,125			
	Varianz	0,0002	0,0001	0,0001	0,0012	0,0021	0,0065	0,0156			
	Werte	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0			
Ausreisser-Test nach Grubbs											
	Extremwert	0,086	0,14	0,233	0,45	1,25	2,39	4,68			
	Prüfwert	1,388	1,694	1,6	1,464	1,507	1,597	1,294			
Signifikanz 95%											
	Tabellenwert	1,822	1,822	1,822	1,822	1,822	1,822	1,822			
	Straggler?	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein			
Signifikanz 99%											
	Tabellenwert	1,944	1,944	1,944	1,944	1,944	1,944	1,944			
	Ausreißer?	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein			

Cochran-Test (Varianzhomogenität) (Signifikanz 99%)	Mandel-F-Test auf Linearität (Signifikanz 99%)	Lineare Kalibrationsfunktion Y = a·x + b	Quadratische Kalibrationsfunktion Y = A·x ² + B·x + C
Prüfwert 0,6092	Prüfwert 0,39	a 0,00450	A 0,0
Tabellenwert 0,4866	Tabellenwert 21,19	b 0,02483	B 0,004564
Bestanden? nein	Bestanden? ja	R 0,9999	C 0,019231
		Rest-SD 0,0247	R 0,9999
			Rest-SD 0,0263

1.2 QUALIFIER		Messsignal: EIS2						Messgröße: arearatio		Einheit: ng/mL	
Konzentration		10,0	25,0	50,0	100,0	250,0	500,0	1000,0			
MESSUNG	1	0,050	0,086	0,157	0,394	0,897	1,590	3,370			
	2	0,052	0,092	0,152	0,359	0,849	1,670	3,190			
	3	0,048	0,083	0,161	0,341	0,830	1,710	3,270			
	4	0,046	0,095	0,150	0,355	0,906	1,660	3,430			
	5	0,055	0,094	0,157	0,415	0,913	1,870	3,490			
	6	0,046	0,088	0,149	0,398	0,953	1,900	3,660			
	Mittelwert	0,05	0,09	0,154	0,377	0,891	1,733	3,402			
	SD	0,003	0,005	0,005	0,029	0,045	0,124	0,166			
	Varianz	0,0	0,0	0,0	0,001	0,002	0,015	0,028			
	Werte	6	6	6	6	6	6	6			
	Extremwert	0,055	0,083	0,161	0,415	0,953	1,900	3,660			
	Prüfwert	1,603	1,334	1,413	1,299	1,374	1,344	1,552			
	Tabellenwert	1,822	1,822	1,822	1,822	1,822	1,822	1,822			
	Straggler?	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein			
	Tabellenwert	1,944	1,944	1,944	1,944	1,944	1,944	1,944			
	Ausreißer?	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein			

Cochran-Test (Varianzhomogenität) (Signifikanz 99%)	Mandel-F-Test auf Linearität (Signifikanz 99%)	Lineare Kalibrationsfunktion Y = a·x + b	Quadratische Kalibrationsfunktion Y = A·x ² + B·x + C
Prüfwert 0,602	Prüfwert 4,03	a 0,003399	A 0,0
Tabellenwert 0,4866	Tabellenwert 21,19	b 0,01710	B 0,003553
Bestanden? nein	Linear? ja	R 0,9999	C 0,004299
		Rest-SD 0,0233	R 0,9999
			Rest-SD 0,0184

Präzision

QC-Sollwert:		30		Einheit:		ng/mL				
	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8	Tag 9	Tag 10
MESSUNG	1	29	30,3	32,9	34,4	28,4	29,9	30,6	29,7	
	2	24,6	30,2	30,8	26,9	30,3	29,5	28,6	31,6	
	3									
	4									
	5									
	6									
	7									
	8									
	9									
	10									
Mittelwert	26,80	30,25	31,85	30,65	29,35	29,70	29,60	30,65		
BIAS, %	-10,7	0,8	6,2	2,2	-2,2	-1,0	-1,3	2,2		
SD	3,11	0,07	1,48	5,30	1,34	0,28	1,41	1,34		
RSD, %	11,6	0,2	4,7	17,3	4,6	1,0	4,8	4,4		

Kenndaten	OK	Wiederholpräzision		Laborpräzision	
MW (ges.)	29,86	SD	2,39	SD	2,39
SD	2,25	RSD, %	8,0	RSD, %	8,0
RSD, %	7,5				

Richtigkeit		95%-Intervall	OK
Abw.	-0,14	Faktor	2,274
Bias, %	-0,5	β -Toleranz	24,28 bis 35,15
		Prüfbereich (30%)	21,00 bis 39,00
		Prüfbereich (40%)	18,00 bis 42,00

QC-Sollwert:		300		Einheit:		ng/mL				
	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8	Tag 9	Tag 10
MESSUNG	1	287,0	287,0	292,0	314,0	301,0	272,0	291,0	257,0	
	2	228,0	275,0	305,0	309,0	271,0	276,0	290,0	288,0	
	3									
	4									
	5									
	6									
	7									
	8									
	9									
	10									
Mittelwert	257,50	281,00	298,50	311,50	286,00	274,00	290,50	272,50		
BIAS, %	-14,2	-6,3	-0,5	3,8	-4,7	-8,7	-3,2	-9,2		
SD	41,72	8,49	9,19	3,54	21,21	2,83	0,71	21,92		
RSD, %	16,2	3,0	3,1	1,1	7,4	1,0	0,2	8,0		

Kenndaten	OK	Wiederholpräzision		Laborpräzision	
MW (ges.)	283,94	SD	18,86961844	SD	21,38904092
SD	21,2303831	RSD, %	6,6	RSD, %	7,5
RSD, %	7,5				

Richtigkeit		95%-Intervall	OK
Abw.	-16,06	Faktor	2,338
Bias, %	-5,4	β -Toleranz	218,74 bis 318,73
		Prüfbereich (30%)	210,00 bis 390,00

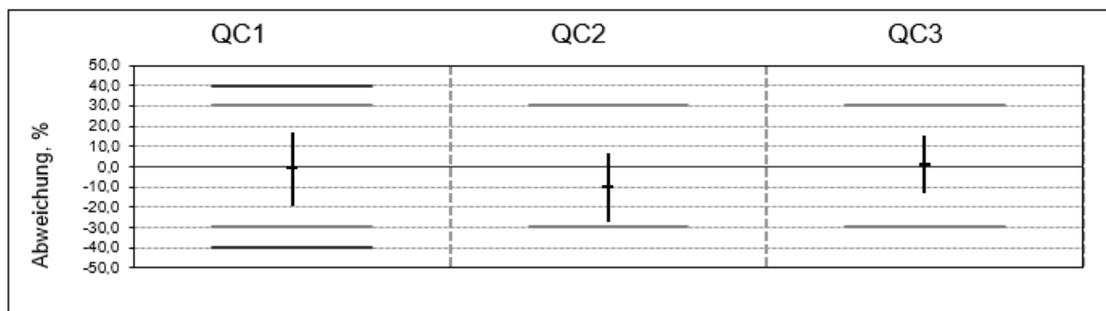
QC-Sollwert: Einheit:

	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8	Tag 9	Tag 10
1	838,0	854,0	781,0	835,0	807,0	752,0	752,0	736,0		
2	876,0	812,0	800,0	877,0	831,0	777,0	777,0	759,0		
3										
4										
5										
6										
7										
8										
9										
10										

Mittelwert	857,0	833,0	790,5	856,0	819,0	764,5	764,5	747,5		
BIAS, %	7,1	4,1	-1,2	7,0	2,4	-4,4	-4,4	-6,6		
SD	26,87	29,70	13,44	29,70	16,97	17,68	17,68	16,26		
RSD, %	3,1	3,6	1,7	3,5	2,1	2,3	2,3	2,2		

Kenndaten	OK	Wiederholpräzision		Laborpräzision	
MW (ges.)	804,00	SD	21,92	SD	45,91
SD	44,72	RSD, %	2,7	RSD, %	5,7
RSD, %	5,6				

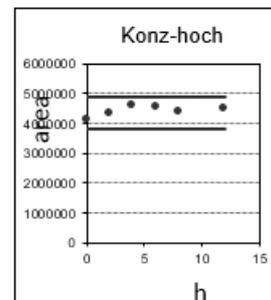
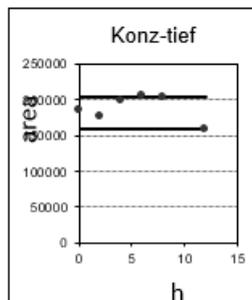
Richtigkeit		95%-Intervall	OK
Abw.	4,0	Faktor	2,5
Bias, %	0,5	β -Toleranz	693,23 bis 922,81
		Prüfbereich (30%)	560,00 bis 1040,00



Zusammenfassung	QC1	QC2	QC3
β -Toleranz	24,28 bis 35,15	218,74 bis 318,73	693,23 bis 922,81
%	-19,1 bis 17,2	-27,1 bis 6,2	-13,3 bis 15,4
Prüfbereich (30%)	21,00 bis 39,00	210,00 bis 390,00	560,00 bis 1040,00
Prüfbereich (40%)	18,00 bis 42,00		

Stabilität

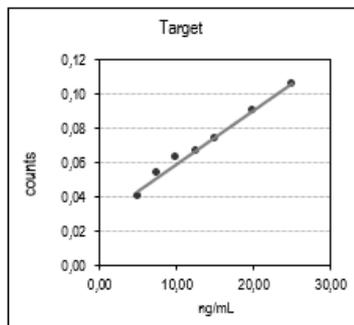
MESSUNG	Konz-tief		Konz-hoch	
	Zeit h	QC-Pool area	Zeit h	QC-Pool area
	0,0	185000	0,0	4100000
	2,0	175000	2,0	4350000
	4,0	198000	4,0	4590000
	6,0	205000	6,0	4560000
	8,0	203000	8,0	4360000
	12,0	159000	12,0	4500000
Werte				
min. Wert	6	159000	6	4100000
max. Wert	6	205000	6	4590000
Spanne		46000		490000
Spanne, %		22,4 %		10,7 %
Prüfwert		25,0 %		25,0 %
Steigung		-0,0001		0,0000
Abschnitt		16,3661		-52,8616
R		-0,24601		0,55518
Beurteilung		OK		OK



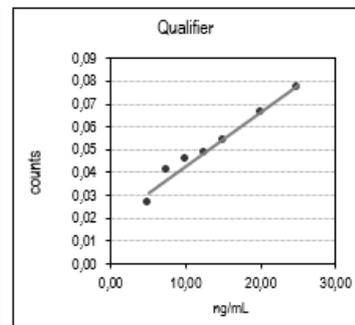
Kriterium: Spanne < Prüfwert

Grenzwerte

Einheit	Kalibrator ng/mL	Target Konzentration	Qualifizier Konzentration
1	5,0	0,040	0,027
2	7,5	0,054	0,041
3	10,0	0,063	0,045
4	12,5	0,067	0,048
5	15	0,074	0,054
6	20	0,090	0,066
7	25	0,106	0,078
8			
9			
10			



Lineare Kalibration
 $Y = 0,00312 \cdot X + 0,02824$



Lineare Kalibration
 $Y = 0,00233 \cdot X + 0,01962$

Messungen	2	2
Signifikanz	99	99
k-Wert	3	3
Ausreißer-F-Test		
Kalibrator Nr.	1	1
Prüfwert	9,85	15,57
Krit.-Wert 99%	21,19	21,19
Ausreißer	nein	nein
Linearitäts-Mandel-Test		
Prüfwert	0,49	0,52
Krit.-Wert 99%	21,19	21,19
Bestanden?	ja	ja

a	0,003116	0,002334
b	0,02824	0,019622
R	0,9944	0,9872
Rest-SD	0,003	0,0029

Grenzwerte	
Nachweisgrenze	3,10 4,72
Erfassungsgrenze	6,20 9,43
Bestimmungsgrenze	8,33 12,12

Matrixeffekte und Wiederfindung

		QC1	30	ng/mL	QC2	800	ng/mL
		Reinsubstanz	Extrakt	Matrix	Reinsubstanz	Extrakt	Matrix
		Konzentration	Konzentration	Konzentration	Konzentration	Konzentration	Konzentration
MESSUNG		0,156	0,122	0,13	2,87	2,6	2,58
		0,133	0,123	0,181	3,49	2,95	2,44
		0,134	0,128	0,128	2,77	2,9	2,83
		0,138	0,133	0,134	2,93	2,79	2,92
		0,147	0,12	0,134	2,73	2,79	2,79
		0,195	0,121	0,126	3,72	2,7	2,67
Mittelwert		0,1505	0,1245	0,138833	3,085	2,788333	2,705
SD		0,023484	0,00501	0,020904	0,415391	0,127971	0,17672
Varianz		0,000551	0,000025	0,000437	0,17255	0,016377	0,03123
Anzahl		6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
Wiederfindung,%		111,5	97,0				
	RSD, %	17,9	7,5				
Matrixeffekt,%		82,7	90,4				
	RSD, %	13,3	11,9				
Beurteilung		Ok	Ok				
Kriterium:		Recovery >=50%					
		SD <=25%					
		Matrixeffekte: 75-125%					

NACT

Linearität

1. Arbeitsbereich und Kalibrationsmodell

1.1 TARGET		Messsignal: NAT1						Messgröße: arearatio		Einheit: ng/mL	
Konzentration		10,0	25,0	50,0	100,0	250,0	500,0	1000,0			
MESSUNG	1	0,02	0,029	0,046	0,088	0,195	0,376	0,714			
	2	0,022	0,033	0,049	0,092	0,206	0,371	0,74			
	3	0,019	0,028	0,044	0,092	0,203	0,378	0,738			
	4	0,018	0,027	0,044	0,089	0,202	0,382	0,743			
	5	0,018	0,027	0,042	0,09	0,207	0,401	0,758			
	6	0,019	0,028	0,045	0,092	0,208	0,404	0,768			
Mittelwert		0,019	0,029	0,045	0,09	0,204	0,385	0,744			
SD		0,0014	0,0021	0,0024	0,002	0,0048	0,0138	0,0186			
Varianz		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0002	0,0003			
Werte		6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0			
Ausreisser-Test nach Grubbs											
Extremwert		0,022	0,033	0,049	0,088	0,195	0,404	0,714			
Prüfwert		1,564	1,795	1,702	1,345	1,784	1,353	1,589			
Signifikanz 95%											
Tabellenwert		1,822	1,822	1,822	1,822	1,822	1,822	1,822			
Straggler?		nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein			
Signifikanz 99%											
Tabellenwert		1,944	1,944	1,944	1,944	1,944	1,944	1,944			
Ausreißer?		nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein			

Cochran-Test (Varianzhomogenität) (Signifikanz 99%)	Mandel-F-Test auf Linearität (Signifikanz 99%)	Lineare Kalibrationsfunktion $Y = a \cdot x + b$		Quadratische Kalibrationsfunktion $Y = A \cdot x^2 + B \cdot x + C$			
Prüfwert	0,6006	Prüfwert	12,68	a	0,00073	A	0,0
Tabellenwert	0,4866	Tabellenwert	21,19	b	0,01364	B	0,000775
Bestanden?	nein	Bestanden?	ja	R	0,9998	C	0,010197
				Rest-SD	0,0056	R	1,0
						Rest-SD	0,003

1.2 QUALIFIER		Messsignal: NAT2						Messgröße: arearatio		Einheit: ng/mL	
Konzentration		10,0	25,0	50,0	100,0	250,0	500,0	1000,0			
MESSUNG	1	0,078	0,109	0,167	0,317	0,681	1,290	2,490			
	2	0,080	0,118	0,176	0,318	0,677	1,300	2,530			
	3	0,072	0,106	0,152	0,328	0,696	1,280	2,540			
	4	0,069	0,098	0,157	0,310	0,716	1,310	2,590			
	5	0,067	0,099	0,149	0,322	0,728	1,370	2,660			
	6	0,070	0,108	0,162	0,320	0,718	1,410	2,670			
Mittelwert		0,073	0,106	0,161	0,319	0,703	1,327	2,58			
SD		0,005	0,007	0,01	0,006	0,021	0,052	0,073			
Varianz		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,003	0,005			
Werte		6	6	6	6	6	6	6			
Extremwert											
Prüfwert		0,080	0,118	0,176	0,310	0,677	1,410	2,670			
Prüfwert		1,436	1,600	1,548	1,541	1,216	1,614	1,229			
Tabellenwert											
Straggler?		nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein			
Tabellenwert											
Ausreißer?		nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein			

Cochran-Test (Varianzhomogenität) (Signifikanz 99%)	Mandel-F-Test auf Linearität (Signifikanz 99%)	Lineare Kalibrationsfunktion $Y = a \cdot x + b$		Quadratische Kalibrationsfunktion $Y = A \cdot x^2 + B \cdot x + C$			
Prüfwert	0,6171	Prüfwert	3,6	a	0,002537	A	0,0
Tabellenwert	0,4866	Tabellenwert	21,19	b	0,05135	B	0,002628
Bestanden?	nein	Linear?	ja	R	0,9999	C	0,043764
				Rest-SD	0,0142	R	0,9999
						Rest-SD	0,0115

Präzision

QC-Sollwert:		30		Einheit:		ng/mL					
MESSUNG		Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8	Tag 9	Tag 10
	1	31,4	31,4	34,1	33,8	30,8	32,4	33,8	30,4		
	2	33,3	33,5	33	32,8	33,4	33	33,7	32,2		
	3										
	4										
	5										
	6										
	7										
	8										
	9										
10											
Mittelwert		32,35	32,45	33,55	33,30	32,10	32,70	33,75	31,30		
BIAS, %		7,8	8,2	11,8	11,0	7,0	9,0	12,5	4,3		
SD		1,34	1,48	0,78	0,71	1,84	0,42	0,07	1,27		
RSD, %		4,2	4,6	2,3	2,1	5,7	1,3	0,2	4,1		

Kenndaten	OK	Wiederholpräzision		Laborpräzision	
MW (ges.)	32,69	SD	1,13	SD	1,15
SD	1,15	RSD, %	3,5	RSD, %	3,5
RSD, %	3,5				

Richtigkeit		95%-Intervall		OK
Abw.	2,69	Faktor	2,302	
Bias, %	9,0	β-Toleranz	32,98 bis 38,25	
		Prüfbereich (30%)	21,00 bis 39,00	
		Prüfbereich (40%)	18,00 bis 42,00	

QC-Sollwert:		300		Einheit:		ng/mL					
MESSUNG		Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8	Tag 9	Tag 10
	1	295,0	307,0	312,0	302,0	307,0	279,0	299,0	269,0		
	2	200,0	290,0	328,0	335,0	293,0	298,0	289,0	298,0		
	3										
	4										
	5										
	6										
	7										
	8										
	9										
10											
Mittelwert		247,50	298,50	320,00	318,50	300,00	288,50	294,00	283,50		
BIAS, %		-17,5	-0,5	6,7	6,2	0,0	-3,8	-2,0	-5,5		
SD		67,18	12,02	11,31	23,33	9,90	13,44	7,07	20,51		
RSD, %		27,1	4,0	3,5	7,3	3,3	4,7	2,4	7,2		

Kenndaten	OK	Wiederholpräzision		Laborpräzision	
MW (ges.)	293,81	SD	27,56469662	SD	29,98645528
SD	29,83112189	RSD, %	9,4	RSD, %	10,2
RSD, %	10,1531153				

Richtigkeit		95%-Intervall		OK
Abw.	-6,19	Faktor	2,335	
Bias, %	-2,1	β-Toleranz	217,72 bis 357,78	
		Prüfbereich (30%)	210,00 bis 390,00	

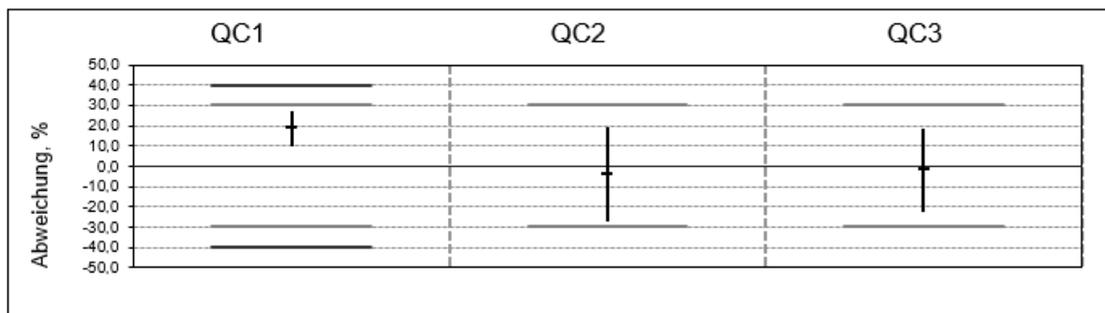
QC-Sollwert: Einheit:

	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8	Tag 9	Tag 10
1	869,0	878,0	858,0	731,0	795,0	751,0	722,0	706,0		
2	888,0	823,0	832,0	721,0	856,0	747,0	749,0	749,0		
3										
4										
5										
6										
7										
8										
9										
10										

Mittelwert	878,5	850,5	845,0	726,0	825,5	749,0	735,5	727,5		
BIAS, %	9,8	6,3	5,6	-9,3	3,2	-6,4	-8,1	-9,1		
SD	13,44	38,89	18,38	7,07	43,13	2,83	19,09	30,41		
RSD, %	1,5	4,6	2,2	1,0	5,2	0,4	2,6	4,2		

Kenndaten	OK	Wiederholpräzision		Laborpräzision	
MW (ges.)	792,19	SD	25,59	SD	66,21
SD	64,30	RSD, %	3,2	RSD, %	8,4
RSD, %	8,1				

Richtigkeit		95%-Intervall	OK
Abw.	-7,81	Faktor	2,503
Bias, %	-1,0	β -Toleranz	618,74 bis 950,16
		Prüfbereich (30%)	560,00 bis 1040,00

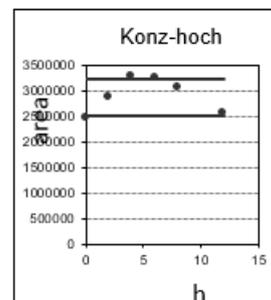
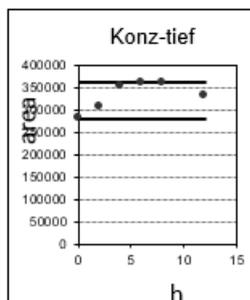


Zusammenfassung	QC1	QC2	QC3
β -Toleranz	32,98 bis 38,25	217,72 bis 357,78	618,74 bis 950,16
%	9,9 bis 27,5	-27,4 bis 19,3	-22,7 bis 18,8
Prüfbereich (30%)	21,00 bis 39,00	210,00 bis 390,00	560,00 bis 1040,00
Prüfbereich (40%)	18,00 bis 42,00		

Stabilität

MESSUNG	Konz-tief		Konz-hoch	
	Zeit h	QC-Pool area	Zeit h	QC-Pool area
	0,00	281000	0,00	2470000
	2,00	307000	2,00	2870000
	4,00	354000	4,00	3260000
	6,00	360000	6,00	3230000
	8,00	360000	8,00	3060000
	12,00	331000	12,00	2570000

Werte	6		6	
min. Wert	281000	area	2470000	area
max. Wert	360000	area	3260000	area
Spanne	79000	area	790000	area
Spanne, %	21,9	%	24,2	%
Prüfwert	25,0	%	25,0	%
Steigung	0,0001		0,0000	
Abschnitt	-20,6334		3,4566	
R	0,58791		0,04988	
Beurteilung	OK		OK	



Kriterium: Spanne < Prüfwert

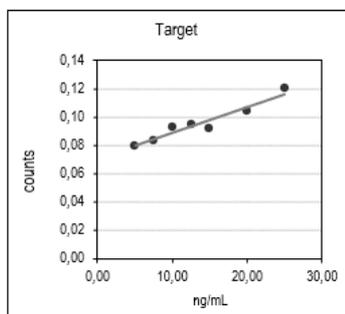
Grenzwerte

Einheit	Kalibrator ng/mL	Target Konzentration	Qualifier Konzentration
1	5,0	0,080	0,373
2	7,5	0,084	0,415
3	10,0	0,093	0,452
4	12,5	0,095	0,474
5	15	0,092	0,429
6	20	0,104	0,500
7	25	0,120	0,546
8			
9			
10			

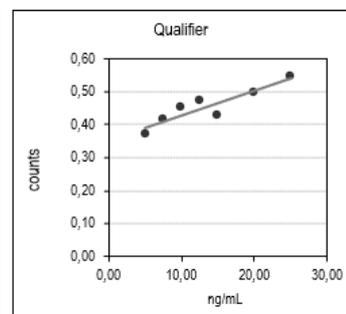
Messungen	2	2
Signifikanz	99	99
k-Wert	3	3

Ausreißer-F-Test	5	5
Kalibrator Nr.	5	5
Prüfwert	4,47	4,79
Krit.-Wert 99%	21,19	21,19
Ausreißer	nein	nein

Linearitäts-Mandel-Test	0,88	0,02
Prüfwert	0,88	0,02
Krit.-Wert 99%	21,19	21,19
Bestanden?	ja	ja



Lineare Kalibration
 $Y = 0,00183 \cdot X + 0,07039$



Lineare Kalibration
 $Y = 0,00747 \cdot X + 0,35413$

a	0,001829	0,007469
b	0,070388	0,354129
R	0,96	0,919
Rest-SD	0,004	0,0247

	Grenzwerte	
Nachweisgrenze	8,51	12,52
Erfassungsgrenze	17,03	25,03
Bestimmungsgrenze	28,89	64,26

Matrixeffekte und Wiederfindung

	QC1 30 ng/mL			QC2 800 ng/mL		
	Reinsubstan: Konzentration	Extrakt Konzentration	Matrix Konzentration	Reinsubstan: Konzentration	Extrakt Konzentration	Matrix Konzentration
MESSUNG	0,03	0,0258	0,0283	0,819	0,6399	0,6629
	0,0276	0,024	0,025	0,972	0,662	0,665
	0,0355	0,03	0,033	0,668	0,671	0,861
	0,0288	0,03	0,028	0,712	0,692	0,649
	0,0276	0,025	0,034	0,68	0,687	0,682
	0,0378	0,0206	0,031	0,924	0,6689	0,6979
Mittelwert	0,031217	0,0259	0,029883	0,795833	0,670133	0,702967
SD	0,004363	0,003637	0,0034	0,130219	0,018682	0,079245
Varianz	0,000019	0,000013	0,000012	0,016957	0,000349	0,00628
Anzahl	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
Wiederfindung, %	115,4		104,9			
RSD, %	21,5		12,0			
Matrixeffekt, %	83,0		84,2			
RSD, %	16,3		15,0			
Beurteilung	Ok		Ok			
Kriterium:	Recovery >=50%					
	SD <=25%					
	Matrixeffekte: 75-125%					

PEth

Linearität

1. Arbeitsbereich und Kalibrationsmodell

1.1 TARGET		Messsignal: PEth1						Messgröße: arearatio		Einheit: ng/mL	
Konzentration		10,0	25,0	50,0	100,0	250,0	500,0	1000,0			
MESSUNG	1	0,1	0,237	0,417	0,899	2,03	3,9	8,02			
	2	0,071	0,219	0,494	1,07	2,48	4,75	10,3			
	3	0,097	0,242	0,411	0,957	2,67	4,99	9,8			
	4	0,086	0,231	0,439	0,897	2,13	4,14	8,4			
	5	0,037	0,212	0,484	1,01	2,42	5,17	10,6			
	6	0,141	0,266	0,475	0,8	1,87	3,58	7,3			
Mittelwert		0,089	0,235	0,453	0,939	2,267	4,422	9,07			
SD		0,0346	0,019	0,0357	0,0951	0,3045	0,6404	1,3469			
Varianz		0,0012	0,0004	0,0013	0,009	0,0927	0,4101	1,8142			
Werte		6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0			
Ausreisser-Test nach Grubbs											
Extremwert		0,141	0,266	0,411	0,8	2,67	3,58	7,3			
Prüfwert		1,513	1,654	1,185	1,46	1,324	1,314	1,314			
Signifikanz 95%											
Tabellenwert		1,822	1,822	1,822	1,822	1,822	1,822	1,822			
Straggler?		nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein			
Signifikanz 99%											
Tabellenwert		1,944	1,944	1,944	1,944	1,944	1,944	1,944			
Ausreißer?		nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein			
Cochran-Test (Varianzhomogenität) (Signifikanz 99%)		Mandel-F-Test auf Linearität (Signifikanz 99%)			Lineare Kalibrationsfunktion Y = a·x + b			Quadratische Kalibrationsfunktion Y = A·x ² + B·x + C			
Prüfwert		0,779	Prüfwert		4,09	a		0,00903	A		0,0
Tabellenwert		0,4866	Tabellenwert		21,19	b		0,00033	B		0,008708
Bestanden?		nein	Bestanden?		ja	R		0,9999	C		0,027079
						Rest-SD		0,0485	R		1,0
									Rest-SD		0,0381

1.2 QUALIFIER		Messsignal: PEth2						Messgröße: arearatio		Einheit: ng/mL	
Konzentration		10,0	25,0	50,0	100,0	250,0	500,0	1000,0			
MESSUNG	1	0,041	0,154	0,347	0,629	1,240	3,480	6,240			
	2	0,099	0,197	0,591	1,090	3,530	9,600	15,200			
	3	0,047	0,289	0,743	1,780	5,590	9,370	20,500			
	4	0,067	0,113	0,209	0,470	1,030	2,260	4,110			
	5	0,020	0,209	0,403	0,874	2,530	5,890	10,700			
	6	0,097	0,173	0,317	0,647	1,520	2,850	5,670			
Mittelwert		0,062	0,189	0,435	0,915	2,573	5,575	10,40333333			
SD		0,032	0,06	0,196	0,476	1,749	3,271	6,393			
Varianz		0,001	0,004	0,039	0,226	3,057	10,70115	40,87650667			
Werte		6	6	6	6	6	6	6			
Extremwert											
Prüfwert		0,020	0,289	0,743	1,780	5,590	9,600	20,500			
Prüfwert		1,321	1,677	1,568	1,818	1,725	1,230	1,579			
Tabellenwert											
Straggler?		nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein			
Tabellenwert											
Ausreißer?		nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein			
Cochran-Test (Varianzhomogenität) (Signifikanz 99%)		Mandel-F-Test auf Linearität (Signifikanz 99%)			Lineare Kalibrationsfunktion Y = a·x + b			Quadratische Kalibrationsfunktion Y = A·x ² + B·x + C			
Prüfwert		0,7445	Prüfwert		5,07	a		0,010599	A		-0,000001
Tabellenwert		0,4866	Tabellenwert		21,19	b		-0,05090	B		0,011763
Bestanden?		nein	Linear?		ja	R		0,9992	C		-0,147783
						Rest-SD		0,1671	R		0,9997
									Rest-SD		0,124

Präzision

QC-Sollwert:		30		Einheit:		ng/mL					
MESSUNG		Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8	Tag 9	Tag 10
	1	27,1	34,5	34,2	32,7	26,7	24,6	34	27,6		
	2	27,2	29,6	29,2	29,9	31	28,1	30,5	30		
	3										
	4										
	5										
	6										
	7										
	8										
	9										
10											
Mittelwert		27,15	32,05	31,70	31,30	28,85	26,35	32,25	28,80		
BIAS, %		-9,5	6,8	5,7	4,3	-3,8	-12,2	7,5	-4,0		
SD		0,07	3,46	3,54	1,98	3,04	2,47	2,47	1,70		
RSD, %		0,3	10,8	11,2	6,3	10,5	9,4	7,7	5,9		

Kenndaten	OK	Wiederholpräzision		Laborpräzision	
MW (ges.)	29,81	SD	2,57	SD	2,95
SD	2,92	RSD, %	8,6	RSD, %	9,9
RSD, %	9,8				

Richtigkeit		95%-Intervall	OK
Abw.	-0,19	Faktor	2,338
Bias, %	-0,6	β -Toleranz	22,72 bis 36,51
		Prüfbereich (30%)	21,00 bis 39,00
		Prüfbereich (40%)	18,00 bis 42,00

QC-Sollwert:		300		Einheit:		ng/mL					
MESSUNG		Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8	Tag 9	Tag 10
	1	327,0	296,0	286,0	265,0	251,0	263,0	279,0	317,0		
	2	278,0	339,0	309,0	273,0	326,0	305,0	280,0	260,0		
	3										
	4										
	5										
	6										
	7										
	8										
	9										
10											
Mittelwert		302,50	317,50	297,50	269,00	288,50	284,00	279,50	288,50		
BIAS, %		0,8	5,8	-0,8	-10,3	-3,8	-5,3	-6,8	-3,8		
SD		34,65	30,41	16,26	5,66	53,03	29,70	0,71	40,31		
RSD, %		11,5	9,6	5,5	2,1	18,4	10,5	0,3	14,0		

Kenndaten	OK	Wiederholpräzision		Laborpräzision	
MW (ges.)	290,88	SD	31,10667131	SD	31,10667131
SD	26,89454715	RSD, %	10,69417149	RSD, %	10,7
RSD, %	9,2				

Richtigkeit		95%-Intervall	OK
Abw.	-9,13	Faktor	2,247
Bias, %	-3,0	β -Toleranz	212,12 bis 351,94
		Prüfbereich (30%)	210,00 bis 390,00

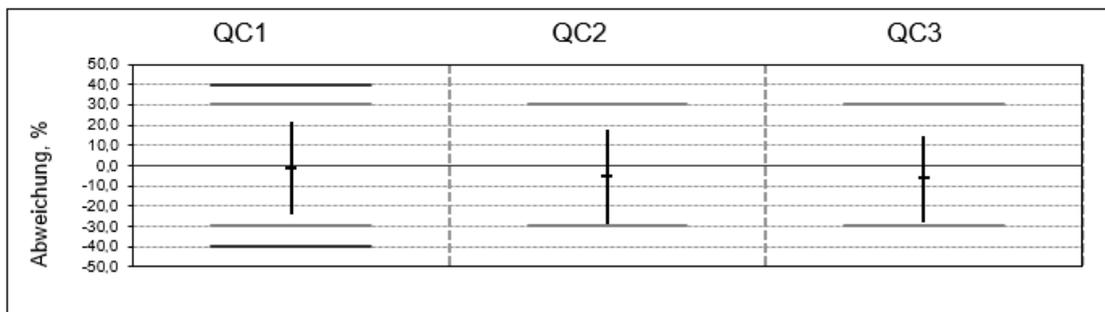
QC-Sollwert: Einheit:

	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8	Tag 9	Tag 10
1	808,0	655,0	635,0	864,0	811,0	905,0	774,0	748,0		
2	744,0	731,0	774,0	783,0	875,0	739,0	731,0	790,0		
3										
4										
5										
6										
7										
8										
9										
10										

Mittelwert	776,0	693,0	704,5	823,5	843,0	822,0	752,5	769,0		
BIAS, %	-3,0	-13,4	-11,9	2,9	5,4	2,8	-5,9	-3,9		
SD	45,25	53,74	98,29	57,28	45,25	117,38	30,41	29,70		
RSD, %	5,8	7,8	14,0	7,0	5,4	14,3	4,0	3,9		

Kenndaten	OK	Wiederholpräzision	Laborpräzision
MW (ges.)	772,94	SD	66,62
SD	72,24	RSD, %	8,6
RSD, %	9,3		

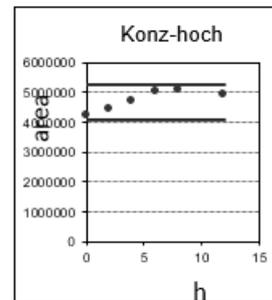
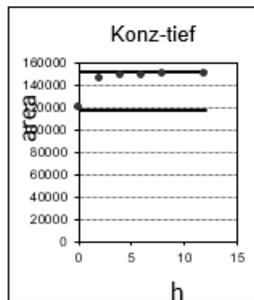
Richtigkeit	95%-Intervall	OK	
Abw.	-27,06	Faktor	2,336
Bias, %	-3,4	β -Toleranz	577,17 bis 916,42
		Prüfbereich (30%)	560,00 bis 1040,00



Zusammenfassung	QC1	QC2	QC3
β -Toleranz	22,72 bis 36,51	212,12 bis 351,94	577,17 bis 916,42
%	- 24,3 bis 21,7	-29,3 bis 17,3	-27,9 bis 14,6
Prüfbereich (30%)	21,00 bis 39,00	210,00 bis 390,00	560,00 bis 1040,00
Prüfbereich (40%)	18,00 bis 42,00		

Stabilität

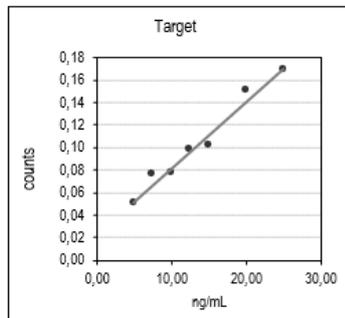
MESSUNG	Konz-tief		Konz-hoch	
	Zeit h	QC-Pool area	Zeit h	QC-Pool area
	0,00	120000	0,00	4230000
	2,00	146000	2,00	4460000
	4,00	148000	4,00	4710000
	6,00	148000	6,00	5010000
	8,00	150000	8,00	5090000
	12,00	150000	12,00	4900000
Werte	6		6	
min. Wert	120000	area	4230000	area
max. Wert	150000	area	5090000	area
Spanne	30000	area	860000	area
Spanne, %	20,0	%	16,9	%
Prüfwert	25,0	%	25,0	%
Steigung	0,0003		0,0000	
Abschnitt	-31,3893		-44,2985	
R	0,69163		0,81231	
Beurteilung	OK		OK	



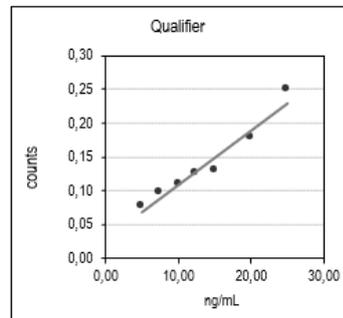
Kriterium: Spanne < Prüfwert

Grenzwerte

Einheit	Kalibrator ng/mL	Target Konzentration	Qualifier Konzentration
1	5,0	0,049	0,076
2	7,5	0,075	0,097
3	10,0	0,076	0,109
4	12,5	0,097	0,124
5	15	0,101	0,128
6	20	0,149	0,177
7	25	0,168	0,248
8			
9			
10			



Lineare Kalibration
Y = 0,00594 · X + 0,02147



Lineare Kalibration
Y = 0,00802 · X + 0,02820

Messungen	2	2
Signifikanz	99	99
k-Wert	3	3
Ausreißer-F-Test		
Kalibrator Nr.	5	5
Prüfwert	2,63	3,33
Krit.-Wert 99%	21,19	21,19
Ausreißer	nein	nein
Linearitäts-Mandel-Test		
Prüfwert	0,05	11,69
Krit.-Wert 99%	21,19	21,19
Bestanden?	ja	ja

a	0,00594	0,008018
b	0,021473	0,028196
R	0,9873	0,9729
Rest-SD	0,007	0,0147

Grenzwerte		
Nachweisgrenze	4,69	6,93
Erfassungsgrenze	9,37	13,87
Bestimmungsgrenze	12,04	20,08

Matrixeffekte und Wiederfindung

		QC1 30 ng/mL			QC2 800 ng/mL		
		Reinsubstanz	Extrakt	Matrix	Reinsubstanz	Extrakt	Matrix
		Konzentration	Konzentration	Konzentration	Konzentration	Konzentration	Konzentration
MESSUNG		2,01	1,76	1,57	39,6	31,3	33,7
		1,73	1,83	1,8	46,2	43,8	31,8
		1,7	1,73	1,72	36,8	38,5	39,7
		2,06	2,55	2,46	41,2	41,5	35,7
		2,05	1,97	1,83	43,1	38,3	43,4
		3,84	2,29	1,83	69,6	53,2	53,2
Mittelwert		2,231667	2,021667	1,868333	46,08333333	41,1	39,58333333
SD		0,804075	0,329874	0,306164	11,94996513	7,273239	7,877415
Varianz		0,646537	0,108817	0,093737	142,8	52,9	62,05366667
Anzahl		6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
Wiederfindung, %		92,4			96,3		
RSD, %		7,3			15,1		
Matrixeffekt, %		90,6			89,2		
RSD, %		21,4			11,4		
Beurteilung		Ok			Ok		
Kriterium:		Recovery >=50%					
		SD <=25%					
		Matrixeffekte: 75-125%					

**Genauigkeit der Bestimmung von Werten > 1000 ng/mL über die Kalibrationsgeraden 10 –
1000 ng/mL**

Messung 1

Zielkonzentration [ng/mL]	EtG [%]	EtS [%]	NAcT [%]	PEth [%]
2000	101	101	108	109
5000	91.7	92.8	88.6	101
10000	97.5	99.9	90.4	83.7
20000	101	98.3	90.5	67,0
40000	104	107	95.1	60.2

Messung 2

Zielkonzentration [ng/mL]	EtG [%]	EtS [%]	NAcT [%]	PEth [%]
2000	107	102	97.9	120
5000	112	103	100	106
10000	109	99.2	93.4	100
20000	100	96.1	88.9	90.6
40000	103	100	90.2	59.3

Erweiterte Validierung: Postmortale Proben**Rohdaten der gemessenen Fälle**

Bei den Angaben zur BAK handelt es sich für die GC- und ADH-Werte um die Mittelwerte

Fall	EtG 1 [ng/mL]	EtG 2 [ng/mL]	EtS 1 [ng/mL]	EtS 2 [ng/mL]	PEth 1 [ng/mL]	PEth 2 [ng/mL]	BAK GC [‰]	BAK ADH [‰]	MW [‰]
1	ca. 4280	ca. 4150	747	735	765	515	2,11	2,15	2,13
2	ca. 9050	ca. 9230	ca. 1680	ca. 1630	ca. 2030	ca. 1160	2,13	2,14	2,14
3	ca. 3220	ca. 3200	495	498	ca. 7620	ca. 4450	1,72	1,76	1,74
4	ca. 9710	ca. 9210	ca. 2550	ca. 2550	ca. 1480	928	3,69	3,65	3,67
5	ca. 2620	ca. 2260	834	796	ca. 1290	630	1,69	1,63	1,66
6	ca. 8360	ca. 8320	ca. 2380	ca. 2330	ca. 2880	ca. 1460	2,61	2,50	2,56
7	ca. 11400	ca. 11700	ca. 1710	ca. 1710	ca. 4290	ca. 2240	2,31	2,24	2,28
8	ca. 9400	ca. 8060	ca. 1080	809	nn	nn	1,60	1,53	1,57
9	ca. 21900	ca. 23300	ca.2730	ca. 2470	ca. 4850	ca. 2210	3,54	3,58	3,56
10	ca. 1210	ca. 1490	420	402	ca. 2410	ca. 1340	1,37	1,29	1,33
11	ca. 10000	ca. 10000	nn	nn	567	170	2,08	2,17	2,13
12	ca. 29100	ca. 28700	ca. 3690	ca. 3670	728	302	3,74	3,78	3,76
13	ca. 4100	ca. 4280	673	670	0	nn	1,29	1,40	1,35
14	nn	nn	nn	nn	nn	nn	1,10	1,14	1,12
15	ca. 35300	ca. 32500	nn	nn	nn	nn	2,48	2,46	2,47
16	ca. 10300	ca. 10200	ca. 1170	ca. 1250	ca. 1840	ca. 1070	1,70	1,73	1,72
17	ca. 12100	ca. 11700	ca. 2140	ca. 2110	848	450	1,99	2,07	2,03
18	ca. 12600	ca. 11900	nn	nn	nn	nn	1,39	1,37	1,38
19	ca. 3430	ca. 3490	850	814	ca. 1740	893	2,84	2,84	2,84
20	ca. 4690	ca. 5060	879	878	ca. 2170	ca. 1290	2,17	2,14	2,16
21	ca. 15500	ca. 14400	ca. 1390	ca. 1390	ca. 3140	ca. 1930	1,76	1,73	1,75
22	ca. 42400	ca. 33400	ca. 1510	ca. 1360	60,5	29,7	3,30	3,24	3,27
23	ca. 21600	ca. 21400	ca. 3060	ca. 3060	ca. 2690	ca. 1600	1,73	1,40	1,57
24	ca. 5190	ca. 5770	ca. 1130	ca. 1110	ca. 3420	ca. 1800	1,64	1,67	1,66
25	ca. 8790	ca. 7310	ca. 1480	ca. 1510	ca. 1400	643	1,98	2,13	2,06
26	ca. 55400	ca. 54700	ca. 5710	ca. 5560	ca. 2210	996	2,46	2,63	2,55
27	ca. 23500	ca. 22300	ca. 2350	ca. 2230	467	235	1,50	1,48	1,49
28	ca. 1440	ca. 1570	ca. 550	506	604	295	1,81	1,69	1,75
29	ca. 16100	ca. 14900	ca. 1570	ca. 1490	616	260	2,10	2,17	2,14
30	ca. 4500	ca. 4940	ca. 1260	ca. 1250	ca. 2670	ca. 1390	2,10	1,99	2,05
31	ca. 10700	ca. 9950	ca. 1300	ca. 1290	122	40,1	1,97	1,83	1,90

AUDIT-Fragebogen

Patientenname:

Geburtsdatum:

Alcohol Use Disorders Identification Test (AUDIT)

Das Trinken von Alkohol kann Ihre Gesundheit und einige Medikationen beeinflussen. Bitte helfen Sie uns bei der Einschätzung Ihrer Trinkgewohnheiten durch Beantwortung der folgenden Fragen.

Ein alkoholisches Getränk entspricht:

0,33 Liter Bier

0,25 Liter Wein oder Sekt

0,02 Liter Spirituosen

1. Wie oft trinken Sie alkoholische Getränke?	Nie	Einmal monatlich oder weniger	2-4mal monatlich	2-3mal wöchentlich	4mal oder mehrmals wöchentlich
2. Wenn Sie an einem Tag Alkohol trinken, wie viel alkoholhaltige Getränke trinken Sie dann typischerweise?	0 bis 2	3 bis 4	5 bis 6	7 bis 9	10 und mehr
3. Wie oft haben Sie 5 oder mehr alkoholische Getränke bei einer Gelegenheit getrunken?	Nie	Weniger als monatlich	Monatlich	Wöchentlich	Täglich oder fast täglich
4. Wie oft haben Sie im letzten Jahr festgestellt, dass Sie mehr getrunken haben, als Sie eigentlich wollten?	Nie	Weniger als monatlich	Monatlich	Wöchentlich	Täglich oder fast täglich
5. Wie oft haben Sie im letzten Jahr im Zusammenhang mit dem Alkoholtrinken eine Aufgabe nicht erledigt, die man eigentlich von Ihnen erwartet hatte?	Nie	Weniger als monatlich	Monatlich	Wöchentlich	Täglich oder fast täglich
6. Wie oft haben Sie im letzten Jahr morgens Alkohol getrunken, um nach einem Trinkgelage in Schwung zu kommen?	Nie	Weniger als monatlich	Monatlich	Wöchentlich	Täglich oder fast täglich
7. Wie oft im letzten Jahr hatten Sie ein Gefühl von Schuld oder Reue nach dem Trinken?	Nie	Weniger als monatlich	Monatlich	Wöchentlich	Täglich oder fast täglich
8. Wie oft im letzten Jahr waren Sie aufgrund des Alkoholtrinkens nicht in der Lage, sich an Ereignisse der letzten Nacht zu erinnern?	Nie	Weniger als monatlich	Monatlich	Wöchentlich	Täglich oder fast täglich
9. Wurden Sie oder jemand anders schon einmal verletzt, weil Sie Alkohol getrunken hatten?	Nein	Ja, aber nicht im letzten Jahr	Ja, im letzten Jahr		
10. Hat sich ein Verwandter, ein Freund, ein Arzt oder jemand anders über Ihre Trinkgewohnheiten Sorgen gemacht oder Ihnen vorgeschlagen, weniger zu trinken?	Nein	Ja, aber nicht im letzten Jahr	Ja, im letzten Jahr		

Sind Sie wegen Alkoholproblemen in Behandlung gewesen?

Nein

Ja, im Moment

Ja, aber nicht im Moment

Individuelle Probandendaten aus den Trinkversuchen**Blutproben Trinkversuch I****Proband 1**

Zeit [h]	EtG 1 [ng/mL]	EtG 2 [ng/mL]	EtS 1 [ng/mL]	EtS 2 [ng/mL]	NAcT 1 [ng/mL]	NAcT 2 [ng/mL]	PEth 1 [ng/mL]	PEth 2 [ng/mL]
Leer	0	0	0	0	0	0	0	0
0	146	147	166	174	49	47,4	0	0
0,5	244	234	211	222	50,8	49,7	0	0
1,0	356	368	238	237	27,2	24,8	0	0
2,0	443	426	259	270	16,3	15,7	0	0
3,0	629	612	302	321	50,4	51	0	0
4,0	442	461	175	180	11,3	11,9	0	0
24	0	0	0	0	0	0	0	0
72	0	0	0	0	13,8	14,3	0	0
168	0	0	0	0	16,2	16,9	0	0

Proband 2

Zeit [h]	EtG 1 [ng/mL]	EtG 2 [ng/mL]	EtS 1 [ng/mL]	EtS 2 [ng/mL]	NAcT 1 [ng/mL]	NAcT 2 [ng/mL]	PEth 1 [ng/mL]	PEth 2 [ng/mL]
Leer	0	0	0	0	24,5	23	0	0
0	92,9	88,4	128	129	43	42,8	20,2	10,6
0,5	168	169	172	176	52,3	51,2	31	16
1,0	220	213	179	183	52,8	53,2	15	0
2,0	316	316	222	240	59,5	58,9	19,9	0
3,0	421	372	204	212	60,1	61,3	17,9	0
4,0	409	411	179	178	66,2	63,5	0	0
24	0	0	0	0	36,8	35,5	0	0
72	0	0	0	0	35	34,8	0	0
168	0	0	0	0	58,4	58,4	0	0

Proband 3

Zeit [h]	EtG 1 [ng/mL]	EtG 2 [ng/mL]	EtS 1 [ng/mL]	EtS 2 [ng/mL]	NACt 1 [ng/mL]	NACt 2 [ng/mL]	PEth 1 [ng/mL]	PEth2 [ng/mL]
Leer	0	0	0	0	48	46	0	0
0	462	487	156	153	55,9	52,3	27	24,1
0,5	897	979	230	224	72,2	71	27,8	25,2
1,0	ca. 1570	ca. 1620	307	308	64,1	65,2	31,4	21,9
2,0	ca. 2460	ca. 2360	325	329	66,9	67	33,8	25,7
3,0	ca. 2830	ca. 2910	342	309	53,4	49,2	39,3	30,6
4,0	ca. 3230	ca. 3340	300	295	51,5	52,7	31,5	20,9
24	43,9	29	0	0	39,3	37,9	14,2	13,1
72	0	0	0	0	40,7	36,2	0	0
168	0	0	0	0	40,6	39,3	0	0

Proband 4

Zeit [h]	EtG 1 [ng/mL]	EtG 2 [ng/mL]	EtS 1 [ng/mL]	EtS 2 [ng/mL]	NACt 1 [ng/mL]	NACt 2 [ng/mL]	PEth 1 [ng/mL]	PEth 2 [ng/mL]
Leer	0	0	0	0	57,1	56,7	0	0
0	675	704	175	179	71,1	68,9	15,6	13,4
0,5	989	ca. 1100	226	221	82,2	79	21,6	17,6
1,0	ca. 1500	ca. 1580	289	274	83,1	82,3	15,7	12,5
2,0	ca. 2140	ca. 2290	321	308	75,7	70,4	25,3	20,9
3,0	ca. 2480	ca. 2630	309	306	70,4	65,5	13,9	11,7
4,0	ca. 3010	ca. 3020	347	335	81,4	74,7	40,2	24,6
24	63,5	63,2	0	0	63,4	61,1	15,8	11,9
72	0	0	0	0	67,5	67,3	0	0
168	0	0	0	0	56,7	53	0	0

Proband 5

Zeit [h]	EtG 1 [ng/mL]	EtG 2 [ng/mL]	EtS 1 [ng/mL]	EtS 2 [ng/mL]	NAcT 1 [ng/mL]	NAcT 2 [ng/mL]	PEth 1 [ng/mL]	PEth 2 [ng/mL]
Leer	0	0	0	0	0	0	32,8	24,4
0	653	648	127	122	29,9	27,6	75,8	47,8
0,5	ca. 1080	ca. 1180	171	166	19,6	19,1	87,7	53,4
1,0	ca. 1210	ca. 1220	179	173	18,6	14,5	85,9	52,9
2,0	ca. 1880	ca. 1970	223	215	29,2	27,4	89,7	55,6
3,0	ca. 2230	ca. 2270	229	221	31,3	28,2	91	59,6
4,0	ca. 2460	ca. 2730	230	221	44,3	44,2	98,3	61,2
24	29,2	13	0	0	20,4	17,2	66	36,5
72	0	0	0	0	21,1	18,2	50,1	26,7
168	0	0	0	0	20,8	16,5	36,4	22,2

Proband 6

Zeit [h]	EtG 1 [ng/mL]	EtG 2 [ng/mL]	EtS 1 [ng/mL]	EtS 2 [ng/mL]	NAcT 1 [ng/mL]	NAcT 2 [ng/mL]	PEth 1 [ng/mL]	PEth 2 [ng/mL]
Leer	0	0	0	0	27,5	26,5	44,7	27,8
0	373	391	181	169	35,7	33,4	99	54,9
0,5	840	922	308	292	49,6	48	86,5	59,3
1,0	ca. 1290	ca. 1310	389	373	44,8	43,1	102	57,3
2,0	ca. 2080	ca. 2130	485	476	45,7	46,8	109	62,4
3,0	ca. 2130	ca. 2060	513	481	48,5	46,4	110	59,4
4,0	ca. 3000	ca. 2960	535	519	49,5	45,6	164	97,6
24	24	26,6	0	0	40,6	36,6	77,9	49,9
72	0	0	0	0	64,3	58,2	57,6	34,7
168	0	0	0	0	47,7	45	35,7	26,1

Proband 7

Zeit [h]	EtG 1 [ng/mL]	EtG 2 [ng/mL]	EtS 1 [ng/mL]	EtS 2 [ng/mL]	NACt 1 [ng/mL]	NACt 2 [ng/mL]	PEth 1 [ng/mL]	PEth 2 [ng/mL]
Leer	0	0	0	0	38	32,1	20,7	15
0	611	642	151	142	48,7	44,4	55,6	35,6
0,5	ca. 1450	ca. 1480	252	253	77,4	76,6	54,5	36,9
1,0	ca. 2010	ca. 1970	295	289	61,7	60	64,6	35,1
2,0	ca.2490	ca.2560	320	299	61,6	56,9	58,3	35,4
3,0	ca. 2880	ca. 3050	309	303	53,5	46,5	69,3	38,8
4,0	ca. 2840	ca. 2980	295	279	57	51,3	63,8	38,6
24	ca. 29,4	0	0	0	59,9	56	55,5	31,1
72	0	0	0	0	72,7	72,3	30,8	21,3
168	0	0	0	0	33,2	29,1	16,3	12,3

Proband 8

Zeit [h]	EtG 1 [ng/mL]	EtG 2 [ng/mL]	EtS 1 [ng/mL]	EtS 2 [ng/mL]	NACt 1 [ng/mL]	NACt 2 [ng/mL]	PEth 1 [ng/mL]	PEth 2 [ng/mL]
Leer	0	0	0	0	14,6	11,1	0	0
0	730	779	173	169	31	30,3	27,2	14,6
0,5	ca. 1460	ca. 1590	257	255	60,8	53,9	28,7	21,1
1,0	ca. 1990	ca. 2130	308	303	40,7	36,4	39,3	22
2,0	ca. 2700	ca. 2690	338	322	61,8	55,3	26,5	15,4
3,0	ca. 2800	ca. 2980	330	322	52,4	54,9	31,7	21,9
4,0	ca. 3050	ca. 3080	338	338	55,8	50,7	33,9	19
24	25,7	30,7	0	0	28,8	25	13,9	8,53
72	0	0	0	0	27,8	25,5	0	0
168	0	0	0	0	25,3	22	0	0

Proband 9

Zeit [h]	EtG 1 [ng/mL]	EtG 2 [ng/mL]	EtS 1 [ng/mL]	EtS 2 [ng/mL]	NAcT 1 [ng/mL]	NAcT 2 [ng/mL]	PEth 1 [ng/mL]	PEth 2 [ng/mL]
Leer	0	0	0	0	20,3	18,8	0	0
0	423	430	152	143	37,3	33,2	10,9	0
0,5	962	990	238	232	38,5	36,1	18,7	12,6
1,0	ca. 1490	ca. 1670	287	291	35,3	32,3	18,3	0
2,0	ca. 2430	ca. 2450	341	313	43,7	42	21,7	11,7
3,0	ca.2750	ca. 2890	329	325	45,9	43,4	25,1	13,8
4,0	ca. 2920	ca. 2970	335	329	40,5	43,8	28,1	17,2
24	17,5	0	0	0	32,9	31,7	16	0
72	0	0	0	0	47,5	47,6	0	0
168	0	0	0	0	37,7	32,6	0	0

Blutproben Trinkversuch IIProband 1

Zeit [h]	EtG 1 [ng/mL]	EtG 2 [ng/mL]	EtS 1 [ng/mL]	EtS 2 [ng/mL]	NAcT 1 [ng/mL]	NAcT 2 [ng/mL]	PEth 1 [ng/mL]	PEth 2 [ng/mL]
Leer	0	0	0	0	15,4	14,6	0	0
0	159	181	39,5	41,1	28,3	29,4	38,8	25,3
0,5	435	407	80,2	77,6	33,9	35,4	35,5	27,0
1,0	636	639	106	98,7	43,8	41,7	38,3	17,1
2,0	823	837	119	118	39,6	38,4	14,9	11,4
3,0	851	826	93,0	92,2	46,7	46,2	0	0
4,0	809	756	68,0	64,8	41,0	42,7	0	0
24	0	0	0	0	33,2	33,5	0	0
72	0	0	0	0	40,2	40,4	0	0
168	0	0	0	0	42,0	39,0	0	0

Proband 2

Zeit [h]	EtG 1 [ng/mL]	EtG 2 [ng/mL]	EtS 1 [ng/mL]	EtS 2 [ng/mL]	NAcT 1 [ng/mL]	NAcT 2 [ng/mL]	PEth 1 [ng/mL]	PEth 2 [ng/mL]
Leer	0	0	0	0	30,0	28,4	27,3	12,8
0	139	125	44,4	42,3	43,0	44,3	60,8	36,5
0,5	347	336	85,7	86,6	49,2	49,3	54,6	30,9
1,0	503	457	105	98,5	54,4	59,9	39,9	27,6
2,0	764	743	106	101	68,8	61,4	40,2	27,2
3,0	771	756	76,8	77,8	74,9	70,9	35,4	24,8
4,0	669	715	57,7	59,0	86,8	87,2	26,1	18,9
24	0	0	0	0	71,1	73,0	27,4	20,2
72	0	0	0	0	84,9	82,5	28,0	21,3
168	0	0	0	0	109	105	17,1	11,9

Proband 3

Zeit [h]	EtG 1 [ng/mL]	EtG 2 [ng/mL]	EtS 1 [ng/mL]	EtS 2 [ng/mL]	NAcT 1 [ng/mL]	NAcT 2 [ng/mL]	PEth 1 [ng/mL]	PEth 2 [ng/mL]
Leer	0	0	0	0	0	0	0	0
0	248	294	85,9	87,3	12,8	10,7	59,5	40,7
0,5	504	482	128	129	20,4	17,8	50,5	31,6
1,0	726	644	153	151	21,6	20,4	72,6	50,5
2,0	945	775	135	134	32,8	29,6	42,6	36,7
3,0	762	709	83,2	83,2	38,5	34,1	15,3	0
4,0	603	661	56,9	57,4	39,6	37,6	14,5	0
24	0	0	0	0	31,5	31,7	11,5	0
72	0	0	0	0	32,0	30,5	0	0
168	0	0	0	0	31,7	32,1	0	0

Proband 4

Zeit [h]	EtG 1 [ng/mL]	EtG 2 [ng/mL]	EtS 1 [ng/mL]	EtS 2 [ng/mL]	NAcT 1 [ng/mL]	NAcT 2 [ng/mL]	PEth 1 [ng/mL]	PEth 2 [ng/mL]
Leer	0	0	0	0	30,4	25,9	0	0
0	188	170	59,5	62,0	30,3	35,5	17,0	0
0,5	393	392	86,7	86,3	41,7	41,5	38,6	26,8
1,0	551	533	112	107	44,9	46,2	33,1	17,3
2,0	886	767	123	113	55,5	47,7	33,5	18,3
3,0	795	715	101	100	37,3	35,8	17,3	0
4,0	737	769	69,3	68,8	45,9	39,3	10,3	0
24	0	0	0	0	40,8	40,7	0	0
72	0	0	0	0	57,4	54,9	0	0
168	0	0	0	0	42,2	48,9	0	0

Proband 5

Zeit [h]	EtG 1 [ng/mL]	EtG 2 [ng/mL]	EtS 1 [ng/mL]	EtS 2 [ng/mL]	NAcT 1 [ng/mL]	NAcT 2 [ng/mL]	PEth 1 [ng/mL]	PEth 2 [ng/mL]
Leer	0	0	0	0	11,3	10,8	46,2	33,3
0	130	135	26,4	28,3	27,8	24,8	107	94,1
0,5	274	281	47,2	50,9	25,2	27,4	105	93,9
1,0	478	387	62,2	62,1	38,3	32,5	107	97,3
2,0	621	596	66,8	67,6	39,8	39,5	91,2	76,3
3,0	601	593	49,5	52,8	33,1	34,1	55,6	41,3
4,0	514	474	39,1	37,8	31,3	28,2	50,6	38,0
24	0	0	0	0	33,4	31,7	47,3	37,8
72	0	0	0	0	23,6	22,7	33,3	23,0
168	0	0	0	0	35,6	33,1	22,8	20,9

Proband 6

Zeit [h]	EtG 1 [ng/mL]	EtG 2 [ng/mL]	EtS 1 [ng/mL]	EtS 2 [ng/mL]	NAcT 1 [ng/mL]	NAcT 2 [ng/mL]	PEth 1 [ng/mL]	PEth 2 [ng/mL]
Leer	0	0	0	0	0	0	0	0
0	374	427	98,7	92,3	28,9	24,1	94,1	109
0,5	686	599	110	102	25,7	26,7	98,8	110
1,0	768	757	105	102	35,6	38,5	57,0	57,0
2,0	916	868	80,4	81,0	42,3	37,4	38,0	34,2
3,0	879	795	26,6	26,1	4,78	5,85	21,5	17,1
4,0	686	758	41,0	42,9	40,9	35,2	14,0	10,5
24	0	0	0	0	28,9	33,4	11,4	0
72	0	0	0	0	32,9	30,8	0	0
168	0	0	0	0	46,4	37,7	0	0

Proband 7

Zeit [h]	EtG 1 [ng/mL]	EtG 2 [ng/mL]	EtS 1 [ng/mL]	EtS 2 [ng/mL]	NAcT 1 [ng/mL]	NAcT 2 [ng/mL]	PEth 1 [ng/mL]	PEth 2 [ng/mL]
Leer	0	0	0	0	18,4	19,7	28,3	26,6
0	353	372	88,6	87,7	24,1	21,6	71,2	61,9
0,5	689	656	115	114	37,3	34,8	88,7	78,6
1,0	1030	831	127	124	42,8	39,4	69,5	73,0
2,0	1130	1100	127	120	38,1	41,4	76,8	76,5
3,0	1160	1020	97,6	95,1	62,0	67,1	46,9	41,6
4,0	962	913	68,8	66,7	55,1	57,0	38,4	37,7
24	0	0	0	0	64,2	59,2	33,3	33,1
72	0	0	0	0	49,6	49,7	29,0	19,1
168	0	0	0	0	70,5	74,3	17,6	15,1

Proband 8

Zeit [h]	EtG 1 [ng/mL]	EtG 2 [ng/mL]	EtS 1 [ng/mL]	EtS 2 [ng/mL]	NAcT 1 [ng/mL]	NAcT 2 [ng/mL]	PEth 1 [ng/mL]	PEth 2 [ng/mL]
Leer	0	0	0	0	60,4	63,9	10,3	0
0	603	563	121	119	79,0	78,5	90,6	85,7
0,5	916	852	139	141	75,6	68,7	86,2	91,6
1,0	1110	1050	155	148	79,9	80,1	75,0	69,3
2,0	1320	1240	149	145	100	91,6	57,2	57,5
3,0	1290	1210	113	113	80,5	77,4	34,7	38,1
4,0	1090	977	90,9	89,2	82,9	79,7	28,7	25,9
24	0	0	0	0	44,3	45,9	23,3	20,1
72	0	0	0	0	84,8	85,3	22,5	22,4
168	0	0	0	0	87,4	84,8	0	0

Urinproben Trinkversuch I

Ist in den Tabellen ein „-“ vermerkt, konnte für den entsprechenden Zeitpunkt kein Probenmaterial generiert werden. Bei Werten von „9999 ng/mL“ unter der Spalte „EtG AU“ überschritten die gemessenen Werte den vorgegebenen Kalibrationsbereich.

Proband 1

Zeit [h]	EtG 1 [ng/mL]	EtG 2 [ng/mL]	EtS 1 [ng/mL]	EtS 2 [ng/mL]	Kreatinin [mg/dL]	EtG AU [ng/mL]	Verhältnis Kreatinin	c _{End} EtG 1 [ng/mL]	c _{End} EtS 1 [ng/mL]
Leer	0	0	0	0	565	41,0	0,177	0	0
0	5670	4780	2900	2950	54,0	9999	1,85	10500	5370
0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1,0	9230	8050	3580	3760	19,0	9999	5,26	48579	18842
2,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	1930	1610	158	167	86,0	1516	1,16	2244	184
72	0	0	0	0	75,0	99	1,33	0	0
168	0	0	0	0	454	143	0,220	0	0

Proband 2

Zeit [h]	EtG 1 [ng/mL]	EtG 2 [ng/mL]	EtS 1 [ng/mL]	EtS 2 [ng/mL]	Kreatinin [mg/dL]	EtG AU [ng/mL]	Verhältnis Kreatinin	c _{End} EtG 1 [ng/mL]	c _{End} EtS 1 [ng/mL]
Leer	0	0	0	0	24,0	31,0	4,17	0	0
0	202	190	129	124	19,0	838	5,26	1063	679
0,5	2830	2380	1470	1450	16,0	9999	6,25	17688	9188
1,0	5340	4990	2380	2440	15,0	9999	6,67	35600	15867
2,0	7790	6730	2760	2900	16,0	9999	6,25	48688	17250
3,0	10100	8940	2900	2980	17,0	9999	5,88	59412	17059
4,0	6380	5990	1610	1670	13,0	9999	7,69	49077	12385
24	290	280	106	103	34,0	386	2,94	853	312
72	0	0	0	0	30,0	23,0	3,33	0	0
168	0	0	0	0	12,0	1,00	8,33	0	0

Proband 3

Zeit [h]	EtG 1 [ng/mL]	EtG 2 [ng/mL]	EtS 1 [ng/mL]	EtS 2 [ng/mL]	Kreatinin [mg/dL]	EtG AU [ng/mL]	Verhältnis Kreatinin	c _{End} EtG 1 [ng/mL]	c _{End} EtS 1 [ng/mL]
Leer	0	0	0	0	135	48,0	0,741	0	0
0	939	914	552	551	26,0	1110	3,85	3612	2123
0,5	2610	2440	1230	1260	12,0	9999	8,33	21750	10250
1,0	5180	4700	2110	2140	13,0	9999	7,69	39846	16231
2,0	16200	13700	5310	5460	33,0	9999	3,03	49091	16091
3,0	176000	146000	37000	42000	160	9999	0,625	110000	23125
4,0	268000	218000	48600	56700	227	9999	0,441	118062	21410
24	337	296	61,7	61,2	37,0	476	2,70	911	167
72	0	0	0	0	85,0	0	1,18	0	0
168	0	0	0	0	70,0	0	1,43	0	0

Proband 4

Zeit [h]	EtG 1 [ng/mL]	EtG 2 [ng/mL]	EtS 1 [ng/mL]	EtS 2 [ng/mL]	Kreatinin [mg/dL]	EtG AU [ng/mL]	Verhältnis Kreatinin	c _{End} EtG 1 [ng/mL]	c _{End} EtS 1 [ng/mL]
Leer	0	0	0	0	17,0	41	5,88	0	0
0	1210	1210	679	696	20,0	1682	5,00	6050	3395
0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1,0	10200	9690	4080	4250	24,0	9999	4,17	42500	17000
2,0	13300	11600	4330	4670	20,0	9999	5,00	66500	21650
3,0	14100	14500	4230	4440	21,0	9999	4,76	67143	20143
4,0	18600	17400	4840	5230	21,0	9999	4,76	88571	23048
24	1260	1180	548	541	58,0	1242	1,72	2172	945
72	0	0	0	0	62,0	0	1,61	0	0
168	0	0	3,25	0	67,0	0	1,49	0	4,85

Proband 5

Zeit [h]	EtG 1 [ng/mL]	EtG 2 [ng/mL]	EtS 1 [ng/mL]	EtS 2 [ng/mL]	Kreatinin [mg/dL]	EtG AU [ng/mL]	Verhältnis Kreatinin	c _{End} EtG 1 [ng/mL]	c _{End} EtS 1 [ng/mL]
Leer	0	0	0	0	299	74	0,334	0	0
0	1140	994	395	384	19,0	1397	5,26	6000	2079
0,5	4550	4070	1480	1570	16,0	9999	6,25	28438	9250
1,0	9680	9100	2750	2840	22,0	9999	4,55	44000	12500
2,0	13700	12200	3140	3330	24,0	9999	4,17	57083	13083
3,0	30000	26700	5870	6430	48,0	9999	2,08	62500	12229
4,0	104000	97100	18800	19900	104	9999	0,962	100000	18077
24	2850	3180	749	786	240	9999	0,417	1188	312
72	0	0	18,5	0	140	151	0,714	0	13,2
168	0	0	0	0	132	83,0	0,758	0	0

Proband 6

Zeit [h]	EtG 1 [ng/mL]	EtG 2 [ng/mL]	EtS 1 [ng/mL]	EtS 2 [ng/mL]	Kreatinin [mg/dL]	EtG AU [ng/mL]	Verhältnis Kreatinin	c _{End} EtG 1 [ng/mL]	c _{End} EtS 1 [ng/mL]
Leer	0	0	0	0	89,0	13,0	1,12	0	0
0	849	859	792	788	37,0	1011	2,70	2295	2141
0,5	2710	2200	2040	2010	16,0	9999	6,25	16938	12750
1,0	5210	4730	3230	3540	16,0	9999	6,25	32563	20188
2,0	7210	6320	3740	3610	15,0	9999	6,67	48067	24933
3,0	12300	10800	5650	5700	28,0	9999	3,57	43929	20179
4,0	66700	64200	26200	28800	105	9999	0,95	63524	24952
24	199	216	205	196	36,0	306	2,78	553	569
72	43,6	32	26,8	10,1	152	64,0	0,658	28,7	17,6
168	0	0	0	0	83,0	0	1,20	0	0

Proband 7

Zeit [h]	EtG 1 [ng/mL]	EtG 2 [ng/mL]	EtS 1 [ng/mL]	EtS 2 [ng/mL]	Kreatinin [mg/dL]	EtG AU [ng/mL]	Verhältnis Kreatinin	c _{End} EtG 1 [ng/mL]	c _{End} EtS 1 [ng/mL]
Leer	0	0	0	0	54,0	0	1,85	0	0
0	1670	1480	779	778	28,0	1624	3,57	5964	2782
0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,0	13900	11900	3720	3780	19,0	9999	5,26	73158	19579
3,0	51900	47400	13700	13800	59,0	9999	1,69	87966	23220
4,0	82600	74400	19200	21200	102	9999	0,980	80980	18824
24	1440	1320	630	780	240	1219	0,417	600	263
72	46,3	38,4	0	0	121	60,0	0,826	38,3	0
168	0	0	0	0	34,0	5,00	2,94	0	0

Proband 8

Zeit [h]	EtG 1 [ng/mL]	EtG 2 [ng/mL]	EtS 1 [ng/mL]	EtS 2 [ng/mL]	Kreatinin [mg/dL]	EtG AU [ng/mL]	Verhältnis Kreatinin	c _{End} EtG 1 [ng/mL]	c _{End} EtS 1 [ng/mL]
Leer	0	0	0	0	266	0	0,376	0	0
0	2850	2840	1450	1520	95,0	9999	1,05	3000	1526
0,5	3650	3360	1390	1420	19,0	9999	5,26	19211	7316
1,0	13100	12400	4490	4700	56,0	9999	1,79	23393	8018
2,0	95000	93600	24300	27500	146	9999	0,685	65068	16644
3,0	109000	92600	24300	26300	129	9999	0,775	84496	18837
4,0	100000	82900	22200	23500	160	9999	0,625	62500	13875
24	1600	1680	889	901	153	1231	0,654	1046	581
72	124	71,9	35,5	0	163	23,0	0,613	76,1	21,8
168	0	0	0	0	350	0	0,286	0	0

Proband 9

Zeit [h]	EtG 1 [ng/mL]	EtG 2 [ng/mL]	EtS 1 [ng/mL]	EtS 2 [ng/mL]	Kreatinin [mg/dL]	EtG AU [ng/mL]	Verhältnis Kreatinin	c _{End} EtG 1 [ng/mL]	c _{End} EtS 1 [ng/mL]
Leer	0	0	0	0	17,0	47,0	5,88	0	0
0	764	767	473	468	16,0	933	6,25	4775	2956
0,5	3020	2770	1430	1390	16,0	9999	6,25	18875	8938
1,0	5720	5080	2370	2370	17,0	9999	5,88	33647	13941
2,0	9940	8440	3650	3670	17,0	9999	5,88	58471	21471
3,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4,0	17600	16200	4770	4840	16,0	9999	6,25	110000	29813
24	682	735	574	571	111	626	0,901	614	517
72	0	0	0	0	25,0	30,0	4,00	0	0
168	0	0	0	0	72,0	6,00	1,39	0	0

Urinproben Trinkversuch II**Proband 1**

Zeit [h]	EtG 1 [ng/mL]	EtG 2 [ng/mL]	EtS 1 [ng/mL]	EtS 2 [ng/mL]	Kreatinin [mg/dL]	EtG AU [ng/mL]	Verhältnis Kreatinin	c_{End} EtG 1 [ng/mL]	c_{End} EtS 1 [ng/mL]
Leer	0	0	0	0	294	37,0	0,340	0	0
0	6610	5780	3290	3270	267	9999	0,375	2476	1232
0,5	24200	26800	13500	13800	155	9999	0,645	15613	8710
1,0	7880	7890	3270	2980	22,0	9999	4,55	35818	14864
2,0	6540	6980	2450	2410	15,0	9999	6,67	43600	16333
3,0	20000	17700	6230	5920	42,0	9999	2,38	47619	14833
4,0	18000	17800	4920	4980	46,0	9999	2,17	39130	10696
24	640	554	124	191	156	364	0,641	410	79,5
72	0	0	0	0	78,0	49,0	1,28	0	0
168	0	0	0	0	183	23,0	0,546	0	0

Proband 2

Zeit [h]	EtG 1 [ng/mL]	EtG 2 [ng/mL]	EtS 1 [ng/mL]	EtS 2 [ng/mL]	Kreatinin [mg/dL]	EtG AU [ng/mL]	Verhältnis Kreatinin	c_{End} EtG 1 [ng/mL]	c_{End} EtS 1 [ng/mL]
Leer	0	0	0	0	40,0	32,0	2,50	0	0
0	778	782	481	422	33,0	773	3,03	2358	1458
0,5	2640	2380	1470	1430	19,0	1885	5,26	13895	7737
1,0	4420	4430	2270	2060	17,0	9999	5,88	26000	13353
2,0	6300	5750	2620	2200	16,0	9999	6,25	39375	16375
3,0	4810	4810	1620	1520	12,0	9999	8,33	40083	13500
4,0	4380	4040	1050	923	12,0	9999	8,33	36500	8750
24	87,5	87,6	42,6	26,2	24,0	92,0	4,17	365	178
72	0	0	0	0	20,0	41,0	5,00	0	0
168	0	0	0	0	30,0	0	3,33	0	0

Proband 3

Zeit [h]	EtG 1 [ng/mL]	EtG 2 [ng/mL]	EtS 1 [ng/mL]	EtS 2 [ng/mL]	Kreatinin [mg/dL]	EtG AU [ng/mL]	Verhältnis Kreatinin	c _{End} EtG 1 [ng/mL]	c _{End} EtS 1 [ng/mL]
Leer	0	0	0	0	183	21,0	0,546	0	0
0	501	531	400	389	20,0	473	5,00	2505	2000
0,5	2590	2610	1940	1830	11,0	1921	9,09	23545	17636
1,0	7090	7090	4640	4520	31,0	9999	3,23	22871	14968
2,0	13500	11500	7040	6730	36,0	9999	2,78	37500	19556
3,0	38600	33100	15500	15300	104	9999	0,962	37115	14904
4,0	27500	27400	9530	8820	99,0	9999	1,01	27778	9626
24	127	72,4	61,0	57,7	57,0	15,0	1,75	223	107
72	0	0	0	0	30,0	0	3,33	0	0
168	0	0	0	0	98,0	0	1,02	0	0

Proband 4

Zeit [h]	EtG 1 [ng/mL]	EtG 2 [ng/mL]	EtS 1 [ng/mL]	EtS 2 [ng/mL]	Kreatinin [mg/dL]	EtG AU [ng/mL]	Verhältnis Kreatinin	c _{End} EtG 1 [ng/mL]	c _{End} EtS 1 [ng/mL]
Leer	0	0	0	0	20,0	0	5,00	0	0
0	6940	5370	4030	4050	228	9999	0,439	3044	1768
0,5	4860	4740	2500	2820	31,0	9999	3,23	15677	8065
1,0	1870	1890	927	901	11,0	9999	9,09	17000	8427
2,0	3240	2680	1040	1070	9,0	9999	11,11	36000	11556
3,0	8980	7730	2460	2790	22,0	9999	4,55	40818	11182
4,0	35200	28200	8610	9610	88,0	9999	1,14	40000	9784
24	26,4	0	22,6	21,1	27,0	38,0	3,70	97,8	83,7
72	0	0	0	0	50,0	31,0	2,00	0	0
168	0	0	0	0	221	26,0	0,452	0	0

Proband 5

Zeit [h]	EtG 1 [ng/mL]	EtG 2 [ng/mL]	EtS 1 [ng/mL]	EtS 2 [ng/mL]	Kreatinin [mg/dL]	EtG AU [ng/mL]	Verhältnis Kreatinin	c _{End} EtG 1 [ng/mL]	c _{End} EtS 1 [ng/mL]
Leer	0	0	0	0	262	61,0	0,382	0	0
0	682	700	257	270	48,0	761	2,08	1421	535
0,5	930	850	388	378	15,0	1311	6,67	6200	2587
1,0	1920	1650	632	638	13,0	1824	7,69	14769	4862
2,0	3000	2480	801	736	16,0	9999	6,25	18750	5006
3,0	8950	7630	2040	2190	43,0	9999	2,33	20814	4744
4,0	20200	13600	3350	3550	62,0	9999	1,61	32581	5403
24	546	594	183	189	180	405	0,556	303	102
72	0	39,1	0	0	34,0	0	2,94	0	0
168	0	0	0	0	270	54,0	0,370	0	0

Proband 6

Zeit [h]	EtG 1 [ng/mL]	EtG 2 [ng/mL]	EtS 1 [ng/mL]	EtS 2 [ng/mL]	Kreatinin [mg/dL]	EtG AU [ng/mL]	Verhältnis Kreatinin	c _{End} EtG 1 [ng/mL]	c _{End} EtS 1 [ng/mL]
Leer	0	0	0	0	174	0	0,575	0	0
0	4420	3310	2630	2730	114	9999	0,877	3877	2307
0,5	6270	5440	3010	3370	34,0	9999	2,94	18441	8853
1,0	8480	7520	3180	3560	35,0	9999	2,86	24229	9086
2,0	32500	28800	9450	10100	130	9999	0,769	25000	7269
3,0	66900	56600	14700	15900	249	9999	0,402	26867	5904
4,0	23800	22900	5370	5840	122	9999	0,820	19508	4402
24	102	87,0	32,8	23,7	66,0	68,0	1,52	155	49,7
72	0	0	0	0	237	60,0	0,422	0	0
168	0	0	0	0	214	0	0,467	0	0

Proband 7

Zeit [h]	EtG 1 [ng/mL]	EtG 2 [ng/mL]	EtS 1 [ng/mL]	EtS 2 [ng/mL]	Kreatinin [mg/dL]	EtG AU [ng/mL]	Verhältnis Kreatinin	c _{End} EtG 1 [ng/mL]	c _{End} EtS 1 [ng/mL]
Leer	0	0	0	0	61,0	0	1,64	0	0
0	2660	2210	1190	1180	51,0	9999	1,96	5216	2333
0,5	2660	2420	1170	1270	15,0	9999	6,67	17733	7800
1,0	2800	2530	1240	1180	14,0	9999	7,14	20000	8857
2,0	19800	18000	5180	5320	55,0	9999	1,82	36000	9418
3,0	51700	48100	12300	13200	130	9999	0,769	39769	9462
4,0	51500	46200	9690	12100	135	9999	0,741	38148	7178
24	57,8	56,2	49,9	44,9	51,0	88,0	1,96	113	97,8
72	22,4	16,9	25,9	27,1	270	17,0	0,370	8,30	9,59
168	0	0	0	0	61,0	21,0	1,64	0	0

Proband 8

Zeit [h]	EtG 1 [ng/mL]	EtG 2 [ng/mL]	EtS 1 [ng/mL]	EtS 2 [ng/mL]	Kreatinin [mg/dL]	EtG AU [ng/mL]	Verhältnis Kreatinin	c _{End} EtG 1 [ng/mL]	c _{End} EtS 1 [ng/mL]
Leer	0	0	0	0	188	0	0,532	0	0
0	8310	8360	3890	4050	187	9999	0,535	4444	2080
0,5	42000	38500	14700	16000	184	9999	0,543	22826	7989
1,0	72300	59800	20500	23000	220	9999	0,455	32864	9318
2,0	107000	81300	25000	30500	257	9999	0,389	41634	9728
3,0	75500	65200	17400	19700	205	9999	0,488	36829	8488
4,0	61000	54500	12100	13200	182	9999	0,549	33516	6648
24	411	384	219	262	130	378	0,769	316	168
72	15,6	20,6	0	0	163	0	0,613	9,57	0
168	0	0	0	0	300	0	0,333	0	0

BAK-Werte**Trinkversuch I**

Proband 1

Zeit [h]	BAK [‰]
-1	0,00
0	0,91
0,5	0,93
1,0	0,84
2,0	0,62
3,0	0,37
4,0	0,16
24	0,00
72	0,00
168	0,00

Proband 2

Zeit [h]	BAK [‰]
-1	0,00
0	0,78
0,5	0,69
1,0	0,66
2,0	0,54
3,0	0,39
4,0	0,24
24	0,00
72	0,00
168	0,00

Proband 3

Zeit [h]	BAK [‰]
-1	0,00
0	0,92
0,5	0,97
1,0	0,95
2,0	0,79
3,0	0,61
4,0	0,44
24	0,00
72	0,00
168	0,00

Proband 4

Zeit [h]	BAK [‰]
-1	0,00
0	0,81
0,5	0,84
1,0	0,81
2,0	0,72
3,0	0,58
4,0	0,45
24	0,00
72	0,00
168	0,00

Proband 5

Zeit [h]	BAK [‰]
-1	0,00
0	0,87
0,5	0,92
1,0	0,87
2,0	0,70
3,0	0,56
4,0	0,42
24	0,00
72	0,00
168	0,00

Proband 6

Zeit [h]	BAK [‰]
-1	0,00
0	0,61
0,5	0,82
1,0	0,84
2,0	0,80
3,0	0,62
4,0	0,49
24	0,00
72	0,00
168	0,00

Proband 7

Zeit [h]	BAK [‰]
-1	0,00
0	0,92
0,5	0,93
1,0	0,82
2,0	0,66
3,0	0,55
4,0	0,41
24	0,00
72	0,00
168	0,00

Proband 8

Zeit [h]	BAK [‰]
-1	0,00
0	1,00
0,5	0,92
1,0	0,85
2,0	0,69
3,0	0,56
4,0	0,45
24	0,00
72	0,00
168	0,00

Proband 9

Zeit [h]	BAK [‰]
-1	0,00
0	0,96
0,5	1,09
1,0	1,06
2,0	0,83
3,0	0,96
4,0	0,69
24	0,00
72	0,00
168	0,00

Trinkversuch II

Proband 1

Zeit [h]	BAK [‰]
-1	0,00
0	0,37
0,5	0,47
1,0	0,42
2,0	0,22
3,0	0,07
4,0	0,00
24	0,00
72	0,00
168	0,00

Proband 2

Zeit [h]	BAK [‰]
-1	0,00
0	0,37
0,5	0,41
1,0	0,36
2,0	0,22
3,0	0,09
4,0	0,00
24	0,00
72	0,00
168	0,00

Proband 3

Zeit [h]	BAK [‰]
-1	0,00
0	0,34
0,5	0,33
1,0	0,27
2,0	0,13
3,0	0,00
4,0	0,00
24	0,00
72	0,00
168	0,00

Proband 4

Zeit [h]	BAK [‰]
-1	0,00
0	0,27
0,5	0,39
1,0	0,38
2,0	0,29
3,0	0,17
4,0	0,06
24	0,00
72	0,00
168	0,00

Proband 5

Zeit [h]	BAK [‰]
-1	0,00
0	0,29
0,5	0,29
1,0	0,29
2,0	0,18
3,0	0,09
4,0	0,00
24	0,00
72	0,00
168	0,00

Proband 6

Zeit [h]	BAK [‰]
-1	0,00
0	0,37
0,5	0,33
1,0	0,25
2,0	0,12
3,0	0,07
4,0	0,00
24	0,00
72	0,00
168	0,00

Proband 7

Zeit [h]	BAK [‰]
-1	0,00
0	0,49
0,5	0,39
1,0	0,34
2,0	0,13
3,0	0,11
4,0	0,00
24	0,00
72	0,00
168	0,00

Proband 8

Zeit [h]	BAK [‰]
-1	0,00
0	0,22
0,5	0,33
1,0	0,36
2,0	0,23
3,0	0,10
4,0	0,00
24	0,00
72	0,00
168	0,00

9 Lebenslauf

Personalien

Name, Vorname: Hofmann, Vanessa
Geburtsdatum, -ort: 28.01.1992, Memmingen

Schulischer Werdegang

1998 – 2002 Grundschule, Ronsberg
2002 – 2011 Gymnasium Maristenkolleg, Mindelheim

Universitärer Werdegang

2011 – 2014 Bachelor of Science:
Biochemiestudium, Universität Ulm
2014 – 2017 Master of Science:
Medizinische Chemie-Studium,
Universität Regensburg

Promotion

seit Oktober 2017 Institut für Rechts- und Verkehrsmedizin,
Heidelberg

Beruflicher Werdegang

seit August 2021 Institut für Rechtsmedizin,
Basel

10 Danksagung

Ich danke meiner Betreuerin und Doktormutter Frau Prof. Dr. med. univ. Kathrin Yen für die Überlassung des interessanten Themas, Bereitstellung des Arbeitsplatzes und das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Herrn Dr. rer. nat. Marc Bartel gilt Dank für die Betreuung meiner Doktorarbeit.

An Herrn Dr. rer. nat. Tom Richard Sundermann geht an dieser Stelle mein Dank für sein stets offenes Ohr, das Durchhaltevermögen beim Korrigieren meiner Arbeit und die Synthese sowie zugehörige NMR-Analytik für den internen Standard von NAcT-D₄.

Zudem gilt mein Dank Herrn Dr. rer. nat. Schmitt, der mir mit seiner Erfahrung und ruhigen Art immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Weiterer Dank gilt Prof. Dr. med. Sebastian Müller und Johannes Müller aus dem Krankenhaus Salem für die Kooperation und die Bereitstellung von interessantem Probenmaterial.

Insbesondere bedanke ich mich bei der gesamten Abteilung „Forensische Toxikologie“ des IRVM, für die tolle Zeit, die stete Hilfe und zahlreichen lustigen Momente. Hierbei dürfen sich vor allem Isolde Härle, Matthias Klingler, Simon Schiffer, Amina Baier und Swetlana Mack angesprochen fühlen. Danke auch an Falk Gaus, der mir bei Software- und Hardwareproblemen immer geholfen hat.

Danke an Dorothee Holuba für das nicht-fachliche Gegenlesen meiner Arbeit, ebenso wie Philipp Marlow und Jan Euteneuer für den ständigen Austausch, wenn die Arbeit wieder endlos erschien. Besonders danken möchte ich auch meinen Mitbewohnern über die letzten Jahre in Heidelberg, die all meine Höhen und Tiefen mit mir durchgemacht haben.

Ganz besonders danken möchte ich meinen Eltern, die mich in meiner schulischen und universitären Ausbildung stets unterstützt haben und immer hinter mir standen. Sie haben mich in meinen Entscheidungen stets bestärkt und ermutigt, meine Ziele ehrgeizig zu verfolgen.

11 Eidesstattliche Versicherung

Bei der eingereichten Dissertation zum Thema:

„Entwicklung und Validierung einer Multimethode zur Bestimmung der Alkoholbiomarker Ethylglucuronid, Ethylsulfat, N-Acetyltaurin und Phosphatidylethanol sowie deren Anwendung in der Forensik“

handelt es sich um meine eigenständig erbrachte Leistung.

Ich habe nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und mich keiner unzulässigen Hilfe Dritter bedient. Insbesondere habe ich wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken übernommene Inhalte als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit oder Teile davon habe ich bislang nicht an einer Hochschule des In- oder Auslands als Bestandteil einer Prüfungs- oder Qualifikationsleistung vorgelegt.

Die Richtigkeit der vorstehenden Erklärungen bestätige ich.

Die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung sind mir bekannt. Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit erkläre und nichts verschwiegen habe.

Ort, Datum

Unterschrift