

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФОСФАТИДИЛЭТАНОЛА В КРОВИ

А.В. Шуриберко, Ю.Е. Разводовский

РНИУП «Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси», г. Гродно, Беларусь

METHOD FOR THE DETERMINATION OF PHOSPHATIDILETHANOL IN THE BLOOD

A.V. Shuriberko, Y.E. Razvodovskiy

Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds
of the National Academy of Sciences of Belarus, Grodno, Belarus

Сведения об авторах:

Шуриберко Алексей Владимирович (SPIN-код: 6620-9130, AuthorID: 1120240). Место работы и должность: заведующий сектором молекулярной генетики отдела медико-биологических проблем алкоголизма РНИУП «Институт биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси». Адрес: Республика Беларусь, г. Гродно, пл. Антония Тызенгауза, 7. Электронная почта: shuriberko@ibiochemistry.by

Разводовский Юрий Евгеньевич – к.м.н. (SPIN-код: 3373-3879; ResearcherID T-8445-2017; ORCID iD: 0000-0001-7185-380X). Место работы и должность: заведующий отделом медико-биологических проблем алкоголизма РНИУП «Институт биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси». Адрес: Республика Беларусь, 230009, г. Гродно, ул. Бульвар Ленинского Комсомола, 50. Электронная почта: razvodovskiy@tut.by

Представлен новый метод количественного определения 16:0/18:2 фосфатидилэтанола (ФЭ) в цельной крови, основанный на обработке образца 2-пропанолом и последующим анализе методом жидкостной хроматографии – тандемной трехкврупольной масс-спектрометрии с предварительным разделением на хроматографической колонке C18. Диапазон определяемых концентраций 16:0/18:2 фосфатидилэтанола 1-2000 нг/см³ (0,0014-2,7588 мкмоль/дм³).

Ключевые слова: фосфатидилэтанол, жидкостная хроматография – тандемная масс-спектрометрия

В настоящее время ведется активная разработка методов лабораторной диагностики хронической алкогольной интоксикации с использованием биохимических маркеров [1]. Фосфатидилэтанол (ФЭ) представляет собой группу гомологов глицерофосфолипидов, где фосфолипазой-D этанол присоединен в положение, обычно занимаемое аминспиртом [2]. Данный фосфолипид синтезируется при неокислительном метаболизме этанола и накапливается в составе мембран эритроцитов. Поскольку ФЭ образуется только в присутствии этанола, диагностическая специфичность ФЭ в теории составляет 100% [3].

Содержание ФЭ повышается даже при разовом употреблении алкоголя ($t_{max} \sim 8$ ч), при этом период его полувыведения составляет 4-10 дней [3-5]. В случае хронического злоупотребления алкоголем ФЭ накапливается в крови и может быть определен в течение 28 дней после последнего приема алко-

голя [6]. Имеющиеся данные говорят о преимуществе ФЭ по сравнению с другими биохимическими маркерами в детекции хронического злоупотребления алкоголем, поскольку он обладает большей чувствительностью и специфичностью [1, 6, 7].

Наиболее чувствительные методы определения ФЭ в настоящее время основаны на хроматографическом разделении с детекцией на масс-анализаторе [2]. При этом различные модификации методов различаются по чувствительности (0,7-280 нг/мл) [8]. В качестве исследуемого материала применяется цельная кровь в том числе и по принципу «сухая капля» (DBS-карты) для автоматизированных систем. Большинство описанных методов подготовки образца основаны на жидкость-жидкостной экстракции гексаном или гептаном при предварительной обработке изопропанолом, часто применяет твердофазную экстракцию [11]. Для контроля степени извлечения и корректировки ошибок на эта-

пе пробоподготовки используют внутренний стандарт (дейтерированный ФЭ или фосфатидилбутанол). Разделение анализируемой матрицы чаще производят на обратнo-фазных (RP) колонках, таких как Luna RP-C5, Bonus-RP, Synergi Polar-RP, встречаются модификации и с Acquity UPLC VEN C8, ACE C4 [7-12].

Частую возникают ситуации коммерческой недоступности дейтерированных внутренних стандартов и необходимости закупки хроматографической колонки под внедряемый метод. В то же время, хроматографическое оборудование часто в базовом комплекте поставляется с колонками C18 (октадецилсилан) как самыми универсальными и востребованными под большинство методов.

Целью настоящей работы являлась разработка и адаптация метода определения 16:0/18:2 фосфатидилэтанола без использования внутреннего стандарта на этапе подготовки образца и его определение на распространенной хроматографической колонке с октадециловой фазой (C18) в режиме обратнo-фазного градиентного элюирования.

1. Принцип метода

Метод основан на предварительной экстракции анализируемого вещества из крови изопропанолом (2-пропанолом), его разделение методом обращенно-фазной жидкостной хроматографии на аналитической колонке ZORBAX Eclipse Plus C18 RRHD, 1,8 μm , 2,1x50 мм в режиме градиентного элюирования и последующим масспектрометрическим анализе в режиме мониторинга множественных реакций с использованием перехода 701,5 \rightarrow 281,2 м/з.

Нижний предел определения составляет – 0,1 нг/см³ (0,0001 мкмоль/дм³) в пробе.

Нижний предел измерения составляет – 1,0 нг/см³ (0,0014 мкмоль /дм³) в пробе.

Диапазон определяемых концентраций: 1–2000 нг/см³ (0,0014–2,7588 мкмоль/дм³).

Присутствующие в экстракте коэкстрагирующиеся вещества определению не мешают. Время определения, включая подготовку одного образца, составляет 30-50 мин.

2. Средства измерений, вспомогательное оборудование, реактивы

2.1. Средства измерений:

– Жидкостной хроматограф Agilent 1260 Infinity II в паре с трехкврупольным масс-анализатором Agilent 6420 LC/TQ, (Agilent Technologies, США).

– Весы лабораторные электронные, предел взвешивания 0,01-210 г, погрешность взвешивания 0,3 мг до 200 г. (Ohaus Adventurer RV214, Китай).

– Колбы мерные: 2-25-2; ГОСТ 1770-74

– Колбы конические 1000 см³ ГОСТ 1770-74

– Стаканы химические ГОСТ 1770-74.

– Автоматические дозаторы вместимостью 0,002-0,020 см³, ТУ 9452-003-33189998-2007.

– Автоматические дозаторы вместимостью 0,200-1 см³, ТУ 9452-002-33189998-2007.

– Цилиндры мерные 1000,0 см³, 25,0 см³ ГОСТ 1770-74.

2.2. Вспомогательное оборудование:

– Колонка хроматографическая ZORBAX Eclipse Plus C18 RRHD, 1,8 μm , 2,1x50 мм, (Agilent Technologies, США).

– Защитная предколонка ZORBAX Eclipse Plus C18, 1,8 μm , 2,1x5 мм, (Agilent Technologies, США).

– Фильтры мембранные, d=47 мм, dпор 0,22 мкм PTFE (Millipore, США).

– Установка для мембранной вакуум-фильтрации растворителей.

– Насос водоструйный или электрический вакуумный для установки фильтрации.

2.2.6. Вортекс (V-1plus и V-32, Biosan, Литва).

– Центрифуга с охлаждением, для микропробирок, с ускорением на дне пробирки 15000 g (Heraeus Biofuge Stratos, США).

2.2.8. Микропробирки однократного применения, 1,5 см³, с крышкой, ТУ 9464-015-29508133-2014.

2.3. Реактивы:

– 16:0/18:2 фосфатидилэтанола, 99,7% чистоты (840514P-25mg, AvantiPolarLipids, США).

– Формиат аммония, осч/для UHPLC (10221-25G-F, LiChropur, США).

– Муравьиная кислота, осч/для UHPLC (G2453-85060-1, Agilent Tech., США).

– Вода деионизированная ГОСТ ISO 3696-2013.

– Метанол, осч/для UHPLC (412722, CarloErba, Франция).

– 2-пропанол осч/для UHPLC (P/7508/17, Fisher Chemicals, Бельгия).

Могут быть использованы другие средства измерения и вспомогательное оборудование, а также реактивы, по точности или квалификации чистоты не ниже указанных в методике.

3. Приготовление растворов

3.1. Приготовление элюирующих растворов

Приготовление элюирующего раствора «А»: в отдельную коническую колбу на 1000 см³ отмерят мерным цилиндром на 1000 см³ 400 см³ метанола, затем 100 см³ бидистиллированной воды. Взвешивают 0,3153 г формиата аммония, добавляют его в колбу с водой и метанолом, растворяют круговыми движениями, далее пипеткой на 1 см³ вносят 1 см³ муравьиной кислоты, снова перемешивают. Цилиндром на 1000 см³ отмеряют 500 см³ 2-пропанола и вносят в колбу с предыдущей смесью.

Полученный раствор тщательно перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,22 мкм.

Приготовление элюирующего раствора «В»: в отдельную коническую колбу на 1000 см³ мерным цилиндром на 25 см³ отмеряют 10 см³ бидистиллированной воды, пипеткой вносят 1 см³ муравьиной кислоты и 0,3153 г формиата аммония. Мерным цилиндром на 1000 см³ отмеряют 990 см³ 2-пропанола и вливают его в коническую колбу примерно 1/3 цилиндра, круговыми движениями перемешивают содержимое колбы до полного растворения соли, после чего доливают оставшийся 2-пропанол из цилиндра. Полученный раствор тщательно перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,22 мкм.

Полученные растворы используют в качестве подвижной фазы.

3.2. Приготовление растворов для подготовки проб

Для подготовки проб используют химически чистый 2-пропанол (95-100%)

3.3. Приготовление градуировочных растворов

Приготовление основных стандартных растворов 16:0/18:2 фосфатидилэтанола:

Для приготовления первичных стандартных растворов 16:0/18:2 фосфатидилэтанола готовят смесь метанола 50 % и 2-пропанола 50%.

Вскрывают ампулу с аналитическим стандартом, содержащую 25 мг 16:0/18:2 фосфатидилэтанола, пипеткой вносят в ампулу 2 см³ смеси метанол-2-пропанол и осторожно растворяют содержимое ампулы с использованием вортекса. После растворения добавляют еще 3 см³ смеси метанол-2-пропанол, перемешивают пипеткой. Полученный раствор с концентрацией 5 мг/мл хранят от -80 до -20 °С на протяжении года.

Готовят второй раствор, содержащий 200 мкг/см³, для этого 1 см³ раствора 5 мг/см³ вносят в мерную колбу на 25 см³ и доводят до метки смесью метанол-2-пропанол

Растворы устойчивы при хранении в холодильнике в течение 1 года.

Приготовление смеси градуировочных растворов

Для приготовления градуировочных растворов 16:0/18:2 фосфатидилэтанола используют цельную кровь лабораторных животных (крыса, мышь, морская свинка, кролик) с ЭДТА или гепарином, не содержащую 16:0/18:2 фосфатидилэтанола.

Готовят и маркируют 11 полипропиленовых микропробирок на 1,5 см³. В пробирку №11 вносят 10 мкл градуировочного раствора №2 с концентрацией 16:0/18:2 фосфатидилэтанола 200 мкг/см³ и 990 мкл цельной крови, пробирку закрывают и перемешивают 10 минут на вортексе (2000 об/мин).

В пробирки 10–2 вносят по 500 мкл крови. Далее выполняют серию последовательных разведений, для этого пипеткой отбирают из пробирки №11 500 мкл крови с 16:0/18:2 фосфатидилэтанола и вносят в пробирку №10, перемешивают 10 минут на вортексе (2000 об/мин), из пробирки №10 отбирают 500 мкл и переносят в пробирку №9, и так далее до пробирки №2. Пробирка

№1 остается с чистой кровью. Полученная серия разведений соответствует указанным в таблице 1 концентрациям 16:0/18:2 фосфатидилэтанола. Для перерасчета значений из нг/см³ в мкмоль/дм³ используют умножение на коэффициент 0,001379.

Таблица 1

Соответствие номера градуировочного раствора с концентрацией в нем фосфатидилэтанола

№ градуировочного раствора (пробирки)	Концентрация фосфатидилэтанола в градуировочном растворе, нг/см ³	Концентрация фосфатидилэтанола в градуировочном растворе, мкмоль/дм ³
1	0	0,0000
2	3,91	0,0054
3	7,81	0,0108
4	15,63	0,0216
5	31,25	0,0431
6	62,50	0,0862
7	125,00	0,1724
8	250,00	0,3448
9	500,00	0,6897
10	1000,00	1,3794
11	2000,00	2,7588

Для проведения градуировки используют свежеприготовленные растворы. Готовят и маркируют второй ряд из 11 полипропиленовых микропробирок на 1,5 мл. В каждую пробирку вносят 100 мкл крови из соответствующего разведения, прибавляют 400 мкл 2-пропанола, закрывают и перемешивают в течении 10 минут на вортексе (2000 об/мин). Далее пробирки центрифугируют при 15000 g 10 минут (комнатная температура), после чего пипеткой осторожно отбирают 200 мкл надосадочной жидкости и переносят в 300 мкл вставку в хроматографическую виалу.

4. Установление градуировочной характеристики

Для определения рабочего – диапазона концентраций и линейности функции градуировки выполняют начальную градуировку масс-спектрометра. Её выполняют по одиннадцати рабочим растворам стандарта

фосфатидилэтанола, каждый градуировочный раствор хроматографируют не менее двух раз, начиная с самой низкой концентрации, принимая за результат измерения среднее арифметическое параллельных измерений. Условия хроматографирования при разделении 16:0/18:2 фосфатидилэтанола:

- Хроматографическая колонка ZORBAX Eclipse Plus C18 RRHD, 1,8 μm, 2,1x50 мм с предколонкой ZORBAX Eclipse Plus C18, 1,8 μm, 2,1x5 мм
- Температура колонки 50°C
- Температура термостата сэмплера 10°C
- Объём вводимой пробы 0,005 см³
- Тип сканирования «Dynamic MRM»
- Ион-прекурсор 701,5 m/z
- Ион-продукт 281,2 m/z
- Режим ионизации ESI (negative polarity)
- Температура источника (Gas Temp) 300°C
- Напряжение капилляра (Capillary Voltage) -4000V
- Поток газа (Gas Flow) 11 л/мин
- Небулайзер (Nebulizer) 15 psi
- Напряжение фрагментора (Fragmentor) 180 V
- Коллизионная энергия (Collision Energy) 30 V
- Напряжение ускорителя ячейки (Cell Accelerator Voltage) 7 V

Параметры разделения (бинарного насоса) и скорость потока представлены в таблице 2.

Таблица 2

Параметры работы бинарного насоса при определении фосфатидилэтанола

Время	Элюент «А» %	Элюент «В» %	Скорость потока мл/мин
0,00	100,0	0,0	0,350
1,00	100,0	0,0	0,300
2,00	70,0	30,0	0,300
3,00	25,0	75,0	0,300
7,00	5,0	95,0	0,300
9,00	0,0	100,0	0,300
10,00	0,0	100,0	0,350
12,00 (Stop time)	100,0	0,0	0,350

– Время удержания $6,5 \pm 0,1$ мин.

Для построения градуировочного графика измеряют площади пиков, соответствующие концентрациям фосфатидилэтанола в градуировочных растворах. Функцию градуировки рассчитывают путем анализа линейной регрессии скорректированных площадей пиков.

5. Подготовка анализируемых образцов

Отбирают 100 мкл образца цельной крови в полипропиленовую микропробирку на $1,5 \text{ см}^3$, прибавляют 400 мкл 2-пропанола, закрывают и тщательно перемешивают в течении 10 минут на вортексе (2000 об/мин). Далее пробирку центрифугируют при 15000 g 10 минут (комнатная температура), после чего пипеткой осторожно отбирают 200 мкл надосадочной жидкости и переносят в 300-мкл вставку в хроматографическую виалу. Отобранный в виалу образец должен быть полностью прозрачным (может быть желтоватым) и не содержать посторонних твердых включений или мути.

6. Проведение измерений

Изопропанольные экстракты, полученные при подготовке проб крови в соответствии п.5 анализируют согласно п.4 насто-

ящей методики. Определяют содержание анализируемого вещества, используя программный пакет MassHunter Workstation Software – LC/MS Data Acquisition версии B.09.00 или выше для сбора данных и MassHunter Workstation Software – Quantitative Analysis версии B.09.00 или выше (аналогичной) для автоматической обработки сигналов детекторов.

Для контроля степени чистоты реактивов и правильности работы оборудования, а также для предотвращения появления ложно положительных пиков проводят измерение дистиллированной воды, прошедшей процедуру пробоподготовки. Если в контрольном образце обнаруживают любое из анализируемых веществ, выявляют причину и устраняют источники загрязнения. Контроль чистоты системы проверяют в начале работы и после анализа проб.

7. Обработка результатов измерений

Содержание 16:0/18:2 фосфатидилэтанола в пробах определяют, с помощью программного пакета ChemStation A.10.01 и выше для автоматической обработки сигнала детекторов, по методу внешнего стандарта.

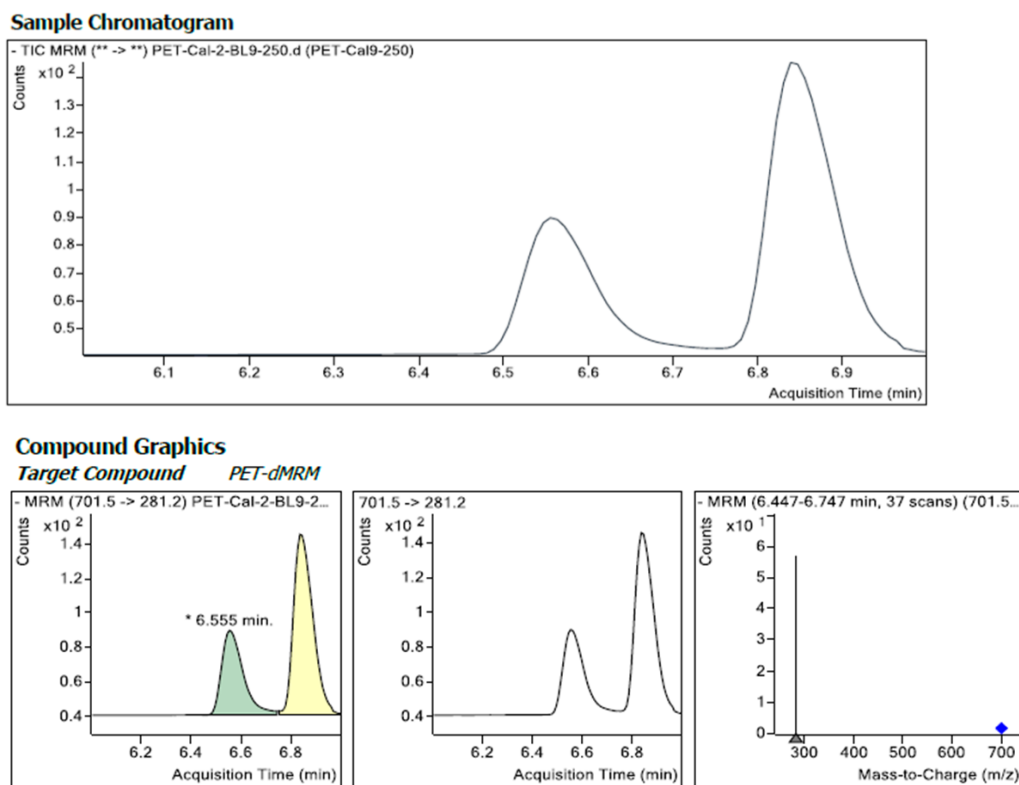


Рис. 1. Типичная хроматограмма ионного тока разделения 16:0/18:2 фосфатидилэтанола в крови.

Calibration Info Target Compound

PET-dMRM

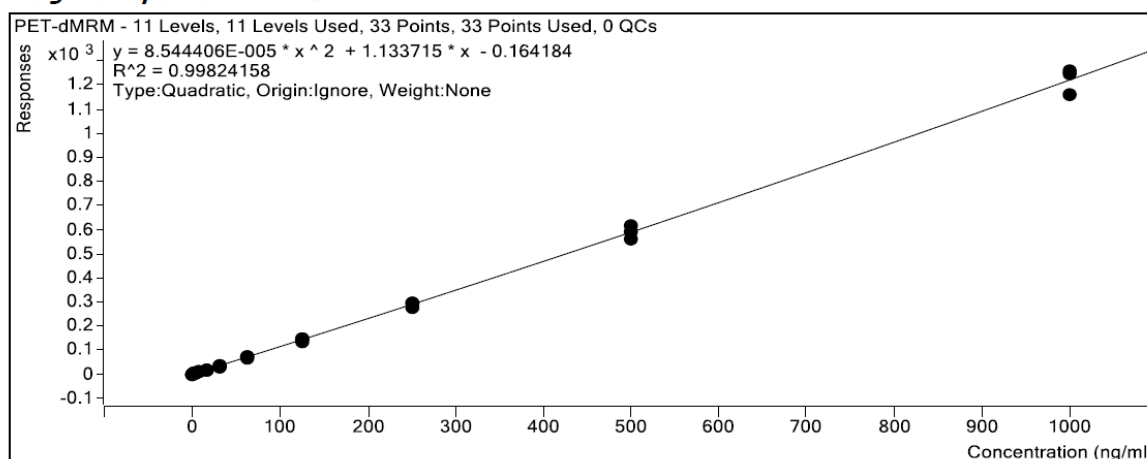


Рис. 2 Градуировочный график определения 16:0/18:2 фосфатидилэтанола.

Программное обеспечение MassHunter Workstation Software – Quantitative Analysis рассчитывает концентрации 16:0/18:2 фосфатидилэтанола в пробе, используя модель невзвешенной линейной регрессии,

На рис. 1 представлена типичная хроматограмма ионного тока разделения 16:0/18:2 фосфатидилэтанола в крови в режиме мониторинга множественных реакций с использованием перехода 701,5→281,2 m/z.

Как видно из хроматограммы, время удержания целевого анализата составляет 6,555 мин., при этом наблюдается интерферирующий пик с таймингом выхода около 6,845 мин, который относительно удален от основного соединения и не мешает анализу. На рисунке 2 показан пример градуировочного графика определения 16:0/18:2 фосфатидилэтанола с использованием для приготовления градуировочных растворов цельной крысиной крови.

Таким образом, нами предложен метод определения 16:0/18:2 фосфатидилэтанола

без использования внутреннего стандарта на этапе подготовки образца и его определение на распространенной хроматографической колонке с октадециловой фазой (C18) в режиме обратно-фазного градиентного элюирования. Представленный режим изопропанольной экстракции с 10-минутным перемешиванием позволяет достичь установления равновесной концентрации целевого анализата в экстрагируемом материале и растворителе с коэффициентом разбавления – 5. Для приготовления калибровочных (градуировочных) растворов нами предложено использовать кровь животных, не содержащую фосфатидилэтанола, которая в дальнейшем проходит аналогичную обработку, как и исследуемый образец, что не требует в последующем применять поправочные коэффициенты на разбавление образца при экстракции.

Литература:

1. Разводовский Ю.Е. Биохимические маркеры алкогольной зависимости. *Наркология*. 2020; 19 (1): 85–92.
2. Schröck A., Thierauf-Emberger A, Schürch S, Weinmann W. Phosphatidylethanol (PEth) detected in blood for 3 to 12 days after single consumption of alcohol – a drinking study with 16 volunteers. *International Journal of Legal Medicine*. 2017; 131: 153–160.
3. Gnann, H., Weinmann W., Thierauf A. Formation of phosphatidylethanol and its subsequent elimination during an extensive drinking experiment over 5 days. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 2012; 36 (9): 1507–1511.
4. Varga A., Hansson P., Johnson G., Alling C. Normalization rate and cellular localization of phosphatidylethanol in whole blood from chronic alcoholics. *Clinica Chimica Acta*. 2000; 299 (1-2): 141–150.
5. Wurst F.M., Thon N., Aradottir S., Hartmann S., Wiesbeck G.A., Lesch O., Skala K., Wolfersdorf M., Weinmann W., Alling C. Clinical study/biomarker: Phosphatidylethanol: normalization during detoxification, gender aspects and correlation with other bi-

- omarkers and self-reports. *Addiction Biology*. 2009; 15 (1): 88–95.
- Hannuksela M.L., Liisanantti M.K., Nissinen A.E., Savolainen M.J. Biochemical markers of alcoholism. *Requires Authentication*. 2007; 45 (8): 953–961.
 - Barrio P., Gual A., Lligoña A., Teixidor L., Weinmann W., Yegles M., Wurst F.M. Phosphatidylethanol for monitoring alcohol use in liver transplant candidates: an observational study. *J. Clin. Med.* 2020; 9 (9): 3060.
 - Gnann H., Weinmann W., Engelmann C., Wurst F.M., Skopp G., Winkler M., Thierauf A., Auwärter V., Dresen S., Ferreirós Bouzas N. Selective detection of phosphatidylethanol homologues in blood as biomarkers for alcohol consumption by LC-ESI-MS/MS. *J. Mass. Spectrom.* 2009; 44 (9): 1293–1299.
 - Javors M.A., Hill-Kapturczak N., Roache J.D., Karns-Wright T.E., Dougherty D.M. Kechagias S. Phosphatidylethanol Compared with Other Blood Tests as a Biomarker of Moderate Alcohol Consumption in Healthy Volunteers: A Prospective Randomized Study. *Alcohol and Alcoholism*. 2015; 50 (4): 399–406.
 - Kechagias S. Dernroth D.N., Blomgren A., Hansson T., Isaksson A., Walther L., Kronstrand R., Kågedal B., Nystrom F.H. Phosphatidylethanol Compared with Other Blood Tests as a Biomarker of Moderate Alcohol Consumption in Healthy Volunteers: A Prospective Randomized Study. *Alcohol and Alcoholism*. 2015; 50 (4): 399–406.
 - Kummer N. 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. *Anal. Bioanal. Chem.* 2016; 408 (3): 825–838.
 - Nguyen V.L. Paull P. Haber P.S., Chitty K., Seth D. Evaluation of a novel method for the analysis of alcohol biomarkers: Ethyl glucuronide, ethyl sulfate and phosphatidylethanol. *Alcohol*. 2018; 67: 7–13.

METHOD FOR THE DETERMINATION OF PHOSPHATIDILETHANOL IN THE BLOOD

A.V. Shuriberko, Y.E. Razvodovsky

Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus, Grodno, Belarus

Abstract:

A new method for the quantitative determination of 16:0/18:2 phosphatidylethanol (PhE) in whole blood is presented, based on the treatment of the sample with 2-propanol and subsequent analysis by liquid chromatography - tandem triple quadrupole mass spectrometry with preliminary separation on a C18 chromatographic column. The range of determined concentrations of 16:0/18:2 phosphatidylethanol is 1-2000 ng/cm³ (0.0014-2.7588 μmol/dm³).

Keywords: phosphatidylethanol, liquid chromatography – tandem mass spectrometry

Вклад авторов:

A.V. Шуриберко: анализ полученных данных, написание и редактирование текста рукописи;
Ю.Е. Разводовский: обзор и перевод публикаций по теме статьи.

Authors' contributions:

A.V. Shuriberko: analysis of material, writing and editing the text of the manuscript;
Y.E. Razvodovsky: review of publications on the topic of the article.

Финансирование: Данное исследование не имело финансовой поддержки.

Financing: The study was performed without external funding.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Статья поступила / Article received: 22.10.2022. Принята к публикации / Accepted for publication: 19.11.2022.

Для цитирования: Шуриберко А.В., Разводовский Ю.Е. Метод определения фосфатидилэтанола в крови. *Академический журнал Западной Сибири*. 2022; 18 (4): 36-42. DOI: 10.32878/sibir.22-18-04(97)-36-42

For citation: Shuriberko A.V., Razvodovsky Y.E. Method for the determination of phosphatidylethanol in the blood. *Academic Journal of West Siberia*. 2022; 18 (4): 36-42. DOI: 10.32878/sibir.22-18-04(97)-36-42 (In Russ)