

Alkol Kullanımının Tespit ve Takibinde Direkt Etanol Biyobelirteçleri Etil Glukuronit ve Etil Sülfatın İdrar ve Serum Matrislerinde LC-MS/MS Ölçüm Metodunun Geliştirilmesi

Development of LC-MS/MS Method of Measurement of Direct Ethanol Biomarkers Ethyl Glucuronid and Ethyl Sulfate in Urine and Serum Matrices in Detection and Tracking of Alcohol Use

© Hazal Yılmaz^{1,2}, © Murat Emrah Maviş², © Gökçe Göksoğürsü², © Oğuz Polat¹

¹Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi, Adli Tıp Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

²SEM Laboratuvar Cihazları Pazarlama San. ve Tic. A.Ş. Ar-Ge Merkezi, İstanbul, Türkiye

Öz

Amaç: Etil glukuronit (EtG) ve etil sülfat (EtS), etanolün oksidatif olmayan minör metabolitleridir. İlk etanol tüketiminden kısa bir süre sonra çeşitli vücut sıvılarında tespit edilebilirler ve ana bileşik olan alkolden daha uzun bir dedeksiyon penceresine sahiptirler. Son alkol tüketimine yönelik oldukça hassas ve spesifik biyobelirteçler olarak kabul edilirler. EtG ve EtS biyobelirteçleri genellikle klinik ve adalet sistemi içinde alkolden uzaklaşmanın izlenmesinde kullanılmaktadır. Bu çalışmada, idrar ve serum matrislerinde EtG ve EtS'nin kalitatif ve kantitatif tespitini sağlayan kolay ve etkin maliyetli analiz metodolojisinin geliştirilmesi hedeflenmiştir.

Gereç ve Yöntem: İdrar ve serumda EtG ve EtS biyobelirteçlerinin eş zamanlı miktar tayini için, hızlı ve güvenilir numune hazırlık protokolleri içeren 5 dakika analiz süreli LC-MS/MS metodu geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Her iki alkol metabolitinin öncül iyonlarla birlikte iki ürün iyonu izlenmiş ve EtG'nin dötoro türevi iç standart olarak kullanılarak sonuçların güvenilirliği artırılmıştır.

Bulgular: İncelenen validasyon kriterleri ve elde edilen değerler, uluslararası kılavuzlarca esasınca belirlenmiş olup kabul edilebilir aralıklarda bulunmuştur. Böylece basit, hızlı numune hazırlık prosedürlerine sahip, idrar/serum numunelerinde hassas, spesifik EtG ve EtS tayini gerçekleştirilebilecek otomasyona uygun bir analitik çözüm üretilmiştir.

Sonuç: Çalışmamızda EtG ve EtS'nin idrar ve serum matrislerinde eşzamanlı kantitatif analizi için LC-MS/MS temelli analitik metodoloji geliştirilmiştir. Numune hazırlığının hiçbir aşamasında kimyasal modifikasyon (türevlendirme), SPE kartuşlu matris temizlik veya konsantre etme gibi zaman alıcı ve maliyetli işlemler uygulanmamıştır. Geliştirilen analitik metod, uluslararası kabul görmüş biyokimyasal analitik metod geliştirme kılavuzları çerçevesince valide edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Alkol Biyobelirteçleri, Etil Glukuronit, Etil Sülfat, Alkol Kullanım Bozukluğu, LC-ESI-MS/MS

Abstract

Objectives: Ethyl glucuronide (EtG) and ethyl sulfate (EtS) are minor non-oxidative metabolites of ethanol. They can be detected in body fluids shortly after ethanol consumption and have a longer detection window than the parent compound. They are considered highly sensitive and specific biomarkers for recent alcohol consumption. EtG and EtS biomarkers are often used in the clinical and justice system to monitor alcohol withdrawal.

*İlgili araştırma çalışması Uluslararası Biyokimya Kongresi 2021 // 32. Ulusal Biyokimya Kongresi'nde poster bildirisi olarak sunulmuştur ve en iyi poster ödülü kazanmıştır (Gaziantep, 27-30 Ekim 2021).

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Hazal Yılmaz

Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi, Adli Tıp Anabilim Dalı; SEM Laboratuvar Cihazları Pazarlama San. ve Tic. A.Ş. Ar-Ge Merkezi, İstanbul, Türkiye

Tel.: +90 507 587 46 13 E-posta: hazal.yilmaz@jasem.com.tr ORCID ID: orcid.org/0000-0002-6627-0834

Geliş Tarihi/Received: 21.04.2022 Kabul Tarihi/Accepted: 13.04.2023

©Telif Hakkı 2023 Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası, Galenos Yayınevi tarafından yayınlanmıştır. Yayınlanan tüm içerik CC BY-NC-ND lisansı altındadır.



Abstract

In this study, it was aimed to develop an easy and cost-effective analysis methodology that provides the qualitative and quantitative detection of EtG and EtS in urine and serum matrices.

Materials and Methods: For the simultaneous quantification of EtG and EtS biomarkers in urine and serum, an LC-MS/MS method with fast and reliable sample preparation protocols with 5 minutes analysis time has been developed and validated. Two product ions along with the precursor ions of both alcohol metabolites were monitored and the deuterium-derivative of EtG was used as an internal standard, for increasing the reliability of the results.

Results: The validation parameters and obtained values were investigated based on international guidelines. They were found within acceptable ranges. Thus, sensitive determination of EtG and EtS in urine/serum samples was achieved with a simple sample preparation protocol which could be automated.

Conclusion: In this study, a simple LC-MS/MS based analytical methodology has been developed for the simultaneous quantitative analysis of EtG and EtS in urine and serum matrices. Time-consuming and costly processes such as chemical modification (derivatization), matrix cleaning with SPE cartridges or concentration were not applied at any step of sample preparation. The developed analytical method has been validated within the framework of internationally accepted biochemical analytical method development guidelines.

Key Words: Alcohol Biomarkers, Ethyl Glucuronide, Ethyl Sulphate, Alcohol Use Disorder, LC-ESI-MS/MS

Giriş

Alkolün kötüye kullanımı, tüm sosyo-ekonomik gruplarda görülmekle birlikte morbidite ve mortalite ile yakın ilişkisi raporlarla ortaya koyulmaktadır. Alkolün kötüye kullanımının modern toplumlar üzerindeki artan etkisi nedeniyle, alkol takibinde kullanılan biyokimyasal belirteçler, alkol tüketim paternlerinin araştırılmasında, alkolle ilişkili hastalıkların tedavi süreçlerinin izlenmesi ve değerlendirilmesinde zengin bir araç kutusu sunmaktadır (1-3). Alkol kullanan popülasyonlarla yapılan araştırmalarda, bir bireyin alkol alımını değerlendirmek için genellikle kişi beyanı esas alınmaktadır. Ancak, alkol kullanım bozukluğu olan ve alkol tüketim miktarlarını doğru bildirmeyen bireylerde, kişisel beyanlar güvenilir hale bürünebilmektedir. Alkol kullanımına ilişkin kişi beyanlarından derlenmiş verilerin aksine, çeşitli biyolojik matrislerden yapılan biyobelirteç düzeyi ölçümleri, daha objektif sonuçlar sağlayabilmektedir (4,5).

Biyobelirteçler, alkolden daha uzun bir tespit penceresine sahip oldukları için, alkol tüketiminin retrospektif olarak saptanmasına olanak tanırırlar. Bu durum, terapötik çabaların izlenmesine yardımcı olmakla birlikte, tedavi boyunca relapsın ortaya çıkarılmasında önemli bir dayanak arz etmektedir. Uyuşturucu rehabilitasyon programları sırasında bireyin aşırı içki içmesi, alkolle bağlantılı komorbidite riskini doğurduğundan, objektif araçlarla bu durumun izlenmesinin önemi bir kez daha ortaya çıkmaktadır. Alkol kullanımını tespit etmek için kanda veya nefeste doğrudan etanol ölçümü ilk tercih edilen analitik yaklaşım olsa da, etanolün dar tespit penceresi bu yöntemlerin, günler önce meydana gelen alkol kullanım tekrarlamalarını tespit etmede duyarlılığını ve faydasını azaltır (6). Bu nedenle doğru alkol biyobelirtecini, güvenilir analiz yöntemleriyle ölçülmesi için büyük çabalar sarf edilmektedir. Alkolün kötüye kullanımının tespiti ve takibine yönelik günümüze kadar

patofizyolojik özellikleri, hassasiyetleri, seçicilikleri ve tespit pencereleri temelinde farklılıklar gösteren çeşitli biyobelirteçler keşfedilmiş ve klinik uygulamalarda yerini almıştır. Biyobelirteç temelli geleneksel alkol testleri, alkol tüketiminden kaynaklanan toksik sonuçları belirlemek için dolaylı biyobelirteçlerin (GGT, ALT, AST, CDT vb.) ölçümüne odaklanır. Bununla birlikte dolaylı biyobelirteçler, fizyolojik/patolojik koşullardan etkilendikleri için yeterince spesifik olmamaktadır ve yalnızca uzun süreli alkol tüketiminin belirlenmesinde işlev göstermektedir. Alkolden uzaklaştırmaya yönelik uygulanan programlarda bu biyobelirteçlerin izlenmesi, genellikle düşük oranda faydalı olmaktadır. Alkol kullanımını saptamada tercih edilen doğrudan biyobelirteçler ise, kimyasal yapısında etanolden gelen iki karbonu içermekte olup, etanol molekülünün oksidatif olmayan metabolik dönüşüm ürünleridir. Doğrudan biyobelirteçler arasında, etil glukuronit-EtG ve etil sülfat-EtS, sindirilen etanolün çok küçük bir miktarından (<0,1) enzimatik olarak dönüştürülen (sırasıyla UDP-glukuronosiltransferaz ve sülfotransferaz) faz II reaksiyon metabolitlerini temsil eder (2,7,8). Çeşitli biyomatrislerde EtG ve EtS biyobelirteçleri klinik, adli tıp, trafik olguları ve iş yeri izlemede yaygın olarak analiz edilmektedir (7,9).

EtG EtS antemortem alkol alımını doğrulamak amacıyla sıklıkla kullanılan biyobelirteçlerdir (10).

Etanol tüketim düzeyine bağlı olarak, EtG ve EtS idrarda 4 güne kadar, kanda ise 8 saate kadar saptanabilmektedir (7,9). Bununla birlikte, numune alınan bireyin mevcut sağlık durumundan ve örnek toplama koşullarından kaynaklı yalancı pozitif/negatif sonuçlara ek olarak EtG'nin immünolojik temelli testlerinde de çapraz reaksiyonlar devreye girebilmekte ve sonuçların güvenilirliğine gölge düşürebilmektedir (11-14). Bu noktada, farklı türden biyomatrislerde EtG ve EtS'nin eş zamanlı ve doğru ölçümünü sağlayabilecek güvenilir bir analitik yöntemine sahip olmak büyük önem arz etmektedir. Son yıllarda,

hassas ve spesifik ölçüm metotlarının geliştirilmesine imkan sunan, sıvı kromatografisi ardışık kütle spektrometrisi (LC-MS/MS) tekniği, bu türden analiz metotlarının geliştirilmesinde ön plana çıkmaktadır. Bu çalışmada, hem idrar hem de serum matrisinde EtG ve EtS biyobelirteçlerinin eş zamanlı ölçümün gerçekleştirilebilecek, "seyrelt ve enjekte et" ile "protein çöktür ve enjekte et" numune hazırlık yaklaşımlarına sahip hızlı örnek hazırlama protokolleri içeren LC-MS/MS analiz metodu geliştirilmiştir.

Gereç ve Yöntem

Kimyasallar ve Materyaller

Kütle dedeksiyonu (MS/MS) optimizasyon çalışmalarında, Recipe Chemicals+Instruments GmbH (Münich, Almanya) firmasından tedarik edilen EtG ve EtS bileşiklerinin 1 µg/mL konsantrasyonlu standart karışım solüsyonu (MS8014) kullanılmıştır. Analiz metodu geliştirme sürecinde kullanılan insan idrarı matrisi temelli liyofilize kalibratör (MS8413) ve kalite kontrol örnekleri (MS8083) Recipe Chemicals+Instruments GmbH (Münich, Almanya) firmasından satın alınmıştır. Serum matrisli çalışmalarda ise EtG ve EtS içermeyen fetal sığır serumu (F6765) kullanılmıştır (Sigma-Aldrich, Almanya). İç standart olarak kullanılan EtG-D5 Toronto Research Chemicals (Toronto, Kanada) firmasından temin edilmiştir. LC-MS kalite asetonitril, LC-MS kalite metanol ve formik asit (%98 saflıkta) Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından satın alınmıştır. Amonyum asetat (%98 saflıkta) Riedel-de Haen (Almanya) firmasından tedarik edilmiştir. Trikloroasetik asit (TCA) ve çinko sülfat heptahidrat ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) (%99 saflıkta) bileşikleri Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edilmiştir. HPLC kalite su laboratuvarımızda kurulu Elga Purelab Classic saf su cihazı kullanılarak hazırlanmıştır.

Kalibratör, Kalite Kontrol ve İç Standart Hazırlığı

Liyofilize kalibratör ve kontrol örnekleri, Recipe firmasının bilgilendirme dokümanlarındaki talimatlar uyarınca çözülmüştür. Böylece idrar matrisinde; EtG için 0,0-4745 ng/mL arasında kalibratör standartları ve üç seviye kalite kontrol örnekleri (125 ng/mL, 505 ng/mL ve 1961 ng/mL) ile EtS için 0,0-2021 ng/mL arasında kalibratör standartları ve üç seviye kalite kontrol örnekleri (38 ng/mL, 185 ng/mL ve 745 ng/mL) elde edilmiştir. Sonraki aşamada ise, idrar için geliştirilen numune hazırlık prosedürü çerçevesince hazırlanmış ve LC-MS/MS sistemine enjekte edilmiştir. Serum matrisli çalışmalarda, fetal sığır serumuna EtG ve EtS standart karışımı belirli düzeylerde eklenerek bir seri kalibratör standardı her iki biyobelirteç için üretilmiştir. EtG ve EtS için (0,0-100,0 ng/mL) konsantrasyonlu kalibratörler elde edilmiştir. Benzer işlem uygulanarak iki seviye iç kalite kontrol örnekleri hazırlanmıştır. Bu örnekler, EtG ve EtS

için (30 ng/mL ve 60 ng/mL) konsantrasyonlarında üretilmiştir. Sonraki basamakta ise, serum için geliştirilen numune hazırlık prosedürü tatbik edilmiş ve LC-MS/MS sistemine enjekte edilmiştir. İdrar ve serum matrislerinde yürütülen tüm numune hazırlık çalışmalarında, asetonitrilde çözülmüş 10 µg/mL konsantrasyona sahip EtG-D5 iç standart solüsyonu (IS) kullanılmıştır.

LC-MS/MS Analiz Metodu

Analiz metodu geliştirme süreci Agilent Technologies (Santa Clara, CA, A.B.D) marka 1290 High Speed Pump (G7120A), 1290 Multisampler (G7167B) ve 1260 MCT Infinity II (G7116A) modüllerine sahip HPLC sisteminde ve bu sisteme bağlı elektrosprey iyon kaynaklı 6470 Triple Quadrupole LC/MS (G6470A) sisteminde yürütülmüştür. EtG, EtS ve IS bileşiklerinin MS/MS optimizasyon parametreleri doğrudan kütle spektrometresine infüzyon yoluyla tayin edilmiştir. Biyobelirteçlerin eş zamanlı ölçümü, ters faz sıvı kromatografisine uygun Agilent Zorbax Hilic Plus 2.1x100 mm 1.8 Micron (P.N. 959758-901) analitik kolonda, 20 mM amonyum asetat ve %0,1 formik asit içeren su (mobil faz A) ve asetonitril (mobil faz B) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sıvı kromatografisi aşamasında 10 µL numune hazırlığı uygulanmış örnek, 20 °C'ye ayarlanmış kolon fırınındaki analitik kolonda aşağıdaki solvent gradienti çerçevesince kromatografik ayırma tabi tutulmuştur; Başlangıç koşullarında %58 oranında mobil faz A, 1 dakika boyunca sabit tutulmuştur. Daha sonra mobil faz A seviyesi %32'ye düşürülerek 3 dakika süresince bu oranla akış sağlanmıştır. Dördüncü dakikadan itibaren 2 dakika boyunca mobil faz A seviyesi %9 düşürülmüştür. Son olarak başlangıç gradient şartlarına 6. dakikada geri dönmüştür. Toplam analiz süresi 9 dk olarak belirlenmiştir. Kütle spektrometresi iyon kaynağı parametreleri ise şu şekilde ayarlanmıştır; kurutma gazı sıcaklığı 300 °C, kurutma gazı akışı 10 L/dak, nebulizör basıncı 40 psi, kılıf gazı sıcaklığı 400 °C, kılıf gazı akışı 10 L/dak, kapiler voltaj negatif için 3500 V, nozle voltaj ise yine negatif için 500 V. kütle dedeksiyonları, ilgili öncül iyonun çarpışmayla indüklenen ayrışması ile meydana gelen ürün iyon geçişleriyle gerçekleştirilmiştir. EtG ve EtS analizi için çoklu reaksiyon modu kullanılmıştır. Biyobelirteçlere ve atanan IS'ye ait kütle geçişleri, her bir öncül iyon-ürün iyon kütle geçişleri için ortak değeri temsil eden optimum parçalanma voltajlarında ve her ürün için spesifik değeri gösteren optimum çarpışma enerjilerinde (CE) takip edilmiştir (Tablo 1). Veri toplama ile kalitatif ve kantitatif incelemeler, sırasıyla Agilent MassHunter Acquisition, Qualitative ve Quantitative Analysis yazılım programları kullanılarak gerçekleştirildi. Biyobelirteçlerin kantitasyonu, matris etkisini ve prosedür kayıplarını telafi eden IS'nin kullanımıyla ve matris etkili kalibratörlerin konsantrasyonları üzerinde yapılan kalibrasyon eğrileri aracılığıyla gerçekleştirilmiştir.

Tablo 1: EtG ve EtS ile IS'nin çoklu reaksiyon modu parametreleri

Bileşik	Öncül iyon (m/z)	Ürün iyon (m/z)	FV (V)	CE (V)	Polarite
EtG	221.1	85.2	130	15	Negatif
EtG	221.1	75.0	130	15	Negatif
EtS	125.0	80.0	80	15	Negatif
EtS	125.0	97.0	80	35	Negatif
IS	226.1	85.2	130	15	Negatif

EtG: Etil glukuronit, EtS: Etil sülfat, IS: Standart solüsyon, FV: Parçalanma voltajları, CE: Çarpışma enerjileri

Numune Hazırlık Denemeleri

İdrar matrisi çalışmaları ve optimum numune hazırlık prosedürünün belirlenmesi

100 µL idrar kalibratör/kalite kontrol örneği bir HPLC vialine pipetlenmiştir. Daha sonra üzerine 50 µL IS solüsyonu ve çeşitli hacimlerde (350 µL, 850 µL ve 1850 µL) farklı kompozisyonlarda asetonitril, metanol, %0,1 formik asit içeren HPLC kalite su seyreltme reaktifleri ilave edilerek 5 saniye boyunca vortekslenmiştir ve ardından da LC-MS/MS sistemine enjekte edilmiştir. Tüm çalışmalardan elde edilen kromatogramlar kalitatif olarak incelenerek, idrar matrisi için optimum numune hazırlık prosedürü belirlenmiştir; 100 µL idrar kalibratör/kalite kontrol örneği üzerine 50 µL IS solüsyonu ve 850 µL %0,1 formik asitli su eklenmiştir. Sonrasında 5 saniye süresince vorteksleme yapılmış ve LC-MS/MS sistemine enjekte edilmiştir (Kromatogram 1).

Serum matrisi çalışmaları ve optimum numune hazırlık prosedürünün belirlenmesi

50 µL serum kalibratör/kalite kontrol örneği bir cam tüpe aktarılmıştır. Bu işlemi takiben, 25 µL IS solüsyonu ve çeşitli hacimlerde (175 µL, 350 µL ve 850 µL) farklı kompozisyonlarda (asetonitril, metanol, %15 TCA solüsyonu ve %15 ZnSO₄ solüsyonu) protein çöktürücü reaktifler eklenerek 5 saniye boyunca vortekslenmiştir. Sonrasında 3000 g'de 5 dakika boyunca oda sıcaklığında santrifüj işlemi uygulanmıştır. Son aşamada süpernatant bir HPLC vialine aktarılarak LC-MS/MS sistemine enjekte edilmiştir. Tüm denemelerden elde edilen kromatogramlar kalitatif olarak incelenerek, serum matrisi için optimum numune hazırlık prosedürü belirlenmiştir; 50 µL serum kalibratör/kalite kontrol örneği üzerine 25 µL IS solüsyonu ve 175 µL asetonitril, sonrasında 5 saniye süresince vorteksleme yapılmış ve 3000 g'de 5 dakika boyunca oda sıcaklığında santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Santrifüj adımını takiben süpernatant LC-MS/MS sistemine enjekte edilmiştir (Kromatogram 2).

Metot Validasyon

Metot validasyon işlemleri yayınlanmış uluslararası kılavuzlar takip edilerek gerçekleştirilmiştir. Bu bağlamda idrar ve serum

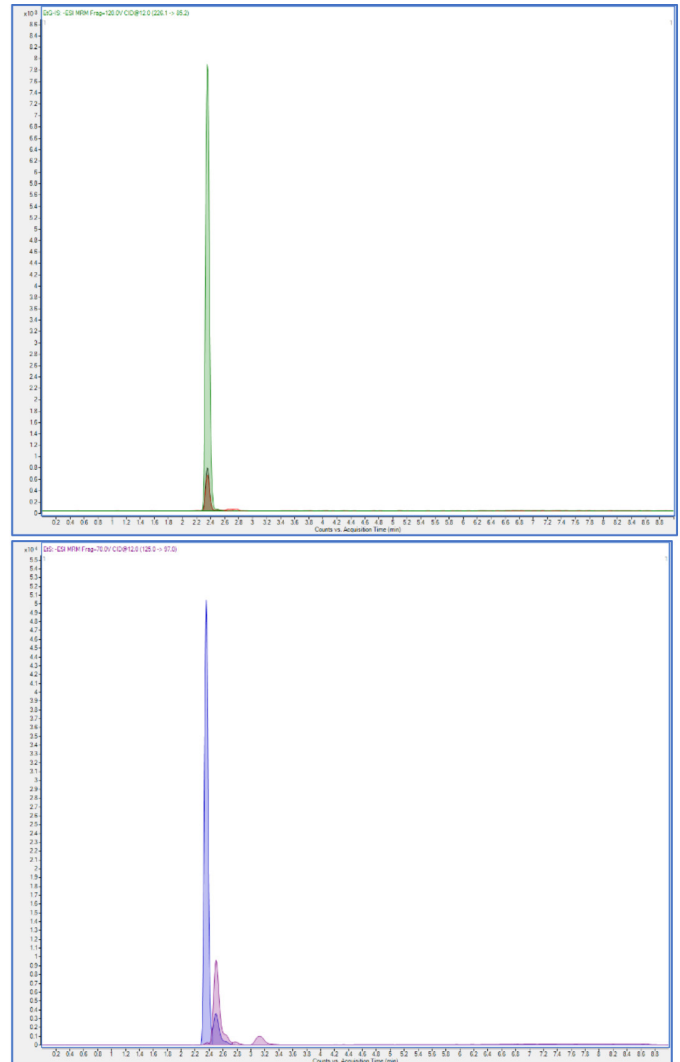
matrisleri için, matris etkili kalibratörlerden oluşturulmuş kalibrasyon eğrileri, doğruluk, kesinlik, saptama limiti (LOD), kantitasyon limiti (LOQ) ve taşıma (carry over) kriterleri incelenerek belirlenmiştir.

Kalibrasyon Eğrileri

İdrar matrisinde EtG için 0,0-4745 ng/mL; EtS için 0,0-2021 ng/mL konsantrasyon aralığındaki dört kalibratör noktası, bir tekrarlı hazırlanarak kalibrasyon eğrileri üretilmiştir. Doğrusal kalibrasyon eğrileri, her bir biyobelirteçin pik alanının iç standart pik alanına oranlanmasıyla çizilmiştir ($R^2 > 0,999$). Aynı adımlar serum matrisi için 0,0-100 ng/mL konsantrasyon aralığındaki dört kalibratör ile çalışılarak atılmış ve doğrusal eğriler $R^2 > 0,999$ değeri ile elde edilmiştir.

Doğruluk ve Kesinlik

Her iki matris için doğruluk çalışması, iki seviye kalite kontrol (EtG düşük seviye: 125 ng/mL, yüksek seviye: 1961 ng/

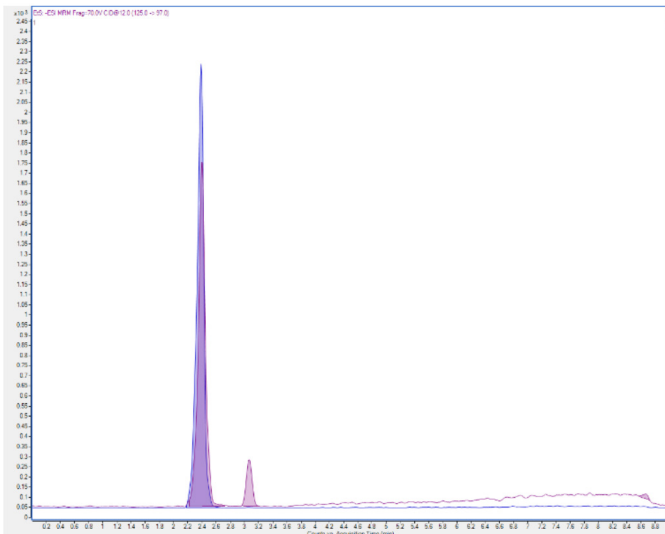
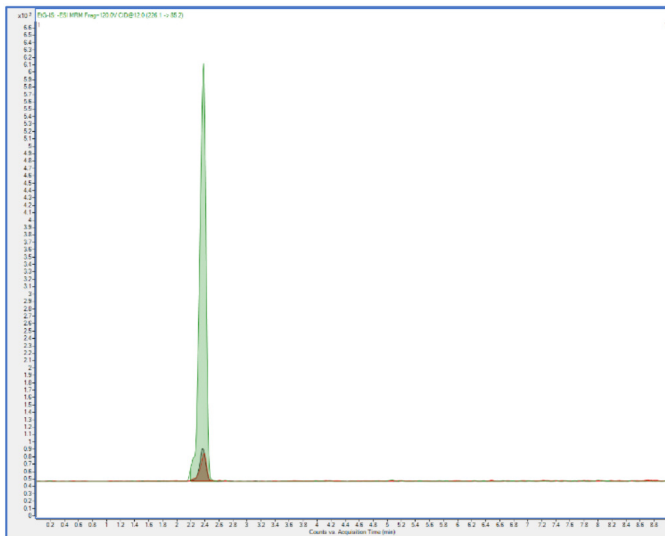


Kromatogram 1: İdrar matrisi için optimum numune hazırlıklı enjeksiyon

mL; EtS düşük seviye: 38 ng/mL, yüksek seviye: 745 ng/mL standartlarının her birini, üç gün boyunca hazırlanması ve takiben LC-MS/MS sistemine enjeksiyonu ile gerçekleştirilmiştir. Kesinlik çalışmalarında ise her iki matris için düşük seviyeli (EtG; 81,7 ng/mL, EtS; 29,1 ng/mL) ve yüksek seviyeli (EtG; 4745 ng/mL, EtS; 2021 ng/mL) standartlar on defa hazırlanarak enjeksiyonlar yapılmıştır. İdrar matrisinde EtG düşük seviye için %RSD değeri 0,18; yüksek seviye için %RSD değeri 0,20; EtS analitinde düşük seviye için %RSD değeri 0,38, yüksek seviye için %RSD değeri 0,23 bulunmuştur. Serum matrisinde ise EtG düşük seviye için %RSD değeri 3,25, yüksek seviye için %RSD değeri 4,12; EtS analitinde düşük seviye için %RSD değeri 2,89, yüksek seviye için %RSD değeri 3,88 olarak bulunmuştur.

LOD ve LOQ Değerleri

Her iki matris için, LOD ve LOQ değerlerinin tespitinde konsantrasyonu en düşük seviye kalibratör hazırlanarak on



Kromatogram 2: Serum matrisi için optimum numune hazırlıklı enjeksiyon

defa enjeksiyon gerçekleştirilir. Elde edilen veriler kullanılarak ortalama ve standart sapmaları üzerinden idrar matrisinde EtG için LOD 6,41 ng/mL, LOQ 21,37 ng/mL; EtS için LOD 2,64 ng/mL ve LOQ 8,81 ng/mL değerlerine ulaşılmıştır. Serum matrisinde ise EtG ve EtS için LOD 2,84 ng/mL, LOQ 9,48 ng/mL değerlerine ulaşılmıştır.

Taşıma (Carry Over)

Taşıma, numune hazırlığı uygulanmış en yüksek kalibrasyon noktasının enjekte edilmesi ve ardından kör matrisin üç enjeksiyonu ile incelenmiştir. İdrar matrisinde EtG için 4745 ng/mL, EtS için 2021 ng/mL konsantrasyonlu kalibratörün enjeksiyonunun ardından yapılan inceleme ve serum matrisinde EtG ve EtS için 100 ng/mL konsantrasyonlu kalibratörün enjeksiyonunun ardından yapılan inceleme sonucunda taşıma olgusuna rastlanılmamıştır.

Tartışma

Alkol kullanımı; hastalık, yaralanma ve ölüm için en yüksek beş risk faktöründen biri olarak yerini almıştır. Alkol suistimali zamanla birçok hastalığı kötüleştirip, gelişimini hızlandırabilmekte ve komplikasyonlara yol açabilmektedir. Ayrıca, toplumun sosyal ve ekonomik yükleriyle de sıkı bir şekilde ilişkilidir. Hastaların alkol kullanımının daha iyi değerlendirilmesi, hem klinik uygulama hem de alkol kullanımına ilişkin epidemiyolojik çalışmalar üzerinde büyük etkiye sahiptir. EtG ve EtS, etanol eliminasyonundan 8 saate kadar serumda, 96 saate kadar ise idrarda saptanabilen iki etanol metabolitidir. Bu doğrudan alkol biyobelirteçlerinin varlığı, bir olaydan sonra (örneğin; araba kazası) örnekleme gecikmesi durumunda son etanol tüketiminin göstergesidir (15). Yalancı negatiflik ve yalancı pozitiflik durumlarının belirlenmesi için EtG ile EtS'nin birlikte analiz edildiği çalışmalarda, EtG sonuçlarında ortaya çıkan yalancı negatif ve yalancı pozitifliklerin EtS sonuçlarında olmadığı saptanmıştır. Bu sebeple EtG ile EtS'nin birlikte çalışılması önerilmiştir (10).

Sonuç

Çalışma kapsamında, EtG ve EtS'nin idrar ve serum matrislerinde eş zamanlı kantitatif analizi için LC-MS/MS temelli analitik metodoloji geliştirilmiştir. Her iki etanol form metabolitinin MS/MS dedeksiyonunda, öncül iyonlar (pozitif polaritede) ve kendilerine özgü ürün iyonlarına ait kütle geçişleri esas alınmıştır. Sıvı kromatografisi safhasında ise polar yapılı analitik kolon ve moleküllerin iyonlaşmasına uygun mobil faz kombinasyonu tercih edilmiştir. İdrar ve serum matrislerinde hedef analit dışındaki bileşenlerinden ve numune hazırlık aşamalarında kullanılan reaktiflerden kaynaklanabilecek matris etkisi, kararlı izotop etiketli iç standart kullanımıyla kompanse edilerek, kantitasyon işleminin doğruluğu kuvvetlendirilmiştir.

Numune hazırlığına yönelik çalışmalar, güvenilir, etkin maliyetli ve kullanıcı dostu basit bir protokolün oluşturulması yaklaşımıyla yürütülmüştür. İdrar matrisinde "seyrelt ve enjekte et", serum matrisinde ise "protein çöktür ve enjekte et" prensipli numune hazırlık protokolleri oluşturulmuştur. Numune hazırlığının hiçbir aşamasında kimyasal modifikasyon (türevlendirme), SPE kartuşlu matris temizlik veya konsantr etme gibi zaman alıcı ve maliyetli işlemler uygulanmamıştır. Geliştirilen analitik metot, uluslararası kabul görmüş biyokimyasal analitik metot geliştirme kılavuzları çerçevesince valide edilmiştir. Bu kılavuzlardaki kriterler esas alınarak, en düşük kantitasyon limiti (LOQ), en düşük tespit limiti (LOD), çalışma aralığı, lineerite, doğruluk, kesinlik, tekrarlanabilirlik, geri kazanım yüzdesi ve taşınma (carry over) çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu noktada, geliştirilen analitik metot ile eş zamanlı ölçülebilecek olan etanol biyobelirteçleri özellikle alkol kullanım bozukluğu teşhisi konulmuş bireylerin tedavi etkinliğinin izlenmesinde önemli veriler sağlayabilecektir.

Etik

Etik Kurul Onayı: İdrar çalışması için yurt dışından temin ettiğim Recipe Chemicals+Instruments GmbH (Münich, Almanya) firmasına ait kalite kontrol ve kalibratör materyalleri, serum çalışması için ise Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından temin ettiğim fetal bovine serum kullanılmıştır. Bu sebeple etik kurul iznine gerek bulunmamaktadır.

Hasta Onamı: Hasta onayına gerek bulunmamaktadır.

Hakem Değerlendirmesi: Editörler kurulu dışında olan kişiler tarafından değerlendirildi.

Yazarlık Katkıları

Konsept: H.Y., M.E.M., G.G.G., O.P., Dizayn: H.Y., M.E.M., G.G.G., O.P., Analiz veya Yorumlama: H.Y., M.E.M., G.G.G., O.P., Literatür Arama: H.Y., M.E.M., G.G.G., O.P., Yazan: H.Y., M.E.M., G.G.G., O.P.

Çıkar Çatışması: Yazarlar arasında herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Finansal Destek: Çalışma için doğrudan veya dolaylı herhangi bir mali destek alınmamıştır.

Kaynaklar

1. Halter CC, Dresen S, Auwaerter V, Wurst FM, Weinmann W. Kinetics in serum and urinary excretion of ethyl sulfate and ethyl glucuronide after medium dose ethanol intake. *Int J Legal Med.* 2008;122:123-128.
2. Luginbühl M, Weinmann W, Butzke I, Pfeifer P. Monitoring of direct alcohol markers in alcohol use disorder patients during withdrawal treatment and successive rehabilitation. *Drug Test Anal.* 2019;11:859-869.
3. Barrio P, Teixidor L, Rico N, et al. Urine Ethyl Glucuronide Unraveling the Reality of Abstinence Monitoring in a Routine Outpatient Setting: A Cross-Sectional Comparison with Ethanol, Self Report and Clinical Judgment. *Eur Addict Res.* 2016;22:243-248.
4. Reisfield GM, Teitelbaum SA, Opie SO, Jones J, Morrison DG, Lewis B. The roles of phosphatidylethanol, ethyl glucuronide, and ethyl sulfate in identifying alcohol consumption among participants in professionals health programs. *Drug Test Anal.* 2020;12:1102-1108.
5. Ulwelling W, Smith K. The PEth Blood Test in the Security Environment: What it is; Why it is Important; and Interpretative Guidelines. *J Forensic Sci.* 2018;63:1634-1640.
6. Fucci N, Gili A, Aroni K, et al. Monitoring people at risk of drinking by a rapid urinary ethyl glucuronide test. *Interdiscip Toxicol.* 2017;10:155-162.
7. Walsham NE, Sherwood RA. Ethyl glucuronide. *Ann Clin Biochem.* 2012;49:110-117.
8. Grodin EN, Nguyen XT, Ho D, Bujarski S, Ray LA. Sensitivity and specificity of a commercial urinary ethyl glucuronide (ETG) test in heavy drinkers. *Addict Behav Rep.* 2020;11:100249.
9. Hernández Redondo A, Schroeck A, Kneubuehl B, Weinmann W. Determination of ethyl glucuronide and ethyl sulfate from dried blood spots. *Int J Legal Med.* 2013;127:769-775.
10. Aşıcıoğlu F, Mutlu E, Belce A. The Importance of Ethyl Glucuronide and Ethyl Sulphate Analysis in Forensic Cases. *Türkiye Klinikleri J Foren Sci Leg Med.* 2019;16:64-69.
11. Helander A, Olsson I, Dahl H. Postcollection synthesis of ethyl glucuronide by bacteria in urine may cause false identification of alcohol consumption. *Clin Chem.* 2007;53:1855-1857.
12. Arndt T, Beyreiß R, Schröfel S, Stemmerich K. Cross-reaction of propyl and butyl alcohol glucuronides with an ethyl glucuronide enzyme immunoassay. *Forensic Sci Int.* 2014;241:84-86.
13. Arndt T, Grüner J, Schröfel S, Stemmerich K. False-positive ethyl glucuronide immunoassay screening caused by a propyl alcohol-based hand sanitizer. *Forensic Sci Int.* 2012;223:359-363.
14. Arndt T, Gierten B, Güssregen B, Werle A, Grüner J. False-positive ethyl glucuronide immunoassay screening associated with chloral hydrate medication as confirmed by LC-MS/MS and self-medication. *Forensic Sci Int.* 2009;184:e27-29.
15. Berg T, Eliassen E, Jørgenrud B, Kabashi S, Petukhov A, Bogstrand ST. Determination of phosphatidylethanol 16:0/18:1 in whole blood by 96-well supported liquid extraction and UHPLC-MS/MS. *J Clin Lab Anal.* 2019;33:e22631.