

Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Virchow Klinikum
Institut für Rechtsmedizin
Abteilung Forensische Toxikologie

Fettsäureethylester und Ethylglucuronid als Marker eines chronisch erhöhten Alkoholkonsums

Publikationsbasierte Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin



vorgelegt von

Martin Hastedt

geboren in Rotenburg (Wümme)

Juni 2013



Die Arbeit wurde in der Zeit von 2009 bis 2013 am Institut für Rechtsmedizin der Charité unter der Leitung von Prof. Dr. M. Tsokos angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Michael Tsokos
2. Gutachter: Prof. Dr. Gerhard Wolber

Disputation am 09.12.2013

ICH DANKE ALLEN, DIE MICH BEI DIESER ARBEIT BESTÄRKT UND
UNTERSTÜTZT HABEN.

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG.....	7
1.1 ALKOHOLMISSBRAUCH ALS GESAMTGESELLSCHAFTLICHES PROBLEM	7
1.2 TRADITIONELL VERWENDETE INDIREKTE ALKOHOLMARKER	8
1.2.1 <i>Desialotransferrin (CDT)</i>	8
1.2.2 <i>Gammaglutamyltransferase (GGT)</i>	9
1.2.3 <i>Transaminasen: AST/ALT</i>	9
1.2.4 <i>Mittleres Erythrozyteneinzelvolumen (MCV)</i>	10
1.3 FETTSÄUREETHYLESTER.....	10
1.4 ETHYLGLUCURONID.....	12
1.5 MESSTECHNIK	13
1.5.1 <i>Headspace-Festphasenmikroextraktion mit anschließender Gaschromatographie-</i> <i>Massenspektrometrie</i>	13
1.5.2 <i>Flüssigchromatographie mit tandemmassenspektrometrischer Detektion</i> <i>(LC/MS/MS)</i>	16
1.6 ZIELSTELLUNG DER ARBEIT	17
2 HINTERGRÜNDE ZUR ALKOHOLMARKERANALYTIK IN HAAREN UND IM MEKONIUM.....	19
2.1 HAARANALYTIK – EINFLUSSGRÖßEN UND HINTERGRÜNDE	19
2.1.1 <i>Aufbau des Haars</i>	19
2.1.2 <i>Wachstumszyklus des Haars</i>	20
2.1.3 <i>Einlagerungswege ins Haar</i>	22
2.1.4 <i>Einfluss von Haarkosmetika</i>	23
2.2 MEKONIUM.....	24
3 ERGEBNISSE.....	27
3.1 MANUSKRIFT I: COMBINED USE OF FATTY ACID ETHYL ESTERS AND ETHYL GLUCURONIDE IN HAIR FOR DIAGNOSIS OF ALCOHOL ABUSE: INTERPRETATION AND ADVANTAGES.....	27
3.1.1 <i>Zusammenfassung</i>	27
3.1.2 <i>Publikation</i>	28
3.2 MANUSKRIFT II: DETECTING ALCOHOL ABUSE: TRADITIONAL BLOOD ALCOHOL MARKERS COMPARED TO ETHYL GLUCURONIDE (ETG) AND FATTY ACID ETHYL ESTERS (FAEES) MEASUREMENT IN HAIR.	28
3.2.1 <i>Zusammenfassung</i>	28
3.2.2 <i>Publikation</i>	29

3.3 MANUSKRIFT III:	
FATTY ACID ETHYL ESTERS IN HAIR AS ALCOHOL MARKERS: ESTIMATING A RELIABLE CUT-OFF POINT BY EVALUATION OF 1,057 AUTOPSY CASES.....	30
3.3.1 Zusammenfassung	30
3.3.2 Publikation.....	32
3.4 MANUSKRIFT IV:	
PRACTICAL EXPERIENCES IN APPLICATION OF HAIR FATTY ACID ETHYL ESTERS AND ETHYL GLUCURONIDE FOR DETECTION OF CHRONIC ALCOHOL ABUSE IN FORENSIC CASES	32
3.4.1 Zusammenfassung	32
3.4.2 Publikation.....	33
3.5 MANUSKRIFT V:	
WORKPLACE ALCOHOL TESTING PROGRAM BY COMBINED USE OF ETHYL GLUCURONIDE AND FATTY ACID ETHYL ESTERS IN HAIR.	34
3.5.1 Zusammenfassung	34
3.5.2 Publikation.....	35
3.6 MANUSKRIFT VI:	
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.....	36
3.6.1 Zusammenfassung	36
3.6.2 Publikation.....	37
3.7 MANUSKRIFT VII:	
FATTY ACID ETHYL ESTERS (FAEES) AS MARKERS FOR ALCOHOL IN MECONIUM: METHOD VALIDATION AND IMPLEMENTATION OF A SCREENING PROGRAM FOR PRENATAL DRUG EXPOSURE.	37
3.7.1 Zusammenfassung	37
3.7.2 Publikation.....	38
4 ABGRENZUNG DER EIGENLEISTUNG	39
5 DISKUSSION	39
5.1 BEDEUTUNG DER ERGEBNISSE UND EINSCHRÄNKUNGEN	39
5.2 AUSBLICK UND ZUKÜNFTIGE FRAGESTELLUNGEN	43
6 ZUSAMMENFASSUNG	45
7 SUMMARY	49
8 PUBLIKATIONSVERZEICHNIS	53
8.1 ORIGINALARTIKEL IN INTERNATIONALEN FACHZEITSCHRIFTEN MIT PEER-REVIEW-VERFAHREN.....	53
8.2 VORTRÄGE.....	54
9 LITERATURVERZEICHNIS	56
10 ANHANG	

Abkürzungsverzeichnis

ADH	Alkoholdehydrogenase
ALDH	Aldehyddehydrogenase
ALT	Alaninaminotransferase
AST	Aspartataminotransferase
AUC	Area under the curve
CDT	Carbohydrate deficient transferrin (Desialotransferrin)
CYP	Cytochrom P450
DHS	Deutsche Hauptstelle für Suchtfragen
DMSO	Dimethylsulfoxid
EI	Elektronenstoßionisation
EtG	Ethylglucuronid
EtOH	Ethanol
EWDTs	European Workplace Drug Testing Society
FAS	Fetales Alkohol Syndrom
fl	Femtoliter
FSEE	Fettsäureethylester
GC/MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GGT	Gamma-Glutamyltransferase
GTFCh	Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie
LC/MS/MS	Flüssigchromatographie-Tandemmassenspektrometrie
MCV	Mean corpuscular volume (Mittleres Erythrozyteneinzelvolumen)
ROC	Receiver Operating Characteristic
SoHT	Society of Hair Testing
SPME	Solid phase micro extraction (Festphasenmicroextraktion)
UDP	Uridindiphosphat

1 Einleitung

1.1 Alkoholmissbrauch als gesamtgesellschaftliches Problem

Allein in Deutschland konsumieren etwa 9,5 Millionen Menschen Alkohol in riskanter Menge. 1,3 Millionen sind alkoholkrank und mehr als 73.000 Menschen sterben jährlich in der Bundesrepublik an den Folgen des Alkoholkonsums. Die jährlichen Kosten für die Volkswirtschaft wurden von der *Deutschen Hauptstelle für Suchtfragen (DHS)* auf etwa 26,7 Milliarden geschätzt [1]. Im Jahr 2010 wurden fast 26.000 Kinder, Jugendliche und junge Erwachsene im Alter zwischen 10 und 20 Jahren mit einer Alkoholvergiftung ins Krankenhaus eingeliefert [2].

Alkoholkonsum spielt unter Anderem eine Rolle bei Unfällen im Straßen- und Luftverkehr, arbeitsrechtlichen Fragestellungen, der Fahreignungsbegutachtung, bei Sorgerechtsstreitigkeiten, der Indikationsstellung für eine Lebertransplantation, Gewaltdelikten, Fragen der Schuldfähigkeit, versicherungsrechtlichen Fragen und, konsumiert von werdenden Müttern, als Ursache für pränatale Fehlbildungen [3-8].

Eine akute alkoholische Beeinflussung messtechnisch zu erfassen ist sehr einfach. Es gibt Atemalkoholmessgeräte, die gerichtsverwertbare Ergebnisse liefern, oder es kann eine Blutalkoholbestimmung durchgeführt werden. Die zulässigen Verfahren und Rahmenbedingungen sind in der Blutalkoholrichtlinie dargestellt [9]. Meist werden entweder zwei gaschromatographische Verfahren oder ein gaschromatographisches Verfahren in Kombination mit einem enzymatisches Messverfahren unter Verwendung der Alkoholdehydrogenase (ADH-Verfahren) zur Blutalkoholbestimmung verwendet. Mit diesen Verfahren kann nur eine akute Alkoholisierung erfasst werden. In vielen Fällen ist es jedoch notwendig festzustellen, ob ein chronisch erhöhter Alkoholkonsum vorliegt.

Die verschiedenen Konsumentengruppen lassen sich unter Anderem durch die täglich aufgenommene Ethanolmenge abgrenzen. Von sozialem Trinkverhalten ist auszugehen bei einer täglichen Aufnahme von weniger als 20 g Ethanol bei Frauen und weniger als 40 g Ethanol bei Männern [10]. Riskanter Alkoholkonsum ist mit Trinkmengen von 40-

120 g Ethanol pro Tag verbunden. Bei einer täglichen Aufnahme von mehr als 120 g Ethanol ist von Alkoholmissbrauch auszugehen.

1.2 Traditionell verwendete indirekte Alkoholmarker

Seit vielen Jahren werden indirekte Alkoholmarker wie das Desialotransferrin, die Gammaglutamyltransferase, Transaminasen oder auch das mittlere Erythrozyteneinzelvolumen zur Detektion von andauerndem Alkoholmissbrauch verwendet. Diese Marker sind relativ kostengünstig zu bestimmen, allerdings haben sich in einer Reihe von Studien nur begrenzte Sensitivitäten gezeigt [11-13]. Da sie alle nicht direkt aus dem Alkoholstoffwechsel gebildet werden, sondern ihre Freisetzung z.B. auf alkoholtypischen Organschäden beruht, sind falsch positive Befunde durch z.B. Infektionen oder anderweitige Schädigungen dieser Organe möglich. Die Spezifität dieser Marker ist somit auch eingeschränkt [13]. Die für die Marker verwendeten Referenzbereiche sind vielfach noch in der Diskussion, methoden- oder geschlechtsabhängig.

1.2.1 Desialotransferrin (CDT)

Das Transferrin ist ein Glykoprotein, welches den Eisentransport im Blut ermöglicht. Es besteht aus einer 679 Aminosäuren umfassenden Polypeptidkette, 2 Bindungsdomänen für 2-wertige Kationen wie Fe^{2+} und einer unterschiedlichen Anzahl an Glykanketten mit terminalem Sialinsäurerest. Im Serum sind Variationen von Asialo- bis Octasialotransferrin zu beobachten.

Durch exzessiven Alkoholkonsum wird ein erhöhter Anteil an Transferrinen mit fehlendem oder einer geringen Zahl an Sialinsäureresten gebildet. Üblicherweise werden unter dem Begriff Desialotransferrin (CDT) Asialo-, Monosialo- und Disialotransferrin zusammengefasst. Als mögliche Ursachen für den erhöhten Anteil dieser sialinsäuredefizienten Transferrinformen werden alkoholbedingte Interaktionen mit der

Sialyltransferase und der Sialidase, sowie ein Eingriff in posttranslationale Peptidmodifikationen gesehen [14].

Es ist bekannt, dass verschiedene Erkrankungen wie Leberzirrhose, Lebertumoren oder auch Arzneistoffe zu erhöhten CDT-Befunden und damit zu falsch positiven Ergebnissen bezüglich der Testung auf exzessiven Alkoholkonsum führen können [15].

Außerdem gibt es eine Reihe verschiedener analytischer Messmethoden. Die Ergebnisse der unterschiedlichen Methoden sind nur begrenzt vergleichbar. Daher muss immer ein methodenabhängiger Referenzbereich bekannt sein, um einen CDT-Befund einordnen zu können. Etwa 2-3 Wochen nach Abstinenzbeginn fallen die CDT-Werte zurück in den Referenzbereich [11].

1.2.2 Gammaglutamyltransferase (GGT)

Die Gammaglutamyltransferase (GGT) kommt membrangebunden in vielen Körperzellen vor. Sie bindet extrazelluläres Glutathion an Peptide, um dieses in die Zellen einzuschleusen, wo es wieder freigesetzt wird. Bei akuten hepatozellulären Schäden, hervorgerufen durch Alkohol oder nicht alkoholinduzierte Erkrankungen, wird die GGT induziert und letztlich in großem Maße ins Blut freigesetzt. Eine verminderte GGT-Freisetzung kann bei fortgeschrittener Leberzirrhose auftreten. Die Bestimmung erfolgt im Serum [14]. Nach Abstinenzbeginn normalisieren sich die GGT-Befunde meist innerhalb von etwa 2-3 Wochen [11].

1.2.3 Transaminasen: AST/ALT

Transaminasen sind Enzyme, welche die Übertragung von Aminogruppen katalysieren. Diagnostisch sind die Aspartataminotransferase (AST) und die Alaninaminotransferase (ALT) von besonderer Bedeutung. Gemessen werden die Transaminasen im Serum. Ihre Eignung als Alkoholmarker ist kritisch zu sehen, da die Sensitivität hier relativ gering ist [14, 16]. Teilweise wird auch das Serumkonzentrationsverhältnis von AST zu ALT zur

Beurteilung herangezogen. Bei Werten unter 1 sind eher akute Leberschäden zu vermuten wohingegen bei einer durch Alkoholmissbrauch verursachten chronischen Leberschädigung häufig Werte über 2 gefunden werden [17]. Transaminasen werden jedoch nicht nur aus der Leber freigesetzt, sondern können z.B. nach Verletzungen oder Infarkten auch aus anderen Geweben stammen [18].

1.2.4 Mittleres Erythrozyteneinzelvolumen (MCV)

Das mittlere Erythrozyteneinzelvolumen (MCV) in fl errechnet sich als der Quotient aus Hämatokrit zu Erythrozytenzahl pro Kubikmillimeter. Der Normalbereich liegt zwischen 80 und 98 fl. Ein kleineres MCV spricht für eine mikrozytäre Anämie. Werte größer als 98 fl können auf einen Alkoholabusus hindeuten. Der Alkohol wirkt toxisch auf hämatopoetische Vorläuferzellen und führt zur Bildung größerer Erythrozyten.

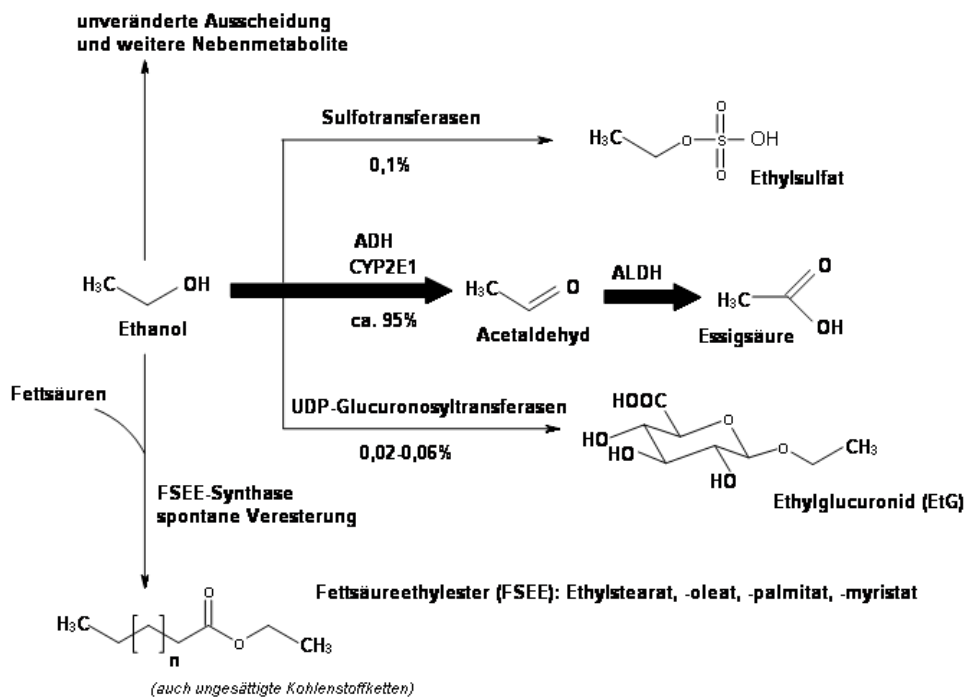
Da die Lebensdauer der Erythrozyten bei etwa 120 Tagen liegt, normalisiert sich das MCV innerhalb von etwa 1-3 Monaten nach Abstinenzbeginn. Allerdings können auch beim MCV verschiedene Erkrankungen oder z.B. Blutungen zu erhöhten Werten führen, so dass die Spezifität als Alkoholmarker begrenzt ist [14, 18].

1.3 Fettsäureethylester

Bereits 1981 beschrieben Lange et al. die Bildung von Fettsäureethylestern (FSEE) als Nebenmetabolite des Ethanol aus dem nichtoxidativen Ethanolabbau [19] (siehe auch Abbildung 1). Eine ganze Reihe verschiedener Fettsäureethylester, die im Körper gebildet werden, konnten identifiziert werden. Die Bildung der Fettsäureethylester kann sowohl spontan erfolgen, als auch katalysiert durch verschiedene körpereigene Enzyme wie Lipoproteinsynthasen, Carboxylesterasen oder sogenannte Fettsäureethylester-Synthasen [20]. Da die Bildung der Fettsäureethylester vor allem in Organen erfolgt, die bei erhöhtem Alkoholkonsum charakteristische Schäden aufweisen, wird angenommen, dass sie zytotoxische Wirkung entfalten [21, 22]. Ein Nachweis ist in praktisch allen Organen, im Haar, im Mekonium sowie in Blut und Urin möglich [23-27]. Um einen

längerfristigen chronisch exzessiven Alkoholkonsum nachzuweisen, eignen sich jedoch grundsätzlich nur Mekonium und Haar.

Abbildung 1. Übersicht zum Ethanolmetabolismus.



Im Jahr 2000 wurde erstmals von Pragst et al. die Verwendung der Fettsäureethylester als Alkoholmarker im Haar vorgeschlagen [28]. Praktische Bedeutung haben vor allem gaschromatographisch-massenspektrometrische (GC/MS) Messmethoden bekommen [3, 8, 23, 29, 30].

Während der Bearbeitung dieses Promotionsthemas, wurde im Juni 2009 von der *Society of Hair Testing (SoHT)* als internationale Fachgesellschaft, ein Konsensus zur Alkoholmarkerbestimmung im Haar veröffentlicht. Es wurden Grenzwerte zur Diagnose von chronisch exzessivem Alkoholkonsum durch Fettsäureethylester und Ethylglucuronid im Haar festgelegt. Die Fettsäureethylester sind demnach als Summenparameter bestehend aus den Ethylestern der Myristinsäure, der Palmitinsäure, der Ölsäure sowie der Stearinsäure zu bestimmen. Die Grenzwerte wurden außerdem

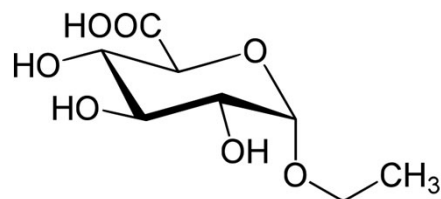
zunächst für den proximalen Haarabschnitt 0-3 cm festgelegt, da Kumulations- und Auswascheffekte eine Abhängigkeit von Haarlänge zu Alkoholmarkerkonzentration bedingen können. Für die Fettsäureethylester wurde ein Cut-off von 0,50 ng/mg vorgeschlagen [31].

Da die Datenlage zu Sensitivität und Spezifität der Methode begrenzt ist, sowie weiterhin erheblicher Diskussionsbedarf bezüglich der festgelegten Grenzwerte und ihrer Datenbasis bestand, wurde eine Revision des Konsensus im Abstand von 2 Jahren beschlossen. Bei der ersten Revision im Frühjahr 2011 wurden Grenzwerte für den proximalen Haarabschnitt 0-6 cm postuliert [32]. Die Datenlage, auf der diese Grenzwerte basieren, konnte aber in diesen 2 Jahren nicht wesentlich erweitert werden.

1.4 Ethylglucuronid

Beim Ethylglucuronid handelt es sich ebenfalls um einen Nebenmetaboliten des Ethanols, welcher über einen nichtoxidativen Stoffwechselweg gebildet wird (siehe Abbildungen 1 und 2). Glucuronosyltransferasen konjugieren UDP-Glucuronsäure und Ethanol. Diese Reaktion findet, wie die Veresterung mit Fettsäuren, für unter 0,1 % des abzubauenen Ethanols statt [33].

Abbildung 2. Struktur von Ethylglucuronid



Ethylglucuronid ist ein sehr hydrophiles und leicht saures Molekül. Daher wird es nur in relativ geringem Umfang ins Haar eingelagert. Der im Konsensus der *Society of Hair Testing* vorgeschlagene Grenzwert zur Detektion von chronisch exzessivem

Alkoholkonsum liegt bei 30 pg/mg im proximalen Haarabschnitt 0-3 cm [32]. Wie bei den Fettsäureethylestern ist auch hier die Datenlage, die Basis zur Ermittlung des Grenzwertes, sowie zur Abschätzung von Sensitivität und Spezifität war, sehr begrenzt. [18, 34-41]. Zur Bestimmung kommen vor allem gaschromatographische oder flüssigchromatographische Methoden mit tandemmassenspektrometrischer Detektion zum Einsatz [30, 42-48].

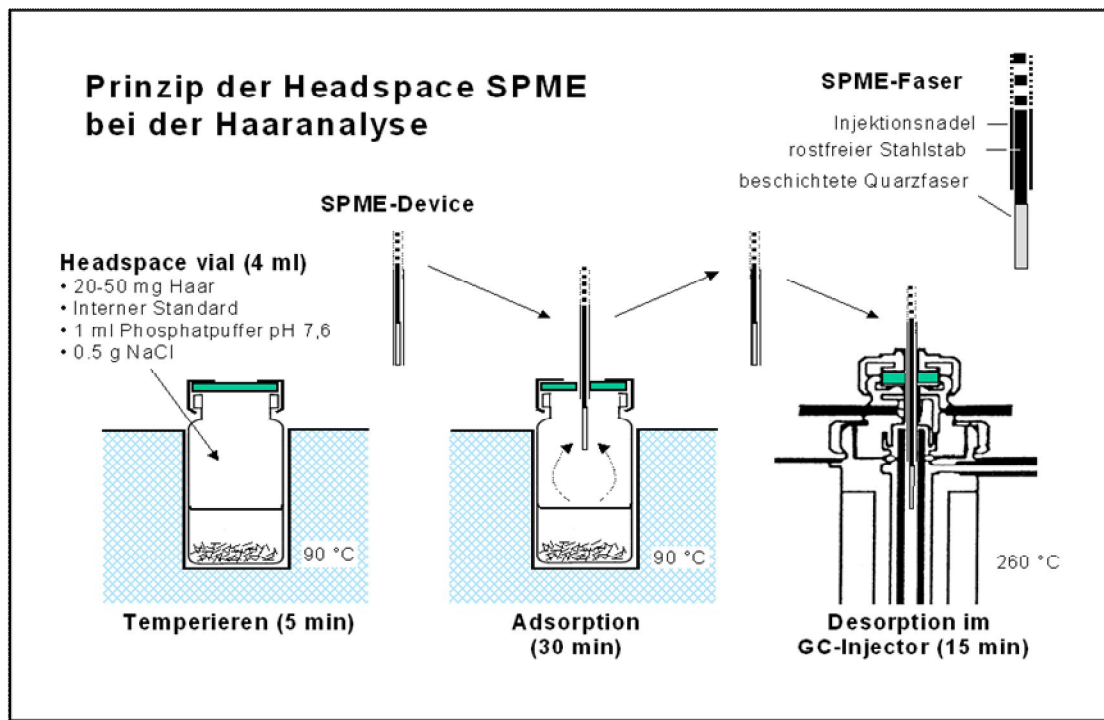
Ethylglucuronid wird zudem als Marker zum Erbringen eines Abstinenzbeleges eingesetzt [49, 50]. Da Konzentrationen ab 7 pg/mg einen dringenden Hinweis auf Alkoholkonsum darstellen, werden in Deutschland für verkehrsmedizinische Begutachtungen nach Vorgabe der *Bundesanstalt für Straßenwesen*, alle Konzentrationen unterhalb dieses Grenzwertes als Beleg zur Untermauerung einer Abstinenzbehauptung anerkannt [51]. Es ist anzumerken, dass Studien gezeigt haben, dass gelegentlicher Alkoholkonsum bei Anwendung des 7 pg/mg-Grenzwertes häufig nicht erfasst wird [52].

1.5 Messtechnik

1.5.1 Headspace-Festphasenmikroextraktion mit anschließender Gaschromatographie-Massenspektrometrie

Bei der Headspace-Festphasenmikroextraktion handelt es sich um ein Verfahren zur Aufreinigung von Probenmaterial oder Primärextrakten [53, 54]. Die zu untersuchende Lösung wird in einem geschlossenen Probengefäß erhitzt. Dadurch verschiebt sich das Phasengleichgewicht der zu untersuchenden Analyte in der Regel zugunsten ihres Gehaltes im Dampfraum. Mittels einer Kanüle wird eine Stahlnadel, welche an ihrer Spitze aus einem mit dem Adsorbens beschichteten Quarz besteht, in den Dampfraum eingeführt. Innerhalb von etwa 15 bis 30 Minuten stellt sich ein Konzentrationsgleichgewicht für den Analyten zwischen flüssiger Phase, Dampfphase und der Festphase an der Nadel ein. Wurde ein geeignetes Adsorbens ausgewählt, kommt es zu einer Kumulation an der Nadel. Im Anschluss wird die Nadel in den Injektor des Gaschromatographen eingestochen. Dort werden die Analyte bei großer Hitze schlagartig desorbiert und der Extrakt wird auf der Kapillarsäule aufgetrennt (siehe Abbildung 3).

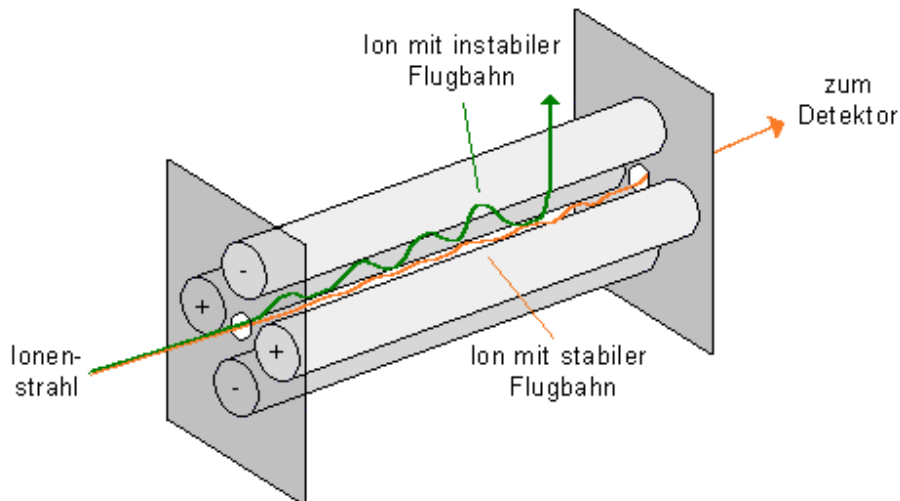
Abbildung 3. Prinzip der Dampfraum-Festphasenmikroextraktion.



Quelle: Sporkert F, Pragst F. Use of headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) in hair analysis for organic compounds. Forensic Sci. Int. 107 (2000).

Bei der gaschromatographisch-massenspektrometrischen Messung handelt es sich um ein sehr weit verbreitetes Verfahren in der analytischen Toxikologie. Nach der Trennung auf der Kapillarsäule erreichen die Analyte das Massenspektrometer. Die Messungen im Rahmen dieser Arbeit wurden mit einem Quadrupolmassenspektrometer durchgeführt. Das gesamte Massenspektrometer steht unter hohem Vakuum, um eine hohe Messempfindlichkeit zu ermöglichen und Molekülkollisionen zu vermeiden.

Abbildung 4. Funktionsprinzip eines Quadrupolmassenspektrometers.



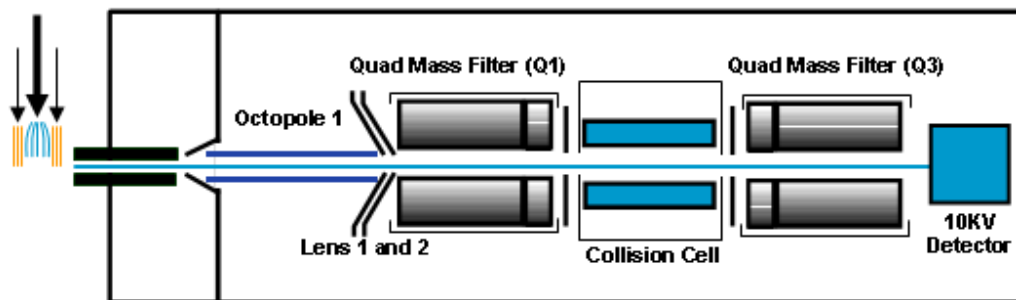
Quelle: http://www.vias.org/tmanalytik_germ/hl_ms_quadrupol.html

Zunächst erreichen die Moleküle die Ionenquelle. Zur Bestimmung der Fettsäureethylester wurde die Elektronenstoßionisation (EI) angewandt. Die Moleküle werden mit Elektronen beschossen, werden in Kationen überführt und fragmentieren. Durch elektrische Felder und Linsensysteme wird ein fokussierter Ionenstrahl gebildet. Dieser wird in den Quadrupol (Abb. 4), ein System bestehend aus 4 parallelen im Quadrat angeordneten Elektrodenstäben, geführt. Zwischen den Elektroden wird, durch Anlegen einer Spannung, ein elektrisches Quadrupolfeld ausgebildet. Ionen, die in dieses Feld gelangen, werden auf schraubenförmige Bahnen gezwungen. Je nach angelegter Spannung werden abhängig von ihrem Masse zu Ladungs-Verhältnis (m/z) die Flugbahnen instabil und die Ionen prallen gegen die Wandung. Nur Ionen mit stabiler Flugbahn passieren den Quadrupol und erreichen den Detektor. Der Detektor ist ein Sekundärelektronenvervielfacher. Der hier erzeugte Entladungsstrom wird von der Software in ein Massenspektrum umgerechnet d.h. als Ionenhäufigkeit aufgetragen gegen m/z dargestellt. EI-Spektren sind, aufgenommen unter Standardbedingungen, sehr gut reproduzierbar und stellen einen hohen Beweiswert für die Anwesenheit des jeweiligen Stoffes dar, der vergleichbar mit dem eines Fingerabdrucks ist.

1.5.2 Flüssigchromatographie mit tandemmassenspektrometrischer Detektion (LC/MS/MS)

Ethylglucuronid wurde mittels LC/MS/MS bestimmt. Die Flüssigchromatographie bietet zwar eine geringere Trennleistung und geringere Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten als die Gaschromatographie, insgesamt überwiegen für viele Anwendungen jedoch die Vorteile: Die Analysenzeiten sind geringer und Stoffe müssen zur Detektion in der Regel nicht derivatisiert werden. Verdampfbarkeit und Thermostabilität sind keine Voraussetzungen für die Detektion. Tandemmassenspektrometer ermöglichen außerdem eine wesentlich empfindlichere Detektion als einfache Quadrupolmassenspektrometer (siehe Abbildung 5). Es handelt sich hier um 2 hintereinandergeschaltete Quadrupole. Die Ionisation erfolgte durch Elektrospray, eine sehr schonende Ionisation, welche in der Regel fast ausschließlich Molekülonen produziert.

Abbildung 5. Funktionsprinzip eines Tandemmassenspektrometers



Die Abbildung wurde von der Firma Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

Die Analyte sind zunächst in der mobilen Phase gelöst und werden in der Ionenquelle durch einen Sprayer zerstäubt. Ein Trocknungsgas mit hoher Temperatur sorgt für eine schlagartige Verdampfung des Lösungsmittels. Je nach Messmodus werden die unkondensierten Kationen oder Anionen durch ein elektrisches Feld eingefangen und in das Massenspektrometer geleitet. Dort wird der Ionenstrahl durch Linsensysteme fokussiert. Im ersten Quadrupol können Ionen mit einer bestimmten Masse ausgewählt

werden, diese werden dann in der Kollisionszelle auf z.B. Stickstoffatome geschossen und fragmentieren. Mit dem zweiten Quadrupol lassen sich die dabei entstehenden Tochterionen auftrennen. Man erhält somit Produktionenspektren. Da der erste Quadrupol sehr spezifisch die Molekülonen selektiert, werden Interferenzen durch koeluirende Stoffe weitgehend vermieden. Dies erhöht die Messempfindlichkeit drastisch. Häufig wird bei zielgerichteten Untersuchungen nicht das gesamte Produktionenspektrum zur Identifizierung genutzt, sondern lediglich Retentionszeit und einzelne Massenübergänge. Das bedeutet, man gibt für eine bestimmte Retentionszeit ein Precursorion (häufig das Molekülon) vor, zu dem dann prominente Tochterionen (in der Regel 2 bis 3) detektiert werden. Da hierbei nicht durch den gesamten Massenbereich gescannt wird und der Untergrund koeluirender Substanzen aus der Matrix fast völlig beseitigt ist, ist die Empfindlichkeit stark erhöht.

1.6 Zielstellung der Arbeit

Zu Beginn der Arbeit waren bereits Grundlagen zur Alkoholmarkeranalytik in Haaren und im Mekonium geschaffen [8, 11, 20, 23, 24, 28, 29, 34, 37, 45, 55-67]. Es waren bereits Methoden zur Quantifizierung von Fettsäureethylestern oder Ethylglucuronid in Haaren und im Mekonium publiziert. Im Rahmen der Promotion sollte die analytische Validierung der Fettsäureethylesterbestimmung im Haar und Mekonium abgeschlossen werden. Es sollte eine umfassende Methodvalidierung nach den Vorgaben der zuständigen Fachgesellschaft, der *Gesellschaft für Forensische und Toxikologische Chemie (GTFCh)*, durchgeführt werden [68].

Der Fokus der Arbeit sollte jedoch auf der klinischen Validierung der Alkoholmarker im Haar liegen. Parameter wie Sensitivität, Spezifität und valide Entscheidungsgrenzen lassen sich bei Biomarkern nur mit großem Aufwand untersuchen, da eine direkte experimentelle Ermittlung häufig nicht möglich ist. Aus ethischen Gründen ist es nicht vertretbar einer Testgruppe über größere Zeiträume gesundheitsschädliche Mengen Alkohol zuzuführen, nur um die genannten Größen zu ermitteln. Dies muss auf indirektem Wege erfolgen. Dabei wurden zwei verschiedene Ansätze verfolgt: Zum

Einen wurden Haarproben aus dem Sektionsgut des Instituts für Rechtsmedizin untersucht. Mit der staatsanwaltschaftlichen und polizeilichen Ermittlungsakte hat man häufig vergleichsweise valide Angaben zu Erkrankungen wie Alkoholismus und kann diese nutzen, um geeignete Grenzwerte abzuschätzen. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Frage einer Übertragbarkeit der Ergebnisse von postmortalen Untersuchungen auf die Untersuchung an lebenden Probanden ebenfalls untersucht und diskutiert werden muss. Zum Anderen sollten Alkoholiker aus der Entzugsklinik und Normaltrinker aus dem sozialen Umfeld der Forschungsgruppe als Probanden dienen, um am lebenden Menschen die Leistungsfähigkeit der Alkoholmarker im Haar zu testen, zu vergleichen und geeignete Grenzwerte vorzuschlagen.

Außerdem sollte die Anwendung der Haaranalyse auf Alkoholmarker niemals unkritisch auf neue Betätigungsfelder übertragen werden. Daher sollte ermittelt werden ob und wie gut die Methodik in verschiedenen Bereichen, wie dem Workplace-Drug-Testing, der postmortalen Forensik, der Fahreignungsbegutachtung und z.B. bei familienrechtlichen Fragestellungen, eingesetzt werden kann. In diesem Rahmen sollte auch die Frage untersucht werden, ob die kombinierte Analyse und Interpretation von Fettsäureethylestern und Ethylglucuronid die Methodenperformance erhöht.

Besonders schwerwiegende Gesundheitsschäden sind bei Alkoholkonsum während der Schwangerschaft zu erwarten. Für Mütter, Kinder und Ärzte ist dies zudem ein sehr sensibles Thema. Wahrheitsgetreue Auskünfte über den Alkoholkonsum können von Seiten der Mütter nicht erwartet werden. Dennoch sollten Untersuchungen zur Anwendbarkeit der Alkoholmarkerbestimmung im Mekonium, dem ersten Stuhl des Neugeborenen, durchgeführt werden. Zur Abschätzung eines geeigneten Grenzwertes sollte eine „Baselinestudie“ durchgeführt werden; d.h. es sollte eine Stichprobe mit repräsentativem Umfang auf Alkoholmarker im Mekonium untersucht werden, um einen „Normalwert“ zu ermitteln. Ausreisser zu höheren Konzentrationen können dann als Hinweis auf einen Alkoholkonsum im letzten Trimenon der Schwangerschaft gesehen werden. Zudem sollte eine analytische Validierung der Fettsäureethylesterbestimmung im Mekonium erfolgen.

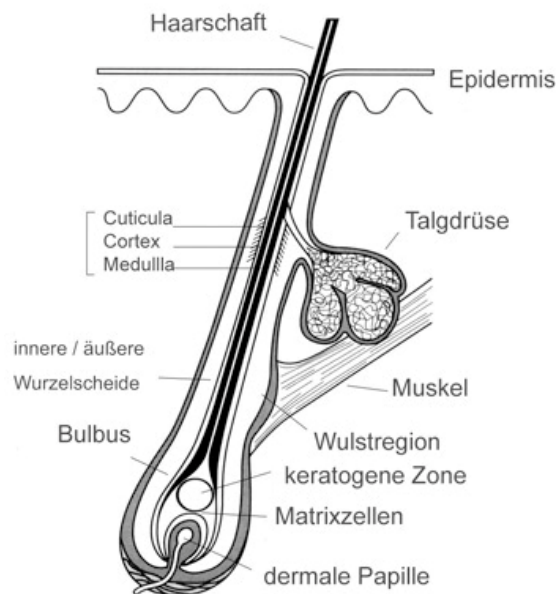
2 Hintergründe zur Alkoholmarkeranalytik in Haaren und im Mekonium

2.1 Haaranalytik – Einflussgrößen und Hintergründe

2.1.1 Aufbau des Haars

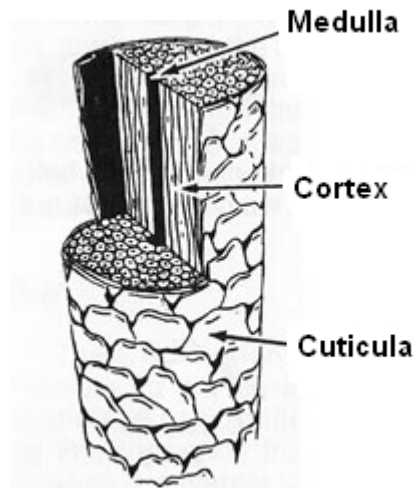
In der Dermis liegt die Haarwurzel. Sie besteht aus lebenden Zellen, die an die Blutbahn angeschlossen sind. Die Matrixzellen sind für den Aufbau des Haars verantwortlich. Keratinozyten produzieren Keratin und Melanozyten produzieren Pigmente. Die gebildeten Hornzellen werden entlang des Haarfollikels aus der Haut herausgeschoben. Sie bilden den Haarschaft. An jedem Haarfollikel findet sich eine Sebumdrüse sowie ein Muskel (Abbildung 6).

Abbildung 6. Aufbau des Haares.



Quelle: <http://www.lilas-kosmetik.de/pages/enthaarung.php>

Abbildung 7. Bestandteile des Haarschaftes.



Quelle: <http://ns2.etchdesignstudio.com/tutorials/itemlist/tag/natural%20hair%20care.html>

Das Haar besteht im Wesentlichen aus Mark (Medulla), Cortex und Cuticula. Das Mark besteht aus teilweise keratinisierten Zellen, die sich aus den Matrixzellen, die die Papille umgeben, bilden. Der Cortex besteht aus keratinisierten Fasern, die sich spindelförmig um die Haarachse reihen und für die ausgeprägte Elastizität der Haare sorgen. Außen schließt sich die Cuticula an. Es handelt sich um schuppenartige, keratinisierte Zellen, die das Haar umgeben (siehe Abbildung 7).

Das wesentliche Material, welches am Aufbau der Haare beteiligt ist, ist das Keratin, ein wasserunlösliches und sehr proteolysestabiles Protein, dass von den Keratinozyten in der Haarwurzel gebildet wird.

2.1.2 Wachstumszyklus des Haars

Der Wachstumszyklus des Haares gliedert sich in 3 Phasen (siehe Abbildung 8): Das eigentliche Wachstum findet in der Anagenphase statt. Die Haarwurzel ist aktiv und produziert Zellen, welche das Haar bilden. In der Katagenphase stirbt die Haarwurzel ab und das Wachstum wird eingestellt. Das Haar fällt dann jedoch meist nicht sofort aus,

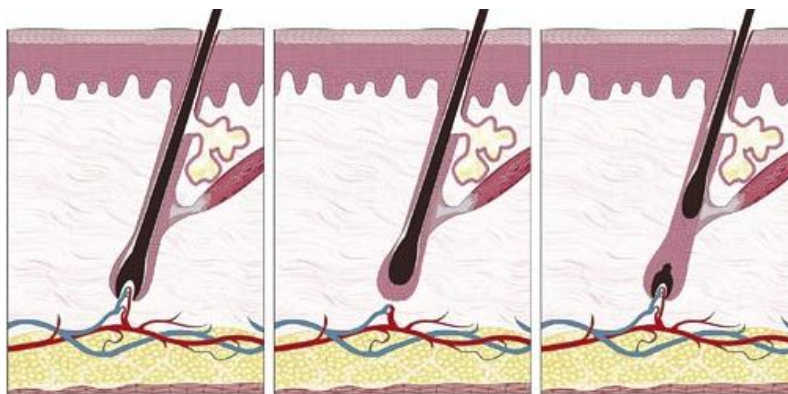
sondern bleibt bis zu 6 Monate in der Haut verankert. Während dieser Zeit findet kein Wachstum mehr statt (Telogenphase). Die Wachstumsgeschwindigkeit, die Dauer der Anagenphase und der Anteil an telogenen Haaren variiert stark je nach Körperregion. Eine Übersicht ist in Tabelle 1 dargestellt [69-71].

Tabelle 1. Zusammenfassung der Wachstumszyklen verschiedener Haartypen: Wachstumsrate, Prozentsatz der anagenen und telogenen Haare sowie die Gesamtdauer der Wachstumszyklen. Literaturübersicht nach Pianta et al. (2013).

Haartyp	Wachstumsrate (cm/Monat)	Anagenphase (Monate)	Anagenphase (%)	Telogenphase (Monate)	Telogenphase (%)	Dauer des gesamten Haarzyklus (Monate)	Quellen
Kopfhaar		48–144		2–6			[72]
Kopfhaar	1,05	6–18	85	3–4,25	13		[73, 74]
Kopfhaar	0,6–1,5	24–144	80–85	6	10–15		[75]
Kopfhaar	0,84–1,41	48–144			5–20		[76]
Kopfhaar	1,05	24–72		3			[77]
Brusthaar	1,05	4	30	4,5	70		[73, 74]
Brusthaar	0,81				50	4–10	[78]
Achselhaar	0,9	4	30	3	70		[73, 74]
Achselhaar	0,87–0,99				50	23–35	[78]
Achselhaar	0,87–1,00	11–18			50		[76]
Achselhaar	0,9						[77]
Armhaar	0,9	3,25	20	3	80		[73, 74]
Armhaar		1–4			60		[76]
Armhaar					60	4–6	[78]
Armhaar		1,5–3		1,75–3,25			[77]
Beinhaar	0,63	4	20	6	80		[73, 74]
Beinhaar	0,39–0,75					3–6	[78]
Beinhaar	0,6	4,75–6,5		3,25–8,5			[77]

Somit kann bei der Entnahme eines Haarbündels davon ausgegangen werden, dass anteilig solche Haare mit analysiert werden, welche sich bereits in der Katagen- oder Telogenphase befinden und einen anderen Zeitraum repräsentieren als die anagenen Haare. Dies ist bei der Begutachtung unbedingt zu berücksichtigen. Untersuchungen von Hartwig et al. (2003), Kintz et al. (2008) sowie von Pianta et al. (2013) haben gezeigt, dass Körperhaar dennoch verwendet werden kann und häufig zu vergleichbaren Ergebnissen führt [63, 71, 79, 80]. Für die Ethylglucuronidbestimmung sollte jedoch kein Achsel- oder Schamhaar verwendet werden, da hier vermutlich durch das feuchte Milieu im Achselbereich bzw. den Eintrag von EtG durch den Urin in das Schamhaar die Interpretation deutlich erschwert ist [71, 79].

Abbildung 8. Graphische Darstellung des Wachstumszyklus eines Haares in der Reihenfolge Anagen-, Katagen- und Telogenphase.



Quelle: <http://www.haar-ausfall.com/service/haarlexikon/wachstumszyklus/index.jsp>

2.1.3 Einlagerungswege ins Haar

Für eine zeitabhängige Begutachtung ist es vorteilhaft, wenn eine punktuelle Einlagerung der zu analysierenden Wirkstoffe durch die Haarwurzel in das Haar erfolgt. Dies ist bei den im Haar nachweisbaren Alkoholmarkern nur zum Teil der Fall [81, 82]. Da es sich bei Ethylglucuronid um ein sehr hydrophiles und leicht saures Molekül handelt, wurden relevante Mengen im Schweiß nachgewiesen [83]. Somit ist auch von einer Einlagerung von außen über den Schweiß in das Haar auszugehen. Da der Schweiß über den Haarschaft spreitet, kommt es nicht zu einer punktuellen Einlagerung. Es kommt entlang des Haarschaftes zu einer Einlagerung des Ethylglucuronids. Aufgrund der ausgeprägten

Hydrophilie stehen dem, z.B. durch die Haarpflege bedingte, Auswascheffekte gegenüber. Dennoch wurde in einem gewissen Rahmen die Möglichkeit eines zeitaufgelösten Ethylglucuronidnachweises in segmentierten Haarproben beschrieben [84]. Der Grad der Pigmentierung des Haares hat keinen relevanten Einfluss auf die Einlagerung des Ethylglucuronides [85].

Die Fettsäureethylester hingegen sind sehr lipophil. Sie kumulieren im Fettgewebe sowie im Sebum [86, 87]. An jedem Haar liegt eine Sebumdrüse an, welche fortwährend Sebum auf den Haarschaft abgibt, welches dort letztlich über die gesamte Länge des Haares spreitet. Daher sind für die Fettsäureethylester ebenfalls Kumulationseffekte vom proximalen Haaransatz nach distal zu beobachten [76]. Dem stehen Auswascheffekte durch die tägliche Haarpflege und den Gebrauch von Haarkosmetika entgegen. Fettsäureethylester können Depots im Fettgewebe bilden und somit ist anzunehmen, dass sie ggf. auch nach Abstinenzbeginn noch einige Zeit freigesetzt und ins Haar eingelagert werden [36]. Die Einlagerung der Fettsäureethylester ins Haar erfolgt ebenfalls unabhängig von der Pigmentierung der Haare [88].

Für beide Marker ist somit eine zeitlich hochaufgelöste Analytik, wie sie z.B. für viele Betäubungsmittel im Haar durchgeführt wird, nicht oder nur eingeschränkt möglich. Es muss zumindest eine Haarlängenabhängigkeit zur Festlegung geeigneter Grenzwerte untersucht werden. Daher hat die *Society of Hair Testing* auf der Basis der aktuellen Datenlage für die Fettsäureethylester und das Ethylglucuronid haarlängenabhängige Entscheidungsgrenzen festgelegt [32].

2.1.4 Einfluss von Haarkosmetika

Haarkosmetika können einen wesentlichen Einfluss auf die Stabilität der Alkoholmarker im Haar haben. Die *SoHT* und die *European Workplace and Drug Testing Society (EWDTS)* als zuständige Fachgesellschaften fordern in ihren Richtlinien daher eine protokollarische Erfassung der vor der Probennahme verwendeten Haarkosmetikprodukte [32, 89].

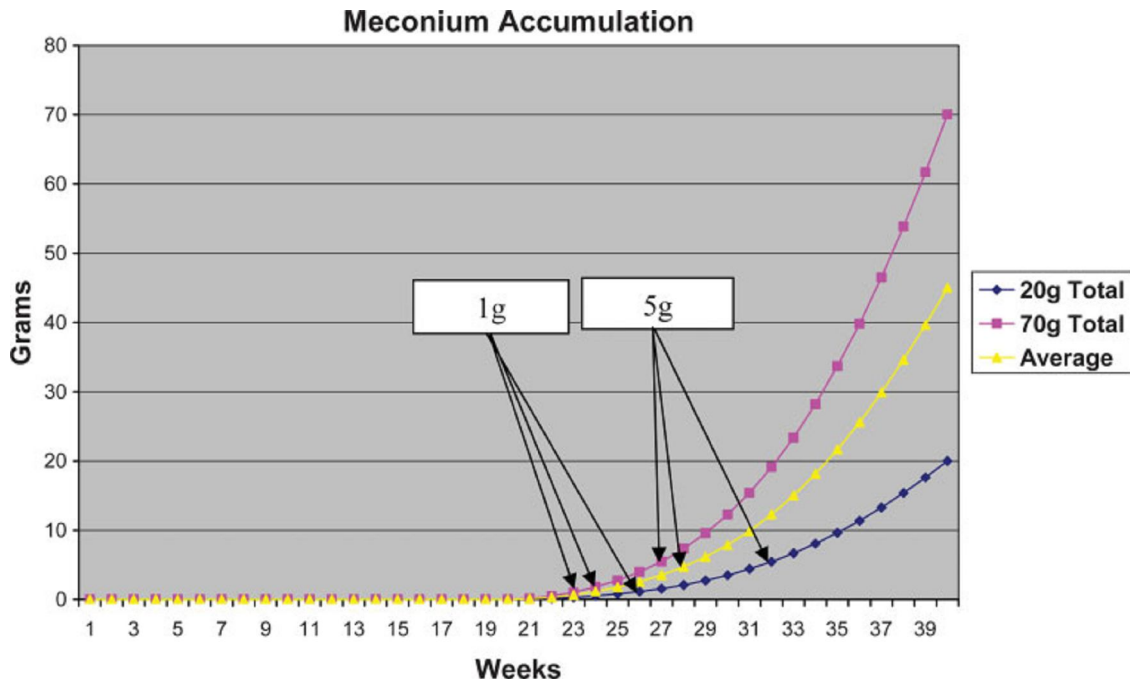
Die Fettsäureethylester neigen aufgrund ihrer Lipophilie weniger dazu durch wässrige Medien aus den Haaren ausgewaschen zu werden. Sie können vor allem durch lipophile Haarkosmetika wie Wachse aus dem Haar extrahiert werden [62]. Aggressive Haarfärbemittel oder Bleichmittel, sowie sehr basische, z.B. ammoniakhaltige Produkte, führen häufig zu einem chemischen Abbau der Analyte in der Haarmatrix. Das größte Problem stellen jedoch alkoholhaltige Haarpflegeprodukte dar. Da die Haare freie Fettsäuren enthalten, kann es bei Kontakt mit Ethanol zu einer spontanen unkatalysierten Veresterung kommen [36, 90, 91]. Schon nach einmaliger Behandlung mit alkoholhaltigen Produkten sind falsch positive Fettsäureethylesterbefunde möglich.

Ethylglucuronid ist ein sehr hydrophiles und oxidationsempfindliches Molekül. Es wird daher angenommen, dass Auswascheffekte z.B. durch die tägliche Haarwäsche bei diesem Marker relativ stark zum Tragen kommen. Außerdem hat sich gezeigt, dass aggressive Kosmetika wie Färbe- oder Bleichmittel, die Peroxide enthalten, zu einem Abbau des Ethylglucuronides führen [36]. Der Kontakt der Haare mit Alkohol führt hingegen nicht zur Bildung von Ethylglucuronid [91]. Allerdings wurden Einzelfälle beschrieben, in denen Ethylglucuronid durch Haarkosmetika basierend auf Pflanzenextrakten in das Haar eingetragen wurde [92].

2.2 Mekonium

Als Mekonium oder Kindspech wird der erste Stuhl des Neugeborenen bezeichnet. Es handelt sich um eine grünbraune, häufig sehr heterogene zähe Masse, welche hauptsächlich aus Schleimhautepithelzellen, über verschlucktes Fruchtwasser aufgenommene Haare, Hautzellen und aus Galle besteht. Das Mekonium wird in der Regel innerhalb der ersten 72 Stunden nach der Geburt abgegeben. In Abbildung 9 ist ersichtlich, dass die Bildung etwa in der 23sten Schwangerschaftswoche beginnt [93].

Abbildung 9. Darstellung der Mekoniumbildung und Akkumulation in der Schwangerschaft.



Quelle: Burd and Hofer 2008

Die Bildungsrate steigt exponentiell an. Daher werden ungefähr 75 % des Mekoniums in den letzten 8 Wochen vor der Geburt gebildet. Es ist somit anzunehmen, dass durch die nachgewiesenen Alkoholmarker vornehmlich dieser Zeitraum repräsentiert wird. Auch wenn nicht alle Schwangerschaftsphasen, in denen Alkohol besonders schwere Schäden hervorrufen kann, abgedeckt werden, lassen sich doch Rückschlüsse über einen fortgesetzten Alkoholkonsum der Mutter gewinnen. Ein großer Vorteil gegenüber anderen Matrices ist die Tatsache, dass das Mekonium nicht invasiv gewonnen wird und die Probennahme keinerlei Risiko für das Kind darstellt, sowie keine kosmetische Beeinträchtigung zu befürchten ist. Auch wenn prinzipiell die Haare je nach Länge ein noch größeres Zeitfenster repräsentieren, ist die Haarmenge und –länge bei Neugeborenen oftmals unzureichend und die Interpretation durch das spezielle Milieu in der Gebärmutter schwierig. Die Mütter sind häufig nicht bereit, Haare zur Untersuchung zur Verfügung zu stellen, womit letztlich nur die Untersuchung von Mekonium zur Bewertung der längerfristigen Alkoholbelastung praktikabel ist.

Wie dringend objektive Marker für maternalen Alkoholkonsum während der Schwangerschaft benötigt werden, zeigen Zahlen aus dem Drogen- und Suchtbericht der Bundesregierung aus dem Jahr 2011. Es wird geschätzt, dass pro Jahr in Deutschland etwa 10.000 der Neugeborenen unter gesundheitlichen Beeinträchtigungen durch den Alkoholkonsum der Mutter während der Schwangerschaft leiden. Eine besonders starke Ausprägung dieser Schädigungen, das Fetale Alkohol Syndrom (FAS), wird bei etwa 4.000 Geburten jährlich beobachtet [2]. Die Diagnose geringergradiger Schäden ist schwierig und unterbleibt häufig. Auch wenn eine kurative Behandlung der durch den Alkohol hervorgerufenen Erkrankung des Kindes meist nicht möglich ist, so kann eine frühzeitige Diagnose helfen Ansprüche gegenüber Krankenkassen durchzusetzen und z.B. im Bildungsbereich frühzeitig eine gezielte zusätzliche Förderung zu ermöglichen.

Zu den beobachteten Schädigungen durch den Alkoholkonsum der Mutter während der Schwangerschaft zählen neben neurologischen Schäden, Lenschwächen und anderer mentaler Erkrankungen, vermindertes Wachstum, Verhaltensauffälligkeiten und physiognomische Veränderungen z.B. im Gesicht [94].

3 Ergebnisse

3.1 Manuskript I:

Combined use of fatty acid ethyl esters and ethyl glucuronide in hair for diagnosis of alcohol abuse: interpretation and advantages.

3.1.1 Zusammenfassung

In dieser Studie wurde die kombinierte Analyse und Interpretation von Fettsäureethylestern und Ethylglucuronid als Alkoholmarker im Haar untersucht. Die Haarproben stammten aus verschiedenen Anwendungsbereichen, wie der Fahreignungsbegutachtung, dem Workplace-Drug-Testing und von familiengerichtlichen Fällen, in denen z.B. Sorgerechtsfragen zu klären waren.

Unter Berücksichtigung der zum Zeitpunkt der Datenerhebung verwendeten Grenzwerte von 25 pg/mg für das Ethylglucuronid und 0,50 ng/mg für die Summenkonzentration der Fettsäureethylester wurde in 75 % der Fälle ein übereinstimmendes Ergebnis für beide Marker gefunden, wobei es sich um 103 negative und 28 positive Ergebnisse gehandelt hat. In 30 Fällen wurden positive Ergebnisse für die FSEE und negative Ergebnisse für das Ethylglucuronid erhalten. Außerdem wurden in 13 Fällen ein positiver EtG- und ein negativer FSEE-Befund erhalten. Diese Daten sowie Daten aus der Literatur zeigen, dass die Zahl der abweichenden Befunde sich reduzieren ließe, wenn man für ein proximales Haarsegment von 0-3 cm Länge die Grenzwerte von 0,50 ng/mg für FSEE und 30 pg/mg für EtG verwenden würde.

Die pharmakokinetischen Abläufe und Eigenschaften wurden von der Aufnahme des Alkohols bis hin zur Einlagerung der Alkoholmarker in das Haar untersucht. Besonderes Interesse galt dem Zusammenhang zwischen aufgenommener Alkoholmenge und der Menge an ins Haar inkorporiertem Alkoholmarker. Es wurde gezeigt, dass die Konzentrationen beider Marker im Besonderen von der Fläche unter der Kurve der Blutalkoholkonzentration aufgetragen gegen die Zeit (AUC(EtOH)) abhängig sind. Aufgrund der Tatsache, dass Ethanol in den relevanten Konzentrationsbereichen nach einer Kinetik nullter Ordnung abgebaut wird, ließ sich nachweisen, dass die AUC(EtOH) überproportional ansteigt bei Tagesalkoholdosen zwischen 60 und 120g. Diese

Besonderheit des Alkoholabbaus führt dazu, dass gerade bei der Haaranalyse auf Alkoholmarker die Diskriminierungsleistung zwischen sozialem Trinkverhalten und Alkoholmissbrauch sehr hoch ist.

Für die gemeinsame Interpretation von EtG und FSEE wurde ein Bewertungsschema entwickelt und vorgestellt. Es konnte gezeigt werden, dass die gemeinsame Auswertung der beiden Marker die Ergebnissicherheit erhöhen kann, da falsch positive oder falsch negative Ergebnisse, durch z.B. Messfehler, biologische Variabilität oder Haarkosmetika teilweise vermieden werden können.

3.1.2 Publikation

Pragst F, Rothe M, Moench B, **Hastedt M**, Herre S, Simmert D.

Combined use of fatty acid ethyl esters and ethyl glucuronide in hair for diagnosis of alcohol abuse: interpretation and advantages.

Forensic Sci Int. 2010 Mar 20;196(1-3):101-10.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2009.12.028>

3.2 Manuskript II:

Detecting alcohol abuse: traditional blood alcohol markers compared to ethyl glucuronide (EtG) and fatty acid ethyl esters (FAEEs) measurement in hair.

3.2.1 Zusammenfassung

In dieser Studie wurden an 169 Probanden die Eignung und die Leistungsfähigkeit sowohl der traditionellen im Blut bestimmten Langzeitalkoholmarker Desialotransferrin (CDT), Gamma-Glutamyltransferase (GGT), Aspartataminotransferase (AST), Alaninaminotransferase (ALT) und des mittleren Korpuskularvolumens der Erythrozyten (MCV), als auch der direkten im Haar nachweisbaren Alkoholmarker Ethylglucuronid (EtG) und den Fettsäureethylestern (FSEE) untersucht. Als Testpersonen wurden Alkoholranke in den Entzugskliniken der *Charité* und im *St. Hedwigs Krankenhaus* Berlin rekrutiert sowie Abstinenzler und Normaltrinker aus dem sozialen Umfeld der Forschungsgruppe untersucht. Es wurden jeweils detaillierte Angaben zu den Trinkgewohnheiten und möglichen Störgrößen für die Untersuchungen, wie Haarkosmetika, gesammelt.

Basierend auf diesen Daten wurden die Sensitivitäten und Spezifitäten der einzelnen Marker berechnet, die Methodenperformances als Fläche unter der „Receiver Operating Characteristic“ Kurve (ROC curve AUC) sowie die optimalen Cut-off-Werte wurden ermittelt. Die größten ROC curve AUCs wurden für EtG, GGT und CDT mit 0,941, 0,943 und 0,899 berechnet. Das relativ gute Ergebnis für die indirekten Marker GGT und CDT ist wahrscheinlich zum Teil auf das Studiendesign zurückzuführen. Da beide Marker etwa innerhalb von 2 bis 3 Wochen nach Abstinenzbeginn wieder im Referenzbereich liegen, wurde ein Abstinenzbeginn von mehr als 2 Wochen vor der Probennahme als Ausschlusskriterium festgesetzt.

Für Ethylglucuronid wurde als optimaler Grenzwert zur Unterscheidung von Normaltrinkern und Alkoholikern eine Konzentration von 28 pg/mg berechnet. Für die Fettsäureethylester wurde ein optimaler Cut-off von 0,675 ng/mg errechnet. Diese Grenzwerte wurden für den proximalen Haarabschnitt 0-3 cm ermittelt.

Es hat sich zudem gezeigt, dass durch die kombinierte Interpretation von FSEE und EtG im Haar, die Zahl der falsch positiven und falsch negativen Befunde minimiert werden kann.

3.2.2 Publikation

Hastedt M, Büchner M, Rothe M, Gapert R, Herre S, Krumbiegel F, Tsokos M, Kienast T, Heinz A, Hartwig S.

Detecting alcohol abuse: traditional blood alcohol markers compared to ethyl glucuronide (EtG) and fatty acid ethyl esters (FAEEs) measurement in hair.

Forensic Sci Med Pathol. 2013 Dec;9(4):471-7.

<http://dx.doi.org/10.1007/s12024-013-9416-8>

3.3 Manuskript III:

Fatty acid ethyl esters in hair as alcohol markers: estimating a reliable cut-off point by evaluation of 1,057 autopsy cases.

3.3.1 Zusammenfassung

1057 Sektionsfälle aus den Jahren 2005 bis 2011 wurden ausgewertet und genutzt, um einen geeigneten Grenzwert für die Unterscheidung zwischen Normaltrinkern und Alkoholikern mittels Haaranalyse auf Fettsäureethylester zu berechnen. Damit berücksichtigt diese Studie eine deutlich größere Fallzahl als die zuvor publizierten Untersuchungen zur Abschätzung eines geeigneten Grenzwertes.

Bei Sektionsfällen steht in der Regel eine Reihe an Daten zur Verfügung, die man bei der Untersuchung lebender Probanden nur schwer gewinnen kann. So wurden Sektionsbefunde an inneren Organen, welche durch Alkohol verursacht worden sein können, erfasst. Besonderes Interesse galt Schädigungen an der Leber, dem Herzen, der Bauchspeicheldrüse, dem Gehirn sowie dem Gastrointestinaltrakt. Außerdem standen polizeiliche Ermittlungsakten, welche grundsätzlich auch Angaben zur Krankenvorgeschichte und somit auch zu einem eventuellen Alkoholismus enthielten, zur Verfügung.

In einem ersten Schritt wurden alle Fälle bezüglich der möglicherweise alkoholbedingten Organschäden ausgewertet. In 80,2 % der untersuchten Fälle wurden eine oder mehrere pathologische Organbefunde erhoben, die mit einem Alkoholmissbrauch in Zusammenhang stehen könnten. Basierend auf der Spezifität dieser Befunde sowie der Daten aus der polizeilichen Ermittlungsakte wurde eine Einteilung der Fälle in 3 Gruppen vorgenommen: a) keine Hinweise auf Alkoholmissbrauch (soziales Trinkverhalten wird angenommen) (n = 168), b) unklarer Konsumstatus (n = 387), c) Alkoholmissbrauch (n = 502).

In einem zweiten Schritt wurden basierend auf den Fällen aus der Gruppe mit sozialem Trinkverhalten und der Gruppe der Alkoholiker Sensitivität und Spezifität der Fettsäureethylester als Langzeitalkoholmarker im Haar bestimmt. Anschließend wurde

eine Receiver Operating Characteristic (ROC) Analyse zur Abschätzung des optimalen Cut-off-Wertes für diese Methode durchgeführt.

Die Fläche unter der ROC-Kurve, welche die Performance der Methode widerspiegelt, wurde mit 0,745 berechnet. Dies spricht für eine nur moderate Leistungsfähigkeit der Methode. Zum Einen kann die Untersuchung postmortaler Proben aufgrund unbekannter Liegezeit bis zur Probennahme und ungünstiger Umgebungsbedingungen, Gärungsvorgängen oder auch wegen des schlechten Hygienestatus der Testpersonen erschwert sein. Am wahrscheinlichsten ist die im Vergleich zu anderen Studien eher geringe Fläche unter der ROC-Kurve darauf zurückzuführen, dass in dieser Studie keine Daten zur haarkosmetischen Behandlung vorlagen und somit nicht berücksichtigt werden konnten. Haarkosmetika können einen deutlichen Einfluss auf die Alkoholmarkerkonzentrationen im Haar haben. Daher wird bei lebenden Probanden die Verwendung von Haarkosmetika bei der Probennahme erfragt. Insgesamt sollte jedoch auch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass frühere Studien, die in aller Regel wesentlich kleinere Kollektive zur Berechnung von Sensitivität und Spezifität berücksichtigt haben, möglicherweise die Leistungsfähigkeit der Methode überschätzt haben.

In dieser Studie konnte kein signifikanter Niveauunterschied zwischen den Konzentrationen in den proximalen Haarsegmenten 0-3 cm und 0-6 cm nachgewiesen werden. Außer für das aufgrund seiner Doppelbindungen oxidationsempfindliche Ethyloleat, ließen sich bei trockener und lichtgeschützter Lagerung für die anderen FSEE hohe Stabilitäten über einen Zeitraum von etwa 800 Tagen nachweisen.

Der optimale Cut-off für die FSEE im Haar zur Unterscheidung zwischen sozialem Trinkverhalten und chronisch exzessivem Alkoholkonsum liegt bei 1,08 ng/mg mit einer Sensitivität von 56 % und einer Spezifität von 80 %. Die Untersuchungen haben gezeigt, dass Ethyloleat, -palmitat und -stearat als einzelne Fettsäureethylester für sich genommen eine mit dem Summenparameter vergleichbare Leistung als Alkoholmarker zeigen. Hier wäre eine Möglichkeit zur Vereinfachung der Methode gegeben.

3.3.2 Publikation

Hastedt M, Bossers L, Krumbiegel F, Herre S, Hartwig S.

Fatty acid ethyl esters in hair as alcohol markers: estimating a reliable cut-off point by evaluation of 1,057 autopsy cases.

Forensic Sci Med Pathol. 2013 Jun;9(2):184-93.

<http://dx.doi.org/10.1007/s12024-013-9425-7>

3.4 Manuskript IV:

Practical experiences in application of hair fatty acid ethyl esters and ethyl glucuronide for detection of chronic alcohol abuse in forensic cases

3.4.1 Zusammenfassung

Die Ergebnisse von 1872 Haarproben, die auf Fettsäureethylester (FSEE) und Ethylglucuronid (EtG) als Langzeitalkoholmarker untersucht wurden, werden in dieser Studie dargestellt.

Selbstauskünfte zum Alkoholkonsum, zur Verwendung von Haarkosmetika, zum Geschlecht und der Haarlänge wurden für die Auswertungen berücksichtigt. CDT und GGT Werte standen in 477 bzw. 454 Fällen zum Abgleich zur Verfügung. Nach Ausschluss unklarer Fälle wurde anhand von Fällen mit höchstens mäßigem Alkoholkonsum auf der einen Seite und Fällen, in denen ein chronisch exzessiver Alkoholkonsum anzunehmen ist, auf der anderen Seite, eine ROC Analyse durchgeführt. Für die Fettsäureethylester wurde der proximale Haarabschnitt 0-6 cm und für das Ethylglucuronid der proximale Abschnitt 0-3 cm untersucht. Die Grenzwerte von 1,0 ng/mg für die FSEEs (0-6 cm) und 30 pg/mg für das EtG (0-3 cm), die von der SoHT 2011 im Konsensus für die Alkoholmarkerbestimmung im Haar vorgeschlagen wurden, konnten grundsätzlich bestätigt werden.

Es konnte gezeigt werden, dass die Verwendung alkoholhaltiger Haarkosmetika, wie Haarspray, zu einer deutlichen Erhöhung der Fettsäureethylesterkonzentration im Haar führen. Die Ethylglucuronidkonzentration wird hierdurch nicht beeinflusst. Allerdings ließen sich in gefärbtem Haar durchschnittlich um 63 % und nach Bleichung sogar um 80 % verminderte Ethylglucuronidkonzentrationen gegenüber unbehandeltem Haar

feststellen. Haargel und –wachs hat insgesamt keinen signifikanten Effekt auf die Alkoholmarkerkonzentrationen im Haar gezeigt, wobei dies im Einzelfall, je nach Zusammensetzung des Kosmetikums, anders sein kann.

Bei Alkoholikern, die den Konsum vor der Probennahme eingestellt hatten, konnte beobachtet werden, dass es teilweise bis zu 10 Monate dauert, bis die Alkoholmarkerkonzentrationen im Haar wieder im für Normaltrinker und Abstinenzler typischen Bereich sind.

Die Untersuchung von Achselhaar und Beinhaar führte bei den Fettsäureethylestern verglichen mit Kopfhaar zu niedrigeren, die Untersuchung von Brusthaar zu höheren Befunden. Die Ethylglucuronidkonzentrationen hingegen waren im Achselhaar niedriger und im Beinhaar höher als im Kopfhaar.

Die kombinierte Interpretation von FSEE und EtG-Befunden führte zu einer geringeren Anfälligkeit für die angesprochenen Fehlerquellen und kann die Ergebnissicherheit erhöhen.

3.4.2 Publikation

Suesse S, Pragst F, Mieczkowski T, Selavka CM, Elian A, Sachs H, **Hastedt M**, Rothe M, Campbell J.

Practical experiences in application of hair fatty acid ethyl esters and ethyl glucuronide for detection of chronic alcohol abuse in forensic cases.

Forensic Sci Int. 2012 May 10;218(1-3):82-91.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2011.10.006>

3.5 Manuskript V:

Workplace alcohol testing program by combined use of ethyl glucuronide and fatty acid ethyl esters in hair.

3.5.1 Zusammenfassung

Die Anwendbarkeit und Eignung der Haaranalyse auf Alkoholmarker im Rahmen eines arbeitsplatzbezogenen Drogentestprogramms (Workplace Drug Testing) wurde untersucht. Außerdem wurde die analytische Validierung der FSEE-Bestimmung im Haar nach den *GTFCh*-Richtlinien vorgestellt.

An Arbeitnehmer, die einen Beruf ausüben, in dem Sie die Verantwortung für Menschenleben oder wertvolle Güter tragen, wie zum Beispiel Piloten, werden besonders hohe Anforderungen gestellt. Bereits kleine Fehler können schwerwiegende Konsequenzen nach sich ziehen. Daher kann in einem solchen beruflichen Umfeld keinesfalls Drogen- oder Alkoholmissbrauch toleriert werden. Andererseits muss eine angewandte Testmethode in einem solchen Falle äußerst zuverlässig sein, da positive Befunde schwere berufliche Einschnitte für den Arbeitnehmer bedeuten können und falsch negative Befunde ggf. zu einer fortgesetzten Gefährdung Dritter beitragen können.

Die Methode zur Fettsäureethylesterbestimmung im Haar wurde nach den Richtlinien der *GTFCh* validiert. Der Arbeitsbereich liegt zwischen 0,05 ng/mg und 5,0 ng/mg für die einzelnen Fettsäureethylester. Die Nachweisgrenzen lagen zwischen 4 und 15 pg/mg Haar und die Bestimmungsgrenzen lagen zwischen 11 und 31 pg/mg. Die Genauigkeit wurde als 95%-Toleranzintervall berechnet und lag im Rahmen der Vorgaben der *GTFCh*.

Bestimmt wurden die FSEEs und das EtG im Haar von 78 Arbeitnehmern aus einem Berufsfeld mit erhöhtem Gefährdungspotential. Anlass für die Untersuchung war in der Regel die Vermutung, dass ein erhöhter Alkoholkonsum vorliegt. In 59 dieser Fälle liegen zudem Daten zu den traditionellen im Blut bestimmten Alkoholmarkern Aspartataminotransferase (AST), Alaninaminotransferase (ALT),

Gammaglutamyltransferase (GGT) und dem mittleren Erythrozyteneinzelvolumen (MCV) (58 Fälle) vor.

Untersucht wurde jeweils, sofern vorhanden, der kopfnaher Haarabschnitt 0-3 cm. Zur Auswertung wurden die Grenzwerte der *Society of Hair Testing* (2009) zur Unterscheidung zwischen sozialem und chronisch exzessivem Alkoholkonsum verwendet. Für die FSEEs lag der Cut-off bei 0,50 ng/mg und für das EtG bei 30 pg/mg Haar. Außerdem wurde ein stufenweise aufgebautes Bewertungsschema für die kombinierte Bewertung der FSEE- und EtG-Befunde angewandt.

In 50 Fällen (60 %) wurden keine Hinweise auf Alkoholmissbrauch gefunden, schwache Hinweise wurden in 13 Fällen (17 %) gefunden und deutliche Hinweise auf einen chronisch exzessiven Alkoholkonsum wurden in 11 Fällen (14 %) erhalten. In 4 Fällen waren die Befunde so stark abweichend in ihrer Aussage, dass keine sichere Einschätzung des Alkoholkonsums vorgenommen werden konnte. Die traditionellen Alkoholmarker konnten die Ergebnisse der Haaranalyse nur teilweise bestätigen. Ihre vergleichsweise geringe Sensitivität und Spezifität ist bekannt und sie haben erwartungsgemäß weniger positive Befunde gezeigt als die Haaranalyse.

Die Haaranalyse auf Alkoholmarker, besonders wenn sowohl die FSEEs als auch das EtG bestimmt und gemeinsam ausgewertet werden, ist eine sehr gut für den Einsatz im Rahmen eines Workplace Drug Testing-Programms geeignete Methode. Da eine gewisse Fehlerquote bei Biomarkern immer zu erwarten ist, sollte die Haaranalyse aber nur als ein Teil der diagnostischen Methoden gesehen und nicht isoliert betrachtet werden.

3.5.2 Publikation

Hastedt M, Herre S, Pragst F, Rothe M, Hartwig S.

Workplace alcohol testing program by combined use of ethyl glucuronide and fatty acid ethyl esters in hair.

Alcohol Alcohol. 2012 Mar-Apr;47(2):127-32.

<http://dx.doi.org/10.1093/alcalc/agr148>

3.6 Manuskript VI:

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.

3.6.1 Zusammenfassung

Fettsäureethylester und Ethylglucuronid wurden in 602 Mekoniumproben bestimmt. Diese „Baseline“-Studie wurde durchgeführt um einen Referenzbereich für die Alkoholmarkerkonzentrationen im Mekonium abschätzen zu können.

Die Fettsäureethylesterbestimmung im Mekonium erfolgte mittels Dampfraum-Festphasenmikroextraktion (HS-SPME) und anschließender GC/MS. Bestimmt wurden, abweichend von der Haaranalyse, die Fettsäureethylester Ethylpalmitat, -linolenat, -oleat und -stearat. Das Ethylglucuronid wurde nach flüssig/flüssig-Extraktion mit LC-MS/MS bestimmt.

Verwendet man für die FSEE einen Grenzwert von 500 ng/g, um von natürlichen FSEE-Gehalten abzugrenzen, so wurden 43 Fälle (7 %) positiv getestet. Die Summenkonzentrationen dieser Fälle lagen zwischen 507 und 22.580 ng/g mit einem Ausreisser von 150.000 ng/g. EtG wurde in 97 Fällen (16 %) nachgewiesen in Konzentrationen bis 10.200 ng/mg mit einem Ausreisser von 82.000 ng/g.

Eine optimale Übereinstimmung zwischen beiden Markern wurde erreicht mit einem Cutoff von 247 ng/g für EtG und 500 ng/g für FSEE. 547 Fälle wurden demnach negativ auf beide Marker getestet. In 33 Fällen waren beide Marker positiv und 9 Fälle sind positiv auf FSEE und negativ auf EtG, 7 Fälle positiv auf EtG und negativ auf FSEE getestet worden.

In keinem der 607 Fälle hat die Mutter einen erheblichen Alkoholkonsum angegeben und es wurden bei keinem der Kinder eindeutige klinische Zeichen für eine alkoholische Schädigung gefunden.

Die kombinierte Interpretation der beiden Alkoholmarker erhöht die Ergebnissicherheit und führt zur Vermeidung von falsch negativen und falsch positiven Befunden.

3.6.2 Publikation

Bakdash A, Burger P, Goecke TW, Fasching PA, Reulbach U, Bleich S, **Hastedt M**, Rothe M, Beckmann MW, Pragst F, Kornhuber J.

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. 2010 Apr;396(7):2469-77.

<http://dx.doi.org/10.1007/s00216-010-3474-5>

3.7 Manuskript VII:

Fatty acid ethyl esters (FAEEs) as markers for alcohol in meconium: method validation and implementation of a screening program for prenatal drug exposure.

3.7.1 Zusammenfassung

Alkoholkonsum während der Schwangerschaft ist ein schwerwiegendes Problem in unserer Gesellschaft. Als eine der schwersten Ausprägungen fetaler alkoholbedingter Erkrankungen wird das Fetale Alkohol Syndrom (FAS) angesehen. Die Folgen sind unter anderem ein verlangsamtes Wachstum, retardierte mentale Entwicklung, Verhaltensauffälligkeiten wie Hyperaktivität und Lernschwächen.

Daher besteht großer Bedarf an Biomarkern, die die schwierige Diagnose einer solchen Embryopathie unterstützen können. Ärzte schrecken häufig vor invasiven Untersuchungen oder Haarentnahmen zurück, da vielfach auf Widerstand der Eltern getroffen wird; sei es aus kosmetischen Gründen oder was gerade in den relevanten Fällen im Vordergrund stehen dürfte, aufgrund der Tatsache das ein gesellschaftlicher Druck Mütter veranlasst, ihren Alkoholkonsum nicht zuzugeben. Gerade wenn es um Säuglinge geht, ist eine nicht invasive Untersuchung zu bevorzugen.

In der vorliegenden Studie wurde eine Methode zur Bestimmung von Fettsäureethylestern als Alkoholmarker im Mekonium nach den Vorgaben der *GTFCh* validiert und auf ein drogenassoziiertes Probandenkollektiv (122 Fälle) angewendet. Die Fettsäureethylesterbestimmung erfolgte im Rahmen eines Drogenscreenings.

Eine Auswahl von Fettsäureethylestern wurde untersucht: Ethylmyristat, Ethylpalmitat, Ethyloleat, Ethyllinolat, Ethylstearat und Ethyllinolenat. Gemessen wurde gegen die deuterierten Standards D5-Ethyloleat, -stearat, -palmitat und -myristat. Für die Kalibrierung wurden jeweils 50 mg Mekonium mit den FSEE zu folgenden Konzentrationen gespiked: 0,05, 0,10, 0,20, 0,50, 1, 2, 5 und 10 ng/mg. Für jedes Level erfolgte eine Sechsfachbestimmung. Linearität und Varianzenhomogenität wurden bestätigt. Richtigkeit und Präzision wurden untersucht und als 95%-Toleranzintervall dargestellt. Die Bestimmungs- und Nachweisgrenzen für die einzelnen Fettsäureethylester lagen zwischen 0,010 und 0,044 ng/mg bzw. zwischen 0,003 und 0,018 ng/mg.

Von den 122 untersuchten Mekoniumproben aus der drogenassoziierten Population wurden 89 positiv getestet auf eine oder mehrere der untersuchten Wirkstoffe. In 25 Fällen wurden erhöhte FSEE-Konzentrationen gemessen. Als Grenzwert wurde, wie in der Literatur mehrfach beschrieben, eine FSEE-Konzentration von 0,50 ng/mg Mekonium angewendet. Alkohol war damit der am dritthäufigsten aufgenommene Wirkstoff in dieser Probandengruppe. Es konnte gezeigt werden, dass die validierte Methode gut geeignet ist zum Einsatz in Drogenscreenings in Realproben und dass eine Untersuchung auf Alkoholmarker gerade bei bekanntem Drogenabusus der Mutter sinnvoll ist.

3.7.2 Publikation

Hastedt M, Krumbiegel F, Gapert R, Tsokos M, Hartwig S
Fatty acid ethyl esters (FAEEs) as markers for alcohol in meconium: method validation and implementation of a screening program for prenatal drug exposure.
Forensic Sci Med Pathol. 2013 Sep;9(3):287-95.
<http://dx.doi.org/10.1007/s12024-012-9385-3>

4 Abgrenzung der Eigenleistung

Die vorliegende Dissertation wurde als kumulative Arbeit eingereicht. Grundlage dieser Arbeit sind sieben Publikationen. Die folgende Tabelle legt die Eigenleistung des Autors an den einzelnen Manuskripten dar.

Tab. 1 Eigenanteil an den Manuskripten der vorliegenden kumulativen Dissertation [in %].

Manuskript	Konzeption	Durchführung (Datenerhebung)	Datenauswertung	Manuskripterstellung
I	10	30	10	10
II	50	30	90	90
III	80	40	90	90
IV	10	10	10	10
V	90	60	90	80
VI	10	40	30	10
VII	60	20	30	80

5 Diskussion

5.1 Bedeutung der Ergebnisse und Einschränkungen

Angesichts der zentralen Bedeutung des Alkoholkonsums und –missbrauchs für viele gesellschaftliche aber auch individuelle Probleme von Millionen Menschen in unserem Land, ist die Etablierung von zuverlässigen Langzeitalkoholmarkern ein wichtiges Anliegen. In der vorliegenden Arbeit wurden Methoden zum Nachweis von Alkoholmarkern in Haaren und im Mekonium validiert und mittels klinischer Studien Daten zur Optimierung der Entscheidungsgrenzen dieser Methoden ermittelt.

Die Methodvalidierungen erfolgten nach den Richtlinien der *GTFC* und haben belegt, dass die entwickelten Methoden zuverlässig und genau sind. Vor allem die Haaranalyse auf Alkoholmarker ist mittlerweile gut etabliert bei Fragestellungen wie postmortalem Nachweis von Alkoholmissbrauch, familienrechtlichen Fragestellungen, der Fahreignungsbegutachtung oder dem Workplace Drug Testing. Mehrere tausend Haaranalysen auf Alkoholmarker werden jährlich in Deutschland durchgeführt. Fachkreise und Auftraggeber haben erkannt, dass die Leistungsfähigkeit und Aussagekraft dieser Analytik so hoch ist, dass die höheren Kosten gegenüber traditionellen Alkoholmarkern wie CDT und GGT in vielen Fällen gerechtfertigt sind. Fachgesellschaften und Organisationen wie die *Society of Hair Testing*, die *European Workplace Drug Testing Society* und die *Bundesanstalt für Straßenwesen* haben Richtlinien zur Bestimmung von Ethylglucuronid und/oder Fettsäureethylestern im Haar formuliert und empfehlen diese Methoden für verschiedenste Fragestellungen.

Dennoch werden sowohl gerichtlich als auch innerhalb der Fachgesellschaften die zu verwendenden Grenzwerte diskutiert [95]. Diese Arbeit hat einen Beitrag zu dieser Diskussion geleistet und es wurden anhand von verschiedenen Studien Daten zur Optimierung der Grenzwerte gesammelt und ausgewertet. Je nach Studiendesign sind die Ergebnisse jedoch mit Unsicherheiten behaftet. Da aus ethischen Erwägungen bei solchen Forschungsarbeiten die Gesundheit von Testpersonen nicht beeinträchtigt werden darf, konnten zur Ermittlung geeigneter Grenzwerte natürlich keine gesunden Testpersonen in Referenzgruppen und Untersuchungsgruppen, in denen täglich in schädlichem Maße Alkohol konsumiert werden müsste, eingeteilt werden. Alle im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten wurden auf indirektem Wege ermittelt und beinhalten entsprechende Unsicherheiten.

Es wurden Alkoholiker in Entzugskliniken für Untersuchungen gewonnen. Hier besteht zwar kein wesentliches Interesse an Falschangaben bezüglich des Alkoholkonsums, jedoch handelt es sich natürlich um eine Gruppe von Alkoholikern, die sich in der Regel in einem fortgeschrittenen Stadium der Alkoholkrankheit befindet. Testpersonen die sich am Übergang zwischen sozialem Trinkverhalten und Alkoholmissbrauch befinden sind sicherlich unterrepräsentiert. Zudem versuchen viele Alkoholkranke bevor sie sich in den

Entzug begeben, ihren Alkoholkonsum stetig zu reduzieren. Ein gleichmäßiges Trinkverhalten in den Monaten vor der Probennahme war häufig nur begrenzt gegeben.

Die Testpersonen der Referenzgruppe hingegen haben zwar freiwillig teilgenommen, es kann jedoch aufgrund des gesellschaftlichen Druckes angenommen werden, dass gerade Testpersonen mit erhöhtem sozialem Alkoholkonsum oder bereits schädlichem Konsum, ihre täglichen Trinkmengen zu niedrig angegeben haben.

Um nicht auf Selbstauskünfte der Testpersonen angewiesen zu sein, wurde zur Abschätzung einer geeigneten Entscheidungsgrenze für die FSEE ein Kollektiv von über 1000 Todesfällen untersucht. Hier standen Daten aus der staatsanwaltschaftlichen Ermittlungsakte und Krankenberichten zur Verfügung. Außerdem konnten alkoholbedingte Organschäden bei der Sektion erfasst werden. Als wesentlicher Unsicherheitsfaktor wurde bei dieser Studie die unbekannte haarkosmetische Behandlung eingeschätzt. Bereits bei einfacher Anwendung eines alkoholhaltigen Haarkosmetikums kann die FSEE-Konzentration im Haar deutlich oberhalb des Grenzwertes für chronisch exzessiven Alkoholkonsum liegen. Aggressive Haarkosmetika wie Bleich- und Färbemittel können zu einer deutlichen Absenkung der Analytkonzentration im Haar führen. Es ist daher in der Praxis unerlässlich, haarkosmetische Behandlungen bei der Probennahme zu erfragen und zu protokollieren. Ein grundsätzliches Problem ist, dass eine objektive Einschätzung oder ein analytischer Nachweis solcher Haarkosmetika meist nicht möglich ist. Ein Abgleich mit Körperhaaren kann weitere Informationen liefern, allerdings ist hier grundsätzlich das vom Kopfhaar abweichende Wachstumsverhalten (vor allem erhöhter Anteil an telogenem Haar) zu berücksichtigen.

Der derzeit verwendete Grenzwert für das Ethylglucuronid zur Unterscheidung von sozialem und chronisch exzessivem Alkoholkonsum wurde bestätigt. Für die Fettsäureethylester wäre es sinnvoll, die Entscheidungsgrenze anzuheben, um zu viele falsch positive Befunde zu vermeiden. Derzeit schlägt die Society of Hair Testing cut-offs für die FSEE in Haaren von 0,50 ng/mg für den proximalen Haarabschnitt 0-3 cm und von 1,0 ng/mg für den proximalen Haarabschnitt 0-6 cm vor. Die Untersuchungen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, legen nahe, dass für die genannten Haarabschnitte weder systematische Kumulations- noch Auswascheffekte zu erwarten

sind oder dass diese sich im Wesentlichen aufheben und dass ein einheitlicher Cut-off möglich wäre. In einer Studie an lebenden Probanden wurde ein optimierter Cut-off von 0,70 ng/mg und als Ergebnis einer Untersuchung von 1057 Sektionsfällen wurde ein Cut-off von 1,0 ng/mg vorgeschlagen. In jedem Fall ist eine Anhebung des aktuellen Grenzwertes empfehlenswert. Weitere Daten zur Optimierung des Cut-offs sollten gesammelt werden.

Trotz einer Reihe von Parametern, die die Ergebnissicherheit beeinflussen können, konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass besonders die Haaranalyse auf Alkoholmarker den traditionell verwendeten aus dem Blut bestimmten Alkoholmarkern überlegen ist. Die Sensitivität und Spezifität insbesondere der kombiniert interpretierten FSEE- und EtG-Befunde ist wesentlich höher als dies bei den traditionellen Markern wie CDT, GGT, AST, ALT und MCV der Fall ist. Mit Ausnahme von MCV haben die traditionellen Marker nach Abstinenzbeginn nur noch ein Zeitfenster von 2-3 Wochen, in denen Werte oberhalb des Referenzbereichs gemessen werden können. Mit der Haaranalyse werden Zeitfenster von mehreren Monaten vor der Probennahme abgedeckt. Die traditionellen indirekten Alkoholmarker zeigen zudem nicht unbedingt einen chronisch erhöhten Konsum an; sie bewegen sich erst aus dem Referenzbereich wenn nach häufig langjährigem erhöhtem Alkoholkonsum eine Organschädigung, vor allem der Leber, eintritt. Auch bei anderen Leberschädigungen durch entzündliche Erkrankungen oder Virushepatiden steigt die Konzentration von CDT, GGT, AST und ALT an.

Für Mekonium wurde eine validierte Methode für die FSEE-Bestimmung sowie eine Basisvalidierung für die EtG-Bestimmung vorgestellt. In der Laborroutine wird vor allem die FSEE-Bestimmung im Mekonium bei bekanntem Drogenkonsum, Alkoholmissbrauch der Mutter oder Verdacht darauf durchgeführt. Zwar wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Baselinestudie zu den FSEE-Konzentrationen im Mekonium einer deutschen Population durchgeführt, ein sicherer Grenzwert ist jedoch nach wie vor nicht etabliert. Wie bei den Haaren, so kann auch selbst bei abstinenten Müttern im Mekonium der Kinder häufig eine geringe FSEE-Konzentration nachgewiesen werden. Der Alkohol hierfür könnte z.B. endogen durch den Stoffwechsel produziert werden oder durch Darmbakterien entstehen. Mit einer Baselinestudie lässt sich ein Referenzbereich für physiologische Alkoholmarkerkonzentrationen im Mekonium abschätzen.

Eine bereits gestartete Studie, in der Mütter nach ihrem Alkoholkonsum während der Schwangerschaft befragt werden sollten und zudem Haar- und Mekoniumanalysen auf Alkoholmarker durchgeführt werden sollten, sowie klinische Parameter wie der Finnegan-Score erfasst werden sollten, scheiterte an der mäßigen Kooperation der Patientinnen und letztlich auch an den behandelnden Ärzten. Nur sehr wenige Mütter waren bereit diesen nicht invasiven und völlig ungefährlichen Untersuchungen zuzustimmen. Die behandelnden Ärzte scheuten häufig die Konfrontation mit den Eltern und die schwierige Frage, wie mit positiven Alkoholmarkerbefunden in solchen Fällen in der Klinik umgegangen werden sollte. Eine objektive Grundlage für diese Zurückhaltung ist kaum gegeben. Um zum Kindeswohl eine Mekoniumuntersuchung auf Alkoholmarker zu einer Routineuntersuchung werden zu lassen, bedürfte es wohl mehr politischem Druck. Die Drogenbeauftragte der Bundesregierung hat in ihrem Jahresbericht 2012 zwar die Problematik sehr deutlich angesprochen und eine Fokussierung auf das Thema Alkohol in der Schwangerschaft in Aussicht gestellt, dennoch konnte sich die Methodik in Deutschland bisher in der Praxis kaum durchsetzen [1]. Wie relevant es gerade bei Schwangerschaften, die aufgrund eines Substanzmissbrauchs der Mutter zu den Risikoschwangerschaften gehören, ist, dass die Alkoholmarker in das Drogenscreening aufgenommen werden, hat diese Arbeit gezeigt.

5.2 Ausblick und zukünftige Fragestellungen

Analytisch ist die Bestimmung von Ethylglucuronid und Fettsäureethylestern im Haar weitgehend ausgereift. Für die EtG-Analytik könnte es sinnvoll sein, durch bessere Probenaufreinigung oder empfindlichere Messtechnik die Nachweis- und Bestimmungsgrenze weiter herabzusetzen. Gerade wenn die Methode zum Erbringen eines Abstinenzbelegs genutzt werden soll, würde dies die Aussagesicherheit möglicherweise erhöhen. Für die Fettsäureethylesterbestimmung könnte eine Vereinfachung der Methode Ziel weiterer Forschungsprojekte sein. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Hinweise dafür erhalten, dass die Verwendung einzelner FSEE anstatt des Summenparameters eine vergleichbare Methodenperformance liefert. Die ohnehin schon

hohe Robustheit der Methode könnte durch die Verwendung tandemmassenspektrometrischer Detektoren erhöht werden.

Obwohl im Rahmen dieser Arbeit an großen Probandenkollektiven Untersuchungen zur Abschätzung optimaler Entscheidungsgrenzen zwischen sozialem und chronisch exzessivem Trinkverhalten durchgeführt wurden, wären weitere Studien zur Bestätigung dieser Ergebnisse und zur dauerhaften Festlegung geeigneter Grenzwerte hilfreich. Da zunehmend auf die Verwendung der Haaranalytik zum Erbringen von Abstinenzbelegen zurückgegriffen wird, sollten besonders für das EtG Studien zur Ermittlung eines optimalen Grenzwertes zur Unterscheidung zwischen Abstinenz und sozialem Trinkverhalten durchgeführt werden.

Ein Vergleich der Methodik zwischen unterschiedlichen Laboren bezüglich der Eignung unterschiedlicher Probennahmemethoden, Lagerbedingungen, Probenaufarbeitungsverfahren (Mahlung, Ultraschallextraktion, etc.), Messmethoden und deren Beitrag zur Gesamtmessunsicherheit würde die Vergleichbarkeit der Ergebnisse erhöhen.

Zur Anwendung der Haaranalyse auf Alkoholmarker bei neuen Fragestellungen sollten Studien zur Eignung durchgeführt werden. Derzeit wird die Methodik zur Überprüfung der Compliance von schwerst Leberkranken, die auf eine Lebertransplantation warten, überprüft. Die Leistungsfähigkeit der Methode wird im Vergleich zu den Ergebnissen des psychologischen Konsils, welches klassischer Weise die Frage, ob es einen fortgesetzten Alkoholabusus gibt, beantworten soll.

Für die Bestimmung von Alkoholmarkern im Mekonium wird die größte Herausforderung für die Zukunft die Ermittlung zuverlässiger Entscheidungsgrenzen sein. Auch die Performance dieser Methodik sowie die tatsächlich abgedeckten Zeitfenster sind noch weitgehend unklar.

6 Zusammenfassung

Alkoholmissbrauch und die Folgen daraus, wie schwerste gesundheitliche Schäden, Unfälle oder Gewalttaten, stellen ein großes Problem in unserer Gesellschaft dar. Um dem entgegenwirken zu können, ist es notwendig, Marker zur Verfügung zu haben, die es ermöglichen den Alkoholkonsum einer Person objektiv einschätzen zu können.

Ziel dieser Arbeit war es, Methoden zur Bestimmung von Fettsäureethylestern (FSEEs) und Ethylglucuronid (EtG) zum Nachweis eines chronisch exzessiven Alkoholkonsums zu validieren. Bei beiden Markern handelt es sich um Nebenmetabolite aus dem nichtoxidativen Alkoholstoffwechsel. Als Matrices zum Nachweis von Langzeitalkoholmarkern sind Haare und Mekonium geeignet. Insgesamt wurden Haarproben von 3350 Probanden, sowie Mekoniumproben von 724 verschiedenen Fällen auf Alkoholmarker untersucht.

Die Messmethoden zum Nachweis der beiden Marker in Haaren und im Mekonium wurden basierend auf den Vorgaben der *Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie (GTFCh)* validiert. Die Eignung dieser Methoden wurde jeweils an Realproben gezeigt. Die Fettsäureethylesterbestimmung wurde nach Flüssigextraktion der Haare oder des Mekoniums mit Headspace-Festphasenmikroextraktion (HS-SPME) und anschließender gaschromatographisch-massenspektrometrischer Detektion durchgeführt. Für die Haaranalyse auf FSEEs wurde Linearität für die Arbeitsbereiche von 0,05 ng/mg bis 0,50 ng/mg und von 0,50 ng/mg bis 5,0 ng/mg (je einzelner FSEE) gezeigt. Aufgrund von Sättigungseffekten bei der HS-SPME mussten getrennte Kalibrierungen für den niedrigen und den hohen Konzentrationsbereich durchgeführt werden. Die Nachweis- (limit of detection = LOD) und Bestimmungsgrenzen (lower limit of quantification = LLOQ) wurden für Ethylmyristat (LOD: 9 pg/mg; LLOQ: 13 pg/mg) Ethylpalmitat (LOD: 9 pg/mg; LLOQ: 19 pg/mg), Ethyloleat (LOD: 14 pg/mg; LLOQ: 31 pg/mg) und Ethylstearat (LOD: 4 pg/mg; LLOQ: 11 pg/mg) bestimmt.

Für die Methode zum Nachweis von FSEEs im Mekonium wurde Linearität für einen Arbeitsbereich von 0,05 ng/mg bis 10,0 ng/mg für die einzelnen FSEEs nachgewiesen. Nur für Ethylinolenat lag der Arbeitsbereich zwischen 0,10 ng/mg und 10 ng/mg. Für

Ethylmyristat, -palmitat, -linolat und -linolenat war eine Wichtung mit dem Faktor $1/x^2$ erforderlich, für Ethyloleat und -stearat wurde die ungewichtete Kalibrierfunktion verwendet. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden für Ethylmyristat (LOD: 8 pg/mg; LLOQ: 21 pg/mg) Ethylpalmitat (LOD: 7 pg/mg; LLOQ: 17 pg/mg), Ethyloleat (LOD: 6 pg/mg; LLOQ: 19 pg/mg), Ethyllinolat (LOD: 18 pg/mg; LLOQ: 36 pg/mg), Ethyllinolenat (LOD: 13 pg/mg; LLOQ: 44 pg/mg) und Ethylstearat (LOD: 3 pg/mg; LLOQ: 10 pg/mg) bestimmt.

Die Ethylglucuronidbestimmung erfolgte nach Flüssigextraktion der Haare oder des Mekoniums mittels Flüssigchromatographie und tandemmassenspektrometrischer Detektion. Für die Haaranalyse wurde Linearität für einen Arbeitsbereich von 7 pg/mg bis 5000 pg/mg und für die Methode zur Ethylglucuronidbestimmung im Mekonium wurde ein linearer Arbeitsbereich von 30 pg/mg bis 80000 pg/mg verwendet. Zur Wichtung der Kalibrierfunktionen wurde jeweils ein Wichtungsfaktor von $1/x^2$ verwendet. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze im Haar lag bei 2 pg/mg beziehungsweise 7 pg/mg. Im Mekonium wurde eine Nachweisgrenze von 10 pg/mg und eine Bestimmungsgrenze von 30 pg/mg ermittelt.

In einem zweiten Schritt wurde eine klinische Validierung dieser Marker durchgeführt. Es sollte untersucht werden bei welchen Cut-off-Werten eine bestmögliche Unterscheidung zwischen sozialem und chronisch exzessivem Alkoholkonsum möglich ist. Die Ermittlung geeigneter Entscheidungsgrenzen für Biomarker, die einen pathologischen Prozess oder Befund anzeigen sollen, ist sehr aufwendig. Daten über den Referenzbereich, die Korrelation zwischen Alkoholaufnahme und Markerkonzentration im Haar oder Mekonium, das betrachtete Zeitfenster, Einflussgrößen, die zu einer fehlerhaften Interpretation des Messergebnisses führen können, sowie Daten zu Sensitivität und Spezifität und damit zur Ermittlung eines geeigneten Grenzwertes, können nur auf indirektem Wege gewonnen werden. Die gezielte Aufnahme gesundheitsgefährdender Alkoholmengen kann Testpersonen nicht zugemutet werden. Die Daten wurden somit nur von Realfällen ($n = 4074$) erhoben. Zuverlässige Angaben zu Trinkgewohnheiten und -mengen, zur Haarkosmetik, zum Gesundheitsstatus allgemein und zu Basisdaten wie Körpergröße, Gewicht, Geschlecht, Haarfarbe etc. sind erforderlich und wurden einbezogen.

Für die Haaranalytik wurden sehr weitgehende Aussagen bezüglich der Methodenperformance erhalten und es wurden konkrete Vorschläge zur Optimierung der Entscheidungsgrenzen gemacht. Die Flächen unter den Receiver-Operating-Characteristic-Kurven (ROC curve AUCs) für die Fettsäureethylesterbestimmung im Haar lagen je nach Studiendesign bei 0,745, bei 0,828 bzw. bei 0,955. Für das Ethylglucuronid haben sich abhängig vom Studiendesign ROC curve AUCs von 0,941 bzw. 0,954 ergeben. Die optimierten Entscheidungsgrenzen für die Fettsäureethylesterbestimmung liegen höher als derzeit von der *Society of Hair Testing* (SoHT) vorgeschlagen. Je nach Fragestellung und je nachdem ob Daten zur Haarkosmetik vorliegen oder diese ausgeschlossen werden kann, sollte ein Grenzwert zwischen 0,70 ng/mg und 1,0 ng/mg für Fettsäureethylester (FSEE) im Haar verwendet werden. Die ermittelten Sensitivitäten lagen zwischen 56 % und 77 % bei Spezifitäten zwischen 80 % und 96 %.

Für das Ethylglucuronid (EtG) wurden optimierte Grenzwerte von 28 bzw. 30 pg/mg errechnet, was dem von der *Society of Hair Testing* vorgeschlagenen Cut-off (30 pg/mg) entspricht. Die berechneten Sensitivitäten lagen je nach Studiendesign zwischen 75 % und 83 % mit Spezifitäten von jeweils 97 %.

Die Untersuchungsergebnisse legen nahe, dass das Ethylglucuronid besser zum Nachweis eines chronisch exzessiven Alkoholkonsums geeignet ist als die Fettsäureethylester. Gleichzeitig wurde gezeigt, dass die kombinierte Interpretation beider Marker dazu führt, dass besonders wenig falsch positive und falsch negative Befunde erhalten werden.

Außerdem wurden FSEE und EtG im Haar mit den traditionell aus dem Blut bestimmten Alkoholmarkern Desialotransferrin (engl.: Carbohydrate deficient transferrin (CDT)), Gammaglutamyltransferase (GGT), mittleres Erythrozyteneinzelvolumen (engl.: mean corpuscular volume (MCV)), Aspartataminotransferase (AST) und Alaninaminotransferase (ALT) verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass die Haaranalyse auf direkte Alkoholmarker den klassischen Markern und Methoden überlegen ist. Dies liegt an den größeren Nachweiszeitfenstern und der höheren Sensitivität und Spezifität. Lediglich bei viele Monate andauerndem fortgesetzten Alkoholabusus, Ausschluss von nicht alkoholbedingten Lebererkrankungen und einem

maximal 2-3 Wochen zurückliegenden Abstinenzbeginn, sind CDT und GGT mit ROC curve AUCs von 0,899 bzw. 0,943 vielfach die wirtschaftlicheren Alternativen mit vergleichbarer Aussagekraft.

Für die Anwendung bei besonderen Fragestellungen wie Workplace Drug Testing (n = 78), familienrechtlichen Fragestellungen und bei Todesfällen (n = 1057) wurden Daten gesammelt und die Eignung der Methodik beschrieben.

Für die Bestimmung von Ethylglucuronid und Fettsäureethylestern im Mekonium wurde neben den analytischen Methodenvalidierungen eine Baselinestudie zur Abschätzung des Referenzbereiches durchgeführt, in der für eine große Population (n = 602) Alkoholmarkerkonzentrationen im Mekonium bestimmt wurden, um so „Normalwerte“ zu erhalten. Eine sichere Entscheidungsgrenze konnte so zwar nicht ermittelt werden, jedoch konnte ein Referenzbereich grob abgegrenzt werden. Für die Fettsäureethylester ist ein Cut-off bei 0,50 ng/mg und für das Ethylglucuronid von 274 pg/mg als geeignet abgeschätzt worden.

Insgesamt konnte mit dieser Arbeit bestätigt werden, dass Ethylglucuronid und Fettsäureethylester als Marker eines chronisch erhöhten Alkoholkonsums geeignet sind.

7 Summary

Alcohol abuse and its consequences such as severe illnesses, accidents or violence are major problems in western societies. Therefore, reliable and accurate biomarkers are required to objectively monitor alcohol consumption.

The aim of this research project was to validate analytical methods for the determination of fatty acid ethyl esters (FAEEs) and ethyl glucuronide (EtG) as long term alcohol abuse markers. Both markers are minor metabolites which are released during non-oxidative alcohol metabolism. Hair and meconium were identified as suitable analytical matrices that provide a large time frame. Hair samples from 3350 test persons and meconium samples from 724 cases were analyzed in total.

Methods to detect these markers in hair and meconium were validated according to the guidelines of the *German Society of Forensic Toxicologists (GTFCh)*. The applicability of these methods was demonstrated in real cases. Liquid extraction from hair or meconium was performed to determine the FAEEs. This was followed by headspace solid phase microextraction (HS-SPME) and gaschromatography mass spectrometry.

Linearity was shown for the calibration ranges from 0.05 ng/mg to 0.50 ng/mg (for the single FAEEs) and from 0.50 ng/mg up to 5.0 ng/mg. A high range and a low range calibration were applied because the calibration curve was slightly bent due to saturation effects. The limits of detection (LODs) and the lower limits of quantification (LLOQ) were estimated for ethyl myristate (LOD: 9 pg/mg; LLOQ: 13 pg/mg), ethyl palmitate (LOD: 9 pg/mg; LLOQ: 19 pg/mg), ethyl oleate (LOD: 14 pg/mg; LLOQ: 31 pg/mg) and ethyl stearate (LOD: 4 pg/mg; LLOQ: 11 pg/mg).

The method used to quantify FAEEs in meconium showed linearity for the calibration range from 0.05 ng/mg to 10.0 ng/mg (for the single FAEEs). A calibration range from 0.10 ng/mg to 10.0 ng/mg was applied only to ethyl linolenate. The curves of ethyl myristate, ethyl palmitate, ethyl linoleate and ethyl linolenate were weighted using a factor of $1/x^2$; weighting was not necessary for ethyl oleate and ethyl stearate. The limits of detection and the lower limits of quantification were estimated for ethyl myristate (LOD: 8 pg/mg; LLOQ: 21 pg/mg), ethyl palmitate (LOD: 7 pg/mg; LLOQ: 17 pg/mg),

ethyl oleate (LOD: 6 pg/mg; LLOQ: 19 pg/mg), ethyl linoleate (LOD: 18 pg/mg; LLOQ: 36 pg/mg), ethyl linolenate (LOD: 13 pg/mg; LLOQ: 44 pg/mg) and ethyl stearate (LOD: 3 pg/mg; LLOQ: 10 pg/mg).

Following liquid extraction from hair or meconium, ethyl glucuronide was measured using liquid chromatography tandem mass spectrometry. A linear calibration ranging from 7 pg/mg up to 5000 pg/mg was applied in the detection of EtG in hair. A linear calibration curve from 30 pg/mg to 80000 pg/mg was used in order to quantify EtG in meconium. The calibration functions were weighted with the factor $1/x^2$. The LOD and LLOQ in hair were 2 pg/mg and 7 pg/mg, respectively. In meconium, a LOD of 10 pg/mg and a LLOQ of 30 pg/mg were estimated.

In addition to the analytical validation a clinical validation of these markers and their performances were considered important. Reliable cut-off values for the differentiation between social drinking and chronic excessive drinking should be investigated. The estimation of suitable reference ranges and cut-offs for biomarkers, used for the detection of pathological processes, is difficult. Data on reference ranges, the correlation between alcohol intake and marker concentration in hair or meconium, the covered time frame, influence values which may lead to a misinterpretation as well as data on sensitivity and specificity can only be generated indirectly. Test persons cannot participate in studies which include the systematic intake of harmful amounts of alcohol. Therefore, the data was generated from real cases (n = 4074). Reliable information on drinking habits, drinking amounts, hair cosmetics, the general health status and general parameters such as body weight, height, gender and hair color were necessarily considered.

Extensive investigations on the hair test for alcohol markers were conducted and detailed results regarding method performances as well as a suggestion for optimized cut-offs were obtained. The areas under the Receiver Operating Characteristic curves (ROC curve AUCs) in the determination of FAEEs in hair were, according to the study design, 0.745, 0.828 and 0.955. For ethyl glucuronide in hair, ROC curve AUCs of 0.941 and 0.954 respectively were recorded. The cut-off values for FAEEs optimized according to the presented data were higher than the actual cut-offs proposed by the *Society of Hair Testing (SoHT)*. Depending on the population and depending on the availability of data

on hair cosmetic treatment the cut-off should be raised to a value between 0.70 ng/mg and 1.00 ng/mg. The sensitivities were estimated between 56 % and 77 % with specificities between 80 % and 96 %.

The optimized cut-off values for EtG were calculated as 28 pg/mg or 30 pg/mg respectively, which is in accordance with the proposal of the *SoHT*. Depending on the study design the sensitivities were between 75 % and 83 % with a specificity of 97 % in both cases.

The results of the presented studies indicate that ethyl glucuronide in hair is a better marker for detecting alcohol abuse when compared to FAEEs in hair. Nevertheless, it was demonstrated that the combined interpretation of both markers leads to a decreased number of false-positive and false-negative results.

In addition, hair FAEEs and hair EtG were compared to the traditional alcohol markers carbohydrate deficient transferrin (CDT), gamma-glutamyl transpeptidase (GGT), mean corpuscular volume of the erythrocytes (MCV), aspartate transaminase (AST) and alanine transaminase (ALT) which are measured using blood samples. In general, it was found that the hair analysis was more accurate than the traditional alcohol markers. Main advantages were the wider time frame that was covered, especially when EtG and FAEEs are interpreted in combination, a higher sensitivity and specificity was reported. However, markers such as CDT and GGT may be more cost-effective in some cases. Their values rose only after long-term alcohol abuse when significant organ damages became apparent and in most cases receded to their reference range within 2 or 3 weeks of alcohol abstinence.

The application of hair analysis of alcohol markers for a variety of situations, such as workplace drug testing, driving ability examination, death cases and family courts was tested and pitfalls and advantages were described.

Methods for the detection of ethyl glucuronide and fatty acid ethyl esters in meconium were validated according to forensic guidelines. A baseline study including 602 cases was undertaken to estimate a reference range for the alcohol marker concentrations and for this population the alcohol marker concentration in meconium was measured to estimate a “normal” value. A confident cut-off value could not be obtained, but, as a first

step, a reference range was roughly estimated. A cut-off of 0.50 ng/mg for FAEEs and 274 pg/mg for EtG was applied.

In conclusion, the results of this work demonstrate and confirm the applicability of ethyl glucuronide and fatty acid ethyl esters as long-term alcohol abuse markers.

8 Publikationsverzeichnis

8.1 Originalartikel in internationalen Fachzeitschriften mit Peer-Review-Verfahren

Hastedt M, Bossers L, Krumbiegel F, Herre S, Hartwig S.

Fatty acid ethyl esters in hair as alcohol markers: estimating a reliable cut-off point by evaluation of 1,057 autopsy cases.

Forensic Sci Med Pathol. 2013 Mar 26. [Epub ahead of print]

Hastedt M, Büchner M, Rothe M, Gapert R, Herre S, Krumbiegel F, Tsokos M, Kienast T, Heinz A, Hartwig S.

Detecting alcohol abuse: traditional blood alcohol markers compared to ethyl glucuronide (EtG) and fatty acid ethyl esters (FAEEs) measurement in hair.

Forensic Sci Med Pathol. 2013 Mar 17. [Epub ahead of print]

Hastedt M, Krumbiegel F, Gapert R, Tsokos M, Hartwig S.

Fatty acid ethyl esters (FAEEs) as markers for alcohol in meconium: method validation and implementation of a screening program for prenatal drug exposure.

Forensic Sci Med Pathol. 2012 Nov 5. [Epub ahead of print]

Hastedt M, Herre S, Pragst F, Rothe M, Hartwig S.

Workplace alcohol testing program by combined use of ethyl glucuronide and fatty acid ethyl esters in hair.

Alcohol Alcohol. 2012 Mar-Apr;47(2):127-32. doi: 10.1093/alcalc/agr148. Epub 2011 Dec 6.

Suesse S, Pragst F, Mieczkowski T, Selavka CM, Elian A, Sachs H, **Hastedt M**, Rothe M, Campbell J.

Practical experiences in application of hair fatty acid ethyl esters and ethyl glucuronide for detection of chronic alcohol abuse in forensic cases.

Forensic Sci Int. 2012 May 10;218(1-3):82-91. doi: 10.1016/j.forsciint.2011.10.006. Epub 2011 Oct 27.

Bakdash A, Burger P, Goecke TW, Fasching PA, Reulbach U, Bleich S, **Hastedt M**, Rothe M, Beckmann MW, Pragst F, Kornhuber J.

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. 2010 Apr;396(7):2469-77. doi: 10.1007/s00216-010-3474-5. Epub 2010 Feb 10.

Pragst F, Rothe M, Moench B, **Hastedt M**, Herre S, Simmert D.
Combined use of fatty acid ethyl esters and ethyl glucuronide in hair for diagnosis of alcohol abuse: interpretation and advantages.
Forensic Sci Int. 2010 Mar 20;196(1-3):101-10. doi: 10.1016/j.forsciint.2009.12.028.
Epub 2010 Jan 12.

8.2 Vorträge

Hastedt M, Krumbiegel F, Herre S.
Haaranalytik mit hochauflösender Massenspektrometrie
16. Tagung der sächsischen Institute für Rechtsmedizin und des Landeskriminalamtes Sachsen, Dresden, 2012

Hastedt M.
GHB/GBL – von Weihnachtsmännern und dem Komakiller
Fortbildungsveranstaltung der Berliner Ärztekammer, Veranstalter: Institut für Rechtsmedizin der Charité, Berlin, 2012

Hastedt M.
Alkohol im Straßenverkehr – Möglichkeiten der Haaranalytik
Fortbildungsveranstaltung der Landesektion Berlin-Brandenburg des B.A.D.S., Berlin, 2012

Hastedt M.
K.O.-Mittel GHB – ein interessanter Fall
GTFCh Treffen der Toxikologen Berlin-Brandenburg, Berlin, 2012

Hastedt M.
GBL/GHB – Wirkmengen und Nachweismöglichkeiten
Treffen der Mordkommissionen Berlin-Brandenburg, Ahrensfelde, 2012

Pragst F, Broecker S, **Hastedt M**, Herre S, Andresen-Streichert H, Sachs H, Tsokos M.
Methadon und illegale Drogen in Kinderhaaren – ein zuverlässiger Indikator für die Gefährdung von Kindern im Drogenmilieu
91. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin, Freiburg, 2012

Hartwig S, Büchner M, Herre S, Kienast T, Heinz A, **Hastedt M.**
Eignung konventioneller und direkter Alkoholmarker zur Diskriminierung der Abstinenz und des geringen Alkoholkonsums von riskantem und chronisch exzessivem Alkoholkonsum – eine vergleichende, prospektive Studie an Normaltrinkern, Abstinenten und Alkoholikern in klinischer Entzugsbehandlung
91. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin, Freiburg, 2012

Hastedt M.
Drogennachweis im Haar – Untersuchungsmethoden und Interpretation
Treffpunkt In-vitro-Diagnostik, Netzwerk Diagnostik Berlin-Brandenburg e.V., Berlin, 2012

Hastedt M, Hartwig S, Krumbiegel F, Herre S, Tsokos M.
Fettsäureethylester und Ethylglucuronid in Haaren als Marker für chronisch exzessiven Alkoholkonsum im Rahmen eines arbeitsplatzbezogenen Drogentestprogramms
Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin (DGRM), Münster, 2011

Suesse S, Selavka C, Sachs H, **Hastedt M,** Rothe M, Pragst F.
Practical experiences in application of EtG and FAEE for detection of chronic alcohol abuse in forensic cases according to the SoHT consensus
Jahrestagung der Society of Hair Testing (SoHT), Chamonix, 2011

Hastedt M, Hartwig S, Herre S.
Abstinenzkontrollprogramme in der Fahreignungsbegutachtung
Wissenschaftlicher Vortrag für Verkehrspsychologen und MPU-Beratungsstellen, Berlin, 2011

Pragst F, Süße S, **Hastedt M.**
Alcohol Markers (EtG, FAEE) in Hair
SoHT Workshop, München, 2010

Pragst F, Rothe M, Herre S, Simmert D, **Hastedt M.**
Combined Use of FAEE and EtG in Hair for Diagnosis of Alcohol Abuse. Interpretation and Advantages.
Jahrestagung der Society of Hair Testing (SoHT), Rom, 2009

Hastedt M, Dümpelmann D, Correns A, Simmert D, Herre S, Tsokos M.
Letale GHB-Intoxikationen.
Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin (DGRM), Düsseldorf, 2009

9 Literaturverzeichnis

- [1] Dyckmans M (2012) Drogen- und Suchtbericht, Die Drogenbeauftragte der Bundesregierung, Berlin.
- [2] Dyckmans M (2011) Drogen- und Suchtbericht, Die Drogenbeauftragte der Bundesregierung, Berlin.
- [3] Hastedt M, Herre S, Pragst F, Rothe M, Hartwig S. Workplace alcohol testing program by combined use of ethyl glucuronide and fatty acid ethyl esters in hair. *Alcohol Alcohol.* 2012;47:127-132.
- [4] Pragst F, Rothe M, Moench B, Hastedt M, Herre S, Simmert D. Combined use of fatty acid ethyl esters and ethyl glucuronide in hair for diagnosis of alcohol abuse: interpretation and advantages. *Forensic Sci Int.* 2010;196:101-110.
- [5] MacLeod S, Koren G. Meconium testing for fatty acid ethyl esters: a 2011 status report. *J Popul Ther Clin Pharmacol.* 2011;18:e500-502.
- [6] Erim Y, Bottcher M, Dahmen U, Beck O, Broelsch CE, Helander A. Urinary ethyl glucuronide testing detects alcohol consumption in alcoholic liver disease patients awaiting liver transplantation. *Liver Transpl.* 2007;13:757-761.
- [7] Stewart SH, Koch DG, Willner IR, Randall PK, Reuben A. Hair ethyl glucuronide is highly sensitive and specific for detecting moderate-to-heavy drinking in patients with liver disease. *Alcohol Alcohol.* 2013;48:83-87.
- [8] Caprara DL, Klein J, Koren G. Diagnosis of fetal alcohol spectrum disorder (FASD): fatty acid ethyl esters and neonatal hair analysis. *Ann Ist Super Sanita.* 2006;42:39-45.
- [9] Rolf Aderjan TD, Herbert Käferstein, Dieter Krause, Frank Mußhoff, Liane Daniela Paul, Frank Peters, Gertrud Rochholz, Georg Schmitt, Gisela Skopp. Richtlinien zur Bestimmung der Blutalkoholkonzentration (BAK) für forensische Zwecke. *Blutalkohol.* 2011;48:137-143.
- [10] World Health Organisation. Global Status Report on Alcohol 2004. Geneva, 2004
- [11] Niemela O. Biomarkers in alcoholism. *Clin Chim Acta.* 2007;377:39-49.
- [12] Salaspuro M. Carbohydrate-deficient transferrin as compared to other markers of alcoholism: a systematic review. *Alcohol.* 1999;19:261-271.

- [13] Hock B, Schwarz M, Domke I, Grunert VP, Wuertemberger M, Schiemann U, Horster S, Limmer C, Stecker G, Soyka M. Validity of carbohydrate-deficient transferrin (%CDT), gamma-glutamyltransferase (gamma-GT) and mean corpuscular erythrocyte volume (MCV) as biomarkers for chronic alcohol abuse: a study in patients with alcohol dependence and liver disorders of non-alcoholic and alcoholic origin. *Addiction*. 2005;100:1477-1486.
- [14] Das SK, Dhanya L, Vasudevan DM. Biomarkers of alcoholism: an updated review. *Scand J Clin Lab Invest*. 2008;68:81-92.
- [15] Maenhout TM, De Buyzere ML, Delanghe JR. Non-oxidative ethanol metabolites as a measure of alcohol intake. *Clin Chim Acta*. 2013;415:322-329.
- [16] Whitfield JB, Hensley WJ, Bryden D, Gallagher H. Some laboratory correlates of drinking habits. *Ann Clin Biochem*. 1978;15:297-303.
- [17] Majhi S, Baral N, Lamsal M, Mehta KD. De Ritis ratio as diagnostic marker of alcoholic liver disease. *Nepal Med Coll J*. 2006;8:40-42.
- [18] Hannuksela ML, Liisanantti MK, Nissinen AE, Savolainen MJ. Biochemical markers of alcoholism. *Clin Chem Lab Med*. 2007;45:953-961.
- [19] Lange LG, Bergmann SR, Sobel BE. Identification of fatty acid ethyl esters as products of rabbit myocardial ethanol metabolism. *J Biol Chem*. 1981;256:12968-12973.
- [20] Hartwig S. Diss.: Fettsäureethylester als Alkoholmarker im Haar von Abstinenzlern, Normaltrinkern und Todesfällen mit Alkoholanamnese sowie Einflüsse von kosmetischer Haarbehandlung. Med. Fakultät Charité, Humboldt Universität Berlin. 2004.
- [21] Alhomsy K, Selig M, Sustic T, Katrangi E, Weissig V, Laposata M. Induction of apoptosis and necrosis in human peripheral blood mononuclear cells by fatty acid ethyl esters. *Alcohol Clin Exp Res*. 2008;32:534-543.
- [22] Wu H, Bhopale KK, Ansari GA, Kaphalia BS. Ethanol-induced cytotoxicity in rat pancreatic acinar AR42J cells: role of fatty acid ethyl esters. *Alcohol Alcohol*. 2008;43:1-8.
- [23] Pragst F, Yegles M. Determination of fatty acid ethyl esters (FAEE) and ethyl glucuronide (EtG) in hair: a promising way for retrospective detection of alcohol abuse during pregnancy? *Ther Drug Monit*. 2008;30:255-263.
- [24] Caprara DL, Klein J, Koren G. Baseline measures of fatty acid ethyl esters in hair of neonates born to abstaining or mild social drinking mothers. *Ther Drug Monit*. 2005;27:811-815.

- [25] Borucki K, Schreiner R, Dierkes J, Jachau K, Krause D, Westphal S, Wurst FM, Luley C, Schmidt-Gayk H. 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.* 2005;29:781-787.
- [26] Refaai MA, Nguyen PN, Cluette-Brown JE, Laposata M. Ethyl arachidonate is the predominant fatty acid ethyl ester in the brains of alcohol-intoxicated subjects at autopsy. *Lipids.* 2003;38:269-273.
- [27] Refaai MA, Nguyen PN, Steffensen TS, Evans RJ, Cluette-Brown JE, Laposata M. Liver and adipose tissue fatty acid ethyl esters obtained at autopsy are postmortem markers for premortem ethanol intake. *Clin Chem.* 2002;48:77-83.
- [28] Pragst F, Spiegel K, Sporkert F, Bohnenkamp M. Are there possibilities for the detection of chronically elevated alcohol consumption by hair analysis? A report about the state of investigation. *Forensic Sci Int.* 2000;107:201-223.
- [29] Auwärter V. Diss.: Fettsäureethylester als Marker exzessiven Alkoholkonsums - Analytische Bestimmung im Haar und in Hautoberflächenlipiden mittels Headspace-Festphasenmikroextraktion und Gaschromatographie-Massenspektrometrie. Institute for Legal Medicine and Forensic Sciences. 2006.
- [30] Albermann ME, Musshoff F, Madea B. A fully validated high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of ethyl glucuronide in hair for the proof of strict alcohol abstinence. *Anal Bioanal Chem.* 2010;396:2441-2447.
- [31] Kintz P. Consensus of the Society of Hair Testing on hair testing for chronic excessive alcohol consumption 2009. *Forensic Sci Int.* 2010;196:2.
- [32] Kintz P. Consensus of the Society of Hair Testing on hair testing for chronic excessive alcohol consumption 2011. *Forensic Sci Int.* 2012;218:2.
- [33] Droenner P, Schmitt G, Aderjan R, Zimmer H. A kinetic model describing the pharmacokinetics of ethyl glucuronide in humans. *Forensic Sci Int.* 2002;126:24-29.
- [34] Auwarter V, Sporkert F, Hartwig S, Pragst F, Vater H, Diefenbacher A. Fatty acid ethyl esters in hair as markers of alcohol consumption. Segmental hair analysis of alcoholics, social drinkers, and teetotalers. *Clin Chem.* 2001;47:2114-2123.
- [35] Lees R, Kingston R, Williams TM, Henderson G, Lingford-Hughes A, Hickman M. Comparison of ethyl glucuronide in hair with self-reported alcohol consumption. *Alcohol Alcohol.* 2012;47:267-272.

- [36] Suesse S, Pragst F, Mieczkowski T, Selavka CM, Elian A, Sachs H, Hastedt M, Rothe M, Campbell J. Practical experiences in application of hair fatty acid ethyl esters and ethyl glucuronide for detection of chronic alcohol abuse in forensic cases. *Forensic Sci Int.* 2012;218:82-91.
- [37] Wurst FM, Alexson S, Wolfersdorf M, Bechtel G, Forster S, Alling C, Aradottir S, Jachau K, Huber P, Allen JP, Auwarter V, Pragst F. Concentration of fatty acid ethyl esters in hair of alcoholics: comparison to other biological state markers and self reported-ethanol intake. *Alcohol Alcohol.* 2004;39:33-38.
- [38] Morini L, Varango C, Filippi C, Rusca C, Danesino P, Cheli F, Fusini M, Iannello G, Groppi A. Chronic excessive alcohol consumption diagnosis: comparison between traditional biomarkers and ethyl glucuronide in hair, a study on a real population. *Ther Drug Monit.* 2011;33:654-657.
- [39] Kharbouche H, Faouzi M, Sanchez N, Daeppen JB, Augsburg M, Mangin P, Staub C, Sporkert F. Diagnostic performance of ethyl glucuronide in hair for the investigation of alcohol drinking behavior: a comparison with traditional biomarkers. *Int J Legal Med.* 2012;126:243-250.
- [40] Pirro V, Valente V, Oliveri P, De Bernardis A, Salomone A, Vincenti M. Chemometric evaluation of nine alcohol biomarkers in a large population of clinically-classified subjects: pre-eminence of ethyl glucuronide concentration in hair for confirmatory classification. *Anal Bioanal Chem.* 2011;401:2153-2164.
- [41] Hoiseth G, Morini L, Poletti A, Christophersen A, Morland J. Ethyl glucuronide in hair compared with traditional alcohol biomarkers--a pilot study of heavy drinkers referred to an alcohol detoxification unit. *Alcohol Clin Exp Res.* 2009;33:812-816.
- [42] Agius R, Nadulski T, Kahl HG, Schrader J, Dufaux B, Yegles M, Pragst F. Validation of a headspace solid-phase microextraction-GC-MS/MS for the determination of ethyl glucuronide in hair according to forensic guidelines. *Forensic Sci Int.* 2010;196:3-9.
- [43] Alvarez I, Bermejo AM, Taberero MJ, Fernandez P, Cabarcos P, Lopez P. Microwave-assisted extraction: a simpler and faster method for the determination of ethyl glucuronide in hair by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2009;393:1345-1350.
- [44] Cabarcos P, Hassan HM, Taberero MJ, Scott KS. Analysis of ethyl glucuronide in hair samples by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS). *J Appl Toxicol.* 2012

- [45] Janda I, Weinmann W, Kuehnle T, Lahode M, Alt A. Determination of ethyl glucuronide in human hair by SPE and LC-MS/MS. *Forensic Sci Int.* 2002;128:59-65.
- [46] Kharbouche H, Sporkert F, Troxler S, Augsburg M, Mangin P, Staub C. Development and validation of a gas chromatography-negative chemical ionization tandem mass spectrometry method for the determination of ethyl glucuronide in hair and its application to forensic toxicology. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2009;877:2337-2343.
- [47] Lamoureux F, Gaulier JM, Sauvage FL, Merceroles M, Vallejo C, Lachatre G. Determination of ethyl-glucuronide in hair for heavy drinking detection using liquid chromatography-tandem mass spectrometry following solid-phase extraction. *Anal Bioanal Chem.* 2009;394:1895-1901.
- [48] Tarcomnicu I, van Nuijs AL, Aerts K, De Doncker M, Covaci A, Neels H. Ethyl glucuronide determination in meconium and hair by hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Forensic Sci Int.* 2010;196:121-127.
- [49] Boscolo-Berto R, Viel G, Montisci M, Terranova C, Favretto D, Ferrara SD. Ethyl glucuronide concentration in hair for detecting heavy drinking and/or abstinence: a meta-analysis. *Int J Legal Med.* 2012
- [50] Liniger B, Nguyen A, Friedrich-Koch A, Yegles M. Abstinence monitoring of suspected drinking drivers: ethyl glucuronide in hair versus CDT. *Traffic Inj Prev.* 2010;11:123-126.
- [51] Schubert W, Mattern R. (2009) Beurteilungskriterien—Urteilsbildung in der Medizinisch-Psychologischen Fahreignungsdiagnostik, Kirschbaum Verlag GmbH, Bonn.
- [52] Kronstrand R, Brinkhagen L, Nystrom FH. Ethyl glucuronide in human hair after daily consumption of 16 or 32 g of ethanol for 3 months. *Forensic Sci Int.* 2012;215:51-55.
- [53] Pragst F. Application of solid-phase microextraction in analytical toxicology. *Anal Bioanal Chem.* 2007;388:1393-1414.
- [54] Sporkert F, Pragst F. Use of headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) in hair analysis for organic compounds. *Forensic Sci Int.* 2000;107:129-148.
- [55] Bearer CF, Jacobson JL, Jacobson SW, Barr D, Croxford J, Molteno CD, Viljoen DL, Marais AS, Chiodo LM, Cwik AS. Validation of a new biomarker of fetal exposure to alcohol. *J Pediatr.* 2003;143:463-469.

- [56] Brien JF, Chan D, Green CR, Iqbal U, Gareri J, Kobus SM, McLaughlin BE, Klein J, Rao C, Reynolds JN, Bocking AD, Koren G. Chronic prenatal ethanol exposure and increased concentration of fatty acid ethyl esters in meconium of term fetal Guinea pig. *Ther Drug Monit.* 2006;28:345-350.
- [57] Chan D, Bar-Oz B, Pellerin B, Paciorek C, Klein J, Kapur B, Farine D, Koren G. Population baseline of meconium fatty acid ethyl esters among infants of nondrinking women in Jerusalem and Toronto. *Ther Drug Monit.* 2003;25:271-278.
- [58] Chan D, Klein J, Karaskov T, Koren G. Fetal exposure to alcohol as evidenced by fatty acid ethyl esters in meconium in the absence of maternal drinking history in pregnancy. *Ther Drug Monit.* 2004;26:474-481.
- [59] Chan D, Knie B, Boskovic R, Koren G. Placental handling of fatty acid ethyl esters: perfusion and subcellular studies. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004;310:75-82.
- [60] Derauf C, Katz AR, Easa D. Agreement between maternal self-reported ethanol intake and tobacco use during pregnancy and meconium assays for fatty acid ethyl esters and cotinine. *Am J Epidemiol.* 2003;158:705-709.
- [61] Garcia-Algar O, Kulaga V, Gareri J, Koren G, Vall O, Zuccaro P, Pacifici R, Pichini S. Alarming prevalence of fetal alcohol exposure in a Mediterranean city. *Ther Drug Monit.* 2008;30:249-254.
- [62] Hartwig S, Auwarter V, Pragst F. Effect of hair care and hair cosmetics on the concentrations of fatty acid ethyl esters in hair as markers of chronically elevated alcohol consumption. *Forensic Sci Int.* 2003;131:90-97.
- [63] Hartwig S, Auwarter V, Pragst F. Fatty Acid ethyl esters in scalp, pubic, axillary, beard and body hair as markers for alcohol misuse. *Alcohol Alcohol.* 2003;38:163-167.
- [64] Klein J, Karaskov T, Koren G. Fatty acid ethyl esters: a novel biologic marker for heavy in utero ethanol exposure: a case report. *Ther Drug Monit.* 1999;21:644-646.
- [65] Moore C, Jones J, Lewis D, Buchi K. Prevalence of fatty acid ethyl esters in meconium specimens. *Clin Chem.* 2003;49:133-136.
- [66] Ostrea EM, Jr., Hernandez JD, Bielawski DM, Kan JM, Leonardo GM, Abela MB, Church MW, Hannigan JH, Janisse JJ, Ager JW, Sokol RJ. Fatty acid ethyl esters in meconium: are they biomarkers of fetal alcohol exposure and effect? *Alcohol Clin Exp Res.* 2006;30:1152-1159.

- [67] Yegles M, Labarthe A, Auwarter V, Hartwig S, Vater H, Wennig R, Pragst F. Comparison of ethyl glucuronide and fatty acid ethyl ester concentrations in hair of alcoholics, social drinkers and teetotallers. *Forensic Sci Int.* 2004;145:167-173.
- [68] Peters FT, Hartung M, Herbold M, et al.. Society of Toxicological and Forensic Chemistry (GTFCh), Anforderungen an die Validierung von Analysenmethoden. *Toxichem Krimtech.* 2009;76:185-208.
- [69] Harkey MR. Anatomy and physiology of hair. *Forensic Sci Int.* 1993;63:9-18.
- [70] Krause K, Foitzik K. Biology of the hair follicle: the basics. *Semin Cutan Med Surg.* 2006;25:2-10.
- [71] Pianta A, Liniger B, Baumgartner MR. Ethyl Glucuronide in Scalp and Non-head Hair: An Intra-individual Comparison. *Alcohol Alcohol.* 2013
- [72] Attenberger A, Würfl O (1981) *Fachkunde für Friseure*, Ernst Kieser GmbH, Augsburg.
- [73] Richards RN, Uy M, Meharg G. Temporary hair removal in patients with hirsutism: a clinical study. *Cutis.* 1990;45:199-202.
- [74] Richards RN, Meharg GE (1991/1997) *Cosmetic and Medical Electrolysis and Temporary Hair Removal: A Practice Manual and Reference Guide*, Medic Ltd., Toronto.
- [75] Pragst F, Rothe M, Spiegel K, Sporkert F. Illegal and therapeutic drug concentrations in hair segments - a time table of drug exposure? *Forensic Sci Rev.* 1998;10:81-111.
- [76] Pragst F. Pitfalls in hair analysis. *Toxichem Krimtech.* 2004;71:69-83.
- [77] Vogt A, McElwee KJ, Blume-Peytavi U. (2008) *Hair Growth and Disorders*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- [78] Pragst F, Sachs H. (2007) Die Haarprobe als Untersuchungsmatrix zur toxikologischen Fahreignungsdiagnostik, in *Series Die Haarprobe als Untersuchungsmatrix zur toxikologischen Fahreignungsdiagnostik*, Tagungsband zum XV. GTFCh-Symposium 2007, pp 84-99, Mosbach (Baden).
- [79] Kintz P, Villain M, Vallet E, Etter M, Salquebre G, Cirimele V. Ethyl glucuronide: unusual distribution between head hair and pubic hair. *Forensic Sci Int.* 2008;176:87-90.
- [80] Kerekes I, Yegles M, Grimm U, Wennig R. Ethyl glucuronide determination: head hair versus non-head hair. *Alcohol Alcohol.* 2009;44:62-66.

- [81] Agius R, Ferreira LM, Yegles M. Can ethyl glucuronide in hair be determined only in 3 cm hair strands? *Forensic Sci Int.* 2012;218:3-9.
- [82] Schrader J, Rothe M, Pragst F. Ethyl glucuronide concentrations in beard hair after a single alcohol dose: evidence for incorporation in hair root. *Int J Legal Med.* 2012;126:791-799.
- [83] Schummer C, Appenzeller BM, Wennig R. Quantitative determination of ethyl glucuronide in sweat. *Ther Drug Monit.* 2008;30:536-539.
- [84] Appenzeller BM, Agirman R, Neuberg P, Yegles M, Wennig R. Segmental determination of ethyl glucuronide in hair: a pilot study. *Forensic Sci Int.* 2007;173:87-92.
- [85] Appenzeller BM, Schuman M, Yegles M, Wennig R. Ethyl glucuronide concentration in hair is not influenced by pigmentation. *Alcohol Alcohol.* 2007;42:326-327.
- [86] Gonzalez-Illan F, Ojeda-Torres G, Diaz-Vazquez LM, Rosario O. Detection of fatty acid ethyl esters in skin surface lipids as biomarkers of ethanol consumption in alcoholics, social drinkers, light drinkers, and teetotalers using a methodology based on microwave-assisted extraction followed by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Anal Toxicol.* 2011;35:232-237.
- [87] Pragst F, Auwarter V, Kiessling B, Dyes C. Wipe-test and patch-test for alcohol misuse based on the concentration ratio of fatty acid ethyl esters and squalene CFAEE/CSQ in skin surface lipids. *Forensic Sci Int.* 2004;143:77-86.
- [88] Kulaga V, Velazquez-Armenta Y, Aleksa K, Vergee Z, Koren G. The effect of hair pigment on the incorporation of fatty acid ethyl esters (FAEE). *Alcohol Alcohol.* 2009;44:287-292.
- [89] Agius R, Kintz P. Guidelines for European workplace drug and alcohol testing in hair. *Drug Test Anal.* 2010;2:367-376.
- [90] De Giovanni N, Donadio G, Chiarotti M. Ethanol contamination leads to Fatty acid ethyl esters in hair samples. *J Anal Toxicol.* 2008;32:156-159.
- [91] Martins Ferreira L, Binz T, Yegles M. The influence of ethanol containing cosmetics on ethyl glucuronide concentration in hair. *Forensic Sci Int.* 2012;218:123-125.
- [92] Sporkert F, Kharbouche H, Augsburg MP, Klemm C, Baumgartner MR. Positive EtG findings in hair as a result of a cosmetic treatment. *Forensic Sci Int.* 2012;218:97-100.

- [93] Burd L, Hofer R. Biomarkers for detection of prenatal alcohol exposure: a critical review of fatty acid ethyl esters in meconium. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2008;82:487-493.
- [94] Pruett D, Waterman EH, Caughey AB. Fetal alcohol exposure: consequences, diagnosis, and treatment. *Obstet Gynecol Surv.* 2013;68:62-69.
- [95] Pragst F. Interpretation problems in a forensic case of abstinence determination using alcohol markers in hair. *Forensic Sci Int.* 2012;217:e4-7.

10 Anhang

a) Manuskript I:

Combined use of fatty acid ethyl esters and ethyl glucuronide in hair for diagnosis of alcohol abuse: Interpretation and advantages

b) Manuskript II:

Detecting alcohol abuse: traditional blood alcohol markers compared to ethyl glucuronide (EtG) and fatty acid ethyl esters (FAEEs) measurement in hair

c) Manuskript III:

Fatty acid ethyl esters in hair as alcohol markers: estimating a reliable cut-off point by evaluation of 1057 autopsy cases

d) Manuskript IV:

Practical experiences in application of hair fatty acid ethyl esters and ethyl glucuronide for detection of chronic alcohol abuse in forensic cases

e) Manuskript V:

Workplace alcohol testing program by combined use of ethyl glucuronide and fatty acid ethyl esters in hair

f) Manuskript VI:

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

g) Manuskript VII:

Fatty acid ethyl esters (FAEEs) as markers for alcohol in meconium: method validation and implementation of a screening program for prenatal drug exposure