

Aus dem Forensisch Toxikologischen Centrum München GmbH

Geschäftsführung: Prof. Dr. rer. nat. Frank Mußhoff



***Bestimmung des Alkoholmarkers Phosphatidylethanol aus
Trockenblutproben mittels LC-MS/MS zur Klassifizierung
eines vorangegangenen Alkoholkonsums***

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Naturwissenschaften
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Josefine Herzog

aus
Dresden

Jahr
2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Frank Mußhoff

Zweitgutachter: Prof. Dr. Axel Imhof

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Juni 2024

Affidavit



LUDWIG-
MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

Promotionsbüro
Medizinische Fakultät



Eidesstattliche Versicherung

Herzog, Josefine

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

Bestimmung des Alkoholmarkers Phosphatidylethanol aus Trockenblutproben mittels LC-MS/MS zur Klassifizierung eines vorangegangenen Alkoholkonsums

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 4. Juli 2024

Ort, Datum

Josefine Herzog

Unterschrift Doktorandin

Inhaltsverzeichnis

Affidavit	3
Abkürzungsverzeichnis	4
Publikationsliste	6
1 Beitrag zu den Veröffentlichungen	8
1.1 Paper I.....	8
1.2 Paper II.....	9
1.3 Paper III.....	10
1.4 Paper IV	11
2 Einleitung	12
3 Theoretische Grundlagen	14
3.1 Pharmakokinetik des Ethanols	14
3.2 Phosphatidylethanol (PEth)	15
3.3 Trockenblutproben (DBS)	17
3.4 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Tandemmassenspektrometrie	18
4 Ergebnisse	20
4.1 Validierung einer Methode zur Detektion von sieben PEth-Homologen	20
4.2 Nachweis eines einmaligen moderaten Alkoholkonsums.....	20
4.3 Konzentrationsschwankungen von PEth bei sozial angepasstem Trinkverhalten über sechs Monate	21
4.4 Stabilität von PEth in alkoholnegativen Blutproben	21
5 Zusammenfassung	22
6 Abstract	23
7 Paper I	24
8 Paper II	25
9 Paper III	26
10 Paper IV	27
11 Literaturverzeichnis	28
Danksagung	32

• This work is licensed under CC BY 4.0. •

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Abkürzungsverzeichnis

ACS	Acetyl-CoA-Synthase
ADH	Alkoholdehydrogenase
ALDH	Acetaldehyddehydrogenase
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BAK	Blutalkoholkonzentration
CoA	Coenzym A
CTU	Chemisch toxikologische Untersuchungen
DBS	Dried Blood Spot, Trockenblutprobe
DGVM	Deutsche Gesellschaft für Verkehrsmedizin e.V.
DGVP	Deutsche Gesellschaft für Verkehrspsychologie e.V.
EC-Nummer	Enzyme Commission Number
ESI	Elektrospray-Ionisation
EtG	Ethylglucuronid
EtG _H	Ethylglucuronidkonzentration in den Haaren
FSEE	Fettsäureethylester
GTFCh	Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie
HPLC-MS/MS	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Tandemmassenspektrometrie
LOQ	Limit of Quantification, Bestimmungsgrenze
MEOS	Mikrosomales Ethanol-oxidierendes System
MPU	Medizinisch-Psychologische Untersuchung
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
PEth	Phosphatidylethanol
PLD	Phospholipase D
Q	Quadrupol
sn	Stereospezifische Nummerierung (von Fettsäuren)
TIAFT	The International Association of Forensic Toxicologists
UDP	Uridin-5'-diphosphat

Publikationsliste

Publikationen (peer-reviewed) als Bestandteil der kumulativen Dissertation:

Herzog J, Skopp G, Musshoff F. Development and validation of seven phosphatidylethanol-homologues in dried blood spots including preliminary results after excessive use of an ethanol-based hand sanitizer. *J Anal Toxicol.* 2023 Mar 24;47(3):245-252. doi: 10.1093/jat/bkac086

Herzog J, Skopp G, Musshoff F, Hartung B. Formation of phosphatidylethanol and ethylglucuronide after low to moderate alcohol consumption in volunteers with a previous three-week alcohol abstinence. *Alcohol Alcohol.* 2023 Nov 11;58(6):599-605. doi: 10.1093/alcalc/agad025

Herzog J, Skopp G, Musshoff F. Monitoring of phosphatidylethanol in dried blood spots and of EtG in hair over six months of alcohol consumption. *Drug Test Anal.* 2024 Apr; 16(4):359-368. doi: 10.1002/dta.3553

Herzog J, Skopp G, Musshoff F, Hartung B. Storage stability of phosphatidylethanol homologues in whole blood and dried blood spots of nonalcoholics at different temperatures over 60 days. *Drug Test Anal.* 2023 doi: 10.1002/dta.3619

Weitere Publikationen (Peer-reviewed):

Herzog J, Skopp G, Musshoff F. Phosphatidylethanol als Biomarker in der Fahreignungsdiagnostik – Vorstellung eines neuen Alkoholkonsummarkers. *Z. f. Verkehrssicherheit* 2019 66(2):74-77.

Fels H, Herzog J, Musshoff F, Graw M, Paul LD, Holzer A. Prävalenz von Neuen Psychoaktiven Substanzen (NPS) bei der Teilnahme am Straßenverkehr – Eine retrospektive Studie. *Z. f. Verkehrssicherheit* 2020 66(2):72-74.

Fels H, Herzog J, Skopp G, Holzer A, Paul LD, Graw M, Musshoff F. Retrospective analysis of new psychoactive substances in blood samples of German drivers suspected of driving under the influence of drugs. *Drug Test Anal.* 2020 Oct;12(10):1470-1476. doi: 10.1002/dta.2897

Franz S, Herzog J, Skopp G, Musshoff F. Will tetrahydrocannabinol be formed from cannabidiol in gastric fluid? An in vivo experiment. *Int J Legal Med.* 2023 Jan;137(1):79-87. doi: 10.1007/s00414-022-02896-w

Herzog J, Skopp G, Musshoff F (2023) Monitoring von Phosphatidylethanol in Trockenblutproben und Ethylglucuronid im Haar während einer 6-monatigen Trinkverlaufskontrolle. *Z. f. Verkehrssicherheit* 68(2):144.

Konferenzbeiträge:

Vorträge:

Herzog J, Skopp G, Musshoff F. Phosphatidylethanol als Biomarker in der Fahreignungsdiagnostik – Vorstellung eines neuen Alkoholkonsummarkers. 15. Symposium der DGVP und der DGVM. Bonn, 12. Oktober 2019

Herzog J, Skopp G, Musshoff F. Formation of seven PEth-homologues after excessive use of an ethanol-based hand sanitizer. PEth NET Conference, Basel, 19. Mai 2022

Herzog J, Skopp G, Musshoff F. Monitoring of phosphatidylethanol in dried blood spots and of EtG in hair over six months of alcohol consumption. GTFCh Symposium, Mosbach 1. April 2023

Herzog J, Skopp G, Musshoff F, Hartung B. (In)stability of phosphatidylethanol in whole blood and dried blood spots under different storage conditions over 60 days. 60th Conference of The International Association of Forensic Toxicologist (TIAFT), Rom 27. - 31. August 2023

Posterpräsentationen:

Herzog J., Mogler L., Münster-Müller S., Hansen S., Pütz M., Auwärter V. Development and optimization of a filtration based radioligand binding assay to determine the cannabinoid receptor affinities for (S) and (R) MDMB-CHMICA. 56th Conference of The International Association of Forensic Toxicologist (TIAFT), Ghent, 26. - 30. August 2018

Herzog J, Skopp G, Musshoff F. Monitoring von Phosphatidylethanol in Trockenblutproben und Ethylglucuronid im Haar während einer 6-monatigen Trinkverlaufskontrolle. 18. Symposium der DGVP und der DGVM. München, 7. Oktober 2022

Herzog J, Skopp G, Musshoff F. Monitoring of phosphatidylethanol in dried blood spots and of EtG in hair over six months of alcohol consumption. 60th Conference of The International Association of Forensic Toxicologist (TIAFT), Rom, 27. - 31. August 2023

1 Beitrag zu den Veröffentlichungen

1.1 Paper I

Development and validation of seven phosphatidylethanol-homologues in dried blood spots including preliminary results after excessive use of an ethanol-based hand sanitizer

Herzog, Josefine; Skopp, Gisela; Mußhoff, Frank

Journal of Analytical Toxicology 2023 Mar 24;47(3):245-252

DOI: 10.1093/jat/bkac086

Autorenkürzel:

Josefine Herzog (JH)

Gisela Skopp (GS)

Frank Mußhoff (FM)

Arbeitsanteile	Autoren
Konzept und Studiendesign	JH, GS, FM
Literaturrecherche	JH
Methodenentwicklung/-validierung	JH
Datenerhebung	JH
Datenauswertung und -interpretation	JH, GS
Erstentwurf Manuskript	JH
Revision Manuskript	JH, GS, FM
Supervision	GS, FM

1.2 Paper II

Formation of phosphatidylethanol and ethylglucuronide after low to moderate alcohol consumption in volunteers with a previous three-week alcohol abstinence

Herzog, Josefine; Skopp, Gisela; Mußhoff, Frank; Hartung, Benno

Alcohol and Alcoholism 2023 Nov 11;58(6):599-605

DOI: 10.1093/alcalc/agad025

Autorenkürzel:

Josefine Herzog (JH)

Gisela Skopp (GS)

Frank Mußhoff (FM)

Benno Hartung (BH)

Arbeitsanteile	Autoren
Konzept und Studiendesign	JH, GS, FM, BH
Literaturrecherche	JH, BH
Methodenentwicklung/-validierung	JH
Datenerhebung	JH, BH
Datenauswertung und -interpretation	JH, BH
Erstentwurf Manuskript	JH
Revision Manuskript	JH, GS, FM, BH
Supervision	BH, FM

1.3 Paper III

Monitoring of phosphatidylethanol in dried blood spots and of ethyl glucuronide in hair over six months of alcohol consumption

Herzog, Josefine; Skopp, Gisela; Mußhoff, Frank

Drug Testing and Analysis 2024 Apr; 16(4):359-368

DOI: 10.1002/dta.3553

Autorenkürzel:

Josefine Herzog (JH)

Gisela Skopp (GS)

Frank Mußhoff (FM)

Arbeitsanteile	Autoren
Konzept und Studiendesign	JH, FM
Literaturrecherche	JH
Datenerhebung	JH
Datenauswertung und -interpretation	JH, GS
Erstentwurf Manuskript	JH
Revision Manuskript	JH, GS, FM
Supervision	GS, FM

1.4 Paper IV

Storage stability of phosphatidylethanol homologues in whole blood and dried blood spots of non-alcoholics at different temperatures over 60 days

Herzog, Josefine; Skopp, Gisela; Mußhoff, Frank; Hartung, Benno

Drug Testing and Analysis

DOI: 10.1002/dta.3619

Autorenkürzel:

Josefine Herzog (JH)

Gisela Skopp (GS)

Frank Mußhoff (FM)

Benno Hartung (BH)

Arbeitsanteile	Autoren
Konzept und Studiendesign	JH, GS, FM, BH
Literaturrecherche	JH, GS
Datenerhebung	JH
Datenauswertung und -interpretation	JH, GS
Erstentwurf Manuskript	JH
Revision Manuskript	JH, GS, FM, BH
Supervision	GS, FM, BH

2 Einleitung

Der Begriff Forensik (lat. *forensis*: zum Forum, Markt gehörig) hat seinen Ursprung aus dem Römischen Reich und basiert auf den öffentlich zur Schau gestellten Gerichtsverfahren, Urteilsverkündungen und Bestrafungen. Heute werden unter Forensik zahlreiche Arbeitsgebiete verstanden, in denen systematisch kriminelle Vergehen identifiziert, analysiert und rekonstruiert werden.^{1,2}

Eines dieser Gebiete ist die *Forensische Toxikologie*, die den Bezug der Vergiftungslehre zur Rechtsprechung sowohl bei Lebenden als auch bei Verstorbenen herstellt.³ Dabei sind stets das Zusammenspiel aus Nachweisbarkeit von Fremdstoffen, die Beurteilung ihrer Wirkung unter Berücksichtigung der Pharmakologie und individueller Fallumstände, als auch die rechtlichen Grundlagen zu berücksichtigen. In die Analysen werden verschiedenste biologische Matrizes wie Körperflüssigkeiten, Haare und Organproben eingesetzt und gezielt auf Alkohol, Drogen, Medikamente und andere (an)organische Substanzen untersucht.^{1,2}

Bei Verstorbenen werden chemisch-toxikologische Untersuchungen unter der Fragestellung einer Beeinträchtigung oder Intoxikation zum Zeitpunkt des Todes durchgeführt. Dabei gilt es, zwischen vorsätzlicher Giftbeibringung, absichtlicher Selbstvergiftung oder unabsichtlicher Vergiftung zu unterscheiden.^{1,2}

Angeordnet durch die Polizei oder Staatsanwaltschaft dienen Untersuchungen bei Lebenden dem Nachweis berauschender Mittel bei einer Teilnahme am Straßenverkehr sowie bei Körperverletzungs- oder Tötungsdelikten und anderen Straftaten zur Einschätzung der strafrechtlichen Verantwortlichkeit. Weiterhin werden mithilfe spezifischer Analysen Fragen zur Eignung bezüglich der Fahrerlaubnis, des Sorgerechts oder der Arbeitsplatzkontrolle beantwortet, die beispielsweise von Verwaltungsbehörden gefordert werden.²

Ethanol ist weltweit das am häufigsten konsumierte legale Rauschmittel und führte zum Teilgebiet der *Forensischen Alkoholologie*, welches sich mit dem Nachweis und der rechtlichen Bewertung von Alkoholdelikten befasst. Neben der klassischen Bestimmung der Blutalkoholkonzentration (BAK) kann auch das individuelle Trinkverhalten evaluiert werden. Im klinischen Umfeld werden dabei vor allem indirekte Biomarker mittels einfacher Blutuntersuchungen bestimmt. Zu den klassischen indirekten Markern gehören dabei das Kohlenhydratdefiziente Transferrin, die Enzymaktivitäten der Gammaglutamyl-, Aspartat- und Alaninaminotransferasen sowie das mittlere korpuskuläre Volumen der Erythrozyten. Diese Aktivitäten sowie die weiteren biologischen Messgrößen liegen bei übermäßigem Alkoholkonsum sowie bei Alkoholkranken oberhalb des Normbereichs. Dabei ist jedoch stets zwischen anderen krankheitsbedingten Einflüssen auf den Messwert, der durch Tumore, Hepatitis, Leberzirrhose oder eine Medikamenteneinnahme beeinflusst werden kann, zu differenzieren.⁴

Forensische Fragestellungen werden inzwischen bevorzugt durch die Bestimmung von direkten Alkoholkonsummarkern beantwortet. Diese entstehen nur nach Alkoholaufnahme im Körper und sind in den einzelnen Matrizes unterschiedlich lange nachweisbar. Zu den geläufigsten direkten Alkoholmarkern gehören Ethylglucuronid (EtG) und -sulfat, Fettsäureethylester sowie

Phosphatidylethanol (PEth). Das seit Jahren etablierte EtG, welches aus Ethanol und aktivierter UDP-Glucuronsäure mithilfe von UDP-Glucuronyltransferasen gebildet wird, wird vorrangig in Urin und Blut sowie in Haaren nachgewiesen. Dabei kann nur anhand der Konzentrationsbestimmung in Haaren das Trinkverhalten (Alkoholabstinenz, sozial akzeptierter und übermäßiger Alkoholkonsum) einer Person während der letzten Monate beurteilt werden.^{4,5}

In den letzten Jahren rückte PEth zur Klassifizierung eines vorangegangenen Alkoholkonsums immer mehr in den Fokus. PEth beschreibt dabei eine Gruppe von abnormalen Phospholipiden, welche in den Zellmembranen von Erythrozyten nach Ethanolkonsum akkumulieren. Im Gegensatz zu EtG in den Haaren (EtG_H) reagiert PEth sehr schnell auf Konsumänderungen, was zunächst bei Alkoholkranken in Entzugskliniken gezeigt werden konnte.^{4,6}

Ziel dieser Doktorarbeit war die Entwicklung einer Methode zur Bestimmung von insgesamt sieben verschiedenen PEth-Homologen im Blut durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Tandemmassenspektrometrie (LC-MS/MS) und ihre Validierung nach den Richtlinien der Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie (GTFCh). Anschließend wurde ihre Routine-tauglichkeit im weiteren Verlauf belegt, unter anderem durch Ermittlung der Trinkmenge zur Überschreitung des propagierten Grenzwertes zum Ausschluss einer Abstinenz. Weiterhin wurden Konzentrationsschwankungen bei sozial angepasstem Trinkverhalten über einen längeren Zeitraum sowie die Stabilität von PEth in alkoholnegativen Blutproben unter unterschiedlichen Lagerungsbedingungen untersucht.

3 Theoretische Grundlagen

3.1 Pharmakokinetik des Ethanols

Nach dem Konsum von alkoholhaltigen Getränken wird Ethanol zu etwa 95 % im Magen-Darm-Trakt absorbiert. Spätestens 1 bis 2 Stunden nach dem letzten Konsum von ethanolhaltigen Genussmitteln erreicht die BAK ihren Maximalwert. In der sogenannten Absorptionsphase werden rund 20 % des Ethanols über den Magen, der Hauptanteil über den Dünndarm aufgenommen. Die Aufnahme über die Magenschleimhaut kann dabei durch verschiedene Faktoren gehemmt oder beschleunigt werden. So verlangsamt beispielsweise eine fetthaltige Nahrung die Absorption, während der Konsum von hochprozentigen oder kohlenensäurehaltigen Getränken, wie zum Beispiel Schaumwein, die Aufnahme beschleunigt.^{1,2,7}

Sobald der Alkohol über die Blutbahn die Leber passiert, wird Ethanol über die Alkoholdehydrogenase (ADH, EC 1.1.1.1) zu Acetaldehyd abgebaut. Mit einer Plasmahalbwertszeit von 1,7 Minuten wird Acetaldehyd mittels Acetaldehyddehydrogenase (ALDH, EC 1.2.1.3) rasch zu Acetat oxidiert. Beide Enzymreaktionen benötigen NAD^+ als Cosubstrat. Die Metabolisierung des Ethanols verläuft weitgehend konzentrationsunabhängig, da diese Reaktion nullter Ordnung von der Reoxidation von $\text{NADH} + \text{H}^+$ abhängig ist. Im letzten Schritt wird Acetat mittels Acetyl-CoA-Synthase (ACS, EC 6.2.1.1) zu Acetyl-CoA umgewandelt, welches vor allem dem Citrat- und Fettsäurezyklus sowie der Cholesterolsynthese als Substrat dient (Abbildung 1). Bei Normaltrinkern werden zwischen 0,1 bis 0,2 g Alkohol pro Stunde abgebaut.

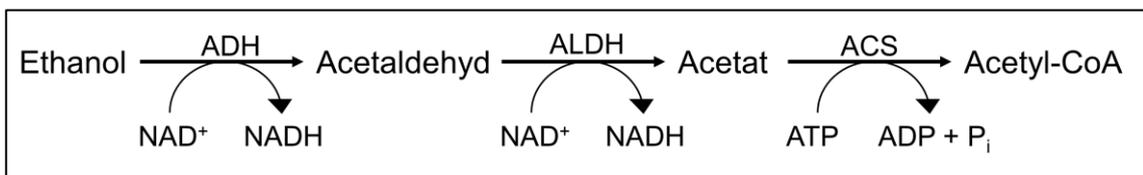


Abbildung 1: Abbau von Ethanol und den daraus resultierenden Stoffwechselprodukten durch die Enzyme Alkoholdehydrogenase (ADH), Acetaldehyddehydrogenase (ALDH) und Acetyl-CoA-Synthase (ACS) mithilfe der Abspaltung von Nicotinamidadenindinukleotid (NAD^+) zu $\text{NADH} + \text{H}^+$, sowie von Adenosintriphosphat (ATP) zu Adenosindiphosphat (ADP).

Bei längerer, hoher Alkoholbelastung erfolgt der Abbau zusätzlich durch Cytochrom $\text{P}_{450} 2\text{E}1$ (CYP2E1), das auch als mikrosomales Ethanol-oxidierendes System (MEOS) bekannt ist. Da das ADH-Enzymsystem durch die Abhängigkeit der Oxidation von $\text{NADH} + \text{H}^+$ in seiner Alkoholabbaugeschwindigkeit limitiert ist, der Körper sich aber vor etwaigen Alkoholvergiftungen zu schützen versucht, erfolgt der Alkoholabbau nach Induktion des CYP2E1 in deutlich kürzerer Zeit. Zu einer solchen Induktion kann es nach einem täglichen Konsum von 40 g reinem Alkohol über einen Zeitraum von zwei Wochen kommen.⁸ Durch CYP2E1 wird bei der Ethanoloxidation eine Vielzahl an Radikalen freigesetzt, die nachweislich für Zellschäden und im späteren Verlauf für die typischen Hepatopathien bei Alkoholkranken verantwortlich gemacht werden.^{8,9}

Während der Metabolisierung des Ethanols wird die Ethylgruppe zu einem kleinen Prozentsatz in Moleküle – sogenannte direkte Alkoholkonsummarker – eingebaut. Diese sind in verschiedenen Körpermatrizes nachweisbar und ihre genaue Bildung wird in Abbildung 2 näher erläutert.

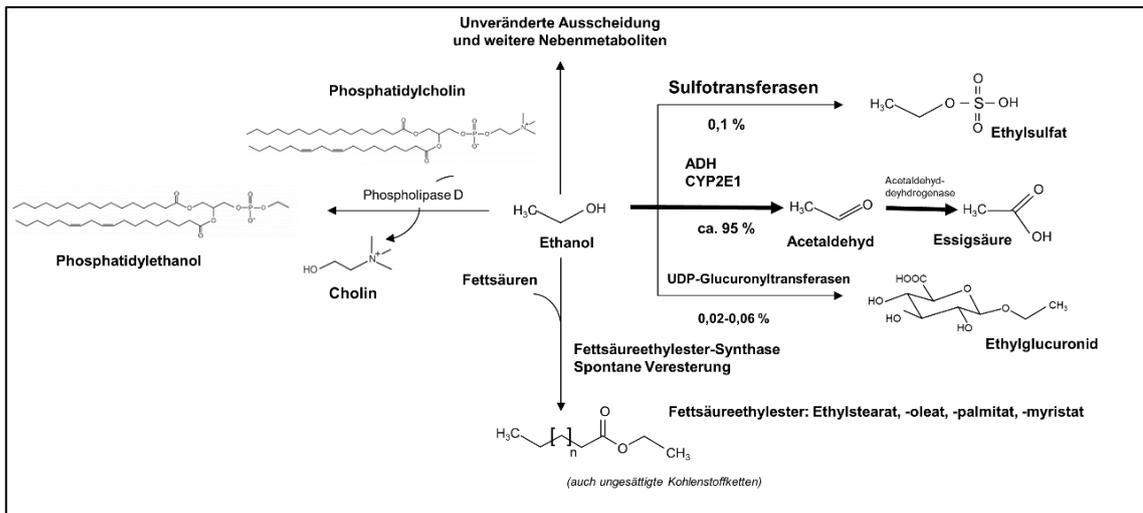


Abbildung 2: Rund 95 % des aufgenommenen Ethanols werden mittels Alkoholdehydrogenase (ADH) oder zusätzlich durch das Cytochrom P₄₅₀ 2E1 (CP2E1) abgebaut. Darstellung modifiziert nach Hastedt¹⁰

Die Nachweisdauer einzelner direkter Alkoholkonsummarker ist abhängig von der konsumierten Menge an Alkohol, der für den Nachweis verwendeten Matrix und dem jeweiligen Marker selbst.

Seit Jahren ist die Bestimmung von EtG im Urin als auch in den Haaren zum Nachweis eines kürzlich stattgefundenen Alkoholkonsums (Urin) und zur Evaluierung des Trinkverhaltens (Haare) fester Bestandteil in der Fahreignungsdiagnostik. Die überwachten Zeitfenster liegen dabei im Urin bei bis zu 48 Stunden. In den Haaren wird in der Regel ein Zeitraum von maximal drei (Deutschland) oder sechs (Schweiz) Monaten nachgewiesen, wobei diese Beschränkung der guten Wasserlöslichkeit des EtG und damit seiner Auswaschbarkeit aus den Haaren geschuldet ist. Um die Alkoholabstinenz bei Überprüfung der Fahreignung zu belegen, werden in der Regel alkoholfreie Zeiträume von mindestens sechs Monaten von der zuständigen Führerscheinstelle verlangt.⁴

In den letzten Jahren rückte immer mehr der ebenfalls direkte Alkoholmarker PEth als alternativer Analyt zur Fahreignungsüberprüfung in den Vordergrund.

3.2 Phosphatidylethanol (PEth)

Mithilfe des Cosubstrats Wasser wird aus Phosphatidylcholin unter Abspaltung von Cholin Phosphatidsäure gebildet. Diese Reaktion wird durch das Enzym Phospholipase D (PLD, EC 3.1.1.4) katalysiert. PLD weist eine rund 250-fach höhere Bindungsaffinität zu Ethanol als zu Wasser auf, sodass bei Anwesenheit von Ethanol vorzugsweise PEth gebildet wird.¹¹ Phosphatidylcholin besitzt zwei Fettsäureketten mit unterschiedlichem Sättigungsgrad und Länge. Diese bleiben in dem seit dem Jahr 1984 bekannten PEth erhalten und führen zu einer Vielzahl von Homologen mit unterschiedlichen Fettsäuremustern. Davon wurden 48 verschiedene Homologe durch Gnann et

al. 2010 beschrieben.¹²⁻¹⁴ Die Benennung der einzelnen PEth-Homologe basiert auf den jeweiligen Fettsäureketten in sn1- und sn2-Position, welche die stereoisomerische Nummerierung (sn) von Fettsäuren festlegt. PEth 16:0/18:1 ist mit bis zu 46 % die am häufigsten auftretende PEth-Variante.¹⁵ Dieses Homolog enthält einen Hexadecansäurerest in sn1-Position und einen Octadecensäurerest in sn2-Position (Abbildung 3).¹⁴

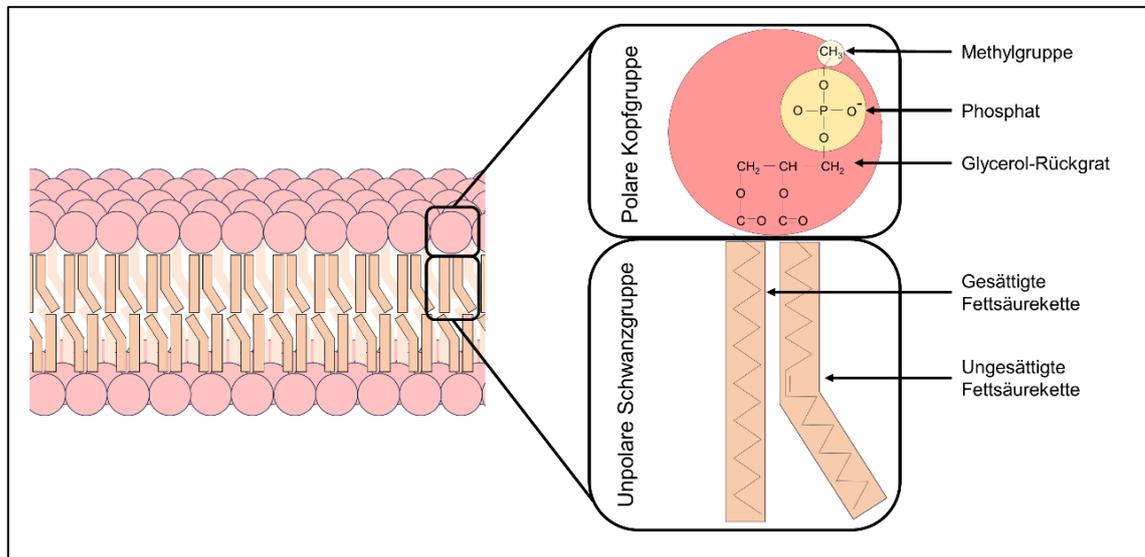


Abbildung 3: Vereinfachte Darstellung einer Lipiddoppelschicht mit dem strukturellen Aufbau von PEth 16:0/18:1

Neben PEth 16:0/18:1 ist PEth 16:0/18:2 mit bis zu 28 % das am zweithäufigsten vorkommende PEth-Homologe.¹⁵⁻¹⁷ Die Bestimmung weiterer PEth-Homologe kann sowohl zur Plausibilitätsüberprüfung als auch zur weitergehenden Beurteilung eines vorangegangenen Alkoholkonsums genutzt werden. Die zuletzt genannte Anwendung ist jedoch noch nicht intensiv erforscht. Um weitere Informationen über andere PEth-Homologe zu erlangen, wurde in dieser Dissertation eine Methode entwickelt, die neben den zwei oben genannten Analyten auch die PEth-Homologe 16:0/20:4, 17:0/18:1, 18:0/18:1, 18:1/18:1 und 18:0/18:2 beinhaltet (Publikation I).

Generell wird PEth bei Anwesenheit von Ethanol in allen Zellmembranen gebildet und sofort durch das Enzym Phosphatidylcholin-Phospholipase (EC 3.1.3.75) abgebaut. Dieser Abbau findet in den Erythrozyten nicht statt, da dort das Enzym nicht vorkommt. Somit kommt es in der Zellmembran der Erythrozyten zu einer Akkumulation von PEth.¹⁸⁻²⁰ Bereits im Jahr 2013 wurde erstmalig ein Schwellenwert zur Klassifizierung vorangegangenen Alkoholkonsums durch Helander und Hansson in Schweden vorgeschlagen. Dabei wurde eine Überschreitung von 35 ng PEth 16:0/18:1/ mL Blut als Ausschluss einer Alkoholabstinenz empfohlen. Durch eine modernere und sensitivere Analytik konnte dieser Schwellenwert in den letzten Jahren auf 20 ng PEth 16:0/18:1/ mL Blut herabgesetzt werden.^{5,21} Bei einem einmaligen Trinkereignis nach vorangegangener, mehrwöchiger Alkoholabstinenz wurde überprüft, ob mit Erreichen einer BAK von durchschnittlich 0,80 ‰ eine Überschreitung des 20 ng PEth 16:0/18:1/ mL Blut-Grenzwertes einhergeht (Publikation II).

In Deutschland wurde PEth 16:0/18:1 in die 4. überarbeitete Version der Fahreignungsbeurteilungen, welche im November 2022 erschien, implementiert. Dabei gibt es analog zu EtG_H drei Kategorien zur Charakterisierung eines vorangegangenen Alkoholkonsums (Tabelle 1).²²

Tabelle 1: Empfehlungen zur Evaluierung des Trinkverhaltens mithilfe der Alkoholmarker Ethylglucuronid in den Haaren (EtG_H) und Phosphatidylethanol (PEth) im Blut

	EtG _H [pg/mg]	PEth 16:0/18:1 [ng/mL]
Nachweiszeitraum	3 Monate	4 Wochen
Geringer Alkoholkonsum/-abstinenz	< 5	< 20
Sozial akzeptiertes Trinkverhalten	5 – 30	20 – 210
Übermäßiger Alkoholkonsum	> 30	> 210

PEth findet seit Jahren Anwendung zur Überprüfung einer Alkoholabstinenz in Alkoholentzugskliniken. Nach einer mehrwöchigen Abstinenz fällt dabei die PEth-Konzentration drastisch ab.²³⁻²⁵ Bei sozial akzeptiertem Trinken kann eine Alkoholabstinenz von 28 Tagen bereits zu einem negativen PEth-Befund führen. Aus der raschen Bildung und dem beschriebenen Abfall resultiert ein mittellanges Nachweisfenster, das wesentlich kürzer als für EtG_H, aber deutlich länger als für EtG im Urin ist. Ein unregelmäßiger Alkoholkonsum oder eine Änderung der Trinkgewohnheiten bei Gelegenheitstrinkern könnte demnach zu nachschwankenden PEth-Konzentrationen führen. Um diese These zu prüfen, wurde ein sechsmonatiges Monitoring von Personen mit sozial akzeptiertem Trinkverhalten (Normaltrinker) durchgeführt, bei dem die tägliche Trinkmenge dokumentiert und eine regelmäßige Entnahme von Kapillarblut und Haaren durchgeführt wurden (Publikation III).

Die Bildung von PEth erfolgt bei Anwesenheit von Ethanol in der Blutprobe auch nach ihrer Entnahme in der Venüle. Somit ist eine Momentaufnahme der tatsächlichen PEth-Konzentration bei aktuell alkoholisierten Probanden erschwert und kann zu fälschlich erhöhten Ergebnissen führen. Eine Überprüfung der Stabilität von Realproben, bei denen auch alkoholpositive Proben gelagert wurden, führte zu teils widersprüchlichen Aussagen.²⁶⁻³² Da ein positiver Befund bei einer Alkoholabstinenzkontrolle im Rahmen der Fahreignungsüberprüfung zu einem Programmabbruch führt, bleibt die Frage nach der Stabilität von PEth-positiven, alkoholnegativen Proben ungeklärt. In der vierten Veröffentlichung wurde die Stabilität von zehn Blutproben, die über 60 Tage unter unterschiedlichen Bedingungen gelagert wurden, unter Hinzuziehung des Stabilitätskriteriums nach Stamm et al. überprüft.³³

3.3 Trockenblutproben (DBS)

Während Trockenblutproben (Dried Blood Spots; DBS) vor allem aus dem Neugeborenenenscreening zur Detektion von Stoffwechselerkrankungen bekannt sind, werden sie seit 2021 von der Welt Anti-Doping Agentur auch im Rahmen von Dopingkontrollen verwendet. In den letzten Jahren wurden immer mehr Applikationen im Bereich des Therapeutic Drug Monitoring oder für toxikologische Fragestellungen basierend auf DBS publiziert.³⁴⁻³⁶ In dieser Arbeit wurde ebenfalls

eine Methode entwickelt, die auf einer Extraktion der PEth-Homologen aus DBS basiert. Für die Analysen auf PEth werden dabei lediglich 20 µL Blut benötigt, welches nach Entnahme auf ein Filterpapier (Whatman 903, Ahlström, Bernstein, Deutschland) aufgetragen und nach vollständiger Trocknung weiterbearbeitet wird (Publikation I). Neben dem sehr geringen Probenvolumen kann die Probengewinnung minimal-invasiv aus der Fingerbeere und somit aus Kapillarblut erfolgen. Die Filterkarten mit den getrockneten Proben können platzsparend und ungekühlt gelagert werden. Auch ein Probenversand ist deutlich kostengünstiger, da eine Umverpackung nicht erforderlich ist und kein Auslaufisiko im Vergleich zu flüssigen Proben besteht. Zudem ist das Infektionsrisiko geringer als bei der Handhabung von Vollblut- oder Urinproben, da viele Viren ihre Virulenz beim Trocknen der DBS verlieren.^{37,38}

3.4 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Tandemmassenspektrometrie

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) beschreibt ein physikalisches Trennverfahren, bei dem unter hohem Druck Substanzgemische aufgetrennt werden. Nach der Probenaufarbeitung, bei der die gewünschten Analyten extrahiert und durch Evaporation des Eluats aufkonzentriert werden, wird das Analytgemisch mittels eines Eluenten (mobile Phase) durch eine Trennsäule gedrückt. Diese Trennsäule ist mit Partikeln spezifischer physikalischer Eigenschaften gefüllt, welche als stationäre Phase bezeichnet werden. Die Elution erfolgt in der Regel mittels eines Fließmittelgradienten, um eine effiziente und zeitsparende chromatographische Auftrennung zu gewährleisten. Dabei treten Wechselwirkungen zwischen mobiler und stationärer Phase sowie dem Analytgemisch auf, welche eine Substanztrennung zur Folge haben. Die Verweildauer einzelner Substanzen ist dabei sowohl von der Affinität der einzelnen Substanzen zu den Oberflächengruppen der stationären Phase als auch von ihrer Wechselwirkung mit der mobilen Phase abhängig. Dies beeinflusst gleichzeitig die Elution der einzelnen Substanzen aus der Trennsäule und damit die Retentionszeit als substanzspezifischem Parameter.³⁹⁻⁴¹

Die in dieser Arbeit verwendete Trennsäule HyPurity C4 (50 mm x 3 mm, Partikelgröße 5µm, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) ist charakterisiert durch eine Umkehrphase aus Silicagel mit C4-„Bürstchen“ auf der Oberfläche, die eine geringere Hydrophobizität als C8- oder C18-Materialien besitzt und daher für die Auftrennung hydrophober Analyten besonders geeignet ist. Zur Auftrennung von Phosphatidylethanol wurde ein Fließmittel basierend auf Acetonitril und somit von polarem Charakter gewählt.

Nach erfolgter Auftrennung der Substanzen gelangen diese nach Elektrospray-Ionisation (ESI) ins Massenspektrometer (MS). Hierbei werden die ionisierten Moleküle in der Lösung durch eine Kapillare, an deren Ende eine Hochspannung angelegt ist, geleitet. Für die Analyse der PEth-Homologe werden positiv geladene Teilchen abgezogen, während negativ geladene Ionen am Ende der Kapillare einen Taylor-Konus ausbilden, aus dem Tröpfchen herausgeschleudert werden. Durch Stickstoff als Trocknungsgas und hohe Temperaturen in der Ionenquelle wird eine Verdampfung des Lösemittels aus diesen Tröpfchen begünstigt. Durch die Abnahme der

Tröpfchengröße kommt es zu einer Zunahme der Ladungsdichte an deren Oberfläche. Bei Erreichen des Raleigh-Limits zerplatzen die Mikrotröpfchen (Coulomb-Explosion). Durch das simultane Verdampfen und Absaugen des Elutionsmittels liegen nach weiteren Coulomb-Explosionen letztendlich nur noch geladene Teilchen in gasförmigem Zustand vor. Dieser Vorgang erfolgt bei Atmosphärendruck, während im MS/MS-System Hochvakuum herrscht. Die geladenen Teilchen fliegen nun in den ersten Massenanalysator, welcher aus vier parallel angeordneten Metallstäben (Quadrupol) besteht, an die Gleich- und Wechselspannungen angelegt sind. Die Ionen bewegen sich nun entsprechend den Einstellungen auf instabilen oder stabilen Bahnen. Vorher definierte, spezifische Ionen können den Zwischenraum zwischen den Stäben aufgrund einer stabilen Flugbahn passieren, werden bei ihrem Aufschlagen auf den Detektor detektiert und in digitale Signale umgewandelt.³⁹⁻⁴¹

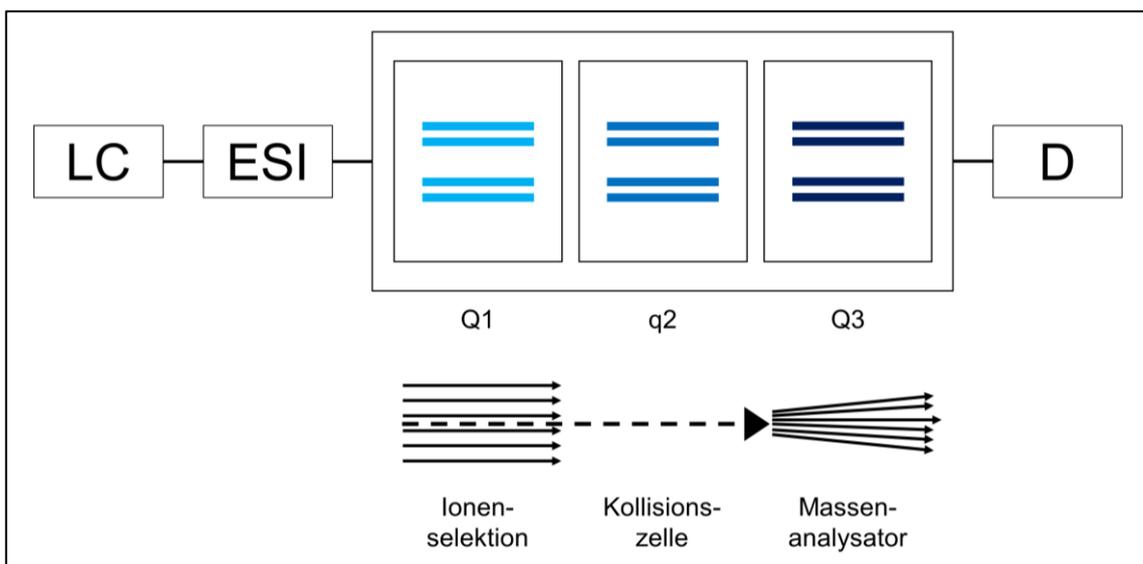


Abbildung 4: Vereinfachte Darstellung eines Flüssigkeitschromatographen (LC), gekoppelt mit einer Elektrospray-Ionisationskammer (ESI) und dem Triple Quadrupol Massenspektrometer, bestehend aus zwei Quadrupol-Massenanalysatoren (Q1 und Q3), einer dazwischengeschalteten Kollisionszelle (q2) und dem Detektor (D)

In dieser Arbeit wurde ein Triple Quadrupol Gerät, bei dem drei Quadrupole hintereinandergeschaltet sind, verwendet (Abbildung 4). Im ersten Quadrupol erfolgt die Filterung eines oder mehrerer spezifischer Ionen. Diese werden im zweiten Quadrupol nach Zusammenstoß mit einem Inertgas, hier Stickstoff, fragmentiert. Im dritten Quadrupol werden diese spezifischen Fragmentationen erneut herausgefiltert und anschließend detektiert. Je nach Fragestellung stehen verschiedene Messmodi zur Verfügung. Da die Masse von PEth und den zu detektierenden Homologen bekannt war, konnte ein Product-Ion-Scan mit anschließendem Multiple-Reaction-Monitoring genutzt werden. Dabei erfolgt im ersten Quadrupol die Selektion eines spezifischen Vorläuferions der jeweiligen Masse/Ladung. Dieses wird im zweiten Quadrupol fragmentiert. Zur Quantifizierung werden zwei spezifische Fragmente – Target und Qualifier – herangezogen. Nur Fragmentationen, die vom Vorläuferion stammen, passieren den dritten Quadrupol. Ein PEth-Homolog gilt als eindeutig identifiziert, wenn sowohl Target als auch Qualifier bei der gleichen Retentionszeit detektiert werden und die Peakflächen im gleichen Verhältnis zueinander stehen.³⁹⁻⁴¹

4 Ergebnisse

4.1 Validierung einer Methode zur Detektion von sieben PEth-Homologen

In der ersten Veröffentlichung dieser wissenschaftlichen Arbeit wurde eine routinetaugliche Methode, die die Anforderungen an die Validierung von Analysemethoden der GTFCh erfüllt, zum Nachweis von insgesamt sieben verschiedenen PEth-Homologen aus DBS etabliert.^{42,43} Dabei wurden die Parameter Sensitivität, Linearität, Genauigkeit, Stabilität, Matrixeffekte, Wiederfindung, Carry-over und Grenzwerte geprüft und bestanden. Durch die damals aktuelle Corona-19-Pandemie und der teilweise intensiven Verwendung ethanolhaltiger Desinfektionsmittel wurde zusätzlich überprüft, ob eine Bildung und Kumulation von PEth im Fingerkapillarblut nach exzessivem Händedesinfizieren erfolgt. An der Studie nahmen zehn Probanden teil, von denen acht Teilnehmer initiale PEth-Werte von unter 20 ng PEth 16:0/18:1/ mL Blut und zwei Teilnehmer Werte über 210 ng PEth 16:0/18:1/ mL Blut und somit oberhalb der Grenze von sozial angepasstem Trinkverhalten aufwiesen. Während dieser Studie durften keine zusätzlichen alkoholischen Genussmittel konsumiert werden. Dabei konnte festgestellt werden, dass exzessives Händedesinfizieren, welches 30-mal am Tag an fünf aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt wurde, weder zu einer zusätzlichen Akkumulation noch zu einer Überschreitung des Cutoffs bei den acht Personen mit PEth-Werten unter 20 ng PEth 16:0/18:1/ mL Blut führte.

4.2 Nachweis eines einmaligen moderaten Alkoholkonsums

In der zweiten Publikation wurde ein Trinkversuch beschrieben, bei dem 18 Probanden nach dreiwöchiger Alkoholabstinenz innerhalb von 90 Minuten Alkohol konsumierten, um eine maximale BAK von 0,80 ‰ zu erreichen. Es sollte ermittelt werden, ob durch die hierfür erforderlichen Trinkmengen der Cutoff einer Alkoholabstinenz von 20 ng PEth 16:0/18:1/ mL Blut überschritten wurde. Anschließend wurde während der kontrollierten Abstinenz stündlich Blut entnommen, um die Konzentration der Alkoholabbauprodukte PEth und EtG mit der BAK zu vergleichen. Am nächsten Tag erfolgte abermals eine einmalige Blutentnahme. Nur fünf Teilnehmer überschritten am Folgetag die 20 ng PEth 16:0/18:1/ mL Blut-Marke. Bei einer Absenkung des Grenzwertes auf 10 ng PEth 16:0/18:1/ mL Blut konnte bei 16 Probanden der vorangegangene Alkoholkonsum nachgewiesen werden. Zusätzlich konnten insgesamt fünf weitere Homologe (PEth 16:0/18:2, 16:0/20:4, 18:0/18:1, 18:1/18:1 und 18:0/18:2) nachgewiesen werden. In allen Blutproben, auch in den am Folgetag entnommenen, konnte EtG (> 3 ng/mL Blut) nachgewiesen werden.

4.3 Konzentrationsschwankungen von PEth bei sozial angepasstem Trinkverhalten über sechs Monate

In der dritten Publikation wurde eine sechsmonatige Studie präsentiert, bei der 23 Probanden, die regelmäßig Alkohol konsumierten, mithilfe der Social Media App *Beer with me* ihren täglichen Alkoholkonsum bezüglich Art und Menge dokumentierten. Alle zwei bis vier Wochen erfolgte eine Kapillarblutentnahme zur Bestimmung der PEth-Konzentrationen. Nach drei und sechs Monaten wurde eine 3 cm lange, kopfhautnahe Haarsträhne entnommen, um den EtG_H-Gehalt zu bestimmen. Bei zwölf Probanden stimmten die Konzentrationen der Alkoholkonsummarker mit dem Trinkverhalten überein. Bei acht Probanden ergaben sich auffällige PEth-Konzentrationen (> 20 ng PEth 16:0/18:0/ mL Blut), die jedoch unauffällig bezüglich ihrer EtG_H-Werte (< 5 pg/mg) waren. Bei einer Steigerung des Alkoholkonsums adaptierten sich die PEth-Konzentrationen deutlich schneller als die EtG_H-Werte. Dies lässt sich durch die Wachstumszyklen des Haares erklären, während haarkosmetische Behandlungen wie eine Blondierung zu einer Degradation von EtG im Haar und damit zu scheinbar diskrepanten Befunden führten. Zwei Probanden wiesen PEth-Konzentrationen von über 210 ng PEth 16:0/18:0/ mL Blut, aber EtG_H-Werte von unter 30 pg/mg auf (vgl. Tabelle 1). Gründe hierfür könnten bei punktuellen, exzessiven Trinkepisoden („Binge drinking“) liegen. Eine Probandin lag trotz dokumentiertem Alkoholkonsum in fünf von sieben PEth-Analysen unter 20 ng PEth 16:0/18:0/ mL Blut; beide Haaranalysen verliefen ebenfalls negativ.

4.4 Stabilität von PEth in alkoholnegativen Blutproben

In der vierten Publikation wurden Blutproben bei zehn aktuell alkoholnegativen Normaltrinkern entnommen. Hieraus wurden 24 Aliquote á 100 µL Vollblut und 72 DBS á 20 µL je Blutprobe angefertigt. Jeweils acht Vollblutaliquote und 24 DBS pro Blutprobe wurden anschließend bei -80°C, 4°C und 18°C Raumtemperatur für insgesamt 60 Tage gelagert. Die initiale PEth-Bestimmung erfolgte am Tag der Probenahme, anschließend wurden jeweils drei DBS an den Tagen 1, 3, 5, 7, 11, 17, 25, 40 und 60 aufgearbeitet und vermessen. An den gleichen Tagen wurden drei DBS aus den Vollblutaliquoten kreiert. Die daraus entstandenen 72 neuen DBS pro Probe wurden am Ende der Studie in einem Lauf aufgearbeitet und analysiert. Insgesamt konnten fünf verschiedenen PEth Homologe (16:0/18:1, 16:0/18:2, 16:0/20:4, 18:0/18:1, 18:0/18:2) initial detektiert werden. Die Beurteilung der Stabilität erfolgte anhand der kritischen Differenz.³³ Alle Homologe, bis auf PEth 16:0/20:4, erfüllten das Stabilitätskriterium für DBS und Vollblut bei einer Lagerung bei -80°C. PEth 16:0/18:1 erfüllte das Stabilitätskriterium in 9 von 10 Proben unabhängig von der Lagerungstemperatur, sowohl im Vollblut als auch in den DBS-Proben für 60 Tage. Die initiale Konzentration von PEth 16:0/20:4 sank um bis zu 42 % nach 7 Tagen, wenn die Proben in Form von DBS gelagert wurden. Bei einer Lagerung als Vollblut sank die Konzentration auf bis zu 100 % bereits nach einem Tag. Bis auf zwei Ausnahmen waren die PEth-Homologe 16:0/18:2, 18:0/18:1 und 18:0/18:2 in Form von DBS bis zu 40 Tagen stabil.

5 Zusammenfassung

In dieser Dissertation wurde eine Methode zur Detektion von insgesamt sieben Phosphatidylethanol-Homologen (PEth 16:0/18:1, 16:0/18:2, 16:0/20:4, 17:0/18:1, 18:0/18:1, 18:1/18:1 und 18:0/18:2) in Trockenblutproben (DBS) mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Tandemmassenspektrometrie nach den Richtlinien der Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie validiert. Anschließend wurde die Methode verwendet, um bisher offene Fragestellungen bezüglich PEth, insbesondere in der Fahreignung, zu beantworten.

PEth beschreibt eine Gruppe von abnormalen Phospholipiden, die nur bei Anwesenheit von Ethanol gebildet werden. Diese akkumulieren vorrangig in der Zellmembran von Erythrozyten, da hier das Enzym Phosphatidylcholin-Phospholipase (EC 3.1.3.75), welches für den Abbau von PEth verantwortlich ist, fehlt. Ein Unterschreiten von 20 ng PEth 16:0/18:1/ mL Blut wird für die Annahme einer Alkoholabstinenz, und ein Überschreiten von 210 ng PEth 16:0/18:1/ mL Blut für ein nicht-sozial verträgliches Trinkverhalten empfohlen.

In der ersten Publikation wurde die erfolgreiche Validierung der Methode für die Parameter Selektivität, Linearität, Genauigkeit, Stabilität, Matrixeffekte, Wiederfindung, Carry-over und Grenzwerte erstmalig für sieben PEth-Homologe vorgestellt. Zudem konnte gezeigt werden, dass bei initial PEth-negativen Probanden ein exzessives Händedesinfizieren mit ethanolhaltigen Lösungen nicht zu einer Überschreitung des Grenzwertes von 20 ng PEth 16:0/18:1/ mL Blut führte. Die zweite Publikation stellt einen einmaligen Trinkversuch mit 18 Probanden nach einem dreiwöchigen Verzicht auf alkoholhaltige Genussmittel dar. Fünf Probanden, die eine durchschnittliche BAK von 0,93 ‰ aufwiesen, überschritten am Folgetag des Trinkversuchs den Grenzwert von 20 ng PEth 16:0/18:1/ mL Blut. Durch eine Kombination mit PEth 16:0/18:2 oder Ethylglucuronid (EtG) in DBS konnte die Sensitivität für die Detektion eines vorangegangenen Alkoholkonsums auf 72,2 % bzw. 100 % gesteigert werden. In der dritten Veröffentlichung dokumentierten 23 Teilnehmer über sechs Monate ihren täglichen Alkoholkonsum, der oft deutlichen Schwankungen unterlag, mittels einer Social Media App. In regelmäßigen Abständen von zwei bis vier Wochen wurde Kapillarblut für die PEth-Analytik, nach drei und sechs Monate jeweils eine 3 cm lange, proximale Haarsträhne für die EtG-Bestimmung entnommen. Während 22 von 23 Probanden PEth-positiv (> 20 ng PEth 16:0/18:1/ mL Blut) Ergebnisse erzielten, konnte der Alkoholkonsum (> 5 pg EtG/ mg Haar) nur in 14 Haarproben nachgewiesen werden. Somit konnte gezeigt werden, dass Änderungen im Trinkverhalten durch PEth schneller als durch EtG_H angezeigt werden. In der letzten Publikation wurde die Stabilität von zehn PEth-positiven, alkoholnegativen Realproben bei unterschiedlichen Bedingungen untersucht. Dabei erfolgte die Lagerung sowohl in Vollblut als auch in DBS bei Temperaturen von -80°C, 4°C und 18°C. Es konnte gezeigt werden, dass PEth 16:0/18:1 in 9 von 10 Proben unabhängig von der Lagerungstemperatur sowohl in DBS als auch in Vollblut über 60 Tage stabil war. Insgesamt war PEth in DBS deutlich länger als im Vollblut stabil.

Zusätzlich zu den Publikationen wurden die Ergebnisse dieser Arbeit auf nationalen und internationalen Fachkonferenzen vorgestellt.

6 Abstract

In this doctoral thesis, a liquid chromatography/tandem mass spectrometry method to detect up to seven phosphatidylethanol homologues (PEth 16:0/18:1, 16:0/18:2, 16:0/20:4, 17:0/18:1, 18:0/18:1, 18:1/18:1 und 18:0/18:2) in dried blood spots (DBS) was validated. The validation was performed according to the guidelines of the German Society of Toxicological and Forensic Chemistry. Thereafter, this method was applied to further investigate some open questions concerning PEth, especially those regarding fitness-to-drive.

PEth describes a group of abnormal phospholipids being formed only when ethanol is present in blood. PEth accumulates primarily in the cell membrane of erythrocytes due to the lack phosphatidylcholine-phospholipase (EC 3.1.3.75) being involved in the degradation of PEth. Concentrations of < 20 or > 210 ng PEth 16:0/18:1/ mL blood are recommended when assessing teetotalism or excessive alcohol consumption, respectively.

The first publication describes the successful method's validation including tests for selectivity, linearity, precision, stability, recovery, matrix effects, carry-over, and limits of detection of seven PEth homologues. Moreover, it has been shown, that initial PEth-negative test subjects are not endangered to surpass the lower threshold of 20 ng PEth 16:0/18:1/ mL blood by excessively using an ethanolic hand sanitizer. The second publication presents a single drinking event of 18 participants after a three-week abstinence of alcohol. Five subjects with a mean blood alcohol concentration of 0.93 ‰ reached more than 20 ng PEth 16:0/18:1/ mL blood on the following day. By combining both PEth 16:0/18:2 and ethyl glucuronide (EtG) in DBS, there was an increased sensitivity to detect recent alcohol consumption of 72.2 % and 100 %, respectively. In publication 3, 23 participants documented their daily alcohol consumption revealing individual fluctuations via a social media app. Capillary blood to detect PEth was collected periodically every two to four weeks. After three and six months, a 3 cm long, proximal hair strand for the determination of EtG was collected as well. Twenty-two out of 23 participants had positive PEth results (> 20 ng PEth 16:0/18:1/ mL blood), whereas only 14 participants had EtG_H concentrations of more than 5 pg/mg. In contrast to EtG in hair, PEth showed a rapid adaption in its concentration when the drinking behavior changes. In the last publication, the stability of PEth-positive, but ethanol-free samples stored under different conditions was investigated. Storage was conducted both in whole blood and DBS, and samples were stored at -80°C, 4°C and 18°C. Nine of ten samples passed the stability criterion for PEth 16:0/18:1 for 60 days both in whole blood and DBS independent of the storage temperature. Altogether, the stability criterion for PEth (16:0/18:1, 16:0/18:2, 16:0/20:4, 18:0/18:1, and 18:0/18:2) was passed longer by using DBS than whole blood.

The results obtained during these four publications were presented on both national and international expert meetings.

7 Paper I

Development and validation of seven phosphatidylethanol-homologues in dried blood spots including preliminary results after excessive use of an ethanol-based hand sanitizer

Herzog, Josefine; Skopp, Gisela; Mußhoff, Frank

Journal of Analytical Toxicology 2023 Mar 24;47(3):245-252

DOI: 10.1093/jat/bkac086

8 Paper II

Formation of phosphatidylethanol and ethylglucuronide after low to moderate alcohol consumption in volunteers with a previous three-week alcohol abstinence

Herzog, Josefine; Skopp, Gisela; Mußhoff, Frank; Hartung, Benno

Alcohol and Alcoholism 2023 Nov 11;58(6):599-605

DOI: [10.1093/alcalc/agad025](https://doi.org/10.1093/alcalc/agad025)

9 Paper III

Monitoring of phosphatidylethanol in dried blood spots and of ethyl glucuronide in hair over six months of alcohol consumption

Herzog, Josefine; Skopp, Gisela; Mußhoff, Frank

Drug Testing and Analysis 2024 Apr; 16(4):359-368

DOI: 10.1002/dta.3553

10 Paper IV

Storage stability of phosphatidylethanol homologues in whole blood and dried blood spots of non-alcoholics at different temperatures over 60 days

Herzog, Josefine; Skopp, Gisela; Mußhoff, Frank; Hartung, Benno

Drug Testing and Analysis

DOI: 10.1002/dta.3619

11 Literaturverzeichnis

1. Madea B, ed. *Rechtsmedizin: Befunderhebung, Rekonstruktion, Begutachtung*. 3rd ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2015.
2. Madea B, Mußhoff F, Tag B. *Kurzlehrbuch Rechtsmedizin*. 1st ed. Bern: Huber; 2012.
3. Musshoff F, Madea B, Hess C. Toxikologie. In: *Madea, Burkhard (2015) - Rechtsmedizin*. Vol. 3:599-691.
4. Andresen-Streichert H, Müller A, Glahn A, Skopp G, Sterneck M. Alcohol Biomarkers in Clinical and Forensic Contexts. *Dtsch Arztebl Int*. 2018;115(18):309-315. doi:10.3238/arztebl.2018.0309.
5. Heier C, Xie H, Zimmermann R. Nonoxidative ethanol metabolism in humans-from biomarkers to bioactive lipids. *IUBMB Life*. 2016;68(12):916-923. doi:10.1002/iub.1569.
6. Helander A, Hermansson U, Beck O. Dose-Response Characteristics of the Alcohol Biomarker Phosphatidylethanol (PEth)-A Study of Outpatients in Treatment for Reduced Drinking. *Alcohol Alcohol*. 2019;54(6):567-573. doi:10.1093/alcalc/agz064.
7. Aktories, Klaus, Förstermann, Ulrich, Hofmann BF, Starke K, eds. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie: Für Studenten der Medizin, Veterinärmedizin, Pharmazie, Chemie und Biologie sowie für Ärzte, Tierärzte und Apotheker*. 9th ed. München, Jena: Elsevier Urban & Fischer; 2005.
8. Oneta CM, Lieber CS, Li J, et al. Dynamics of cytochrome P4502E1 activity in man: induction by ethanol and disappearance during withdrawal phase. *J Hepatol*. 2002;36(1):47-52. doi:10.1016/S0168-8278(01)00223-9.
9. Teschke R, Gellert J. Hepatic microsomal ethanol-oxidizing system (MEOS): metabolic aspects and clinical implications. *Alcoholism Clin Exp Res*. 1986;10(6 Suppl):20S-32S. doi:10.1111/j.1530-0277.1986.tb05176.x.
10. Hastedt M. Dissertation - Fettsäureethylester und Ethylglucuronid als Marker eines chronisch erhöhten Alkoholkonsums: -Fettsäureethylester und Ethylglucuronid als Marker eines chronisch erhöhten Alkoholkonsums. *Universitätsbibliothek der FU Berlin*. 2013.
11. Bruntz RC, Lindsley CW, Brown HA. Phospholipase D signaling pathways and phosphatidic acid as therapeutic targets in cancer. *Pharmacol Rev*. 2014;66(4):1033-1079. doi:10.1124/pr.114.009217.
12. Alling C, Gustavsson L, Månsson JE, Benthin G, Anggård E. Phosphatidylethanol formation in rat organs after ethanol treatment. *Biochim Biophys Acta*. 1984;793(1):119-122. doi:10.1016/0005-2760(84)90060-2.
13. Benthin G, Anggård E, Gustavsson L, Alling C. Formation of phosphatidylethanol in frozen kidneys from ethanol-treated rats. *Biochim Biophys Acta*. 1985;835(2):385-389. doi:10.1016/0005-2760(85)90295-4.
14. Gnann H, Engelmann C, Skopp G, et al. Identification of 48 homologues of phosphatidylethanol in blood by LC-ESI-MS/MS. *Anal Bioanal Chem*. 2010;396(7):2415-2423. doi:10.1007/s00216-010-3458-5.

15. Nalesso A, Viel G, Cecchetto G, et al. Quantitative profiling of phosphatidylethanol molecular species in human blood by liquid chromatography high resolution mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2011;1218(46):8423-8431. doi:10.1016/j.chroma.2011.09.068.
16. Gnann H, Thierauf A, Hagenbuch F, Rohr B, Weinmann W. Time dependence of elimination of different PEth homologues in alcoholics in comparison with social drinkers. *Alcohol Clin Exp Res*. 2014;38(2):322-326. doi:10.1111/acer.12277.
17. Brenna JT, Plourde M, Stark KD, Jones PJ, Lin Y-H. Best practices for the design, laboratory analysis, and reporting of trials involving fatty acids. *Am J Clin Nutr*. 2018;108(2):211-227. doi:10.1093/ajcn/nqy089.
18. Kobayashi M, Kanfer JN. Phosphatidylethanol formation via transphosphatidylation by rat brain synaptosomal phospholipase D. *J Neurochem*. 1987;48(5):1597-1603. doi:10.1111/j.1471-4159.1987.tb05707.x.
19. Varga A, Hansson P, Johnson G, Alling C. Normalization rate and cellular localization of phosphatidylethanol in whole blood from chronic alcoholics. *Clinica Chimica Acta*. 2000;299(1-2):141-150. doi:10.1016/S0009-8981(00)00291-6.
20. Aradóttir S, Moller K, Alling C. Phosphatidylethanol formation and degradation in human and rat blood. *Alcohol Alcohol*. 2004;39(1):8-13. doi:10.1093/alcalc/agh003.
21. Luginbühl M, Wurst FM, Stöth F, Weinmann W, Stove CP, van Uytvanghe K. Consensus for the use of the alcohol biomarker phosphatidylethanol (PEth) for the assessment of abstinence and alcohol consumption in clinical and forensic practice (2022 Consensus of Basel). *Drug Test Anal*. 2022. doi:10.1002/dta.3340.
22. Brenner-Hartmann J, Fastenmeier W, Graw M. *Urteilsbildung in der Fahreignungsbegutachtung: Beurteilungskriterien*. 4th ed. Bonn: Kirschbaum Verlag; 2022.
23. Gunnarsson T, Karlsson A, Hansson P, Johnson G, Alling C, Odham G. Determination of phosphatidylethanol in blood from alcoholic males using high-performance liquid chromatography and evaporative light scattering or electrospray mass spectrometric detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 1998;705(2):243-249. doi:10.1016/S0378-4347(97)00541-0.
24. Kwak HS, Han J-Y, Ahn H-K, et al. Blood levels of phosphatidylethanol in pregnant women reporting positive alcohol ingestion, measured by an improved LC-MS/MS analytical method. *Clin Toxicol (Phila)*. 2012;50(10):886-891. doi:10.3109/15563650.2012.744997.
25. Stöth F, Weinmann W, Soravia LM, Pfeifer P. Evaluation of Phosphatidylethanol Elimination in Alcohol Use Disorder Patients Undergoing Withdrawal Treatment. *Alcohol Alcohol*. 2023;58(3):266-273. doi:10.1093/alcalc/agad010.
26. Faller A, Richter B, Kluge M, Koenig P, Seitz HK, Skopp G. Stability of phosphatidylethanol species in spiked and authentic whole blood and matching dried blood spots. *Int J Legal Med*. 2013;127(3):603-610. doi:10.1007/s00414-012-0799-y.
27. van der Nagel BCH, Wassenaar S, Bahmany S, Koch BCP. Quantification of Phosphatidylethanol in Whole Blood as a Proxy for Chronic Alcohol Consumption, Using Ultra Performance Convergence Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Therapeutic Drug Monitoring*. 2018;40(2):268-275. doi:10.1097/FTD.0000000000000492.

28. Skråstad RB, Spigset O, Aamo TO, Andreassen TN. Stability of Phosphatidylethanol 16:0/18:1 in Freshly Drawn, Authentic Samples from Healthy Volunteers. *J Anal Toxicol*. 2021;45(4):417-421. doi:10.1093/jat/bkaa082.
29. Dumitrascu C, van de Lavoie MCA, Neels H, et al. Stability of phosphatidylethanol 16:0/18:1 in authentic and spiked whole blood. *Drug Test Anal*. 2021;13(6):1219-1222. doi:10.1002/dta.2995.
30. Casati S, Ravelli A, Angeli I, Durello R, Minoli M, Orioli M. An automated sample preparation approach for routine liquid chromatography tandem-mass spectrometry measurement of the alcohol biomarkers phosphatidylethanol 16:0/18:1, 16:0/16:0 and 18:1/18:1. *J Chromatogr A*. 2019;1589:1-9. doi:10.1016/j.chroma.2018.12.048.
31. Bakhireva LN, Shrestha S, Gutierrez HL, Berry M, Schmitt C, Sarangarm D. Stability of Phosphatidylethanol in Dry Blood Spot Cards. *Alcohol Alcohol*. 2016;51(3):275-280. doi:10.1093/alcalc/agv120.
32. Aboutara N, Jungen H, Szewczyk A, Müller A, Iwersen-Bergmann S. Stability of PEth 16:0/18:1, 16:0/18:2, 16:0/20:4, 18:0/18:1, 18:0/18:2, and 18:1/18:1 in authentic whole blood samples (at room temperature). *Drug Test Anal*. 2023. doi:10.1002/dta.3559.
33. Stamm D. A new concept for quality control of clinical laboratory investigations in the light of clinical requirements and based on reference method values. *J Clin Chem Clin Biochem*. 1982;20(11):817-824. doi:10.1515/cclm.1982.20.11.817.
34. Aboutara N, Jungen H, Szewczyk A, Sterneck M, Müller A, Iwersen-Bergmann S. Analysis of six different homologues of phosphatidylethanol from dried blood spots using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Drug Test Anal*. 2021;13(1):140-147. doi:10.1002/dta.2910.
35. Jones J, Jones M, Plate C, Lewis D. The detection of 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanol in human dried blood spots. *Anal Methods*. 2011;3(5):1101. doi:10.1039/c0ay00636j.
36. Kummer N, Ingels A-S, Wille SMR, et al. Quantification of phosphatidylethanol 16:0/18:1, 18:1/18:1, and 16:0/16:0 in venous blood and venous and capillary dried blood spots from patients in alcohol withdrawal and control volunteers. *Anal Bioanal Chem*. 2016;408(3):825-838. doi:10.1007/s00216-015-9169-1.
37. Spiekerkoetter U, Krude H. Target Diseases for Neonatal Screening in Germany. *Dtsch Arztebl Int*. 2022;119(17):306-316. doi:10.3238/arztebl.m2022.0075.
38. Thevis M, Kuuranne T, Thomas A, Geyer H. Do dried blood spots have the potential to support result management processes in routine sports drug testing?-Part 2: Proactive sampling for follow-up investigations concerning atypical or adverse analytical findings. *Drug Test Analysis*. 2021;13(3):505-509. doi:10.1002/dta.3011.
39. Gey M. *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik: Biosubstanzen, Trennmethode, Strukturanalytik, Applikationen*. 3rd ed. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum; 2015.
40. Hesse M, Meier H, Zeeh B. *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie: 102 Tabellen*. 7th ed. Stuttgart: Thieme; 2005.
41. Matissek R, Fischer M, Steiner G. *Lebensmittelanalytik*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2018.

-
42. Peters F, Hartung M, Herbold M, Schmitt G, Daldrup T, Mußhoff F. Appendix B to the Guidelines for quality assurance in forensic-toxicological analyses: Requirements for the validation of analytical methods. *Toxichem Krimtech*. 2009;(76):185-208.
 43. Peters FT, Drummer OH, Musshoff F. Validation of new methods. *Forensic Sci Int*. 2007;165(2-3):216-224. doi:10.1016/j.forsciint.2006.05.021.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Doktorarbeit unterstützt und begleitet haben.

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. F. Mußhoff für die Bereitstellung der wissenschaftlichen Stelle zur Durchführung dieses Promotionsprojekts, die wissenschaftlichen Betreuung, den großzügigen Gestaltungsfreiraum und der Geduld während der gesamten Bearbeitungszeit.

Ein großes Dankeschön geht an Frau Prof. G. Skopp, die mir jederzeit mit beeindruckendem Fachwissen und hilfreichen Ratschlägen zur Seite gestanden und mich dadurch zu einer besseren Wissenschaftlerin gemacht hat.

Vielen Dank an Herrn Dipl.-Ing. (FH) T. Dame, der stets mit immenser Ruhe allerlei analytische Fragen beantwortet und jegliche Gedankensprünge meinerseits gelassen ertragen hat.

Besten Dank an meine (Leid-)Genossen und Toxikologen Frau Dr. H. Fels, Herrn Dr. S. Franz, Herrn Dr. T. Franz und Herrn C. Wiedfeld für stetige Motivation, Tipps und Tricks.

Ein besonderer Dank geht an alle Arbeitskollegen, Freunde und Bekannte, die bei jeglichen Trinkversuchen mit viel Spaß und Ehrgeiz teilgenommen haben. Danke, dass ihr (fast) nie die ernsthaften Absichten dieser wissenschaftlichen Arbeit angezweifelt habt. Vor allem möchte ich mich bei Andrea, Carina, Leonie, Michaela, Sandra und Petzi bedanken – vielen Dank für die ehrliche Freundschaft, die zwischen Arbeitsalltag und Aperol Spritz wachsen konnte.

Ein weiterer Dank geht an meinen Mitautor Herrn PD Dr. B. Hartung, dem Bund gegen Alkohol und Drogen im Straßenverkehr e.V. und der Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie für die finanzielle Unterstützung einzelner Projekte.

Der herzlichste und allergrößte Dank gilt meinen Eltern, meinem Bruder und meinem Oheim. Ohne euch wäre ich nicht ich.