

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie



**Stanovenie fosfatidylethanolu v krvi
technikou kvapalinovej chromatografie
s hmotnostne spektrometrickou detekciou**

Diplomová práca

Autor:

Bc. Kristína Petrovská

Školiteľ:

doc. RNDr. Petr Fryčák, PhD.

Študijný program:

Chemie

Študijný odbor:

Analytická chemie

Forma štúdia:

Prezenčná

Olomouc 2023

Palacky Univerzity Olomouc

Faculty of Science

Department of Analytical Chemistry



**Quantification of phosphatidylethanol
in blood by liquid chromatography
with mass spectrometric detection**

Diploma Thesis

Author:	Bc. Kristína Petrovská
Supervisor:	doc. RNDr. Petr Fryčák, PhD.
Study programme:	Chemistry
Major:	Analytical Chemistry
Study form:	Full-time

Olomouc 2023

Bibliografické informácie

Autor:	Bc. Kristína Petrovská
Názov práce:	Stanovenie fosfatidylethanolu v krvi technikou kvapalinovej chromatografie s hmotnostne spektrometrickou detekciou
Typ práce:	Diplomová
Vedúci práce:	doc. RNDr. Petr Fryčák, Ph.D.
Pracovisko:	Katedra analytické chemie, UP v Olomouci
Rok obhajoby:	2023
Abstrakt:	Diplomová práca sa zaoberá vývojom metódy pre stanovenie fosfatidylethanolu v ľudskej krvi technikou LC/MS. Fosfatidylethanol vzniká z fosfatidylcholínu v krvi len za prítomnosti ethanolu, čo ho robí sľubným biomarkerom konzumácie alkoholu, použiteľným v klinickej a forenznej praxi. Boli vyvinuté dve metódy stanovenia PEth v krvi, jedna pre roztoky štandardov a druhá bola optimalizovaná pre reálne vzorky, kedy interferenty eluujúce sa v blízkosti retenčných časov analytu a vnútorného štandardu PProp si vynútili predĺženie doby analýzy. Tieto interferenty boli následne predbežne identifikované na základe fragmentačných spektier a databázy lipidov Lipid Maps, avšak sa už nepodarilo identifikovať presnú izomériu. PEth bol vyvinutou metódou stanovený v modelových (spikovaných) vzorkách plnej krvi.
Kľúčové slová:	Fosfatidylethanol, biomarker alkoholizmu, ľudská krv, kvapalinová chromatografia, hmotnostná spektrometria, vývoj metódy, príprava vzorky
Počet strán:	54
Jazyk:	Slovenský

Bibliografic information

Author: Bc. Kristína Petrovská

Title: Quantification of phosphatidylethanol in blood by liquid chromatography with mass spectrometric detection

Type of Thesis: Diploma

Supervisor: doc. RNDr. Petr Fryčák, Ph.D.

Department: Department of Analytical Chemistry, UP Olomouc

The Year of Presentation: 2023

Abstract: The diploma thesis deals with the development of a method for determination of phosphatidylethanol in human blood by LC/MS. Phosphatidylethanol is formed from phosphatidylcholine in blood only in the presence of ethanol, making it a promising biomarker of alcohol consumption that can be used in clinical practice for PEth screening. Two methods have been developed to determine phosphatidylethanol in blood, one for standards and the other was optimized for real samples, when interferences eluting near the retention times of the analyte and internal standard phosphatidylpropanol forced an extension of the analysis time. These interferences were subsequently tentatively identified using collision-induced dissociation spectra and the Lipid Maps database, without exact isomerism identification. Using the developed method, PEth was quantified in model (spiked) samples of whole blood.

Keywords: Phosphatidylethanol, biomarker of alcoholism, human blood, liquid chromatography, mass spectrometry, method development, sample preparation

Number of Pages: 54

Language: Slovak

Prehlásenie:

Prehlasujem, že som túto diplomovú prácu vypracovala samostatne a všetky použité literárne zdroje som správne uviedla v zozname použitej literatúry.

V Olomouci dňa:

Bc. Kristína Petrovská

Pod'akovanie:

Týmto by som sa chcela poďakovať vedúcemu svojej diplomovej práce doc. RNDr. Petrovi Fryčákovi, Ph.D. za odborné vedenie práce, jeho trpezlivosť, čas, ochotu a pomoc pri konzultáciách. Ďalej by som sa chcela poďakovať Mgr. Oleksandrovi Prystopiukovi za pomoc v laboratóriu a čas pri riešení technických záležitostí. V neposlednom rade ďakujem svojim rodičom za podporu počas celého štúdia.

Táto diplomová práca bola finančne podporená Interní grantovou agentúrou UP v rámci projektov IGA_PrF_2022_023 a IGA_PrF_2023_027.

Obsah

Zoznam použitých skratiek	-
Úvod	1
1 Teoretická časť	2
1.1 Fosfolipidy a fosfolipidová dvojvrstva	2
1.2 Fosfatidylcholíny	2
1.3 Fosfatidylethanol	3
1.4 Biomarkery	5
1.4.1 Biomarkery alkoholovej konzumácie a alkoholového zneužívania	6
1.4.1.1 Markery stavu	7
1.4.1.2 Markery charakteristiky	11
1.5 Metódy analýzy PEth v literatúre	13
1.5.1 Kvapalinová chromatografia	14
1.5.1.1 Detektory	15
2 Experimentálna časť	20
2.1 Ciele práce	20
2.2 Prístroje	20
2.3 Chemikálie	21
2.4 Štandardy	21
2.5 Reálne vzorky	22
2.6 Parametre analýzy	22
2.7 Príprava reálnych vzoriek pre analýzu	24
3 Výsledky a diskusia	25
3.1 Hľadanie optimálnej mobilnej fázy	28
3.2 Limit detekcie a limit stanoviteľnosti	29
3.3 Medziľahlá precíznosť	30
3.4 Porovnanie rôznych postupov prípravy reálnych vzoriek	31
3.4.1 Helander et al., 2019 ⁵⁷	31
3.4.2 Upravený postup podľa Nalessa et al., 2011 ⁵⁰	32
3.4.3 Kombinácia postupov Helandera et al., 2019 ⁵⁷ a Zhenga et al., 2011 ¹⁷	33
3.4.4 Analýza lipidov podľa Wolrabovej et al., 2021 ⁶³	34
3.5 Ďalšie zložky matrice	35
4 Záver	41
5 Zoznam použitej literatúry	42

Zoznam použitých skratiek

5-HTOL	5-hydroxytryptofol
AC	adenylátcykláza
ALT	alanín aminotrasferáza
AST	aspartát aminotrasferáza
CDP	cytidín difosfát
CTP	cytidín trifosfát
EEMK	ethylestery mastných kyselín
ELSD	detektor rozptylu svetla
EtG	ethylglukoronid
GABA	kyselina gama-aminobutánová
GGT	gama-glutamyltrasferáza
HPLC	vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
HRMS	vysokorozlišujúca hmotnostná spektrometria
KDT	karbohydrát-deficientný transferín
LC	kvapalinová chromatografia
MeOH	methanol
MF	mobilná fáza
MS	hmotnostná spektrometria
MS/MS (MS²)	hmotnostná spektrometria v tandémovom usporiadaní
PC	papierová chromatografia
PCh	fosfatidylcholín
PE	fosfatidylethanolamín
PEth	fosfatidylethanol
PProp	fosfatidylpropanol
SF	stacionárna fáza
SOE	stredný objem erytrocytov
THF	tetrahydrofurán
TIC	celkový prúd iónov
TLC	chromatografia na tenkej vrstve
UHPLC	ultra vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
WHO	Svetová zdravotnícka organizácia

Úvod

Alkoholizmus je v dnešnej dobe veľkým sociálnym problémom vyskytujúcim sa vo všetkých krajinách sveta. Spôsobuje mnohé ochorenia, ktoré môžu ovplyvňovať aj ďalšie generácie. Preto je v záujme lekárov nájst' vhodný prostriedok na objektívne vyhodnotenie stavu pacienta. Takýmito prostriedkami, ktoré sa už niekoľko rokov využívajú v klinickej praxi, sú takzvané biomarkery. Tento pojem označuje medicínske znaky, ktorými sa sleduje zdravotný stav pacienta. Ich analýzou sa získavajú objektívne, presné a reprodukovateľné výsledky, ktoré dopĺňajú, potvrdzujú alebo vyvracajú zdravotné symptómy, ktoré pacient vníma len pocitovo. Existujú dva druhy biomarkerov konzumácie alkoholu: markery stavu a markery charakteristiky. Markermi stavu sa biochemickými metódami zisťuje pacientova nedávna konzumácia alkoholu vrátane skonzumovaného množstva. Zároveň vypovedajú o tom, či mal pacient v minulosti prípady ťažkého alkoholizmu. Markery charakteristiky ukazujú na pacientove vrodené riziko vzniku alkoholovej závislosti.

Jedným z biomarkerov konzumácie alkoholu, ktorý upriamil pozornosť ako vedcov, tak lekárov, je fosfatidylethanol. Vzniká v červených krvinkách len za prítomnosti ethanolu, a teda sa javí ako perspektívny biomarker konzumácie alkoholu. Aby sa však jeho kvalitatívne a kvantitatívne stanovenie uplatnilo v klinickej praxi, je nutné nájst' a optimalizovať metódu jeho analýzy s reprodukovateľnými výsledkami. Toto štúdium popisujú nasledujúce kapitoly mojej diplomovej práce. Vyvinuli a optimalizovali sa dve metódy, kedy prvá bola nastavená na roztoky štandardov a druhá pre reálne vzorky. Interferenty eluujúce sa v okolí retenčného času analytu a interného štandardu si vynútili predĺženie doby analýzy a gradientu na zvýšenie špecificity. Dĺžka analýzy optimalizovanej pre roztoky štandardov bola 6 minút, pre reálne vzorky to bolo 17 minút. Objem nástreku bol 5 μ l. Retenčný čas analytu PEth v metóde vyvinutej pre reálne vzorky bol okolo 9,90 minút, retenčný čas vnútorného štandardu PProp bol okolo 10,30 minút.

1 Teoretická časť

1.1 Fosfolipidy a fosfolipidová dvojvrstva

Fosfolipidy predstavujú triedu komplexných lipidov, ktoré sa skladajú z dvoch častí: hydrofilnej, ktorá obsahuje fosfátovú skupinu, a hydrofóbnej, zloženej z dvoch zbytkov mastných kyselín. Vďaka svojej amfifilnej povahe hrajú kľúčovú rolu bunkových membrán, pretože môžu tvoriť fosfolipidovú dvojvrstvu. Táto dvojvrstva sa vytvorí, keď fosfolipid príde do kontaktu s vodou, a to tak, že hydrofilná časť zostáva na vonkajšej strane a hydrofóbna časť sa zorientuje do stredu membrány. Stred dvojvrstvy neobsahuje takmer žiadnu vodu ani látky v nej rozpustné.

Táto len niekoľko nanometrov¹ tenká membrána vytvára bariéru okolo všetkých buniek a je nepriepustná pre väčšinu hydrofilných látok a iónov. Navyše zabráňuje difúzii iónom, proteínom a iným molekulám do miest, kde by sa nemali vyskytovať, ale naopak ich necháva na miestach, kde sú potrebné. Je súčasťou všetkých organizmov.

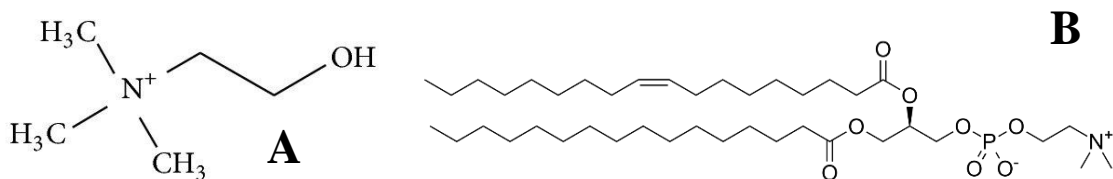
Prevažnú časť fosfolipidovej dvojvrstvy tvoria fosfolipidy, ale nie sú to jediné stavebné jednotky, z ktorých je dvojvrstva vytvorená. Vo všetkých organizmoch prechádzajú celou membránou integrálne proteíny, ktoré majú niekoľko funkcií. Môžu cez ne transportovať látky oboma smermi, môžu byť receptormi a plnia aj funkciu enzýmov. V živočíšnych bunkách tvorí dvojvrstvu aj napr. cholesterol, ktorý posilňuje membránu a znižuje jej permeabilitu. Okrem toho cholesterol reguluje aktivitu niektorých integrálnych membránových proteínov.

Medzi najrozšírenejšie fosfolipidy, ktoré tvoria fosfolipidovú dvojvrstvu, patrí fosfatidylcholín, ktorý je obsiahnutý z takmer 50 % väčšiny buniek cicavcov.² Iné fosfolipidy dvojvrstvy zahŕňajú fosfatidylserín, fosfatidylethanolamín a fosfatidylglycerol.

1.2 Fosfatidylcholíny

Fosfatidylcholíny (PCh) sú trieda fosfolipidov prítomných vo všetkých eukaryotických a niektorých prokaryotických organizmoch. Sú základnou stavebnou jednotkou membrán a fungujú aj ako signálne molekuly. Ich syntéza aj degradácia prispievajú k bunkovej homeostáze PCh a iných lipidov. Skladajú sa z cholínovej skupiny,

fosfátu a rôznych zvyškov mastných kyselín, pričom väčšinou jedna z nich je nasýtená a druhá nenasýtená. Príklad štruktúry fosfatidylcholínu je zobrazený na Obr. 1.

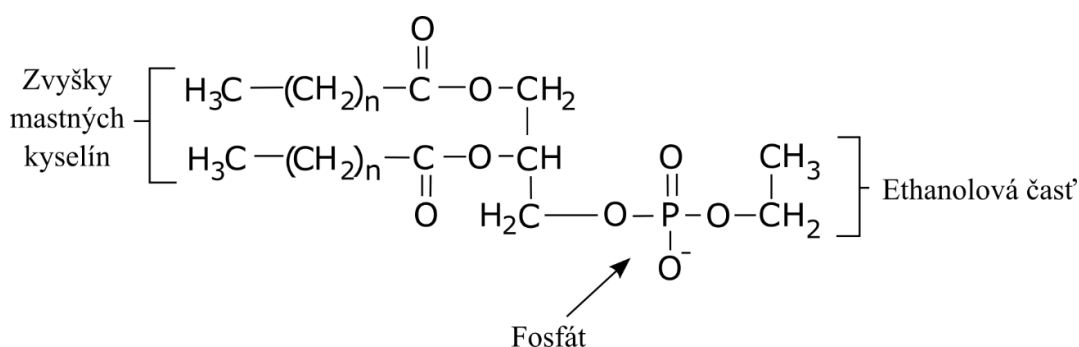


Obr. 1: A - cholínová skupina, B - 1-palmitoyl-2-oleoylfosfatidylcholín

Syntéza PCh z cholínu prebieha vo všetkých bunkách cicavcov tzv. CDP-cholínovou cestou (CDP – cytidín difosfát), ktorá pozostáva z troch krokov. Prvou reakciou je konverzia cholínu na fosfocholín pomocou enzýmu cholín kinázy.³ Väčšina cholínu je prijatá z potravy. Následne je enzýmom CTP:fosfocholín cytidyltransferázou (CTP – cytidín trifosfát) premenený fosfocholín na CDP-cholín. Tento enzým je regulovaný na viacerých úrovniach, ako je fosforylácia, translokácia k membránam a génová expresia. V poslednom kroku syntézy CDP-cholín a 1,2-diacylglycerol pochádzajúci z enzýmu CTP-cholín:1,2-diacylglycerol cholínfosfotransferázy vytvoria fosfatidylcholín.⁴ Hepatocyty v pečeni môžu syntetizovať PCh aj metyláciou fosfatidylethanolamínu.⁵

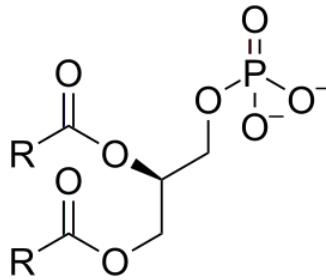
1.3 Fosfatidylethanol

Fosfatidylethanol (PEth) je abnormálny fosfolipid. Skladá sa z glycerolovej kostry, na ktorú je naviazaná fosfátová skupina a nepolárna ethanolová časť, a dva zvyšky mastných kyselín (viď Obr. 2). Zvyšky mastných kyselín môžu obsahovať 16, 18 alebo 20 uhlíkov, čiže $n = 14, 16$ alebo 18 . Tvorí sa v bunkových membránach červených krvných buniek len za prítomnosti ethanolu⁶ transfosfatidylačnou reakciou z fosfatidylcholínu pomocou enzýmu fosfolipáza D^{7,8}.



Obr. 2: Štruktúra fosfatidylethanolu

Za normálnych podmienok hydrolyzuje fosfokináza D fosfatidylcholíu za vzniku fosfatidovej kyseliny (štruktúra je naznačená na Obr. 3), ktorá je dôležitým sekundárnym poslom. Tá môže byť metabolizovaná na diacylglycerol alebo na lyzo-fosfatidovú kyselinu, obe molekuly sú biologicky významné.⁹ Konverzia fosfatidovej kyseliny na diacylglycerol pomocou enzýmov lipid fosfát fosfohydroláz je rozhodujúcim krokom syntézy fosfatidylcholíu, fosfatidylethanolamínu a fosfatidylserínu.¹⁰ Fosfatidylethanol sa tiež vytvára priamo z fosfatidovej kyseliny.¹¹



Obr. 3: Štruktúrny skelet fosfatidovej kyseliny. Pozostáva z glycerovej kostry, fosfátovej skupiny a dvoch zvyškov mastných kyselín, ktoré sú označené R. Obvykle býva jeden zvyšok mastnej kyseliny nasýtený a druhý nenasýtený

Za predpokladu, že je v organizme vysoký obsah ethanolu, fosfatidylethanol sa rýchlo syntetizuje a pomaly degraduje, čo má za následok akumulovanie PEth v bunkových membránach.^{12,13} Bola zistená korelácia medzi koncentráciou fosfatidylethanolu v krvi a skonzumovaným alkoholom, aj keď ich vzájomný vzťah sa môže líšiť od jedinca.¹⁴⁻¹⁷ Toto zistenie naznačilo možné využitie stanovenia koncentrácie fosfatidylethanolu v krvi ako biomarkeru alkoholovej konzumácie. Avšak PEth sa za prítomnosti ethanolu môže vytvárať *in vivo* aj po tom, čo bolo vykonané vzorkovanie, čo môže potenciálne viesť k falošným výsledkom.^{17,18}

Dosiaľ bolo identifikovaných 48 homológov fosfatidylethanolu na základe počtu uhlíkov vo zvyškoch mastných kyselín a počtu násobných väzieb v nich obsiahnutých. Tieto homológy sú vypísané v Tab. I. Najviac zastúpeným homológom je 16:0/18:1, na ktorý sa literatúra často odkazuje ako na fosfatidylethanol bez toho, aby autori brali do úvahy aj ostatné homológy, ktoré sú v porovnaní s ním zastúpené v oveľa menšej miere. Druhým najrozšírenejším je homológ 16:0/18:2.¹⁹

Tab. I: 48 homológov fosfatidylethanolu, ktoré boli zatiaľ identifikované

14:0/16:0	16:0/18:1	16:0/22:5	17:0/18:1	18:0/22:5	18:1/22:4
14:0/18:1	16:0/18:2	16:0/22:6	17:0/18:2	18:0/22:6	18:1/22:5
14:0/18:2	16:0/18:3	16:1/14:0	18:0/18:1	18:1/18:1	18:1/22:6
14:0/20:4	16:0/20:2	16:1/16:1	18:0/18:2	18:1/18:2	18:2/18:2
16:0/16:0	16:0/20:3	16:1/18:0	18:0/20:3	18:1/20:1	18:2/20:1
16:0/16:1	16:0/20:4	16:1/18:1	18:0/20:4	18:1/20:2	18:2/20:4
16:0/17:1	16:0/20:5	16:1/18:2	18:0/20:5	18:1/20:3	20:1/20:4
16:0/18:0	16:0/22:4	16:1/20:4	18:0/22:4	18:1/20:4	20:2/20:4

1.4 Biomarkery

Pojem biologické markery alebo biomarkery označuje širokú podskupinu medicínskych znakov, ktorými sa sleduje zdravotný stav pacienta. Ich analýza produkuje objektívne, presné a reprodukovateľné výsledky, ktoré dopĺňujú, potvrdzujú alebo vyvracajú zdravotné symptómy, ktoré pacient vníma len pocitovo. Bolo popísaných niekoľko presnejších definícií pojmu biomarker, avšak sú si podobné. Pracovná skupina pre definície biomarkerov Národného inštitútu zdravia definovala pojem v roku 1998 ako „charakteristiku, ktorá je objektívne meraná a zhodnotená ako indikátor normálnych biologických procesov, patogénnych procesov alebo farmakologicky odpovedá na terapeutický zásah“.²⁰ Ďalšia definícia vysvetľuje termín ako „akúkoľvek substanciu, štruktúru alebo proces, ktoré môžu byť merané v tele alebo jeho produktoch, a ovplyvňujú alebo predpovedajú výskyt alebo výsledok choroby“.²¹ S týmto vysvetlením prišli spoločne Medzinárodný program chemickej bezpečnosti vedený Svetovou zdravotníckou organizáciou (WHO) v koordinácii s Organizáciou spojených národov a Medzinárodnou organizáciou práce. Ešte v širšom ponímaní popisuje pojem biomarkery nie len výskyt a výsledok choroby, ale aj efekt liečby, zásahov a dokonca nezamýšľaných environmentálnych vystavení rôznym chemikáliám a živinám. WHO vo svojej správe o validite biomarkerov pri hodnotení environmentálnych rizík uviedla, že ich skutočná definícia zahŕňa „takmer akékoľvek meranie odrážajúce interakciu medzi biologickým systémom a potenciálnym nebezpečenstvom, ktoré môže byť chemického, biologického alebo fyzického pôvodu. Meraná veličina môže byť funkčná, fyziologická, biochemická na bunkovej úrovni alebo molekulová interakcia“.²²

Za príklady biomarkerov sa považuje všetko od tepu a krvného tlaku, základných chemických testov až po zložitejšie laboratórne krvné testy a iných tkanív. Skúmanie medicínskych znakov v klinickej praxi siaha do dávnej histórie, takpovediac do začiatkov samotnej medicíny, pričom biomarkery sú najobjektívnejšími, kvantifikovateľnými znakmi, ktoré moderná veda dokáže spoľahlivo reprodukovať. Používanie laboratórne meraných biomarkerov sa v klinickom výskume však nepraktizuje dlho, preto sú stále vyvíjané nové a lepšie postupy. Kľúčovým je vždy určenie vzťahu medzi akýmkoľvek merateľným biomarkerom a relevantným klinickým záverom.

1.4.1 Biomarkery alkoholovej konzumácie a alkoholového zneužívania

Alkoholizmus je celosvetovým problémom už niekoľko desaťročí, a preto je v záujme lekárov zaistenie vhodných klinických metód na štúdium nie len nedávnej alkoholovej konzumácie pacienta, ale aj histórie prípadov alkoholizmu v rodine, kde cieľom je určenie genetickej predispozície konzumácie alkoholu, ktorú pacient môže mať. Avšak tieto metódy musia byť dostatočne objektívne, aby bola zabezpečená vhodná liečba pacienta. Metódy, ktoré sa ponúkajú, sú kvantitatívne analýzy biomarkerov, ktoré môžu indikovať prítomnosť alebo zlepšenie pacientovho zdravotného stavu, spolu s geneticou predispozíciou pre daný zdravotný problém.

Existujú dva druhy biomarkerov konzumácie alkoholu: markery stavu a markery charakteristiky. Prvou skupinou sa biochemickými metódami zisťuje pacientova nedávna konzumácia alkoholu vrátane toho, či išlo vyslovene o opilstvo alebo len pár pohárikov. Zároveň vypovedajú o tom, či mal pacient v minulosti prípady ťažkého alkoholizmu. Markery charakteristiky ukazujú na pacientove vrodené riziko vzniku alkoholovej závislosti. Voľba adekvátneho biomarkeru je rozhodujúca. Analýza by mala byť citlivá, aby vypovedala o stave pacienta vo vzťahu k alkoholu a nie k možným iným chorobám a problémom. Taktiež by mala byť presná a precízna, aby mohli lekári správne zhodnotiť zdravotný stav pacienta a navrhnúť odpovedajúcu liečbu.

1.4.1.1 *Markery stavu*

Pri vyhodnocovaní alkoholovej konzumácie pacienta sa hľadá nie len na jeho nedávnu (akútnu), ale aj dlhodobú (chronickú) konzumáciu alkoholu. Zisťuje sa aj množstvo vypitého alkoholu, teda, či ide o prípad primeraného alebo ťažkého alkoholizmu. Za ťažký alkoholizmus sa považuje konzumácia viac ako 60 gramov alkoholu, čo zodpovedá štyrom až piatim pohárikom denne. Konzumácia takéhoto množstva po dobu minimálne 2 týždňov sa považuje za chronický ťažký alkoholizmus.²³

Rôzne biomarkery stavu využívajú rôzne techniky na zistenie jednotlivých úrovní alebo období alkoholovej konzumácie. Tieto biomarkery môžu byť vo vzťahu k chemickým látkam produkovaných v ľudskom tele pri metabolizme alkoholu, alebo môžu byť odpoveďou na zmenu iných zlúčenín, buniek alebo tkanív, ktoré sa zmenili v dôsledku chronického alebo akútneho vystavenia alkoholom.

Ethanol má toxický efekt na organizmus, čo ovplyvňuje stredný objem erytrocytov (SOE), enzýmy ako gama-glutamyltransferázu (GGT), aspartát aminotransferázu (AST), alanín aminotransferázu (ALT), karbohydrát-deficientný transferín (KDT), a serotonínový metabolit 5-hydroxytryptofol (5-HTOL). Takmer všetok ethanol, ktorý vstúpi do organizmu, je premenený na acetaldehyd enzýmom alkoholdehydrogenázou prítomným v cytoplazme rýchlosťou $0,1 - 0,2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Oxidácia ethanolu prebieha v malej miere aj pôsobením enzýmov katalázy a cytochrómu P450. Nasleduje oxidácia acetaldehydu na acetát enzýmom aldehyddehydrogenázou. Časť prijatého ethanolu podlieha biotransformácii, ktorá vedie na ethylglukoronid (EtG), ethylestery mastných kyselín (EEMK) a už vyššie spomínaný fosfatidylethanol (PEth).^{25,26} Sledovanie práve týchto zlúčenín ako biomarkerov alkoholovej konzumácie sa ukázalo byť vhodné, avšak je niekedy zložité interpretovať získané dáta a vytvoriť ustanovené laboratórne postupy pre analytických pracovníkov.

Ako biomarkery sa najdlhšie využívajú GGT, ALT, AST a SOE, ktoré sa zisťujú pri rutinných krvných testoch, no sú s nimi spojené aj určité problémy. Ich hodnoty sa môžu vzťahovať aj na rôzne iné ochorenia, fajčenie alebo užívanie rôznych liečiv. Okrem toho je nutné ustanoviť referenčné intervalové rozpätie pre pohlavie, vek a telesnú hmotnosť.^{25,26}

1.4.1.1.1 Gama-glutamyltransferáza (GGT)

Tento glykoproteín je obsiahnutý v hepatocytoch a iných bunkách, ktoré produkujú žlč. Zvýšené hladiny tohto enzýmu naznačujú možné ochorenie pečene. Chronickí alkoholici, zvlášť tí, ktorí ešte užívajú rôzne iné látky, či už drogy alebo liečivá, však mávajú tieto hladiny tiež nad referenčnou limitou. Sledovanie tohto enzýmu ako biomakeru alkoholovej konzumácie preto nie je vyhovujúce, práve kvôli jeho nízkej špecifite. Okrem tejto nevýhody sa navyše vyznačuje aj nízkou citlivosťou.

1.4.1.1.2 Alanín aminotransferáza (ALT) a aspartát aminotransferáza (AST)

Obidva enzýmy napomáhajú pri metabolizme aminokyselín v pečeni. Sú indikátormi ochorenia pečene, no sú ešte menej špecifické na alkohol než GGT, preto sú užitočnejšie ako indikátory ochorenia pečene než ako indikátory ochorenia spojených s alkoholom. Obidva enzýmy však vykazujú vyššie hodnoty u ľudí, ktorí sú inak zdraví, len konzumujú vysoké množstvo alkoholu.²⁷ Z týchto dvoch enzýmov je špecifickejší na ochorenie pečene v dôsledku konzumácie alkoholu enzým alanín aminotransferáza (ALT), pretože sa vyskytuje prevažne v pečeni, zatiaľ čo enzým aspartát aminotransferáza (AST) je prítomný vo viacerých orgánoch. Okrem pečene je obsiahnutý v mozgu, srdci, obličkách a svalových tkanivách. V klinických testoch sa zisťuje pomer AST:ALT. Vysoké hodnoty týchto enzýmov (asi 500 jednotiek na liter) môžu naznačovať ochorenie pečene spojené s alkoholizmom. Problémom je, že u pacientov mladších ako 30 rokov a starších ako 70 rokov nie sú spoľahlivým indikátorom, pretože v týchto vekových skupinách pacientov nie sú také presné v porovnaní s inými markermi.²⁷

1.4.1.1.3 Stredný objem erytrocytov (SOE)

Pacienti, ktorí trpia ťažkým chronickým alkoholizmom majú okrem vyššie zmienенých markerov stavu zvýšené hladiny aj stredného objemu erytrocytov.²⁸ Avšak použitie tohto markeru nie je ideálne, keďže hodnoty SOE zostávajú zvýšené aj niekoľko mesiacov po tom, čo pacient úplne prestane s konzumáciou alkoholu. Okrem toho ho ovplyvňujú rôzne iné faktory, čo ešte viacej znižuje jeho špecifitu a skresľuje akúkoľvek interpretáciu klinických výsledkov.

1.4.1.1.4 Karbohydrát-deficientný transferín (KDT)

Transferín je glykoproteín zodpovedný za transport železa v krvnom obehu. Je to molekula, ktorá, ako už meno napovedá, nemá dostatok sacharidu kyseliny sialovej (skupinové označenie pre deriváty kyseliny neuraminovej, bežne sa pod týmto názvom rozumie kyselina N-acetylneuraminová). Za normálnych podmienok obsahuje transferín štyri až šesť molekúl kyseliny sialovej, zatiaľ čo KDT obsahuje dve alebo menej molekúl. Štúdie zistili, že konzumácia alkoholu narušuje schopnosť kyseliny sialovej viazať sa ako na transferín, tak na ostatné molekuly. Zdraví jedinci majú viac druhov transferínu, ale ťažkí alkoholicy majú väčší podiel práve KDT druhu. Práve toto zistenie umožňuje využitie KDT ako efektívneho biomarkeru alkoholovej konzumácie. KDT pre túto analýzu vykazuje dobrú špecificitu (60-96 %), ale nízku senzitivitu (31-91 %), keďže jedinci môžu vykazovať nízke hodnoty napriek vysokej konzumácii alkoholu. Navyše kvôli genetickej variabilite, ochoreniam pečene, vrodeným poruchám glykozylácie a užívaniu liekov môžu výsledky vykazovať falošnú pozitivitu.^{25,29} Ďalšou nevýhodou je, že aby bol tento marker použiteľný na interpretáciu ochorenia spojeného s konzumáciou alkoholu, je nutné požiť vysoké dávky ethanolu. Preto sa KDT v praxi používa len ako marker chronického mierneho až ťažkého alkoholizmu.^{30,31} Počas abstinencie však trvá dva až tri týždne, kým hladiny KDT klesnú na referenčné hodnoty.³¹

1.4.1.1.5 5-hydroxytryptofol (5-HTOL)

5-hydroxytryptofol vzniká ako jeden z produktov metabolizmu neurotransmiteru serotonínu. Alkohol spolu s jeho primárnym metabolitom acetaldehydom ovplyvňujú metabolizmus serotonínu, a to tak, že telo produkuje viac 5-HTOL v porovnaní so situáciou, kedy alkohol nie je konzumovaný. Telo eliminuje 5-HTOL močom, pričom v ňom môže byť identifikovaný približne o 5 až 15 hodín dlhšie než štandardné testovania na alkohol, ktoré preukazujú každý pohárik alkoholu v moči len asi hodinu.³² Kvôli tomuto sa 5-hydroxytryptofol používa ako biomarker nedávnej ťažkej konzumácie alkoholu.^{33,34} Avšak je nutné dodať, že 5-HTOL sa považuje len ako potenciálny biomarker alkoholovej konzumácie, keďže v rutinných klinických testoch sa nesleduje tak často.

1.4.1.1.6 Ethylglukoronid (EtG)

EtG je ďalší metabolit alkoholu vznikajúci v pečeni, keď je alkohol konjugovaný s glukuronovou kyselinou, ktorá transformuje látky na hydrofilné metabolity, aby boli ľahšie vylúčené z tela. EtG je detegovateľný v krvi až 36 hodín a v moči až 5 dní po nadmernej konzumácii alkoholu. Okrem toho sa môže zistiť aj z iných telových tekutín, vlasov alebo tkanív³⁵, ale nenašla sa žiadna priama korelácia medzi skonsumovaným alkoholom a identifikovaným EtG vo vlasoch. EtG sa totiž ukladá vo vlasoch pri nedávnej konzumácii, čo je výhodné pri testovaní periód konzumovania alkoholu v čase. Nutnosťou je však drahá inštrumentácia, ktorú predstavuje hmotnostný spektrometer, aby boli výsledky z moču správne interpretované. Vzorky iných telových tekutín neprinášajú uspokojivé výsledky.³⁵

1.4.1.1.7 Ethylestery mastných kyselín (EEMK)

Pri metabolizme alkoholu vznikajú už okrem vyššie zmienených aj ethylestery mastných kyselín. Klinicky sa testujú ako kombinácia štyroch jednotlivých molekúl a sú prítomné v pečeni, pankrease a tukových väzivách až 24 hodín po konzumácii alkoholu. Ako marker sú EEMK citlivé a špecifické na odlišenie príležitostných od ťažkých alkoholikov.^{36,37} Pretože sa, rovnako ako EtG, vyskytujú aj vo vlasoch^{35,38}, výskumníci navrhujú použitie EEMK vo vlasoch ako biomarkera chronického ťažkého alkoholizmu.³⁶ Telo sa nedokáže zbaviť EEMK uložených vo vlasoch, takže sa hromadia počas dlhého vystavenia alkoholom v prípade chronického alkoholizmu. EEMK sa používa aj v postmortem testoch ako biomarker alkoholovej konzumácie, kde sa zisťuje ich obsah v pečeni a tukových väzivách.³⁷ Je nutné merať ich kvantitu z týchto orgánov, pretože obsah alkoholu v krvi môže podávať skreslenú informáciu v dôsledku vzniku alkoholu aj po smrti jedinca. Stanovenie obsahu EEMK ako biomarkera alkoholovej konzumácie sa ukazuje spoľahlivo až do 12 hodín (stanovenie z tukového väziva) a až 24 hodín (stanovenie z tkaniva pečene) po smrti zvierat'a, ktorému bol predtým podaný alkohol.³⁷

1.4.1.2 *Markery charakteristiky*

Markery charakteristiky sa zameriavajú na genetickú predispozíciu pacienta na vznik alkoholovej závislosti alebo ochorení s alkoholom spojených. Je dôležité vedieť, kto je potenciálne ohrozený, aby sa úplne predišlo problémom s alkoholom, alebo aby sa pacientovi navrhla správna liečba už v raných štádiách ochorenia. Vhodný marker charakteristiky by mal spĺňať minimálne tri podmienky. Po prvé by mal byť pomocou génov dedičný z rodičov na potomstvo, po druhé, mal by byť spojený s konkrétnym ochorením v širokej populácii. Posledným kritériom pre vhodnosť biomarkeru je jeho nezávislosť na stave ochorenia. To znamená, že by mal byť prítomný v prípade, kedy pacient vykazuje symptómy sledovaného ochorenia, ale aj v prípade, kedy pacient tieto symptómy nevykazuje.³⁹ Biomarkery, ktoré spĺňajú tieto kritériá a majú nízku pravdepodobnosť falošne pozitívnych a falošne negatívnych výsledkov, budú vynikajúcim prostriedkom na predikciu vzniku alkoholovej závislosti u pacienta. Niektoré enzýmy a skupina neurotransmiterov, ktoré budú spomenuté ďalej v tejto kapitole, majú vysoký potenciál. Je však nutný ďalší výskum v tejto oblasti na zistenie čo najlepších výsledkov a neskôr ich uplatnenie v klinickej praxi.

1.4.1.2.1 **Aktivita Adenylátcyklázy (AC)**

Adenylátcykláza je proteínový enzým prítomný v bunkových membránach, kde vytvára energiu pre bunky. Po tom, čo štúdie zistili, že aktivita AC je dedičná a enzým je menej aktívny v krvných bunkách abstinujúcich pacientov v porovnaní s pacientmi, ktorí alkohol nepijú vôbec,⁴⁰ sa výskumníci zamerali na sledovanie aktivity AC ako biomarkeru. Ukázalo sa, že hodnota aktivity AC sa zvýši, ak alkoholik začne opäť s popíjaním, čo naznačuje, že alkohol nejakým spôsobom stimuluje aktivitu AC. Avšak hodnotu aktivity AC môže ovplyvňovať aj marihuana a iné drogy, takže ako biomarker pre alkohol sa ukazuje byť necitlivým.⁴⁰ V dnešnej dobe sa výskumníci zameriavajú na odlišnosť štruktúry génov spojených s aktivitou AC medzi pacientmi trpiacimi alkoholovou závislosťou a zdravými ľuďmi.

1.4.1.2.2 Kyselina gama-aminobutánová (GABA)

Neurotransmitter kyselina gama-aminobutánová (tiež gama-aminomaslová) je signálna molekula, ktorá sa viaže na iónotropné GABA receptory v mozgových bunkách. Táto molekula umožňuje nabitým chloridovým iónom transport cez bunkové membrány, čím kontroluje chemickú rovnováhu bunky. Štúdie zistili^{39,41}, že ľudia majú rozdielne hodnoty GABA a tieto rozdiely sú dedičné. Okrem toho, štúdie ukazujú, že ľudia závislí na alkohole majú nižšie hodnoty GABA než tí, ktorí na alkohole závislí nie sú. Podľa týchto predbežných štúdií GABA spĺňa dva z troch kritérií pre marker charakteristiky alkoholovej konzumácie.

1.4.1.2.3 Dopamín

Ďalším zo skupiny neurotransmiterov je dopamín, ktorý umožňuje v určitých častiach mozgu prenos impulzov. Článok z roku 2002, ktorý skúmal spojenie medzi alkoholizmom a hodnotami dopamínu,³⁹ objasňuje, že alkoholici mužského pohlavia, ktorí abstinovali 7 rokov, mali znížené hladiny aktivity dopamínových receptorov v porovnaní s mužmi, ktorí alkohol nekonzumovali. Predošlá štúdia, na ktorú tento článok nadväzoval, odhalila, že alkoholici, ktorí si prešli štádiom abstinencie po dobu 4 až 7 dní, vykazovali zvýšenú odpoveď na dopamín, čo znamená zvýšenú aktivitu dopamínových receptorov.⁴² Iné výskumy, ktoré študovali hladiny primárneho produktu metabolizmu dopamínu, kyseliny homovanilínovej, sa rozchádzajú vo výsledkoch. Niektorí zistili zvýšené hodnoty kyseliny homovanilínovej u alkoholikov v porovnaní s ľuďmi, ktorí alkohol nepijú.⁴³ Iné skúmania naznačujú nižšie hladiny tejto kyseliny práve u ľudí, ktorí alkohol konzumujú.⁴⁴ Kvôli týmto nezhodám vo výsledkoch sa zatiaľ dopamín nepovažuje za vhodný biomarker.

1.4.1.2.4 Beta-endorfín

Beta-endorfín patrí tiež medzi neurotransmitery. Je to opioid, ktorý vzniká v hypofýze a jeho úlohou je aktivácia opioidných receptorov neurónov. Má sa za to, že je prirodzenou úľavou od bolesti a prináša pocit blaženosti. Štúdie zistili, že konzumenti alkoholu majú nižšie hodnoty beta-endorfínu a že ich potomkovia majú menej opioidných receptorov v porovnaní s ľuďmi, ktorí alkohol nepijú.^{45,46} Tieto bádania naznačujú,

že rozdiely v hladinách beta-endorfinu sú ako dedičné, tak špecifické na alkohol, čo spĺňa dve z troch požiadaviek pre vhodný biomarker charakteristiky alkoholovej konzumácie. Než však bude považovaný za skutočný biomarker, musia výskumníci tento neurotransmitter preskúmať ešte detailnejšie.

1.4.1.2.5 Serotonín

Predbežné výskumy indikujú, že neurotransmitter serotonín alebo iná biochemická látka s ním spojená majú potenciál, aby sa stali biomarkerom charakteristiky pre alkoholizmus. Jednou z týchto molekúl, ktorá sa spája so serotonínom, je aminokyselina tryptofán, ktorá ovplyvňuje produkciu serotonínu v mozgu, čo môže viesť k jeho zníženej produkcii u ľudí, ktorí nadmerne požívajú alkohol.^{39,47} Ďalšie výskumy sa zameriavajú na aktivitu serotonínových transportérov, ktoré kontrolujú dostupnosť serotonínu pre bunky. Boli objavené prirodzené rozdiely medzi ľuďmi v aktivite serotonínových transportérov v krvných doštičkách, pričom tieto rozdiely sú dedičné. Navyše sa zistilo, že alkoholicy, ktorí dlhšiu dobu nekonzumovali alkohol, majú vyššie hodnoty aktivity serotonínových transportérov než ľudia, ktorí alkohol nekonzumujú. Rovnako je táto odlišnosť pozorovaná aj u ich detí, kde deti alkoholikov majú tiež zvýšené hladiny aktivity serotonínových transportérov v porovnaní s deťmi nealkoholikov.⁴⁸ Tieto výsledky naznačujú potenciál použitia aktivity serotonínových transportérov ako biomarkeru charakteristiky alkoholovej konzumácie.

1.5 Metódy analýzy PEth v literatúre

Napriek rutinnému stanoveniu fosfolipidov plynovou chromatografiou vďaka ich prchavosti po derivácii na methylestery, neboli zaznamenané analýzy PEth plynovou chromatografiou kvôli jeho abnormálnej neprchavosti. Jedinou metódou analýzy PEth je kvapalinová chromatografia v spojení s rôznymi detektormi. Prehľad vybraných analytických metód, typov vzoriek a formy študovaného PEth od r. 2010 sú zhrnuté v Tab. II.

1.5.1 Kvapalinová chromatografia

Kvapalinová chromatografia (LC) patrí v dnešnej dobe medzi najrozšírenejšie techniky používané v rôznych odvetviach. Ide ako o kvalitatívnu, tak o kvantitatívnu analýzu, kde sa študovaný analyt rozdeľuje medzi dve fázy – stacionárnu a mobilnú. Stacionárnu fázu (SF) predstavujú väčšinou silikagélové častice mikrometrových priemerov pokryté rôzne dlhými uhlíkatými reťazcami na ovplyvnenie zadržiavania (retencie) analytu. Existujú dve usporiadania kvapalinovej chromatografie – plošné a kolónové. V plošnom usporiadaní je stacionárna fáza absorbovaná v chromatografickom papieri (tzv. papierová chromatografia PC) alebo je vo forme tenkej vrstvy nanosená na doštičku (tzv. chromatografia na tenkej vrstve, z anglického Thin Layer Chromatography TLC, kde stacionárnou fázou je väčšinou Al_2O_3). V kolónovom usporiadaní sa stacionárna fáza nachádza vnútri analytickej kolóny. Kvapalná mobilná fáza (MF) sa v plošnom usporiadaní nechá vzlietať po chromatografickom papieri a zložky analytu sa separujú na ploche papiera. V kolónovom usporiadaní mobilná fáza tlačí analyt z dávkovacej slučky cez kolónu, až na detektor, ktorých je mnoho druhov, napr. na základe požadovanej skúmanej vlastnosti analytu. Na identifikáciu analytu slúži v plošnom usporiadaní retenčný faktor, čo je pomer vzdialenosti, ktorú ušiel analyt, k vzdialenosti, ktorú prešla mobilná fáza. V kolónovom usporiadaní je identifikačným kritériom retenčný čas analytu, čo predstavuje mieru zachytávania analytu na stacionárnej fáze. Je však nutné dodať, že tieto identifikačné charakteristiky sa vždy vzťahujú na použité podmienky separácie (mobilná fáza, stacionárna fáza, príp. typ analytickej kolóny).

Pretože PEth obsahuje vo svojej štruktúre ako nepolárnu časť, ktorou sú zvyšky mastných kyselín, tak polárnu časť, ktorú predstavuje fosfátová skupina, kvapalinová chromatografia naráža na určité úskalía, ktorým môže byť voľba mobilnej fázy. Napriek tomu je z Tab. II zjavné, že táto technika je hlavne v spojení s hmotnostne spektrometrickou detekciou (MS) najpoužívanejšia pri štúdiu PEth.

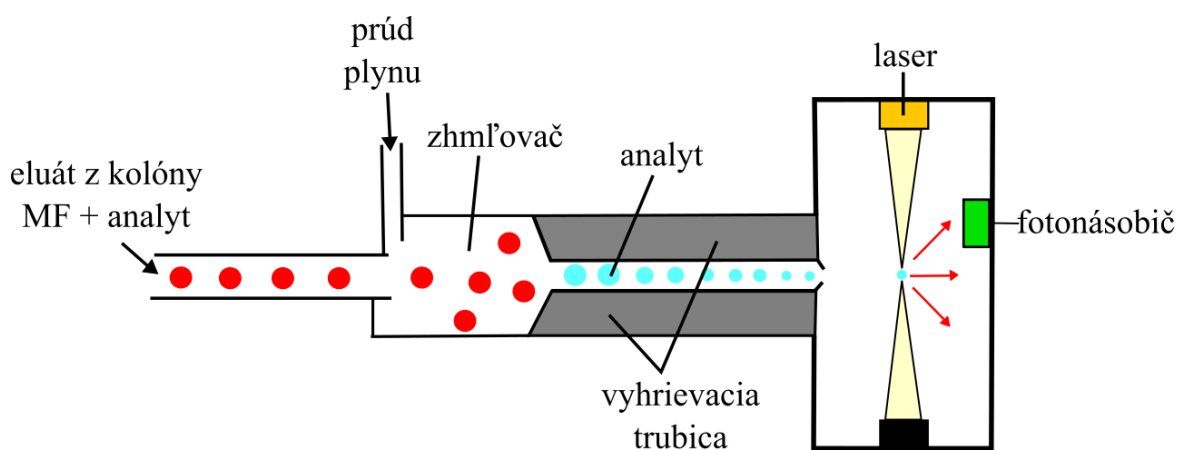
Podľa účinnosti separácie kvapalinovej chromatografie nájdeme v literatúre niekoľko skratiek odkazujúce na túto metódu. Klasická kvapalinová chromatografia (z anglického Liquid Chromatography – LC) pracuje za relatívne nízkych pracovných tlakov a priemerov častíc analytickej kolóny väčších než 10 μm . Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia, v staršej literatúre tiež označovaná ako vysokotlaková (z anglického High Performance/High Pressure) má skratku HPLC a pracuje za vyšších tlakov (okolo 40 MPa alebo 400 barov), a preto môže využiť priemer častíc stacionárnej fázy od 5 do 10 μm .

Moderné HPLC systémy dosiahnu ešte vyššej účinnosti, pretože pracujú s kolónami naplnenými časticami s rozmermi pod 2 μm , čo je spojené s nutnosťou použitia vyšších tlakov na zaistenie dostatočného prietoku mobilnej fázy. Tieto tzv. ultra vysokoúčinné (Ultra High Performance UHPLC) systémy kvapalinovej chromatografie môžu dosahovať pracovných tlakov až viac než 100 MPa (1000 barov).

1.5.1.1 Detektory

1.5.1.1.1 Detektor rozptylu svetla (ELSD)

Detektor rozptylu svetla (z anglického Evaporative Light Scattering Detector) analyzuje rozptyl svetla neprchavého analytu v podobe malých kvapôčok po odparení mobilnej fázy. Eluát z kolóny kvapalinového spektrometra je vedený plynom do zhml'ovača, ktorý prevedie kvapalnú fázu na plynnú. Tá je potom transportovaná do vyhrievanej trubice, kde sa odparí mobilná fáza a kvapky neprchavého analytu sa zmenšujú. Analyt je následne transportovaný do detekčnej časti, kde dochádza k rozptylu svetelného toku vyžarovaného laserom na malé kvapky. Rozptýlené svetlo dopadá na fotodiódy alebo fotonásobiče. Schéma detektoru rozptylu svetla je vyobrazená na Obr. 4.



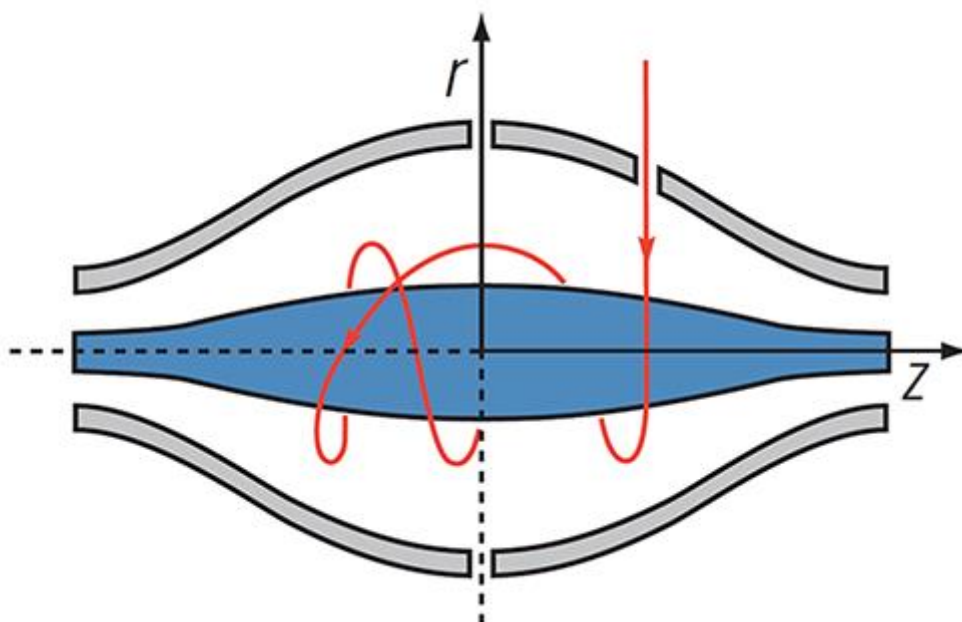
Obr. 4: Schéma detektoru rozptylu svetla

Tab. II: Prehľad analytických metód, typov vzoriek a formy študovaného PEth od r. 2010

Autor	Rok publikácie	Typ vzorky	Forma študovaného PEth	Analytická metóda
Stewart <i>et al.</i> ¹⁶	2010	Plná krv	16:0/18:1	LC-MS/MS
Wurst <i>et al.</i> ⁴⁹	2010	Plná krv	Celkový PEth	HPLC-ELSD
Nalesso <i>et al.</i> ⁵⁰	2011	Plná krv	17 molekulárnych druhov PEth	LC-HRMS
Wurst <i>et al.</i> ⁵¹	2012	Plná krv	Celkový PEth	HPLC-ELSD
Jain <i>et al.</i> ⁵²	2014	Plná krv	16:0/18:1	LC-MS/MS
Baldwin <i>et al.</i> ⁵³	2015	Plná krv	16:0/18:1	LC-MS/MS
Kummer <i>et al.</i> ⁵⁴	2016	Plná krv, sušená krvná škvrna	16:0/18:1, 18:1/18:1, 16:0/16:0	LC-MS/MS
Andresen- Streichert <i>et al.</i> ⁵⁵	2017	Plná krv	16:0/18:1, 16:0/18:2	LC-MS/MS
Andreassen <i>et al.</i> ⁵⁶	2018	Plná krv	16:0/18:1	LC-MS/MS
Helander <i>et al.</i> ⁵⁷	2019	Plná krv	16:0/18:1, 16:0/18:2, 16:0/20:4	LC-MS/MS
Liang <i>et al.</i> ⁵⁸	2020	Sušená krvná škvrna	Celkový PEth	LC-MS/MS
Neumann <i>et al.</i> ⁵⁹	2021	Plná krv	16:0/18:1	LC-MS/MS
Gundlach <i>et al.</i> ⁶⁰	2022	Sušená krvná škvrna	16:0/18:1, 16:2/18:2	LC-MS/MS

1.5.1.1.2 Hmotnostne spektrometrický detektor (MS)

Najpoužívanejší detektor v spojení ako s plynovou a kvapalinovou chromatografiou, tak aj s inými technikami, je hmotnostne spektrometrický dedtektor. Umožňuje identifikáciu látok, poskytuje informácie o štruktúre a molekulovej hmotnosti. Meria hodnotu pomeru hmotnosti na počte kladných alebo záporných elementárnych nábojov iónov v plynnej fázi, m/z . Analyty a zložky mobilnej fázy prítomné v eluáte z kolóny sú v iónovom zdroji ionizované, vzniknuté ióny sú urýchlené a cez hmotnostný analyzátor, kde sú separované, sa dostávajú do detektora. Hmotnostný analyzátor separuje ióny, ktoré vznikli v iónovom zdroji, podľa pomeru m/z . V tandémovom usporiadaní sú ióny v kolíznej cele, zaradenej medzi iónovým zdrojom a analyzátorom, vystavené energii kolízneho plynu, a rozpadnú sa na fragmentové ióny. Tandémové usporiadanie hmotnostného spektrometra sa označuje ako MS/MS alebo MS². Vysokorozlišujúci hmotnostný spektrometer (z anglického High Resolution Mass Spectrometry HRMS) umožňuje zložitejší pohyb iónov v konštrukcii hmotnostného analyzátoru, ktorý týmto dokáže rozlíšiť ióny s vyššou presnosťou, čo má za následok detailnejšie výsledky. Príkladom hmotnostného analyzátoru pre HRMS je tzv. orbitrap, ktorý umožňuje ako eliptický, tak lineárny pohyb iónov, ako je zobrazené červenou šípkou na Obr. 5.

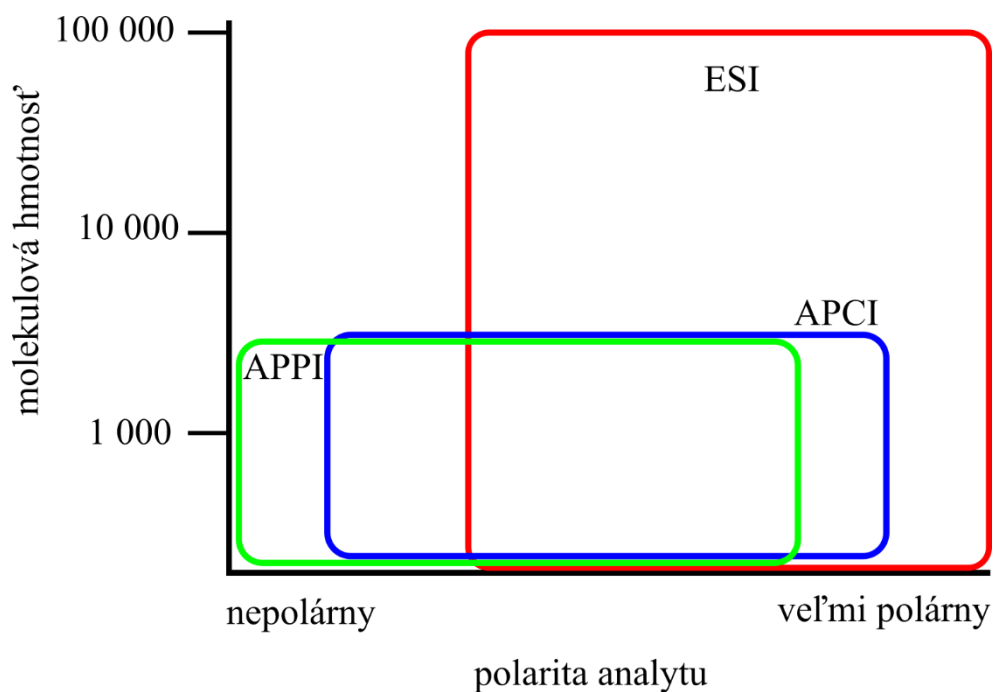


Obr. 5: Schéma hmotnostného analyzátoru orbitrap, prevzaté z: <https://www.creative-proteomics.com/support/q-exactive-hybrid-quadrupole-orbitrap-mass-spectrometer.htm>

Zvolenie typu iónového zdroja ovplyvňuje typ vznikajúcich ionizovaných iónov. Takzvaným tvrdým ionizačným zdrojom, ktorý poskytuje molekulový ión katión radikál v dôsledku bombardovania atómov a molekúl vysokoenergetickými elektrónmi, je iónový zdroj s elektrónovou ionizáciou. Spektrá bývajú obvykle informačne bohaté a ukladajú sa do databáz spektier látok. Táto metóda sa využíva hlavne v spojení s plynovou chromatografiou. Iónovým zdrojom s nižšou energiou, je napr. iónový zdroj s chemickou ionizáciou, obsahujúcim reakčný plyn v iónovom zdroji, ktorý odovzdá analytu svoj náboj, a analyt sa tým ionizuje. Ako reakčný plyn sa používa napríklad metán. Tento typ iónového zdroja poskytuje menšie množstvo iónov, a teda spektrá nie sú tak informačne bohaté v porovnaní so spektrami vytvorenými iónovým zdrojom s elektrónovou ionizáciou. Na druhú stranu sa využíva napr. pre látky termolabilné, ktoré nie je možné previesť do plynnej fázy ionizáciou elektrónom. V prípade, že iónový zdroj je v priestore s atmosférickým tlakom, označuje sa ako chemická ionizácia za atmosférického tlaku, APCI. Ďalším typom iónového zdroja je iónový zdroj so sprejovou ionizáciou, kedy sa kvapalná vzorka privádza kovovou kapilárou do iónového zdroja, na konci kapiláry je vložené napätie. Raz alebo niekoľkokrát nabité ióny sú vytvorené desolváciou vzniknutých malých kvapiek. Najčastejšie používaným typom ionizačného zdroja je práve elektrosprej (ESI), ktorý funguje na tomto princípe. Táto metóda je výhodná pre použitie pre polárne látky a látky s vysokými molekulovými hmotnosťami. Iným typom iónového zdroja je fotoionizačný iónový zdroj, kedy sa malé kvapky po prechode vyhrievacou kapilárou vystavia prúdu fotónov (najbežnejším zdrojom fotónov je kryptónová výbojka o energii 10 eV a 10,6 eV). V prípade, že takýto typ iónového zdroja je v priestore s atmosférickým tlakom, označuje sa ako fotoionizácia za atmosférického tlaku, APPI. Každý typ iónového zdroja má svoje obmedzenie použiteľnosti v rozmedzí molekulových hmotností a polarít analytu, ktoré zobrazuje Obr. 6.

Fragmentácia iónov prebieha v kolíznej cele umiestnenej za iónovým zdrojom, v ktorej sa obvykle nachádza inertný kolízny plyn. Zrážkou iónov vzniknutých v iónovom zdroji s kolíznym plynom vznikajú fragmentové ióny, ktoré slúžia ako identifikačný nástroj. Ióny s konkrétnou hodnotou hmoty m/z môžu patriť iným látkam než študovanej, prítomným napr. v matrici, ale fragmentačné cesty bývajú špecifické, preto sledovaním prítomnosti a intenzity práve fragmentových iónov môžeme s vysokou mierou istoty preukázať a stanoviť študovaný analyt. Jedným z typov kolíznej cely je aj iónová pasca, v ktorej sa vznikajúce ióny zachytia, fragmentujú kolíznym plynom a fragmentové ióny sú ďalej prepustené do detektora.

Hmotnostný spektrometer sleduje vzniknuté ióny v dvoch módoch – pozitívnom a negatívnom, na základe náboja vznikajúcich iónov. Väčšina látok poskytuje silnejší signál v pozitívnom móde.



Obr. 6: Použitelnosť typu iónového zdroja na základe molekulovej hmotnosti a polarity analytu. ESI - elektrosprejová ionizácia, APCI - chemická ionizácia za atmosférického tlaku, APPI - fotoionizácia za atmosférického tlaku

2 Experimentálna časť

2.1 Ciele práce

Cieľmi tejto diplomovej práce bolo:

- nájsť vhodné podmienky pre chromatografickú analýzu štandardov fosfatidylethanolu a fosfatidylpropanolu;
- nastaviť vhodné parametre pre ionizáciu a hmotnostne spektrometrickú analýzu PEth a PProp;
- nájsť vhodný postup prípravy vzoriek plnej krvi pre LC/MS analýzu PEth;
- overiť vyvinutú metódu analýzou kvantifikáciou v modelových vzorkách krvi.

2.2 Prístroje

- Kvapalinový chromatograf: UltiMate 3000 System (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA)
- Hmotnostný spektrometer: LTQ XL Linear Ion Trap Mass Spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA)
- Analytická kolóna: XB-C18 100 Å, rozmery 2,6 µm, 50 x 2.10 mm (Phenomenex, California, USA)
- Spracovanie dát: Thermo Xcalibur 4.2 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA), Microsoft Excel 365, Microsoft Word 365 (Microsoft, Washington, USA)
- Centrifúga Hettich Mikro 120 (Hettich Instruments, Tuttlingen, Nemecko)
- Minitrepačka TTS 2 (The Yellow Line, Maryland, USA)
- Ultrazvuková čistička S 40 H (Elma – ultrasonic, Ruiselede, Belgicko)
- Automatické pipety (Gilson, Wisconsin, USA) a (Eppendorf, Hamburg, Nemecko)

2.3 Chemikálie

- Acetón, p.a. (MikroCHEM, Pezinok, Slovenská republika)
- Acetonitril, HPLC čistota (VWM Chemicals, New York, USA)
- Deionizovaná voda (Direct-Q UV Millipore, Massachusetts, USA)
- Dichlórmetán p.a. (Penta, Praha, Česká republika)
- Izopropylalkohol čistý (Penta, Praha, Česká republika)
- n-heptán 99% p.a. (Penta, Praha, Česká republika)
- n-hexán (VWM Chemicals, New York, USA)
- Chloroform stabilizovaný ~ 1% ethanolom, p.a. (Penta, Praha, Česká republika)
- Methanol, HPLC čistota (VWM Chemicals, New , USA)
- Octan amónny, HPLC čistota (Fisher Chemical, Pennsylvania, USA)
- Tetrahydrofurán, HPLC čistota (Sigma-Aldrich, Missouri, USA)

2.4 Štandardy

- 16:0/18:1 Fosfatidylethanol: sodná soľ 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-fosfoethanolu, chloroformový roztok, 25 mg v 2,5 ml chloroformu (Avanti Polar Lipids, Alabama, USA)
- 18:1 Fosfatidylpropanol: sodná soľ 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-fosfopropanolu, 25 mg (Avanti Polar Lipids, Alabama, USA)

2.5 Reálne vzorky

Na analýzu bola použitá vlastná krv, ktorá bola následne spikovaná štandardom PEth 16:0/18:1 o koncentráciách 300 a 400 ng/ml, keďže tieto koncentrácie PEth v krvi prislúchajú skupine ľudí, ktorí konzumujú 1 až 3 poháriky denne, čo sa už považuje za prípad alkoholizmu.⁶¹ Dve vzorky, každá o objeme 1 ml, boli následne uchované pri - 18 °C.

2.6 Parametre analýzy

Separácia kvapalinovou chromatografiou prebiehala gradientovou elúciou, pričom zloženie mobilnej fázy je popísané v Tab. III a IV. Mobilná fáza A pozostávala zo zmesi 10 mM octanu amónneho a tetrahydrofuránu v pomere 60:40 V/V, mobilná fáza B bola 100% tetrahydrofurán. Prietok bol nastavený na 0,4 ml/min. Analytická kolóna bola termostatovaná na 40 °C. Vyvinuli a optimalizovali sa dve metódy. Prvá bola nastavená na roztoky štandardov a druhá pre reálne vzorky, kedy interferenty elujúce sa v okolí retenčného času analytu a interného štandardu si vynútili predĺženie doby analýzy a gradientu na zvýšenie špecificity. Dĺžka analýzy optimalizovanej pre roztoky štandardov bola 6 minút, pre reálne vzorky to bolo 17 minút. Objem nástreku bol 5 µl. Retenčný čas analytu PEth v metóde vyvinutej pre reálne vzorky bol okolo 9,90 minút, retenčný čas vnútorného štandardu PProp bol okolo 10,30 minút.

Tab. III: Zloženie mobilnej fázy počas separácie gradientovou elúciou pre metódu vyvinutú pre roztoky štandardov

Čas (min)	Mobilná fáza A (%)	Mobilná fáza B (%)
0	100	0
1	100	0
4,5	42	58
5	100	0
6	100	0

Tab. IV: Zloženie mobilnej fázy počas separácie gradientovou elúciou pre metódu vyvinutú pre reálne vzorky

Čas (min)	Mobilná fáza A (%)	Mobilná fáza B (%)
0	100	0
6	100	0
13	42	58
13,5	42	58
15	100	0
17	100	0

Podmienky hmotnostného detektora boli optimalizované automaticky aj manuálne a sú zhrnuté v Tab. V. Rovnaké nastavenie sa použilo pre obe metódy. Ionizácia prebiehala v zápornom režime, v ktorom analyt aj vnútorný štandard poskytujú intenzívnejší signál.

Tab. V: Nastavenie iónového zdroja hmotnostného detektora

Parameter	Hodnota
Rýchlosť prúdenia nebulizačného plynu (sheath gas) (arb)	22
Rýchlosť prúdenia pomocného plynu (aux gas) (arb)	11
Rýchlosť prúdenia protiprúdového dusíka (sweep gas) (arb)	0
Sprejovacie napätie (kV)	2,50
Teplota kapiláry (°C)	350
Napätie konusu (V)	- 26
Napätie na iónovej šošovke za vyhrievanou kapilárkou (V)	- 107,32

2.7 Príprava reálnych vzoriek pre analýzu

Vzorky sa po ich rozmrazení pretrepali na minitrepačke a odobralo sa 50 µl krvi do plastovej mikroskúmavky. Pridalo sa 2,75 µl roztoku interného štandardu fosfatidylpropanolu o koncentrácii 0,1 mg/ml, jeho konečná koncentrácia v roztoku bola 1 µg/ml. Vo finálnom postupe bola zvolená táto konečná koncentrácia PProp v roztoku, aj keď v jednotlivých skúšaných postupoch príprav spomenutých v tejto práci v kapitole 6.3 *Porovnanie rôznych postupov prípravy reálnych vzoriek* je uvedená konečná koncentrácia PProp v roztoku 100 ng/ml. Jeho koncentrácia musela byť navýšená z dôvodu potlačenia vplyvu interferentov a jasné odlíšenie píku 477 patriacemu vnútornému štandardu fosfatidylpropanolu na chromatografickom zázname. Na extrakciu sa použilo 75 µl acetonitrilu a 150 µl acetónu. Vzorky boli následne jemne pretriasané pri laboratórnej teplote po dobu 20 min a potom centrifugované 20 min pri 14 000 rpm.

Odobrala sa kvapalná fáza do novej plastovej mikroskúmavky, ktorá sa opäť vložila do centrifúgy na 10 min pri 14 000 rpm. Opatrne sa odpipetoval kvapalný podiel bez prípadného sedimentu do insertu autosamplerovej vialky a nastrieklo sa 5 μ l do HPLC/MS systému.

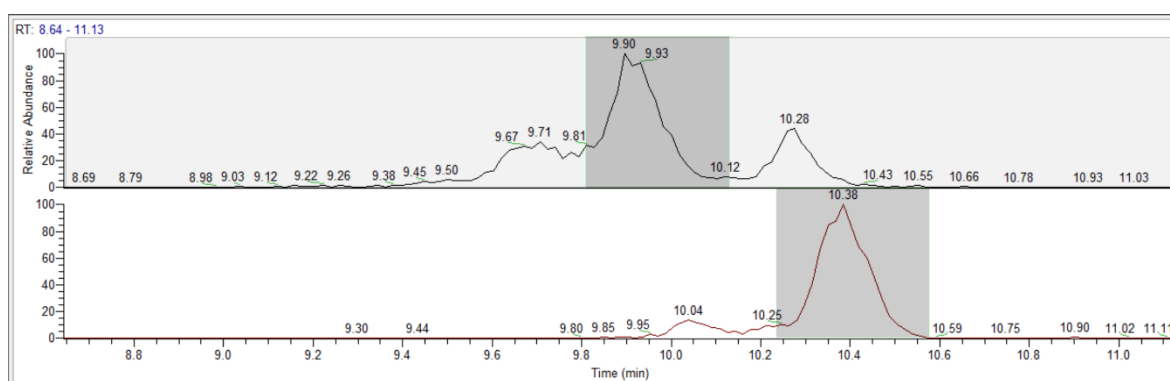
3 Výsledky a diskusia

Sledovala sa intenzita signálu fragmentového iónu 437 pre analyt a fragmentového iónu 477 pre vnútorný štandard. Oba tieto ióny vznikajú fragmentáciou rodičovských iónov sledovaných látok, pričom prekursorový ión $[M-H]^-$ pre PEth mal hodnotu m/z 701,5 a pre vnútorný štandard PProp mal hodnotu m/z 741,5. Odštiepením keténu mastnej kyseliny 18:1 (kyselina olejová) v oboch sledovaných látkach v prostredí kolíznej cely vznikajú vyššie uvedené fragmentové ióny, ktorých sledovaním v očakávanom retenčnom čase sa zaistilo odlišenie od rušivých látok (selektivitu zaist'uje zachovanie štruktúrneho motívu ethanolu resp. propanolu v produktovom ióne). Kvalitatívna aj kvantitatívna analýza boli preto vykonané v režime selected reaction monitoring (SRM). Fragmentový ión s hodnotou m/z 281,0, ktorý je prítomný v hmotnostných spektrách oboch látok (viď Obr. 8) vo vyššej intenzite v porovnaní s iónmi 437 a 477 sa nesledoval z toho dôvodu, že bol identifikovaný ako práve vyššie zmienená mastná kyselina. Tento ión bol viditeľný v spektrách viacerých interferujúcich látok, čo by spôsobilo falošne pozitívny výsledok. Chromatogram reálnej vzorky je zobrazený na Obr. 7.

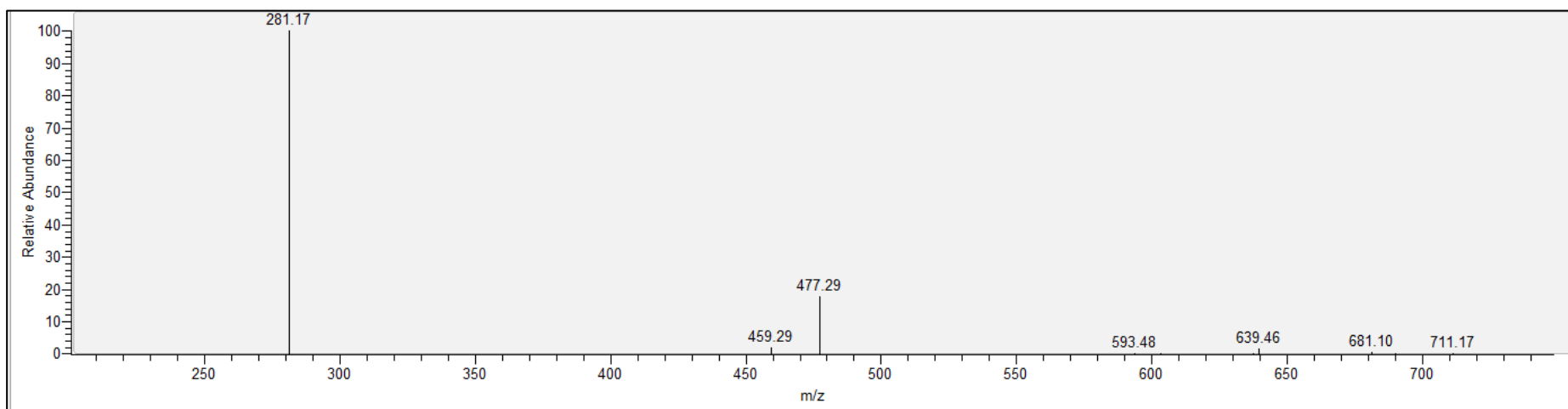
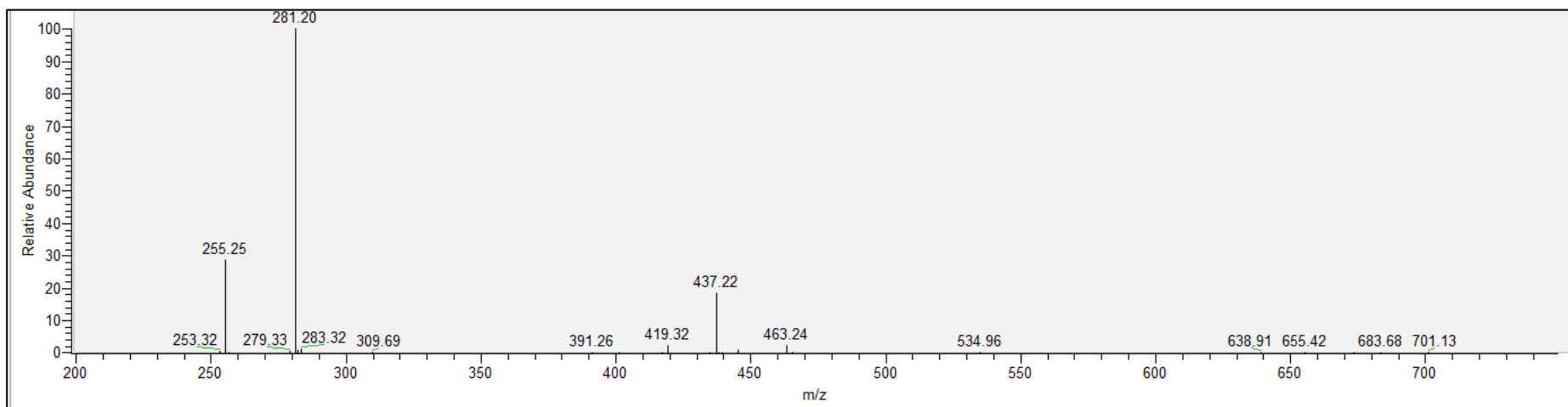
Následne bola vypočítaná koncentrácia PEth z kalibračnej priamky a relatívna chyba v porovnaní so spikovanými koncentraciami PEth pre obe reálne vzorky. Spikované boli štandardom PEth o koncentráciách 300 a 400 ng/ml. Tieto koncentrácie literatúra označuje za prípady alkoholizmu, kedy jedinec vypije v priemere jeden až tri poháriky denne.⁶¹ Tab. VI. zhŕňa toto porovnanie.

Tab. VI.: Koncentrácie PEth spikovaných reálnych vzoriek, namerané koncentrácie PEth z kalibračnej priamky a relatívna chyba merania

Koncentrácia PEth spikovaná (ng/ml)	Koncentrácia PEth nameraná (ng/ml)	Relatívna chyba (%)
300	247	-17,67
400	298	-25,50



Obr. 7: Chromatogram reálnej vzorky krvi, vyznačené píky analytu (hore) a vnútorného štandardu (dole). Priradenie chromatografického píku analytu a vnútornému štandardu bolo na základe retenčných časov zistených analýzou štandardov PEth a PProp



Obr. 8: MS/MS spektrum analytu PEth (hore, m/z 701,5) a vnútorného štandardu PProp (dole, m/z 741,5)

3.1 Hľadanie optimálnej mobilnej fázy

Literatúra uvádza niekoľko rozličných zložení mobilnej fázy pri štúdiu PEth.^{19,50,54,62} Pri použití acetonitrilu alebo methanolu, ktoré sa v tejto literatúre objavujú, však nebol pozorovaný signál analytu. Preto musela byť vykonaná analýza bez použitia kolóny priamou infúziou do MS detektora na overenie, že ho detektor rozpoznáva. Ukázalo sa, že tieto rozpúšťadlá nemali dostatočne vysokú elučnú silu, aby dostali analyt do detektora. Zvýšením elučnej sily mobilnej fázy použitím tetrahydrofuránu boli dosiahnuté uspokojivé výsledky.

Ďalším sledovaným parametrom bola symetria píku, kedy použitím kyslejšej mobilnej fázy (2% ACN + 1% HCOOH v deionizovanej H₂O) boli pozorované chvostujúce píky analytu. Pravdepodobne to bolo zapríčinené čiastočnou disociáciou fosfátu v PEth. pK_a okolo 2 v kyslej mobilnej fázi spôsobuje rovnováhu disociovaného a nedisociovaného fosfátu, čo má za následok rozmývanie píkov. Aby sa tento efekt potlačil, zvolil sa roztok octanu amónneho, v ktorom sa predpokladala úplná disociácia. Ako ideálna sa ukázala byť aplikácia 10 mM roztoku octanu amónneho v deionizovanej vode (mobilná fáza A) v spojení so 100% tetrahydrofuránom (mobilná fáza B), ďalej v texte označovaným THF.

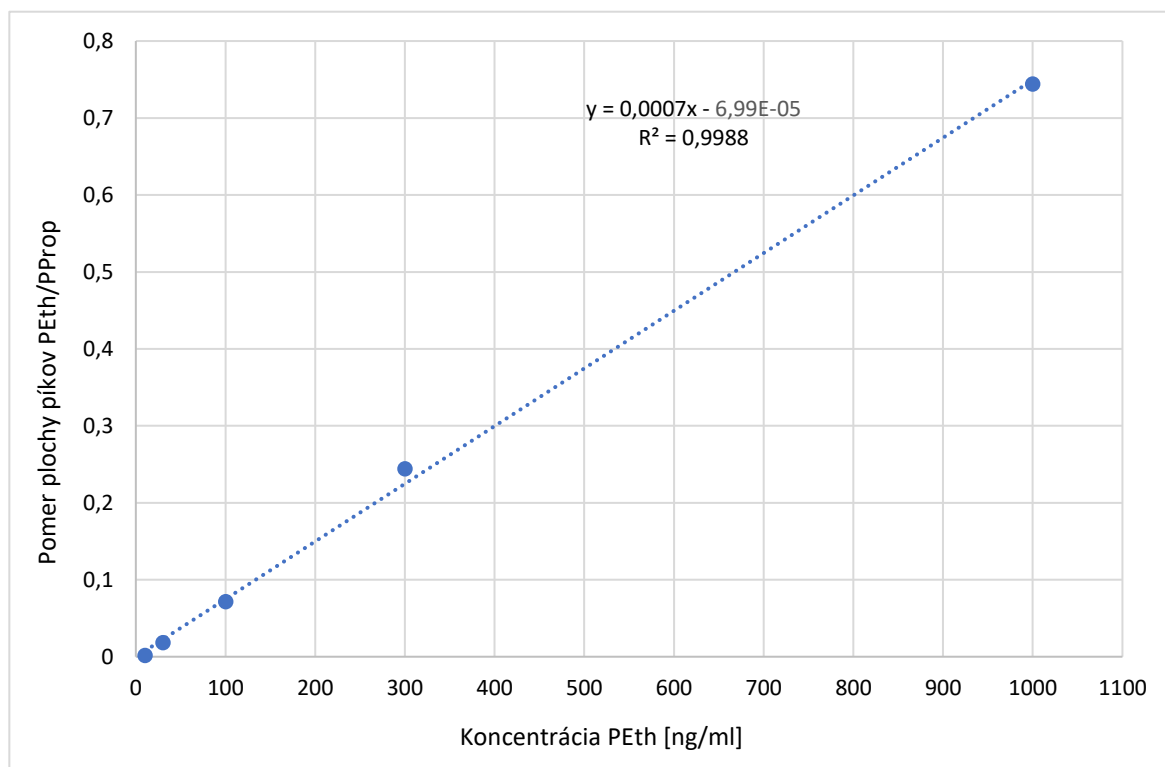
Nasledoval prechod na gradientovú elúciu, kedy bola snaha o nastavenie vhodnej elučnej sily, aby sa dosiahol priaznivý retenčný čas sledovaných látok, symetria píkov a intenzita signálov. Doba analýzy bola vtedy 10 minút, pričom najvyhovujúcejším retenčným časom sledovaných látok by bolo okolo polovice, čiže 5 minút. V nastavení, ktoré zobrazuje Tab. VII., je pomer zložiek mobilnej fázy, kedy pri nástreku zmesového roztoku PEth a PProp bol dosiahnutý retenčný čas analytu 4,18 minúty a retenčný čas PProp 4,30 minúty. Konečnou úpravou zloženia mobilnej fázy na 10 mM octan amónny : THF v pomere 60:40 V/V (mobilná fáza A) a THF (mobilná fáza B), sa dosiahla rovnaká elučná sila, ako je v Tab. VI, a tento gradient sa využíval po celú dobu študovania PEth v reálnych vzorkách. Dôvod bol čisto praktický – vodná mobilná fáza s octanom amónnym by sa pri dlhšom skladovaní znehodnotila rastom baktérií a rias. Uvedený je v Tab. III.

Tab. VII: Zloženie mobilnej fázy vo vyhovujúcich podmienkach pre analýzu pred jej konečnou úpravou

Čas (min)	Mobilná fáza A (%) 10 mM CH ₃ COONH ₄	Mobilná fáza B (%) THF
0	60	40
1	60	40
7	0	100
7,5	60	40

3.2 Limit detekcie a limit stanovitelnosti

Zostrojením závislosti pomerov plôch pík analytu PEth/vnútornému štandardu PProp na koncentrácii PEth v kalibračnom rade roztokov sa určila rovnica kalibračnej priamky a koeficient spoľahlivosti R^2 . Kalibračný rad analytu sa pripravil v koncentračnom rozmedzí od 10 do 1000 ng/ml PEth v methanole (MeOH). Graf 1 popisuje túto kalibračnú závislosť.



Graf 1: kalibračná závislosť pomeru plôch pík PEth/PProp na koncentráciách PEth v kalibračnom rade, rovnica kalibračnej priamky a koeficient spoľahlivosti R^2

Limit detekcie (LOD) a limit stanoviteľnosti (tiež známym ako limit kvantifikácie, LOQ) boli vypočítané z parametrov získaných z kalibračnej závislosti nasledujúcimi rovnicami:

$$LOD = \frac{3 \cdot \sigma}{S} \quad (1)$$

$$LOQ = \frac{10 \cdot \sigma}{S}, \quad (2)$$

v ktorých značí σ štandardnú odchýlku úseku a S smernicu kalibračnej závislosti. Hodnota LOD bola stanovená na 28 ng/ml a hodnota LOQ na 94 ng/ml.

3.3 Medziľahlá precíznosť

Medziľahlá precíznosť merania je dôležitým parametrom určujúcim precíznosť opakovaného merania za rovnakých podmienok na rovnakom prístroji vykonané rovnakým pracovníkom za krátke časové obdobie. Na výpočet bol použitý nasledujúci vzťah

$$RSD (\%) = \frac{100 \cdot s}{\bar{x}}, \quad (3)$$

v ktorom značí s smerodajnú odchýlku a \bar{x} aritmetický priemer hodnôt. Medziľahlá precíznosť bola vypočítaná z troch hodnôt koncentrácie získanej z kalibračnej priamky pre kalibračné roztoky PEth o koncentráciách 10 ng/ml a 30 ng/ml a ich zhrnutie je zobrazené v Tab. VIII.

Tab. VIII: Hodnoty koncentrácie vypočítanej z kalibračnej priamky pre analyt, ich priemer a vypočítaná smerodajná odchýlka pre kalibračné roztoky PEth 10 ng/ml a 30 ng/ml

Roztok	Koncentrácia PEth (ng/ml)	Smerodajná odchýlka	Priemer koncentrácie (ng/ml)
PEth 10 ng/ml	13	3,9	8,6
	9		
	4		
PEth 30 ng/ml	50	14,1	45,4
	59		
	26		

Z týchto hodnôt boli získané parametre RSD, kedy pre kalibračný roztok PEth 10 ng/ml bola relatívna smerodajná odchýlka 45,35 % a pre PEth 30 ng/ml 31,06 %.

3.4 Porovnanie rôznych postupov prípravy reálnych vzoriek

Boli vyskúšané celkovo štyri postupy prípravy reálnych vzoriek, pričom výber závisel na tom, aby použité podmienky analýz uvedených v článkoch boli čo najpodobnejšie vyhovujúcim nastaveniam parametrov prístroja a dostupnému príslušenstvu.

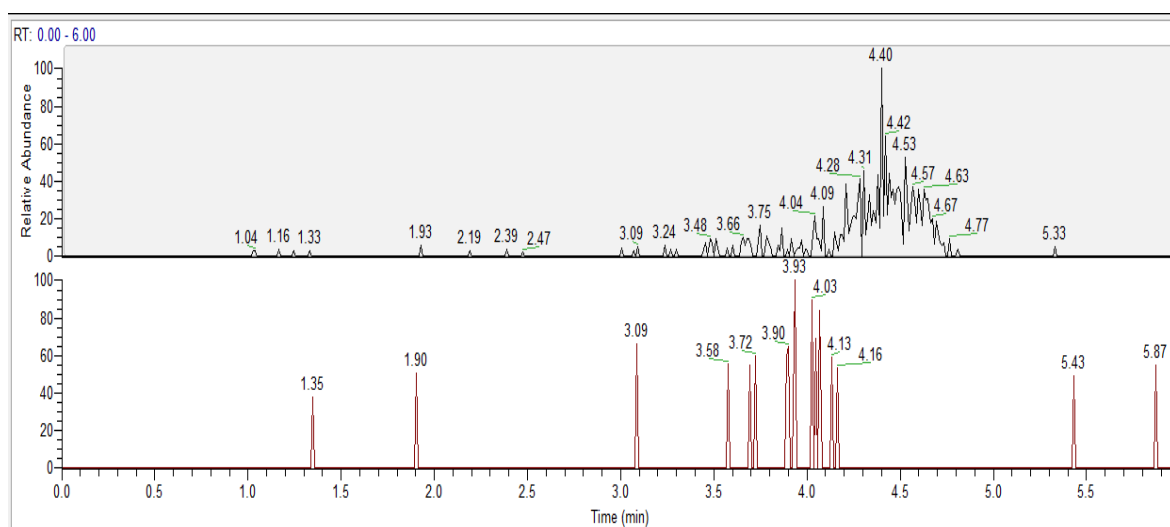
3.4.1 Helander et al., 2019⁵⁷

V postupe, ktorý sa nakoniec vybral na prípravu reálnych vzoriek a ktorý je uvedený v tejto práci v kapitole 5.6 *Príprava reálnych vzoriek pre analýzu* dochádzalo pri použití kratšej doby analýzy ku koelúcii sledovaných látok s interferujúcimi látkami. V dôsledku toho muselo byť predĺženie trvanie chromatografického deja, aby došlo k lepšej separácii analytu od ďalších prítomných zložiek. Tento postup prípravy reálnych vzoriek sa vybral na bližšie skúmanie interferentov a vďaka jeho nízkej časovej náročnosti v porovnaní s ostatnými skúšanými prípravami reálnych vzoriek.

3.4.2 Upravený postup podľa Nalessa et al., 2011⁵⁰

V tomto článku, kde bolo použité spojenie kvapalinovej chromatografie s vysokorozlišujúcou hmotnostnou spektrometriou na štúdium molekulárnych druhov PEth v ľudskej krvi, použili postup úpravy vzorky, ktorý však musel byť z dôvodu šetrenia reálnej vzorky a chemikálií upravený o pipetované objemy nasledujúcim spôsobom: k 100 μ l krvi sa pridalo 20 μ l roztoku vnútorného štandardu PProp o koncentrácii 1 μ g/ml, 100 μ l deionizovanej vody a nechalo sa krátko sonifikovať v ultrazvukovej čističke. Následne sa po kvapkách pridávalo 270 μ l izopropanolu a 400 μ l n-hexánu za občasného pretrepávania na minitrepačke. Po centrifugácii 10 minút sa odobrala vrchná fáza do novej plastovej mikroskúmavky a nechala sa odpariť dosucha jemným prúdom dusíka pri 40 °C. Zbytok po vysušení bol rekonštituovaný použitím 50 μ l dichlórmetánu a 150 μ l metanolu.

Tento postup sa však ukázal byť nevyhovujúci, pretože na chromatograme (viď Obr.9) nebol viditeľný pík vnútorného štandardu.

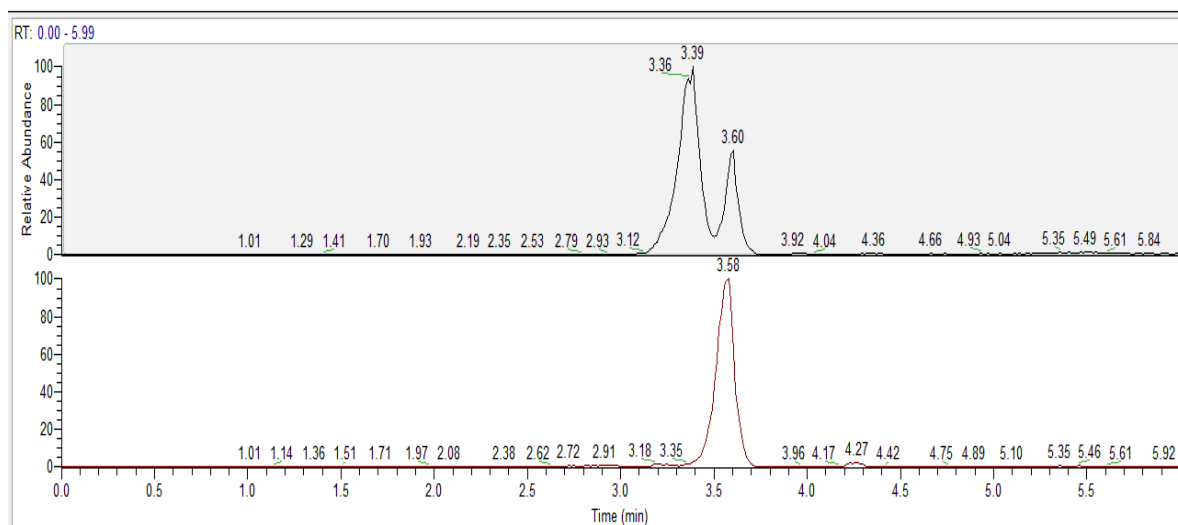


Obr. 9: Chromatogram reálnej vzorky pripravenej upraveným postupom podľa Nalessa et al. (2011), horná časť patrí elúcii PEth, spodná vnútornému štandardu PProp

3.4.3 Kombinácia postupov Helandera et al., 2019⁵⁷ a Zhenga et al., 2011¹⁷

Ďalším postupom prípravy, ktorý sa vyskúšal, a na ktorý sa odkazoval aj konečný postup prípravy podľa Helandera et al. (2019)⁵⁷, sa zaoberali švédski vedci počas štúdia PEth v ľudskej krvi. Postup vychádza z prípravy Helandera et al. uvedeným v tejto práci v kapitole 5.6 *Príprava reálnych vzoriek pre analýzu* (pozn. pipetovaný objem vnútorného štandardu bol 18 μ l roztoku PProp o koncentrácii 1 μ g/ml, aby bola konečná koncentrácia 100 ng/ml), avšak miesto nástreku po druhej centrifugácii do LC sa pokračovalo postupom od Zhenga et al. odobratím kvapalného podielu do novej plastovej mikroskúmavky a vysušením dosucha prúdom dusíka pri 30 °C. Na opätovné rozpustenie sa použilo 50 μ l n-heptánu, 50 μ l acetonitrilu a 75 μ l izopropanolu. Pred vložením do autosamplerovej vialky sa vzorky ešte nechali odstrediť na centrifúge po dobu 10 min pri 14 000 rpm.

Problémom tohto postupu prípravy bol až štvornásobný nárast intenzity signálov analytu aj vnútorného štandardu pravdepodobne spôsobený rušivými látkami. Chromatogram tohoto postupu prípravy je zobrazený na Obr. 10.

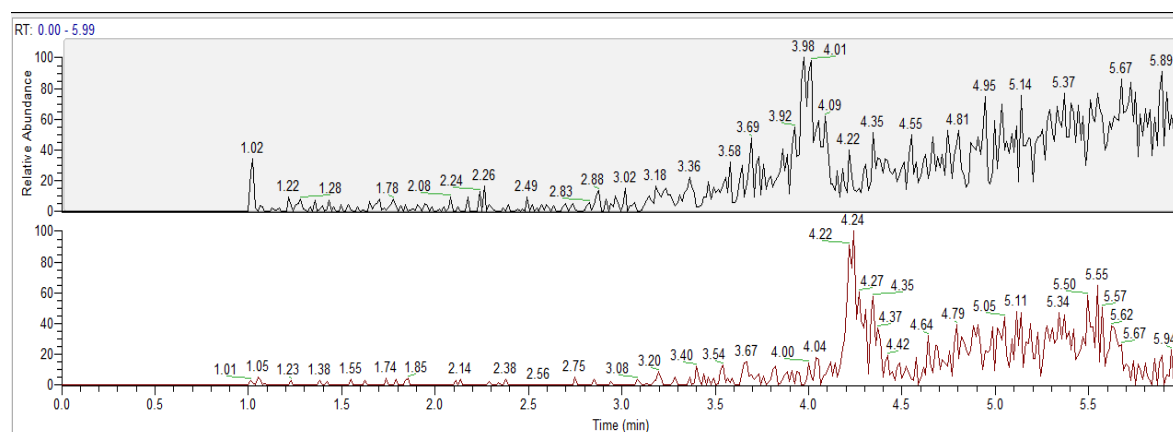


Obr. 10: Chromatogram reálnej vzorky pripravenej kombináciou postupov podľa Helandera et al. (2019) a Zhenga et al. (2011), na ktorý sa novší článok odkazuje. Horná časť chromatogramu patrí elúcii PEth, spodná vnútornému štandardu PProp

3.4.4 Analýza lipidov podľa Wolrabovej et al., 2021⁶³

Štvrtým postupom prípravy bola analýza lipidov podľa článku Wolrabovej et al., ktorej tím sa zaoberal štúdiom rozdielom profilov lipidov v plazme jedincov trpiacich rakovinou prsníka, obličiek alebo prostaty v porovnaní so zdravými ľuďmi. Odobralo sa 25 µl krvi, pridalo sa množstvo vnútorného štandardu odpovedajúce koncentrácii PProp 100 ng/ml v konečnom roztoku (pipetovaný objem bol 100 µl roztoku PProp o koncentrácii 1 µg/ml) a 3 ml zmesi chloroformu/methanolu v pomere 2:1 V/V. Vzorky sa vložili na 10 minút do ultrazvukovej čističky pri 40 °C. Po ochladení na laboratórnu teplotu sa pridalo 600 µl deionizovanej vody a nechalo sa pretriasť na minitrepačke 1 minútu. Vzorky sa nechali odstrediť pri 14 000 rpm po dobu 3 minúty a následne sa do novej mikroskúmavky odpipetovala spodná organická vrstva, ktorá sa prúdom dusíka pri 40 °C nechala odpariť dosucha. Pridalo sa 500 µl zmesi chloroformu/izopropanolu v pomere 1:1 V/V a po jemnom pretrepaní na minitrepačke sa vzorky znovu odstredili pri rovnakom nastavení centrifúgy. Odpipetoval sa kvapalný podiel bez prípadného sedimentu do autosamplerovej vialky a pridalo sa 500 µl mobilnej fázy A (zmes 10 mM octanu amónneho/100% THF v pomere 60:40, V/V).

Keďže bola vzorka rozdelená na dve fázy a nebolo isté, v ktorej sa budú nachádzať analyt a vnútorný štandard, oddelili sa a nastriekli sa do systému LC/MS samostatne. V hornej fáze neboli látky objavené a použitie spodnej fázy pre kvantifikáciu by bolo nevhodné, pretože signály oboch látok, PEth aj vnútorného štandardu, PProp, boli zaznamenané v šume (chromatogramy látok popisuje Obr. 11).



Obr. 11: Chromatogram reálnej vzorky pripravenej podľa Wolrabovej et al. (2021). Horná časť chromatogramu patrí elúcii PEth, spodná vnútornému štandardu PProp

3.5 Ďalšie zložky matrice

Aby sa presne určilo, ktoré signály patria sledovaným látkam, bolo úmyslom zdefinovať jednotlivé signály látok (ďalej označovaných rušivé látky) v okolí retenčných časov, ktoré by sa použili ako vnútorné štandardy obyčajne prítomné v ľudskej krvi. Na identifikáciu týchto látok v okolí retenčných časov analytu PEth a vnútorného štandardu PProp bol použitý tzv. data dependentný sken, kedy ióny získané z MS spektier reálnych vzoriek v okolí retenčných časov sledovaných látok boli fragmentované a podľa hodnoty m/z fragmentových iónov bolo posudzované, ktoré mastné kyseliny sú v danej látke prítomné. Uvedené sú v Tab. IX, ktorá popisuje, o aký fragment ide, štruktúry týchto látok sú zobrazené na Obr. 12. Vznikajúce fragmenty boli identifikované ako mastné kyseliny, keďže sa predpokladalo, že ide o lipidy vyskytujúce sa bežne v ľudskej krvi, z ktorých sa obyčajne skladajú. Podľa nich sa pomocou databázy lipidov Lipid Maps Structure Database⁶⁴ identifikovali interferujúce látky, avšak už nebolo možné odlíšiť jednotlivé izoméry. Na bližšie určenie, o ktorý izomér sa presne jedná, by bola nutná samostatná analýza štandardov týchto látok, čo však nebolo cieľom tejto práce, ale mohlo by byť predmetom ďalšej štúdie.

Fragmenty s m/z hodnotami 437,25; 452,25 a 478,33 nepredstavujú samostatné mastné kyseliny, ale vznikajú po odštiepení jednej z mastnej kyseliny buď v podobe keténu (len v prípade PE(O-16:0/18:2(9Z,12Z))) alebo po odštiepení kyslíka hydroxylovej skupiny karboxylu. Napriek tomu, že niektoré zložky matrice poskytujú fragmenty so sledovanými hodnotami m/z 437 a 477, ktoré prislúchajú aj analytu aj vnútornému štandardu, od týchto látok sa odlišovali retenčnými časmi. Prehľad identifikovaných potenciálnych interferujúcich látok zobrazuje Tab. X. Nejde však o vyčerpávajúci zoznam, niektoré látky nebolo možné identifikovať.

Tab. IX: Fragmentové ióny, ich hodnota m/z a bližší štruktúrny popis

Hodnota m/z fragmentového iónu	Popis fragmentu
255,25	Kyselina palmitová (16:0)
279,25	Kyselina linolová (18:2)
281,25	Kyselina olejová (18:1)
283,25	Kyselina stearová (18:0)
303,25	Kyselina arachidonová (20:4)
329,25	Kyselina dokozapentaénová (22:5)
331,25	Kyselina adrenová (22:4)

Tab. X: Prehľad potenciálne použiteľných látok pre kalibráciu retenčného času analytu prítomných v okolí retenčných časov analytu a vnútorného štandardu, PE je skratka pre fosfatidylethanolamín, GFL značí glycerofosfolipid

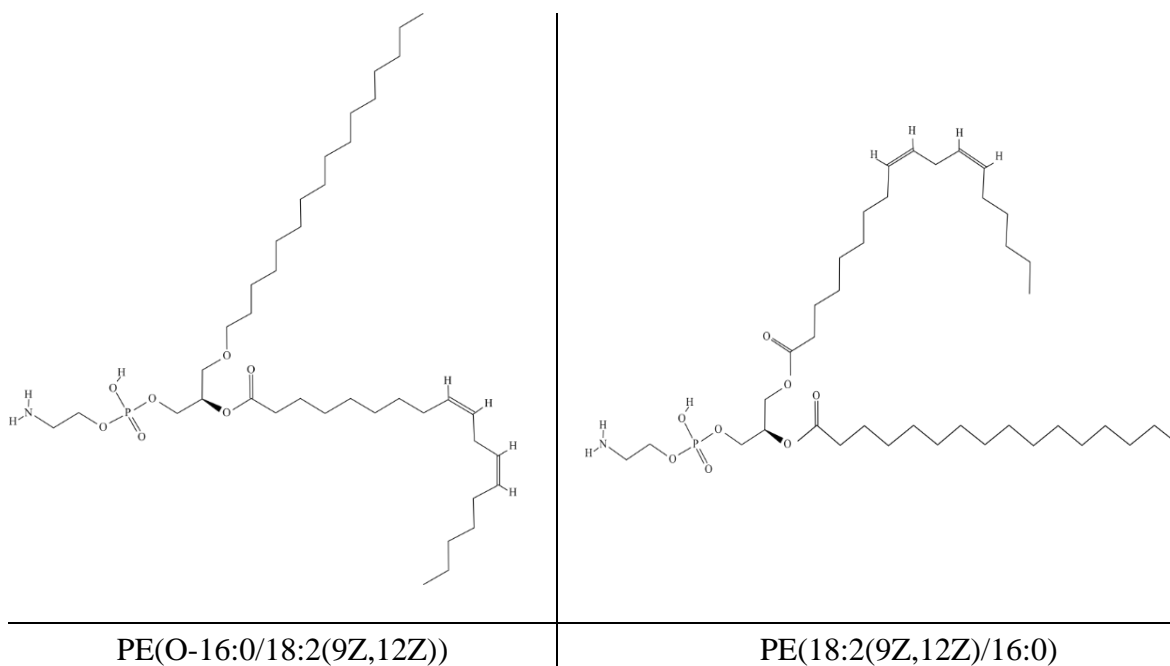
Hodnota m/z (deprotonizovaná)	Fragmentové ióny	Potenciálna látka	Kategória látok
699,67	255,25; 279,25; 437,25	PE(O-16:0/18:2(9Z,12Z))	GFL
714,83	255,25; 279,25; 452,33	PE(18:2(9Z,12Z)/16:0)	GFL
		PE(16:0/18:2(9Z,12Z))	
723,67	255,25; 283,25	Látka obsahujúca 16:0 a 18:0 mastné kyseliny, bližšie neidentifikovaná kvôli koelúcii s PEth 16:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)	-
	255,25; 303,25; 419,25*; 437,25	PEth 16:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)	GFL
738,75	255,25; 303,25; 452,25	PE(16:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z))	GFL
		PE(20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)/16:0)	

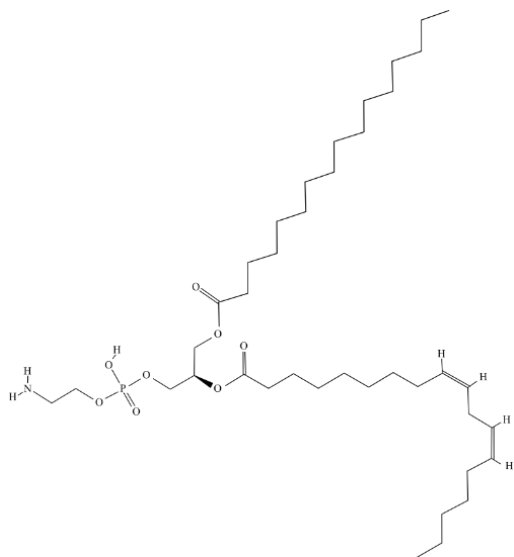
*Fragment s m/z 419,25 vzniká odštiepením vody z fragmentu 437,25.

Tab. X – pokrač., PCh označuje fosfatidylcholín

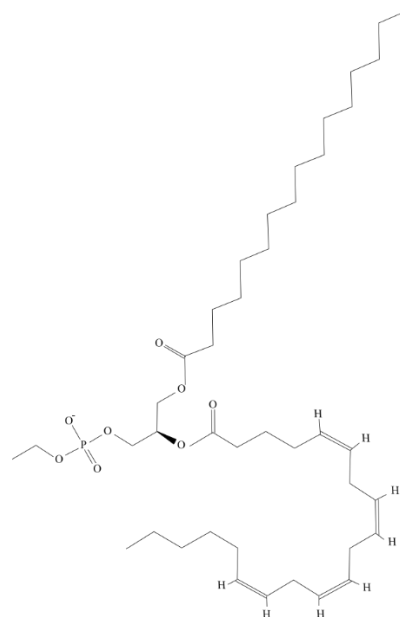
Hodnota m/z (deprotonizovaná)	Fragmentové ióny	Potenciálna látka	Kategória látok
764,83	255,25; 281,25; 303,25; 329,25; 478,25	PE(18:1(9Z)/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z))	GFL
		PE(20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)/18:1(9Z))	
		PCh(P-16:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z))	
		Látka obsahujúca 16:0 a 22:5 mastné kyseliny, bližšie neidentifikovaná kvôli koelúcii	-
778,71	303,25; 331,25	Látka obsahujúca 20:4 a 22:4 mastné kyseliny, bližšie neidentifikovaná	-

Štruktúry zaznamenané v Tab. X sú zobrazené v rovnakom poradí (zhora dolu a zľava doprava) na Obr. 12.

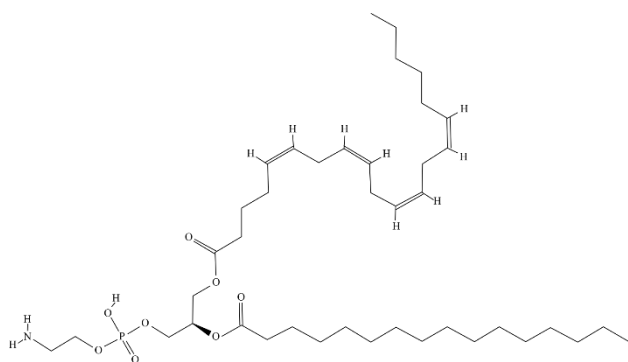




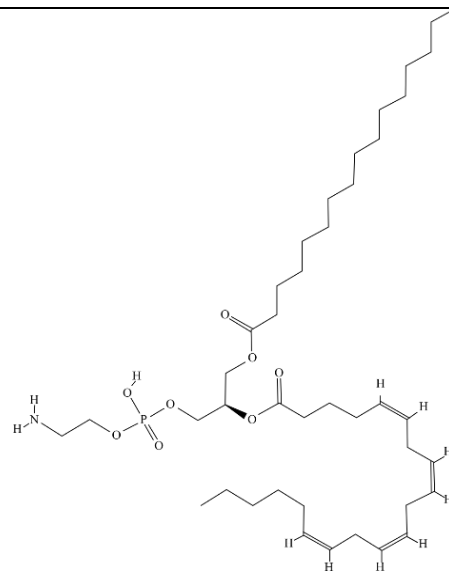
PE(16:0/18:2(9Z,12Z))



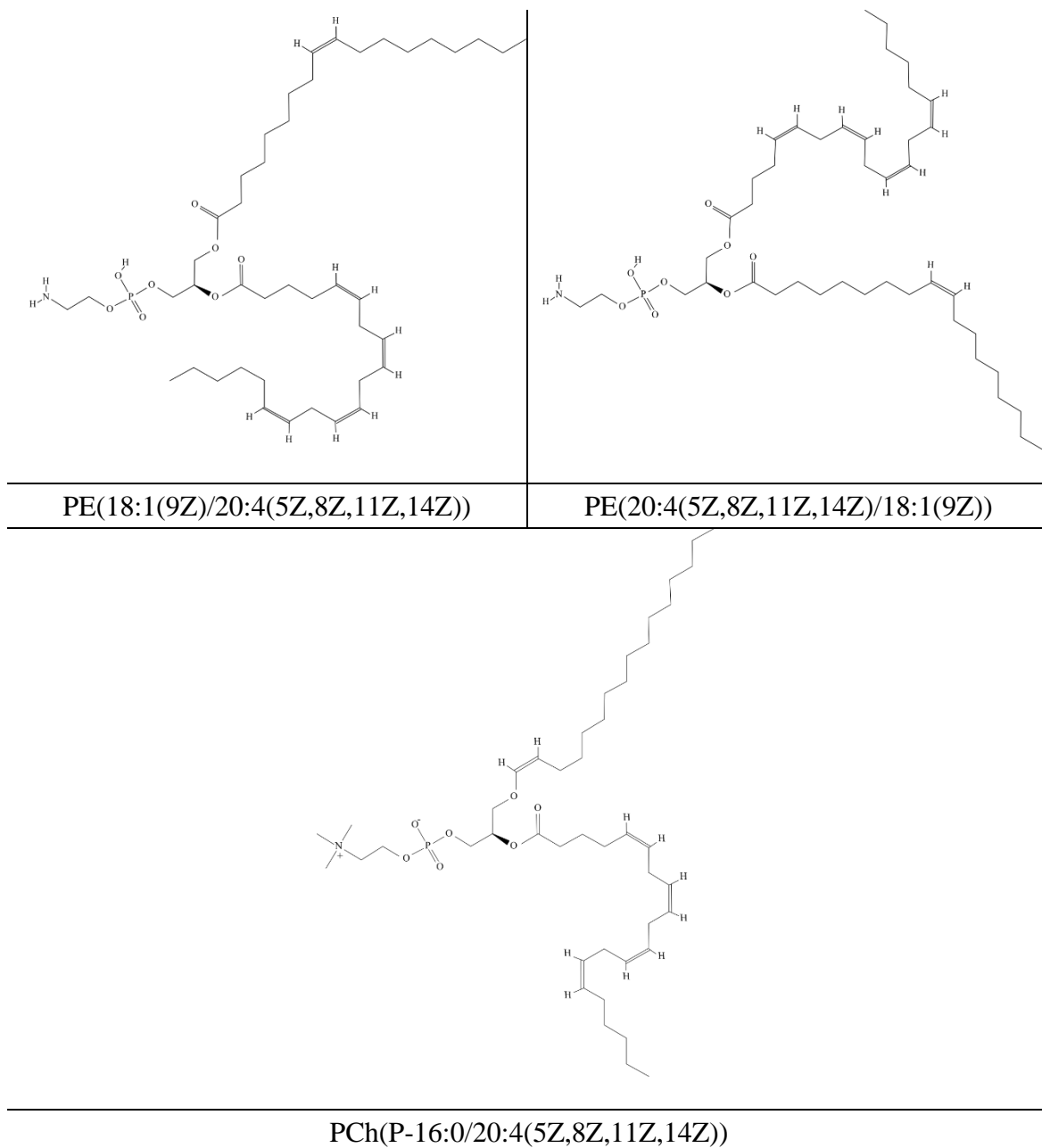
PEth 16:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)



PE(20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)/16:0)



PE(16:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z))



Obr. 12: Štruktúry a názvy identifikovaných ďalších zložiek matrice v okolí retenčných časov analytu PEth a vnútorného štandardu PProp

Porovnaním retenčných časov látok s hmotou m/z 699,67; 764,83, analytu PEth a vnútorného štandardu PProp a určenie diferencií medzi nimi však neboli zistené rovnaké hodnoty (alebo ich pomer), a teda kalibrácia retenčného času na tieto látky bežne prítomné v matrici nebola dosiahnutá. Tab. XI zobrazuje hodnoty retenčných časov a jednotlivé rozdiely medzi nimi pre tri nástreky reálnej vzorky počas troch rôznych dní. Vyplýva z nej, že v meraniach bolo rozdielne elučné poradie. Oproti meraniu číslo 1, kedy bolo elučné poradie nasledovné: ión 699,67-PEth-ión 764,83-PProp sa v meraní číslo 2 najskôr eluoval PEth, potom ión 699,67, nasledoval vnútorný štandard PProp a ako posledný sa eluoval ión s hodnotou m/z 764,83. V poslednom meraní bolo prehodené poradie elúcie PProp a iónu 764,83.

Tab. XI: Retenčné časy PEth, PProp a iónov s hodnotami m/z 699,67 a 764,83 pre tri rôzne nástreky reálnej vzorky počas troch dní

Číslo merania	Retenčný čas iónu 699,67 (min)	Rozdiel (min)	Retenčný čas PEth (min)	Rozdiel (min)	Retenčný čas iónu 764,83 (min)	Rozdiel (min)	Retenčný čas PProp (min)
1	9,48	0,44	9,92	0,30	10,22	0,16	10,38
2	9,23	0,73	8,50	1,10	9,60	0,27	9,33
3	5,79	1,41	7,20	2,43	9,63	0,90	8,73

4 Záver

Cieľom tejto práce bolo vyvinúť metódu pre stanovenie fosfatidylethanolu (PEth) v ľudskej krvi metódou kvapalinovej chromatografie s hmotnostne spektrometrickou detekciou, ktorá by sa dala použiť v klinickej praxi. Fosfatidylethanol sa totiž vytvára v krvi z fosfatidylcholínu len za prítomnosti ethanolu, čo ho robí výborným biomarkerom alkoholovej konzumácie. Boli vyvinuté dve metódy, pričom jedna bola optimalizovaná pre roztoky štandardov a druhá pre reálne vzorky. Dve metódy sa vytvorili preto, že interferujúce látky v okolí retenčných časov analytu a vnútorného štandardu (PProp) zvyšovali sledované signály fragmentových iónov 437 (PEth) a 477 (PProp), čo prispievalo k falošne pozitívnemu výsledku, a tým znehodnocovalo kvantitatívne vyhodnocovanie látok. Za postup prípravy reálnych vzoriek sa vybral článok pod vedením Helandera, ktorý v porovnaní s ďalšími skúmanými postupmi príprav reálnych vzoriek nemal také nedostatky. Retenčné časy ako analytu, tak aj vnútorného štandardu sa v rôzne dni nástreku posúvali, ale voči sebe zostávali v rovnakom odstupe, preto sa uvažovalo o identifikácii látok v okolí ich retenčných časov, aby sa jednoznačne dalo prehlásiť, že ide o fosfatidylethanol. Tieto látky by sa použili ako vnútorné štandardy, keďže sa bežne vyskytujú v matrici, avšak toto nebolo dosiahnuté. Data dependentným skenom bolo zistené, že niektoré látky poskytujú pri fragmentácii rovnaké ióny, ako boli sledované (437 a 477), ale od sledovaných látok sa líšili retenčnými časmi. Identifikovalo sa 12 možných interferujúcich látok, pričom ide prevažne o skupinu glycerofosfolipidov. Nebolo však možné rozlíšiť, o ktorý izomér sa presne jedná, na toto odlíšenie by bolo nutné vykonať samostatné analýzy štandardov jednotlivých izomérov, čo však nebolo cieľom tejto práce. Hodnota LOD bola stanovená na 28 ng/ml a hodnota LOQ na 94 ng/ml. Namerané koncentrácie PEth vypočítané z kalibračnej priamky (247 a 298 ng/ml) sa od spikovanej koncentrácie PEth (300 a 400 ng/ml) veľmi nelíšili. Relatívna chyba bola vypočítaná na -17,67 % a -25,50 %. Medziľahlá precíznosť merania bola vypočítaná pre kalibračné roztoky PEth o koncentráciách 10 ng/ml a 30 ng/ml z koncentrácie vypočítanej použitím kalibračnej priamky v podobe relatívnej smerodajnej odchýlky. RSD pre roztok PEth 10 ng/ml bola 45,35 % a pre roztok PEth 30 ng/ml bola vypočítaná hodnota RSD 31,06 %.

5 Zoznam použitej literatúry

1. Andersen, O. S. & Koeppe, R. E. Bilayer thickness and membrane protein function: An energetic perspective. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **36**, 107–130 (2007).
2. Phillips, M. C. The Membranes of Cells. *Chem. Phys. Lipids* **70**, 223 (1994).
3. Ishidate, K. Choline/ethanolamine kinase from mammalian tissues. *Biochim. Biophys. Acta - Lipids Lipid Metab.* **1348**, 70–78 (1997).
4. McMaster, C. R. & M. Bell, R. CDP-choline:1,2-diacylglycerol cholinephosphotransferase. *Biochim. Biophys. Acta - Lipids Lipid Metab.* **1348**, 100–110 (1997).
5. Vance, D. E., Walkey, C. J. & Cui, Z. Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase from liver. *Biochim. Biophys. Acta - Lipids Lipid Metab.* **1348**, 142–150 (1997).
6. Alling, C., Gustavsson, L. & Änggård, E. An abnormal phospholipid in rat organs after ethanol treatment. *FEBS Lett.* **152**, 24–28 (1983).
7. Gustavsson, L. & Alling, C. Formation of phosphatidylethanol in rat brain by phospholipase D. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **142**, 958–963 (1987).
8. Kobayashi, M. & Kanfer, J. N. Phosphatidylethanol Formation via Transphosphatidylation by Rat Brain Synaptosomal Phospholipase D. *J. Neurochem.* **48**, 1597–1603 (1987).
9. Morris, A. J. *et al.* Regulation and functions of phospholipase D. in *Biochemical Society Transactions* vol. 25 1151–1157 (Biochem Soc Trans, 1997).
10. Athenstaedt, K. & Daum, G. Phosphatidic acid, a key intermediate in lipid metabolism. *Eur. J. Biochem.* **266**, 1–16 (1999).
11. Bocckino, S. B., Wilson, P. B. & Exton, J. H. Ca²⁺-mobilizing hormones elicit phosphatidylethanol accumulation via phospholipase D activation. *FEBS Lett.* **225**, 201–204 (1987).
12. Aradóttir, S., Seidl, S., Wurst, F. M., Jönsson, B. A. G. & Alling, C. Phosphatidylethanol in human organs and blood: A study on autopsy material and influences by storage conditions. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **28**, 1718–1723 (2004).
13. Hansson, P.; Caron, M.; Johnson, G.; Gustavsson, L.; Alling, C. Blood phosphatidylethanol as a marker of alcohol abuse: levels in alcoholic males during withdrawal. *Alcohol Clin Exp Res.* 108–110 (1997).
14. Aradóttir, S., Asanovka, G., Gjerds, S., Hansson, P. & Alling, C. Phosphatidylethanol (PEth) concentrations in blood are correlated to reported alcohol intake in alcohol-dependent patients. *Alcohol Alcohol.* **41**, 431–437 (2006).
15. Stewart, S. H., Koch, D. G., Willner, I. R., Anton, R. F. & Reuben, A. Validation of blood phosphatidylethanol as an alcohol consumption biomarker in patients with chronic liver disease. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **38**, 1706 (2014).
16. Stewart, S. H., Law, T. L., Randall, P. K. & Newman, R. Phosphatidylethanol and

- Alcohol Consumption in Reproductive Age Women. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **34**, 488 (2010).
17. Zheng, Y., Beck, O. & Helander, A. Method development for routine liquid chromatography-mass spectrometry measurement of the alcohol biomarker phosphatidylethanol (PEth) in blood. *Clin. Chim. Acta* **412**, 1428–1435 (2011).
 18. Bendroth, P. *et al.* Comparison of ethyl glucuronide in hair with phosphatidylethanol in whole blood as post-mortem markers of alcohol abuse. *Forensic Sci. Int.* **176**, 76–81 (2008).
 19. Gnann, H. *et al.* Identification of 48 homologues of phosphatidylethanol in blood by LC-ESI-MS/MS. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010 3967** **396**, 2415–2423 (2010).
 20. Atkinson, A. J. *et al.* Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clin. Pharmacol. Ther.* **69**, 89–95 (2001).
 21. World Health Organization & International Programme on Chemical Safety. Biomarkers In Risk Assessment: Validity And Validation. *Environ. Heal.* 144 (2001).
 22. Aitio, A. *et al.* Biomarkers and risk assessment: Concepts and principles. *Environ. Heal. Criteria* 3–82 (1993).
 23. Peterson, K. Biomarkers for Alcohol Use and Abuse: A Summary. *Alcohol Res. Heal.* **28**, 30 (2004).
 24. Swift, R. Direct measurement of alcohol and its metabolites. *Addiction* **98**, 73–80 (2003).
 25. Maenhout, T. M., De Buyzere, M. L. & Delanghe, J. R. Non-oxidative ethanol metabolites as a measure of alcohol intake. *Clin. Chim. Acta* **415**, 322–329 (2013).
 26. Helander, A. & Beck, O. Chapter 17 Analytical markers of acute and chronic alcohol consumption. in *Handbook of Analytical Separations* vol. 6 567–588 (Elsevier Science B.V., 2008).
 27. Halvorson, M. R. *et al.* Comparative Evaluation of the Clinical Utility of Three Markers of Ethanol Intake: The Effect of Gender. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **17**, 225–229 (1993).
 28. Neumann, T. & Spies, C. Use of biomarkers for alcohol use disorders in clinical practice. *Addiction* **98**, 81–91 (2003).
 29. Süße, S., Selavka, C. M., Mieczkowski, T. & Pragst, F. Fatty acid ethyl ester concentrations in hair and self-reported alcohol consumption in 644 cases from different origin. *Forensic Sci. Int.* **196**, 111–117 (2010).
 30. Caslavská, J. & Thormann, W. Monitoring of alcohol markers by capillary electrophoresis. *J. Sep. Sci.* **36**, 75–95 (2013).
 31. Helander, A., Husa, A. & Jeppsson, J. O. Improved HPLC Method for Carbohydrate-deficient Transferrin in Serum. *Clin. Chem.* **49**, 1881–1890 (2003).
 32. Beck, O. & Helander, A. 5-Hydroxytryptophol as a marker for recent alcohol intake. *Addiction* **98**, 63–72 (2003).

33. Johnson, R. D., Lewis, R. J., Canfield, D. V., Dubowski, K. M. & Blank, C. L. Utilizing the Urinary 5-HTOL/5-HIAA Ratio to Determine Ethanol Origin in Civil Aviation Accident Victims. *J. Forensic Sci.* **50**, 1–6 (2005).
34. Johnson, R. D., Lewis, R. J., Canfield, D. V & Blank, C. L. Accurate assignment of ethanol origin in postmortem urine: Liquid chromatographic-mass spectrometric determination of serotonin metabolites. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **805**, 223–234 (2004).
35. Wurst, F. M., Skipper, G. E. & Weinmann, W. Ethyl glucuronide--the direct ethanol metabolite on the threshold from science to routine use. *Addiction* **98 Suppl 2**, 51–61 (2003).
36. Wurst, F. M. *et al.* Concentration of fatty acid ethyl esters in hair of alcoholics: comparison to other biological state markers and self reported-ethanol intake. *Alcohol Alcohol* **39**, 33–38 (2004).
37. Salem, R. O., Refaai, M. A., Cluette-Brown, J. E., Russo, J. W. & Laposata, M. Fatty acid ethyl esters. Ethanol metabolites that reflect ethanol intake. *Am. J. Clin. Pathol.* **119 Suppl**, (2003).
38. Yegles, M. *et al.* Comparison of ethyl glucuronide and fatty acid ethyl ester concentrations in hair of alcoholics, social drinkers and teetotallers. *Forensic Sci. Int.* **145**, 167–173 (2004).
39. Ratsma, J. E., Van der Stelt, O. & Gunning, W. B. Neurochemical markers of alcoholism vulnerability in humans. *Alcohol Alcohol* **37**, 522–533 (2002).
40. Hoffman, P. L., Glanz, J., Tabakoff, B. & WHO/ISBRA. Platelet adenylyl cyclase activity as a trait marker of alcohol dependence. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **24**, 810–821 (2002).
41. Mihic, S. J. & Harris, R. A. Alcohol actions at the GABA-A receptor/chloride channel complex. in *Deitrich, R.A, and Erwin, V.G., eds. Pharmacological Effects of Ethanol on the Nervous System* 51–72 (Boca Raton: CRC Press, 1996).
42. Balldin, J., Alling, C., Gottfries, C. G., Lindstedt, G. & Långström, G. Changes in dopamine receptor sensitivity in humans after heavy alcohol intake. *Psychopharmacol. 1985* **86**, 142–146 (1985).
43. George, D. T. *et al.* Buspirone treatment of alcoholism: age of onset, and cerebrospinal fluid 5-hydroxyindolacetic acid and homovanillic acid concentrations, but not medication treatment, predict return to drinking. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **23**, 272–278 (1999).
44. Petrakis, I. L. *et al.* CSF monoamine metabolite and beta endorphin levels in recently detoxified alcoholics and healthy controls: prediction of alcohol cue-induced craving? *Alcohol Clin Exp Res.* **23**, 1336–41 (1999).
45. Oswald, L. M. & Wand, G. S. Opioids and alcoholism. *Physiol. Behav.* **81**, 339–358 (2004).
46. Zalewska-Kaszubska, J. & Czarnecka, E. Deficit in beta-endorphin peptide and tendency to alcohol abuse. *Peptides* **26**, 701–705 (2005).
47. Swann, A. C., Johnson, B. A., Cloninger, C. R. & Chen, Y. R. Relationships of

- plasma tryptophan availability to course of illness and clinical features of alcoholism: a preliminary study. *Psychopharmacology (Berl)*. **143**, 380–384 (1999).
48. Oroszi, G. & Goldman, D. Alcoholism: genes and mechanisms. *Pharmacogenomics* **5**, 1037–1048 (2004).
 49. Wurst, F. M. *et al.* Phosphatidylethanol: Normalization during detoxification, gender aspects and correlation with other biomarkers and self-reports. *Addict. Biol.* **15**, 88–95 (2010).
 50. Nalesso, A. *et al.* Quantitative profiling of phosphatidylethanol molecular species in human blood by liquid chromatography high resolution mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1218**, 8423–8431 (2011).
 51. Wurst, F. M. *et al.* Characterization of sialic acid index of plasma apolipoprotein J and phosphatidylethanol during alcohol detoxification--a pilot study. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **36**, 251–257 (2012).
 52. Jain, J., Evans, J. L., Briceño, A., Page, K. & Hahn, J. A. Comparison of Phosphatidylethanol Results to Self-Reported Alcohol Consumption Among Young Injection Drug Users. *Alcohol Alcohol.* **49**, 520–524 (2014).
 53. Baldwin, A. E., Jones, J., Jones, M., Plate, C. & Lewis, D. Retrospective assessment of prenatal alcohol exposure by detection of phosphatidylethanol in stored dried blood spot cards: An objective method for determining prevalence rates of alcohol consumption during pregnancy. *Int. J. Alcohol Drug Res.* **4**, 131–137 (2015).
 54. Kummer, N. *et al.* 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.* **408**, 825–838 (2016).
 55. Andresen-Streichert, H. *et al.* Improved detection of alcohol consumption using the novel marker phosphatidylethanol in the transplant setting: results of a prospective study. *Transpl. Int.* **30**, 611–620 (2017).
 56. Andreassen, T. N., Havnen, H., Spigset, O., Falch, B. M. H. & Skråstad, R. B. High Throughput UPLC®-MSMS Method for the Analysis of Phosphatidylethanol (PEth) 16:0/18:1, a Specific Biomarker for Alcohol Consumption, in Whole Blood. *J. Anal. Toxicol.* **42**, 33–41 (2018).
 57. Helander, A., Böttcher, M., Dahmen, N. & Beck, O. Elimination Characteristics of the Alcohol Biomarker Phosphatidylethanol (PEth) in Blood during Alcohol Detoxification. *Alcohol Alcohol.* **54**, 251–257 (2019).
 58. Liang, X. *et al.* DNA methylation signature on phosphatidylethanol, not on self-reported alcohol consumption, predicts hazardous alcohol consumption in two distinct populations. *Mol. Psychiatry* **26**, 2238–2253 (2020).
 59. Neumann, J., Beck, O. & Böttcher, M. Phosphatidylethanol, ethyl glucuronide and ethanol in blood as complementary biomarkers for alcohol consumption. *J. Mass Spectrom. Adv. Clin. Lab* **22**, 3–7 (2021).
 60. Gundlach, J. P. *et al.* Phosphatidylethanol (PEth) for Monitoring Sobriety in Liver Transplant Candidates: Preliminary Results of Differences Between Alcohol-Related and Non-Alcohol-Related Cirrhosis Candidates. *Ann. Transplant.* **27**,

(2022).

61. Stewart, S. H. *et al.* Preliminary evaluation of phosphatidylethanol and alcohol consumption in patients with liver disease and hypertension. *Alcohol Alcohol* **44**, 464–467 (2009).
62. 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* **67**, 7–13 (2018).
63. Wolrab, D. *et al.* Plasma lipidomic profiles of kidney, breast and prostate cancer patients differ from healthy controls. *Sci. Reports 2021 111* **11**, 1–14 (2021).
64. Sud, M. *et al.* LMSD: LIPID MAPS structure database. *Nucleic Acids Res.* **35**, D527–D532 (2007).