



CE-SERTIFIOITUJEN LC-MS/MS
-DIAGNOSTIIKKATARVIKKEIDEN TARJOAJA

KÄYTTÖOHJEET

PETH 16:0/18:1 -ARVOJEN TUNNISTAMISEEN SEERUMISTA
JA KOKOVERESTÄ IN VITRO -MENETELMÄLLÄ

CE

Sisältö

1.	KÄYTTÖTARKOITUS	3
2.	JOHDANTO	3
3.	TOIMENPIDEPERIAATTEET	3
4.	VAROITUKSET JA VAROTOIMENPITEET	4
5.	TERVEYTEEN JA TURVALLISUUTEEN LIITTYVÄT VAROTOIMENPITEET	4
6.	PAKKAUKSEN SISÄLTÖ	4
7.	VARASTOINTIOLOSUHTEET	4
8.	TARVITTAVAT MATERIAALIT, JOTKA EIVÄT SISÄLLY TOIMITUKSEEN	5
9.	REAGENSSI-AINEIDEN VALMISTELU	5
10.	NÄYTTEEN VALMISTELU	7
11.	LC-MS/MS -MENETELMÄN KROMATOGRAFISET OLOSUHTEET (LISTATTU ESIMERKIKSI)	7
12.	GRADIENTTI	7
13.	LASKELMA.....	7
14.	ESIMERKKEJÄ KROMATOGRAMMEISTA	8
15.	LAADUNVALVONTA	9
16.	TOIMINTAOMINAISUUDET	10
17.	CE-MERKINTÄ	10
18.	VIITTEET:	10

FOSFATIDYLIETANOLI, PEth, LC-MS/MS -PAKKAUS

Tuotenumero 50-2002, 400 analyysia

Yhdysvaltain patentit 9499572, 9784701

Eurooppapatentti 2992334

1. KÄYTTÖTARKOITUS

Fosfatidyylietanolin (PEth) 16:0/18:1 -arvon selvittämiseksi kokoverestä in vitro -menetelmällä

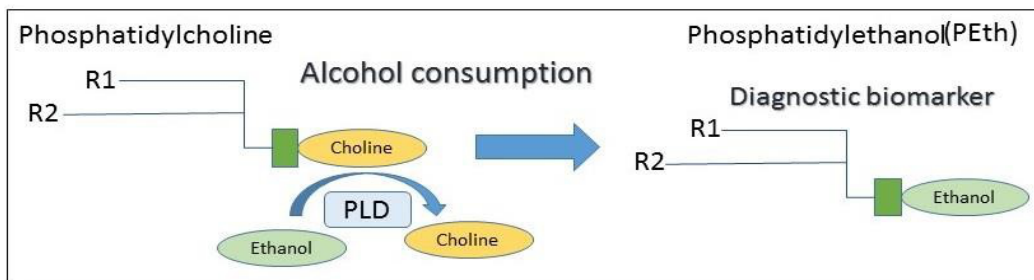
Kuvatun LC-MS/MS -menetelmän käyttötarkoitus on fosfatidyylietanolin (PEth) määrän selvittäminen kokoverestä.

In vitro -menetelmällä suoritettavaan diagnostiikkaan.

2. JOHDANTO

Kokoveren fosfatidyylietanoli (PEth) on alkoholinkulutuksen biologinen merkkiaine.

PEth on luonnoton fosfolipidi, jota syntyy ainoastaan etanolin läsnäollessa. Sen vuoksi PEth antaa sataprosenttisen teoreettisen diagnostisen tarkkuuden alkoholin kulutuksen biologisena merkkiaineena. Elävälle organismille suoritettavan PEth-kokeen toiminta perustuu fosfatidyylikoliinin uudelleenjärjestymiseen fosfolipaasi D:n läsnäollessa. PEth-16:0/18:1 on PEth-homologioiden runsain yksittäinen muoto, ja sitä käytetään potilaiden alkoholinkulutuksen arviointiin verestä tehtävässä määrällisessä tandemmassaspektrometriaan yhdistetyssä nestekromatografisessa (LC-MS/MS) analyysissa. Alkoholinkulutus ja veren PEth-arvo ovat suorassa yhteydessä toisiinsa.



PEth-arvon on havaittu ilmaisevan alkoholinkulutusta muita merkkiaineita tarkemmin. PEthin puoltiintumisaika verenkierrassa on kolmesta kahdeksaan päivää. Tämä tarkoittaa, että PEth voidaan havaita verestä jopa neljä viikkoa sen jälkeen, kun etanoli on haihtunut kehosta.

Verinäytteen PEth-pitoisuus voidaan määrittää erittäin tarkasti LC-MS/MS -analyysissa.

redhot diagnosticsin kehittämä testi on vakaa, erittäin tarkka ja erittäin herkkä.

3. TOIMENPIDEPERIAATTEET

Fosfatidyylietanoli erotellaan kokoverestä 50 mikrolitraan verta 200 mikrolitran

uuttopuskurilla, joka sisältää sisäisen standardointiaineen (deuteroitu fosfatidyylietanoli). Huolellisen sekoituksen jälkeen putkea pyöritetään sentrifugissa ja LC-MS-järjestelmään injektoidaan supernatanttinäyte. Ainesosat erotellaan käänteisfaasikolonnilla (C8) kahden liuoksen gradientilla. Kolonnista tulevaa nestettä seurataan sähkösuihku-ionisaatio-massaspektrometrialla monireaktioseurantaa (MRM) käyttäen PEth-arvon ja sisäisen standardointiaineen ominaisten siirtymien seuraamiseksi. PEthin kromatografisten huippuarvoalueiden ja sisäisen standardointiaineen suhdetta käytetään näytteen PEth-pitoisuuden määrittämiseen.

4. VAROITUKSET JA VAROTOIMENPITEET

Tässä pakkauksessa olevia materiaaleja ei tule käyttää pakkauksen etiketissä olevan päiväyksen jälkeen.

Pakkauksessa olevia reagenssi- ja perusaineita ei tule sekoittaa muiden pakkausten reagenssi- tai perusaineiden kanssa tai korvata muiden pakkausten reagenssi- tai perusaineilla.

Pipetointi- ja puhdistusmenetelmien sekä inkubaatioajan ja lämpötilan erot voivat aiheuttaa tutkimustulosten eroavaisuuksia.

Analyysi on suunniteltu siten, että se eliminoi verinäytteissä olevien muiden solujen makromolekyylien tai tekijöiden aiheuttamat häiriöt ja taustatekijät. Taustatekijöitä ei voida sulkea kokonaan pois, ennen kuin kaikki tekijät on testattu analyysipakkauksella.

5. TERVEYTEEN JA TURVALLISUUTEEN LIITTYVÄT VAROTOIMENPITEET

Käytä asianmukaista silmä-, käsi- ja kasvosuojia tätä materiaalia käsitellessäsi. Kun koe on valmis, hävitä kaikki jäämät määräysten mukaisesti.

6. PAKKAUKSEN SISÄLTÖ

Tuotenro 50-2002

Nimi / pakkauksen komponentti	Määrä
PEth 16:0/18:1	40 nmol / 0,1 ml
D5-PEth 16:0/18:1	2X18 nmol / 0,5 ml
Uuttoliuos	2x45 ml
Viritysliuos	1 ml

Viritysluosta tarvitaan LC-MS/MS-asetusten optimointiin ja herkkyyden arviointiin Peth LC-MS/MS -pakkauksta käytettäessä.

7. VARASTOINTIOLOSUHTTEET

Reagenssiaineiden säilytyslämpötilan tulee olla +2–8 °C.

Kun kalibrointiaine on laimennettu kokovereen, se tulee säilyttää jäisenä -20 °C lämpötilassa.

8. TARVITTAVAT MATERIAALIT, JOTKA EIVÄT SISÄLLY TOIMITUKSEEN

- LC-MS/MS-laitteet
- Kolonni
- Mobiilifaasi A
 - Asetonitriili, ammoniakki ja etaanihappo
- Mobiilifaasi B
 - Asetonitriili, tetrahydrofuraani, 2-propanoli
- Vortex-sekoitin
- Sentrifugi
- Esikolonnit tai suodattimet
- Näytteenottoon tarvittavat näyteputki
- Automaattisen näytteenottimen näyteputki (lasi)

Phenomenex Kinetex C8 -kolonni: 00B-4497-AN

Kuvaus: Kinetex® 2.6 µm C8 100 Å, LC-kolonni 50 x 2.1 mm, Ea

Stationäärifaasi: C8 TMS-päätykorkilla

Kiinteä tuki: Piidioksidiydin

Erotustila: Käänteisfaasi

9. REAGENSSI AINEIDEN VALMISTELU

Seoksen analysointiin soveltuvat (EDTA-näyteputkiin kerätyt) verinäytteet. Analyysi voidaan suorittaa sekä tuoreille verinäytteille että jäädytetyille verinäytteille.

Anna näytteiden ja reagenssiaineiden saavuttaa huonelämpötila ennen käyttöä.

Tärkeää! Pyöritä kalibrointiaineen ja sisäisen standardointiaineen sisältävää ampullia hetkellisesti sentrifugissa ennen ampullin avaamista (esim. Eppendorf-sentrifugi, 2000 RCF, 2 min).

Uuttoliuksen valmistelu (EXT)

Pyöritä sisäistä standardointiainetta PEth 16:0/18:1 (2000 RCF, 2 min) sisältävää ampullia sentrifugissa, avaa ampulli ja lisää 0,5 ml uuttoliuosta, siirrä luos uuttoliuospulloon, toista kahdesti siirtääksesi koko sisäisen standardointiliuksen uuttoliuospulloon. Sisäisen standardointiaineen d5- PEth 16:0/18:1 lopullinen pitoisuus uuttoliuksessa on 0,4 µM.

Kalibrointiaineen valmistelu ja laimennus

Suorita puhtaalle verelle esiseulonta varmistaaksesi, että siinä ei ole PEth:tä tai muita häiritseviä aineita. Pyöritä sentrifugissa kalibrointiainetta PEth 16:0/18:1 (2000 RCF, 2 min) sisältävä ampulli, avaa ampulli ja lisää PEth 16:0/18:1 -kalibrointiaineen ampulliin 900 µl verta. Sekoita huolellisesti pipetillä. Käytä tätä perusaineena, kun valmistelet K1-kalibrointiainetta, K1:tä valmistellessasi K2:ta, jne., alla olevan taulukon ja kaavion

mukaisesti. Tuloksena syntyneitä näyteputkia C1–C5 voidaan käyttää ainakin kahdeksaan kalibroitikäyrään, kun jokaisesta näyteputkesta otetaan 50 mikrolitraa verta kalibroitikäyrän valmisteluun. Kalibroitaine tulee säilyttää -20 °C lämpötilassa.

Standardi	Standardi ionipitoisuus (µM)	Aine	Aineen til. [µl]	Til. [µl]	Kok. til. [µl]	Til. [µl]
Kal	40				100	900
K1	4	K1	100	900	100	750
K2	1	K2	250	750	100	500
K3	0,5	K3	500	500	1000	800
K4	0,1	K4	200	800	100	500
K5	0,05	K5	500	500	1000	1000

Kaavio 1. Veren kalibroitaineen laimennussarja

Mobiilifaasi A

Tuotantomäärä 750 ml

Seos, lopullinen liuos	Määrä
20 % asetonitrili	150 ml
0,5 mM ammoniakki	375 µl
1,0 mM etaanihappo	750 µl
dH ₂ O	600 ml

Mobiilifaasi B

Tuotantomäärä 500 ml

Seos, lopullinen liuos	Määrä
20 % asetonitrili	100 ml
20 % tetrahydrofuraani	100 ml
60 % 2-propanoli	300 ml

10. NÄYTTEEN VALMISTELU

1. Lisää 200 mikrolitraan uuttoliuosta 50 mikrolitraan verta, sekoita vortex-sekoittimessa huolellisesti 2 x 5 sekunnin ajan.
2. Pyöritä sentrifugissa 16400 RCF huoneenlämpötilassa 10 minuutin ajan.
3. Siirrä 200 µl supernatanttinäytettä automaattisen näytteenottimen näyteputkeen, aseta näyteputki automaattiseen näytteenottimeen, injektoi 20 µl näytettä laitteeseen.

11. LC-MS/MS -MENETELMÄN KROMATOGRAFISET OLOSUHTEET (LISTATTU ESIMERKIKSI)

Väline	Waters Quattro Premier XE
Ionization	Electrospray
Scan Type	MRM
Polarity	Negative
Spray Voltage (kV)	2.8
Cone Gas (L/hrs.)	100
Desolvation Temp (°C)	370
Source Temp (°C)	90
Desolvation Gas Flow (L/hrs.)	800
Collision Gas (mL/min)	0.1
Cone Voltage (V)	60

12. GRADIENTTI

Mobiilifaasien A ja B virtaus on 0,3 ml/min

Aika	MOF A	MOF B
0,00	70	30
1,5	20	80
1,6	0	100
2,2	0	100
2,25	70	30

13. LASKELMA

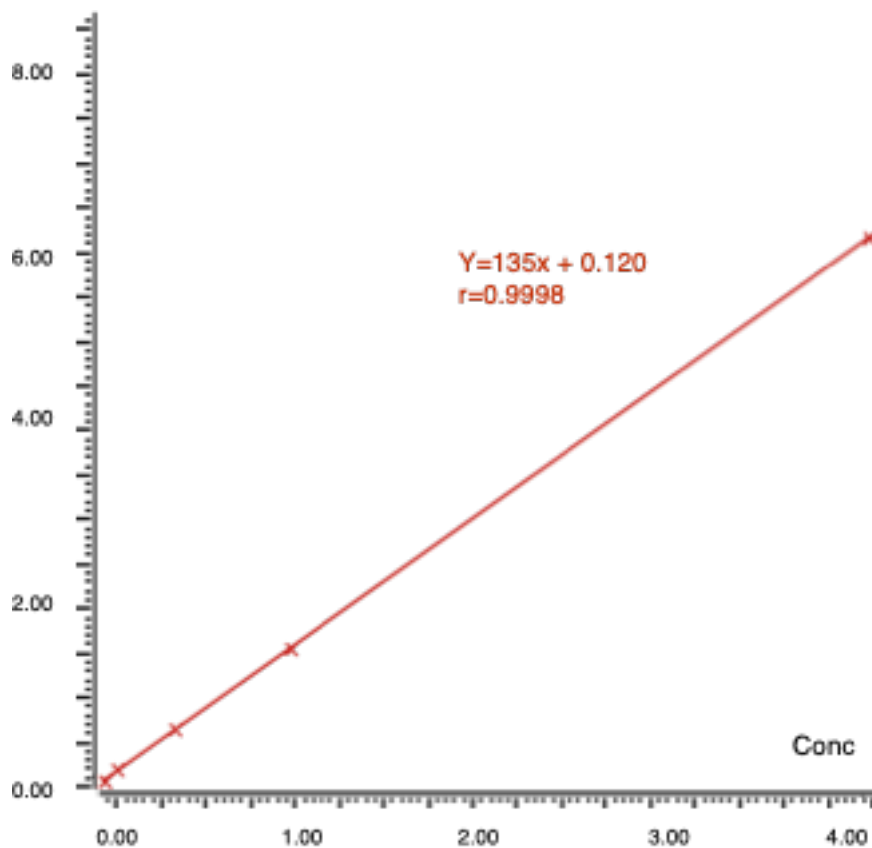
Analyyttien huippuarvoalueet jaetaan sisäisen standardin huippuarvoalueella, ja suhdelukuja (vasteita) käytetään sovittamaan kalibrointinäytteissä suorat linjat vasteeseen suhteessa analyytin pitoisuuteen. Suositetaan ensimmäisen kertaluvun lineaarista regressiota, jota painotetaan $1/x$:llä.

14. ESIMERKKEJÄ KROMATOGRAMMEISTA

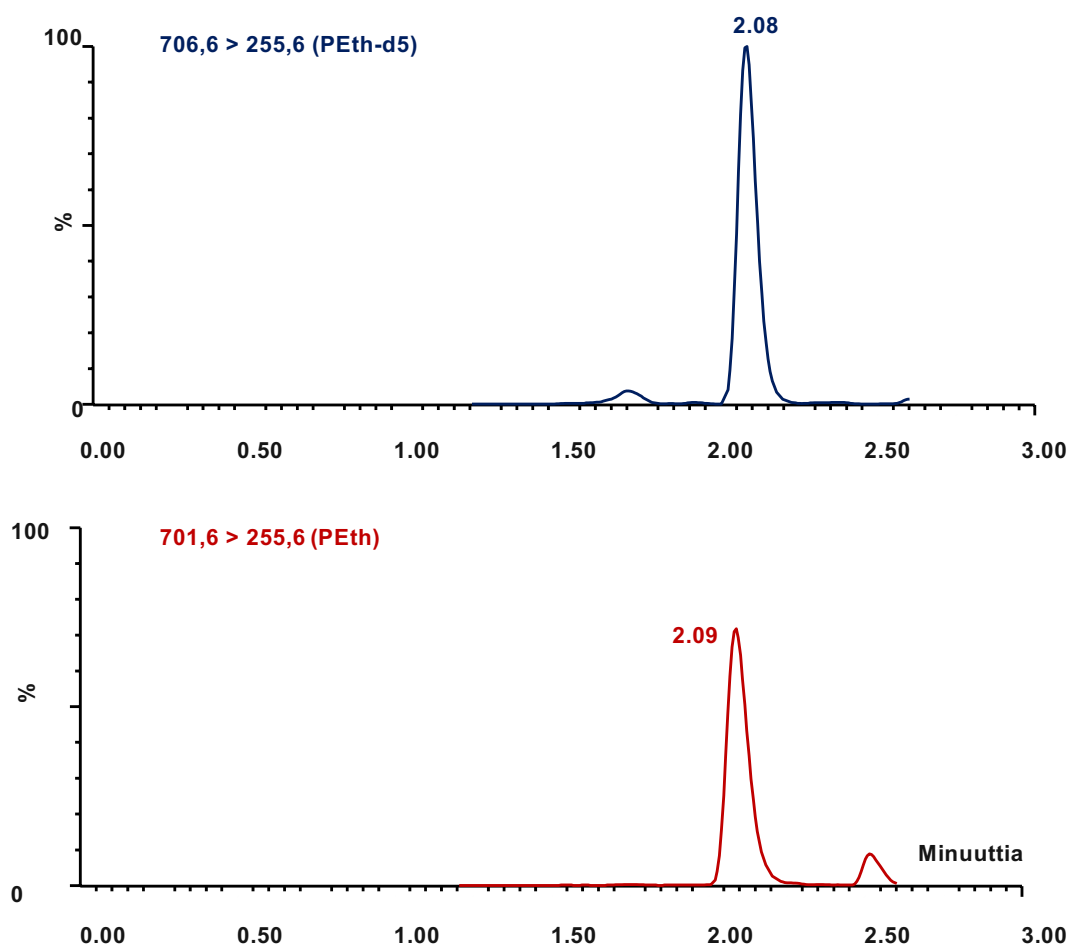
Molekyyli	MW
PEth 16:0/18:1	703
PEth-d5 16:0/18:1	708

KAKSI ERI MRM-SIIRTYMÄFRAGMENTTIA 255,6 JA 281,6.

On suositeltavaa käyttää kromatogrammien tallentamiseen m/z 701 → 255 MRM-siirtymää ja käyttää samaa fragmenttia (255) sisäisenä PEth-standardina. PEth-viritysluoksen avulla m/z-arvojen tarkkojen desimaalien löytäminen kunkin MS/MS-laitteen osalta on helpompaa.



Kaavio 2. Kalibrointikäyrä 701 → 255 -siirtymään kromatogrammien pohjalta



Kaavio 3. Vertailunäyte 0,3 µM

15. LAADUNVALVONTA

Erän vertailunäyte tulee analysoida jokaisen näyte-erän kanssa. Vertailunäytteiden analyysien tuloksia tulee arvioida tilastollisilla menetelmillä, joiden avulla voidaan varmistaa menetelmällä saatujen tulosten tarkkuus. Kaikkien erien sisäisen standardointialueen valvominen on suositeltavaa. Sisäisen standardointiaineen systemaattinen vähentyminen voi olla merkki laitteistoon liittyvistä ongelmista, kuten saastuneesta kolonnista tai ionilähteestä. Yksittäiset poikkeamat voivat viitata näytteeseen tai näytteen valmisteluun liittyviin ongelmiin.

Viritysluos:

Käytä mukana toimitettavaa PEth-virityssainetta löytääksesi MRM-jäämien tarkan siirtymän, kun valmistelet pakettia ensimmäistä kertaa. Tarkista massa-asteikkojen tarkkuus massaspektrometrin vuosittaisen ennaltaehkäisevän huollon jälkeen ja kaikkien muiden sellaisten toimenpiteiden jälkeen, jotka voivat vaikuttaa massa-asteikkojen tarkkuuteen.

Puhdistusliuos:

Noudata automaattisen näytteenottimen valmistajan ohjeita.

Sisäinen standardointi:

Sisäisen standardoinnin alueen tulisi olla yhdenmukainen. Jos alue ei ole yhdenmukainen, se voi olla merkki häiriöistä tai jäänteiden vaikutuksista.

16. TOIMINTAOMINAISUUDET

Mittausalueen alaraja

0,05 µM

Mittausalue

0,05–4 µM

Yli 4 µM näytteet tulee laimentaa ja analysoida uudelleen.

Toistettavuus

Näyte	PEth [µmol/l]	Sarjan Sisäinen toistettavuus CV (n=20)	Sarjojen välinen toistettavuus CV (n=20)
QC Low	0,15	<12 %	<15 %
QC Mid	0,7	<10 %	<12 %
QC High	3,0	<8 %	<10 %

17. CE-MERKINTÄ

PEth-pakkauksella on EY:n in vitro -diagnostiikkaa koskevan direktiivin 98/79/EY mukainen CE-merkintä.

18. VIITTEET:

1. Kechagias S, Dernroth DN, Blomgren A, Hansson T, Isaksson A, Walther L, Kronstrand R, Kågedal B, Nystrom FH. Phosphatidylethanol Compared with Other Blood Tests as a Biomarker of Moderate Alcohol Consumption in Healthy Volunteers: A Prospective Randomized Study. *Alcohol Alcohol.* 07/2015;50(4):399-406.
2. Gustavsson L, Alling C. Formation of phosphatidylethanol in rat brain by phospholipase D. *Biochem Biophys Res Com* 1987, 142(3):958-63.
3. Helander A. and Zheng Y. Molecular Species of the Alcohol Biomarker Phosphatidylethanol in Human Blood Measured by LC-MS. *Clinical Chemistry* 2009, 55(7):1395-1405.
4. Gnann H, Engelmann C, Skopp G, Winkler M, Auwärter V, Dresen S, Ferreirós N, Wurst FM, Weinmann W. Identification of 48 homologues of phosphatidylethanol in blood by LC-ESI-MS/MS. *Anal Bioanal Chem* 2010, 396(7):2415-23.
5. Furey A, Moriarty M, Bane V, Kinsella B, Lehane M. Ion suppression; a critical review on

- causes, evaluation, prevention and applications. *Talanta* 2013, 15(115):104-22.
6. Viel G, Boscolo-Berto R, Cecchetti G, Fais P, Nalesso A, Ferrara SD. Phosphatidylethanol in blood as a marker of chronic alcohol use: A systematic review and meta-analysis. *Int.J.Mol.Sci* 2012, 13, 14788-14812
 7. Euroopan parlamentin ja neuvoston 27 päivänä lokakuuta 1998 antama direktiivi 98/79/EY in vitro -diagnostiikkaan käytettävistä lääketieteellisistä laitteista