

ПРАВИТЕЛЬСТВО МОСКВЫ
ДЕПАРТАМЕНТ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ ГОРОДА МОСКВЫ

РЕКОМЕНДОВАНО



МЕТОДИКА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ФОСФАТИДИЛЭТАНОЛА (PEth) В КРОВИ

Методические рекомендации № 7

Москва 2022

УДК 615.9: 543.544.5.068.7
ББК 52.8
М54

Организация разработчик: Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Московский научно-практический центр наркологии Департамента здравоохранения города Москвы»

Составители: Петухов А.Е., Кошкина Е.А., Надеждин А.В., Тетенова Е.Ю., Колгашкин А.Ю., Кучеров Ю.Н., Смирновская М.С., Смирнов А.В., Федоров М.В.

Рецензенты:

Дворская О.Н. – заведующая кафедрой Фармации и химии фармацевтического факультета ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, доктор фармацевтических наук

Белова М.В. – ведущий научный сотрудник отделения острых отравлений и соматопсихиатрических расстройств ГБУЗ «НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского» ДЗМ, д.б.н.

Методика количественного определения фосфатидилэтанола (PEth) в крови методические рекомендации / составители: Петухов А.Е., Е.А. Кошкина, Надеждин А.В. [и др.]. – М.: ГБУЗ «МНПЦ наркологии ДЗМ», 2022. – 19 с.

Методические рекомендации «Методика количественного определения фосфатидилэтанола (PEth) в крови» подготовлены в рамках НИР «Мониторинг распространенности наркологических заболеваний в целях повышения качества и эффективности оказания наркологической помощи в Москве»

Материалы методических рекомендаций обобщают опыт количественного определения в крови прямого маркера злоупотребления алкоголем – фосфатидилэтанола.

Методические рекомендации предназначены для специалистов лабораторной диагностики, организаторов здравоохранения, занимающихся внедрением современных технологий в медицинских учреждениях, врачей психиатров-наркологов.

Данный документ является собственностью департамента здравоохранения города Москвы и не подлежит тиражированию и распространению без соответствующего разрешения.

ISSN

© Департамент здравоохранения города Москвы, 2022

© ГБУЗ «МНПЦ наркологии ДЗМ», 2022

© Коллектив авторов, 2022

СОДЕРЖАНИЕ

Обозначения и сокращения	4
Введение	5
Основная часть	7
Описание методики	8
Валидация методики	10
Заключение	15
Список литературы	16

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

PEth – фосфатидилэтанол

AUDIT – 4 скрининговый опросник, состоящий из трех первых и десятого вопросов полного опросника об употреблении алкоголя AUDIT (The Alcohol Use Disorders Identification Test)

SCL-5 – опросник из 5 вопросов для оценки выраженности психопатологической симптоматики (Symptom Check List – SCL)

ГГТ – γ -глутамилтрансфераза

АСТ – аспартатаминотрансфераза

АЛТ – аланинаминотрансфераза

CDT – карбогидратдефицитный трансферрин

СКОЭ, MCV – средний корпускулярный объем эритроцитов

EtG – этилглюкуронид

PLD – фосфолипаза D

ВЭЖХ – метод высокоэффективной жидкостной хроматографии

ЖЖЭ – жидкость-жидкостная экстракция

ВС – внутренний стандарт

МТБЕ – Метил-трет-бутиловый эфир

АСН – ацетонитрил

IPA – 2-пропанол

НПКО – нижний предел количественного определения

FDA (Food and Drug Administration) – Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов в США

QCA, QCB, QCC, QCD – образцы контроля качества

ВВЕДЕНИЕ

Разработка метода определения фосфатидилэтанола является частью исследовательской работы, проведенной в рамках научного (открытого, сравнительного) проекта «Изучение употребления алкоголя и других психоактивных веществ среди госпитализированных соматических больных», которое проводилось на базе городской клинической больницы им. В.П. Демикова ДЗМ (ГКБ №68) и МНПЦ наркологии ДЗМ. Целью исследования было оценить распространенность вредного употребления алкоголя среди пациентов соматического профиля, госпитализированных по неотложным показаниям и изучить способы выявления употребления алкоголя, в том числе биомаркера алкоголя фосфатидилэтанола (PEth). В исследовании приняло участие 3009 пациентов старше 18 лет, поступивших на стационарное лечение в соматические отделения (терапия, кардиология, пульмонология, неврология) по неотложным показаниям. При получении письменного согласия на исследование, пациентом заполнялась анкета, состоящая из вопросов: скринингового теста AUDIT-4 об употреблении алкоголя и других психоактивных веществ, SCL-5 состоящая из 5 вопросов, касающихся тревожности и депрессии. Пробы крови анализировались в химико-токсикологической лаборатории МНПЦ наркологии на присутствие психоактивных веществ: алкоголь, наркотики, бензодиазепины и на наличие фосфатидилэтанола (PEth) с его количественной оценкой.

Выбор фосфатидилэтанола в качестве биомаркера злоупотребления алкоголем продиктован тем, что оценка непрямых биомаркеров, таких как γ -глутамилтрансфераза (ГГТ), аспартатаминотрансфераза (АСТ), аланинаминотрансфераза (АЛТ), карбогидратдефицитный трансферрин (CDT), средний корпускулярный объем эритроцитов (СКОЭ, MCV) была неоднозначной и в большинстве случаев требовала бы оценки всех нарушений в организме, способных вызвать повышения этих биомаркеров. Определение прямого метаболита этанола – этилглюкуронида (EtG) не рассматривалось из-

за того, что EtG не является маркером хронического злоупотребления алкоголем, так как он указывает лишь на факт наличия этанола в организме и может давать ложноположительные результаты даже при наружном применении этанола [1- 8].

Определение уровня PEth представляется наиболее современным, объективным и точным методом диагностики злоупотребления алкоголем. PEth образуется *in vivo* под действием фосфолипазы D из эндогенного фосфолипида фосфатидилхолина. В норме фосфатидилхолин превращается в фосфатидную кислоту под действием фосфолипазы D (PLD). В присутствии этанола реакция смещается в сторону образования ковалентной связи с этанолом с образованием PEth [9]. PEth представляет собой группу гомологичных глицерофосфолипидов, которые различаются между собой связанными остатками жирных кислот. Всего насчитывается 48 гомологов, причем наиболее часто встречающимися являются PEth 16:0/18:1 (38%) и PEth 16:0/18:2 (24%) [10,11,12]. Было показано, что количественное измерение суммы этих двух гомологов коррелирует лучше с общим уровнем PEth в крови, чем измерение каждого из гомологов в отдельности [13].

PEth образуется в различных тканях, таких как головной мозг, печень, в лимфоцитах, тромбоцитах и эритроцитах. В отличие от других клеток в эритроцитах отсутствует фосфолипаза C, которая осуществляет метаболизм PEth, поэтому PEth может в них накапливаться [14]. Было показано, что образование PEth в крови не зависит от гематологических показателей (СКОЭ, гематокрит, количество эритроцитов) [14].

Период полувыведения PEth составляет от 4 до 10 дней [15, 16]. Из-за большого периода полувыведения при длительном употреблении алкоголя PEth накапливается в крови. В таком случае появляется возможность детектировать PEth в течение 28 дней после последнего приема алкоголя [17].

Теоретически специфичность PEth составляет 100%, так как его образование напрямую зависит от содержания этанола в крови [18,19]. Чувствительность, по разным оценкам, составляет от 94,5 [18] до 100% [19]. В проведенных исследованиях было показано, что не существует различий между уровнем образования PEth при употреблении алкоголя между мужчинами и женщинами, а также людьми разного возраста [17, 20]. Помимо этого, проводились исследования для выявления возможного влияния сопутствующих заболеваний, таких как гипертония и заболевания печени, на образование PEth при приеме алкоголя. Однако взаимосвязи между этими факторами не было выявлено [20].

Согласно принятому соглашению содержание PEth в крови ≥ 0.3 мкмоль/л (210 нг/мл) рассматривается как маркер чрезмерного злоупотребления алкоголем, в то время как уровень PEth < 0.05 мкмоль/л (35 нг/мл) относится к низкому уровню потребления алкоголя или же его отсутствию [21].

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

В настоящее время определение фосфатидилэтанола в крови проводят с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с тандемным масс-спектрометрическим детектированием благодаря высокой чувствительности и специфичности метода.

Как правило, основным методом пробоподготовки является жидкость-жидкостная экстракция (ЖЖЭ) с использованием в качестве растворителей изопропанола и гексана, также описаны методики, использующие осаждение белков и твердофазную экстракцию [12-14]. Описан метод 96-ти лунок для быстрого получения более чистых экстрактов [15].

Цель исследования состояла в разработке и валидации методики количественного определения фосфатидилэтанола в цельной крови для применения в лабораторно-диагностической практике с целью контроля лиц группы риска по злоупотреблению алкоголем.

ОПИСАНИЕ МЕТОДИКИ

Материалы и методы

Хроматографирование и детектирование проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Agilent 1260 (Agilent Technologies, Калифорния, США), оснащенного градиентным насосом G1312B, дегазатором G4225A, автосамплером G1329B, термостатом колонок G1316A и тандемным масс-селективным детектором Agilent 6460 (Agilent Technologies, Калифорния, США) с источником ионизации Jet Stream Electrospray Ionization.

Для исследования были использованы следующие реактивы: PEth 16:0/18:1 (Avanti Polar Lipids, Алабама, Алабама, США), PEth 16:0/18:1-d5 – внутренний стандарт (ВС) данного исследования (Echelon Biosciences, Солт-Лейк-Сити, США). Метил-трет-бутиловый эфир (МТБЕ, Merck, Дармштадт, Германия), метанол (HPLC-grade, Scharlau, Сентменат, Испания), ацетонитрил (ACN, HPLC-grade, Acros Organics, Гел, Бельгия), кислота муравьиная, 2-пропанол (IPA) и аммония формиат были приобретены в Sigma-Aldrich (HPLC-grade, Штайнхайм, Германия). Вода высокого качества была получена в лаборатории при помощи системы очистки воды Milli-Q, Merck KGaA (Дармштадт, Германия).

Исходные стандартные растворы PEth и ВС готовили растворением навесок в метаноле; рабочие стандартные растворы – разведением и смешиваем исходных стандартных растворов.

Исходные стандартные растворы хранили при температуре -50°C , а рабочие стандартные растворы при $+4^{\circ}\text{C}$.

Пробоподготовка

Для определения фосфатидилэтанола в цельной крови, 100 мкл крови помещали в пробирку типа Эппендорф, добавляли 100 мкл деионизированной воды, 50 мкл смеси 2-пропанола и ацетонитрила 1:1 (IPA:ACN 1:1), 25 мкл внутреннего стандарта PEth-D5 с концентрацией 1129 нг/мл, 500 мкл смеси метил-третбутилового эфира и 2-пропанола 4:1 (МТБЕ/IPA 4:1), встряхивали

на Вортексе в течение 30 секунд. Затем центрифугировали при 14500 об/мин в течение 10 минут при температуре 4 °С. Надосадочный органический слой объемом 450 мкл переносили в виалу на 2 мл, выпаривали в шкафу для выпаривания при температуре не выше 40°С, затем добавляли 100 мкл смеси 2-пропанола и ацетонитрила 1:1 (IPA:ACN 1:1), переносили в коническую вставку, закрывали виалу для проведения дальнейшего анализа.

Условия хроматографического разделения и детектирования

Условия хроматографирования и детектирования были подобраны экспериментально.

Для проведения исследования использовали хроматографическую колонку Zorbax Eclipse Plus C18 RRHD (1.8 мкм, 2.1 x 50мм) с предколонкой Zorbax Eclipse Plus C18 (1.8 мкм, 12,5 x 2.1мм) (Agilent Technologies, Калифорния, США). Температура термостата колонок составляла 50 °С. В качестве подвижной фазы применяли элюент А (10 мМ водный раствор формиата аммония/ацетонитрил, (20:80, v:v)) и элюент В (2-пропанол) в градиентном режиме элюирования (таблица 1) со скоростью потока 0,4 мл/мин и объемом вводимой пробы 5 мкл.

Таблица 1 - Градиент состава подвижной фазы

Время анализа, мин	Объемная доля элюента А, %	Объемная доля элюента В, %
0.00	90.0	10.0
0.01	50.0	50.0
2.00	50.0	50.0
3.00	0.0	100.0
5.00	0.0	100.0
6.00	90.0	10.0

Время анализа для каждого образца составило 11 минут. ВЭЖХ-МС/МС параметры для PEth и внутреннего стандарта PEth-d5 указаны в таблице 2.

Таблица 2 - ВЭЖХ-МС/МС параметры

Аналит	Время удерживания (мин)	MRM переходы	Напряжение на фрагменторе (В)	Энергия в ячейке соударения (В)	Время выдержки (мс)
PEth 16:0/18:1	3.6	701.8 → 281.3	239	29	200
		701.8 → 255.3		37	
PEth 16:0/18:1-d ₅ (BC)	3.6	706.8 → 281.3	239	29	200
		706.8 → 255.3		37	

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ

Валидация биоаналитической методики была проведена на основе руководства FDA по следующим параметрам: селективность; нижний предел количественного определения (НПКО); линейность; перенос пробы, точность, прецизионность, эффект матрицы, стабильность (внутри- и межлабораторная) [28].

Селективность

Селективность оценивалась путем сравнения хроматограмм образца холостой биологической матрицы с хроматограммой образца НПКО, содержащего PEth 16:0/18:1 (0.0025 мкмоль/л) и PEth 16:0/18:1-d₅ (1.6 мкмоль/л) (рисунки 1,2).

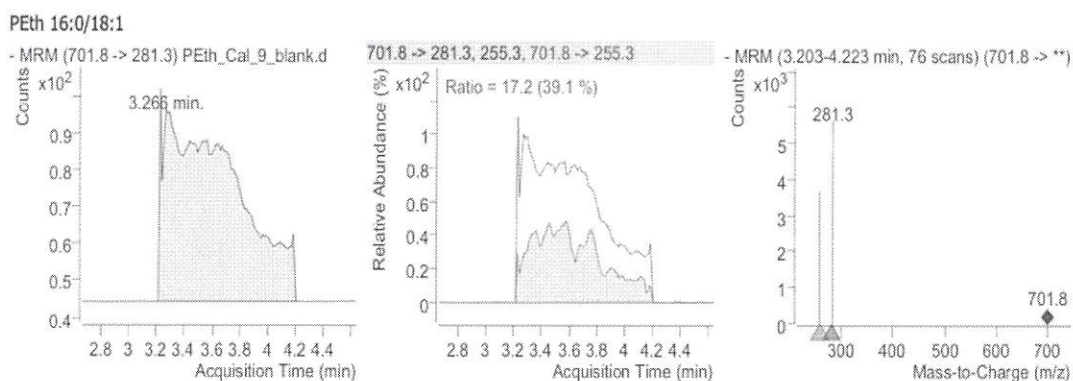


Рисунок 1 - Хроматограмма PEth 16:0/18:1 и PEth 16:0/18:1-d₅ в цельной крови – холостой биологической матрице.

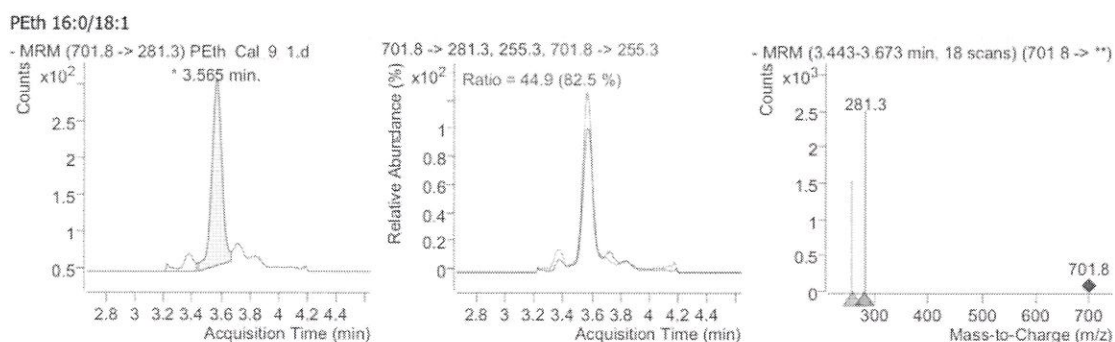


Рисунок 2 - Хроматограмма PEth 16:0/18:1 и PEth 16:0/18:1-d₅ в цельной крови – биологическая матрица с прибавлением растворов рабочего и внутреннего стандартов.

Нижний предел количественного определения и линейность

Линейность подтверждалась в диапазоне концентраций от 0.0025 мкмоль/л до 3.0 мкмоль/л. По полученным значениям был построен калибровочный график в координатах отношение площади пика аналита соответственно к площади пика ВС от отношения концентрации аналита. НПКО методики определяли на основании данных линейности, точности и прецизионности. За НПКО методики принималась минимальная концентрация PEth 16:0/18:1 в цельной крови в диапазоне линейной зависимости, которую можно было количественно определить с приемлемой прецизионностью и

точностью, которая составила 0.0025 мкмоль/л. Отношение сигнал/шум по пикам PEth 16:0/18:1, рассчитанное при помощи программного обеспечения Mass Hunter, составило более 10:1.

Калибровочная кривая носила линейный характер во всем диапазоне определяемых концентраций 0.0025 мкмоль/л – 3.0 мкмоль/л. Полученный коэффициент корреляции соответствовал критерию пригодности (не менее 0,99) (рисунок 3).

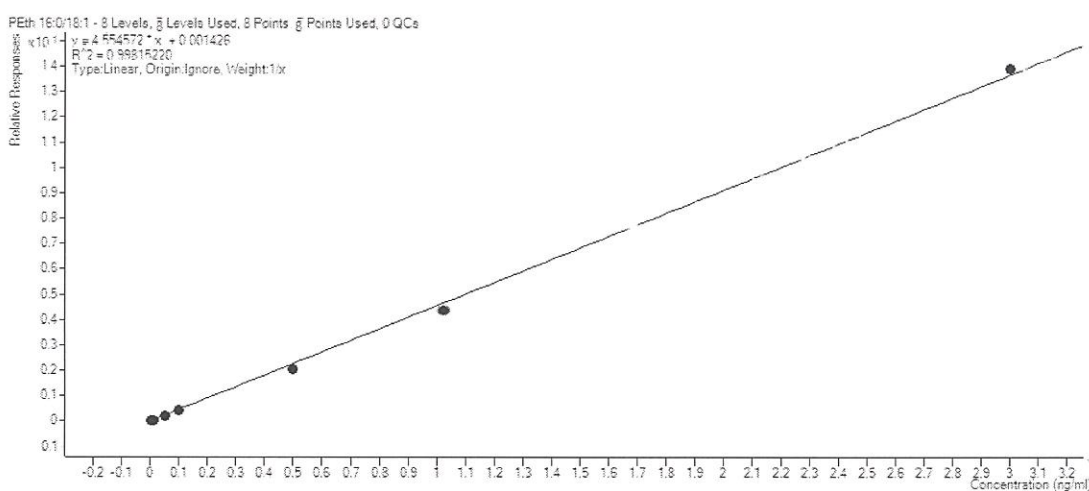


Рисунок 3 - Калибровочный график №1 зависимости отношения площади пика PEth 16:0/18:1 к площади пика PEth 16:0/18:1-d₅ от концентрации PEth 16:0/18:1

Относительная погрешность измерений для калибровочных образцов составила не более 20% для НПКО и не более 10,16 % для остальных точек от номинальных значений.

Отклонения концентраций калибровочных образцов, рассчитанные по уравнению линейной зависимости от номинальных значений, приведены в таблице 3.

Таблица 3 - Отклонения концентраций PEth 16:0/18:1 в калибровочных образцах от их номинальных значений, калибровочный график №1

Концентрация, номинальная, мкмоль/л	Концентрация, рассчитанная, мкмоль/л	Е, %	Норма, не более %
0,0025	0,0029	16,00	20
0,005	0,0054	8,00	15
0,01	0,0093	-7,00	15
0,05	0,0469	-6,20	15
0,1	0,0971	-2,90	15
0,5	0,4492	-10,16	15
1	0,9153	-8,47	15
3	3,0567	1,89	15

Перенос пробы

Перенос PEth 16:0/18:1 оценивался при последовательном анализе проб с концентрацией PEth 16:0/18:1 3 мкмоль/л и чистой цельной крови. В результате последовательного анализа на хроматограмме чистой крови отсутствовали пики, соответствующие по времени удерживания PEth 16:0/18:1. Таким образом, перенос пробы не наблюдался.

Точность и прецизионность

Анализ точности и прецизионности методики внутри цикла проводили с использованием пяти образцов холостой цельной крови (n=5) с добавлением рабочих стандартных растворов PEth 16:0/18:1 до получения концентраций 0.0025, 0.0075, 1.5, 2.25 мкмоль/л (QCA, QCB, QCC, QCD). Анализ точности и прецизионности методики между циклами проводили на этих же 4 уровнях концентрации PEth 16:0/18:1 между циклами за три различных дня (n=15). Полученные величины относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (Е, %) соответствуют нормам (не более 20 % на уровне НПКО, не более 15 % - для остальных точек). Полученные результаты

позволяют считать методику точной и прецизионной при определении PEth 16:0/18:1 в цельной крови (Таблицы 4,5).

Таблица 4 - Прецизионность и точность методики определения PEth 16:0/18:1 в цельной крови внутри аналитического цикла (n=5)

Концентрация, номинальная, мкмоль/л	Концентрация, рассчитанная, мкмоль/л	RSD, %	E, %
0,0025	0,0030 ± 0,0001	4,38	19,20
0,0075	0,0072 ± 0,0000	0,00	-4,00
1,5	1,6203 ± 0,0051	0,31	8,02
2,25	2,2403 ± 0,0061	0,27	-0,43

Таблица 5 - Прецизионность и точность методики определения PEth 16:0/18:1 в цельной крови между аналитическими циклами (n=15)

Концентрация, номинальная, мкмоль/л	Концентрация, рассчитанная, мкмоль/л	RSD, %	E, %
0,0025	0,0029 ± 0,0001	5,00	14,93
0,0075	0,0072 ± 0,0001	1,72	-4,44
1,5	1,5518 ± 0,0523	3,37	3,46
2,25	2,2883 ± 0,0408	1,78	1,70

Эффект матрицы

Эффект матрицы (ME) был оценен на нижнем и верхнем уровнях диапазона линейности PEth 16:0/18:1 (0.0075 мкмоль/л и 2.25 мкмоль/л). Значения ME, а также ME, нормализованному по ВС, для нижнего уровня концентраций составили 95% и 102%, соответственно; для верхнего уровня – 91% и 98%, соответственно. Рассчитанные значения ME удовлетворяют критериям приемлемости.

Стабильность

Проведенные исследования на образцах цельной крови показали, что PEth 16:0/18:1 стабилен при различных условиях хранения. Была показана

стабильность PEth 16:0/18:1 при хранении в течение 6 часов при комнатной температуре. Помимо этого, было подтверждено, что хранение при температуре -20° С в течение 4 недель, а также 3 цикла заморзки-разморозки не влияют на стабильность PEth 16:0/18:1.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана и валидирована методика количественного определения фосфатидилэтанола в плазме крови методом ВЭЖХ-МС/МС. Аналитический диапазон методики составил 0.0025 мкмоль/л – 3.0 мкмоль/л; уровень НПКО PEth 16:0/18:1 был равен 0.0025 мкмоль/л.

Данная методика пригодна для использования в лабораторно-диагностической практике с целью определения группы риска по злоупотреблению алкоголем; контроля качества ремиссии и выявления рецидивов заболевания среди наркологических больных [28].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Walther L, de Bejczy A, Löf E, Hansson T, Andersson A, Guterstam J, Hammarberg A, Asanovska G, Franck J, Söderpalm B, Isaksson AP. Phosphatidylethanol is Superior to Carbohydrate-Deficient Transferrin and γ -Glutamyltransferase as an Alcohol Marker and is a Reliable Estimate of Alcohol Consumption Level. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 2015; 39(11): 2200–2208.
2. Jastrzębska I, Zwolak A, Szczyrek M, Wawryniuk A, Skrzydło-Radomańska B, Daniluk J. Biomarkers of alcohol misuse: recent advances and future prospects. *Gastroenterology Review* 2016; 11 (2): 78–89.
3. Loomba R, Bettencourt R, Barrett-Connor E. Synergistic association between alcohol intake and body mass index with serum alanine and aspartate aminotransferase levels in older adults: the rancho bernardo study. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 2009; 30 (11-12):1137–1149
4. Tavakoli HR, Hull M, Michael Okasinski L. Review of current clinical biomarkers for the detection of alcohol dependence. *Innovations in Clinical Neuroscience* 2011; 8(3):26-33.
5. Conigrave KM, Davies P, Haber P, Whitfield JB. Traditional markers of excessive alcohol use. *Addiction* 2003; 98 (прил. 2):31–43.
6. Mårtensson O, Härlin A, Brandt R, Seppä K, Sillanaukee P. Transferrin isoform distribution: gender and alcohol consumption. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 1997; 21(9):1710–1715.
7. Wurst FM, Thon N, Yegles M, Schrock A, Preuss UW, Weinmann W. Ethanol metabolites: their role in the assessment of alcohol intake. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 2015; 39:2060–2072.
8. Петухов А.Е. с соавт. Фосфатидилэтано́л как биомаркер злоупотребления алкоголем // Наркология. - 2017. - № 2. - С.42 – 47)

9. Javors MA, Hill-Kapturczak N, Roache JD, Karns-Wright TE, Dougherty DM. Characterization of the Pharmacokinetics of Phosphatidylethanol 16:0/18:1 and 16:0/18:2 in Human Whole Blood After Alcohol Consumption in a Clinical Laboratory Study. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 2016; 40(6):1228-34
10. Isaksson A, Walther L, Hansson T, Andersson A, Alling C. Phosphatidylethanol in blood (B-PEth): a marker for alcohol use and abuse. *Drug Testing and Analysis* 2011; 3:195–200.
11. 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. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2010; 396(7):2415-23.
12. Nalesso A, Viel G, Cecchetto G, Mioni D, Pessa G, Favretto D, Ferrara SD. Quantitative profiling of phosphatidylethanol molecular species in human blood by liquid chromatography high resolution mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2011; 1218:8423–8431.
13. Zheng Y, Beck O, Helander A. Method development for routine liquid chromatography-mass spectrometry measurement of the alcohol biomarker phosphatidylethanol (PEth) in blood. *Clinica Chimica Acta* 2011; 412: 1428–1435.
14. Viel G, Boscolo-Berto R, Cecchetto G, Fais P, Nalesso A, Ferrara SD. Phosphatidylethanol in blood as a marker of chronic alcohol use: a systematic review and meta-analysis. *International Journal of Molecular Sciences* 2012; 13:14788–14812.
15. Gnann H, Weinmann W, Thierauf A. Formation of phosphatidylethanol and its subsequent elimination during an extensive drinking experiment over 5 days. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 2012; 36:1507–1511.
16. Varga A, Hansson P, Johnson G, Alling C. Normalization rate and cellular localization of phosphatidylethanol in whole blood from chronic alcoholics. *Clinica Chimica Acta* 2000; 299:141–150.

17. Wurst FM, Thon N, Aradottir S, Hartmann S, Wiesbeck GA, Lesch O, Skala K, Wolfersdorf M, Weinmann W, Alling C. Phosphatidylethanol: normalization during detoxification, gender aspects and correlation with other biomarkers and self-reports. *Addiction Biology* 2010; 15:88–95.
18. Hartmann S, Aradottir S, Graf M, Wiesbeck G, Lesch O, Ramskogler K, Wolfersdorf M, Alling C, Wurst FM. Phosphatidylethanol as a sensitive and specific biomarker—comparison with gamma glutamyl transpeptidase, mean corpuscular volume and carbohydrate-deficient transferrin. *Addiction Biology* 2007; 12:81–84.
19. Hannuksela ML, Liisanantti MK, Nissinen AE, Savolainen MJ. Biochemical markers of alcoholism. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2007; 45:953–961.
20. Stewart SH, Reuben A, Brzezinski WA, Koch DG, Basile J, Randall PK, Miller PM. Preliminary evaluation of phosphatidylethanol and alcohol consumption in patients with liver disease and hypertension. *Alcohol and Alcoholism* 2009; 44:464–467
21. Helander A, Hansson T. National harmonization of the alcohol biomarker PEth. *Läkartidningen* 2013; 110:1747–1748.
22. Петухов А.Е., Надеждин А.В., Bogstrand S.T., Брюн А.Е., Раменская Г.В., Кошкина Е.А., Мельник Е.В., Смирнов А.В., Тетенова Е.Ю. Сравнительный анализ методик определения фосфатидилэтанола в крови как биомаркера злоупотребления алкоголем. *Судебно-медицинская экспертиза* 2017; (5): 23-26. doi: 10.17116/sudmed201760523-26.
23. Nalesso A., Viel G., Cecchetto G., Mioni D., Pessa G., Favretto D., Ferrara S.D. Quantitative profiling of phosphatidylethanol molecular species in human blood by liquid chromatography high resolution mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2011; 1218:8423-8431. doi.org/10.1016/j.chroma.2011.09.068.
24. Kwak H.S., Han J.Y., Ahn H.K., Kim M.H., Ryu H.M., Kim M.Y., Chung H.J., Cho D.H., Shin C.Y., Velazquez-Armenta E.Y., Nava-Ocampo A.A. Blood levels of phosphatidylethanol in pregnant women reporting positive alcohol ingestion, measured by an improved LC-MS/MS analytical method. *Clinical Toxicology* 2012; 50(10):886-891. doi.org/10.3109/15563650.2012.744997.

25. 9. Kummer N., Ingels A.S., Wille S.M., Hanak C., Verbanck P., Lambert W.E., Samyn N., Stove C.P. 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. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2016; 408(3):825-838. doi.org/10.1007/s00216-015-9169-1.
26. Oppolzer D., Barroso M., Gallardo E. Bioanalytical procedures and developments in the determination of alcohol biomarkers in biological specimens. *Bioanalysis*. 2016; 8 (3): 229-251. doi.org/ 10.4155/bio.15.240.
27. Luginbühl M., Stöth F., Schröck A., Gaugler S., Weinmann W. Quantitative determination of phosphatidylethanol in dried blood spots for monitoring alcohol abstinence. *Nature Protocols* 2021; 16(1): 283-308. doi: 10.1038/s41596-020-00416.
28. Петухов А. Е., Мельник Е. В., Надеждин А. В., Тетенова Е. Ю., Суханова А. М., Панкратенко Е. П., Кошкина Е. А. Разработка и валидация методики количественного определения фосфатидилэтанола в цельной крови. *Медицина – 2022*; (3): 1-12