

METHANOL AS A MARKER OF ALCOHOL ADDICTION

Dariusz ZUBA¹, Wojciech GUBAŁA¹, Wojciech PIEKOSZEWSKI^{1, 2},
Janusz PACH³, Andrzej PARCZEWSKI^{1, 4}

¹ *Institute of Forensic Research, Cracow*

² *Department of Clinical and Industrial Toxicology, Collegium Medicum,
Jagiellonian University, Cracow*

³ *Toxicological Clinic, Collegium Medicum, Jagiellonian University, Cracow*

⁴ *Faculty of Chemistry, Jagiellonian University, Cracow*

ABSTRACT: Blood methanol levels were determined in 138 alcohol addicts (patients of the Toxicological Clinic, Collegium Medicum Jagiellonian University – CM UJ, Cracow), four times during the first day of their detoxification, and in 13 volunteers who consumed alcohol in planned experiments. Methanol concentrations in the blood of the alcoholics at the time of their admission to the hospital were significantly higher, as compared to peak concentrations obtained for people who drink occasionally ($p < 0.05$). Due to the much higher concentration of ethanol in the alcoholics' blood, the results were standardised through the division of methanol concentration by ethanol concentration. The mean value of the ratio was also higher for the alcohol addicts, and the difference between means turned out to be statistically significant ($p < 0.05$). Methanol turned out to be a sensitive and specific marker for alcohol addiction. The threshold value for recognition of alcohol addiction, which amounts to 10 mg/l, was exceeded in ~80% patients of the CM UJ Toxicological Clinic, whereas it was not observed in the control group. Blood methanol levels in the alcohol-addicted participants remained high for ten to twenty hours after admission to the hospital. This means that methanol is a short-term marker of alcoholic disease. Great differences in methanol elimination were observed as well. In occasional drinkers, the methanol concentration rose or remained at the same level until the ethanol concentration dropped below 0.2 g/l. In alcoholics, the methanol was metabolised concurrently with ethanol oxidation. The elimination rate of the methanol depended on its actual concentration and was independent of ethanol concentration.

KEY WORDS: Methanol; Alcoholism; Marker; Addiction; SPME.

Z Zagadnień Nauk Sądowych, z. XLIX, 2002, 59–73

Received 22 Februar 2001; accepted 2 April 2002

INTRODUCTION

One of the leading causes of car accidents is driving under the influence of alcohol, and people who are addicted to it constitute a significant group among the perpetrators of such offences. For this reason, research has been

conducted for over 10 years into developing markers for alcoholism which, when determined through routine toxicological analysis, could be used to recognise alcohol addicts [12, 16, 18, 21].

Methanol seems to be the most interesting compound. The possibility of its application in toxicological and forensic practise results from the fact that it is a by-product of alcohol fermentation, and can therefore be detected in most alcoholic beverages [22]. After consumption of such beverages, it is absorbed into the body and then transported through the bloodstream to the tissues. Owing to very good solubility in water, practically all the absorbed methanol goes into the blood [3]. At the same time, metabolism of methanol is inhibited even at relatively low concentrations of ethanol in the blood. This phenomenon is caused by the higher affinity of ethanol, than methanol, to alcohol dehydrogenase, the most important enzyme in the biotransformation of alcohol. Consequently, methanol concentrations increase in persons consuming alcohol (because of endogenic production [5, 9, 19]), or remain at the same level, up to the time when the ethanol concentration drops below 0.2–0.3 g/l [8, 10, 11, 14]. The phenomenon of the inhibition of methanol metabolism by ethanol can be used to diagnose alcohol addiction. When people addicted to alcohol are in what is known as an alcoholic trance, they drink for several days, with no period of sobriety. During this entire time, methanol is not metabolised, leading to a significant increase in its concentration in the blood, as compared to people who drink occasionally. Over ten years ago, it was proposed [2, 4] that a blood methanol concentration higher than 10 mg/l should be treated as a threshold value for recognition of alcoholic disease.

Determination of methanol in the blood – besides ethanol – can also be used for forensic purposes in order to give an opinion in other kinds of cases as well [5, 6, 7, 8, 9]. First, it can help to assess the credibility of a suspect's testimony concerning the amount and type of alcoholic beverage, as well as its time of consumption. The result of blood methanol determination can also be helpful for giving opinions in cases when a perpetrator leaves the scene of an accident. These persons are often under the influence of alcohol at the time of the accident, and then, in order to avoid the legal consequences, they report to the police station several hours after the event. An increased level of methanol could indicate that a person consumed an alcoholic beverage in the recent past. Furthermore, the determination can help to assess the credibility of testimony in a case when a perpetrator claims that he/she consumed alcohol just after the accident but before sample collection.

Until now research into the application of methanol as a marker of alcohol addiction have been performed mainly in Germany and the United States. The aim of the study presented in this paper was to assess whether or

not the results of research performed in other countries can be applied to the Polish population. As is known, Polish consumers prefer stronger alcoholic beverages, i.e. vodkas, which contain less methanol compared to beer or wine, because of the distillation and rectification processes used to make it [22].

MATERIAL AND METHODS

Two groups of subjects were included in the study. The first was comprised of 138 acutely poisoned patients of the Toxicological Clinic, Collegium Medicum, Jagiellonian University, Cracow, who on the basis of psychological and psychiatric examinations were recognised as alcohol addicts. The second, control group, was made up of 13 volunteers who consumed alcohol in planned experiments. They were not addicted to alcohol. They consumed 40% v/v vodka in an amount of 0.7 g per kg of body weight (men), or 0.6 g per kg of body weight (women).

Blood samples of alcohol addicts were collected into heparinised tubes, four times during the first day of detoxification. The first sample was taken during admission to the hospital, and then 6, 18 and 24 hours after admission. The blood samples of the people in the control group were collected at 30 min intervals, timed from the end of alcoholic beverage consumption, up to the time when blood ethanol concentration, checked using a breathalyser, dropped below 0.2 g/l.

The methanol and ethanol contents of the blood were determined through gas chromatography, using standard headspace analysis (HS) and a combination of this method with solid-phase microextraction (HS-SPME). 0.1 ml of 1,1-dimethylethanol (internal standard) and 0.5 ml of saturated solution of potassium carbonate (for HS), or 0.5 g of this compound (for HS-SPME) were added to 0.5 ml samples of blood or standard, in measurement vials, which had a volume of 22 ml (for HS) or 4 ml (for HS-SPME). Solid-phase microextraction was performed using 65 μm Carbowax/divinylbenzene fibre coating, and was conducted at 60°C for 10 min. The working parameters of the applied gas chromatographs are listed in Table I.

RESULTS AND DISCUSSION

Methanol concentration in alcohol addicts and persons drinking occasionally

The concentration of methanol in the blood of patients at the Toxicological Clinic CM UJ was determined four times during the first day of their stay

in the hospital. The statistical parameters describing changes in its concentration are presented in Table II.

TABLE I. WORKING PARAMETERS OF THE APPLIED GAS CHROMATOGRAPHS

Parameter	Method	
	HS	HS-SPME
Chromatograph	Perkin Elmer Autosystem with HS40 autosampler	Hewlett Packard HP 6890
Injector temperature	150°C	200°C
Column	0.2% Carbowax 1500/ Graphpack-GC	Rtx-BAC1 (30 m × 530 μm × 1.5 μm)
Oven temperature	50°C	70°C
Carrier gas (head pressure)	Nitrogen (30 kPa)	Helium (50 kPa)
Detector (temperature)	FID (150°C)	FID (200°C)

TABLE II. STATISTICAL PARAMETERS DESCRIBING METHANOL CONCENTRATIONS [mg/l] IN THE BLOOD OF PATIENTS FROM THE TOXICOLOGICAL CLINIC OF THE CM UJ DURING THE FIRST DAY OF DETOXIFICATION

Parameter	Time of blood sample collection				
	During admission	During admission (after correction)*	6 h after admission	18 h after admission	24 h after admission
Mean	28.69	20.77	26.29	7.30	1.43
SD	38.79	12.2	36.66	21.03	3.33
Median	22.1	20.8	20.3	1.2	0.45
Lower quartile	12.0	11.0	11.5	0.4	0.2
Upper quartile	32.8	31.9	28.2	6.0	1.0
Minimum	2.0	2.0	0.0	0.0	0.0
Maximum	324.4	52.3	281.9	201.5	21.9

* – outliers were excluded from the data (explanation in the text).

For most of the patients, the peak methanol concentration occurred during admission to the hospital. According to the data collected in Table II, its level remained high from several hours to over ten. Methanol concentration was considerably reduced 18 h after admission, and close to zero after 24 h.

The determined concentrations were compared to the results of methanol determinations in people from the control group. The results of determinations during admission to the hospital for alcohol addicts, and the peak blood methanol concentrations for the control group were compared.

The distribution of methanol concentrations in patients of the Toxicological Clinic CM UJ differ significantly from normal distribution. Furthermore, there were outliers among the data (some results were considerably higher than the rest). In order to detect these points, the Grubb test was used [13]. On the basis of the test, the results of six patients whose initial methanol concentration exceeded 55 mg/l were rejected. After doing this, the mean methanol concentration was very close to the median. The average value of peak methanol concentration in persons drinking occasionally amounted to 3.37 ± 1.05 mg/l, while the median is 3.1 mg/l. The difference between methanol concentrations in alcohol addicts and in social drinkers, estimated by means of t-Student test, was statistically significant at the assumed confidential level ($\alpha = 0.05$).

The comparison of methanol concentrations in both tested groups doesn't take into consideration the fact that ethanol concentrations in the blood of people from the control group were significantly lower than in that of patients at the Toxicological Clinic CM UJ (consumption greater amounts of alcohol than used in the study is not advisable for medical reasons). Concentrations in the occasional drinkers averaged 0.77 ± 0.17 g/l, whereas it was 3.20 ± 1.12 g/l in the hospitalised subjects. Thus, methanol concentration in the blood of the patients at the Toxicological Clinic CM UJ was estimated at the moment when mean ethanol concentration amounted to 0.8 g/l. The average methanol concentration was 16.5 mg/l, and it was five times higher than the mean obtained for the control group.

The results were also standardised by division of blood methanol concentration (*BMC*) by blood ethanol concentration (*BEC*). The obtained values of the *BMC/BEC* ratio for both groups in relationship to ethanol concentration are shown in Figure 1.

The standardisation of the results confirmed that methanol can be applied as a marker of alcoholic disease. For a large group of the patients at the Toxicological Clinic CM UJ, the concentration ratio levels were higher than in occasional drinkers. The mean value of the *BMC/BEC* coefficient for alcohol addicts amounted to $7.53 \times 10^{-3} \pm 5.26 \times 10^{-3}$, and for the control group to $4.49 \times 10^{-3} \pm 1.41 \times 10^{-3}$. The difference turned out to be statistically significant at the assumed confidential level ($\alpha = 0.05$).

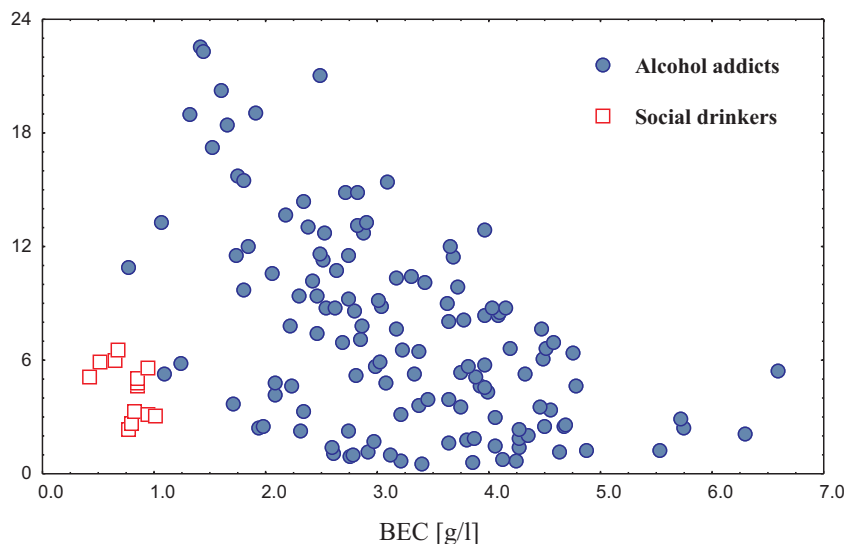


Fig. 1. Blood methanol concentration (BMC) to blood ethanol concentration (BEC) ratio in relation to ethanol concentration for alcohol addicts and persons drinking occasionally.

Whether or not methanol concentrations depend on actual ethanol concentration was also estimated. The Pearson's r correlation coefficient was used as a measure of dependency [13]. The concentration levels of these compounds turned out to be unrelated, the r coefficient value for the group of addicted persons amounted to 0.04 ($p > 0.1$), and 0.34 ($p > 0.1$) for the control group. The independence of methanol concentration from actual ethanol concentration is favourable, in terms of the possibility for its application as a marker of alcoholic disease.

The obtained values of methanol concentrations were compared to the threshold value for recognition of alcoholic disease proposed in the literature (10 mg/l). For the group of patients at the Toxicological Clinic CM UJ, the value was exceeded in 76.8% of cases during admission to the hospital, in 80.0% of cases after 6 h, in only 23.3% after 18 h, and 6.0% after 24 h. These values indicate that methanol is a sensitive, albeit short-term marker of alcoholic disease. Its concentration is elevated only for several to twenty hours after the end of alcoholic beverage consumption. In the group of persons drinking occasionally, none of the results exceeded the threshold value. This indicates methanol's good specificity as a marker of alcoholic disease. The raised values are comparable or higher in relation to currently used markers, e.g. activities of gamma-glutamyl-transferase (GGTP), aspartate aminotransferase (AspAT), alanine aminotransferase (AlAT) or alkaline phosphate (AP) [16].

Elimination of methanol in alcohol addicts and persons drinking occasionally

Both methanol and ethanol elimination proceed through the same metabolic routes. As mentioned in the introduction, the metabolism of methanol is stopped because of the higher affinity of ADH to ethanol, as well as the significantly higher level of this compound in blood. The analysis of changes in methanol and ethanol concentrations over time, obtained for the tested control group, leads to the similar conclusions. When blood ethanol concentration exceeded 0.2 g/l, methanol was not metabolised in any of the subjects. Because the experiments were not carried out at ethanol concentrations lower than this value, it was impossible to perform pharmacokinetics calculations.

Blood samples from the patients of the Toxicological Clinic CM UJ were collected four times. This allowed for the assessment of changes in methanol concentrations over time for the addicted subjects. Figure 2 presents the changes in concentrations for individual subjects during the first 18 hours of hospitalisation (two time ranges were distinct).

As can be seen in Figure 2, during just the first 6 hours after admission, when the mean ethanol concentration was higher than 1.5 g/l, methanol was metabolised in a significant group of the patients (49 persons, 40.8%). Methanol concentration increased in four patients, which could indicate that they were admitted to the hospital shortly after consumption (they were in the phase of ethanol absorption). During the next 12 hours of hospitalisation, methanol was metabolised much faster and in a greater number of patients. The oxidation of methanol took place, despite the presence of ethanol in the body.

The changes of methanol concentration in all patients of the Toxicological Clinic CM UJ in both time intervals, counted per hour, were compared. The decrease of methanol concentration during the first 6 h (d_{0-6}) averaged to 0.56 mg/l/h. Its level in individual subjects depended on methanol concentration at the time of admission BMC_0 ($d_{0-6} = -0.52 + 0.020 BMC_0$, $r = 0.73$, $p < 0.0001$), and was independent of ethanol concentration during admission BEC_0 ($d_{0-6} = 1.06 - 0.18 BEC_0$, $r = -0.19$, $p > 0.01$). The decrease of methanol concentration calculated for the time interval between 6 and 18 h after admission to the hospital, d_{6-18} , averaged 1.59 mg/l/h, and the obtained values for individual subjects depended on actual methanol concentration, BMC_6 , ($d_{6-18} = 0.17 + 0.047 BMC_6$, $r = 0.83$, $p < 0.0001$) and was independent of ethanol concentration, BEC_6 ($d_{6-18} = 2.31 - 0.54 BEC_6$, $r = -0.22$, $p > 0.01$).

The results shown above indicate that, in alcohol addicts, methanol metabolism can proceed independently of ethanol oxidation. In this group, to a much greater extent than in healthy individuals, other metabolic systems, e.g. the microsomal ethanol oxidation system (MEOS) or catalase system,

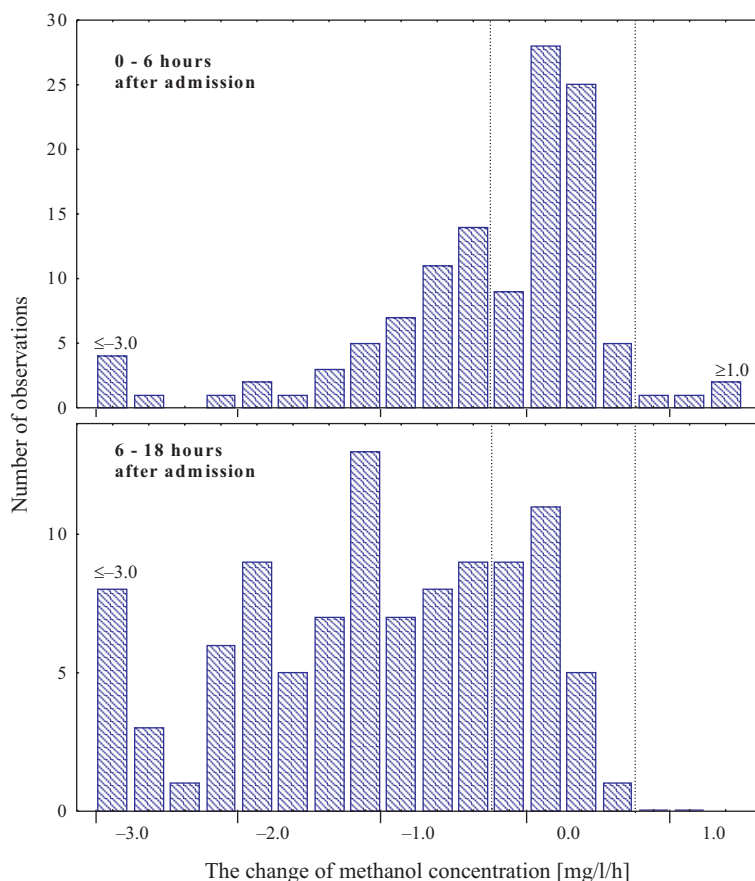


Fig. 2. Changes in methanol concentration during the first 18 h of hospitalisation. The interval at which results change as a consequence of random fluctuations was marked with dashed lines.

presumably take part in the metabolism of alcohol [2, 4, 15]. The characteristic of these systems is much smaller selectivity in relation to the ADH system. The phenomenon of the activation of other metabolic systems for the oxidation of alcohol is confirmed by a very high average of the ethanol elimination coefficient (β_{60}), which amounted to $0.264 \pm 0.074 \text{ g/l} \times \text{h}$ (median $0.258 \text{ g/l} \times \text{h}$) for the tested group of alcohol addicts. The obtained values of elimination coefficient were higher in most cases than is assumed in retrospective calculations of ethanol concentration. Of the tested group, in 101 patients (83.5%) the value of ethanol elimination coefficient exceeded $0.2 \text{ g/l} \times \text{h}$. This means that in retrospective calculations of ethanol concentration, the fact that a person addicted to alcohol can eliminate ethanol much more rap-

idly should be taken into consideration. The phenomenon of acceleration of ethanol elimination in alcoholics has been observed by other authors [1, 18, 20].

CONCLUSIONS

1. The threshold value for recognition of alcohol addiction (blood methanol concentration over 10 mg/l), proposed by German authors, can also be used in reference to the Polish population.
2. Methanol is a sensitive and specific, but short-term marker of alcoholic disease. Its blood level is increased only for several to twenty hours, timed from the end of consumption. Therefore, an increased level of methanol indicates alcoholic problems in a tested person, whereas a low level of this compound does not prove that a tested person is addicted to alcohol.
3. The performed study revealed that methanol metabolism in alcohol-addicted persons might proceed concurrently with ethanol oxidation. The phenomenon of parallel metabolism of both types of alcohol does not exist in people who drink occasionally. Thus, the observation of a significant decrease of methanol concentration, at a high ethanol level, shows that enzymatic systems other than ADH were activated. It can also indicate the frequent consumption of alcohol by a tested person.

References:

1. Adachi J., Mizoi Y., Fukunaga T. [et al.], Comparative study on ethanol elimination and blood acetaldehyde between alcoholics and control subjects, *Alcoholism Clinical & Experimental Research* 1989, vol. 13, pp. 601–604.
2. Barz J., Sprung R., Freudenstein P. [et al.], Investigations on methanol kinetics in alcoholics, *Blutalkohol* 1988, vol. 25, pp. 163–171.
3. Baselt R. C., Cravey R. H., Disposition of toxic drugs and chemicals in man, Chemical Toxicology Institute, Foster City 1995.
4. Bilzer N., Penners B. M., Conrad A., Die Methanolkinetik bei chronischem Alkoholismus, *Blutalkohol* 1991, Bd 28, S. 377–392.
5. Gilg T., von Meyer L., Liebhardt E., Formation and accumulation of endogenous methanol under the influence of ethanol, *Blutalkohol* 1987, vol. 24, pp. 321–332.
6. Haffner H. T., Banger M., Graw M. [et al.], The kinetics of methanol elimination in alcoholics and the influence of ethanol, *Forensic Science International* 1997, vol. 89, pp. 129–136.
7. Haffner H. T., Batra A., Wehner H. D. [et al.], Methanol levels and methanol elimination in alcoholics, *Blutalkohol* 1993, vol. 30, pp. 52–62.

8. Haffner H. T., Besserer K., Graw M. [et al.], Methanol elimination in non-alcoholics: inter- and intraindividual variation, *Forensic Science International* 1997, vol. 86, pp. 69–76.
9. Haffner H. T., Graw M., Besserer K. [et al.], Endogenous methanol: variability in concentration and rate of production. Evidence of a deep compartment?, *Forensic Science International* 1996, vol. 79, pp. 145–154.
10. Haffner H. T., Wehner H. D., Scheytt K. D. [et al.], The elimination kinetics of methanol and the influence of ethanol, *International Journal of Legal Medicine* 1992, vol. 105, pp. 111–114.
11. Iffland R., Balling P., Öhmichen M. [et al.], Methanol, Isopropanol, n-Propanol – endogene Bildung unter Äthanoleinfluß, *Blutalkohol* 1989, Bd 26, S. 87–97.
12. Jones A. W., Sternebring B., Kinetics of ethanol and methanol in alcoholics during detoxification, *Alcohol & Alcoholism* 1992, vol. 27, pp. 641–647.
13. Kobus P., Pietrzykowski R., Zieliński W., Statystyka z pakietem „Statistica”, Fundacja „Rozwój SGGW”, Warszawa 1998.
14. Majchrowicz E., Mendelson J. H., Blood methanol concentrations during experimentally induced ethanol intoxication in alcoholics, *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics* 1971, vol. 179, pp. 293–300.
15. Musshoff F., Daldrup T., Bonte W. [et al.], Ethanolunabhängige Methanolelimination bei chronischen Alkoholikern, *Blutalkohol* 1995, Bd 32, S. 317–336.
16. Musshoff F., Dalrup T., Determination of biological markers of alcohol abuse, *Journal of Chromatography B* 1998, vol. 713, pp. 245–264.
17. Olsen H., Sakshaug J., Duckert F. [et al.], Ethanol elimination-rates determined by breath analysis as a marker of recent excessive ethanol consumption, *Scandinavian Journal of Clinical Laboratory Investigation* 1989, vol. 49, pp. 359–365.
18. Schmutte P., Bilzer N., Penners B. M., Some aspects concerning the kinetics of the congener methanol and propanol-1 in absence of ethanol, *Blutalkohol* 1988, vol. 25, pp. 137–142.
19. Stoehlmacher P., Methanol from ethanol?, *Blutalkohol* 1995, vol. 32, pp. 193–207.
20. Winek C. L., Murphy K. L., The rate and kinetic order of ethanol elimination, *Forensic Science International* 1984, vol. 25, pp. 159–166.
21. Zuba D., Chłobowska Z., Parczewski A., Analysis of volatile organic compounds in blood of people consuming alcoholic drinks by means of gas chromatography, *Problems of Forensic Sciences* 1998, vol. 38, pp. 36–54.
22. Zuba D., Chłobowska Z., Parczewski A., Identification of alcoholic beverages on the basis of quantitative analysis of impurities, *Problems of Forensic Sciences* 1997, vol. 35, pp. 42–58.

METANOL JAKO WSKA NIK UZALEŻNIENIA OD ALKOHOLU

Dariusz ZUBA, Wojciech GUBAŁA, Wojciech PIEKOSZEWSKI, Janusz PACH,
Andrzej PARCZEWSKI

WPROWADZENIE

Prowadzenie pojazdów mechanicznych pod wpływem alkoholu jest jedną z najważniejszych przyczyn wypadków drogowych. Wśród sprawców tego typu zdarzeń dużą grupę stanowią osoby od niego uzależnione. Dlatego od kilkunastu lat prowadzone są badania nad opracowaniem takich markerów choroby alkoholowej, dzięki oznaczeniu których – podczas rutynowej analizy toksykologicznej – można by rozpoznać osoby uzależnione od alkoholu [12, 16, 18, 21].

Związkiem, który wzbudza największe zainteresowanie, jest metanol. Możliwość jego wykorzystania w praktyce toksykologiczno-sądowej wynika z faktu, że stanowi produkt uboczny procesu fermentacji alkoholowej, dzięki czemu można go wykryć w większości napojów alkoholowych [22]. Po spożyciu takich napojów jest on wchłaniany do organizmu, a następnie wraz z krwią przenoszony do poszczególnych tkanek. Ze względu na bardzo dobrą rozpuszczalność w wodzie praktycznie cała ilość wchłoniętego metanolu przechodzi do krwi [3]. Jednocześnie już przy stosunkowo niskim jego stężeniu we krwi zahamowany zostaje metabolizm metanolu. Zjawisko to jest spowodowane jest wyższym powinowactwem etanolu niż metanolu do dehydrogenazy alkoholowej, najważniejszego enzymu odpowiedzialnego za biotransformację alkoholi. W konsekwencji u osób spożywających alkohol stężenie metanolu wzrasta (ze względu na jego endogenną produkcję [5, 9, 19]) lub pozostaje na stałym poziomie do czasu, gdy stężenie etanolu nie spadnie poniżej 0,2–0,3 g/l [8, 10, 11, 14]. Zjawisko blokowania metabolizmu metanolu przez etanol może być wykorzystane do diagnozowania choroby alkoholowej. Osoby uzależnione od alkoholu, będąc w tzw. ciągu alkoholowym, piją po kilka lub kilkanaście dni bez fazy trzeźwienia. Przez cały ten czas metanol nie jest metabolizowany, co prowadzi do znacznego podwyższenia stężenia tego związku we krwi w porównaniu do osób pijących okazjonalnie. Kilkanaście lat temu zaproponowano, aby stężenie metanolu we krwi powyżej 10 mg/l traktować jako wartość progową rozpoznawania choroby alkoholowej [2, 4].

Oznaczenie metanolu we krwi – obok oznaczania etanolu – może być wykorzystane do celów sądowych również przy opiniowaniu w innego typu sprawach [5, 6, 7, 8, 9]. Po pierwsze, może pomóc przy ocenie wiarygodności zeznań osoby podejrzanej co do ilości, rodzaju oraz czasu konsumpcji napoju alkoholowego. Wynik oznaczenia metanolu we krwi może być także przydatny przy opiniowaniu w sprawach, w których sprawca wypadku zbiegł z miejsca zdarzenia. Osoby te często znajdują się pod wpływem alkoholu w chwili wypadku, a w celu uniknięcia konsekwencji prawnych zgłaszają się na posterunek policji po kilku lub kilkunastu godzinach po zdarzeniu. Podwyższony poziom metanolu mógłby wskazywać, że dana osoba w nieodległej przeszłości spożywała napój alkoholowy. Ponadto oznaczenie to może pomóc ocenić

wiarygodność zeznań w przypadku, gdy sprawca twierdzi, że spożył alkohol już po wypadku, ale przed pobraniem próby krwi.

Badania nad wykorzystaniem metanolu jako markera choroby alkoholowej prowadzone były dotychczas głównie w Niemczech i Stanach Zjednoczonych. Celem badań przedstawionych w niniejszej pracy była ocena, czy wyniki uzyskane w innych krajach można odnieść również do polskiej populacji. Jak wiadomo, polscy konsumenci preferują mocne alkohole (wódki), które ze względu na stosowane procesy destylacji i rektyfikacji zawierają znacznie mniej metanolu w stosunku do piwa czy wina [22].

MATERIAŁ I METODY

Badaniami objęto dwie grupy probantów. Pierwszą tworzyło 138 ostro zatrutych alkoholem pacjentów Kliniki Toksykologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, którzy na podstawie badań psychologicznych i psychiatrycznych zostali uznani za osoby uzależnione od alkoholu. Drugą grupę (kontrolną) stanowiło 13 ochotników, którzy spożywali alkohol w planowanych eksperymentach. Osoby te nie były uzależnione od alkoholu. Konsumowali oni wódkę (40% v/v) w ilości 0,7 g etanolu/kg masy ciała (mężczyźni) lub 0,6 g etanolu/kg masy ciała (kobiety).

Próby krwi od osób uzależnionych były pobierane do heparynizowanych probówek czterokrotnie w trakcie pierwszej doby detoksykacji. Pierwsza próba pobierana była podczas przyjęcia do szpitala, a następnie po 6, 18 i 24 godzinach od przyjęcia. Krew od osób stanowiących grupę kontrolną pobierano w odstępach trzydziestominutowych od czasu zakończenia konsumpcji napoju alkoholowego do czasu, gdy stężenie etanolu we krwi (kontrolowane za pomocą analizatora wydychanego powietrza) spadło poniżej 0,2 g/l.

Zawartość metanolu oraz etanolu we krwi wyznaczano metodą chromatografii gazowej, wykorzystując klasyczną analizę fazy nadpowierzchniowej (HS) oraz połączenie tej metody z mikroekstrakcją do fazy stałej (HS-SPME). Do 0,5 ml próbki krwi lub wzorca umieszczonych w naczyniu pomiarowym (o pojemności 22 ml w metodzie HS oraz 4 ml w metodzie HS-SPME) dodawano 0,1 ml roztworu 1,1-dimetyletanolu (wzorzec wewnętrzny) oraz 0,5 ml nasyconego roztworu węgla potasu (w metodzie HS) lub 0,5 g tego związku (w metodzie HS-SPME). Do mikroekstrakcji do fazy stałej stosowano pokrycie włókna 65 μ m Carbowax/divinylbenzene, ekstrakcję analitów prowadzono w temperaturze 60°C przez 10 minut. Parametry pracy użytych chromatografów gazowych podano w tabeli I.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Stężenia metanolu u osób uzależnionych i pijących okazjonalnie

Stężenie metanolu we krwi pacjentów Kliniki Toksykologii CM UJ wyznaczano czterokrotnie podczas pierwszej doby ich pobytu w szpitalu. Parametry statystyczne opisujące zmiany stężenia tego związku podano w tabeli II.

U większości pacjentów maksymalne stężenie metanolu we krwi występowało przy ich przyjęciu do szpitala. Jak wynika z danych zebranych w tabeli II, jego wysoki poziom utrzymywał się od kilku do kilkunastu godzin. Po 18 godzinach od przyjęcia dochodziło do znacznego obniżenia stężenia metanolu, a po 24 godzinach jego stężenie było zbliżone do zera.

Wyznaczone stężenia porównano z wynikami oznaczeń metanolu u osób z grupy kontrolnej. W porównaniu wykorzystano wyniki oznaczeń przy przyjęciu do szpitala (osoby uzależnione) oraz maksymalne stężenia metanolu we krwi (grupa kontrolna). Rozkład stężeń metanolu u pacjentów Kliniki Toksykologii CM UJ znacznie odbiegał od rozkładu normalnego, a ponadto wśród danych znajdowały się wyniki zdecydowanie odbiegające od pozostałych. Do ich wykrycia wykorzystano test Grubba [13]. W oparciu o ten test usunięto dane 6 pacjentów (u których początkowe stężenie metanolu przekraczało 55 mg/l) i po wykonaniu tej operacji średnie stężenie metanolu było bardzo bliskie wartości mediany. Średnia wartość maksymalnego stężenia metanolu u osób pijących okazjonalnie wyniosła $3,37 \pm 1,05$ mg/l, zaś mediana – 3,1 mg/l. Różnica między stężeniami metanolu u osób uzależnionych oraz pijących okazjonalnie, oceniona za pomocą testu t-Studenta, była statystycznie istotna przy przyjętym poziomie istotności ($\alpha = 0,05$).

Porównanie stężeń metanolu w obu badanych grupach nie uwzględnia faktu, że stężenie etanolu we krwi osób z grupy kontrolnej były znacznie niższe niż u pacjentów Kliniki Toksykologii CM UJ (konsumpcja większych ilości alkoholu niż stosowane w badaniach jest niewskazana ze względów medycznych). Średnie stężenie u osób pijących okazjonalnie wyniosło $0,77 \pm 0,17$ g/l, podczas gdy u osób hospitalizowanych $3,20 \pm 1,12$ g/l). Dlatego oszacowano stężenie metanolu we krwi pacjentów Kliniki Toksykologii CM UJ w chwili, gdy średnie stężenie etanolu wyniosło 0,8 g/l. Średnie stężenie metanolu wyniosło 16,5 mg/l, a zatem było pięciokrotnie wyższe niż średnia uzyskana dla grupy kontrolnej. Zastosowano również standaryzację wyników poprzez podzielenie stężenia metanolu we krwi (*BMC*) przez stężenie etanolu we krwi (*BEC*). Uzyskane wartości ilorazu *BMC/BEC* dla obu grup w zależności od stężenia etanolu przedstawiono na rycinie 1.

Standaryzacja wyników potwierdziła zasadność stosowania metanolu jako markera choroby alkoholowej. Dla dużej grupy pacjentów Kliniki Toksykologii CM UJ poziomy ilorazu stężeń były wyższe niż u osób pijących okazjonalnie. Średnia wartość współczynnika *BMC/BEC* dla osób uzależnionych wyniosła $7,53 \times 10^{-3} \pm 5,26 \times 10^{-3}$, a dla grupy kontrolnej $4,49 \times 10^{-3} \pm 1,41 \times 10^{-3}$. Różnica ta okazała się statystycznie istotna przy przyjętym poziomie istotności ($\alpha = 0,05$).

Oszacowano również, czy stężenie metanolu zależy od aktualnego stężenia etanolu. Jako miarę zależności zastosowano współczynnik korelacji Pearsona *r* [13]. Poziomy stężeń tych związków okazały się nieskorelowane, wartość współczynnika *r* dla grupy osób uzależnionych wyniosła 0,04 ($p > 0,1$), natomiast dla grupy kontrolnej 0,34 ($p > 0,1$). Niezależność stężeń metanolu od aktualnego stężenia etanolu jest korzystna z punktu widzenia możliwości zastosowania metanolu jako markera choroby alkoholowej.

Uzyskane wyniki stężeń metanolu porównano z proponowaną w literaturze wartością progową rozpoznawania choroby alkoholowej (10 mg/l). Dla grupy pacjentów Kliniki Toksykologii CM UJ wartość ta została przekroczona w 76,8% przypadków przy przyjęciu do szpitala, 80,0% przypadków po 6 godzinach i tylko w 23,3% po

18 godzinach oraz 6,0% po 24 godzinach. Wartości te wskazują, że metanol jest czułym, aczkolwiek krótkoterminowym markerem choroby alkoholowej. Jego stężenie jest podwyższone tylko przez kilkanaście godzin od zakończenia konsumpcji napoju alkoholowego. W grupie osób pijących okazjonalnie żaden wynik nie przekroczył wartości progowej, co świadczy o dużej swoistości metanolu jako markera choroby alkoholowej. Powyższe wielkości są porównywalne lub wyższe w odniesieniu do obecnie stosowanych markerów, takich jak np. aktywności gamma-glutamylotransferazy (GGTP), aminotransferazy asparaginowej (AspAT), aminotransferazy alaninowej (AlAT) czy fosfatazy zasadowej (AP) [16].

Eliminacja metanolu u osób uzależnionych oraz pijących okazjonalnie

Eliminacja metanolu oraz etanolu z organizmu człowieka przebiega z wykorzystaniem tych samych szlaków metabolicznych. Jak wspomniano we wstępie, ze względu na wyższe powinowactwo ADH do etanolu oraz znacznie wyższy poziom tego związku we krwi, metabolizm metanolu zostaje zahamowany. Do podobnych wniosków prowadzi analiza zmian stężeń metanolu i etanolu w czasie uzyskanych dla badanej grupy kontrolnej. U żadnego z probantów metanol nie był eliminowany, gdy stężenie etanolu we krwi przekraczało 0,2 g/l. Ponieważ nie prowadzono eksperymentów przy stężeniach etanolu niższych od tej wartości, niemożliwe było wykonanie obliczeń farmakokinetycznych.

Czterokrotne pobranie prób krwi od pacjentów Kliniki Toksykologii CM UJ pozwoliło na ocenę zmian stężeń metanolu w czasie u osób uzależnionych. Na rycinie 2 przedstawiono, jak zmieniały się te stężenia dla poszczególnych pacjentów w czasie pierwszych 18 godzin hospitalizacji (z rozróżnieniem na dwa przedziały czasowe).

Jak widać na rycinie 2, już w trakcie pierwszych 6 godzin od przyjęcia do szpitala, gdy średnie stężenie etanolu było wyższe niż 1,5 g/l, u dość dużej grupy pacjentów (49 osób, 40,8%) następował metabolizm metanolu. U czterech pacjentów stężenie metanolu wzrastało, co może świadczyć, że do szpitala zostali przyjęci w niedługim czasie od zakończenia konsumpcji (byli w fazie wchłaniania alkoholu). W ciągu kolejnych 12 godzin hospitalizacji metanol metabolizowany był już znacznie szybciej i u znacznie większej liczby pacjentów. Utlenianie metanolu miało miejsce mimo obecności etanolu w organizmie.

W przypadku każdego z pacjentów Kliniki Toksykologii CM UJ porównano zmiany stężenia metanolu w obu przedziałach czasowych w przeliczeniu na 1 godzinę. Średni spadek stężenia metanolu podczas pierwszych 6 godzin (d_{0-6}) wyniósł 0,56 mg/l/h; jego wielkość u poszczególnych pacjentów zależała od stężenia metanolu przy przyjęciu BMC_0 ($d_{0-6} = -0,52 + 0,020 BMC_0$, $r = 0,73$, $p < 0,0001$) a nie zależała od stężenia etanolu przy przyjęciu BEC_0 ($d_{0-6} = 1,06 - 0,18 BEC_0$, $r = -0,19$, $p > 0,01$). Średnia wartość spadku stężenia metanolu obliczona dla przedziału czasu od 6 do 18 godziny od przyjęcia do szpitala (d_{6-18}) wyniosła 1,59 mg/l/h; uzyskane wartości w przypadku pacjentów zależały od aktualnego stężenia metanolu BMC_6 ($d_{6-18} = 0,17 + 0,047 BMC_6$, $r = 0,83$, $p < 0,0001$), a nie zależały od stężenia etanolu BEC_6 ($d_{6-18} = 2,31 - 0,54 BEC_6$, $r = -0,22$, $p > 0,01$).

Powyższe wyniki świadczą o tym, że u osób uzależnionych metabolizm metanolu może zachodzić niezależnie od utleniania etanolu. Prawdopodobnie w metabolizmie alkoholu u tej grupy osób w znacznie większym stopniu, w porównaniu do osób

zdrowych, biorą udział inne systemy metaboliczne, np. układ MEOS – mikrosomalny system utlenienia alkoholu czy system katalazy [2, 4, 15]. Cechą charakterystyczną tych układów jest znacznie mniejsza ich selektywność w stosunku do etanolu w porównaniu z układem ADH. Zjawisko włączania się innych systemów metabolicznych do utlenienia alkoholi potwierdza bardzo wysoka średnia wartość współczynnika eliminacji etanolu (β_{60}), która dla badanej grupy osób uzależnionych wyniosła $0,264 \pm 0,074 \text{ g/l} \times \text{h}$ (mediana $0,258 \text{ g/l} \times \text{h}$). Otrzymane wartości współczynnika eliminacji były w większości przypadków wyższe niż przyjmuje się w obliczeniach retrospektywnych stężenia etanolu. W badanej grupie u 101 pacjentów (83,5%) wartość współczynnika eliminacji etanolu przekraczała $0,2 \text{ g/l} \times \text{h}$. Oznacza to, iż w obliczeniach retrospektywnych stężenia etanolu powinno uwzględniać się fakt, że jeśli osoba jest uzależniona od alkoholu, to eliminacja etanolu może zachodzić u niej znacznie szybciej. Zjawisko zwiększania szybkości eliminacji etanolu u alkoholików zostało zaobserwowane również przez innych autorów [1, 18, 20].

WNIOSKI

1. Wartość progowa rozpoznawania uzależnienia od alkoholu (stężenie metanolu we krwi powyżej 10 mg/l), zaproponowana przez autorów niemieckich, może być również stosowana w odniesieniu do polskiej populacji.
2. Metanol jest czułym i swoistym, aczkolwiek krótkoterminowym markerem choroby alkoholowej. Jego poziom we krwi jest podwyższony tylko przez kilka lub kilkanaście godzin od zakończenia konsumpcji. Zatem podwyższony poziom metanolu wskazuje na problemy alkoholowe u badanej osoby, natomiast niski poziom tego związku nie dowodzi, że dana osoba nie jest uzależniona.
3. Przeprowadzone badania wykazały, że metabolizm metanolu u osób uzależnionych może zachodzić równocześnie z utlenieniem etanolu. Zjawisko równoległego metabolizmu obu alkoholi nie występuje u osób pijących okazjonalnie. Zatem zaobserwowanie istotnego spadku stężenia metanolu przy wysokim poziomie etanolu wskazuje na uaktywnienie innych systemów enzymatycznych niż układ ADH, co również może wskazywać na częstą konsumpcję alkoholu przez badaną osobę.