

Pflastertest für Fettsäureethylester (FSEE) in Hautoberflächenlipiden als Alkoholmarker. Vergleich mit Trinkangaben, FSEE-Konzentrationen im Haar und konventionellen Alkoholmarkern.

Markus Schwarz, Sven Hartwig, Thomas Nadulski, Thorsten Kienast, Fritz Pragst

Zusammenfassung

Es wurde ein Pflastertest unter Verwendung von Sebutapes (CuDerm Corporation, Dallas, Texas) für die reproduzierbare Gewinnung von Hautoberflächenlipiden und deren Analyse auf vier Fettsäureethylester (Ethylmyristat, Ethylpalmitat, Ethyloleat und Ethylstearat) als Alkoholmarker mittels Festphasenmikroextraktion (SPME) und Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) entwickelt und bei 52 Patienten einer Alkoholentzugsklinik, 20 Normaltrinkern und 15 Nichttrinkern angewendet. Zum Vergleich wurden persönliche Trinkmengenangaben erfasst, die Fettsäureethylesterkonzentration im Haar und die konventionellen Alkoholmarker γ -GT, MCV, ALAT und CDT (nicht in allen Fällen) bestimmt. Die Summe der vier Ester C_{FSEE} in den Hautoberflächenlipiden reichte bei den Patienten der Alkoholentzugsklinik von 11,3 bis 857 ng pro Pflaster (Mittelwert 84,3 ng, $n = 52$) und im Haar von 0,29 bis 5,25 ng/mg (Mittelwert 0,99 ng/mg, $n = 24$). Die entsprechenden Werte bei den Normaltrinkern (13,9 – 271 ng pro Pflaster, Mittelwert 48,0 ng, $n = 62$ und 0,31 – 0,58 ng/mg Haar, Mittel 0,38 ng/mg) und bei den Nichttrinkern (3,6 – 32,0 ng pro Pflaster, Mittelwert 16,0 ng, $n = 94$ und 0,05 bis 0,13 ng/mg Haar, Mittelwert 0,07 ng/mg) waren deutlich niedriger. Bei vier Patienten im stationären Alkoholentzug wurde der Pflastertest täglich für die Dauer von zwei Wochen nach Abstinenzbeginn wiederholt. Hier zeigte sich keine signifikante Abnahme der C_{FSEE} . Unter Verwendung eines Cut-Off-Wertes von 30 ng pro Pflaster wurde ein Alkoholabusus nach zwei Wochen Alkoholabstinenz mit einer Spezifität und Sensivität von 77 % erfasst. Die Korrektur der C_{FSEE} bei Anwendung von Squalen als natürlichem internem Standard brachte keine signifikante Verbesserung.

Abstract

A patch test based on Sebutape adhesive patches (CuDerm Corporation, Dallas, Texas) for reproducible collection of skin surface lipids and its analysis for the four fatty acid ethyl esters (FAEE) ethyl myristate, ethyl palmitate, ethyl oleate and ethyl stearate by headspace solid phase microextraction (SPME) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was developed and applied to 52 patients in withdrawal treatment, 20 social drinkers and 15 teetotallers. For comparison, the self-reported alcohol consumption, FAEE in hair and the conventional markers γ -GT, MCV, ALAT and CDT (not in all cases) were determined. The sum of the four esters C_{FAEE} in the skin surface lipids ranged from 11.3 to 857 ng per patch (mean 84.3 ng, $n = 52$) and in hair from 0.29 to 5.25 ng/mg (mean 0.99 ng/mg, $n = 24$). The corresponding data for social drinkers (13.9 to 271 ng per patch, mean 48.0 ng, $n=62$ and 0.31 to 0.58 ng/mg in hair, mean 0.38 ng/mg) and teetotallers (3.6 to 32.0 ng per patch, mean 16.0 ng, $n=94$ and 0.05 to 0.13 ng/mg in hair, mean 0.07 ng/mg) were significantly lower. In four patients in stationary alcohol withdrawal the patch test was performed daily for a duration of two weeks after the start of abstinence. Here no significant decrease of C_{FAEE} was observed. Using a cut-off value of 30 ng per patch, alcohol abuse after two weeks of alcohol abstinence was detected with a specificity and sensitivity of 77%. Correction of C_{FAEE} using squalene as a natural internal standard did not bring about a significant improvement.

and for teetotallers (3.6-32.0 ng per patch, mean 16.0 ng, n=94 and 0.05 to 0.13 ng/mg in hair, mean 0.07 ng/mg) were clearly lower. For four of the withdrawal patients, the patch test was applied daily for two weeks after beginning of abstinence showing no significant decrease of C_{FAEE} . Using a cut-off of 30 ng per patch, alcohol abuse during the last two weeks was detected with a specificity of 77 % and a sensitivity of 77 %. Correction of C_{FAEE} by use of squalene as natural internal standard did not improve the significance.

1. Einleitung

Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass Fettsäureethylester (FSEE) nach Alkoholenuss in verschiedenen Körpergeweben und speziell auch in Talgdrüsen gebildet und akkumuliert werden. Der Nachweis von FSEE im Haar als Marker für chronisch exzessiven Alkoholkonsum und die Interpretation der Ergebnisse wurden bereits intensiv untersucht [1-10]. Dabei wurde unter anderem festgestellt, dass der Hauptteil der FSEE über das an der Hautoberfläche sezernierte Sebum, in welchem vergleichsweise hohe FSEE-Konzentrationen gefunden wurden, kontinuierlich in das Haar eingelagert wird. Eine zeitliche Zuordnung von Trink- und Abstinenzphasen war damit nicht möglich. Die in die Haarmatrix eingelagerten FSEE eignen sich als Langzeitalkoholmarker. Die Sebumproduktion in den Talgdrüsen nimmt eine Transitionszeit von 8 - 10 Tagen in Anspruch. Die Messung der Fettsäureethylesterkonzentration in Hautoberflächenlipiden (HOL) könnte folglich für die mittelfristige Beurteilung des Alkoholkonsums angewendet werden.

Zur Überprüfung dieser Annahme, wurde ein Pflastertest für die reproduzierbare Gewinnung von Hautoberflächenlipiden und deren Analyse entwickelt und bei Patienten einer Alkoholentzugsklinik, Normaltrinkern und Abstinenzlern angewendet. Durch möglichst tägliche Anwendung des Pflastertestes bei Alkoholentzugspatienten sollten Erkenntnisse über den zeitlichen Konzentrationsverlauf der FSEE im Sebum nach Abstinenzbeginn erhalten werden. In einem Vergleich konventioneller Alkoholismuskmarker, der Fettsäureethylesterkonzentration in Kopfharen und der Trinkmengenangaben mit der Fettsäureethylesterkonzentration im Sebum von Alkoholikern, Normaltrinkern und Abstinenzlern sollte eine Einschätzung der Zuverlässigkeit der entwickelten Methode vorgenommen werden.

2. Material und Methoden

2.1 Probanden

Die Versuchsreihen erfolgten in Kooperation mit dem St. Hedwig Krankenhaus Berlin – Abteilung Psychiatrie. Für alle im Rahmen dieser Studie durchgeführten Versuche lag ein positives Votum der Ethikkommission der Charité – Universitätsmedizin Berlin vor. Die Probanden wurden ausführlich über die Studienziele- und -abläufe informiert.

2.2 Gewinnung von Hautoberflächenlipiden

Die Hautoberflächenlipide wurden mittels beschichteter Sebutape-Pflaster (CuDerm Corporation, Dallas, Texas) von der Stirn gewonnen. Die Pflaster finden allgemein in der dermatologischen Diagnostik Verwendung. Die ausgewählte Hautpartie wurde zunächst mit Aceton entfettet und getrocknet. Anschließend wurden jeweils drei Sebutape-Pflaster für die Dauer von drei Stunden auf der Haut belassen (Abb. 1a-c) und anschließend auf einer Trägerkarte fixiert (Abb. 2) und bei Normaltemperatur bis zur Analyse in Briefumschlägen gelagert.

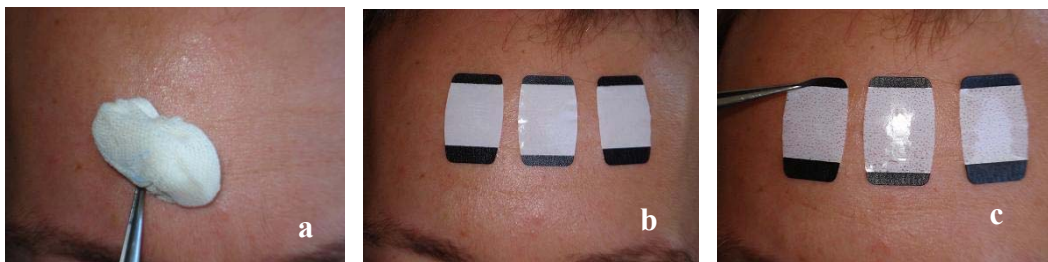


Abb. 1. Definierte Gewinnung von Hautoberflächenlipiden auf der Stirn. a) Gründliche Entfettung mit Aceton. b) Absorption der frisch gebildeten Lipide mittels der anhaftenden Sebutapes für 3 Stunden. c) Ablösen der Sebutapes nach 3 Stunden, Berührung mit den Händen muss vermieden werden.

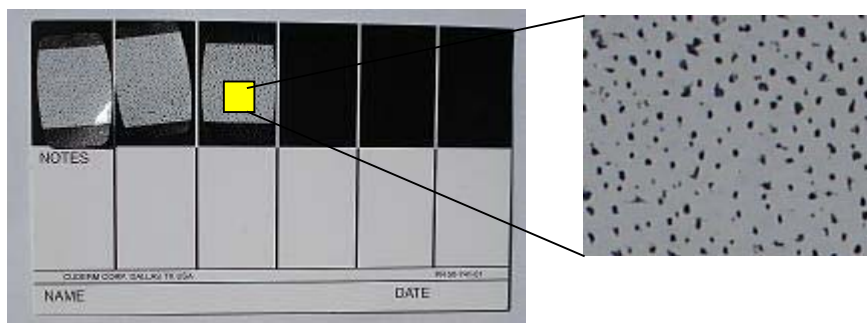


Abb. 2. Aufbewahrung der getragenen Pflaster auf einer Trägerkarte. Im vergrößerten Ausschnitt eines Pflasters sind die Lipide von den einzelnen Talgdrüsenausführungsgängen als schwarze Punkte zu erkennen.

2.3 Analyse der Pflaster auf FSEE

Zur Ablösung der Lipide wurden die Pflaster mit der aktiven Fläche nach unten auf die Öffnung von 10 ml Headspace-Gefäßen gelegt, in die zuvor 2 ml n-Heptan und die vier deuterierten FSEE-Standards (je 20 ng absolut) gegeben wurden (Abb. 3). Die Gefäße wurden mit Septum und Aluminiumbördelkappe fest verschlossen. Auf diese Weise wurde eine definierte Hautoberfläche von 1,3

cm² für die Analyse gesichert. Die Gefäße wurden durch Überkopfstellen und Schütteln für 10 Minuten extrahiert und danach wieder geöffnet. Für die Analyse auf Squalen wurden 100 µl abgenommen und in ein HPLC-Vial überführt. Das restliche n-Heptan wurde in ein Headspace-Schraubvial gegeben und das n-Heptan in beiden Vials bei 50 °C im Stickstoffstrom eingedampft. Zur Messung der FSEE wurden zum Rückstand 1 ml Pufferlösung pH 7,4 und 0,5 g NaCl hinzugefügt.



Abb. 3. Durch Auflegen der Sebupapes mit der aktiven Fläche auf die Öffnung eines Heaspace-Vials und anschließendem Ablösen der Lipide mit n-Heptan wird eine definierte untersuchte Oberfläche von 1,3 cm erreicht.

Die Bestimmung der FSEE durch GC-MS und von Squalen durch HPLC erfolgte nach den bereits früher beschriebenen Methoden. Abb. 4 zeigt das typisches GC-MS-SIM-Chromatogramm der Probe eines Alkoholikers. Für die Bewertung wurden die Mittelwerte der in den drei Pflastern ermittelten FSEE-Konzentrationen herangezogen.

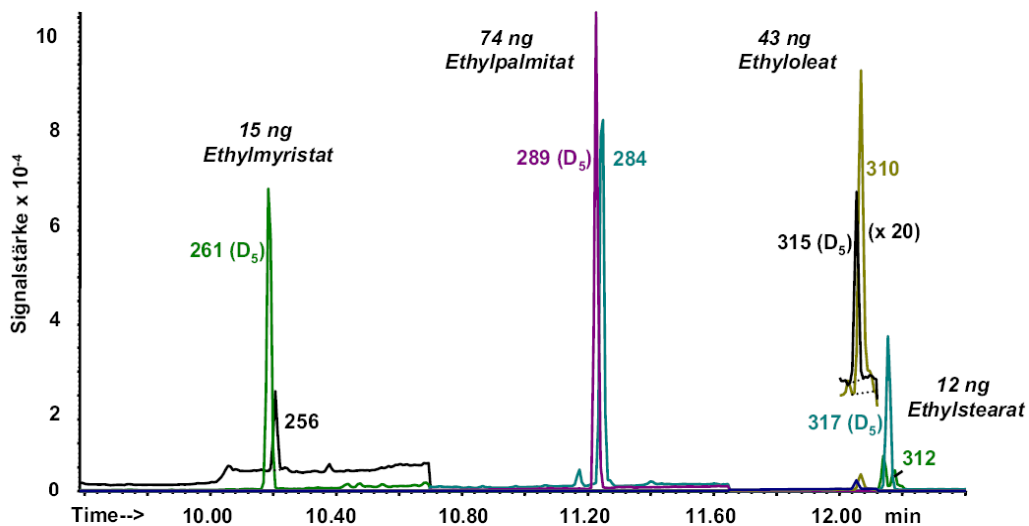


Abb. 6: Typisches GC-MS-SIM-Chromatogramm einer Hautoberflächenlipidprobe. .

3. Ergebnisse und Diskussion

Insgesamt haben im Rahmen ihres Alkohol-Enzugs-Aufenthaltes am St. Hedwig Krankenhaus 61 Patienten an der Studie zum Vergleich der Güte und Zuverlässigkeit der verschiedenen Alkoholismuskmarker teilgenommen. Die 48 Männer und 13 Frauen waren zwischen 22 und 69 Jahre alt und vor ihrer stationären Aufnahme in die Klinik bereits mehrmals wegen schwerem Alkoholmissbrauches ambulant in ärztlicher Behandlung. Von 59 Probanden konnten die Alkoholismus-Parameter γ -GT, ALAT und MCV ermittelt werden. Von 31 Probanden wurde zusätzlich der CDT-Wert bestimmt. 25 Probanden stimmten einer Haaranalyse auf FSEE zu und 52 Probanden haben zumindest einmal für drei Stunden die Sebustape-Pflaster zur Quantifizierung der FSEE in den Hautoberflächenlipiden getragen.

Tabelle 1. Auswertung der verschiedenen Alkoholismuskmarker bezüglich ihrer korrekten Aussagefähigkeit bei 61 Probanden im stationären Alkoholentzugsprogramm.

Alkoholismuskmarker	Grenzwert	Messwerte n	erhöhte Werte	Spezifität
γ -GT	55 U/L	59	41 (61%)	+
ALAT	45 U/L	59	26 (44%)	-
MCV	100 μm^3	59	10 (17%)	--
CDT	1.9 %	31	26 (83%)	+++
FSEE (Haar)	0.5 ng/mg	16	25 (64%)	++
FSEE (Hautoberflächenlipide)	32 ng	52	41 (79%)	+++

Die Auswertung der fünf untersuchten Alkoholismuskmarker erbrachte die in Tabelle 1 aufgeführten Ergebnisse. Von den 59 ermittelten Werten für die Enzymkonzentration des γ -GT lagen 41, d.h. 69% über dem Grenzwert von 55U/L. Von 59 ermittelten Werten für die Enzymkonzentration der ALAT lagen 26, d.h. 44% über dem Grenzwert von 45U/L. Von 59 ermittelten Werten für das korpuskuläre Erythrozytenvolumen MCV lagen 10, d.h. 17% über dem Grenzwert von 100 μm^3 . Von 31 bestimmten Werten für die Konzentration an Carbohydratdefizientem Transferrin CDT lagen 26, d.h. 83% über dem Grenzwert von 1,9%. Dieses Ergebnis bestätigt die gängige Meinung unter Medizinern, welche bereits langjährige Erfahrungen mit der Behandlung von Alkoholkranken haben, dass das CDT und das γ -GT die zuverlässigsten dieser vier bestimmten klinisch-chemischen Marker für exzessiven Alkoholabusus sind. Normalerweise wird jedoch bislang aus Kostengründen auf die Bestimmung des CDT-Wertes verzichtet. Die beiden anderen Parameter ALAT und MCV zeigen mit Quoten von 44% und 17% nur eine geringe Zuverlässigkeit als Marker für übermäßigen Alkoholmissbrauch. Man kann jedoch deutlich erkennen, dass keiner dieser vier ermittelten klinisch-chemischen Labormarker eine hundertprozentige Aussage bietet.

Von den 25 untersuchten Haarproben auf FSEE lagen 16, d.h. 64% über dem Grenzwert von 0.5 ng/mg Haar als Summe der vier Fettsäureethylester Ethylmyristat, Ethylpalmitat, Ethylstearat und Ethyloleat.

Die Bestimmung der FSEE in Hautoberflächenlipiden wurde bei 52 Patienten im stationären Alkoholentzug, 20 Normaltrinkern und 15 Nichttrinkern angewendet. C_{FSEE} reichte bei den Patienten der Alkoholentzugsklinik von 11,3 bis 857 ng pro Pflaster (Mittelwert 84,3 ng, $n = 52$). Die entsprechenden Werte bei den Normaltrinkern (13,9 – 271 ng pro Pflaster, Mittelwert 48,0 ng,) und bei den Nichttrinkern (3,6 – 32,0 ng pro Pflaster, Mittelwert 16,0 ng) waren deutlich niedriger. In Abb. 5 sind die Summen der vier untersuchten Fettsäureethylester pro Pflaster für die untersuchten Gruppen dargestellt.

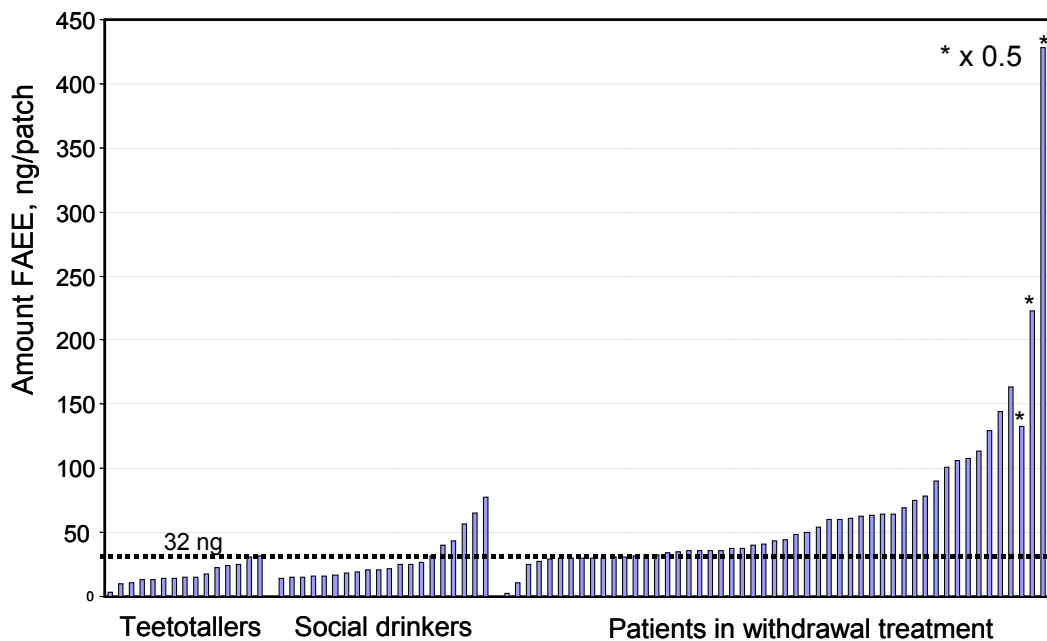


Abb. 5. Summen der vier untersuchten Fettsäureethylester pro Pflaster bei 52 Alkoholikern, 20 Normaltrinkern und 15 Abstinenzlern

Um Grenzwerte (ng FSEE/Pflaster) zur Differenzierung zwischen Abstinenzlern, Normaltrinkern und Alkoholikern zu erhalten, wurde eine sogenannte Receiver Operating Characteristic kurz ROC-Analyse [11] durchgeführt. Dabei wurden die Werte weiterer Normaltrinker und Abstinenzler hinzugezogen, so dass die Gruppe der „Nichtalkoholiker“ 156 Probanden umfasste. Die Ergebnisse sind in Abb. 6 dargestellt.

Für die Unterscheidung zwischen Alkoholikern und Nicht-Alkoholikern anhand des Absolutwertes der Summe der vier FSEE pro Sebutape-Pflaster ergab sich einen Grenzwert von 32 ng bei einer Sensitivität und Spezifität von 77%. Die

analog durchgeführte ROC-Analyse zur Unterscheidung zwischen Alkoholikern und Nicht-Alkoholikern anhand des Quotienten aus der Summe der vier FSEE zu Squalen (b) ergab einen Grenzwert von 1.09 ng/μg bei einer Sensitivität und Spezifität von nur 72%. Unter der Annahme des Grenzwertes von 32ng FSEE pro getragenen Pflaster lagen von 52 untersuchten Patienten des St. Hedwig Krankenhauses 41, d.h. 79% oberhalb dieses Grenzwertes.

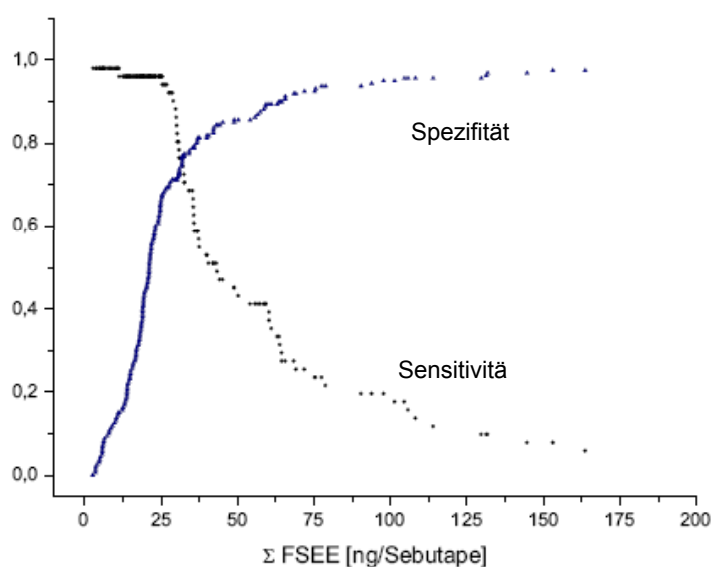


Abb. 6.
Ergebnis der ROC-Analyse
des FSEE-Nachweises in
Hautoberflächenlipiden als
Alkoholismusmarker.

Die Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der FSEE-Werte in Hautoberflächenlipiden war nur bei sechs Probanden möglich, welche die Pflaster an mehr als zehn Tagen getragen haben. Ein Beispiel ist in Abb. 7 dargestellt. Es zeigt sich, dass bei der Mehrzahl der Probanden der höchste ermittelte Wert für die Menge an FSEE in den Hautoberflächenlipiden innerhalb der ersten neun Tage nach stationärer Aufnahme gemessen wurde. Diese Werte lagen auch alle deutlich oberhalb des ermittelten Grenzwertes von 32ng FSEE für die Abgrenzung von Alkoholikern zu Normaltrinkern. Da einige Patienten jedoch eine längere Abstinenzphase vor Beginn der Entzugsbehandlung aufwiesen als andere, sind die Werte nicht direkt miteinander vergleichbar. Ein eindeutiger Konzentrationsverlauf mit kontinuierlich abnehmender FSEE-Konzentration innerhalb des Entzugsprogramms konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Aufgrund der intensiven aber individuell stark unterschiedlichen Alkoholaufnahme besaßen einige Patienten auch nach 28 Tagen noch deutlich erhöhte FSEE-Werte in den Hautoberflächenlipiden, wohingegen andere bereits nach kurzer Zeit Werte im Bereich der Normaltrinker oder sogar im Abstinenzlerbereich aufwiesen.

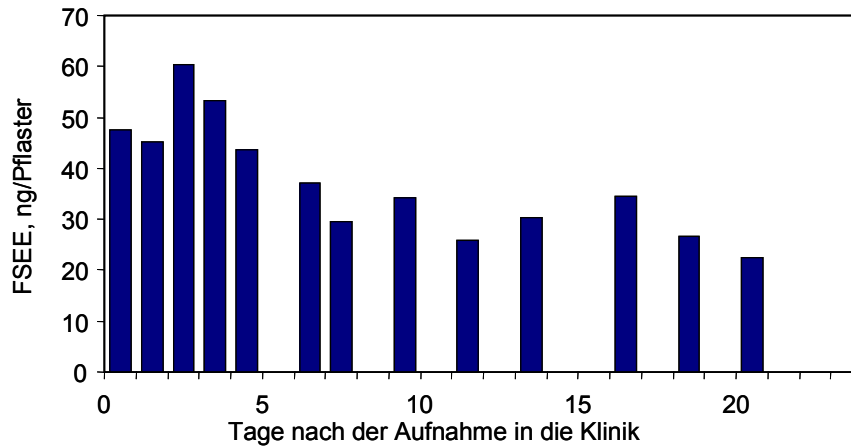


Abb. 7. Zeitlicher Verlauf der FSEE-Konzentration in Hautoberflächenlipiden bei einem Patienten in der Entzugsklinik.

4. Schussfolgerungen

Chronischer Alkoholmissbrauch kann durch die Messung der Fettsäureethylesterkonzentration in Hautoberflächenlipiden auch nach mindestens zweiwöchiger Alkoholabstinenz festgestellt werden. Die Werte sind ähnlich denen, die bei der Haaranalyse gefunden werden. Die Sensitivität ist mit der des CDT vergleichbar und deutlich besser als die des MCV, der γ -GT und der ALAT. Schwierigkeiten bei der Anwendung des Pflastertestes zeigten sich bei der Bereitschaft, die unter Umständen stigmatisierenden Pflaster für drei Stunden an der Stirn, dem Ort der größten Talgdrüsendichte, zu tragen.

5. Literatur

- [1] F. Pragst, V. Auwaerter, F. Sporkert, K. Spiegel: Analysis of fatty acid ethyl esters in hair as possible markers of chronically elevated alcohol consumption by headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) and gas chromatography mass spectrometry (GC-MS). *Forensic Sci. Int.* 121 (2001) 76-88.
- [2] V. Auwaerter, H. Vater, F. Pragst, F. Sporkert, A. Diefenbacher, S. Hartwig: Konzentrationen von Fettsäureethylestern in Haarsegmenten und Trinkverhalten: Proceedings GTFCh - Symposium Mosbach 2001, S. 288-298.
- [3] F. Pragst, V. Auwaerter, S. Hartwig, H. Vater, A. Diefenbacher: Fettsäureethylester als direkte Alkoholmarker im Haar - Eine neue Möglichkeit zur retrospektiven Prüfung auf exzessiven Alkoholkonsum. *Berichte der Bundesanstalt für Straßenwesen* 133 (2001) 76-81.
- [4] V. Auwaerter, F. Sporkert, S. Hartwig, F. Pragst, H. Vater, A. Diefenbacher: Fatty acid ethyl esters in hair as markers of alcohol consumption. Segmental hair analysis of alcoholics, social drinkers, and teetotallers. *Clin.Chem.*, 47 (2001) 2114-2123.

- [5] S. Hartwig, V. Auwaerter, F. Pragst: 2003, Effect of hair care and hair cosmetics on the concentrations of fatty acid ethyl esters as markers of chronically elevated alcohol consumption: *Forensic Sci. Int.* 131 (2003) 90-97.
- [6] S. Hartwig, V. Auwaerter, F. Pragst: Fatty acid ethyl esters in scalp, pubic, axillary, beard and body hair as markers for alcohol misuse: *Alcohol & Alcoholism* 8 (2003) 163-167.
- [7] F. Pragst, V. Auwaerter, S. Hartwig, F. Sporkert, 2003, Fettsäureethylester im Haar und im Sebum als Marker für chronisch exzessiven Alkoholkonsum. In H. Strauch und F. Pragst (Hrsg.), *Beiträge des wissenschaftlichen Symposiums Rechtsmedizin 11. Juli 2003*: Berlin, Verlag Dr. Dieter Helm, S. 61-97.
- [8] F. Pragst, V. Auwärter, B. Kießling, C. Dyes. Wipe test and patch test for alcohol misuse based on the concentration ratio of fatty acid ethyl esters and squalene CFAEE/CSQ in skin surface lipids. *Forensic Sci. Int.* 143 (2004) 77-86.
- [9] M. Yegles, A. Labarthe, V. Auwärter, S. Hartwig, H. Vater, R. Wennig, F. Pragst, Comparison of ethyl glucuronide and fatty acid ethyl ester concentrations in hair of alcoholics, social drinkers and teetotalers, *Forensic Sci. Int.* 145 (2004) 167-73.
- [10] Pragst, F. and Balikova MA, State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse *Clin Chim Acta.* 370 (2006) 17-49.
- [11] M. Greiner, D. Pfeiffer, R.D. Smith, Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. *Prev. Vet. Med.* 45 (2000) 23-41.

Markus Schwarz
 Dr. med. Sven Hartwig
 Dr. rer. nat Thomas Nadulski
 Prof. Dr. Fritz Pragst
 Institut für Rechtsmedizin
 Charité – Universitätsmedizin Berlin
 Hittorfstraße 18
 D-14195 Berlin
E-Mail: fritz.pragst@charite.de

Dr. med. Torsten Kienast
 Klinik für Psychiatrie und
 Psychotherapie der Charité
 St. Hedwig-Krankenhaus
 Turmstraße 21
 D-10559 Berlin