

Разработка и валидация методики количественного определения фосфатидилэтанола в цельной крови

Петухов А. Е.^{1,2}

к.фарм.н., заведующий химико-токсикологической лабораторией Референс-центра по мониторингу потребления психоактивных веществ¹; доцент, кафедра фармацевтической и токсикологической химии им. А. П. Арзамасцева Института фармации им. А. П. Нелюбина²

Мельник Е. В.²

к.фарм.н., руководитель, научно-образовательный исследовательский центр «ФАРМА-ПРЕМИУМ» Института фармации им. А.П. Нелюбина

Надеждин А. В.^{1,3}

к.м.н., ведущий научный сотрудник¹; доцент³

Тетенова Е. Ю.¹

к.м.н., ведущий научный сотрудник

Суханова А. М.^{1,2}

к.фарм.н., химик-эксперт медицинской организации химико-токсикологической лаборатории Референс-центра по мониторингу потребления психоактивных веществ¹; старший преподаватель кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева Института фармации им. А.П. Нелюбина²

Панкратенко Е. П.¹

медицинский лабораторный техник (фельдшер-лаборант) химико-токсикологической лаборатории Референс-центра по мониторингу потребления психоактивных веществ

Кошкина Е. А.¹

д.м.н., профессор, главный научный сотрудник

1 – ГБУЗ «Московский научно-практический центр наркологии», г. Москва, Российская Федерация

2 – ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), г. Москва, Российская Федерация

3 – ФГБОУ ДПО Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования Минздрава России, г. Москва, Российская Федерация

Автор для корреспонденции: Петухов Алексей Евгеньевич; **e-mail:** a-l-e-x4@yandex.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Введение. Фосфатидилэтанол (PEth) представляет собой фосфолипид, медленно образующийся в клеточных мембранах в результате ферментативной реакции между фосфатидилхолином и этанолом, катализируемой фосфолипазой D. Опубликованные в литературе методики определения фосфатидилэтанола применяют высокоэффективную жидкостную хроматографию с масс-спектрометрическим детектированием как метод, обладающий высокой специфичностью, точностью, прецизионностью и возможностью определения веществ в минимальных концентрациях, что является основополагающим для клинической лабораторной диагностики при осуществлении мониторинга злоупотребления алкоголем населением. **Цель.** Цель исследования заключалась в разработке и валидации методики количественного определения прямого маркера злоупотребления алкоголем фосфатидилэтанола в крови человека. **Материалы и методы.** Количественное определение фосфолипида проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией. **Результаты исследования и их обсуждения.** Разработанная методика была валидирована по параметрам:

селективность, нижний предел количественного определения, линейность, перенос пробы, точность, прецизионность, эффект матрицы, стабильность. Аналитический диапазон составил 0.0025 мкмоль/л – 3.0 мкмоль/л; уровень НПКО PEth 16:0/18:1 был равен 0.0025 мкмоль/л. **Выводы.** Разработанная методика количественного определения фосфатидилэтанола пригодна для применения в лабораторной диагностике с целью проведения популяционного мониторинга при анализе злоупотребления алкоголем.

Ключевые слова: биомаркеры злоупотребления алкоголем, фосфатидилэтанол, ВЭЖХ-МС/МС, валидация

doi: 10.29234/2308-9113-2022-10-3-1-12

Для цитирования: Петухов А. Е., Мельник Е. В., Надеждин А. В., Тетенкова Е. Ю., Суханова А. М., Панкратенко Е. П., Кошкина Е. А. Разработка и валидация методики количественного определения фосфатидилэтанола в цельной крови. *Медицина* 2022; 10(3): 1-12.

Введение

На сегодняшний день проблема высокой летальности по причине острой алкогольной интоксикации и хронического алкоголизма занимает одну из лидирующих позиций в России [1]. В связи с этим актуальным и перспективным является определение прямого биомаркера злоупотребления алкоголем, фосфатидилэтанола (PEth), благодаря его высокой чувствительности и специфичности среди других биомаркеров злоупотребления алкоголем (прямых и непрямых) в рамках лабораторной диагностики [2].

Потребление этанола приводит к появлению PEth в тканях вследствие образования фосфатидилового спирта в результате реакции трансфосфатидилирования под действием фермента фосфолипазы D на фосфатидилхолин и воду в качестве субстратов [3]. В норме фосфатидилхолин превращается в фосфатидную кислоту [4].

Средний период полураспада PEth варьируется от 3 до 12 дней. Концентрация фосфатидилэтанола в крови ≥ 211 нг/мл (300 нмоль/л) указывает на злоупотребление алкоголем, тогда как концентрация PEth ≤ 21 нг/мл (≤ 30 нмоль/л) указывает на низкое потребление алкоголя [5].

В настоящее время определение фосфатидилэтанола в крови проводят с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с тандемным масс-спектрометрическим детектированием благодаря высокой чувствительности и специфичности метода. В литературных источниках описаны методики определения PEth методом жидкостной хроматографии – тандемной масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС/МС) с электроспрейной ионизацией как способ идентификации различных гомологов исследуемого фосфолипида [6]. Кроме того, используют методы жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией высокого разрешения, ультра-ВЭЖХ-МС/МС, метод неводного капиллярного электрофореза [7-12].

Как правило, основным методом пробоподготовки является жидкость-жидкостная экстракция (ЖЖЭ) с использованием в качестве растворителей изопропанола и гексана,

также описаны методики, использующие осаждение белков и твердофазную экстракцию [12-14]. Описан метод 96-ти лунок для быстрого получения более чистых экстрактов [15].

Цель исследования

Цель исследования состояла в разработке и валидации методики количественного определения фосфатидилэтанола в цельной крови для применения в лабораторно-диагностической практике с целью контроля лиц групп риска по злоупотреблению, ремиссии алкоголизма и рецидивов.

Материалы и методы

Хроматографирование и детектирование проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Agilent 1260 (Agilent Technologies, Калифорния, США), оснащенном градиентным насосом G1312B, дегазатором G4225A, автосамплером G1329B, термостатом колонок G1316A и tandemным масс-селективным детектором Agilent 6460 (Agilent Technologies, Калифорния, США) с источником ионизации Jet Stream Electrospray Ionization.

Для исследования были использованы следующие реактивы: PEth 16:0/18:1 (Avanti Polar Lipids, Алабастер, Алабама, США), PEth 16:0/18:1-d5 – внутренний стандарт (ВС) данного исследования (Echelon Biosciences, Солт-Лейк-Сити, США). Метил-трет-бутиловый эфир (MTBE, Merck, Дармштадт, Германия), метанол (HPLC-grade, Scharlau, Сентменат, Испания), ацетонитрил (ACN, HPLC-grade, Acros Organics, Гел, Бельгия), кислота муравьиная, 2-пропанол (IPA) и аммония формиат были приобретены в Sigma-Aldrich (HPLC-grade, Штайнхайм, Германия). Вода высокого качества была получена в лаборатории при помощи системы очистки воды Milli-Q, Merck KGaA (Дармштадт, Германия).

Исходные стандартные растворы PEth и ВС готовили растворением навесок в метаноле; рабочие стандартные растворы – разведением и смешиваем исходных стандартных растворов.

Исходные стандартные растворы хранили при температуре -50°C , а рабочие стандартные растворы при $+4^{\circ}\text{C}$.

Пробоподготовка

Для определения фосфатидилэтанола в цельной крови, 100 мкл крови помещали в пробирку типа Эппендорф, добавляли 100 мкл деионизированной воды, 50 мкл смеси 2-пропанола и ацетонитрила 1:1 (IPA:ACN 1:1), 25 мкл внутреннего стандарта PEth-D5c

концентрацией 1129 нг/мл, 500 мкл смеси метил-третбутилового эфира и 2-пропанола 4:1 (МТВЕ/IPA 4:1), встряхивали на Вортексе в течение 30 секунд. Затем центрифугировали при 14500 об/мин в течение 10 минут при температуре 4° С. Надосадочный органический слой объемом 450 мкл переносили в виалу на 2 мл, выпаривали в шкафу для выпаривания при температуре не выше 40° С, затем добавляли 100 мкл смеси 2-пропанола и ацетонитрила 1:1 (IPA:ACN 1:1), переносили в коническую вставку, закрывали виалу для проведения дальнейшего анализа.

Условия хроматографического разделения и детектирования

Условия хроматографирования и детектирования были подобраны экспериментально.

Для проведения исследования использовали хроматографическую колонку Zorbax Eclipse Plus C18 RRHD (1.8 мкм, 2.1 x 50мм) с предколонкой Zorbax Eclipse Plus C18 (1.8 мкм, 12,5 x 2.1мм) (Agilent Technologies, Калифорния, США). Температура термостата колонок составляла 50° С. В качестве подвижной фазы применяли элюент А (10 мМ водный раствор формиата аммония/ацетонитрил, (20:80, v:v)) и элюент В (2-пропанол) в градиентном режиме элюирования (табл. 1) со скоростью потока 0,4 мл/мин и объемом вводимой пробы 5 мкл. Время анализа для каждого образца составило 11 минут. ВЭЖХ-МС/МС параметры для PEth и внутреннего стандарта PEth-d5 указаны в таблице 2.

Таблица 1. Градиент состава подвижной фазы

Время анализа, мин	Объемная доля элюента А, %	Объемная доля элюента В, %
0.00	90.0	10.0
0.01	50.0	50.0
2.00	50.0	50.0
3.00	0.0	100.0
5.00	0.0	100.0
6.00	90.0	10.0

Таблица 2. ВЭЖХ-МС/МС параметры

Аналит	Время удерживания (мин)	MRM переходы	Напряжение на фрагменторе (В)	Энергия в ячейке соударения (В)	Время выдержки (мс)
PEth 16:0/18:1	3.6	701.8 → 281.3	239	29	200
		701.8 → 255.3		37	
PEth 16:0/18:1-d5 (BC)	3.6	706.8 → 281.3	239	29	200
		706.8 → 255.3		37	

Результаты и обсуждение

Валидация методики

Валидация биоаналитической методики была проведена на основе руководства FDA по следующим параметрам: селективность; нижний предел количественного определения (НПКО); линейность; перенос пробы, точность, прецизионность, эффект матрицы, стабильность (внутри- и межлабораторная) [17].

Селективность

Селективность оценивалась путем сравнения хроматограмм образца холостой биологической матрицы с хроматограммой образца НПКО, содержащего PEth 16:0/18:1 (0.0025 мкмоль/л) и PEth 16:0/18:1-d₅ (1.6 мкмоль/л) (рис. 1,2).

Рис. 1. Хроматограмма PEth 16:0/18:1 и PEth 16:0/18:1-d₅ в цельной крови – холостой биологической матрице.

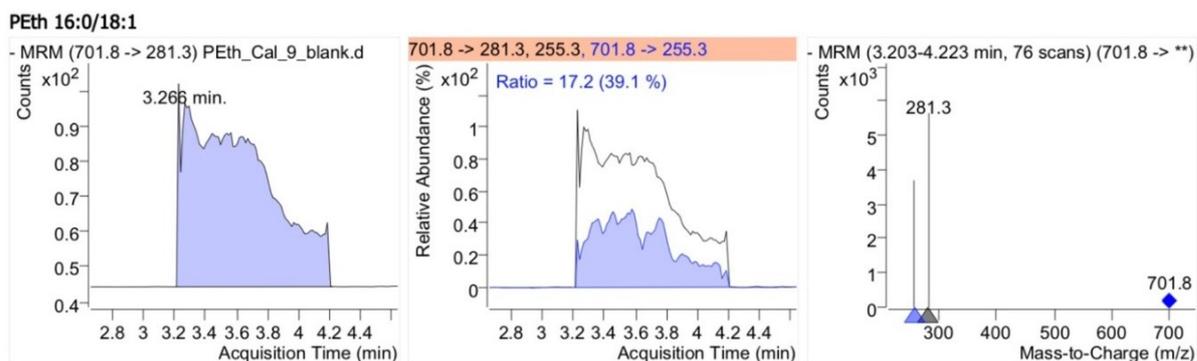
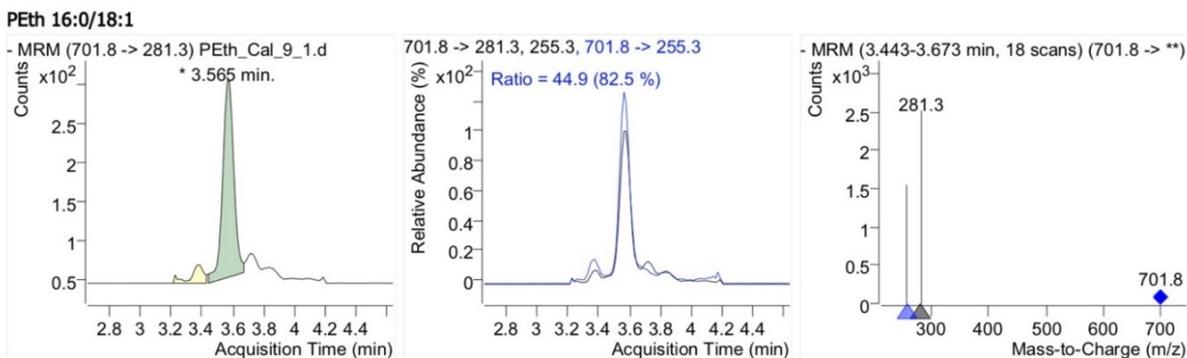


Рис. 2. Хроматограмма PEth 16:0/18:1 и PEth 16:0/18:1-d₅ в цельной крови – биологическая матрица с прибавлением растворов рабочего и внутреннего стандартов.

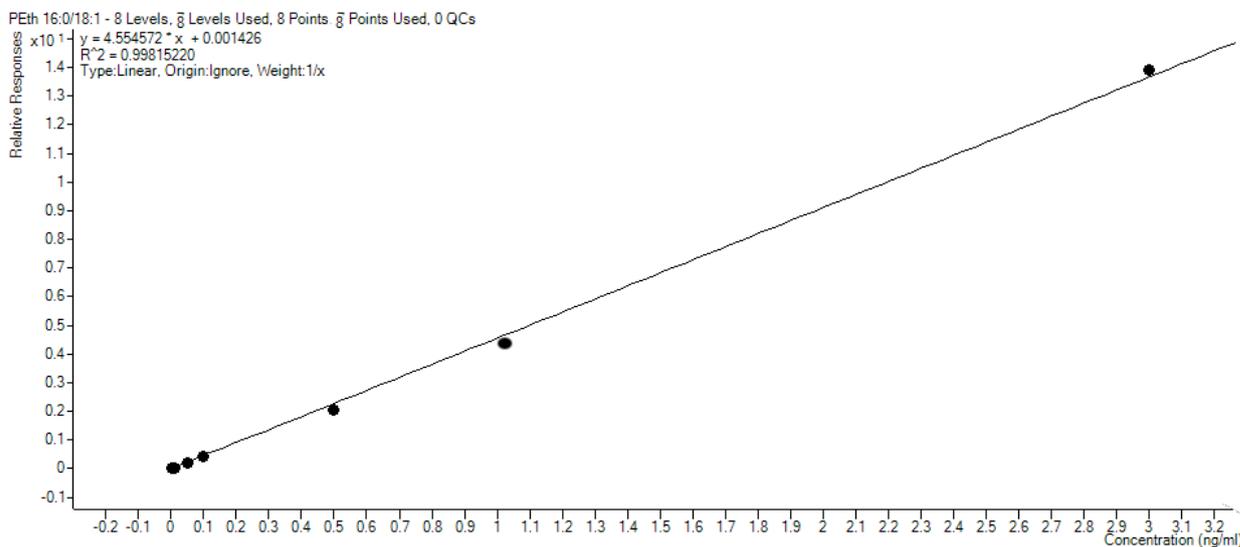


Нижний предел количественного определения и линейность

Линейность подтверждалась в диапазоне концентраций от 0.0025 мкмоль/л до 3.0 мкмоль/л. По полученным значениям был построен калибровочный график в координатах отношение площади пика аналита соответственно к площади пика ВС от отношения концентрации аналита. НПКО методики определяли на основании данных линейности, точности и прецизионности. За НПКО методики принималась минимальная концентрация PEth 16:0/18:1 в цельной крови в диапазоне линейной зависимости, которую можно было количественно определить с приемлемой прецизионностью и точностью, которая составила 0.0025 мкмоль/л. Отношение сигнал/шум по пикам PEth 16:0/18:1, рассчитанное при помощи программного обеспечения Mass Hunter, составило более 10:1.

Калибровочная кривая носила линейный характер во всем диапазоне определяемых концентраций 0.0025 мкмоль/л – 3.0 мкмоль/л. Полученный коэффициент корреляции соответствовал критерию пригодности (не менее 0,99) (рис. 3). Относительная погрешность измерений для калибровочных образцов составила не более 20% для НПКО и не более 15% для остальных точек от номинальных значений.

Рис. 3. Калибровочный график №1 зависимости отношения площади пика PEth 16:0/18:1 к площади пика PEth 16:0/18:1-d₅ от концентрации PEth 16:0/18:1.



Отклонения концентраций калибровочных образцов, рассчитанные по уравнению линейной зависимости от номинальных значений, приведены в таблице 3.

Таблица 3. Отклонения концентраций PEth 16:0/18:1 в калибровочных образцах от их номинальных значений, калибровочный график №1

Концентрация, номинальная, мкмоль/л	Концентрация, рассчитанная, мкмоль/л	E, %	Норма, не более %
0,0025	0,0029	16,00	20
0,005	0,0054	8,00	15
0,01	0,0093	-7,00	15
0,05	0,0469	-6,20	15
0,1	0,0971	-2,90	15
0,5	0,4492	-10,16	15
1	0,9153	-8,47	15
3	3,0567	1,89	15

Перенос пробы

Перенос PEth 16:0/18:1 оценивался при последовательном анализе проб с концентрацией PEth 16:0/18:1 3 мкмоль/л и чистой цельной крови. В результате последовательного анализа на хроматограмме чистой крови отсутствовали пики, соответствующие по времени удерживания PEth 16:0/18:1. Таким образом, перенос пробы не наблюдался.

Точность и прецизионность

Анализ точности и прецизионности методики внутри цикла проводили с использованием пяти образцов холостой цельной крови (n=5) с добавлением рабочих стандартных растворов PEth 16:0/18:1 до получения концентраций 0.0025, 0.0075, 1.5, 2.25 мкмоль/л (QCA, QCB, QCC, QCD). Анализ точности и прецизионности методики между циклами проводили на этих же 4 уровнях концентрации PEth 16:0/18:1 между циклами за три различных дня (n=15). Полученные величины относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (E, %) соответствуют нормам (не более 20% на уровне НПКО, не более 15% – для остальных точек). Полученные результаты позволяют считать методику точной и прецизионной при определении PEth 16:0/18:1 в цельной крови (табл. 4,5).

Таблица 4. Прецизионность и точность методики определения PEth 16:0/18:1 в цельной крови внутри аналитического цикла (n=5)

Концентрация, номинальная, мкмоль/л	Концентрация, рассчитанная, мкмоль/л	RSD, %	E, %
0,0025	0,0030 ± 0,0001	4,38	19,20
0,0075	0,0072 ± 0,0000	0,00	-4,00
1,5	1,6203 ± 0,0051	0,31	8,02
2,25	2,2403 ± 0,0061	0,27	-0,43

Таблица 5. Прецизионность и точность методики определения PEth 16:0/18:1 в цельной крови между аналитическими циклами (n=15)

Концентрация, номинальная, мкмоль/л	Концентрация, рассчитанная, мкмоль/л	RSD, %	E, %
0,0025	0,0029 ± 0,0001	5,00	14,93
0,0075	0,0072 ± 0,0001	1,72	-4,44
1,5	1,5518 ± 0,0523	3,37	3,46
2,25	2,2883 ± 0,0408	1,78	1,70

Эффект матрицы

Эффект матрицы (ME) был оценен на нижнем и верхнем уровнях диапазона линейности PEth 16:0/18:1 (0.0075 мкмоль/л и 2.25 мкмоль/л). Значения ME, а также ME, нормализованного по ВС, для нижнего уровня концентраций составили 95% и 102%, соответственно; для верхнего уровня – 91% и 98%, соответственно. Рассчитанные значения ME удовлетворяют критериям приемлемости.

Стабильность

Проведенные исследования на образцах цельной крови показали, что PEth 16:0/18:1 стабилен при различных условиях хранения. Была показана стабильность PEth 16:0/18:1 при хранении в течение 6 часов при комнатной температуре. Помимо этого, было подтверждено, что хранение при температуре -20° С в течение 4 недель, а также 3 цикла заморозки-разморозки не влияют на стабильность PEth 16:0/18:1.

Заключение

Разработана и валидирована методика количественного определения фосфатидилэтанола в плазме крови методом ВЭЖХ-МС/МС. Аналитический диапазон методики составил 0.0025 мкмоль/л – 3.0 мкмоль/л; уровень НПКО PEth 16:0/18:1 был равен 0.0025 мкмоль/л. Данная методика пригодна для использования в лабораторно-диагностической практике с целью контроля лиц групп риска по злоупотреблению, ремиссии алкоголизма и рецидивам.

Литература

1. Халимова Ю.С., Шокиров Б.С. Морфофункциональные особенности внутренних органов при хроническом алкоголизме. *Научный прогресс* 2022; 3 (2): 782-789.
2. Петухов А.Е., Надеждин А.В., Богstrand С.Т., Брюн Е.А., Раменская Г.В., Кошкина Е.А., Мельник Е.В., Смирнов А.В., Тетенова Е.Ю. Фосфатидилэтанол как биомаркер злоупотребления алкоголем. *Наркология* 2017; (2): 42-47.
3. Aradottir S., Olsson B.L., Methodological modifications on quantification of phosphatidylethanol in blood from humans abusing alcohol, using high-performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection. *BMC Biochemistry* 2005; (6): 18, doi: 10.1186/1471-2091-6-18
4. Литвинова Е.С., Сорокин А.В., Долгарева С.А., Бушмина О.Н., Харченко А.В., Конопля Н.А. Белки и липиды мембраны эритроцитов при острой и хронической алкогольной интоксикации. *Современные проблемы науки и образования* 2017; (2): 115.
5. Hahn J.A., Anton R.F., Javors M.A. The formation, elimination, interpretation, and future research needs of phosphatidylethanol for research studies and clinical practice. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 2016; 40(11): 2292-2295.
6. Петухов А.Е., Надеждин А.В., Bogstrand С.Т., Брюн А.Е., Раменская Г.В., Кошкина Е.А., Мельник Е.В., Смирнов А.В., Тетенова Е.Ю. Сравнительный анализ методик определения фосфатидилэтанола в крови как биомаркера злоупотребления алкоголем. *Судебно-медицинская экспертиза* 2017; (5): 23-26, doi: 10.17116/sudmed201760523-26
7. Nalesso A., Viel G., Cecchetto G., Mioni D., Pessa G., Favretto D., Ferrara S.D. Quantitative profiling of phosphatidylethanol molecular species in human blood by liquid chromatography high resolution mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2011; 1218:8423-8431, doi: 10.1016/j.chroma.2011.09.068
8. Kwak H.S., Han J.Y., Ahn H.K., Kim M.H., Ryu H.M., Kim M.Y., Chung H.J., Cho D.H., Shin C.Y., Velazquez-Armenta E.Y., Nava-Ocampo A.A. Blood levels of phosphatidylethanol in pregnant women reporting positive alcohol ingestion, measured by an improved LC-MS/MS analytical method. *Clinical Toxicology* 2012; 50(10): 886-891, doi: 10.3109/15563650.2012.744997
9. Kummer N., Ingels A.S., Wille S.M., Hanak C., Verbanck P., Lambert W.E., Samyn N., Stove C.P. 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* 2016; 408(3): 825-838, doi: 10.1007/s00216-015-9169-1
10. Nalesso A., Viel G., Cecchetto G., Frison G., Ferrara S.D. Analysis of the alcohol biomarker phosphatidylethanol by NACE with on-line ESI-MS. *Electrophoresis* 2010; 31(7): 1227-1233, doi: 10.1002/elps.200900430
11. Oppolzer D., Barroso M., Gallardo E. Bioanalytical procedures and developments in the determination of alcohol biomarkers in biological specimens. *Bioanalysis* 2016; 8(3): 229-251, doi: 10.4155/bio.15.240
12. Luginbühl M., Stöth F., Schröck A., Gaugler S., Weinmann W. Quantitative determination of phosphatidylethanol in dried blood spots for monitoring alcohol abstinence. *Nature Protocols* 2021; 16(1): 283-308, doi: 10.1038/s41596-020-00416
13. Zhang X., Zheng F., Lin Z., Johansen S., Yu T., Liu Y., Huang Z., Li J., Yan J., Rao Y. Simultaneous determination of ethanol's four types of non-oxidative metabolites in human whole blood by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 2017; 963:68-75, doi: 10.1016/j.aca.2017.01.040
14. Duarte M., Jagadeesan K.K., Billing J., Yilmaz E., Laurell T., Ekstrom S. Solid-phase extraction of the alcohol abuse biomarker phosphatidylethanol using newly synthesized polymeric sorbent materials containing quaternary heterocyclic groups. *Journal of Chromatography A* 2017; 1519:1-8, doi: 10.1016/j.chroma.2017.08.051

15. Berg T., Eliassen E., Jorgenrud B., Kabashi S., Petukhov A.E., Bogstrand S.T. Determination of phosphatidylethanol 16:0/18:1 in whole blood by 96-well supported liquid extraction and UHPLC-MS/MS. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 2019; 33, doi: 10.1002/jcla.22631
16. White D., O'Halloran S.J., Salman S.M., Macquillan G., Joyce D.A. Validation of a liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for erythrocyte phosphatidylethanol revealing critical considerations for its use as a clinical biomarker. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 2022; 1192: 123134, doi: 10.1016/j.jchromb.2022.123134
17. Food and Drug Administration, Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, U.S. Dep Heal. Hum. Serv. 2001, P. 4–10. [Электронный ресурс] Режим доступа: <http://www.labcompliance.de/documents/FDA/FDA-Others/Laboratory/f-507-bioanalytical-4252fnl.pdf> (дата обращения 14.09.2022).

Development and Validation of a Method for Quantitative Determination of Phosphatidylethanol in Whole Blood

Petukhov A. E.^{1,2}

PhD (Pharmacy), Head, Chemical and Toxicological Laboratory of the Reference Center for Monitoring the Use of Psychoactive Substances¹; Assistant Professor, A.P. Arzamastsev Chair for Pharmaceutical and Toxicological Chemistry of A.P. Neljubin Institute for Pharmacy²

Mel'nik E. V.²

PhD (Pharmacy), Head, scientific and educational research center "PHARMA-PREMIUM", A.P. Neljubin Institute for Pharmacy

Nadezhdin A. V.^{1,3}

MD, PhD, Leading Researcher¹; Assistant Professor³

Tetenova E. J.¹

MD, PhD, Leading Researcher

Sukhanova A. M.^{1,2}

PhD (Pharmacy), Chemist-Expert, Chemical-Toxicological Laboratory of the Reference Center for Monitoring the Use of Psychoactive Substances¹; Senior Lecturer A.P. Arzamastsev Chair for Pharmaceutical and Toxicological Chemistry of A.P. Neljubin Institute for Pharmacy²

Pankratenko E. P.¹

Medical Laboratory Technician, Chemical-Toxicological Laboratory of the Reference Center for Monitoring the Use of Psychoactive Substances

Koshkina E. A.¹

Doctor of Medicine, Professor, Head Researcher

1 – Moscow Research and Practical Centre on Addictions of Moscow Department of Public Health, Moscow, Russian Federation

2 – Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

3 – Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russian Federation

Corresponding Author: Petukhov Aleksei; **e-mail:** a-l-e-x4@yandex.ru

Funding: The study had no sponsorship.

Conflict of interest. None declared.

Abstract

Introduction. Phosphatidylethanol (PEth) is a phospholipid slowly forming in cell membranes as a result of the phospholipase D enzymatic reaction between phosphatidylcholine and ethanol. As a result of the analysis of published scientific papers, high performance liquid chromatography with mass spectrometric detection is used to

determine phosphatidylethanol as a method with high specificity, accuracy, precision and the ability to determine substances at minimum concentrations, which is fundamental for clinical laboratory diagnostics when monitoring alcohol abuse in the population. **Aim.** The aim of the study was to develop and validate a method for the quantitative determination of a direct marker of alcohol abuse, phosphatidylethanol, in human blood. **Materials and methods.** Phospholipid was quantified by high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Results of the study and their discussion.** The developed method was validated for the following parameters: selectivity, lower limit of quantitation, linearity, sample transfer, accuracy, precision, matrix effect, stability. The analytical range was 0.0025 $\mu\text{mol/L}$ – 3.0 $\mu\text{mol/L}$; LPCO level PEth 16:0/18:1 0.0025 was equal to $\mu\text{mol/l}$. **Conclusions.** The developed method for the quantitative determination of phosphatidylethanol is suitable for use in laboratory diagnostics in order to monitor the population in the analysis of alcohol abuse.

Keywords: alcohol abuse biomarkers, phosphatidylethanol, HPLC-MS/MS, validation

References

1. Halimova Ju.S., Shokirov B.S. Morfofunkcional'nye osobennosti vnutrennih organov pri hronicheskom alkogolizme. [Morphofunctional features of internal organs in chronic alcoholism]. *Nauchnyj progress [Scientific progress (Russian Federation)]* 2022; 3 (2): 782-789. (In Russ.)
2. Petuhov A.E., Nadezhdin A.V., Bogstrand S.T., Bryun E.A., Ramenskaja G.V., Koshkina E.A., Mel'nik E.V., Smirnov A.V., Tetenova E.Ju. Fosfatidiljetanol kak biomarker zloupotreblenija alkogolem [Phosphatidylethanol as the new alcohol abuse biomarker]. *Narkologija [Narcology]* 2017; (2): 42-47. (In Russ.)
3. Aradottir S., Olsson B.L. Methodological modifications on quantification of phosphatidylethanol in blood from humans abusing alcohol, using high-performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection. *BMC Biochemistry* 2005; (6): 18, doi: 10.1186/1471-2091-6-18
4. Litvinova E.S., Sorokin A.V., Dolgareva S.A., Bushmina O.N., Kharchenko A.V., Konoplyan.A. Belki i lipidy membrany jericitov pri ostroj i hronicheskoj alkogol'noj intoksikacii [Proteins and lipids of the erythrocyte membrane in acute and chronic alcohol intoxication]. *Sovremennye problem nauki i obrazovanija [Modern problems of science and education]* 2017; (2): 115. (In Russ.)
5. Hahn J.A., Anton R.F., Javors M.A. The formation, elimination, interpretation, and future research needs of phosphatidylethanol for research studies and clinical practice. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 2016; 40(11): 2292-2295.
6. Petuhov A.E., Nadezhdin A.V., Bogstrand S.T., Bryun A.E., Ramenskaja G.V., Koshkina E.A., Mel'nik E.V., Smirnov A.V., Tetenova E.Ju. Sravnitel'nyj analiz metodik opredelenija fosfatidiljetanola v krovi kak biomarkera zloupotreblenija alkogolem [The comparative analysis of the methods for the determination of phosphatidylethanol in blood as a biological marker of alcohol abuse]. *Sudebno-medicinskaja ekspertiza [Forensic-medical Examination]* 2017; (5): 23-26, doi: 10.17116/sudmed201760523-26 (In Russ.)
7. Nalesso A., Viel G., Cecchetto G., Mioni D., Pessa G., Favretto D., Ferrara S.D. Quantitative profiling of phosphatidylethanol molecular species in human blood by liquid chromatography high resolution mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2011; 1218:8423-8431, doi: 10.1016/j.chroma.2011.09.068
8. Kwak H.S., Han J.Y., Ahn H.K., Kim M.H., Ryu H.M., Kim M.Y., Chung H.J., Cho D.H., Shin C.Y., Velazquez-Armenta E.Y., Nava-Ocampo A.A. Blood levels of phosphatidylethanol in pregnant women reporting positive alcohol ingestion, measured by an improved LC-MS/MS analytical method. *Clinical Toxicology* 2012; 50(10): 886-891, doi: 10.3109/15563650.2012.744997.
9. Kummer N., Ingels A.S., Wille S.M., Hanak C., Verbanck P., Lambert W.E., Samyn N., Stove C.P. 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* 2016; 408(3): 825-838, doi: 10.1007/s00216-015-9169-1.

10. Nalesso A., Viel G., Cecchetto G., Frison G., Ferrara S.D. Analysis of the alcohol biomarker phosphatidylethanol by NACE with on-line ESI-MS. *Electrophoresis* 2010; 31(7):1227-1233, doi: 10.1002/elps.200900430
11. Oppolzer D., Barroso M., Gallardo E. Bioanalytical procedures and developments in the determination of alcohol biomarkers in biological specimens. *Bioanalysis* 2016; 8(3): 229-251, doi: 10.4155/bio.15.240
12. Luginbühl M., Stöth F., Schröck A., Gaugler S., Weinmann W. Quantitative determination of phosphatidylethanol in dried blood spots for monitoring alcohol abstinence. *Nature Protocols* 2021; 16(1): 283-308, doi: 10.1038/s41596-020-00416
13. Zhang X., Zheng F., Lin Z., Johansen S., Yu T., Liu Y., Huang Z., Li J., Yan J., Rao Y. Simultaneous determination of ethanol's four types of non-oxidative metabolites in human whole blood by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 2017; 963:68-75, doi: 10.1016/j.aca.2017.01.040
14. Duarte M., Jagadeesan K.K., Billing J., Yilmaz E., Laurell T., Ekstrom S. Solid-phase extraction of the alcohol abuse biomarker phosphatidylethanol using newly synthesized polymeric sorbent materials containing quaternary heterocyclic groups. *Journal of Chromatography A* 2017; 1519: 1-8, doi: 10.1016/j.chroma.2017.08.051
15. Berg T., Eliassen E., Jorgenrud B., Kabashi S., Petukhov A.E., Bogstrand S.T. Determination of phosphatidylethanol 16:0/18:1 in whole blood by 96-well supported liquid extraction and UHPLC-MS/MS. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 2019; 33, doi: 10.1002/jcla.22631.
16. White D., O'Halloran S.J., Salman S.M., Macquillan G., Joyce D.A. Validation of a liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for erythrocyte phosphatidylethanol revealing critical considerations for its use as a clinical biomarker. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 2022; 1192: 123134. doi: 10.1016/j.jchromb.2022.123134
17. Food and Drug Administration, Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, U.S. Dep Heal. Hum. Serv. 2018, P. 4-10. Available at: <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf> Accessed: 11.10.2022.