

Summary of the PhD Thesis as a Thank You for the GTFCh Travel Fund for Presenting at the 2011 SOFT-TIAFT Meeting in San Francisco (CA)

Phosphatidylethanol - ein Alkoholkonsummarker auf dem Weg in die klinisch-forensische Routinediagnostik

Heike Gnann

Universitätsklinikum Freiburg, Institut für Rechtsmedizin, Forensische Toxikologie, Albertstraße 9, D-79104 Freiburg

1. Einleitung

Laut Angaben des Statistischen Bundesamts Deutschland liegt Alkohol als Ursache für Unfälle mit Personenschaden auf dem zweiten Platz, gleich hinter Fahren mit einer erhöhten Geschwindigkeit [1]. Nichtsdestotrotz ist die Zahl alkoholbedingter Unfälle seit 1997 um mehr als die Hälfte zurückgegangen und es wäre wünschenswert, wenn dieser Trend anhielte [2]. Dies kann dadurch unterstützt werden, dass sowohl alkoholisierten Führern von Fahrzeugen als auch Alkoholikern, deren Blut eventuell zur Fahrzeit eine geringe Alkoholkonzentration aufweist, die aber trotzdem eine Gefahr für den Straßenverkehr darstellen, schnellstmöglich dem öffentlichen Verkehr entzogen werden. An dieser Stelle kommen sogenannte Alkoholkonsummarker zum Einsatz. Es handelt sich hierbei zum einen um körpereigene Stoffe, die durch Alkoholkonsum vermehrt gebildet werden (indirekte Alkoholkonsummarker) oder um Metabolite, bei denen durch Alkoholkonsum ein Ethanolrest in die Struktur eines anderen Moleküls eingebaut wird (direkte Alkoholkonsummarker). Grundsätzlich sind direkte Marker spezifischer, da bei indirekten Markern nicht ausgeschlossen werden kann, dass für deren Erhöhung anderweitige Ursachen zugrunde liegen. Zu den direkten Markern zählen neben der BAK an sich (Nachweisbarkeit bis zu 36 h nach Ende des Alkoholkonsums) das Ethylglucuronid und Ethylsulfat, die das Zeitfenster der Nachweisbarkeit auf ca. 5 Tage (im Urin) erhöhen [3-4]. Biomarker für einen chronischen Alkoholkonsum sind vorwiegend indirekte, wie z.B. die γ -Glutamyltransferase und das kohlenhydrat-defiziente Transferrin [5-8]. Als direkte Marker seien die Fettsäureethylester zu nennen, die in Haaren auch noch nach Monaten nachzuweisen sind. Somit bleibt das Phospholipid Phosphatidylethanol (PEth) der einzige bekannte Marker, der in Blut nachweisbar ist und einen Alkoholiker als einen solchen identifizieren könnte.

PEth besteht aus einem Glycerolgrundgerüst, an dem an sn-1 und sn-2 Position Fettsäurereste und an Position sn-3 Phosphoethanol verestert ist. Gebildet wird es aus Phosphatidylcholin (PC) mittels der Phospholipase D, die bei Alkoholabstinenz unter Wassereinfluss die Spaltungsreaktion von PC in Phosphatidsäure und Cholin katalysiert. Falls allerdings Ethanol in den Zellen vorhanden ist, kann dieses als Co-substrat anstelle von Wassermolekülen reagieren und PEth wird gebildet [9, 10]. Ethanol hat eine um ca. 1000-fach höhere Substratspezifität für die Phospholipase D als Wasser, ebenso wie andere kurzkettige Alkohole [11, 12], was zur Folge hat, dass es auch bei einer vergleichsweise niedrigen Konzentration von Ethanol zu einer Umsetzung kommt. PEth wird in den Zellmembranen von Erythrozyten gebildet, wurde aber bereits auch in Leber und Hirn nachgewiesen [13].

Allerdings wird dieser Marker in Deutschland noch nicht routinemäßig eingesetzt. Aufgrund wenig empfindlicher Detektoren war es in den letzten Jahrzehnten noch nicht möglich, diesen Marker in Blut von Gelegenheitstrinkern nachzuweisen. Dies hat sich in den letzten Jahren geändert: Es wurden neuere Methoden mit unterschiedlichen Detektoren entwickelt (u. a. aus

Dried Blood Spots mit Tandem- und Time-of-flight-Massenspektrometrie (MS/MS und TOF-MS)), mit denen niedrigere Nachweisgrenzen einhergingen [14-19]. Trotz der neueren Entwicklungen gab es zu Beginn dieser Arbeit nur wenige Untersuchungen zu diesem Marker, insbesondere im Hinblick auf mögliche Unterscheidungskriterien zwischen Gelegenheitstrinkern und Alkoholikern. Diese herauszufinden war das Hauptziel dieser Arbeit. Nebenher galt es weitere Homologe zu identifizieren (da es sich bei PEth nicht um ein einziges Molekül handelt) und weitere Untersuchungen durchzuführen, um diesen Marker für die Detektion von riskantem oder übermäßigem Konsum in der Routinediagnostik zu etablieren.

2. Methoden

2.1. Extraktion

Aufgrund seiner Präsenz in Erythrozyten wird PEth aus Vollblut analysiert. Es wurde eine flüssig-flüssig-Extraktion durchgeführt, wobei zu 300 µL Blut 100 µL Boratpuffer pH 9 und 10 µL des internen Standards (10 µg/mL PBut/PProp) hinzupipettiert wurden. Anschließend wurden 800 µL Isopropanol addiert, gevortext und zuletzt 1200 µL n-Hexan hinzugegeben. Das Gemisch wurde 20 min über Kopf geschüttelt und im Anschluss 5 min bei 4000 g zentrifugiert. Der klare Überstand wurde bei 40 °C unter einem Stickstoffstrom bis zur Trockne eingedampft und in 150 µL Laufmittelgemisch aufgenommen. Dieses bestand aus 25% A und 75% B, A=2 mmolare Ammoniumacetatlösung, B=Methanol/Aceton; 95/5, v/v. Um diesen z. T. unsauberen Extrakt aufzureinigen, wurde er durch Micro-Spin Filter gegeben. Ein Aliquot von 20 µL wurde zur Analyse auf die Säule des HPLC-Systems gebracht.

2.2. LC-MSMS

Das Gemisch wurde mittels einer Agilent HPLC 1100 Serie auf einer Luna Phenyl Hexyl, 50 x 2 mm, 3 µm aufgetrennt und über eine Turboionspray-Quelle in ein Triple-Quadrupol-Massenspektrometer mit linearer Ionenfalle (Q-Trap 2000) überführt. Der binäre Gradient begann mit 75% B, 0-3 min 75% B; 3-8 min, 75-95% B; 8-12 min, 95% B; 12-13 min, 95-75% B. Die Säule wurde anschließend 2 min reequilibriert. Die Ofentemperatur betrug 40 °C und die Flussrate 0,4 mL/min.

In allen Messmethoden wurden die Analyten im negativen Modus unter folgenden Bedingungen detektiert: DP: -60 V, EP: -9 V, Curtaingas: 20 psi, Collisionsgas: 5 psi, Ion spray voltage: -4200 V, Quelltemperatur: 400 °C, Ionengas 1: 40 psi, Ionengas 2: 70 psi.

Übergänge der MRM-Methode: PEth 16:0/16:0: [M-H]⁻ 675,5 → m/z 255,2 und 437,3; PEth 16:0/18:1: [M-H]⁻ 701,5 → m/z 255,2 und 281,2; PEth 18:1/18:1: [M-H]⁻ 727,5 → m/z 281,3 und 463,7; PProp 18:1/18:1: [M-H]⁻ 741,5 → m/z 281,2 und 477,3.

3. Ergebnisse und Diskussion

Die in den letzten Jahren entwickelten Analysenmethoden hatten den Nachteil, nicht sehr sensitiv zu sein und verbrauchten große Mengen an Lösungsmittel für eine Blutextraktion. In dieser Arbeit ist es durch eine Optimierung verschiedener Parameter gelungen, die Extraktionsausbeute bei starker Dezimierung der Lösungsmittelmenge zu steigern. Ebenso wurde eine LC-MS/MS-Methode erstellt und optimiert [20]. Um diese hinsichtlich ihrer Richtigkeit und Robustheit stetig zu überprüfen, wurde ein Ringversuch initiiert, an denen mehrere Labore aus Europa, die diese Analyse durchführen, teilnahmen. Des Weiteren konnte durch diverse Stabilitätsuntersuchungen festgestellt werden, dass sich zur Lagerung von Blutproben eine Temperatur von +4 °C oder -80 °C am besten eignet.

Ebenso wurde festgestellt, dass eine nachträgliche Aufdotierung von Leerblutproben mit Ethanol zu einer nachträglichen Bildung von PEth führt. Diese Bildung hängt stark von der Umgebungstemperatur sowie von den Zusätzen in Blutmonovetten ab, in der das Blut gelagert wird. Erneut bestätigten sich die bereits erwähnten Temperaturen von +4 °C oder -80 °C als besonders günstig. Diese Ergebnisse bestätigen die Untersuchungen von Aradottir et al. Sie stellten fest, dass es bei einer Temperatur von -20 °C zu einer vermehrten nachträglichen Bildung kommt [21]. Eine Erklärung für dieses Phänomen liegt möglicherweise in einer Aktivierung der Phospholipase D [22, 23]. Als ideales Behältnis erwies sich mit Abstand eine Monovette mit Homocystein-Zusatz, in der sogar bei einer Aufdotierung auf 3 % bei den besagten Temperaturen keine Neubildung von PEth zu detektieren war. Dieser Aspekt ist nicht zu vernachlässigen, da die Wahrscheinlichkeit, dass sich bei einer alkoholabhängigen Person Alkohol im Blut befindet, äußerst hoch ist. Somit kann das Risiko einer Verfälschung des PEth-Gehalts nach Abnahme der Blutprobe erheblich reduziert werden und dadurch wird eine Routineanwendung erst möglich.

Bis zur heutigen Zeit sind einige Studien hinsichtlich des Markers PEth in Blut von Alkoholikern durchgeführt worden. Jedoch fehlte eine exakte Identifizierung der im Blut existenten PEth Homologe, nicht zuletzt aus dem Grunde, weil die herkömmlichen Analysemethoden außer Stande waren, einzelne Homologe detektieren zu können.

In den ersten Studien wurde PEth mittels HPLC-ELSD (-evaporative light scattering detector) nachgewiesen. Es handelt sich hierbei um einen Detektor, der relativ unspezifisch ist, da er nur anhand des gebrochenen Lichts Signale aufnimmt, unabhängig von der Größe und Masse des Moleküls [14, 15, 24]. Folglich ist es mit diesem Detektor auch nicht möglich, verschiedene Homologe simultan zu detektieren – es wird stets ein gesamt PEth gemessen. Dies ist einer der Gründe, warum sich das Massenspektrometer (MS) als sehr vorteilhaft erweist. Es erreicht zudem eine sehr viel höhere Spezifität. Das Massenspektrometer wird in jüngerer Vergangenheit vermehrt als Detektor zur PEth-Messung eingesetzt und es werden damit wenige einzelne Homologe quantitativ gemessen [16, 25]. Vergleiche zwischen LC-MS/MS (HPLC gekoppelt mit einem Tandemmassenspektrometer) und HPLC-ELSD belegen, dass die Nachweisgrenzen mittels MS wesentlich niedriger liegen und diese Methodik auch unter diesem Gesichtspunkt geeigneter ist [26].

Durch Einsatz von LC-MS/MS gelang in dieser Arbeit eine Aufschlüsselung von 48 PEth Homologen in einem post-mortem Blut eines Alkoholikers und damit ergab sich die Möglichkeit, die prozentualen Anteile der einzelnen Homologe näher zu betrachten [27]. Es stellte sich heraus, dass die vier am häufigsten vertretenen Homologe 16:0/18:1, 16:0/18:2, 18:0/18:2 und 18:0/18:1 sind. Ein zugehöriges Chromatogramm ist in Abbildung 1 zu finden.

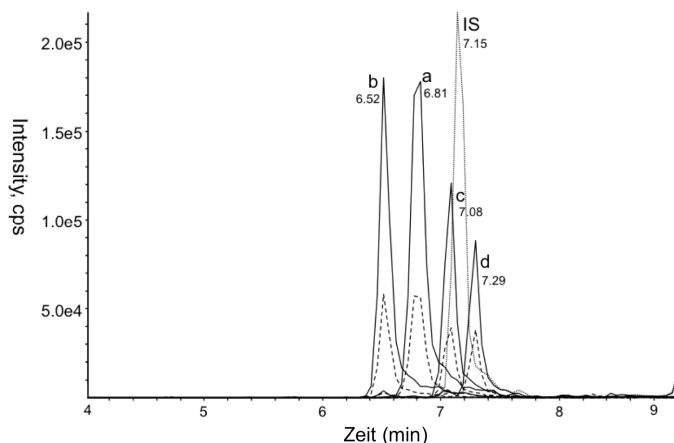


Abb. 1. Extracted Ion Chromatogram der 4 Homologe mit den höchsten prozentualen Anteilen und dem internen Standard PProp (IS), a: PEth 16:0/18:1 m/z 701,5–281,2, 255,2; b: PEth 16:0/18:2 m/z 699,5–255,2, 279,2; c: PEth 18:0/18:2 m/z 727,5–283,2, 279,2; d: PEth 18:0/18:1 m/z 729,5–283,3, 281,3; IS (PProp) m/z 741,5–281,2.

Das Vergleichen von Studien ist somit auch immer mit der Schwierigkeit verbunden, die Detektoren miteinzubeziehen und gegebenenfalls Absolutwerte umzurechnen. Helander et al. gehen davon aus, dass PEth 16:0/18:1 und PEth 16:0/18:2 annähernd 60 % des gesamten PEths ausmachen und berechnen daraus einen gesamt PEth-Wert [28].

Eine Abgrenzung zwischen Alkoholikern und Gelegenheitsrinkern lag in der Betrachtung der absoluten PEth-Werte. Laut Literaturangaben bewegen sich die in Blut von Alkoholikern gemessenen Werte von 2000 ng/mL bis zu 6000 ng/mL für das PEth-Homolog 16:0/18:1 [24, 25, 29]. Bei den Alkoholikern, die im Rahmen dieser Arbeit während der Entwöhnung begleitet wurden, konnten Werte von 120 ng/mL bis 1990 ng/mL ermittelt werden. Diese teilweise eher niedrigeren Werte resultierten aus der Tatsache, dass einige Patienten bereits einige Tage abstinent lebten, bevor sie die Entwöhnungstherapie begannen. Ein großes Problem bestand aber in dem Mangel an PEth-Werten in Blut von Gelegenheitsrinkern. Bei Auswertung der Blutproben von 78 Gelegenheitsrinkern wurde ersichtlich, dass bei einem großen Teil kein PEth vorhanden war. Die restlichen wiesen Werte bis zu 400 ng/mL auf. Um diese Werte genauer mit dem Trinkverhalten bzw. einer bestimmten Trinkmenge in Zusammenhang zu setzen, wurden verschiedene Trinkversuche (TV) durchgeführt. Dabei wurde eine definierte Menge Alkohol innerhalb einer Stunde getrunken, um die PEth-Bildung und PEth-Eliminierung zu untersuchen. Versuche über 5 Trinktage (11 Probanden) und 10 Trinktage (4 Probanden) wurden hierzu durchgeführt, bei denen jeweils eine Mindest-Blutalkoholkonzentration von 1,00 Promille erwünscht war [30]. Hierbei ergaben sich maximale PEth Werte bis zu 240 ng/mL (5 Tage TV, Abb. 2) und bis zu 510 ng/mL (10 Tage TV). Ein weiteres Resultat dieser Trinkversuche war, dass sich PEth bereits eine Stunde nach Trinkbeginn in detektierbaren Mengen gebildet hatte. Damit konnte die allgemein vertretene These, dass PEth erst nach wiederholtem Alkoholkonsum messbar ist, widerlegt werden.

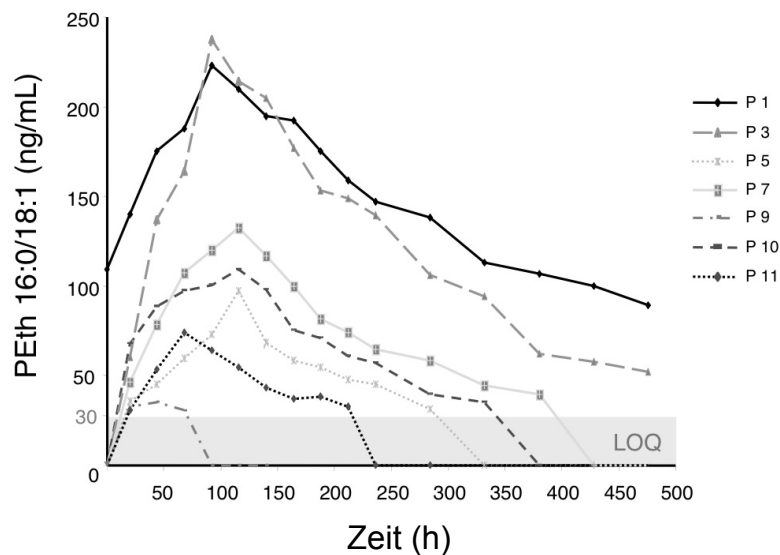


Abb. 2: Konzentrationsverläufe von PEth 16:0/18:1 während eines 5-tägigen Trinkversuchs von 7 Probanden, Tag 1-5 Trinkperiode, Tag 6-21 Abstinenzperiode.

Zur Abrundung der Entwicklung der LC-MS/MS Methodik wurde ein deuterierter PEth-Standard synthetisiert. Hierfür wurde D₅-Ethanol mit Phosphatidsäure, DMAP und DCC in Dichlormethan gelöst und 5 min bei 0°C, anschließend mehrere Stunden bei Raumtemperatur gerührt und mittels semipräparativer HPLC aufgereinigt. Dieser kann zukünftig für weiterführende Arbeiten als interner Standard zur Quantifizierung mit LC-MS/MS eingesetzt werden.

4. Konklusion

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wurde ein "Cut-off"-Wert von 800 ng/ml für PEth 16:0/18:1 festgelegt. Dieser beinhaltet einen gewissen Abstand zwischen Gelegenheitstrinkern und Alkoholikern, ist aber auch niedrig genug, um möglichst viele Alkoholiker als solche zu identifizieren. Werte, die um den "Cut-off" liegen, sollten als starke Konsumenten eingestuft werden, bei denen ein Test auf mögliches Suchtverhalten angebracht wäre. Bei PEth-Werten bis zu 600 ng/ml ist von einem gelegentlichen Konsum auszugehen. Der TV über 10 Tage hinweg symbolisiert unseres Erachtens keinen gelegentlichen Konsum mehr, allerdings galt es extreme Werte für einen solchen zu ermitteln. Zudem ergaben die Auswertungen der Trinkversuche, dass es ein hohes Maß an interindividuellen Schwankungen hinsichtlich der gebildeten PEth-Konzentrationen gab. Weiterhin könnte eine Messung der Enzymaktivität der PLD Aufschluss über die Bildungsgeschwindigkeit geben. In einem Pilotprojekt trank ein Proband über vier Wochen dreimal pro Woche auf ca. ein Promille, mit dem Ergebnis, dass 400 ng/ml PEth 16:0/18:1 nicht überschritten wurden. Dies zeigt, dass zum Erreichen höherer PEth-Konzentrationen engere Trinkabstände oder eine höhere Alkoholisierung notwendig sind. Das Homolog 16:0/18:1 eignete sich hierbei besonders zur Quantifizierung, zum einen handelt es sich um eines der am häufigsten vorkommenden PEth-Homologe, zum anderen ist es eines der wenigen kommerziell erhältlichen.

5. Literatur

- [1] Statistisches Bundesamt Wiesbaden. Unfallentwicklung auf deutschen Straßen 2010 2011;26.
- [2] Statistisches Bundesamt Wiesbaden. Unfallentwicklung auf deutschen Straßen 2010 2011;27.
- [3] Lands WE. A review of alcohol clearance in humans. *Alcohol* 1998;15:147–60.
- [4] Halter CC, Dresen S, Auwärter V, Wurst FM, Weinmann W. Kinetics in serum and urinary excretion of ethyl sulfate and ethyl glucuronide after medium dose ethanol intake. *Int J Legal Med* 2008;122:123–8.
- [5] Hannuksela ML, Liisanantti MK, Nissinen AET, Savolainen MJ. Biochemical markers of alcoholism. *Clin Chem Lab Med* 2007;45:953–61.
- [6] Helander A. Biological markers in alcoholism. *J Neural Transm Suppl* 2003;66:15–32.
- [7] Golka K, Wiese A. Carbohydrate-deficient transferrin (CDT)—a biomarker for long-term alcohol consumption. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2004;7:319–37.
- [8] Singer MV, Teysen S. *Alkohol und Alkoholfolgekrankheiten*. Springer Medizin Verlag Heidelberg 2005;569ff.
- [9] Gustavsson L, Alling C. Formation of phosphatidylethanol in rat brain by phospholipase D. *Biochem Biophys Res Commun* 1987;142:958–63.
- [10] Kobayashi M, Kanfer JN. Phosphatidylethanol formation via transphosphatidylolation by rat brain synaptosomal phospholipase D. *J Neurochem* 1987;48:1597–603.
- [11] Chalifa-Caspi V, Eli Y, Liscovitch M. Kinetic analysis in mixed micelles of partially purified rat brain phospholipase D activity and its activation by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Neurochem Res* 1998;23:589–99.
- [12] Seidler L, Kaszkin M, Kinzel V. Primary alcohols and phosphatidylcholine metabolism in rat brain synaptosomal membranes via phospholipase D. *Pharmacol Toxicol* 1996;78:249–53.
- [13] Alling C, Gustavsson L, Månsson JE, Benthin G, Anggård E. Phosphatidylethanol formation in rat organs after ethanol treatment. *Biochim Biophys Acta* 1984;793:119–22.
- [14] Aradottir S, Olsson BL. Methodological modifications on quantification of phosphatidylethanol in blood from humans abusing alcohol, using high-performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection. *BMC Biochem* 2005;6:18.

- [15] 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;705:243–9.
- [16] Tolonen A, Lehto TM, Hannuksela ML, Savolainen MJ. A method for determination of phosphatidylethanol from high density lipoproteins by reversed phase HPLC with TOF-MS detection. *Anal Biochem* 2005;341:83–8.
- [17] Varga A, Nilsson S. Nonaqueous capillary electrophoresis for analysis of the ethanol consumption biomarker phosphatidylethanol. *Electrophoresis* 2008;29:1667–71.
- [18] Hahn JA, Dobkin LM, Mayanja B, Emenyonu NI, Kigozi IM, Shiboski S, Bangsberg DR, Gnann H, Weinmann W, Wurst FM. Phosphatidylethanol (PEth) as a biomarker of alcohol consumption in HIV-Positive patients in sub-Saharan Africa. *Alcohol Clin Exp Res* 2012;36:854-62.
- [19] Faller A, Richter B, Kluge M, Koenig P, Seitz HK, Thierauf A, Gnann H, Winkler M, Mattern R, Skopp G. LC-MS/MS analysis of phosphatidylethanol in dried blood spots versus conventional blood specimens. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2011;401:1163-6.
- [20] Gnann H, Weinmann W, Engelmann C, Wurst FM, Skopp G, Winkler M, Thierauf A, Auwärter V, Dresen S, Ferreirós Bouzas N. Selective detection of phosphatidylethanol homologues in blood as biomarkers for alcohol consumption by LC-ESI-MS/MS. *Journal of Mass Spectrometry* 2009;44:1293-9.
- [21] Aradóttir S, Seidl S, Wurst FM, Jönsson BAG, Alling C. Phosphatidylethanol in human organs and blood: a study on autopsy material and influences by storage conditions. *Alcohol Clin Exp Res* 2004;28:1718–23.
- [22] Ruelland E, Cantrel C, Gawer M, Kader J-C, Zachowski A. Activation of phospholipases C and D is an early response to a cold exposure in Arabidopsis suspension cells. *Plant Physiol* 2002;130:999–1007.
- [23] Welti R, Li W, Li M, Sang Y, Biesiada H, Zhou H-E, Rajashekar CB, Williams TD, Wang X. Profiling membrane lipids in plant stress responses. Role of phospholipase D alpha in freezing-induced lipid changes in Arabidopsis. *J Biol Chem* 2002;277:1994–2002.
- [24] Varga A, Hansson P, Johnson G, Alling C. Normalization rate and cellular localization of phosphatidylethanol in whole blood from chronic alcoholics. *Clin Chim Acta* 2000;299:141–50.
- [25] Helander A, Zheng Y. Molecular species of the alcohol biomarker phosphatidylethanol in human blood measured by LC-MS. *Clin Chem* 2009;55:1395–405.
- [26] Marques P, Hansson T, Isaksson A, Walther L, Jones J, Lewis D, Jones M. Detection of phosphatidylethanol (PEth) in the blood of drivers in an alcohol ignition interlock program. *Traffic Inj Prev* 2011;12:136–41.
- [27] Gnann H, Engelmann C, Skopp G, Winkler M, Auwärter V, Dresen S, Ferreirós N, Wurst FM, Weinmann W. Identification of 48 homologues of phosphatidylethanol in blood by LC-ESI-MS/MS. *Anal Bioanal Chem* 2010;396:2415-23.
- [28] Zheng Y, Beck O, Helander A. Method development for routine liquid chromatography-mass spectrometry measurement of the alcohol biomarker phosphatidylethanol (PEth) in blood. *Clin Chim Acta* 2011;412:1428–35.
- [29] Isaksson A, Walther L, Hansson T, Andersson A, Alling C. Phosphatidylethanol in blood (B-PEth): a marker for alcohol use and abuse. *Drug Test Anal* 2011;3:195–200.
- [30] Gnann H, Weinmann W, Thierauf A. Formation of phosphatidylethanol and its subsequent elimination during an extensive drinking experiment over five days. *Alcohol Clin Exp Res* 2012;36:1507-11.