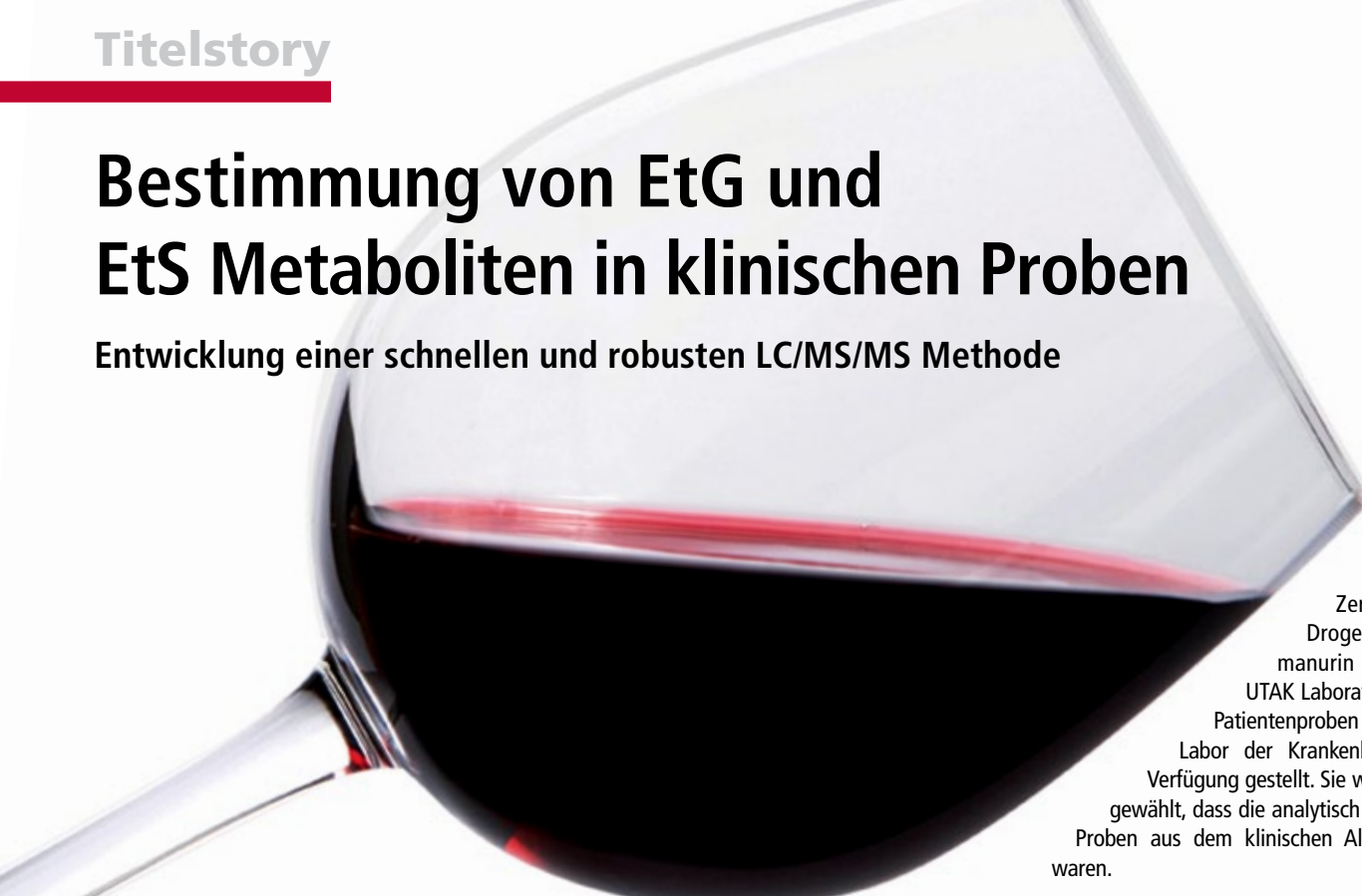


Bestimmung von EtG und EtS Metaboliten in klinischen Proben

Entwicklung einer schnellen und robusten LC/MS/MS Methode



mental Sciences erworben. Zertifiziertes Drogenfreies Humanurin wurde von UTAK Laboratories gekauft. Patientenproben wurden vom Labor der Krankenhauskette zur Verfügung gestellt. Sie wurden so ausgewählt, dass die analytisch komplexesten Proben aus dem klinischen Alltag vertreten waren.

Die GC-FID Bestimmung von Alkohol ist aufgrund des Alkoholabbaus im Körper nur innerhalb von 6–24 Stunden nach dem Konsum verlässlich. Die Bestimmung der Ethanolmetaboliten Ethylglucuronid (EtG) und Ethylsulfat (EtS) aus Urin kann auch noch 80 Stunden nach dem Alkoholkonsum verlässliche Ergebnisse liefern. Die Analyse dieser Analyten kann wegen ihres polaren Charakters und der komplexen Matrix eine aufwändige Methodenentwicklung erfordern.

Die analytische Abteilung von Phenomenex wurde kürzlich von einem Kunden gebeten, eine schnelle und einfache Methode für die Bestimmung von EtG und EtS zu entwickeln. In der in diesem Artikel beschriebenen Methode folgt einer einfachen Verdünnung der Urinprobe eine schnelle (< 7 min) LC/MS/MS Bestimmung. Sie kann multiplext werden und so Injektionsintervalle von weniger als zwei Minuten ermöglichen. Die Leistung der Methode wurde über die Standardkalibrierbereiche validiert, und die Methode wurde verwendet, um Patientenproben zu analysieren. Es wurde eine deutliche Auftrennung zwischen EtG und EtS sowie eines verbreiteten endogenen Inhaltsstoffs von Urin erreicht.

Einleitung

Der Nachweis von Alkoholkonsum bei Personen wird durch den schnellen metabolischen Abbau des Alkohols erschwert. Ethanol wird im Körper auf zwei unterschiedlichen Wegen metabolisiert.

Hierbei entstehen entweder EtG oder EtS. Diese beiden Metaboliten werden langsam über den Urin ausgeschieden und können daher noch drei bis fünf Tage nach dem Alkoholkonsum nachgewiesen werden. Dies ist besonders wichtig, wenn für gewisse Tätigkeiten vorheriger Alkoholkonsum verboten ist [1]. Außerdem sind EtG und EtS genauere Indikatoren für Alkoholkonsum als andere Nachweise, da Sie nur beim Genuss von Alkohol auftreten.

Es wurden verschiedene Methoden zur Bestimmung von EtG und EtS vorgeschlagen. Diese schließen auch GC/MS- und LC/MS/MS-Methoden ein [2]. Die Analyse dieser Verbindungen kann aufgrund ihres polaren Charakters (log P von EtG = 1,51 und EtS = 0,62) herausfordernd sein. Bei herkömmlichen LC-Phasen treten häufig Probleme damit auf, diese Verbindung ohne die Verwendung von Ionenpaarreagenzien ausreichend zurückzuhalten. Man eluiert dann häufig zu einem Zeitpunkt an dem noch starke Suppressionseffekte durch die Matrix auftreten. Kürzlich wurde Phenologix von einer großen Krankenhauskette gebeten, eine robuste Methode für deren Alkoholentzugsprogramm zu entwickeln. Phenologix ist eine analytische Abteilung, die Phenomenex Kunden bei der Entwicklung und Optimierung von chromatographischen Methoden unterstützt. In diesem Artikel wird der Entwicklungsprozess und die anschließende Validierung einer LC/MS/MS-Methode zur Bestimmung von EtG/EtS beschrieben.

Reagenzien und Chemikalien

Alle Reagenzien und Lösemittel besaßen HPLC oder analytische Qualität. Ethyl β-D-glucuronid (EtG) und Ethyl β-D-glucuronid-d5 (EtG-d5) wurden von Cerilliant gekauft. Ethylsulfat und Ethylsulfat-d5 (EtS-d5) wurden von Athena Environ-

Ergebnisse und Diskussion

Zur Bestimmung der geeigneten Phase für diese Analyse wurden insgesamt 15 verschiedene HPLC Säulen unter verschiedenen Laufmittelbedingungen getestet. Um EtG ohne den Einsatz von Ionenpaarreagenzien zu retinieren, muss mit rein wässrigen Laufmittelbedingungen gestartet werden. Dies schränkt die Auswahl der C18 Phasen ein, die für diese Methode verwendet werden können. Synergi Hydro-RP besitzt ein polares Endcapping, das die Säule 100% wasserstabil macht und eine erhöhte polare Selektivität gegenüber den Metaboliten bietet. Die Trenneffizienz einer Säule ist proportional zur Partikelgröße, allerdings ist der erzeugte Rückdruck auch umgekehrt proportional zur Partikelgröße. Es wurde daher ein 2,5 µm Material gewählt, um eine maximale Trenneffizienz innerhalb der Druckbegrenzungen eines konventionellen HPLC Systems zu erzielen.

Der Einsatz der Synergi Hydro-RP 2,5 µm Säule ermöglichte die schnelle Trennung von EtG und EtS in weniger als zwei Minuten (Abb. 1). Die Gesamtlaufzeit betrug sieben Minuten, um ein gründliches Spülen der Säule sicherzustellen. Das relevante Analysenzeitfenster ist jedoch kleiner als zwei Minuten. Dadurch erlaubt diese schnelle Trennung auch den Einsatz von Multiplexing-Techniken, um den Probendurchsatz zu erhöhen und die Analyse einer großen Anzahl von Proben zu ermöglichen. Besonders wichtig war, dass ein endogener Matrixbestandteil, der bekannt dafür ist eine starke Ionensuppression im EtS Messkanal zu verursachen, sehr gut von EtG abgetrennt wurde.

Phenomenex wurde gebeten die Probenvorbereitung aus Kostengründen zu minimieren. Deshalb wurde entschieden, die Urinproben im Verhältnis 1:10 mit einer 10 mM Ammoniumacetat-Lösung zu verdünnen. Es wurden Standardkalibrierkurven über den Konzentrationsbereich von 25 ng/ml bis 2000 ng/ml durch das Auftragen

Analyt	LOQ	ULOQ	Schnittpunkt Y-Achse	R ²	Präzision % (N = 3)						S/R	RT	
					80ng/ml		400ng/ml		800ng/ml*				25ng/ml
					Ø	%CV	Ø	%CV	Ø	%CV			
EtG-1	25	2000	0.0007661x + 0.00214	0.9989	118	1.83	116	5.89	108	2.33	47.5	1.11	
EtG-2	25	2000	0.0386x + 0.0372	0.9978	103	9.97	93.1	6.91	96.1	1.04	48.5	1.10	
EtS-1	25	2000	0.00554x + 0.025	0.9969	113	1.25	104	7.20	103	1.46	88.2	1.30	
EtS-2	25	2000	0.0263x + 0.125	0.9959	112	5.16	107	4.58	102	0.98	205.3	1.30	

Tabelle 1: Statistische Daten zur Bestimmung von EtG und EtS in Urin mit LC/MS/MS. LOQ = Quantifizierungsgrenze (Limit of quantification), ULOQ = Obere Quantifizierungsgrenze (Upper limit of quantification), CV = Variationskoeffizient (Coefficient of Variation, CV = Standardabweichung / Durchschnitt), S/R = Signal / Rausch, RT = Retentionszeit (Retention Time). *Wegen eines Gerätefehlers wurden für den 800 ng/ml Standard nur zwei Messungen durchgeführt.

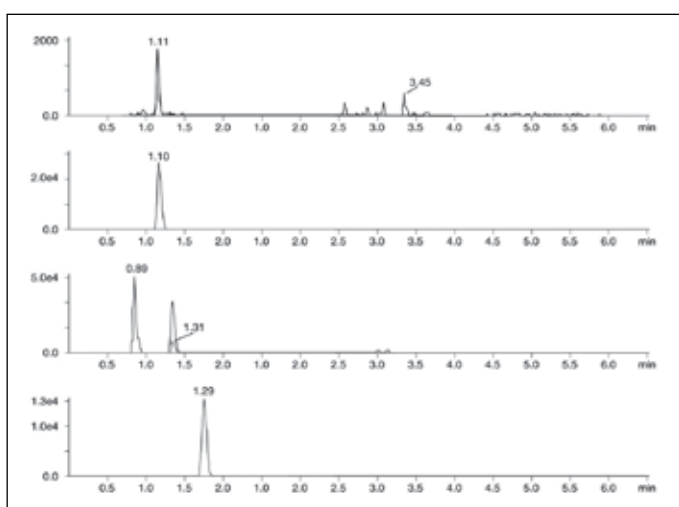


Abb. 1. Extrahierte Ionenchromatogramme von EtG, EtS und deren internen Standards (EtG-D5 und EtS-D5) bei einer Konzentration von 100 ng/ml in 1:10 verdünnten Humanurin.

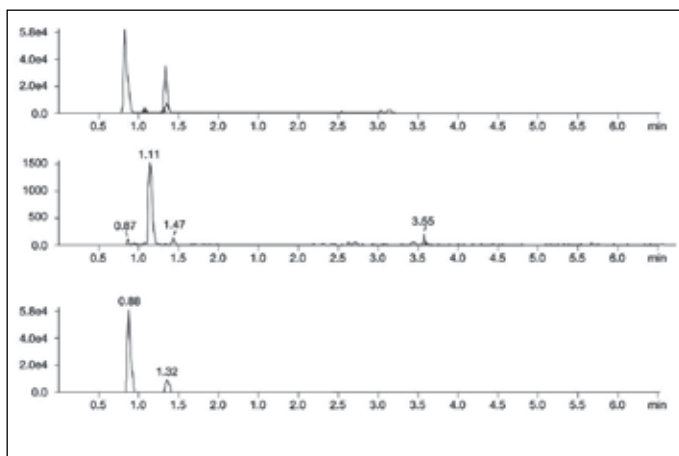


Abb. 2. Patientenprobe mit relativ niedrigen EtG und EtS Konzentrationen.

der relativen Peakfläche (Peakfläche von EtG und EtS/ Peakfläche der internen Standards) gegenüber der Konzentration ermittelt. Eine lineare Regressionsgerade mit dem Gewichtungsfaktor 1/x wurde verwendet, um den übermäßigen Einfluss hoher Konzentration von EtG und EtS in den hochkonzentrierten Kalibrierlösungen auszubalancieren. Die Standardkalibrierkurven waren über den Kalibrierbereich linear mit einem R² Wert für EtG-1 von 0,9989.

Die Empfindlichkeit der Methode wurde in Form der Quantifizierungsgrenze (Limit of Quantification, LOQ) durch Bestimmung der geringsten Konzentration mit einem Signal-zu-

Säule: Synergi Hydro-RP, 2,5µm
 Dimensionen: 100 x 2,0 mm
 Laufmittel: A: 10mM Ammoniumacetat
 B: Methanol : Acetonitril (50:50)

Gradient:	Zeit (min)	B (%)	Flussrate: 0,5 ml/min
	0.00	0.0	Injektionsvolumen: 10 µl
	4.00	80.0	Temperatur: 25 °C
	4.10	0.0	Detektor: API 4000
	7.00	0.0	Ionisierung: ESI
			Polarität: Negativ

Rausch-Verhältnis von mindestens 10:1 ermittelt. Bei der niedrigsten Standardkonzentration (25 ng/ml) betragen die jeweiligen Signal-zu-Rausch-Verhältnisse 47,5 für Massenübergang 1 von EtG, 48,5 für Massenübergang 2 von EtG, 88,2 für Massenübergang 1 von EtS und 205,3 für Massenübergang 2 von EtS. Daher wurde abgeschätzt, dass das LOQ für EtG und EtS bei jeweils < 25 ng/ml liegt (Tab. 1).

Bei der Arbeit mit klinischen Proben ist es wichtig, die Methode einem Belastungstest zu unterziehen, da sich Patientenproben in ihrer Zusammensetzung stark unterscheiden können. Diese Methode wurde mit Patientenproben, die vom Auftraggeber gestellt wurden, auf Ihre Eignung für die Routine überprüft. Drei Proben wurden ausgewählt, um die hohe Konzentration von Verunreinigungen und unterschiedliche EtG sowie EtS Konzentrationen widerzuspiegeln (Abb. 2). Dabei wurde festgestellt, dass die Methode innerhalb des Kalibrierbereiches robust ist.

durchsatzes bei gleichzeitiger Kostenreduzierung durch Lösemittelsparnis ermöglicht. Die Kosten für die Probenvorbereitung konnten durch den „dilute and shoot“ Ansatz minimiert werden. Eine gute Auflösung und Abtrennung von EtG und EtS von endogenen Verunreinigungen macht die Methode robust. Die Bestimmungsgrenzen liegen deutlich unterhalb von regulatorischen Anforderungen. Die Methode wurde durch die Analyse von realen Patientenproben auf Ihre Präzision und Routinetauglichkeit verifiziert.

Literatur

- [1] DuPont R.L. et al.: Employee Assistance Digest, 28, 15–21. (2008)
- [2] Wurst FM et al.: Ethyl glucuronide: a marker of recent alcohol consumption with clinical and forensic implications. Alcohol. 2000 Feb;20(2):111-6.

Autoren: Sky Countryman, Shuguang Li, Seyed Sadjadi und Jeff Layne

► **KONTAKT**

Phenomenex Ltd.
 Aschaffenburg
 Tel.: 06201/58830-0
 Fax: 06201/58830-11
 skyc@phenomenex.com
 www.phenomenex.com