

Zusammenfassung der Dissertation als Dank an die GTFCh für die Gewährung eines Stipendiums zur Präsentation eines wissenschaftlichen Vortrags oder Posters beim TIAFT-SOFT Kongress in San Francisco 2011

Untersuchungen zu den Alkoholmarkern Ethylglucuronid und Ethylsulfat sowie zu Fettsäureethylestern in unterschiedlichen Matrices

Maria Elena Albermann

Universitätsklinikum Bonn, Institut für Rechtsmedizin, Forensische Toxikologie, Stiftsplatz 12, D-53111 Bonn

1. Einleitung

Bei verschiedensten Fragestellungen besteht der Bedarf, Alkoholkonsumgewohnheiten bzw. eine Alkoholabstinenz analytisch zu überprüfen. Eine Reihe von Veröffentlichungen beschreibt und vergleicht die verschiedenen Marker für unterschiedliche Einsatzgebiete [1-6]. Für eine retrospektive Einschätzung des Alkoholkonsums über einen Zeitraum von mehreren Tagen bis Monaten ist unter anderem eine Quantifizierung der direkten Alkoholmarker Ethylglucuronid (EtG), Ethylsulfat (EtS) [7-12] oder ausgewählter Fettsäureethylester (FAEE) [12-16] in Haaren sowie in verschiedenen Körperflüssigkeiten geeignet.

EtG und EtS sind schwerflüchtige, wasserlösliche Phase-II-Metaboliten von Ethanol, die durch eine katalysierte Konjugation des Alkohols mit UDP-Glucuronsäure [17] bzw. mit aktiviertem Sulfat [18, 19] gebildet werden. Verschiedene analytische Methoden zur Detektion und Quantifizierung von EtG und EtS in Urin, Serum oder Haaren wurden bisher veröffentlicht. Eine tabellarische Auflistung bisheriger Methoden ist in [20] bzw. in [21] zu finden. In die *Beurteilungskriterien [zur] Urteilsbildung in der Medizinisch-Psychologischen Fahreignungsdiagnostik* [22] wurde 0,1 mg/L als Grenzwert für EtG in Urin und 7 pg/mg für Haare aufgenommen. Von der Society of Hair Testing (SoHT) wurden Grenzwerte von 7 pg/mg für den Ausschluss einer Abstinenz [23] und 30 pg/mg für den Nachweis eines starken, chronischen Konsums [24, 25] empfohlen.

FAEE sind ebenfalls nach der Aufnahme von Alkohol in Haaren und verschiedenen Körperflüssigkeiten, wie z. B. Blut [26-30] oder Mekonium [31-34], gefunden worden. Pragst et al. [14, 15, 35] entwickelten eine Dampfraum-Festphasenmikroextraktions-Methode (HS-SPME) gekoppelt mit einer gaschromatographisch-massenspektrometrischen Analyse (GC-MS) zur Quantifizierung von FAEE in Haaren und konnten damit nachweisen, dass die eingelagerten Mengen der vier FAEE, Ethylmyristat, Ethylpalmitat, Ethyloleat und Ethylstearat proportional zur konsumierten Alkoholmenge sind. Für den Nachweis in Haaren wurden von der SoHT Grenzwerte für die Summenkonzentration aus den vier genannten FAEE sowohl für den Nachweis eines starken chronischen Konsums (0,5 ng/mg) [24, 25] als auch für den Ausschluss einer Abstinenz (0,2 ng/mg) postuliert [23]. Da erhöhte FAEE-Konzentrationen auch in den Haaren von strikt abstinenten Personen gefunden wurden, ist der Gebrauch als Abstinenzmarker umstritten [16, 36-40].

Im Rahmen der Promotion wurden Methoden für die Quantifizierung von EtG und EtS in Urin sowie von EtG bzw. FAEE in Haaren mit besonderem Schwerpunkt auf den unteren Konzentrationsbereich optimiert und nach den Richtlinien der Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie (GTFCh) validiert [41, 42]. Neben routinemäßig durchgeführten Analysen zur Fahreignungsbegutachtung wurden verschiedene Studien zum

Nachweis von EtG und EtS in Urin nach der Aufnahme geringer Alkoholmengen in Form von Wein und Bier bzw. alkoholhaltiger Lebensmittel sowie zum Vergleich der EtG- und FAEE-Konzentrationen in Haaren aus Abstinenzuntersuchungen sowie von Patienten aus dem Alkoholzug durchgeführt.

2. Ergebnisse und Diskussion

2.1 EtG bzw. FAEE in Haaren

Ein empfindliches Flüssigchromatographie-Verfahren mit Tandem-Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS/MS) mit einer Bestimmungsgrenze (4 pg/mg) weit unterhalb des aktuellen Grenzwertes für Abstinenzuntersuchungen (7 pg/mg) wurde erfolgreich optimiert und nach den Richtlinien der GTFCh validiert (siehe [21]). Eine erneute Optimierung der Methode - erforderlich aufgrund eines vermehrten Auftretens von Störsignalen - wurde mit der Entwicklung eines automatisierten Mahlverfahrens für die Haare verknüpft (siehe [43]). Bei der Validierung konnten sehr niedrige Nachweis- und Bestimmungsgrenzen (1,7 pg/mg bzw. 2,3 pg/mg) sowie gute Ergebnisse für die Präzision, die Genauigkeit und die Matrixeffekte mit Abweichungen von $\leq 5\%$ erzielt werden. LC-MS/MS-Chromatogramme von aufgestockten Haarproben in Höhe des Grenzwertes (7 pg/mg), analysiert mit beiden Methoden, sind in Abbildung 1 zu finden. Erstmals durchgeführte, vergleichende Analysen von Haarproben im gemahlenen oder geschnittenen Zustand konnten zudem zeigen, dass ein Mahlen der Haare zu signifikant höheren EtG-Konzentrationen mit einem durchschnittlichen Anstieg von 51% führte (siehe [43]). Die großen Variationen der Abweichungen (-5 – +181%) sind wahrscheinlich auf die Inhomogenität der Matrix zurückzuführen und verdeutlichen die Schwierigkeiten von Haaranalysen.

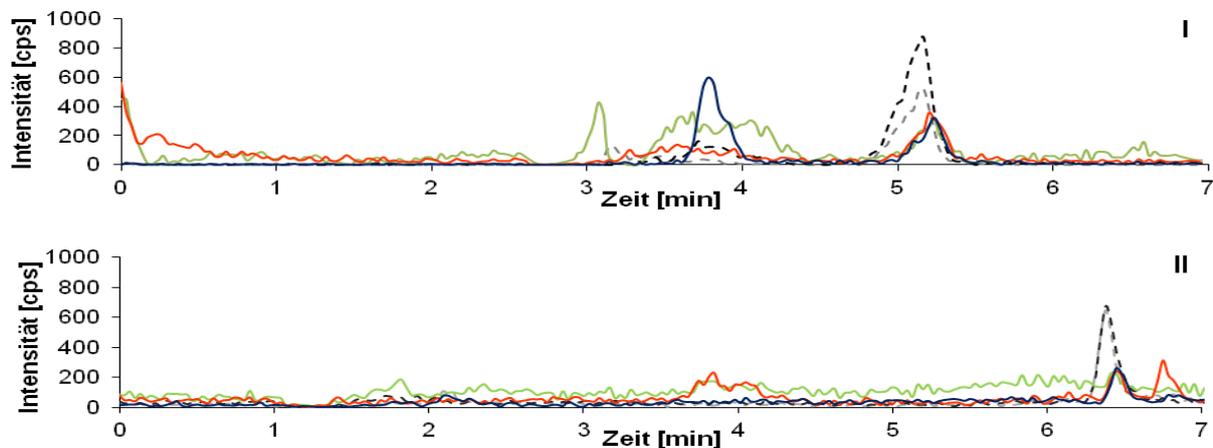


Abb. 1. LC-MS/MS-Chromatogramme von Leerhaaren aufgestockt mit EtG (7 pg/mg) analysiert mit der ursprünglichen Methode I sowie mit dem optimierten Verfahren II unter Einsatz des automatisierten Malverfahrens.

Die Bestimmung eines zweiten, unabhängigen Parameters mit konträren Eigenschaften in Bezug auf EtG kann eine deutliche Erhöhung der diagnostischen Genauigkeit eines Befundes ermöglichen. Hierzu wurde ein Verfahren zum Nachweis der vier FAEE: Ethylmyristat, Ethylpalmitat, Ethyloleat und Ethylstearat in Haaren mittels HS-SPME und GC-MS in Anlehnung an die Methode von Pragst et al. [15], mit besonderem Augenmerk auf den unteren Konzentrationsbereich, optimiert und validiert. Es konnten niedrige Nachweisgrenzen (0,016 – 0,025 ng/mg) sowie gute Resultate für die Präzision und Genauigkeit mit Abweichungen $\leq 11\%$ erreicht werden. Chromatogramme von Kinderhaaren sowie von einer positiven Realprobe sind in Abbildung 2 dargestellt.

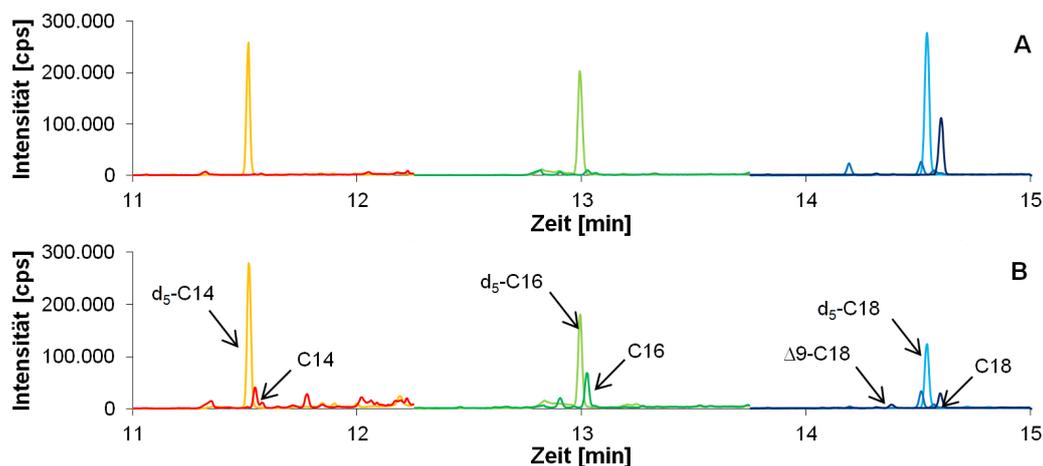


Abb. 2. GC-MS-Chromatogramme von Kinderharen **A** sowie von einer Realprobe **B** mit einer FAEE-Summenkonzentration (Ethylmyristat (C14), Ethylpalmitat (C16), Ethyloleat (D9-C18) und (Ethylstearat C18)) von 0,26 ng/mg.

Im Rahmen einer Studie wurden daraufhin die EtG- und FAEE-Konzentrationen von 160 zufällig ausgewählten Haarproben (proximale 3 cm) aus Abstinenzuntersuchungen verglichen (siehe [44]). Unter Berücksichtigung der von der SoHT empfohlenen Grenzwerte [23] (FAEE: 0,2 ng/mg, EtG: 7 pg/mg) wurden übereinstimmende Einteilungen in 77,5% der Fälle gefunden. In 16,9% der Fälle deuteten die FAEE-Konzentrationen auf einen höheren Alkoholkonsum hin, in 5,6% die bestimmten EtG-Konzentrationen. Die größere Zahl an FAEE positiven Fällen ist wahrscheinlich auf die Möglichkeit der externen Kontamination zurückzuführen. Bei einer zusätzlichen Analyse von 73 Haarproben mit EtG-Konzentrationen im grenzwertigen Bereich zwischen 4 und 10 pg/mg konnte eine ähnlich gute Übereinstimmung der EtG- und FAEE-Ergebnisse von 72,6% erzielt werden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass EtG der verlässlichere Marker zu sein scheint. Eine Bestimmung der FAEE-Konzentration zur Absicherung ist jedoch auch bei Abstinenzuntersuchungen möglich. Eine lineare Abhängigkeit zwischen den EtG- und FAEE-Konzentrationen bestand nicht.

In einer weiteren Studie wurden die EtG- und FAEE-Konzentrationen in 247 Haarsegmenten von 73 Patienten im Alkoholentzug mit deren Selbstauskünften verglichen. Übereinstimmende Ergebnisse von allen drei Parametern wurden in 43,9% der untersuchten Segmente gefunden. In 81,3% der Fälle spiegelte mindestens einer der beiden Biomarker (EtG: 64,9%, FAEE: 59,3%) die Angaben zum Alkoholkonsum richtig wider. Die beste Übereinstimmung (76,7%) wurde für EtG bei einer Beschränkung auf das proximale Segment gefunden. Ein Nachweis von EtG im proximalen Haarsegment scheint daher am besten für den Ausschluss einer Abstinenz geeignet zu sein. Eine direkte Korrelation zu den angegebenen Trinkmengen wurde weder für EtG noch für die FAEE gefunden. Mögliche Gründe hierfür sind, neben den unterschiedlichen Eigenschaften beider Marker, die großen Unsicherheiten bei subjektiven Angaben der Patienten zum eigenen Trinkverhalten.

2.2 EtG und EtS in Urin

Eine schnelle und einfache LC-MS/MS-Methode zum Nachweis von EtG und EtS in Urin mit sehr niedrigen Bestimmungsgrenzen von 0,019 mg/L bzw. 0,015 mg/L wurde ebenfalls erfolgreich optimiert und validiert (für Details siehe [20]). Eine hohe Sensitivität war hierbei entscheidend, da bei Urinen mit sehr niedrigen Kreatininkonzentrationen im Bereich von 20 mg/dL eine Normierung auf 100 mg/dL selbst bei EtG-Konzentrationen $\leq 0,02$ mg/L zu einer Überschreitung des Grenzwertes (0,1 mg/L) führen kann. Durch eine Analyse von 171

Urinproben mit bekannten EtG-Konzentrationen konnte zudem gezeigt werden, dass der zur Verfügung stehende klinisch-chemische Analyzer für eine semiquantitative Bestimmung von EtG in Urin geeignet war. Mit einem Grenzwert von 0,08 mg/L konnten falsch negative Ergebnisse fast ausgeschlossen werden (Sensitivität: 98,6%). Die zufriedenstellende Spezifität von 90% ermöglicht eine deutliche Verringerung der zeit- und kostenintensiven Bestätigungsanalysen mittels LC-MS/MS.

Der in die zweite Auflage der *Beurteilungskriterien* [zur] *Urteilsbildung in der Medizinisch-Psychologischen Fahreignungsdiagnostik* [22] aufgenommene Grenzwert für EtG in Urin von 0,1 mg/L wird unter anderem aufgrund der widersprüchlichen Ergebnisse von Studien zum Risiko von falsch positiven Ergebnissen durch den Konsum oder Gebrauch von alkoholhaltigen Lebensmitteln und Hygieneprodukten [45-50] fortwährend diskutiert. Durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten kontrollierten Trink- und Essversuche mit alkoholhaltigen Lebensmitteln konnte jedoch deutlich gemacht werden, dass ein Nachweis von EtG und EtS höchstens nach einem übermäßigen Konsum der getesteten Produkte (Apfelsaft, Traubensaft, Weinsauerkraut, überreife Bananen und alkoholfreies Bier) und nur über einen sehr begrenzten Zeitraum möglich ist (siehe [51]). Eine Überschreitung des Grenzwertes von 0,1 mg/L wurde nach der Aufnahme der größten Alkoholmenge in Form von 2 – 3 L alkoholfreiem Bier (7,1 – 10,7 g Alkohol) für maximal 13,0 h beobachtet (siehe Abbildung 3). Kein EtG konnte nach dem Konsum von 1 – 2 L Apfelsaft (0,3 – 0,6 g Alkohol) bzw. 1,5 – 2 L Traubensaft (0,9 – 2,5 g Alkohol) im Urin gefunden werden. Eine Normierung der gemessenen EtG-/EtS-Konzentrationen auf eine Kreatininkonzentration von 100 mg/dL (EtG100 bzw. EtS100) ergab zwar deutlich glattere Konzentrationskurven und konformere Ergebnisse für die unterschiedlichen Teilnehmer, hatte jedoch keine entscheidenden Auswirkungen auf die maximalen Nachweisfenster. Große Unterschiede wurden hingegen zwischen dem Konsum von 2 – 3 L alkoholfreiem bzw. 0,33 L Bier gefunden, obwohl etwa die gleiche Menge Alkohol aufgenommen wurde. Dies deutet darauf hin, dass die Art des konsumierten Alkohols und die damit verbundene aufgenommene Flüssigkeitsmenge einen großen Einfluss sowohl auf die gemessenen Konzentrationen als auch auf die bestimmten Nachweisfenster haben.

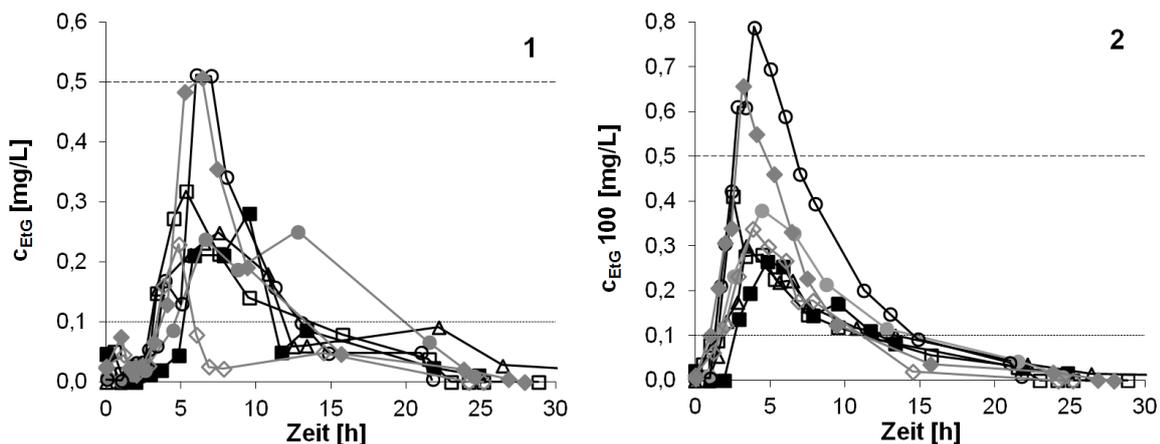


Abb. 3. Zeitlicher Verlauf der gemessenen **1** sowie mit der Kreatininkonzentration normierten **2** EtG-Konzentrationen in Urin nach dem Konsum von 2 – 3 L alkoholfreiem Bier.

Ein weiterer ausgeführter Trinkversuch mit geringen aber im Alltag vorkommenden Mengen Alkohol konnte zudem zeigen, dass selbst ein Grenzwert von 0,1 mg/L in Kombination mit einer Einbestellungsfrist von 24 h nicht zum Nachweis einer strikten Abstinenz geeignet ist, sondern nur zum Ausschluss dieser (siehe [52]). Nach einer Aufnahme von 8,2 g (0,1 L Wein) bzw. 11,2 g (0,33 L Bier) Alkohol konnte EtG für maximal 22,0 h (EtG100: 23,5 h) bzw.

23,5 h (EtG100: 23,5 h) nachgewiesen werden (siehe Abbildung 4). Eine Absenkung des Grenzwertes oder eine Verkürzung der Einbestellungsfrist zur Verbesserung der Sensitivität wären jedoch nicht praktikabel.

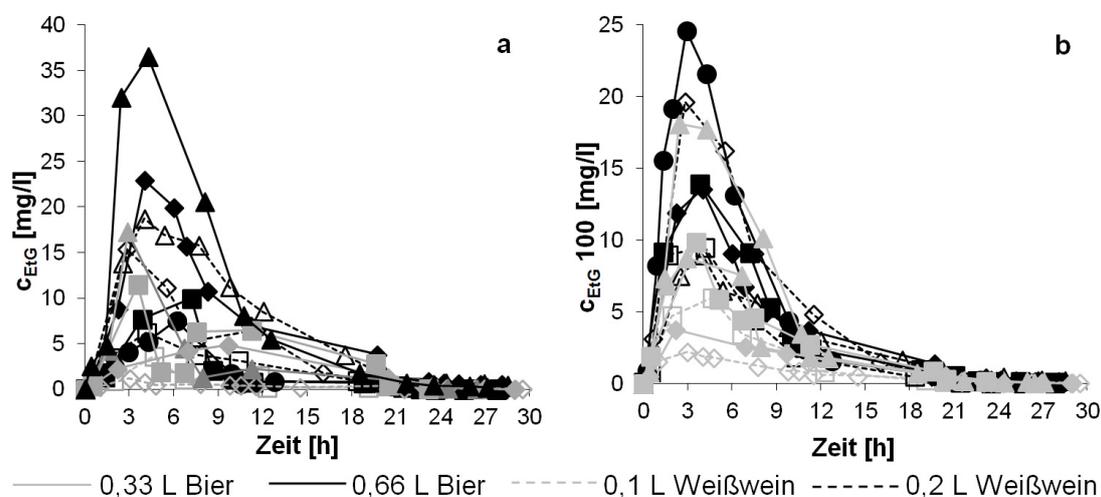


Abb. 4. Verlauf der gemessenen **a** und Kreatinin normierten **b** EtG-Konzentrationen in Urin nach Konsum geringer Mengen Alkohol in Form von Bier oder Wein.

Für EtS, das im Gegensatz zu EtG nur bei einer sehr hohen Belastung durch Bakterien im Urin gebildet oder abgebaut wird [53-55], wurde ein möglicher Grenzwert von 0,05 mg/L ermittelt. Dieser Wert steht in Übereinstimmung mit dem gefundenen molaren Verhältnis von EtG und EtS (Median 2,3) und wurde nach dem Konsum von 16,4 bzw. 23,1 g Alkohol in Form von Wein (0,1 L) oder Bier (0,66 L) für 21 – >28 h überschritten. Durch die Wahl des Grenzwertes, der falsch positive Befunde unwahrscheinlich werden lässt, ist ein Beweis von strikter Abstinenz jedoch ebenfalls nicht möglich. Dieser vorläufige Wert muss durch weitere, größere Studien statistisch bestätigt werden. Zudem muss beachtet werden, dass EtS auch nach dem Konsum von EtS-haltigen Lebensmitteln, z. B. Traubensaft, im Urin zu finden ist.

3. Fazit

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen konnten weitere wichtige Erkenntnisse auf dem Gebiet der direkten Alkoholmarker EtG, EtS und FAEE liefern. Die durchgeführte vergleichende Studie zur Analyse von geschnittenen bzw. gemahlten Haaren ergab, dass die Art der Haarzerkleinerung einen signifikanten Einfluss auf die bestimmten EtG-Konzentrationen hat und somit der Einsatz von methodenabhängigen Grenzwerten oder die Einführung einer standardisierten Methode erforderlich zu sein scheint. Aus den vergleichende Bestimmungen der EtG- und FAEE-Konzentrationen in Haaren aus Fällen zur Fahrignungsbeurteilung resultierten übereinstimmende Beurteilungen in knapp drei Viertel der Fälle und deutliche Hinweise dafür, dass EtG, aufgrund der geringeren Wahrscheinlichkeit für falsch positive Proben, den besser geeigneten Marker für Abstinenzuntersuchungen darstellt. Eine FAEE-Bestimmung zur Absicherung von unklaren Befunden, ist zu empfehlen. Der Vergleich von EtG- und FAEE-Konzentrationen in Haaren von Patienten während eines stationären Entzugs mit deren Angaben zum Alkoholkonsum ergab eine maximale Übereinstimmung (76,6%) für EtG im proximalen Segment. Angesichts des Vergleiches mit subjektiven und retrospektiv erfassten Trinkangaben ist dies ein zufriedenstellendes Resultat.

Die Ergebnisse der Trinkversuche veranschaulichten zum einen, dass ein Urin-Grenzwert von 0,1 mg/L in Kombination mit einer Einbestellungsfrist von 24 h nicht zum Beweis, sondern

nur zum Ausschluss einer Abstinenz geeignet ist. Zum Anderen konnten sie zeigen, dass falsch positive Urin-Befunde auf Grund eines Konsums von alkoholhaltigen Lebensmitteln sehr unwahrscheinlich sind. Dass jedoch kurzzeitig sogar EtG-Konzentrationen > 0,5 mg/L gemessen wurden, verdeutlicht die Relevanz einer ausführlichen Aufklärung der Teilnehmer von Abstinenzprogrammen. Zudem indiziert die starke Abhängigkeit der ermittelten Nachweisfenster von der Art des konsumierten Alkohols, dass aufwändige Trink- und Essversuche mit großen Mengen alkoholhaltiger Lebensmittel nicht gänzlich durch die Aufnahme einer entsprechenden Menge Alkohol in Form von Spirituosen simuliert werden können.

4. Literatur

- [1] Musshoff F. Chromatographic methods for the determination of markers of chronic and acute alcohol consumption. *J Chromatogr B* 2002;781(1-2):457–480.
- [2] Peterson K. Biomarkers for alcohol use and abuse—a summary. *Alcohol Res Health* 2004;28(1):30–37.
- [3] Wurst FM, Alling C, Aradottir S, Pragst F, Allen JP, Weinmann W, Marmillot P, Ghosh P, Lakshman R, Skipper GE, Neumann T, Spies C, Javors M, Johnson BA, Ait-Daoud N, Akhtar F, Roache JD, Litten R. Emerging biomarkers: new directions and clinical applications. *Alcohol Clin Exp Res* 2005;29(3):465–473.
- [4] Hannuksela ML, Liisanantti MK, Nissinen AET, Savolainen MJ. Biochemical markers of alcoholism. *Clin Chem Lab Med* 2007;45(8):953–961.
- [5] Arndt T. Biomarker des Alkoholkonsums. *Toxichem Krimtech* 2011;78:419–430.
- [6] Thierauf A, Perdekamp MG, Weinmann W, Auwärter V. Alkoholkonsummarker. *Rechtsmedizin* 2011;21:69–79.
- [7] Wurst FM, Kempter C, Seidl S, Alt A. Ethyl glucuronide—a marker of alcohol consumption and a relapse marker with clinical and forensic implications. *Alcohol Alcohol* 1999;34(1):71–77.
- [8] Wurst FM, Skipper GE, Weinmann W. Ethyl glucuronide – the direct ethanol metabolite on the threshold from science to routine use. *Addiction* 2003;98 Suppl 2:51–61.
- [9] Seidl S, Wurst FM, Alt A. Ethyl glucuronide—a biological marker for recent alcohol consumption. *Addict Biol* 2001;6(3):205–212.
- [10] Politi L, Leone F, Morini L, Poletini A. Bioanalytical procedures for determination of conjugates or fatty acid esters of ethanol as markers of ethanol consumption: a review. *Anal Biochem* 2007;368(1):1–16.
- [11] Palmer RB. A review of the use of ethyl glucuronide as a marker for ethanol consumption in forensic and clinical medicine. *Semin Diagn Pathol* 2009;26(1):18–27.
- [12] Pragst F, Yegles M. Determination of fatty acid ethyl esters (FAEE) and ethyl glucuronide (EtG) in hair: a promising way for retrospective detection of alcohol abuse during pregnancy? *Ther Drug Monit* 2008;30(2):255–263.
- [13] Pragst F, Auwärter V, Kiessling B, Dyes C. Wipe-test and patch-test for alcohol misuse based on the concentration ratio of fatty acid ethyl esters and squalene cFAEE/cSQ in skin surface lipids. *Forensic Sci Int* 2004;143(2-3):77–86.
- [14] Pragst F, Spiegel K, Sporkert F, Bohnenkamp M. Are there possibilities for the detection of chronically elevated alcohol consumption by hair analysis? A report about the state of investigation. *Forensic Sci Int* 2000;107(1-3):201–223.
- [15] Pragst F, Auwärter V, Sporkert F, Spiegel K. 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* 2001;121(1-2):76–88.
- [16] Auwärter V, Sporkert F, Hartwig S, Pragst F, Vater H, Diefenbacher A. Fatty acid ethyl esters in hair as markers of alcohol consumption. Segmental hair analysis of alcoholics, social drinkers, and teetotalers. *Clin Chem* 2001;47(12):2114–2123.
- [17] Foti RS, Fisher MB. Assessment of UDP-glucuronosyltransferase catalyzed formation of ethyl glucuronide in human liver microsomes and recombinant UGTs. *Forensic Sci Int* 2005;153(2-3):109–116.
- [18] Raftogianis RB, Wood TC, Weinshilboum RM. Human phenol sulfotransferases SULT1A2 and SULT1A1: genetic polymorphisms, allozyme properties, and human liver genotype-phenotype correlations. *Biochem Pharmacol* 1999;58(4):605–616.
- [19] Schneider H, Glatt H. Sulpho-conjugation of ethanol in humans in vivo and by individual sulphotransferase forms in vitro. *Biochem J* 2004;383(Pt. 3):543–549.
- [20] Albermann ME, Musshoff F, Madea B. A high-performance liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method for the determination of ethyl glucuronide and ethyl sulfate in urine validated according to forensic guidelines. *J Chromatogr Sci* 2012;50(1):51–56.
- [21] Albermann ME, Musshoff F, Madea B. A fully validated high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of ethyl glucuronide in hair for the proof of strict alcohol abstinence. *Anal Bioanal Chem* 2010;396(7):2441–2447.

- [22] Schubert W, Mattern R (Hrsg.). Beurteilungskriterien: Urteilsbildung in der Medizinisch-Psychologischen Fahreignungsdiagnostik. Kirschbaum Verlag (Bonn, Deutschland) 2008. ISBN-13: 978-3781216785.
- [23] Society of Hair Testing (SoHT). Preliminary proposal for a consensus: Use of alcohol markers in hair for abstinence assessment 2012. http://www.soht.org/pdf/Proposal+for+alcohol+markers+_Rome+and+Sevilla_.pdf. Aufgerufen am: 05.03.2012.
- [24] Kintz P. Consensus of the Society of Hair Testing on hair testing for chronic excessive alcohol consumption 2009. *Forensic Sci Int* 2010;196(1-3):2.
- [25] Kintz P. Consensus of the Society of Hair Testing on hair testing for chronic excessive alcohol consumption 2011. *Forensic Sci Int* 2012;218(1-3):2.
- [26] Doyle KM, Bird DA, al Salihi S, Hallaq Y, Cluette-Brown JE, Goss KA, Laposata M. Fatty acid ethyl esters are present in human serum after ethanol ingestion. *J Lipid Res* 1994;35(3):428–437.
- [27] Doyle KM, Cluette-Brown JE, Dube DM, Bernhardt TG, Morse CR, Laposata M. Fatty acid ethyl esters in the blood as markers for ethanol intake. *JAMA* 1996;276(14):1152–1156.
- [28] Dan L, Laposata M. Ethyl palmitate and ethyl oleate are the predominant fatty acid ethyl esters in the blood after ethanol ingestion and their synthesis is differentially influenced by the extracellular concentrations of their corresponding fatty acids. *Alcohol Clin Exp Res* 1997;21(2):286–292.
- [29] Kulig CC, Beresford TP, Everson GT. Rapid, accurate, and sensitive fatty acid ethyl ester determination by gas chromatography-mass spectrometry. *J Lab Clin Med* 2006;147(3):133–138.
- [30] Borucki K, Dierkes J, Wartberg J, Westphal S, Genz A, Luley C. In heavy drinkers, fatty acid ethyl esters remain elevated for up to 99 hours. *Alcohol Clin Exp Res* 2007;31(3):423–427.
- [31] Chan D, Knie B, Boskovic R, Koren G. Placental handling of fatty acid ethyl esters: perfusion and subcellular studies. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;310(1):75–82.
- [32] Bearer CF, Santiago LM, O’Riordan MA, Buck K, Lee SC, Singer LT. Fatty acid ethyl esters: quantitative biomarkers for maternal alcohol consumption. *J Pediatr* 2005;146(6):824–830.
- [33] Caprara DL, Klein J, Koren G. Diagnosis of fetal alcohol spectrum disorder (FASD): fatty acid ethyl esters and neonatal hair analysis. *Ann Ist Super Sanita* 2006;42(1):39–45.
- [34] Caprara DL, Nash K, Greenbaum R, Rovet J, Koren G. Novel approaches to the diagnosis of fetal alcohol spectrum disorder. *Neurosci Biobehav Rev* 2007;31(2):254–260.
- [35] Auwärter V. Fettsäureethylester als Marker exzessiven Alkoholkonsums - Analytische Bestimmung im Haar und in Hautoberflächenlipiden mittels Headspace-Festphasenmikroextraktion und Gaschromatographie-Massenspektrometrie. Dissertation Humboldt-Universität zu Berlin 2006.
- [36] De Giovanni N, Donadio G, Chiarotti M. The reliability of fatty acid ethyl esters (FAEE) as biological markers for the diagnosis of alcohol abuse. *J Anal Toxicol* 2007;31(2):93–97.
- [37] Zimmermann CM, Jackson GP. Gas chromatography tandem mass spectrometry for biomarkers of alcohol abuse in human hair. *Ther Drug Monit* 2010;32(2):216–223.
- [38] Wurst FM, Alexson S, Wolfersdorf M, Bechtel G, Forster S, Alling C, Aradóttir S, Jachau K, Huber P, Allen JP, Auwärter V, Pragst F. Concentration of fatty acid ethyl esters in hair of alcoholics: comparison to other biological state markers and self reported-ethanol intake. *Alcohol Alcohol* 2004;39(1):33–38.
- [39] De Giovanni N, Donadio G, Chiarotti M. Ethanol contamination leads to fatty acid ethyl esters in hair samples. *J Anal Toxicol* 2008;32(2):156–159.
- [40] Gareri J, Appenzeller B, Walasek P, Koren G. Impact of hair-care products on FAEE hair concentrations in substance abuse monitoring. *Anal Bioanal Chem* 2011;400(1):183–188.
- [41] Peters FT, Hartung M, Herbold M, Schmitt G, Daldrup T, Mußhoff F. Anhang B zur Richtlinie der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen: Anforderungen an die Validierung von Analysemethoden. *Toxichem Krimtech* 2009;76(3):185–208.
- [42] Musshoff F, Skopp G, Pragst F, Sachs H, Thieme D, Paul LD, des AK Qualitätssicherung M. Anhang C zur Richtlinie der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen: Anforderungen an die Untersuchung von Haarproben. *Toxichem Krimtech* 2009;76(3):209–216.
- [43] Albermann ME, Musshoff F, Aengenheister L, Madea B. Investigations on the influence of different grinding procedures on measured ethyl glucuronide concentrations in hair determined with an optimized and validated LC-MS/MS method. *Anal Bioanal Chem* 2012;403(3):769–776.
- [44] Albermann ME, Musshoff F, Madea B. Comparison of ethyl glucuronide (EtG) and fatty acid ethyl esters (FAEEs) concentrations in hair for testing abstinence. *Anal Bioanal Chem* 2011;400(1):175–181.
- [45] Stephanson N, Dahl H, Helander A, Beck O. Direct quantification of ethyl glucuronide in clinical urine samples by liquid chromatography-mass spectrometry. *Ther Drug Monit* 2002;24(5):645–651.
- [46] Helander A, Beck O. Ethyl sulfate: a metabolite of ethanol in humans and a potential biomarker of acute alcohol intake. *J Anal Toxicol* 2005;29(5):270–274.
- [47] Bicker W, Laemmerhofer M, Keller T, Schuhmacher R, Krska R, Lindner W. Validated method for the determination of the ethanol consumption markers ethyl glucuronide, ethyl phosphate, and ethyl sulfate in human urine by reversed-phase/weak anion exchange liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 2006;78(16):5884–5892.

- [48] Wurst FM, Dresen S, Allen JP, Wiesbeck G, Graf M, Weinmann W. Ethyl sulphate: a direct ethanol metabolite reflecting recent alcohol consumption. *Addiction* 2006;101(2):204–211.
- [49] Wojcik MH, Hawthorne JS. Sensitivity of commercial ethyl glucuronide (ETG) testing in screening for alcohol abstinence. *Alcohol Alcohol* 2007;42(4):317–320.
- [50] Thierauf A, Halter CC, Rana S, Auwaerter V, Wohlfarth A, Wurst FM, Weinmann W. Urine tested positive for ethyl glucuronide after trace amounts of ethanol. *Addiction* 2009;104(12):2007–2012.
- [51] Musshoff F, Albermann E, Madea B. Ethyl glucuronide and ethyl sulfate in urine after consumption of various beverages and foods—misleading results? *Int J Legal Med* 2010;124(6):623–630.
- [52] Albermann ME, Musshoff F, Doberentz E, Heese P, Banger M, Madea B. Preliminary investigations on ethyl glucuronide and ethyl sulfate cutoffs for detecting alcohol consumption on the basis of an ingestion experiment and on data from withdrawal treatment. *Int J Legal Med* 2012;126(5):757–764.
- [53] Helander A, Dahl H. Urinary tract infection: a risk factor for false-negative urinary ethyl glucuronide but not ethyl sulfate in the detection of recent alcohol consumption. *Clin Chem* 2005;51(9):1728–1730.
- [54] Helander A, Olsson I, Dahl H. Postcollection synthesis of ethyl glucuronide by bacteria in urine may cause false identification of alcohol consumption. *Clin Chem* 2007;53(10):1855–1857.
- [55] Baranowski S, Serr A, Thierauf A, Weinmann W, Perdekamp MG, Wurst FM, Halter CC. In vitro study of bacterial degradation of ethyl glucuronide and ethyl sulphate. *Int J Legal Med* 2008;122(5):389–393.