

УДК 543.544.43:[547.6:612.46]

ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ 1-ГИДРОКСИПИРЕНА В МОЧЕ КАК БИОМАРКЕРА ВОЗДЕЙСТВИЯ ПОЛИЦИКЛИЧЕСКИХ АРОМАТИЧЕСКИХ УГЛЕВОДОРОДОВ

© 2020 г. А. Н. Алексеенко^{а, *}, О. М. Журба^а, А. В. Меринов^а, С. Ф. Шаяхметов^а

^аВосточно-Сибирский институт медико-экологических исследований
12-а микрорайон, 3, Ангарск, 665827 Россия

*e-mail: alexeenko85@mail.ru

Поступила в редакцию 01.10.2018 г.

После доработки 10.11.2018 г.

Принята к публикации 29.03.2019 г.

Разработана простая и чувствительная методика определения 1-гидроксипирена в моче как биологического маркера воздействия полициклических ароматических углеводородов. После ферментативного гидролиза для расщепления конъюгата аналит извлекали из матрицы жидкостно–жидкостной экстракцией *n*-гексаном, экстракт упаривали до сухого остатка и дериватизировали аналит силилирующим реагентом *N,O*-бис(триметилсилил)трифторацетамидом в триметилсилиловый эфир при комнатной температуре. Триметилсилильный экстракт анализировали капиллярной газовой хроматографией с масс-селективным детектированием. Количественное высокоточное определение достигнуто за счет использования изотопно-меченного стандарта 1-гидроксипирена-*d*9. Матричных эффектов не наблюдали. Предел обнаружения 0.02 нг/мл, линейный диапазон 0.1–100 нг/мл. Относительные стандартные отклонения в условиях повторяемости и внутрилабораторной прецизионности 0.044 и 0.064 соответственно. Процентная мера правильности 96–102%.

Ключевые слова: 1-гидроксипирен в моче, *N,O*-бис(триметилсилил)трифторацетамид, хромато-масс-спектрометрический анализ, изотопно-меченный стандарт.

DOI: 10.31857/S0044450220010028

Полициклические ароматические углеводороды (ПАУ), обладая высокой канцерогенной и мутагенной активностью, представляют серьезную угрозу здоровью человека и его потомству. В связи с высокой опасностью ПАУ в России и в большинстве других стран проводится мониторинг наиболее опасного бенз(а)пирена в объектах окружающей среды и в пищевых продуктах. Альтернативный способ оценки влияния ПАУ на человека основан на определении их метаболитов в биологических средах, однако его применяют только в развитых странах.

Концентрация остаточных, не превратившихся в метаболиты количеств ПАУ как в кровеносной системе, так и в моче человека настолько мала, что с трудом поддается измерению современными аналитическими методами. Зато уровень содержания некоторых метаболитов достаточно высок. Самой обычной и легкодоступной биологической средой при определении метаболитов ПАУ в организме человека является моча. В подавляющем случае ПАУ присутствуют в виде смесей, причем одним из основных компонентов по уровню концентрации является пирен. Метабо-

лит пирена 1-гидроксипирен – стабильное соединение, относительно легко и надежно определяемое в моче. На основании большого количества исследований можно с достаточной уверенностью признать 1-гидроксипирен адекватным биомаркером присутствия ПАУ в окружающей среде [1–3].

Для определения 1-гидроксипирена в моче применяют ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием [4]. Пробоподготовка включает предварительный ферментативный гидролиз β -глюкуронидазой при 37°C в течение 16 ч, твердофазную экстракцию (ТФЭ) на патроне C_{18} , упаривание элюата досуха и растворение остатка в метаноле. Предел обнаружения 0.1 нг/мл, нижняя граница определяемых содержаний 2 нг/мл при объеме пробы 10 мл, относительное стандартное отклонение s_r (воспроизводимость) 0.126, коэффициент корреляции градуировочного графика 0.990, процентная мера правильности $88 \pm 9\%$.

Другой подходящий метод определения 1-гидроксипирена в моче – газовая хроматография с масс-селективным детектированием (ГХ–МС) в режиме электронной ионизации (ЭИ) [5, 6]. Основ-

ное преимущество метода ГХ–МС по сравнению с ВЭЖХ – это лучшее разделение компонентов и возможность применения изотопно-меченного стандарта d9-1-гидроксипирен (дейтерированный стандарт). Для метода ГХ–МС 1-гидроксипирен, как и его дейтерированный аналог, необходимо дериватизировать, так как наличие ОН-группы обуславливает низкую летучесть, низкую чувствительность и может вызвать взаимодействие аналита с неподвижной фазой колонки. Наиболее распространенными реакциями дериватизации для веществ, содержащих гидроксильные группы, являются ацилирование и силилирование [7, 8]. В реакциях ацилирования соединения, содержащие подвижные атомы водорода, превращают в сложные эфиры при действии карбоновой кислоты или ее ангидридов. Из-за присутствия остаточных количеств кислоты продукты нельзя непосредственно вводить в газовый хроматограф, и требуется этап очистки. В реакциях силилирования подвижные атомы водорода заменяют триметилсилильной или *трет*-бутилдиметилсилильной группой [9]. Продукты этой реакции, как правило, более летучие и термически стабильные. В отличие от ацилирования, силилирование обычно не требует стадии очистки, и производные могут быть введены непосредственно в ГХ. Силилирование – наиболее распространенный метод дериватизации [9], а классическими реагентами для этого являются триметилхлорсилан (ТМХС), триметилэтилсилилимидазол, N-метилтриметилсилилтрифторацетамид, N,O-бис(триметилсил)трифторацетамид (БСТФА) и N-(*трет*-бутилдиметилсилил)-N-метилтрифторацетамид, из которых наиболее часто используют два последних [10].

Определение методом ГХ–МС включает следующие стадии [5, 6, 10]: ферментативный гидролиз β -глюкуронидазой при 37°C в течение 17–18 ч, ТФЭ, упаривание экстракта в токе азота, дериватизацию сухого остатка силилирующим реагентом БСТФА при 60°C в течение 40 мин, анализ методом ГХ–МС. Продолжительность разделения 40 мин. Предел обнаружения 0.5 нг/мл, предел определения 1 нг/мл при объеме пробы 3 мл, s , составляет 0.067–0.131, коэффициент корреляции градуировочного графика 0.995, процентная мера правильности 88.7%.

Цель настоящей работы – разработка методики определения 1-гидроксипирена в моче методом ГХ–МС с использованием изотопно-меченного стандарта. Для этого решали следующие задачи: повышение чувствительности определения за счет увеличения степени экстракции из биологической матрицы; значительное сокращение времени пробоподготовки за счет уменьшения продолжительности ферментативного гидролиза и дериватизации 1-гидроксипирена силилирующим реагентом БСТФА.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Оборудование. Газовый хроматограф Agilent 7890A с масс-селективным детектором Agilent 5975C (ЭИ), автоматическим дозатором Agilent 7693, капиллярной колонкой HP-5MS (30 м × 0.25 мм, 0.25 мкм). Блочный термостат Stuart (30–130°C), вибросмеситель Biosan, центрифуга Eppendorf 5804, система упаривания в токе азота.

Реактивы и стандарты. 1-Гидроксипирен (99.8%, Aldrich); 1-гидроксипирен-d9 (98.8%, Santa Cruz); ацетонитрил (Криохром); водный раствор β -глюкуронидазы Helix Pomatia H-2 (>85000 ед./мл, Aldrich); уксусно-ацетатный буферный раствор с pH 5; сульфат магния х. ч.; *n*-гексан (Криохром); БСТФА, содержащий 1% ТХМС (Fluka).

Пробоподготовка. К 2 мл мочи в центрифужной пробирке емк. 15 мл добавляли 20 мкл раствора 1-гидроксипирена-d9 в ацетонитриле (5 мкг/мл), 1 мл ацетатно-уксусного буферного раствора с pH 5, 20 мкл водного раствора β -глюкуронидазы и нагревали 1 ч при 55°C, затем раствор охлаждали в течение 20 мин до комнатной температуры, добавляли 0.5 г сульфата магния, 2 мл *n*-гексана и интенсивно встряхивали на вибросмесителе в течение 2 мин, разделяли фазы центрифугированием при 4000 об/мин в течение 10 мин, отделяли гексановый экстракт, перенося его во флакон емк. 5 мл с коническим дном, снова добавляли 2 мл *n*-гексана, повторяли процесс, экстракты объединяли. Экстракт упаривали досуха в небольшом токе азота при температуре водяной бани 60°C, затем к сухому остатку добавляли 100 мкл реагента БСТФА и выдерживали 5 мин, после чего переносили в стеклянную вставку в микрофлакон емк. 200 мкл и анализировали.

Хромато-масс-спектрометрия. Определение осуществляли в следующих условиях: температура испарителя 300°C; объем водимой пробы 1 мкл; режим ввода образца без деления потока 0.7 мин; линейная скорость в колонке 40 см/с; режим термостата колонки: выдержка при 60°C в течение 2 мин, подъем со скоростью 15 град/мин до 300°C, выдержка в течение 2 мин; температура интерфейса 290°C, ионного источника ЭИ 230°C, квадруполя 150°C; задержка включения нити накала 16.6 мин. Сбор хромато-масс-спектрометрической информации осуществляли в режиме мониторинга выделенных ионов с m/z 290, 275, 299, 284.

1-Гидроксипирен и 1-гидроксипирен-d9 в виде производных (триметилсиланов) идентифицировали на хроматограммах во времени удерживания и соотношению интенсивностей регистрируемых ионов (табл. 1).

Для количественного определения использовали метод внутреннего стандарта по растворам с концентрацией 1-гидроксипирена в моче с 0.1 до 100 нг/мл.

Таблица 1. Данные для идентификации на масс-хроматограммах 1-гидроксипирена и его изотопно-меченного стандарта

Соединение	Время удерживания, мин	m/z (основной)	m/z (подтверждающий)
1-Гидроксипирен-d9 (внутренний стандарт)	17.14	299 (100%)	284 (20 ± 5%)
1-Гидроксипирен	17.16	290 (100%)	275 (20 ± 5%)

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Силилирование N,О-бис(триметилсилил)трифторацетамидом. Сравнили силилирование 1-гидроксипирена реагентом БСТФА при комнатной температуре (20–25°C) и при 90°C и различной продолжительности реакции (табл. 2). Видно, что при силилировании температура и продолжительность реакции не оказывают значимого влияния на аналитический сигнал, особенно если в качестве последнего выступает относительная площадь (высота) пика. Силилирование достаточно проводить при комнатной температуре в течение 5 мин с изотопно-меченным стандартом, при этом значение s_T минимально.

Выбор способа извлечения 1-гидроксипирена из пробы мочи. Установлено, что при ТФЭ степень извлечения 1-гидроксипирена из мочи составляет 8%, а при жидкостно–жидкостной экстракции (ЖЖЭ) *n*-гексаном – около 90% (табл. 3).

Несмотря на то, что ТФЭ – более современный способ экстрагирования по сравнению с ЖЖЭ, степень извлечения аналита ТФЭ очень низкая. Это можно объяснить главным образом тем, что в образце мочи присутствует большое количество полярных соединений, содержащих в своем составе ОН–, СООН–, NH=, –NH₂-группы, причем в больших концентрациях, чем аналит. Эти компоненты оказывают мешающее влияние при силилировании 1-гидроксипирена реагентом БСТФА, поэтому в реакцию силилирования вступает очень малое количество 1-гидроксипирена. При ЖЖЭ гексаном извлекаются соединения неполярной или малополярной природы, которые не мешают дериватизации. Оптимальным способом извлечения 1-гидроксипирена из биологической матрицы является двукратная ЖЖЭ гексаном.

Выбор условий жидкостно–жидкостной экстракции 1-гидроксипирена с помощью математического планирования. Основными факторами, влияющими на эффективность ЖЖЭ, являются тип экстрагента, продолжительность экстракции, число экстракций, природа и количество высаливающего агента. Установлено, что *n*-гексан является более эффективным экстрагентом, чем диэтиловый эфир и толуол, благодаря снижению мешающих влияний при дериватизации. В качестве высаливающего агента лучше применять

сульфат магния, а не сульфат натрия, так как он обеспечивает более высокую степень извлечения аналита. С помощью математического планирования [11] оптимизировали следующие количественные параметры ЖЖЭ 1-гидроксипирена: массу сульфата магния, продолжительность экстракции, кратность экстракции (табл. 4).

В многофакторном эксперименте одновременно варьировали три фактора. Матрица планирования состояла из 8 опытов. За параметр оптимизации у приняли степень экстракции аналита. Каждый опыт в матрице планирования (табл. 5) повторяли трижды.

Статистическим путем получили уравнение:

$$y = 84 + 8x_3 + 2.07x_1x_2 - 2x_1x_2x_3. \quad (1)$$

Из уравнения (1) видно, что кратность экстракции (x_3) вносит больший вклад в формирование отклика (степень экстракции), чем масса сульфата магния и время экстракции (встряхивание в вибросмесителе). Степень экстракции аналита выше при двукратной экстракции вследствие увеличения концентрации аналита в органической фазе. Подставляя в уравнение кодированные значения факторов, рассчитали теоретические значения параметра оптимизации, которые показывают, что степень экстракции не меняется (табл. 6). Следовательно, нет смысла увеличивать массу

Таблица 2. Зависимость степени дериватизации 1-гидроксипирена реагентом N,О-бис(триметилсилил)трифторацетамидом от времени реакции и температуры

Время реакции, мин	$S_{\text{абс}}^*$		$S_{\text{отн}}^{**}$	
	20–25°C	90°C	20–25°C	90°C
5	3150	3492	0.38	0.34
30	3039	3065	0.39	0.36
45	3419	3174	0.37	0.33
s_T	0.061	0.068	0.026	0.044

* $S_{\text{абс}}$ – абсолютное значение площади пика триметилсилового эфира 1-гидроксипирена.

** $S_{\text{отн}}$ – отношение площадей пиков триметилсилового эфира 1-гидроксипирена и 1-гидроксипирена-d9.

Таблица 3. Извлечение 1-гидроксипирена из водной и биологической матриц разными способами

Способ извлечения	Матрица	Условия	R, %
ТФЭ	Моча	Сорбент C ₁₈ , элюент – метанол	8
	Вода		88
ЖЖЭ	Моча	Двукратная экстракция гексаном	90

Таблица 4. Условия планирования трехфакторного эксперимента

Фактор	Нулевой уровень x_0	Интервал варьирования J	Нижний уровень фактора	Верхний уровень фактора
x_1 – масса MgSO ₄ , г	0.5	0.5	0	1
x_2 – время встряхивания, мин	3	2	1	5
x_3 – кратность экстракции (качественный фактор)	–	–	1	2

Таблица 5. Матрица планирования для проведения трехфакторного эксперимента и полученные значения параметра оптимизации

№ опыта	Факторы						Параметр оптимизации y_j ($n = 3$)
	натуральные			кодированные			
	x_1	x_2	x_3	x_1	x_2	x_3	
1	0	1	1	–	–	–	80.3
2	1	1	1	+	–	–	73.2
3	0	5	1	–	+	–	71.6
4	1	5	1	+	+	–	80.0
5	0	1	2	–	–	+	93.0
6	1	1	2	+	–	+	93.4
7	0	5	2	–	+	+	89.8
8	1	5	2	+	+	+	90.2

сульфата магния x_1 и время экстракции x_2 . Массу сульфата магния целесообразно зафиксировать на нулевом уровне, а время экстракции уменьшить до 2 мин. Таким образом, оптимальные условия ЖЖЭ 1-гидроксипирена из мочи следующие: масса сульфата магния 0.5 г, время экстракции 1–2 мин, двукратная экстракция.

Ферментативный гидролиз. В табл. 7 приведены результаты анализа реальных образцов мочи работников алюминиевого производства с использованием двух вариантов гидролиза β -глюкуронидазой. Видно, что концентрации 1-гидроксипирена, полученные двумя способами, различаются не сильно. Во втором варианте концентрации аналита выше, поэтому ферментативный гидролиз β -глюкуронидазой лучше проводить при 55°C в течение 60 мин.

Валидация методики. Оценены предел обнаружения, предел определения, линейный диапазон, повторяемость, внутрिलाбораторная прецизионность, правильность, матричный эффект, селективность [12].

Таблица 6. Условия постановки опытов и теоретические значения параметра оптимизации

№ опыта	Натуральные значения факторов			Кодированные значения факторов			y
	x_1	x_2	x_3	x_1	x_2	x_3	
							92.0
1	0.5	1	2	0	–1	1	92.0
2	0.5	2	2	0	–0.5	1	92.0
3	0.5	3	2	0	0	1	92.0
4	0.5	4	2	0	0.5	1	92.0
5	0.5	5	2	0	1	1	92.0
6	0.6	3	2	0.20	0	1	92.0
7	0.8	3	2	0.60	0	1	92.0
8	1	3	2	1.00	0	1	92.0

Таблица 7. Концентрация (нг/мл) 1-гидроксипирена в моче работников алюминиевого производства при разных вариантах ферментативного гидролиза β-глюкуронидазой

№ образца мочи	Условия ферментативного гидролиза β-глюкуронидазой	
	37°C, 16 ч	55°C, 1 ч
1	0.5	0.6
2	1.2	1.5
3	2.7	2.9
4	2.4	2.5
5	34.5	39
6	0.83	0.96
7	0.31	0.35
8	22.3	25

Предел обнаружения, рассчитанный для соотношения сигнал/шум ≥ 3 , составил 0.02 нг/мл, предел определения (соотношение сигнал/шум ≥ 10) – 0.1 нг/мл. Линейный диапазон установили по 6 модельным образцам мочи с разными концентрациями 1-гидроксипирена (0.1, 2, 10, 20, 40, 100 нг/мл), коэффициент корреляции $r > 0.999$. Приемлемое значение r не ниже 0.990. Таким образом, линейный диапазон составил от 0.1 до 100 нг/мл. Точность (прецизионность и правильность) оценивали для 4 образцов мочи с добавками аналита 0.5, 2, 20 и 40 нг/мл, каждый образец анализировали дважды в течение пяти дней. По результатам анализа рассчитывали значения s_r (повторяемость и внутрилабораторная прецизионность) и процентную меру правильности как отношение значений найденной и введенной концентрации (табл. 8). Все отношения, лежащие в диапазоне от 96.5 до 102% от номинальной концентрации определяемого вещества, соответство-

вали приемлемому критерию ($100 \pm 7\%$). Значения повторяемости и внутрилабораторной прецизионности удовлетворяют приемлемым критериям (не выше 12%). Введенные концентрации попадают в доверительные интервалы найденных значений.

Матричный эффект оценивали как относительное смещение $b_{МЭ}$, сравнивая относительные сигналы аналита, введенного в органический растворитель ($S_{отн, р}$) и в образец мочи ($S_{отн, м}$) (табл. 9). Расчет осуществляли по следующей формуле:

$$b_{МЭ} = |S_{отн, м} - S_{отн, р}| \times 100 / S_{отн, р} \quad (2)$$

Максимальный матричный эффект составил 3.9%.

На рис. 1 приведены масс-хроматограммы холостого образца и трех образцов с разными концентрациями 1-гидроксипирена (0.1, 0.5, 39 нг/мл) (рис. 1). Пик триметилсилил-1-гидроксипирена узкий (полуширина пика 1.5 с), симметричный, мешающие пики отсутствуют. Следовательно, достигнута высокая селективность определения. Значение s_t измерения времен удерживания составляет 0.027.

Разработанная методика количественного определения 1-гидроксипирена в моче апробирована на образцах мочи работников (31 человек) производства алюминия. Содержание аналита в моче составляло от 0.1 до 263 нг/мл. Проанализированы также образцы мочи работников других производств (14 человек), где в воздушной среде отсутствуют ПАУ; концентрации 1-гидроксипирена находились в интервале от 0.08 до 0.9 нг/мл.

* * *

Таким образом, применение данной методики позволило снизить продолжительность анализа за счет уменьшения времени ферментативного гидролиза и дериватизации 1-гидроксипирена по сравнению с известными методиками. Также достигнуты высокая точность определения за счет использования изотопно-меченного

Таблица 8. Прецизионность и правильность определения 1-гидроксипирена в моче ($P = 0.95$)

Введено, нг/мл	Найдено, нг/мл	Внутрилабораторная прецизионность, s_r ($n = 5$)	Повторяемость, s_r ($n = 2$)	Правильность, %
0.5	0.51 ± 0.04	0.063	0.044	102
2	1.9 ± 0.1	0.064	0.010	97
20	19 ± 1	0.064	0.017	96.5
40	40 ± 3	0.060	0.039	99.3

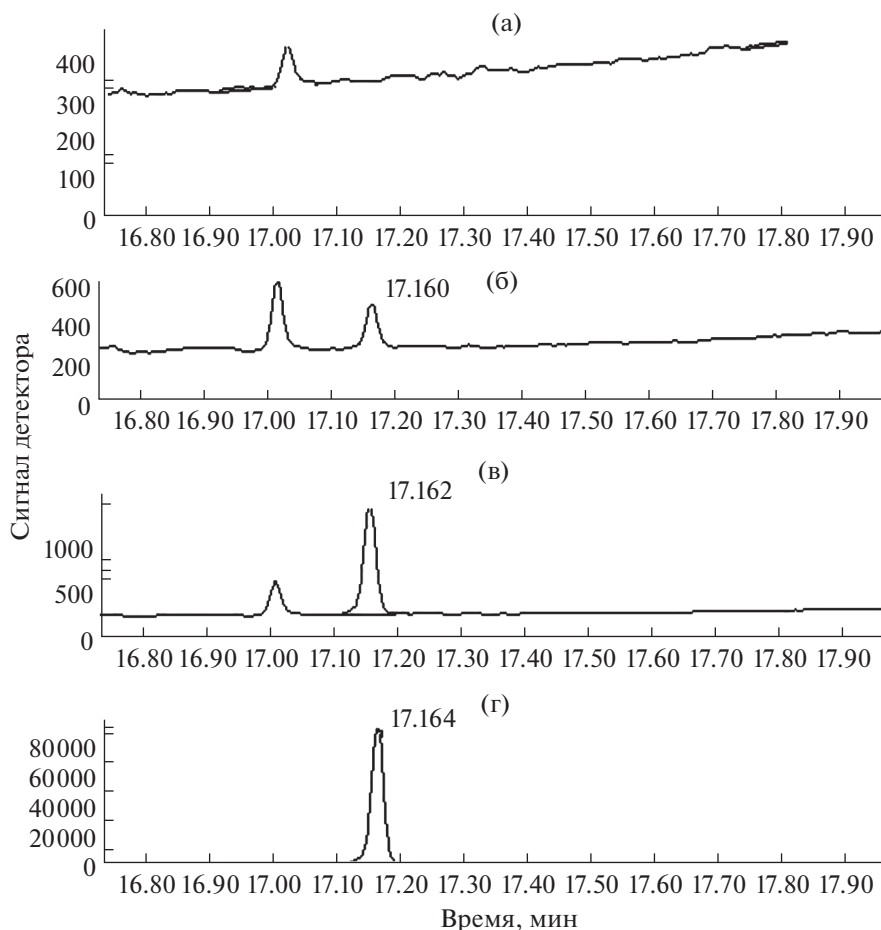


Рис. 1. Масс-хроматограммы (при m/z 290) холостого образца (а), образцов мочи с концентрацией 1-гидроксипирена 0.1 нг/мл (б), 0.5 нг/мл (в), образца мочи работника, подвергнувшегося воздействию ПАУ (концентрация 1-гидроксипирена 39 нг/мл) (г).

Таблица 9. Матричный эффект при определении 1-гидроксипирена

№ образца	Количество 1-гидроксипирена, нг	$S_{\text{отн, р}}$	$S_{\text{отн, м}}$	$b_{\text{МЭ}}, \%$
1	0.4	0.00417	0.00423	1.6
2	4	0.0409	0.0415	1.5
3	20	0.219	0.210	3.9
4	40	0.435	0.446	2.66

стандарта 1-гидроксипирена-d9 и повышение чувствительности определения за счет увеличения степени экстракции из биологической матрицы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Jongeneelen F.J., Boss R.P., Anizon R.B., Theuws J.L., Henderson P.T.* Biological monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons metabolites in urine // *Scand. J. Work Environ. Health.* 1986. V. 12. P. 137.
- Jurgen J., Albrecht S.* Biomonitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons in human urine // *J. Chromatog. B.* 2002. V. 778. P. 31.
- Rossella F., Campo L., Pavanello S., Kapka L., Sivinska E., Fustinoni S.* Urinary polycyclic aromatic hydrocarbons and metabolites as biomarkers of exposure in coke oven workers // *Occup. Environ. Med.* 2009. V. 66. P. 509.
- Jongeneelen F.J., Anzion R.B.M., Henderson P.T.* Determination of hydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine // *J. Chromatog.* 1987. V. 413. P. 227.
- Campo L., Rossella F., Fustinoni S.* Development of a gas chromatography/mass spectrometry method to quantify several urinary monohydroxy metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in occupationally exposed subjects // *J. Chromatog. B.* 2008. V. 875. P. 531.
- Ho-Sang Shin, Hyun-Hee Lim.* Simultaneous determination of 2-naphtol and 1-hydroxypyrene in urine by gas chromatography-mass spectrometry // *J. Chromatog. B.* 2011. V. 879. P. 489.

7. *Blau K., Halket J.M.* Handbook of Derivates for Chromatography. 2nd ed., New-York: Wiley, 1993. 369 p.
8. *Knapp D.R.* Handbook of Analytical Derivatization Reaction. New-York: Wiley, 1979. 741 p.
9. *Pierce A.E.* Silylation of Organic Compounds. Rockford, Illinois: Pierce chemical Co., 1968. 487 p.
10. *Schummer C., Delhomme O., Appenzeller B.M.R.* Comparison of MTBSTFA and BSTFA in derivatization reaction of polar compounds prior to GC/MS analysis // *Talanta*. 2009. V. 77. P. 1473.
11. *Смагунова А.Н., Пашкова Г.В., Бельх Л.И.* Математическое планирование эксперимента в методических исследованиях аналитической химии. Иркутск: Изд-во ИГУ, 2015. 137 с.
12. Guideline on bioanalytical method validation, Europe medicinal agency. 2011. www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf (21.07.2011).