

Автоматическое определение фосфатидилэтанола 16:0/18:1 и 16:0/18:2 методом «сухих пятен крови»

Marc Luginbühl¹, Stefan Gaugler^{2,*}, and Wolfgang Weinmann¹

¹Institute of Forensic Medicine, University of Bern, Bern, Switzerland, and ²CAMAG, Muttenz, Switzerland

*Автор кому следует направлять запросы. Email: Stefan.Gaugler@camag.com

Резюме

Цель: Прямые маркеры алкоголя широко применяются в ходе мониторинга воздержания, оценки водительских качеств и тестирования на наркотики на рабочем месте. Наиболее перспективным прямым маркером алкоголя был признан фосфатидилэтанол (PEth). По сравнению с другими маркерами он обеспечивает длинное окно детекции благодаря их аккумуляции в крови. Для облегчения и ускорения определения PEth мы разработали полностью автоматическую методику с использованием метода «сухих пятен крови».

Методы: Новый аттестованный онлайн-метод с автоматической пробоподготовкой с помощью системы CAMAG DBS-MS 500 снижает затраты на пробоподготовку до абсолютного минимального уровня, вручную готовятся только растворы для калибровки и контрольные пробы.

Результаты: В процессе валидации метод показал высокую эффективность экстракции (>88%), линейность (коэффициент корреляции >0,9953), точность и воспроизводимость (в пределах ±15%) для определения PEth 16:0/18:1 и PEth 16:0/18:2. Оба компонента полностью разделяются за 7 мин. Сравнение данных нового метода с результатами для жидкой цельной крови для 28 подлинных образцов от пациентов с расстройствами, вызванными употреблением алкоголя, показало среднее отклонение менее 2% и корреляционное соотношение >0,9759. Сравнение с DBS экстракцией вручную показало среднее отклонение менее 8% и коэффициент корреляции >0,96666.

Заключение: Автоматизированный анализ PEth на карточках DBS может обеспечить быстрое и точное решение для мониторинга воздержания. В отличие от ручной экстракции PEth в DBS, этот способ не требует трудоемкой пробоподготовки. Кроме того, нанесение внутреннего стандарта с помощью модуля распыления компенсирует изменения при экстракции и влияние матрицы пробы.

Введение

Простой способ мониторинга воздержания алкоголя это определение этилглюкуронида (EtG) и этилсульфата (EtS) в моче. Из-за короткого «окна детекции» пробы следует отбирать достаточно часто, что увеличивает их количество и проблемы с транспортировкой и хранением перед анализом (1). Детекция фосфатидилэтанола (PEth) в качестве прямого маркера алкоголя расширяет «окно детекции» потребления алкоголя до нескольких недель. Из-за быстрой скорости образования и медленной деградации он накапливается в клеточных мембранах примерно на 1-2% от общего пула клеточных фосфолипидов (2, 3). PEth позволяет отличить тяжелых от случайных пьяниц и контролировать воздержание от алкоголя (4-6).

PEth присутствует как группа в составе аномальных фосфолипидов с полярной частью фосфоэтанола. Жирные кислоты находятся в положениях СН-1 и СН-2. Было найдено до 48 различных аналогов PEth с различными комбинациями длин ацильных остатков и количества двойных связей.

В крови после употребления алкоголя преобладающими являются PEth 16:0/18:1 (30-46%) и PEth 16:0/18:2 (16-28%) (7-12). Анализ PEth в цельной крови непригоден для рутинного анализа, так как он неустоек при хранении и транспортировке выше -80°C. Более того, PEth может образоваться *in vitro*, после забора крови, если в ней присутствует этанол. Это может приводить к ложноположительным результатам (10, 13).

На карточках «сухих пятен крови» (СПК) содержание PEth стабильно благодаря инактивации ферментов. Отбор проб на карточки DBS предотвращает образование PEth в самой пробе,

позволяя транспортировать пробу без меток биологической опасности в обычном конверте и без охлаждения. Были разработаны несколько DBS методов для мониторинга PEth, которые показали применимость их определения в «сухих пятнах крови». Протокол включал ручную вырезку дисков с карточек DBS и процедуру пробоподготовки, включая инкубацию, центрифугирование и УЗ-обработку (14–16).

Целью данной работы была разработка метода с полностью автоматической пробоподготовкой, экстракцией и вводом пробы в ВЭЖХ-МС/МС систему для количественной оценки двух PEth, присутствующих более всего в пробе: PEth 16:0/18:1 и PEth 16:0/18:2. Основное внимание было уделено системе с высокой пропускной способностью и минимальным временем цикла. Автоматизация анализа была реализована с помощью системы CAMAG DBS-MS 500 и ВЭЖХ с тройным квадрупольным масс-спектрометром.

Экспериментальная часть

Реактивы и стандарты

Синтез внутренних стандартов для определения PEth (16:0/18:1- D_5 и PEth 16:0/18:2- D_5) был выполнен как описано в (17). Растворы внутренних стандартов готовили растворением обоих чистых компонентов в 2-пропанол.

Ацетат аммония (Fractorip) и метанол с чистотой Reag. Ph Eur (European Pharmacopoeia) произведены компанией Merck (Darmstadt, Germany). 2-пропанол, чистоты HPLC grade приобретен в компании Fisher Chemical (Reinach, Switzerland). Ацетонитрил (р. а.) заказывали в Acros Organics (Geel, Belgium). Аттестованные растворы фосфатидилэтанола 16:0/18:1 и 16:0/18:2 куплены в Cerilliant (Round Rock, USA) и Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, USA). Муравьиная кислота (puriss p.a. 98%) приобреталась в Sigma-Aldrich (Buchs, Switzerland). Деионизованную воду получали в системе Milli-Q производства Millipore (Billerica, USA). Использовались DBS карточки марки BioSample TFN filter paper производства Ahlstrom (поставлены компанией CAMAG, Switzerland).

Калибраторы и контрольные образцы

Для оценки PEth использовали 6 калибраторов, которые готовили из растворов с концентрацией 20, 75, 188, 375, 750 и 1,500 нг/мл (К1–К6). Для верификации калибровочной кривой использовали три контрольных стандарта с концентрациями 20, 45 и 1,180 нг/мл (QC1–QC3). В пробы крови объемом 240 мкл непьющих людей (не содержащей PEth) вводили 10 мкл раствора, содержащего PEth 16:0/18:1 и PEth 16:0/18:2 в 2-пропанол. Затем пробу подвергали перемешиванию в течение 4 часов. После этого 20 мкл пробы наносили на карточку DBS. Перед экстракцией карточку высушивали в течение 3 часов. Для хранения карточку DBS помещали в пакет с осушителем (силикагелем) и пакет хранили в холодильнике при -20°C .

Конфигурация серий и стратегия контроля качества

Для обеспечения надежности измерений и контроля автоматических систем, каждая партия анализов должна включать как минимум один комплект из 6-ти калибраторов (К1–К6), контрольную пробу для каждой концентрации (QC1–QC3), негативный контроль (с и без внутреннего стандарта) и холостую пробу (пустую карточку).

Автоматическая экстракция проб

Система DBS-MS 500 system (CAMAG, Швейцария) была подключена к ТФЭ-ВЭЖХ-МС/МС системе. Для экстракции использовали раствор: вода, ацетонитрил, 2-пропанол и

муравьиная кислота (34.5:15:50:0.05, об/об/об/об). Каждое пятно фотографировалось встроенной камерой до и после экстракции для проверки наличия пятна, юстировки положения экстракционного плунжера и верификации, что экстракция выполнена корректно. Раствор внутреннего стандарта (20 мкл), содержащий дейтерированные аналоги PEth наносился распылением с помощью форсунки равномерным слоем на каждое пятно. В отличие от внесения внутреннего стандарта в раствор пробы, эта процедура позволяет компенсировать погрешность при экстракции (степень извлечения) (18). Затем карточка высушивается в течение 30 с, после чего производилась экстракция с помощью экстракционной головки диаметром 4,2-мм растворителем объемом 40 мкл со скоростью потока 40 мкл/мин. После экстракции, головка и все капилляры промываются 3 раза по 20с с помощью модуля промывки. Раствор для промывки 1 (85% 2-пропанол, 15% вода (об/об), содержащий 13 мМ ацетата аммония), промывочный раствор 2 (50% вода, 50% ацетонитрил (об/об)) и промывочный раствор 3 (2-пропанол).

DBS экстракция вручную

На DBS карточки наносили 20 мкл крови. Для компенсации погрешности экстракции внутренний стандарт наносили распылением с помощью системы CAMAG DBS-MS 500. С карточки вырезали диски и выполняли экстракцию в микропробирке с 1 мл метанола при встряхивании 4 ч на Vortex-Genie 2 (Scientific Industries Inc., New York, USA). После микропробирки центрифугировали 10 мин при 16,000 g на центрифуге (Mikro 220 R, Hettich, Switzerland). Надосадочный слой переносили в микровial для упаривания и сушили досуха в токе азота при 50°C , затем добавляли 100 мкл растворителя для элюирования (вода, ацетонитрил, 2-пропанол и муравьиная кислота (34.5:15:50:0.05, об/об/об/об)).

Экстракция цельной крови вручную

Для определения PEth в цельной крови, 250 мкл цельной крови смешивали с 100 мкл 2-пропанола и встряхивали на Вортексе. Затем добавляли 150 мкл 2-пропанола и 750 мкл ацетонитрила. Пробу повторно встряхивали на Вортексе 45 мин. Затем ее центрифугировали 10 мин при 16,000 g. Надосадочный слой переносили в стеклянную вial для упаривания и сушили досуха в токе азота при 50°C , затем добавляли 800 мкл растворителя для элюирования (вода, ацетонитрил, 2-пропанол и муравьиная кислота (34.5:15:50:0.05, об/об/об/об)).

ТФЭ-ВЭЖХ-МС/МС анализ

ТФЭ-ВЭЖХ-МС/МС система включала ВЭЖХ UltiMate® 3000 UHPLC (Dionex, Thermo Scientific Instruments, Reinach, Switzerland) подключенный к Sciex 5500 QTRAP (Toronto, Canada) в режиме негативного SRM при $-4,500\text{ В}$, см. Рис 1 и Таблицу I. Сначала аналиты «связываются» полярной RP колонкой 20 мм × 2 мм, 5 мкм (Phenomenex, Brechbühler, Schlieren, Switzerland) которая предварительно промывалась раствором А1 (0.1% муравьиной кислоты). Компоненты, не взаимодействующие с колонкой, попадали в слив. После элюирования в течение 0.25 мин раствором 100% В1 (70% ацетонитрил, 30% вода, об/об, содержащий 2 мМ ацетата аммония) в течение периода 2.25 мин, с помощью 10-портового крана UHPLC система переключается с положения «слив» в положение «колонка» на 0.8 мин. Аналитическая колонка Luna RP-C5, 50 мм × 2 мм, 5 мкм (Phenomenex, Brechbühler, Schlieren, Switzerland) термостатируемая при 60°C .

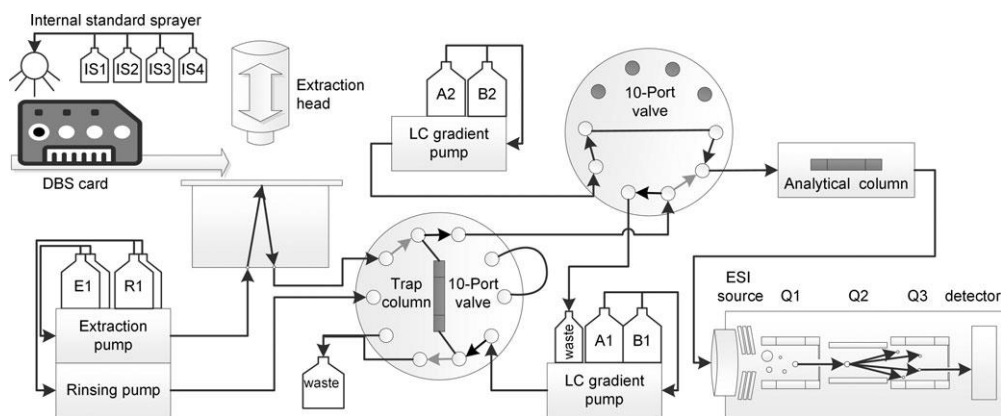


Рис. 1. Конфигурация автоматической системы DBS-MS 500. Внутренний стандарт распыляется на карточку, затем идет экстракция и концентрирование пробы на ТФЭ-колонке. ВЭЖХ обеспечивает требуемое разделение перед вводом пробы в tandemный масс-спектрометр. Черные стрелки индицируют направление потоков при экстракции, а серые при элюировании.

Таблица 1. Параметры настройки мониторинга (SRM) для PEth 16:0/18:1 и PEth 16:0/18:2

Компонент	Q1 [m/z]	Q3 [m/z]	Время пребывания [мс]	DP [В]	EP [В]	CE [В]	CXP [В]	RT [мин]
PEth 16:0/18:1 SRM 1	701.3	255.2	20	-32	-10	-40	-14	3.53
PEth 16:0/18:1 SRM 2	701.3	281.3	20	-20	-10	-40	-14	
PEth 16:0/18:1-D ₅ SRM 1	706.3	255.3	20	-20	-10	-40	-14	
PEth 16:0/18:1-D ₅ SRM 2	706.3	281.1	20	-32	-10	-40	-14	
PEth 16:0/18:2 SRM 1	699.5	279.4	20	-5	-10	-40	-14	3.29
PEth 16:0/18:2 SRM 2	699.5	255.3	20	-5	-10	-40	-14	
PEth 16:0/18:2-D ₅ SRM 1	704.5	279.5	20	-5	-10	-40	-14	
PEth 16:0/18:2-D ₅ SRM 2	704.5	255.3	20	-5	-10	-40	-14	

Проточный фильтр (KrudKatcher Ultra, Phenomenex) был установлен перед аналитической колонкой. Аналитическую колонку кондиционировали элюентом A2 (30% вода, 70% ацетонитрил, об/об, содержащим 0.6 мМ ацетата аммония). Кран переключался в исходное положение на 1.7 мин. Затем, выполняли элюирование элюентом B2 (100% 2-пропанол): Градиент был таким: начало 0% B2, увеличение до 25% B2 с 2.0 до 4.0 мин. Затем, 100% B2 от 4.1 до 5.0 мин. Расход для всех насосов был 0.5 мл/мин. Общее время анализа составляло 5 мин. Примеры хроматограмм, см. Рис. 2.

Результаты

Линейность

Линейность была установлена в ходе трех серий, когда калибраторы K1-K6 измерялись дважды. Была выбрана линейная калибровочная модель с весом $1/x^2$. Коэффициент корреляции для SRM1 и SRM2 составил $0,9980 \pm 0,0016$ (диапазон: 0,9954-0,9996) для PEth 16:0/18:1. Коэффициент корреляции для SRM1 и SRM2 составил $0,9974 \pm 0,0005$ (диапазон: 0,9953-0,9982) для PEth 16:0/18:2. Были испытаны расширенные диапазоны калибровки, в результате чего были получены дополнительные калибровочные образцы в диапазоне 1 750, 2 000, 2 250, 2 500 и 3 000 нг/мл. Для всех четырех контролируемых переходов был исследован диапазон до 2500 нг/мл с коэффициентом корреляции не менее 0,9975. ПКО был установлен на уровне 20 нг/мл, так как образцы ниже этой концентрации связаны с легким или нулевым потреблением алкоголя. Погрешность и невоспроизводимость при такой концентрации были ниже 15%. ПД был определен как 10 нг/мл на основании измерений с соотношением сигнал

-шум не менее 3.

Точность и воспроизводимость

В процессе валидации были определены точность и воспроизводимость методом добавок. Шесть отдельных пятен крови в каждой контрольной концентрации были проанализированы в течение трех дней, см. таблицу II. Точность и воспроизводимость оставались в пределах требуемых $\pm 15\%$ во время внутри- и меж-тестовой оценки для всех трех измерений.

Селективность

Хроматография была оптимизирована для обоих аналогов, PEth 16:0/18:1 и PEth 16:0/18:2. Разделение пиков до нулевой линии предотвращает перекрестное влияние между PEth 16:0/18:2- $2 \times ^{13}C$ и PEth 16:0/18:1 (относительная плотность 8,7%). Образцы шести пациентов, воздержавшихся от употребления алкоголя, были исследованы на предмет хроматографических помех. Во всех исследованных пробах не наблюдалось никаких мешающих пиков с тем же временем удерживания, что и у PEth 16:0/18:1 или PEth 16:0/18:2.

Перенос

Перенос тестировали в каждой пробе непосредственно после самого высокого калибратора (K6, 1500 нг/мл) путем инъекции холостой пробы и он составлял до 0,5% (7,5 нг/мл).

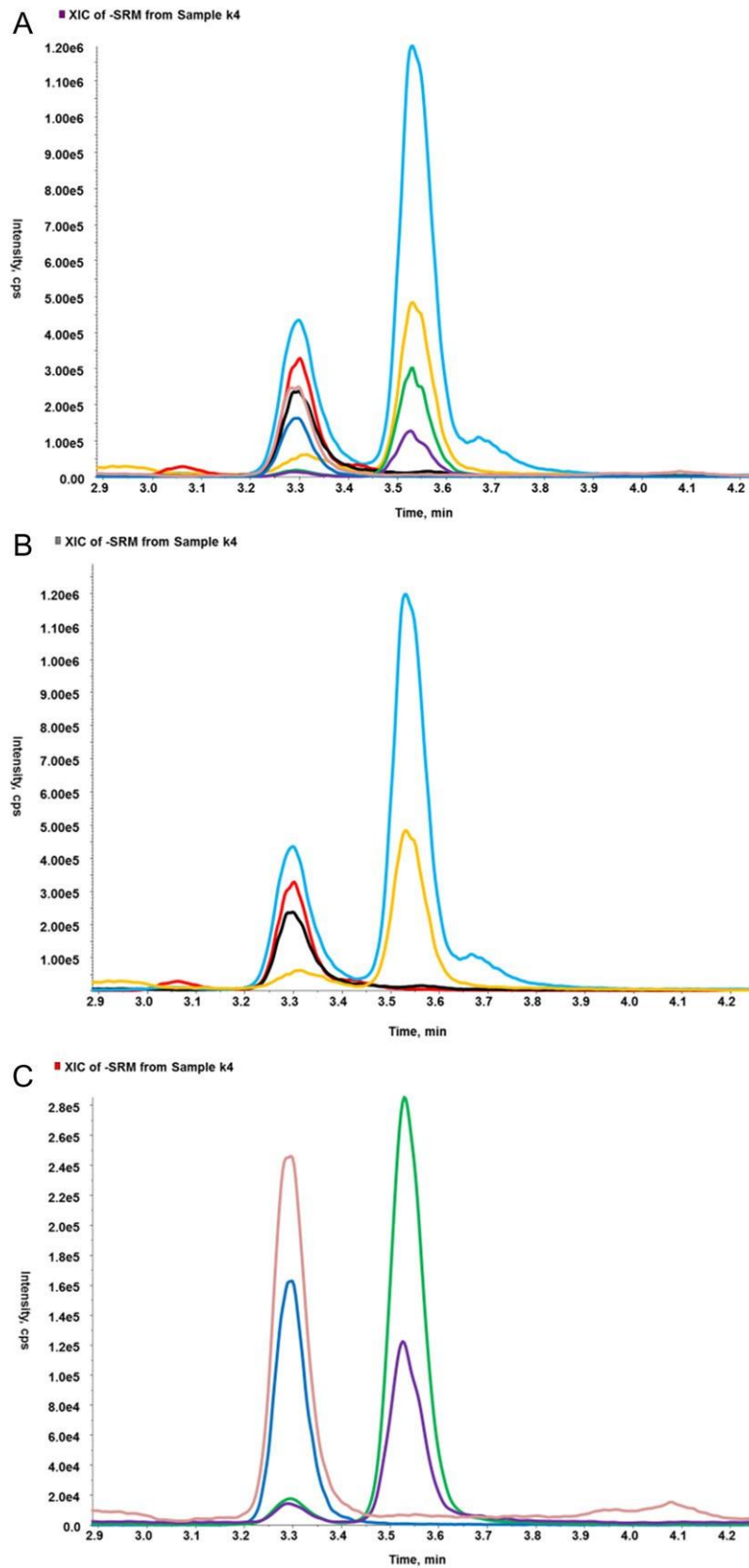


Рис. 2. Хроматограмма для калибратора K4 (375 нг/мл). Часть (A) показывает все SRM переходы. Часть (B) показывает SRM переходы аналитов. Часть (C) показывает SRM переходы внутренних стандартов. Оранжевый: PEth 16:0/18:1 SRM1, Красный: PEth 16:0/18:2 SRM1, Циан: PEth 16:0/18:1 SRM2, Черный: PEth 16:0/18:2 SRM2, Зеленый: PEth 16:0/18:1- D_5 SRM1, Синий: PEth 16:0/18:2- D_5 SRM1, Лиловый: PEth 16:0/18:1- D_5 SRM2, Розовый: PEth 16:0/18:2- D_5 SRM2.

Таблица II. Меж- и внутри-тестовая точность и погрешность, определенные в трех аттестованных опытах с 6-ю контрольными пробами для каждого уровня концентраций

Аналит	Концентрация (нг/мл)	Точность внутри (% , n = 6)	Точность вне (% , n = 3)	Погрешность вне (% , n = 6)	Погрешность внутри (% , n = 3)
PEth 16:0/18:1 SRM 1	20	95–104	100.0	3.7–4.3	4.57
	45	102–106	103.3	2.7–4.6	1.99
	1,180	87–97	91.2	2.5–6	5.69
PEth 16:0/18:1 SRM 2	20	97–101	98.9	2.5–4.3	2.11
	45	97–99	98.5	2.8–6.6	1.16
	1,180	93–104	98.0	2.3–5.1	5.82
PEth 16:0/18:2 SRM 1	20	97–103	99.3	2.8–7.4	3.12
	45	94–105	98.3	3.3–6.7	5.84
	1,180	100–107	103.7	2.9–5.1	2.89
PEth 16:0/18:2 SRM 2	20	97–106	100.8	3.4–8.3	4.52
	45	97–100	99.2	3.2–4.9	1.91
	1,180	93–104	95.1	3.3–6.5	8.14

Эффекты матрицы пробы

Влияние матрицы тестировалось путем ввода экстрактов из шести проб различных чистых образцов с внесенными растворами PEth с концентрацией K3 и K6. Каждая проба готовилась дважды. Концентрацию, определенную с поправкой по внутреннему стандарту сравнивали с образцами, не содержащими матрицы, с введенными дозами PEth с концентрациями K3 и K6. Полученные результаты приведены в Дополнительном материале S1. Изученное влияние матрицы пробы можно считать несущественным. Усиление и подавление ионов были исследованы путем сравнения площади исследуемого вещества без коррекции с внутренним стандартом: на PEth 16:0/18:1 отклик был равен 97–129% и PEth 16:0/18:2 отклик был равен 123–198%.

Эффективность экстракции

Эффективность экстракции была оценена путем повторной экстракции карточек калибраторов. Таким образом, пробы калибратора K4–K6 (375–1500 нг/мл) были проэкстрагированы шесть раз. Таким образом, площадь пика каждого аналита для каждой экстракции сравнивалась с общей площадью пика аналита, полученной после шести экстракций. Для PEth 16:0/18:1, средняя эффективность экстракции составляет 89% после первой экстракции и 7% после второй экстракции. Для PEth 16:0/18:2 средняя эффективность экстракции составила 88% после первой экстракции и 8% после второй экстракции.

Нанесение внутреннего стандарта

Для исследования как влияет время после нанесения внутреннего стандарта на результат измерения сравнивались два различных подхода: в первом случае, прямое нанесение внутреннего стандарта перед экстракцией, во-втором, нанесение внутреннего стандарта за 8 часов до экстракции.

Количественная оценка проб AUD пациентов, различий не наблюдалось: средняя корреляция $105 \pm 10\%$ ($R = 0.9821$) для PEth 16:0/18:1 SRM1 и $101 \pm 10\%$ ($R = 0.9832$) для PEth 16:0/18:1 SRM2. Для PEth 16:0/18:2 SRM1, средняя корреляция $93 \pm 10\%$ ($R = 0.9897$), и для PEth 16:0/18:2 SRM2 = $95 \pm 16\%$ ($R = 0.9877$).

Сравнение для PEth в цельной жидкой крови

Также было проведено сравнение результатов полностью автоматизированной экстракции с определением PEth в цельной жидкой крови для 28 проб AUD пациентов.

Сравнение показало, что результаты PEth, полученные с помощью обоих методов, являются сопоставимыми: для PEth 16:0/18:1 SRM1 средняя корреляция $100 \pm 9\%$ (диапазон: 84–128%), и для PEth 16:0/18:1 SRM2 средняя корреляция $101 \pm 9\%$ (диапазон: 81–122%). Для PEth 16:0/18:2 SRM1 средняя корреляция $98 \pm 8\%$ (диапазон: 87–118%), и для PEth 16:0/18:2 SRM2 средняя корреляция $99 \pm 9\%$ (диапазон: 82–116%). Линейность обоих методов определения PEth была высокой, см. Рис 3.

Сравнение ручной и автоматической DBS экстракции

Для сравнения полностью автоматической экстракции с DBS экстракцией вручную было выполнено сравнение для 28 DBS проб AUD пациентов.

Сравнение экстракции вручную и полностью автоматической экстракции показало, что результаты определения PEth обоими методами сравнимы: для PEth 16:0/18:1 SRM1 средняя корреляция $108 \pm 11\%$ (диапазон: 87–125%), и для PEth 16:0/18:1 SRM2 средняя корреляция $107 \pm 10\%$ (диапазон: 87–126%). Для PEth 16:0/18:2 SRM1 средняя корреляция $96 \pm 10\%$ (диапазон: 75–117%), и для PEth 16:0/18:2 SRM2 средняя корреляция $95 \pm 10\%$ (диапазон: 79–118%). Линейность обоих методов определения PEth была высокой, см. Рис 4.

Обсуждение

Целью данного исследования была разработка метода для полностью автоматизированной пробоподготовки, экстракции и количественной оценки PEth 16:0/18:1 и PEth 16:0/18:2 методом ВЭЖХ-МС/МС. В отличие от анализа наиболее распространенного PEth 16:0/18:1, представленный метод имеет явное преимущество: количественное определение двух наиболее распространенных PEth гомологов позволяет определить результат за один опыт. При воздержании, оба аналога присутствуют в низкой концентрации; у AUD пациентов оба аналога присутствуют в повышенных концентрациях.

В процессе валидации автоматический метод экстракции доказал свою надежность для определения PEth в пробах. Метод имеет хорошую линейность, точность и воспроизводимость. Коэффициент корреляции линейной калибровки составил не менее 0.9953. Точность и воспроизводимость были ниже требуемых значений $\pm 15\%$ для всех контролируемых переходов, независимо от меж- или внутри-тестовых испытаний.

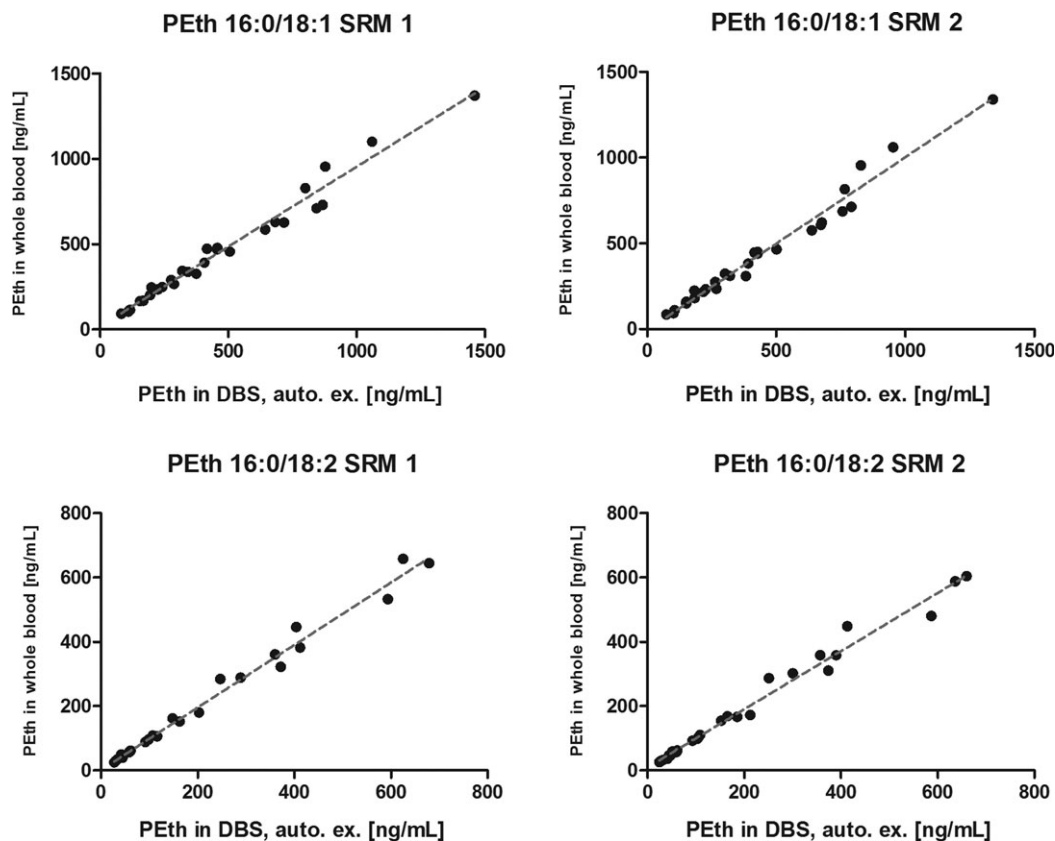


Рис.3. Сравнение концентраций PEth в цельной жидкой крови и при автоматической экстракции DBS карточек для 28 проб AUD пациентов (точки выше ПКО). PEth 16:0/18:1 SRM 1: Наклон: 0.9349 ± 0.02824 ($R=0.9768$), $P < 0.0001$. PEth 16:0/18:1 SRM 2: Наклон: 1.007 ± 0.03102 ($R=0.9759$), $P < 0.0001$. PEth 16:0/18:2 SRM 1: Наклон: 0.9706 ± 0.02339 ($R=0.9863$), $P < 0.0001$. PEth 16:0/18:2 SRM 2: Наклон: 0.9029 ± 0.02489 ($R=0.9821$), $P < 0.0001$.

ПКО =20 нг/мл позволяет анализировать образцы со стандартным интервалом с концентрацией, например 35 нг/мл (19).

Кроме того, в образцах крови взятых у здоровых людей не был обнаружено никакого влияния. Использование двух внутренних стандартов для PEth 16:0/18:1 и 16:0/18:2 позволило компенсировать возможное влияние матрицы, возникающее в процессе измерения. Кроме того, нанесение внутреннего стандарта непосредственно на DBS с помощью модуля распыления позволяет компенсировать возможные отклонения при экстракции. По сравнению с DBS экстракцией вручную с пассивной экстракцией путем встряхивания в растворителе, активная экстракция под давлением показала высокую эффективность экстракции - около 90%. Напротив, Kummer et al. сообщили о степени извлечения PEth для DBS экстракции >55% (СКО <18%) (20).

Что касается переноса до 0,5%, мы рекомендуем проводить повторный анализ проб с низким содержанием PEth, если перед этим проводится анализ проб с высокой концентрацией. Другой вариант - экстракция холостого опыта после каждой реальной пробы. Для ручной инъекции жидких экстрактов было проведено сравнительное исследование переноса, в результате которого был сделан вывод о том, что перенос может быть связан с материалом колонки. В общем, PEth, похоже, имеет свойства, которые дают минимальный перенос: Исаксон и др. сообщили о переносе порядка 0,2% для высокопроизводительного метода для цельной крови (19).

Поскольку пробоподготовка осуществляется в автосамплере, то лабораторные работы сводятся к абсолютному минимуму: вручную готовятся только калибратор и контрольные

пробы. Однако, они могут быть выполнены перед анализом, так как было подтверждено, что PEth относительно стабилен на DBS карточках (21). Потенциал автоматической системы для высокопроизводительного анализа PEth обеспечивает короткое время обработки большого количества образцов. При минимальном времени цикла около 8 минут можно проанализировать до 180 проб в день. Этот простой и быстрый метод может привести к более широкому применению PEth в рутинном анализе.

Сравнение результатов анализов AUD пациентов, содержащих эндогенный PEth, было показано, что концентрации PEth, полученные с помощью полностью автоматической системы, сопоставимы с результатами для жидкой цельной крови или ручной DBS экстракции. Это позволяет сравнивать результаты независимо от применяемого метода экстракции. Для сравнения, протокол ручной калибровки и подготовки контрольных проб должен быть продлен, так как наблюдались различия в результатах между аутентичными образцами PEth у AUD пациентов между DBS экстракцией вручную и автоматической DBS экстракцией. Приготовленные вручную контрольные образцы с добавкой PEth не требовали длительной инкубации, так как для этих образцов не наблюдалось различий между методами экстракции. Это означает, что существует разница между PEth внутри клеток крови и экзогенным PEth, который вводится в пробы крови здоровых людей. Однако длительное инкубирование добавки PEth с холостой пробой крови, по-видимому абсорбирует PEth, что приводит к сопоставимым результатам. Поэтому для проверки методов настоятельно рекомендуется проводить тщательную перекрестную проверку различных методов отбора с использованием аутентичных образцов PEth.

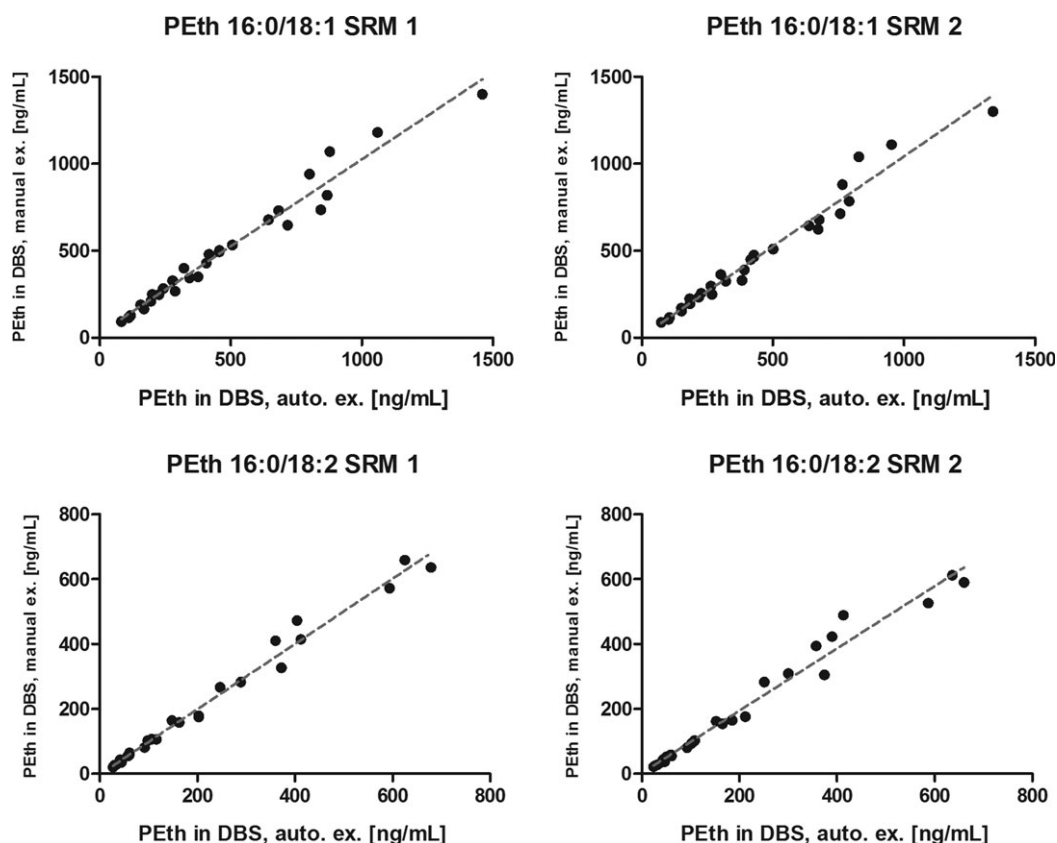


Рис 4. Сравнение DBS экстракции вручную и автоматической DBS экстракции 28 проб AUD пациентов (точки выше ПКО). PEth 16:0/18:1 SRM 1: Slope: 0.9995 ± 0.03644 ($R = 0.9666$), $P < 0.0001$. PEth 16:0/18:1 SRM 2: Наклон: 1.033 ± 0.03613 ($R = 0.9692$), $P < 0.0001$. PEth 16:0/18:2 SRM 1: Наклон: 1.006 ± 0.02542 ($R = 0.9849$), $P < 0.0001$. PEth 16:0/18:2 SRM 2: Наклон: 0.9602 ± 0.03170 ($R = 0.9745$), $P < 0.0001$.

Заключение

Разработан новый метод высокопроизводительного определения PEth в СПК на основе автоматизированного анализа проб с использованием DBS-MS 500 в сочетании с онлайн-ТФЭ-ВЭЖХ-МС/МС.

Аналитический процесс полностью автоматизирован с использованием онлайн-системы анализа DBS-ТФЭ-ВЭЖХ-МС/МС. Пригодность автоматического метода успешно подтверждена и он был применен к реальным образцам.

Результаты, полученные с его помощью сопоставимы таковыми для экстракции вручную из DBS карточек или анализом PEth в жидких образцах крови. Автоматизация с DBS-MS 50 включает в себя возможность идентификации карточки по штрих-коду со ссылкой на лабораторную информационную систему (LIMS).

Дополнительные материалы

Дополнительный материал имеется в он-лайн доступе Journal of Analytical Toxicology.

Благодарности

Благодарим компанию SAMAG за поддержку данных исследований в экспертизе и предоставлении карточек DBS. Кроме того, мы хотели бы выразить нашу признательность коллективу лаборатории судебной токсикологии и химии Института судебной медицины Берна за поддержку в ходе данного исследования. Кроме того, мы хотели бы выразить признательность профессору д-ру Кристофу Стову за его помощь при валидации метода.

Финансирование

Данная работа была выполнена без финансовой поддержки.

Литература

- Luginbühl, M., Weinmann, W., Al-Ahmad, A. (2017) Introduction of sample tubes with sodium azide as a preservative for ethyl glucuronide in urine. *International Journal of Legal Medicine*, 131, 1283–1289.
- Aradottir, S., Seidl, S., Wurst, F.M., Jonsson, B.A.G., Alling, C. (2004) Phosphatidylethanol in human organs and blood: a study on autopsy material and influences by storage conditions. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 28, 1718–1723.
- Hansson, P., Caron, M., Johnson, G., Gustavsson, L., Alling, C. (1997) Blood phosphatidylethanol as a marker of alcohol abuse: levels in alcoholic males during withdrawal. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 21, 108–110.
- Schröck, A., Wurst, F.M., Thon, N., Weinmann, W. (2017) Assessing phosphatidylethanol (PEth) levels reflecting different drinking habits in comparison to the alcohol use disorders identification test—C (AUDIT-C). *Drug and Alcohol Dependence*, 178, 80–86.
- Afshar, M., Burnham, E.L., Kovacs, E.J., Cooper, R.S., Yong, M., Gaydos, J., et al. (2017) Phosphatidylethanol as a biomarker to identify patients with alcohol misuse. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*, 59, 70.
- Nguyen, V.L., Paull, P., Haber, P.S., Chitty, K., Seth, D. (2018) Evaluation of a novel method for the analysis of alcohol biomarkers: ethyl glucuronide, ethyl sulfate and phosphatidylethanol. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*, 67, 7–13.
- Gnann, H., Engelmann, C., Skopp, G., Winkler, M., Auwärter, V., Dresen, S., et al. (2010) Identification of 48 homologues of phosphatidylethanol in blood by LC-ESI-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396, 2415–2423.

8. Gnann, H., Thierauf, A., Hagenbuch, F., Rohr, B., Weinmann, W. (2014) Time Dependence of elimination of different PEth homologues in alcoholics in comparison with social drinkers. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 38, 322–326.
9. Ahn, E.J., Kim, H., Chung, B.C., Kong, G., Moon, M.H. (2008) Quantitative profiling of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in a steatosis/fibrosis model of rat liver by nanoflow liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1194, 96–102.
10. Zheng, Y.F., Beck, O., Helander, A. (2011) Method development for routine liquid chromatography-mass spectrometry measurement of the alcohol biomarker phosphatidylethanol (PEth) in blood. *Clinical Chimica Acta*, 412, 1428–1435.
11. Simon, T.W. (2018) Providing context for phosphatidylethanol as a biomarker of alcohol consumption with a pharmacokinetic model. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 94, 163–171.
12. Maenhout, T.M., De Buyzere, M.L., Delanghe, J.R. (2013) Non-oxidative ethanol metabolites as a measure of alcohol intake. *Clinical Chimica Acta*, 415, 322–329.
13. Bendroth, P., Kronstrand, R., Helander, A., Greby, J., Stephanson, N., Krantz, P. (2008) Comparison of ethyl glucuronide in hair with phosphatidylethanol in whole blood as post-mortem markers of alcohol abuse. *Forensic Science International*, 176, 76–81.
14. Faller, A., Richter, B., Kluge, M., Koenig, P., Seitz, H.K., Thierauf, A., et al. (2011) LC-MS/MS analysis of phosphatidylethanol in dried blood spots versus conventional blood specimens. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401, 1163–1166.
15. Jager, N.G.L., Rosing, H., Schellens, J.H.M., Beijnen, J.H. (2014) Procedures and practices for the validation of bioanalytical methods using dried blood spots: a review. *Bioanalysis*, 6, 2481–2514.
16. Sadones, N., Capiou, S., De Kesel, P.M.M., Lambert, W.E., Stove, C.P. (2014) Spot them in the spot: analysis of abused substances using dried blood spots. *Bioanalysis*, 6, 2211–2227.
17. Luginbühl, M., Willem, S., Schürch, S., Weinmann, W. (2018) Formation of phosphatidylethanol from endogenous phosphatidylcholines in animal tissues from pig, calf, and goat. *Forensic Science International*, 283, 211–218.
18. Velghe, S., Delahaye, L., Stove, C.P. (2018) Is the hematocrit still an issue in quantitative dried blood spot analysis? *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 163, 188–196.
19. Isaksson, A., Walther, L., Hansson, T., Andersson, A., Stenton, J., Blomgren, A. (2017) High-throughput LC-MS/Ms method for determination of the alcohol use biomarker phosphatidylethanol in clinical samples by use of a simple automated extraction procedure—preanalytical and analytical conditions. *The Journal of Applied Laboratory Medicine*, 2, 880–892.
20. Kummer, N., Ingels, A.S., Wille, S.M., Hanak, C., Verbanck, P., Lambert, W.E., et al. (2016) Quantification of phosphatidylethanol 16:0/18:1, 18:1/18:1, and 16:0/16:0 in venous blood and venous and capillary dried blood spots from patients in alcohol withdrawal and control volunteers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408, 825–838.
21. Faller, A., Richter, B., Kluge, M., Koenig, P., Seitz, H.K., Skopp, G. (2013) Stability of phosphatidylethanol species in spiked and authentic whole blood and matching dried blood spots. *International Journal of Legal Medicine*, 127, 603–610.