

应用纪要

在法医毒理学研究中使用SPE和UPLC-MS/MS分析全血中的磷脂酰乙醇(PEth)

Jonathan P. Danaceau, Michelle Wood

Waters Corporation



仅适用于法医毒理学应用。

这是一份应用简报，不包含详细的实验部分。

摘要

磷脂酰乙醇(PEth)是测量饮酒量的直接生物标志物，与其他酒精生物标志物相比，具有更高的选择性和相对较长的半衰期，因此近年来受到更多关注。沃特世开发出一种快速、耐用的净化方法从全血中提取PEth 16:0/18:1和16:0/18:2，该方法采用Ostro直通式样品制备板、ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统和Xevo TQ-S micro，能够达到理想的性能和分析灵敏度。

优势

- 采用快速、简单的净化方法从全血中提取PEth
- 分析灵敏度低至10 ng/mL (0.014 μ M)
- 快速完成色谱分离，无残留
- 整个分析范围内的定量结果准确、精密

简介

磷脂酰乙醇(PEth)是饮酒后在细胞膜上形成的一组异常磷脂。据报道，此类化合物存在40多种同系物。全血中丰度最高的PEth为16:0/18:1和16:0/18:2，分别约占总PEth的37%和25%¹。即使是少量饮酒的情况，也可以使用PEth作为直接标志物进行测量，不受年龄、性别和肝病等因素的影响。PEth还可以用于区分饮酒方式和行为，例如鉴别少量或过量饮酒者以及酗酒者。PEth近年来已成为常用的饮酒标志物，因为其检测窗口长达3~4周，而监测尿液中的乙基葡萄糖醛酸苷(EtG)和硫酸乙酯(EtS)的检测窗口仅为3~4天。与其他生物标志物和化合物（例如EtG和EtS）相比，PEth还具有较高的选择性²⁻⁵。戒酒者的基线PEth浓度通常低于10 ng/mL (0.014 μ M)，建议用截止值0.05 μ M表示少量饮酒行为³，浓度高于0.3 μ M (210 ng/mL)表示大量饮酒或酗酒²。但由于这些分子的疏水性非常强且化学性质独特，导致从全血中提取和分析PEth存在一些独特的挑战。

本文详细介绍了一种定量分析PEth的解决方案，该解决方案依次采用固相萃取(SPE)和快速UPLC-MS/MS方法分析全血中的PEth 16:0/18:1和PEth 16:0/18:2。使用Ostro直通式样品制备板通过简单的2步流程（上样和洗脱）进行分析。方法优化表现出独特的多峰保留特性，其同时具有反相和HILIC特性。采用BEH C₈色谱柱，以50:50乙腈:异丙醇组成的强流动相进行洗脱，得到一种快速分离方法，无可检出残留。

实验

材料

PEth 16:0/18:1、PEth 16:0/18:2以及氘代类似物PEth 16:0/18:1-D₅购自Cerilliant（德克萨斯州圆石）。PEth 16:0/18:1-D₅用作两种分子的内标。全血购自Lampire Biological Products（美国宾夕法尼亚州Pipersville）。

方法

经过两个阶段沉淀100 μ L全血。首先加入200 μ L含50 ng/mL氘代内标的异丙醇(IPA)，涡旋混合5~10 s，使样品充分混合。接下来立即加入800 μ L含0.1%甲酸(FA)的乙腈(ACN)，再次涡旋混合。然后将样品在21K rcf下离心10 min，取上清液直接上样至Waters Ostro直通式样品制备板。用400 μ L的60:20:20乙腈:异丙醇:水对样品进行洗脱，洗脱2次。将ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统(FTN)与Xevo TQ-S micro串联四极杆质谱仪联用，分析20 μ L样品。

采用1.7 μ m Waters BEH C₈色谱柱(2.1 \times 50 mm)对分析物进行色谱分离，柱温为40 $^{\circ}$ C。流动相A (MPA)为5 mM甲酸铵（含0.1%甲酸）；流动相B为50:50乙腈:异丙醇。流速为0.5 mL/min。溶剂梯度从50:50 MPA:MPB开始，在3 min内增加至100% MPB。运行分析后，添加两个50:50 MPA:MPB在30 s内增加至100% MPB的快速梯度，尽量减少残留。在ESI-模式下分析样品。对每种化合物监测两个通道。质谱参数见表1。标准曲线浓度范围为10~1000 ng/mL (0.014~1.4 μ M)。从提取回收率、基质效应、线性、准确度、精密度、分析灵敏度、残留、稀释完整性和提取样品稳定性方面验证该方法。

分析物	[M-H] ⁻	MRM	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (eV)
PEth 16:0/18:1	701.6	255.2	10	30
		281.3	10	35
PEth 16:0/18:2	699.6	255.3	10	30
		279.3	10	35
PEth 16:0/18:1-d5	706.6	255.2	10	30
		281.3	10	35

表1.质谱参数

结果与讨论

样品净化

方法优化表明，PEth在Ostero吸附剂上可能存在多峰保留机理。似乎表现出一些HILIC特性，因为需要大量的水(20%)和另一种质子溶剂（甲醇或异丙醇）才能从吸附剂上洗脱PEth。同时，由于PEth的亲脂性高，因此还需要强反相洗脱溶剂。与甲醇相比，使用异丙醇作为第三种助溶剂可以得到更高、更一致的回收率。优化后的最终洗脱溶剂为60:20:20乙腈:水:异丙醇。

该萃取方法的回收率很高，离子抑制效应非常少，能够轻松满足分析灵敏度要求。萃取方法简单高效，获得的样品非常洁净。PEth 16:0/18:2和PEth 16:0/18:1的平均回收率分别为88%和79%。萃取重现性高，所有% RSD均低于10%。基质效应很小，两种分子的基质效应均低于13%。回收率和基质效应结果可参见表2。

批内结果(n = 6)					
分析物	回收率			基质效应	
	平均值	S.D.	%RSD	平均值	S.D.
PEth 16:0/18:1	75.1%	6.9%	9.3%	-12.4%	4.6%
PEth 16:0/18:2	89.6%	2.7%	3.1%	-9.1%	5.7%

批内结果(n = 6)					
分析物	回收率			基质效应	
	平均值	S.D.	%RSD	平均值	S.D.
PEth 16:0/18:1	79.0%	6.1%	7.7%	-7.6%	4.4%
PEth 16:0/18:2	87.8 %	3.0%	3.4%	-6.6%	2.2%

表2.回收率和基质效应

色谱分析

对UPLC-MS/MS方法进行优化，以平衡保留时间和选择性，同时尽量减少残留。使用C₈色谱柱以及由50:50乙腈:异丙醇组成的强流动相B实现这一目的。初步方法开发表明，C₁₈色谱柱的保留性过强，并且仅由乙腈组成的流动相不足以充分洗脱PEth并防止残留。除流动相优化以外，在分析梯度后使用快速的“锯齿”梯度，进一步减小存在残留的可能性。使用本文所述的条件，PEth 16:0/18:1和PEth 16:0/18:2彼此实现基线分离，并与全血中的其他干扰物质实现基线分离。这一点从图1中在PEth 16:0/18:1和PEth 16:0/18:2之后流出的宽峰可以看出。PEth 16:0/18:2和16:0/18:1的保留时间分别为2.54 min和2.64 min。即使在进样高浓度标准品(1000 ng/mL)后也未发现残留。

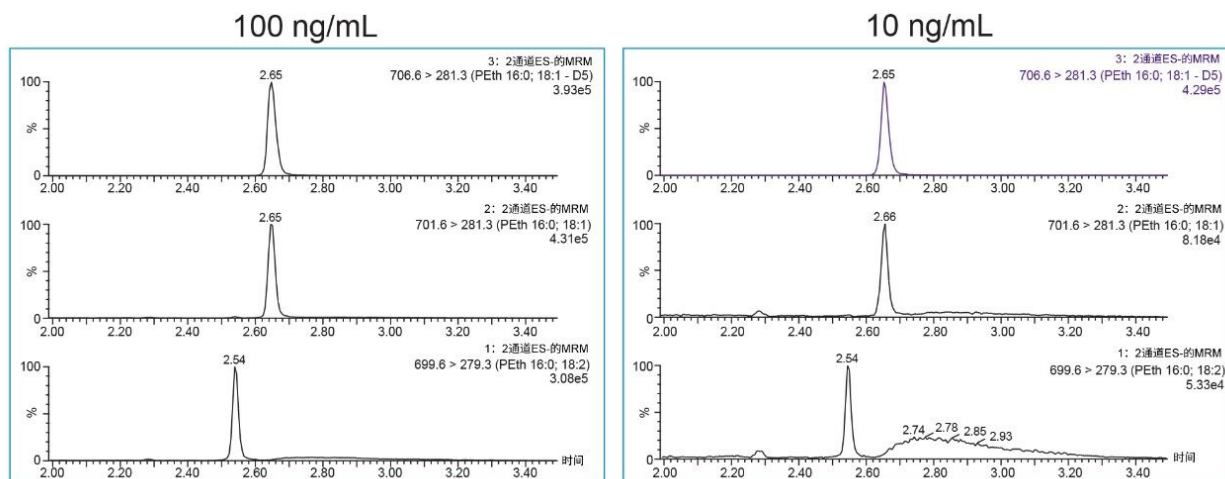


图1.PETh色谱图

定量验证

该方法的分析灵敏度足够高，两种分子的定量限均为10 ng/mL (0.014 μM)，可轻松满足方法要求和文献中报道的检测限^{2,3}。尽管血液基质仅存在很少的PETh (约5 ng/mL)，但是方法验证表明，该方法可轻松区分并准确定量最低校准水平(10 ng/mL)的添加量。该方法在10~1000 ng/mL (0.014~1.4 μM)范围内呈线性。PEth 16:0/18:1和PEth 16:0/18:2的标准曲线见图2。

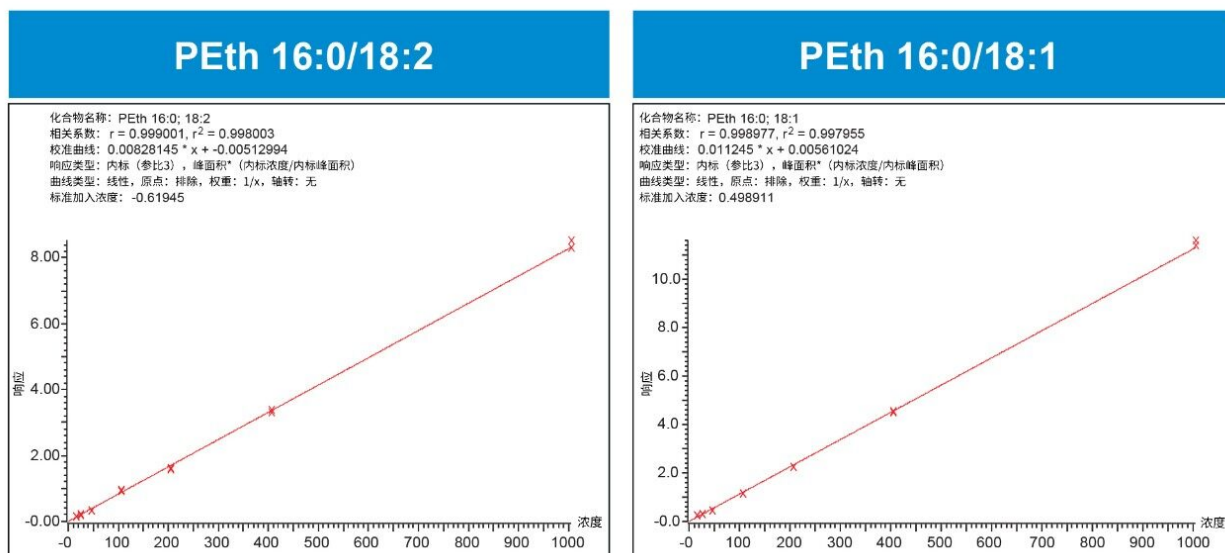


图2.PETh标准曲线

准确度和精密度

准确度和精密度结果见表3。所有准确度均在目标值的15%以内，大部分在10%以内。所有%RSD均低于13%，大部分低于10%。定量限定义为最低校准品浓度(10 ng/mL)，在验证过程中得到证实。准确度在15%以内，%RSD为5.1%。

	低浓度 QC 75 ng/mL		中浓度 QC 250 ng/mL		高浓度 QC 750 ng/mL	
	平均值	%RSD	平均值	%RSD	平均值	%RSD
PEth 16:0/18:1	85.8%	4.1%	91.9%	3.5%	94.0%	10.4%
PEth 16:0/18:2	86.5%	4.6%	91.4%	3.1%	95.0%	12.3%

	低浓度 QC 75 ng/mL		中浓度 QC 250 ng/mL		高浓度 QC 750 ng/mL	
	平均值	%RSD	平均值	%RSD	平均值	%RSD
PEth 16:0/18:1	85.9%	4.0%	95.1%	6.6%	99.5%	1.9%
PEth 16:0/18:2	85.8%	6.9%	93.3%	8.2%	99.8%	2.7%

表3.准确度和精密度

结论

本研究开发出一种定量全血中PEth 16:0/18:1和PEth 16:0/18:2的生物分析方法。该方法先进行蛋白沉淀，然后用Ostro直通式样品制备板进行简单提取。分析使用Waters ACQUITY UPLC系统和Xevo TQ-S micro质谱仪完成，结果表明该方法具有良好的线性、准确度和精密度，无可检出残留，分析灵敏度轻松满足建议的0.05 μM截止水平。

参考资料

1. Helander, N. *et al.* Molecular Species of the Alcohol Biomarker Phosphatidylethanol in Human Blood Measured by LC-MS.2009.*Clin.Chem.*, 55(7):1395–1405.
2. Andreassen, T., *et al.*High Throughput UPLC-MS/MS Method for the Analysis of

- Phosphatidylethanol (PEth) 16:0/18:1, A Specific Biomarker for Alcohol Consumption, in Whole Blood.2018.*J. Anal.Tox.* 42(1): 33–41.
3. Kechevias, S. *et al.* Phosphatidylethanol Compared with Other Blood Tests as A Biomarker of Moderate Alcohol Consumption in Healthy Volunteers: A Prospective Randomized Study.2015. *Alcohol and Alcoholism* 50(4): 399–406.
 4. Stewart, S.H. *et al.*, Phosphatidylethanol and Alcohol Consumption in Reproductive Age Women. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 2010.34(3): 488–492.
 5. Ohuou, P. 等人.使用UPLC-MS/MS方法定量人尿液中的EtG和EtS.沃特世应用纪要, 2018.720006273ZH <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2018/uplc-ms-ms-method-quantitation-etg-ets-human-urine.html>> .
-

特色产品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/134613317>>

Xevo TQ-S micro三重四极杆质谱仪 <<https://www.waters.com/134798856>>

TargetLynx <<https://www.waters.com/513791>>

MassLynx MS软件 <<https://www.waters.com/513662>>

720007120ZH, 2021年1月