

Wartość diagnostyczna etyloglukuronidu (EtG) jako wskaźnika konsumpcji etanolu

The diagnostic value of ethylglucuronide (EtG) as a marker to evaluate ethanol consumption

Anna Małkowska, Mirosław Szutowski

Warszawski Uniwersytet Medyczny, Katedra i Zakład Toksykologii, Warszawa

Abstract – Ethylglucuronide (EtG) is a minor but direct metabolite of ethanol. Only about 0.02% of the ingested ethanol is metabolized in the liver to produce EtG. In many cases EtG can be the only sensitive and specific marker to indicate and monitor alcohol consumption.

EtG can be detected in body fluids, blood and urine for a long period of time after the complete elimination of ethanol. EtG can be also detected in hair allowing retrospective investigation of chronic alcohol abuse and *post-mortem* in many tissues. Sensitive and specific methods for the analysis of EtG are now available either involving gas chromatography with mass spectrometry (GC/MS) or liquid chromatography (LC/MS, LC/MS/MS). For screening EtG enzyme immunoassay is also available. The usefulness of EtG detection has been repeatedly confirmed in situations where alcohol consumption was tentatively assumed, but not confirmed. To ensure reliable tests one should pay attention to the proper protection of sample material, including storage under low temperature and the addition of preservatives, to avoid a decrease in the level of EtG. Estimation of EtG level in urine should be related to creatinine level. The result of the immunochemicals test should finally be confirm by GC/MS or LC/MS methods to rule out possible mistakes.

Key words: ethylglucuronide, alcohol markers, alcohol monitoring

Streszczenie – Etyloglukuronid (EtG) jest bezpośrednim metabolitem alkoholu etylowego. Powstaje w bardzo niewielkiej ilości (ok. 0,02%) w wątrobie. W wielu przypadkach może on być jedynym czułym i dokładnym markerem wskazującym na spożycie alkoholu.

EtG oznacza się w płynach ustrojowych, we krwi i w moczu nawet wówczas, gdy sam etanol jest już nieobecny. Materiałem do badań mogą być również włosy, w których możemy prześledzić historię nadużywania alkoholu, oraz różne tkanki pobrane *post-mortem*. Do oznaczania EtG wykorzystuje się głównie chromatografię gazową sprzężoną ze spektrometrią mas (GC/MS) lub chromatografię cieczową (LC/MS, LC/MS/MS). W analizie przesiewowej stosowane są też testy immunochemiczne. Przydatność oznaczania stężenia EtG została wielokrotnie potwierdzona w sytuacjach, gdy istniały wątpliwości, czy spożywany był alkohol. Należy zwrócić uwagę na odpowiednie zabezpieczenie materiału do badań, przechowywanie go w niskiej temperaturze, dodanie środków konserwujących, aby nie dochodziło do obniżenia stężenia EtG. Oznaczanie stężenia EtG w moczu powinno być odniesione do stężenia kreatyniny. W celu wyeliminowania ewentualnych błędów, wyniki testów immunochemicznych powinny być potwierdzone przez wyniki analiz przeprowadzonych metodami GC/MS lub LC/MS.

Słowa kluczowe: etyloglukuronid, markery spożycia alkoholu etylowego, monitorowanie spożycia alkoholu

Wstęp

Alkohol jest jednym z najstarszych i najczęściej nadużywanych środków uzależniających, powodujących szereg działań ubocznych. Według raportu Światowej Organizacji Zdrowia w grupie państw uprzemysłowionych alkohol to drugi w kolejności, po tytoniu, czynnik ryzyka utraty zdrowia. Do najważniejszych niekorzystnych skutków nadużywania alkoholu należą: udary mózgu, choroba niedokrwienna serca, nadciśnienie, cukrzyca, rak wątroby, rak jamy ustnej i gardła, rak sutka, przełyku i inne nowotwory, marskość wątroby, padaczka, zatrucia i samookaleczenia, a także wypadki drogowe, utonięcia i zabójstwa (1).

W ramach profilaktyki dotyczącej problemów alkoholowych, wczesnego rozpoznawania i leczenia osób uzależnionych wskazane jest monitorowanie spożycia alkoholu poprzez oznaczanie zarówno samego alkoholu, jak i jego metabolitów oraz innych markerów świadczących o nadużywaniu.

Alkohol etylowy przy małych stężeniach we krwi podlega przede wszystkim biotransformacji, z udziałem dehydrogenazy alkoholowej, do aldehydu octowego. Około 6% dawki ulega utlenieniu przy udziale cytochromu P450 2E1, dawniej określanemu jako MEOS (*Microsomal Ethanol Oxidizing System*). Alkohol spożywany w większych dawkach powoduje indukcję cytochromu P450 i przyspieszenie metabolizmu etanolu. Nawet 50% dawki może być utleniane przez cytochrom P450. Niewielkie ilości alkoholu ulegają biotransformacji z udziałem katalazy. Powstały w wyniku utleniania aldehyd octowy podlega dalszej przemianie do kwasu octowego pod wpływem dehydrogenazy aldehydowej. Kwas octowy przy współudziale koenzymu A podlega dalszym przemianom w cyklu kwasu cytrynowego z wytworzeniem dwutlenku węgla i wody. Ten sposób biotransformacji, czyli proces oksydacyjny dotyczy 90% zresorbowanego alkoholu etylowego. Pozostały alkohol wydalany jest w postaci niezmienionej z wydychanym powietrzem (ok. 7%), przez nerki z moczem (2–3%) i przez skórę z potem (ok. 1%) (2). Bardzo niewielka ilość alkoholu ulega metabolizmowi nieoksydacyjnemu z wytworzeniem metabolitów II fazy biotransformacji: etyloglukuronidu (EtG), siarczanu etylu (EtS), estrów etylowych kwasów tłuszczowych (FAEE) oraz fosfatydyloetanolu (EtP). Obecność związków, które są bezpośrednimi metabolitami etanolu jednoznacznie wskazuje na wcześniejszą konsumpcję i dlatego uznaje się je za markery spożycia alkoholu (3, 4).

Do wykrywania uzależnienia od alkoholu oraz w przewlekłym alkoholizmie dokonuje się pomiarów aktywności enzymów wątrobowych gamma-glutamylotransferazy (GGT), amino transferazy alaninowej i asparaginianowej (ALT i AST) oraz średniej objętości krwinkowej (MCV). Zainteresowaniem cieszą się również biopskaźniki takie jak: stężenie kwasu sjałowego (SA), transferyny z niedoborem kwasu sjałowego (synonimy: transferyny desjałowanej, transferyny ubogowęglowodanowej, ubogoglikozylowanej, CDT), β -heksozaminidazy, monoaminooksydazy płytkowej i indeks kwas sjałowy/apolipoproteina J (5). Markery, które nie są bezpośrednimi metabolitami etanolu mogą być przydatne do oceny nadużywania

alkoholu, istnieje jednak wiele czynników mających wpływ na wartość danego wskaźnika – choroby wątroby i przewodów żółciowych, otyłość, wiek, płeć, pochodzenie etniczne i inne. Dodatkowe ograniczenia zastosowania pośrednich markerów w monitorowaniu abstynencji są uwarunkowane ilością alkoholu i czasem jego spożywania, np. przynajmniej 5 drinków dziennie przez okres co najmniej 2 tygodni dla oznaczenia GGT lub CDT (6). Korzystne wydaje się połączenie markerów nefrotoksyczności (β -heksozaminidazy) i hepatotoksyczności (GGT, ALT, AST) w ocenie i monitoringu przewlekłego alkoholizmu (7).

Markerem przydatnym w analizie *post-mortem* jest oznaczanie stosunku alkoholu 2-(5-hydroksyindolilo-3) etylowego (5-HTLO) do kwasu (5-hydroksyindolilo-3) octowego (HIAA), które powstają w wyniku biotransformacji serotoniny. Stężenie 5-HTLO znacznie wzrasta po wypiciu alkoholu, a jego oznaczenie pozwala odróżnić alkohol wypity przed śmiercią od alkoholu endogennego utworzonego po śmierci (8).

W doborze markera konsumpcji etanolu istotnym elementem jest czas, jaki upłynął od momentu wypicia (rys. 1). Z powodu dosyć szybkiego metabolizmu alkoholu etylowego (szybkość eliminacji – 8 do 9 gramów czystego alkoholu w ciągu godziny), oznaczanie etanolu daje możliwość wykrycia alkoholu we krwi lub w moczu w czasie do 6–10 godzin, w zależności od przyjętej dawki.

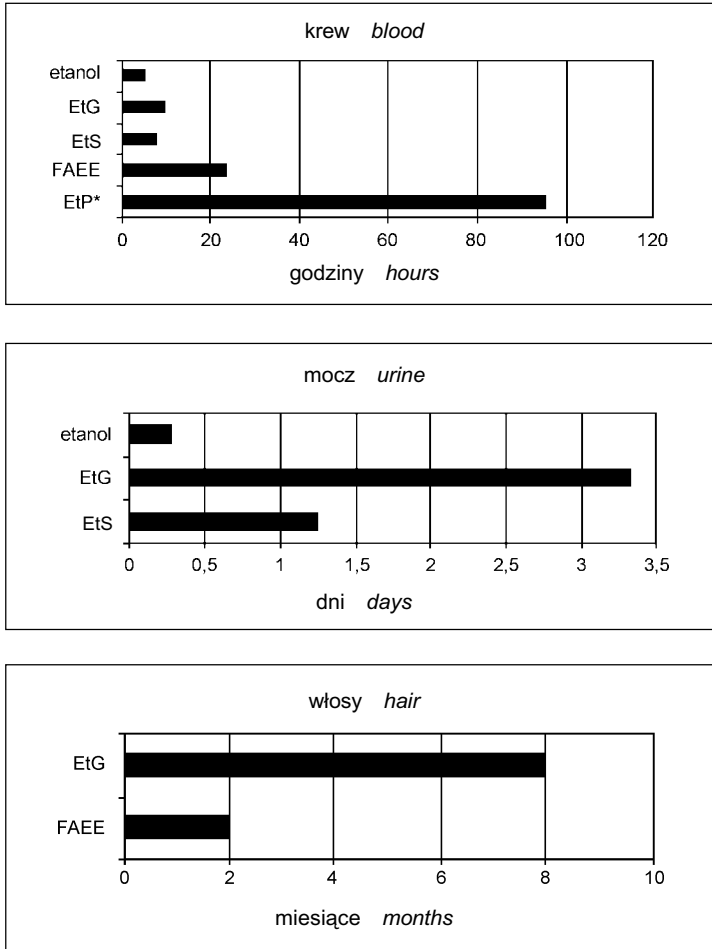
Problem pojawia się, gdy chcemy określić ilość wypitego alkoholu w bardziej odległym czasie, np. kiedy osoba ucieknie z miejsca wypadku lub zostanie popełnione jakieś wykroczenie, którego przyczyną może być alkohol. Bardzo przydatne jest wówczas określenie poziomu EtG w moczu – można go wykryć nawet do 4 dni po wypiciu, a jego obecność jednoznacznie potwierdzi wcześniejsze spożycie alkoholu.

Etyloglukuronid jest nietłym, rozpuszczalnym w wodzie, stabilnym, bezpośrednim metabolitem alkoholu etylowego, który może być oznaczany w różnych płynach ustrojowych, tkankach i we włosach. Powstaje w wyniku reakcji sprzęgania etanolu z aktywnym kwasem glukuronowym z udziałem UDP – glukuronylotransferazy, przede wszystkim w wątrobie (9).

U ludzi tylko ok. 0,02% alkoholu jest metabolizowane do etyloglukuronidu (10). W moczu królików, gdzie EtG był wyizolowany po raz pierwszy w 1952 roku, określono metabolizm na poziomie 0,5–1,6% dawki etanolu (11).

Monitorowanie i diagnostyka EtG w moczu

Pomiar stężenia etyloglukuronidu w moczu umożliwi wiarygodną ocenę spożycia alkoholu w dłuższym okresie. Autorzy różnie podają czas możliwy do oznaczenia etyloglukuronidu w moczu, na ogół 4 dni od momentu całkowitej eliminacji etanolu. U pacjentów, u których stężenie etanolu we krwi wynosiło 1,83‰, EtG był wykrywalny do 80 godzin od momentu wypicia alkoholu (12). Kinetyka wydalania ma związek z ilością wypitego alkoholu. Przy dawce etanolu około 0,1 g/kg masy ciała EtG możemy wykryć tylko do 13–20 godzin (13), w przypadku wypicia większych ilości – do 4 dni (14).



Rys. 1.
Czas wykrywania metabolitów etanolu we krwi, w moczu i we włosach od momentu spożycia alkoholu
Detection time of alcohol metabolites in blood, urine and hair after ethanol consumption

EtG etyloglukuronid – *ethyl glucuronide*

EtS siarczan etylu – *ethyl sulfate*

FAEE estry etylowe kwasów tłuszczowych – *fatty acid ethyl esters*

EtP fosfatydyloetanol – *phosphatidylethanol*

EtP obecny jest we krwi, gdy ilość wypitego alkoholu >50 g dziennie przez okres kilku dni.

EtP can be detected in blood after consumption of ethanol > 50 g per day for a few days.

Oznaczenie pozostałych metabolitów w moczu lub we krwi jest możliwe po jednorazowym spożyciu alkoholu. *Detection of other metabolites is possible after single-use of ethanol.*

Zawartość FAEE we włosach nie zależy od ilości alkoholu.

FAEE in hair is not correlated with alcohol intake.

Zawartość EtG we włosach odzwierciedla ilość wypitego etanolu.

EtG in hair is correlated with alcohol consumption.

Maksymalne stężenie EtG w moczu pojawia się między 4 a 7 godziną po spożyciu (15).

Bardzo ważne jest, aby pomiar był odniesiony do poziomu kreatyniny, ponieważ wypicie dodatkowych szklanek wody powoduje rozcieńczenie moczu i w znacznym stopniu wpływa na stężenie EtG. Można porównać stężenia EtG u różnych osób, przeliczając wartość stężenia EtG na średnią wartość kreatyniny w moczu 100 mg/dl. Rozcieńczenie moczu poniżej 25 mg/dl kreatyniny czyni badaną próbkę nieprzydatną do stwierdzenia abstynencji ze względu na możliwy spadek stężeń EtG poniżej granic detekcji (16).

Oznaczanie EtG odgrywa szczególną rolę w monitorowaniu abstynencji, o czym przekonali się lekarze jednego ze szpitali psychiatrycznych. W przeprowadzonym badaniu brali udział pacjenci, którzy mieli całkowity zakaz spożywania alkoholu z powodu wykroczeń popełnionych pod jego wpływem. Pacjenci byli zwolnieni do domów na przepustkę, a po powrocie zostali poddani badaniu moczu na obecność EtG. Pomimo że wszyscy deklarowali całkowitą abstynencję, to 14 próbek moczu na 146 zawierało EtG. Alkohol był obecny tylko w jednej próbce. W czterech przypadkach oceniono, że konsumpcja wynosiła 40–200 gramów etanolu na 12–60 godzin przed testem. W próbkach krwi EtP nie był obecny, a poziom CDT nie przekraczał wartości referencyjnych (14).

Monitorowanie poziomu EtG w moczu wykorzystano do oceny spożycia alkoholu przez uzależnionych lekarzy. W 100 przypadkach w żadnej z analizowanych próbek moczu nie wykryto alkoholu, ale w 7 uzyskano pozytywny wynik EtG (0,5–196 mg/l), co wskazywało na spożycie alkoholu (17).

Pomiar poziomu etyloglukuronidu okazał się również przydatny w ocenie pacjentów ze zdiagnozowanym alkoholowym uszkodzeniem wątroby, oczekujących na transplantację wątroby, którzy mieli zachowywać całkowitą abstynencję. Pacjenci brali udział w programie odwykowym i byli pytani o spożycie alkoholu, a dodatkowo kontrolowani testem na zawartość alkoholu w wydychanym powietrzu. Żaden z 18 pacjentów nie przyznawał się do spożycia alkoholu i tylko w 1 na 127 testów stwierdzono wynik pozytywny. Po przeprowadzeniu testu na zawartość EtG w moczu u dziewięciu pacjentów stwierdzono pozytywny wynik (w 24 z 49 pobranych próbek). Sześciu z osiemnastu pacjentów nie zgodziło się na badanie moczu na zawartość EtG, można więc przypuszczać, że do przerywania abstynencji dochodziło znacznie częściej. Badanie pokazało małą przydatność pomiarów alkoholu w wydychanym powietrzu i dużą przydatność oznaczania EtG w moczu (18).

Obecność bakterii, np. *Escherichia coli*, powodujących deglukuronidację może wpłynąć na obniżenie EtG w moczu. W 68% próbek moczu zawierających *E.coli* poziom EtG obniżał się od pierwszego dnia, jeśli mocz był przechowywany w temperaturze 22°C. Możemy uniknąć fałszywie negatywnych wyników przez przechowywanie próbek w lodówce w temperaturze 0–4°C lub przez dodawanie środków konserwujących (19).

Przy interpretacji wyników należy jednak brać pod uwagę różne czynniki, takie jak wiek, płeć, zażywanie marihuany, ilość alkoholu wypitą w ostatnim miesiącu,

choroby nerek. Na podstawie analiz badań prowadzonych przez Wursta i wsp. u mężczyzn z chorobami nerek wykazano niższy poziom EtG. W przypadku zażywania marihuany obserwuje się wyższe stężenie EtG, co jest spowodowane wyższą konsumpcją alkoholu w tej grupie osób. Wyższe poziomy EtG obserwowano wraz ze wzrostem wieku, co może wynikać ze zmieniającej się z wiekiem czynności nerek. Natomiast na stężenie EtG nie miała wpływu marskość wątroby (20).

Coraz dokładniejsze techniki dają możliwość oznaczania nawet niewielkich ilości etyloglukuronidu, powstającego po spożyciu alkoholu w dawkach 1 do 2 gramów, które mogą znajdować się w tzw. napojach bezalkoholowych, w preparatach farmaceutycznych zawierających alkohol, w pożywieniu z niewielką ilością alkoholu (np. ciastka, cukierki soki owocowe) (21).

Istnieją również prace mówiące o wykryciu EtG w moczu osób, które używały płynów do płukania gardła zawierających 12% alkoholu (22) lub stosowały płyny do dezynfekcji rąk (60% etanolu) (23). Należy to uwzględnić przy interpretacji wyników.

Monitorowanie i diagnostyka EtG w surowicy

Etyloglukuronid pojawia się w surowicy z opóźnieniem o 45 minut w porównaniu do etanolu. Stężenie maksymalne osiąga po 3,5–5,5 godzinach po spożyciu alkoholu (24). Ustalanie na podstawie stężenia EtG w moczu czasu, w jakim konsumowano alkohol może budzić wątpliwości, ponieważ pije się najczęściej wiele porcji alkoholu, co wydłuża połowiczny czas eliminacji. W przypadku oznaczania EtG w surowicy możemy ten czas określić bardziej precyzyjnie. Poziom EtG w surowicy wzrasta bardzo szybko przez pierwsze 4 godziny konsumpcji alkoholu, następnie osiąga poziom *plateau* podczas kontynuacji picia, potem zaczyna spadać w przybliżeniu do 8 godzin. Po 10 godzinach od eliminacji alkoholu z krwi, tylko niewielka ilość EtG jest wykrywalna w surowicy (15).

W 2002 roku Droenner i wsp. opisali model farmakokinetyki etyloglukuronidu u ludzi. Założyli oni, że tylko jeden układ enzymatyczny, zlokalizowany w jednym istotnym miejscu, jest odpowiedzialny za przekształcanie etanolu do EtG, co ma miejsce w rybosomach reticulum endoplazmatycznego w wątrobie. Tworzenie EtG bezpośrednio zależy od ilości etanolu w surowicy. Opóźnienie pojawienia się EtG w stosunku do etanolu wynika z dystrybucji EtG z rybosomów do kompartmentu centralnego i z faktu, że eliminacja EtG zachodzi zgodnie z kinetyką I-rzędu. Na podstawie opracowanego modelu oznaczenia poziomu EtG we krwi i po uwzględnieniu parametrów kinetycznych, autorzy byli w stanie określić, czy sprawca był pod wpływem alkoholu w momencie wypadku i czy też poziom alkoholu we krwi jest efektem jego spożycia po wypadku, jak deklarował (25).

W próbkach krwi przechowywanych w temperaturze 30/40°C bez środków konserwujących poziom EtG był bardzo niestabilny. Uważa się, że przyczyną braku stabilności są zachodzące procesy gnilne. Aby temu zapobiec można stosować fluorek potasu jako środek konserwujący (26).

Monitorowanie i diagnostyka EtG we włosach

Analiza zawartości EtG we włosach pozwala ocenić konsumpcję alkoholu w dłuższym i bardziej odległym czasie, w porównaniu z analizą w moczu i w surowicy. Pierwsze wzmianki dotyczące obecności EtG we włosach pojawiły się latach 90. (27, 28).

Skopp i wsp. opracowali metodę GC/MS oznaczania EtG we włosach, z granicą oznaczalności 5 ng/mg włosów i granicą wykrywalności na poziomie 2,2 ng/mg (29).

Alt i wsp. opublikowali wyniki oznaczeń EtG w 31 próbkach włosów. Jedna część była pobrana po śmierci od osób z udokumentowaną historią nadużywania alkoholu, druga – od alkoholików hospitalizowanych z zaburzeniami psychicznymi, trzecią część stanowiły włosy pochodzące od osób, które deklarowały spożycie alkoholu na poziomie 20 gramów dziennie, czwarta to grupa kontrolna (włosy pochodzące od dzieci). W dwóch pierwszych grupach zawartość EtG we włosach wynosiła od 119 do 4025 pg/mg. Nie wykryto EtG u osób pijących okazjonalnie do 20 gramów alkoholu dziennie oraz w grupie kontrolnej we włosach pochodzących od dzieci (30).

Zastosowanie kolumnienek SPE na etapie oczyszczania ekstraktów pozwoliło uzyskać granicę detekcji stężenia EtG na poziomie 51 pg/mg włosów przy stosunku sygnału do szumów 3:1, granica oznaczalności wynosiła 102 pg/mg (31). Kolejne lata przynoszą poprawę granic wykrywalności i oznaczalności, 25 pg/mg i 50 pg/mg przy zastosowaniu GC/MS, odpowiedniej ekstrakcji i upochodnienia. Odzysk kształtował się na poziomie 87–98% w zależności od stężenia EtG (32).

W 2004 roku Yegles i wsp. opublikowali pracę o oznaczaniu EtG we włosach metodą GC/MS z granicą wykrywalności i oznaczalności 2 i 4 pg/mg (33).

W badaniu przeprowadzonym na 21 ochotnikach deklarujących codzienne spożycie etanolu na poziomie od 2 do 60 gramów wykazano, że stężenie etyloglukuronidu we włosach odzwierciedla ilość wypitego alkoholu (34).

Kolejne badanie przeprowadzone przez Appenzellera i wsp. potwierdziło istnienie korelacji pomiędzy ilością spożywanego alkoholu a zawartością EtG we włosach. Dodatkowo podzielili oni włosy na segmenty i oceniali stężenia EtG przy założeniu, że włosy rosną z prędkością 1 cm na miesiąc. Daje to możliwość prześledzenia historii konsumpcji alkoholu (35).

Monitorowanie zawartości różnych związków we włosach w sytuacji braku włosów na głowie można przeprowadzić we włosach pobranych z innych partii ciała, należy jednak zwrócić uwagę na fakt, że we włosach łonowych stężenie EtG jest znacznie wyższe niż we włosach pobranych z głowy (36).

Inkorporacja różnych związków do włosów zależy często od ilości zawartej w nich melaniny. Ma to szczególne znaczenie w przypadku związków o charakterze zasadowym, które kumulują się we włosach zawierających dużo melaniny. Związki, które posiadają strukturę lipofilną łatwiej przenikają do włosów. EtG ma bardziej hydrofilową strukturę i trudniej wbudowuje się w strukturę włosa. Kolor włosów nie ma wpływu na zawartość EtG (37).

Analiza *post-mortem*

Możliwość powstawania po śmierci endogennego alkoholu, w wyniku procesów biodegradacyjnych, fermentacji z udziałem bakterii beztlenowych w obecności glukozy, stwarza szereg problemów interpretacyjnych przy określaniu stężenia etanolu w momencie zejścia śmiertelnego. Obok tworzenia alkoholu endogennego we krwi, w przypadku niektórych procesów gnilnych obserwuje się niekiedy zjawisko odwrotne – stopniowe zanikanie alkoholu etylowego powodowane obecnością niektórych bakterii z rodzaju *Acetobacter* (2).

Nawet gdy ilość powstałego alkoholu jest niewielka, prawidłowe rozpoznanie jego pochodzenia może mieć istotne znaczenie w ocenie przyczyn wypadków, kolizji drogowych i innych zdarzeń. Etyloglukuronid jest wówczas wiarygodnym markerem i powinien być brany pod uwagę w sprawach sądowych jako dowód potwierdzający lub wykluczający spożycie alkoholu, ponieważ etyloglukuronid nie powstaje po śmierci, nawet wtedy, gdy pojawia się endogenne alkohol (38). Najwyższe stężenie EtG występuje w moczu, ale nie zawsze mamy pewność, że w momencie popełnienia wykroczenia dana osoba była pod wpływem alkoholu z uwagi na długi możliwy czas obecności metabolitu – do 5 dni. W przypadku analizy *post-mortem* w celu udowodnienia konsumpcji etanolu przed zejściem śmiertelnym bardziej wiarygodnym materiałem będzie krew, mogą być również przydatne: szpik kostny pochodzący z żeber, wątroba (wysokie stężenie EtG), mięśnie i żółć (39) lub włosy (30).

Metody oznaczania EtG

Etyloglukuronid oznaczany jest za pomocą różnych metod chromatograficznych z detekcją spektrometrii mas, głównie GC/MS, LC/MS, LC/MS/MS (tab. 1).

W oznaczeniach przy użyciu chromatografu gazowego GC/MS, jak również LC/MS/MS granice wykrywalności EtG w moczu i surowicy są takie same – 0,1 mg/L. Natomiast granice oznaczalności wynoszą 0,03 mg/L dla GC/MS, a 0,05 mg/L dla LC/MS/MS (40).

Przydatną metodą w oznaczaniu etyloglukuronidu według Weinmanna i wsp. jest zastosowanie tandemowego systemu MS/MS. Zastosowanie LC/MS/MS ma wiele przewag nad GC/MS: krótszy czas analizy, nie ma konieczności upochodnienia (derywatyzacji), powstaje mniej zanieczyszczeń, które mogą interferować (21).

Poza wyborem techniki oznaczania duże znaczenie ma sam sposób przygotowania próbki, oczyszczenie, odbiałczanie z użyciem, np. kwasu solnego w przypadku próbek moczu lub kwasu nadchlorowego dla surowicy. Zastosowanie ekstrakcji przy użyciu kolumniek SPE pozwala na wykrywanie i oznaczanie EtG w moczu i surowicy w niskich stężeniach (41). Podobnie zastosowanie ekstrakcji SPE w przypadku izolacji EtG z włosów pozwala oceniać stężenie na poziomie 2 pg/mg włosów (34).

W analizie przesiewowej bardzo przydatne są testy immunochemiczne. Dostępne na rynku testy do oznaczania etyloglukuronidu w moczu różnią się między

Tabela 1.
Metody oznaczania EtG
Methods for the detection of EtG

Aparatura <i>Laboratory equipment</i>	Materiał biologiczny <i>Matrix</i>	Rodzaj ekstrakcji <i>Extraction</i>	Upochodnienie <i>Derivatization</i>	Standard wewnętrzny <i>Internal standard</i>	Granica wykrywalności i oznaczalności LOD/LOQ	Źródło <i>Reference</i>
GC/MS	mocz <i>urine</i> surowica <i>blood</i>	metanol	pirydyna, BSTFA	EtG-d5	0,1 mg/L = LOD	12
GC/MS	mocz			EtG-d5	0,03/0,1/mg/L	14
GC/MS	mocz, surowica	aminopropyl NH2-SPE	pirydyna, BSTFA	EtG-d5	168/560 ng/ml 37/173 ng/ml	41 41
GC/MS	włosy <i>hair</i>	woda, sonikacja 3h	MSTFA	metyloglukuronid	2,2/5/ ng/mg	29
GC/MS	włosy	woda, sonikacja 2h	pirydyna, BSTFA	EtG-d5	ok. 50 pg/mg	30
GC/MS	włosy	woda, sonikacja 2h	PFPA	EtG-d5	25/50/pg/mg	32
GC/MS	włosy	woda, sonikacja 2h aminopropyl NH2-SPE	PFPA/PFPOH (100:70)	EtG-d5	2/4/pg/mg	33
LC/MS/MS	mocz	SPE (BondElut®SAX)	–	EtG-d5	0,04mg/L = LOD	16
LC/MS	mocz		–	EtG-d5	0,1mg/L = LOQ	10
LC/MS/MS	mocz	10% acetonitryl w wodzie	–	EtG-d5	0,1/0,3 mg/L	15
LC/MS/MS	mocz, surowica	próbka bez przygotowania	–	EtG-d5	0,1mg/L = LOD	12
LC/MS/MS	włosy	woda, sonikacja 3h, aminopropyl NH2-SPE	–	EtG-d5	51/102 pg/mg	31

GC/MS chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas – *gas chromatography – mass spectrometry*

LC/MS chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas – *liquid chromatography – mass spectrometry*

BSTFA N,O-di (trimetylosililo)-trifluoroacetamid – *N,O-bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide*

MSTFA N-metylo-N-trimetylosililo-trifluoroacetamid – *N-methyl-Ntrimethyl-silyltrifluoroacetamide*

PFPA bezwodnik pentafluoropropionowy – *pentafluoropropionic anhydride*

PFPOH pentafluoropropanol – *pentafluoropropanol*

SPE ekstrakcja do fazy stałej – *solid-phase extraction*

LOD granica wykrywalności – *limit of detection*

LOQ granica oznaczalności – *limit of quantitation*

sobą granicą detekcji od 100 ng/ml (Export Drug Testing z San Diego) do 1000 ng/ml (Drug Testing Network). Koszt wykrywania EtG w moczu za pomocą testu wynosi około 40\$. W proponowanych przez producentów testach często podaje się, że wynik testu świadczy o co najmniej 5-dniowej abstynencji, co nie zawsze jest zgodne z prawdą. W badaniu dotyczącym oznaczania EtG w moczu za pomocą komercyjnie dostępnych testów, u 19 przebadanych pacjentów, którym podawano alkohol w różnych dawkach, po 26 godzinach po spożyciu alkoholu uzyskano ujemny wynik testu. Badanie wykazało małą efektywność w przypadku oznaczania niskich stężeń EtG (42). Fałszywie pozytywne wyniki w testach immunochemicznych (Thermo Fisher Scientific Microgenics) pojawiły się u pacjentów przyjmujących wodzian chloralu, którego metabolit – najprawdopodobniej glukuronid trichloroetylu – dawał reakcję krzyżową z kompleksem obecnym w teście immunochemicznym (43). Dlatego wynik testów immunochemicznych powinien zostać potwierdzony metodami chromatograficznymi z detekcją spektrometrii mas, GC/MS lub LC/MS.

Wnioski. Etyloglukuronid jest bezpośrednim metabolitem alkoholu etylowego. Uważa się, że jest czułym i wiarygodnym markerem. Przydatność oznaczania stężenia EtG w moczu została potwierdzona w wielu pracach. W sytuacjach, gdy osoby deklarują całkowitą abstynencję, a tradycyjne metody oznaczania etanolu zawodzą lub są niewystarczające, obecność EtG może mieć znaczenie rozstrzygające. Dzieje się tak, ponieważ etyloglukuronid pojawia się w organizmie po około godzinie od spożycia alkoholu i można go oznaczać w moczu do 4 dni.

Interpretacja ilościowa poziomu EtG w moczu musi być odniesiona do poziomu kreatyniny. Etyloglukuronid plasuje się pomiędzy krótko- (etanol, stosunek HTOL/HIAA) a długowykrywalnymi (CDT, GGT, MCV, EtP) markerami i z uwagi na wysoką specyficzność jest bardzo obiecującym markerem do oceny konsumpcji alkoholu oraz kontrolowania abstynencji.

Pojawienie się testów immunochemicznych pozwala w krótkim czasie potwierdzić spożycie alkoholu. Wyniki testów immunochemicznych wymagają potwierdzenia metodami GC/MS lub LC/MS w celu wyeliminowania ewentualnych błędów.

Oznaczanie EtG we włosach ulega ciągłemu doskonaleniu. Oznaczanie tego metabolitu w segmentach włosów pozwala na odtworzenie historii konsumpcji etanolu. Naczelnym zadaniem dla analityków jest obecnie określenie minimalnego poziomu konsumpcji etanolu, jaki może być wykryty na podstawie oznaczenia EtG we włosach oraz charakterystyka czynników mających istotny wpływ na powstawanie i odkładanie się EtG we włosach.

Jeśli chcemy określić czas, jaki upłynął od wypicia alkoholu, to dobrym materiałem będzie krew, dzięki opracowanej kinetyce EtG i etanolu.

Etyloglukuronid jest również dobrym markerem do oceny spożycia alkoholu w badaniach materiału sekcyjnego. Powinien być brany pod uwagę w sprawach sądowych jako dowód potwierdzający lub wykluczający spożycie alkoholu, ponieważ EtG nie powstaje po śmierci, nawet wówczas, gdy powstanie endogeny alkohol.

PIŚMIENNICTWO

1. Państwowa Agencja Rozwiązywania Problemów Alkoholowych (2003) *Raport o stanie zdrowia na świecie 2002*. Warszawa.
2. Seńczuk W (2005) *Toksykologia Współczesna*. Warszawa: Wydawnictwa Lekarskie PZWL, 503–755.
3. Czech E, Hartleb M (2002) Beztlenowy metabolizm etanolu oraz jego wpływ na szlak metaboliczny serotoniny i transferyny. *Z Zagadnień Nauk Sądowych*, LII, 38–46.
4. Cywik B, Chrostek L, Szmitkowski M (2007) Nieoksydacyjne metabolity etanolu jako markery ostatniego picia alkoholu. *Polski Merkuriusz Lekarski*, XXIII, 135, 235.
5. Czech E, Hartleb M (2007) Tradycyjne i nowe wskaźniki biologiczne spożywania alkoholu w ilościach szkodliwych dla zdrowia. *Alkoholizm i Narkomania*, 20, 1, 103–118.
6. U.S. Department of Health and Human Services (2006) The role of biomarkers in the treatment of alcohol use disorders. *Substance Abuse Treatment Advisory*, 5, 4, www.samsa.gov
7. Taracha E, Habrat B, Chrapusta SJ, Lehner M, Wisłowska A, Woronowicz BT, Bogulas M, Charewicz J, Markuszewski C, Płaźnik A (2006) Combining markers of nephrotoxicity and hepatotoxicity for improved monitoring and detection of chronic alcohol abuse. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 44 (12), 1446–1452.
8. Rainio J, De Georgio F, Bortolotti F, Tagliaro F (2008) Objective post-mortem diagnosis of chronic alcohol abuse – A review of studies on new markers. *Legal Medicine*, 10, 229–235.
9. Wurst FM, Skipper GE, Weinmann W (2003) Ethyl glucuronide – the direct ethanol metabolite on the threshold from science to routine use. *Addiction*, 98 (suppl. 2), 51–61.
10. Dahl H, Stephanson N, Beck O, Helander A (2002) Comparison of urinary excretion characteristics of ethanol and ethyl glucuronide. *Journal of Analytical Toxicology*, 26, 4, 201–204.
11. Kamil JA, Smith JN, Williams RT (1952) A new aspect of ethanol metabolism: isolation of ethyl glucuronide. *Biochemistry Journal*, 51, 32–33.
12. Wurst FM, Kempter C, Seidl S, Alt A (1999) Ethyl glucuronide – a marker of alcohol consumption and a relapse marker with clinical and forensic implications. *Alcohol&Alcoholism*, 34, 1, 71–77.
13. Stephanson N, Dahl H, Helander A, Beck O (2002) Direct quantification of ethyl glucuronide in clinical urine samples by liquid chromatography-mass spectrometry. *Therapeutic Drug Monitoring*, 24, 645–651.
14. Wurst FM, Vogel K, Jachau K, Varga A, Alling C, Alt A, Skipper GE (2003) Ethyl glucuronide discloses recent covert alcohol use not detected by standard testing in forensic psychiatric inpatient. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 27, 3, 471–476.
15. Høiseth G, Bernard JP, Karinen R, Johnsen L, Helander A, Christopherson AS, Mørland J (2007) A pharmacokinetic study of ethyl glucuronide in blood and urine: Application to forensic toxicology. *Forensic Science of International*, 172, 119–124.
16. Goll M, Schmitt G, Ganámann B, Aderjan R (2002) Excretion Profiles of Ethyl Glucuronide in Human Urine after Internal Dilution. *Journal of Analytical Toxicology*, 26, 262–266.
17. Skipper GE, Weinmann W, Thierauf A, Schaefer P, Wiesbeck G, Allen JP, Miller M, Wurst FM (2004) Ethyl glucuronide: A biomarker to identify alcohol use by health professionals recovering from substance use disorders. *Alcohol&Alcoholism*, 39, 5, 445–449.
18. Erim Y, Böttcher M, Dahmen U, Beck O, Broelsch CE, Helander A (2007) Urinary ethyl glucuronide testing detects alcohol consumption in alcoholic liver disease patients awaiting liver transplantation. *Liver transplantation*, 13, 5, 757–761.
19. Helander A, Dahl H (2005) Urinary tract infection: a risk factor for false-negative urinary ethyl glucuronide but not ethyl sulfate in the detection of recent alcohol consumption. *Clinical Chemistry*, 51, 9, 1728–1730.

20. Wurst FM, Wiesbeck GA, Metzger JW, Weinmann W, Graf M (2004) On Sensitivity, Specificity, and the Influence of Various Parameters on Ethyl Glucuronide Levels in Urine – Result From the WHO/ISBRA Study. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 28, 8, 1220–1228.
21. Weinmann W, Schaefer P, Thierauf A (2004) Confirmatory Analysis of Ethylglucuronide in Urine by Liquid-Chromatography/Electrospray Ionization/Tandem Mass Spectrometry According to Forensic Guidelines. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 15, 188–193.
22. Constantino A, DiGregorio EJ, John E, Korn W, Spayd S, Frederic R (2006) The effect of the use of mouthwash on ethylglucuronide concentrations in urine. *Journal of Analytical Toxicology*, 30, 9, 659–662 (4).
23. Rosano TG, Lin J (2008) Ethyl glucuronide excretion in humans following oral administration of and dermal exposure to ethanol. *Journal of Analytical Toxicology*, 32 (8), 594–600.
24. Schmitt G, Droenner P, Skopp G, Aderjan R (1997) Ethyl glucuronide concentration in serum of human volunteers, teetotalers and suspected drinking drivers. *Journal of Forensic Sciences*, 42, 1099–1102.
25. Droenner P, Schmitt G, Aderjan R, Zimmer H (2002) A kinetic model describing the pharmacokinetics of ethyl glucuronide in humans. *Forensic Science International*, 126, 24–29.
26. Høiseth G, Karinen R, Johnsen L, Normann PT, Christophersen AS, Mørland J (2008) Disappearance of ethyl glucuronide during heavy putrefaction. *Forensic Science International*, 176, 147–151.
27. Skopp G, Schmitt G, Dröner P, Aderjan R (1995) Trinkverhalten und Haaranalyse. W: Daldrup T, Mußhoff F (red.) *Drogen und Arzneimittel im Straßenverkehr. Chemische Spuren bei Verkehrsunfällen*. Heppenheim: Dr Dieter Helm, 175–179.
28. Sachs H (1997) Drogennachweis in Haaren. W: Kijewski H (red.) *Das Haar als Spur-Spuren in Haaren*. Lübeck: Schmidt-Römhild, 119–133.
29. Skopp G, Schmitt G, Pötsch L, Dröner P, Aderjan R, Mattern R (2000) Ethyl glucuronide in human hair. *Alcohol&Alcoholism*, 35, 3, 283–285.
30. Alt A, Janda I, Seidl S, Wurst FM (2000) Determination of ethyl glucuronide in hair samples. *Alcohol&Alcoholism*, 35, 3, 313–314.
31. Janda I, Weinmann W, Kuehnle T, Lahode M, Alt A (2002) Determination of ethyl glucuronide in human hair by SPE and LC-MS/MS. *Forensic Science International*, 128, 59–65.
32. Jurando C, Soriano T, Giménez MP, Menéndez M (2004) Diagnosis of chronic alcohol consumption. Hair analysis for ethyl-glucuronide. *Forensic Science International*, 145, 161–166.
33. Yegles M, Labarthe A, Auwärter V, Hartwig S, Vater H, Wennig R, Pragst F (2004) Comparison of ethyl glucuronide and fatty acids ethyl ester concentration in hair of alcoholics, social drinkers and teetotalers. *Forensic Science International*, 145, 167–173.
34. Politi L, Luca M, Fabio L, Aldo P (2006) Ethyl glucuronide in hair: is it a reliable marker of chronic high levels of alcohol consumption? *Addiction*, 101, 10, 1408–1412.
35. Appenzeller BMR, Agirman R, Neuberger P, Yegles M, Wennig R (2007) Segmental determination of ethyl glucuronide in hair: A pilot study. *Forensic Science International*, 173, 87–92.
36. Kintz P, Villain M, Vallet E, Etter M, Salquebre G, Cirimele V (2008) Ethyl glucuronide: Unusual distribution between head hair and pubic hair. *Forensic Science International*, 176, 87–90.
37. Appenzeller BMR, Schuman M, Yegles M, Wennig R (2007) Ethyl glucuronide concentration in hair is not influenced by pigmentation. *Alcohol&Alcoholism*, 42, 4, 326–327.
38. Høiseth G, Karinen R, Christophersen AS, Olsen L, Normann PT, Mørland J (2007) A study of ethyl glucuronide in post-mortem blood as a marker of ante-mortem ingestion of alcohol. *Forensic Science International*, 165, 41–45.
39. Schloegl H, Rost T, Schmidt W, Wurst FM, Weinmann W (2006) Distribution of ethyl glucuronide in rib bone marrow, other tissues and body liquids as proof of alcohol consumption before death. *Forensic Science International*, 156, 213–218.

40. Wurst FM, Kempter C, Metzger J, Seidl S, Alt A (2000) Ethyl glucuronide: a marker of recent alcohol consumption with clinical and forensic implications. *Alcohol*, 20, 111–116.
41. Janda I, Alt A (2001) Improvement of ethyl glucuronide determination in human urine and serum samples by solid-phase extraction. *Journal of Chromatography B*, 758, 229–234.
42. Wojcik MH, Hawthorne JS (2007) Sensitivity of commercial ethyl glucuronide (ETG) testing in screening for alcohol abstinence. *Alcohol and Alcoholism*, 42 (4), 317–320.
43. Arndt T, Gierten B, Güssregen B, Werle A, Grüner J (2008) False-positive ethyl glucuronide immunoassay screening associated with chloral hydrate medication as confirmed by LC/MS/MS and self-medication. *Forensic Science International*, 184, 27–29.

Adres do korespondencji

Anna Małkowska

Katedra i Zakład Toksykologii WUM

ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa

tel./fax (022) 572 0760

e-mail: amalkowska@farm.amwaw.edu.pl

otrzymano: 4.03.2009

przyjęto do druku: 16.06.2009