

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Алексеевко А.Н., Журба О.М., Меринов А.В., Шаяхметов С.Ф.

Оптимизация условий пробоподготовки с помощью математического планирования для определения 1-гидроксипирена в моче методом газовой хромато-масс-спектрометрии

ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований»,
665827, Ангарск

Введение. Для оценки воздействия ПАУ на человека наибольшее распространение получил биологический мониторинг 1-гидроксипирена. Определение 1-гидроксипирена в моче осуществляется с помощью газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС).

Материал и методы. Пробоподготовка заключается в извлечении аналита из биологической матрицы методом 2-кратной жидкостной экстракции гексаном, упаривании экстракта до сухого остатка в токе азота, перерастворении сухого остатка в силилирующем агенте БСТФА. В работе использовали газовый хроматограф Agilent 7890A с капиллярной колонкой HP-5MS и масс-селективным детектором. Идентифицировали 1-гидроксипирен в виде производного (триметилсилана) на масс-хроматограмме по времени удерживания и соотношению интенсивностей регистрируемых ионов.

Результаты. Оптимизацию условий жидкостной экстракции 1-гидроксипирена осуществляли с помощью математического планирования, варьируя массу сульфата магния, время экстракции, кратность экстракции. Матрица планирования включала в себя восемь опытов, в качестве параметра оптимизации служила степень извлечения 1-гидроксипирена. Интерпретация модели показала, что кратность экстракции вносит больший вклад в формирование степени извлечения, чем масса сульфата магния и время экстракции.

Заключение. Выбор оптимальных условий жидкостной экстракции 1-гидроксипирена методом математического планирования позволил оптимизировать методику определения данного аналита в моче методом ГХ-МС для проведения биологического мониторинга.

К л ю ч е в ы е с л о в а : 1-гидроксипирен в моче; газовая хромато-масс-спектрометрия; математическое планирование; оптимальные условия; жидкостная экстракция

Для цитирования: Алексеевко А.Н., Журба О.М., Меринов А.В., Шаяхметов С.Ф. Оптимизация условий пробоподготовки с помощью математического планирования для определения 1-гидроксипирена в моче методом газовой хромато-масс-спектрометрии. *Гигиена и санитария*. 2020; 99 (10): 1153-1158. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2020-99-10-1153-1158>

Для корреспонденции: Алексеевко Антон Николаевич, канд. хим. наук, ст. науч. сотр. лаб. аналитической экотоксикологии и биомониторинга, ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований», 665827, Ангарск. E-mail: alexeeenko85@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена в рамках средств, выделяемых для выполнения государственного задания ФГБНУ ВСИМЭИ.

Участие авторов: концепция и дизайн исследования, утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи; написание текста – Алексеевко А.Н.; редактирование, обсуждение результатов – Журба О.М.; проведение аналитических исследований с применением газовой хромато-масс-спектрометрии – Меринов А.В.; организация исследований, обоснование программы исследований – Шаяхметов С.Ф.

Поступила 10.07.2020

Принята к печати 18.09.2020

Опубликована 30.11.2020

Anton N. Alekseenko, Olga M. Zhurba, Alexey V. Merinov, Salim F. Shayakhmetov

Optimization of conditions for the sample preparation using mathematical planning for determination of 1-hydroxypyrene in urine using method of gas chromatography-mass spectrometry

East-Siberian Institute of Medical and Ecological Research, Angarsk, 665827, Russian Federation

Introduction. Biological monitoring of 1-hydroxypyrene is the most widely used method for evaluating the effects of PAHs on humans. The determination of 1-hydroxypyrene in urine is performed using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS).

Material and methods. Sample preparation consists of extracting the analyte from the biological matrix by 2-fold liquid extraction with hexane, evaporation the extract to the dry residue in the nitrogen current, and re-dissolution of the dry residue in the silylating agent BSTFA. We used gas chromatograph Agilent 7890A with an HP-5MS capillary column and a mass-selective detector. 1-hydroxypyrene was identified as trimethyl silane on a mass chromatogram based on the retention time and intensity ratio of the registered ions.

Results. Optimization of the conditions for liquid extraction of 1-hydroxypyrene was performed using mathematical planning, varying the mass of magnesium sulfate, the extraction time, and the extraction multiplicity. The planning matrix included eight experiments, and the degree extraction of 1-hydroxypyrene was used as an optimization parameter. Interpretation of the model showed the multiplicity of extraction to contribute more to the formation of the degree of extraction than the mass of magnesium sulfate and the extraction time.

Discussion. The proposed method for the sample preparation, based on the extraction of 1-hydroxypyrene by 2-fold liquid extraction with hexane for 2 min with the addition of 0.5 g of magnesium sulfate to the biological sample, allowed reaching the detection limit of 0.1 ng/ml. The evaluation of metrological characteristics showed RSD of the reproducibility to do not exceed 6.4%, the systematic error is not significant, and the accuracy index in the form of a total error is not higher than 15%. Levels of 1-hydroxypyrene in the urine of aluminum production workers are 53 – 414 times higher than in the control group.

Conclusion. The choice of optimal conditions for liquid extraction of 1-hydroxypyrene by mathematical planning allowed developing a method for the determination of this analyte in urine by GC-MS for biological monitoring.

К е y w o r d s : 1-hydroxypyrene in urine; gas chromatography-mass spectrometry; mathematical planning; optimal conditions; liquid extraction

For citation: Alekseenko A.N., Zhurba O.M., Merinov A.V., Shayakhmetov S.F. Optimization of conditions for the sample preparation using mathematical planning for determination of 1-hydroxypyrene in urine using method of gas chromatography-mass spectrometry. *Gigiena i Sanitaria (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2020; 99 (10): 1153-1158. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2020-99-10-1153-1158> (In Russ.)

For correspondence: Anton N. Alekseyenko, MD, Ph.D., senior research, Laboratory of analytical ecotoxicology and biomonitoring of the East-Siberian Institution of Medical and Ecological Research, Angarsk, 665827, Russian Federation. E-mail: labchem99@gmail.com

Information about the authors:

Alekseenko A.N., <https://orcid.org/0000-0003-4980-5304>; Zhurba O.M., <https://orcid.org/0000-0002-9961-6408>; Merinov A.V., <https://orcid.org/0000-0001-7848-6432>; Shayakhmetov S.F., <https://orcid.org/0000-0001-8740-3133>

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgment. The work was performed within the funds allocated for the Siberian Institute of Medical and Ecological Research

Contribution: Alekseenko A.N. – concept and design of the study, approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article; writing a text; Zhurba O.M. – editing, discussion of the results; Merinov A.V. – analytical studies using gas chromatography-mass spectrometry; Shayakhmetov S.F. – organization of research, justification of the research program. All coauthors – approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article.

Received: July 10, 2020

Accepted: September 18, 2020

Published: November 30, 2020

Введение

Полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) – это класс химических веществ, образующихся при неполном сгорании широкого спектра материалов, таких как уголь, масла, древесина и мусор, и оказывающие неблагоприятное воздействие на здоровье человека. Источниками воздействия ПАУ на окружающую среду и людей являются промышленные предприятия, использующие продукты, полученные из угля, дёгтя или креозота, например, производство алюминия, литьё железа и стали, производство кокса; автомобильный транспорт и т. д. [1–6].

Для более полной оценки величины воздействия для здоровья человека помимо контроля за содержанием ПАУ в воздухе и других объектах окружающей среды необходим анализ содержания самих ПАУ или их метаболитов в биологических образцах (биомониторинг). Одним из главных преимуществ биологического мониторинга является то, что этот метод учитывает поступление веществ в организм всеми возможными путями (ингаляционный, пероральный и т. д.). Показатели биомониторинга свидетельствуют об уровнях токсикантов, которые уже действительно поступили в организм и оказывают на него воздействие [2, 7].

ПАУ, попадая в организм, на первом этапе превращаются в арен-оксиды, которые затем переходят в фенолы или дигидродиолы. Фенолы и дигидродиолы экскретируют в мочу в виде водорастворимых сульфатов глюкуронидов [8]. По данным из различных литературных источников, для оценки воздействия ПАУ на человека наибольшее распространение получил биологический мониторинг их гидроксиглированных метаболитов, в особенности мониторинг 1-гидроксипирена [9–21]. В качестве анализируемого объекта при оценке текущего воздействия используется моча. По данным литературы, определение 1-гидроксипирена в моче осуществляется с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) или газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС) [22–26]. Пробоподготовка заключается в предварительном ферментативном гидролизе, извлечении аналита из биологической матрицы твёрдофазной или жидкостной экстракцией, упаривании экстракта до сухого остатка, который перерастворяют в ацетонитриле (для ВЭЖХ) или силилирующем агенте БСТФА (для ГХ-МС). Главное преимущество метода ГХ-МС по сравнению с ВЭЖХ – это высокая эффективность и селективность разделения компонентов на колонке и возможность применения дейтерированного стандарта 1-гидроксипирена-d9. Основным недостатком метода

ГХ-МС является недостаточная чувствительность при определении 1-гидроксипирена у лиц, не подвергающихся воздействию ПАУ, вследствие неполного отражения вопросов выбора оптимальных условий извлечения из биологической матрицы.

Предметом изучения в этой работе явилось повышение чувствительности и точности определения за счёт осуществления выбора оптимальных условий извлечения 1-гидроксипирена с помощью математического планирования.

Цель исследования – применить математическое планирование при выборе оптимальных условий жидкостной экстракции 1-гидроксипирена из биологической пробы мочи.

Материал и методы

Измерительная аппаратура: в работе использовали газовый хроматограф Agilent 7890A с масс-селективным детектором Agilent 5975, капиллярной колонкой HP-5 MS (30 м • 0,25 мм • 0,25 мкм), жидкостным автосамплером Agilent 7693.

Вспомогательное оборудование: водяной термостат с системой упаривания в токе азота, мультвортекс, центрифуга модели 5804 Eppendorf.

Реагенты: 1-гидроксипирен (99,8%, Aldrich), 1-гидроксипирен-d9 (99,9% Santa-Cruz), ацетонитрил (Криохром), ацетатный буфер с pH 5, водный раствор β-глюкуронидазы (85 000 ед./мл, Aldrich), сульфат магния (х.ч.), n-гексан (Криохром), N, O-бис(триметилсилил) трифторацетамид БСТФА (Fluka).

Приготовление модельных растворов. Растворы 1-гидроксипирена в ацетонитриле с концентрациями 0,1; 2; 10; 20; 40 мкг/мл готовили из исходного раствора 1-гидроксипирена в ацетонитриле 100 мкг/мл. Растворы 1-гидроксипирена в моче с концентрациями 0,1; 2; 10; 20; 40; 100 нг/мл готовили в мерных колбах (25 мл) добавлением аликвот (25 мкл) растворов 1-гидроксипирена в ацетонитриле (0,1; 2; 10; 20; 40; 100 мкг/мл) в усреднённую мочу лиц, не контактирующих с ПАУ. Растворы производного 1-гидроксипирена в БСТФА готовили добавлением аликвот (2 мкл) растворов 1-гидроксипирена в ацетонитриле в (реагент для дериватизации БСТФА (100 мкл).

Методика анализа. В центрифужную пробирку вместимостью 15 мл вносили 2 мл исследуемого образца мочи, 20 мкл раствора 1-гидроксипирена-d9 (5 мкг/мл), 1 мл ацетатного буфера с pH 5, 20 мкл водного раствора β-глюкуронидазы, далее осуществляли процесс по следующей последовательности (рис. 1).



Рис. 1. Последовательность определения 1-гидроксипирена в моче.

ГХ-МС анализ осуществляли в следующих условиях. Температура испарителя 300 °С, вводимый объём 1 мкл, ввод образца без деления потока, длительность 0,7 мин, продувка 40 мл/мин, поток гелия через колонку 1,2 мл/мин, режим термостата колонки программировали от 60 °С с выдержкой 2 мин, затем подъём со скоростью 15 °С/мин до 300 °С с выдержкой 2 мин, температура интерфейса 290 °С, задержка растворителя 16 мин. Регистрировали масс-хроматограммы в режиме мониторинга выбранных ионов SIM по отношению масса-заряд m/z 290, 275.

Идентифицировали 1-гидроксипирен в виде триметилсилана (ТМС) на масс-хроматограмме по времени удерживания ($t_R = 17,2$ мин) и соотношению интенсивностей регистрируемых ионов (рис. 2).

Количественное определение в модельном образце мочи (2 нг/мл) проводили способом абсолютной градуировки по растворам 1-гидроксипирена дериватизированного с помощью БСТФА в диапазоне от 2 до 2000 нг/мл без пробоподготовки. Градуировочный график строили как зависимость высоты пика производного 1-гидроксипирена от его концентрации в БСТФА (нг/мл).

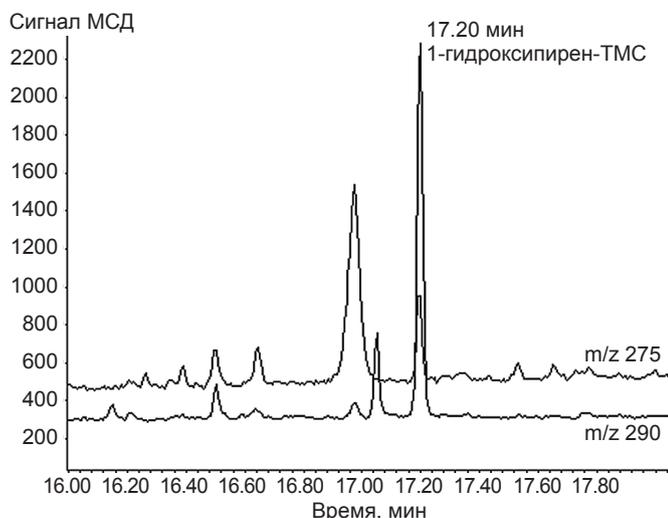


Рис. 2. Масс-хроматограмма модельного раствора 1-гидроксипирена в моче.

Таблица 1

Условия планирования 3-факторного эксперимента

Фактор	Нулевой уровень	Интервал варьирования	Нижний уровень фактора	Верхний уровень фактора
	x_0	J		
x_1 – масса $MgSO_4$, г	0,5	0,5	0	1
x_2 – время экстракции, мин	3,0	2,0	1	5
x_3 – кратность экстракции (качественный фактор)	–	–	1	2

Количественное определение в натуральных образцах мочи осуществляли способом внутреннего стандарта по модельным растворам 1-гидроксипирена в моче в диапазоне 0,1–100 нг/мл. Градуировочный график строили как зависимость отношения высоты пика производного 1-гидроксипирена к высоте пика производного 1-гидроксипирена-d9 от отношения концентрации 1-гидроксипирена к концентрации 1-гидроксипирена-d9. Оптимизация условий жидкостно-жидкостной экстракции 1-гидроксипирена с помощью математического планирования проходила следующие этапы: выбор подобласти факторного пространства, получение матрицы планирования, определение коэффициентов математической модели, статистическая обработка опытных данных с использованием программы Microsoft Excel, оценка адекватности математической модели, интерпретация модели, расчёт мысленных опытов [27–29].

Результаты

К важным факторам жидкостной экстракции, оказывающим влияние на степень извлечения 1-гидроксипирена из биологической пробы, следует отнести природу экстрагента, время экстракции, кратность экстракции, количество высаливающего агента. Экстрагентом служил гексан. В качестве высаливающего агента применяли сульфат магния. С помощью математического планирования выбрали следующие количественные факторы: масса сульфата магния, время экстракции, кратность экстракции (табл. 1).

Осуществили постановку эксперимента при одновременном варьировании данных трёх факторов по заданному плану. Матрица планирования включала в себя 8 опытов, так как число варьируемых факторов составляет 3. Каждый опыт матрицы провели 3 раза (табл. 2). В качестве параметра оптимизации у служила степень извлечения 1-гидроксипирена. Опытным образцом служил раствор 1-гидроксипирена в моче с концентрацией 2 нг/мл без добавки внутреннего

Таблица 2

Матрица планирования 3-факторного эксперимента ЖЖЭ 1-гидроксипирена

№ опыта	Фактор						Степень извлечения y , $n = 3$
	натуральный			кодированный			
	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

Таблица 3

Расчёт и оценка значимости коэффициентов математической модели

Коэффициент математической модели	Вывод
$a_0 = (y_1 + y_2 + y_3 + y_4 + y_5 + y_6 + y_7 + y_8) = 84$	Значим ($ a > \Delta a$)
$a_1 = (-y_1 + y_2 - y_3 + y_4 - y_5 + y_6 - y_7 + y_8) = 0,26$	Незначим ($ a < \Delta a$)
$a_2 = (-y_1 - y_2 + y_3 + y_4 - y_5 - y_6 + y_7 + y_8) = -1,03$	Незначим ($ a < \Delta a$)
$a_3 = (-y_1 - y_2 - y_3 - y_4 + y_5 + y_6 + y_7 + y_8) = 8$	Значим ($ a > \Delta a$)
$a_{12} = (y_1 - y_2 - y_3 + y_4 + y_5 - y_6 - y_7 + y_8) = 2,07$	Значим ($ a > \Delta a$)
$a_{13} = (y_1 - y_2 + y_3 - y_4 - y_5 + y_6 - y_7 + y_8) = -0,07$	Незначим ($ a < \Delta a$)
$a_{23} = (y_1 + y_2 - y_3 - y_4 - y_5 - y_6 + y_7 + y_8) = -0,56$	Незначим ($ a < \Delta a$)
$a_{123} = (-y_1 + y_2 + y_3 - y_4 + y_5 - y_6 - y_7 + y_8) = -2,0$	Значим ($ a > \Delta a$)

стандарта – 1-гидроксипирена-d9. Степень извлечения (y), %, рассчитывали по формуле:

$$y = \frac{C_{п} \cdot V_{БСТФА}}{C_{т} \cdot V_{пробы}} \cdot 100, \quad (1)$$

где $C_{п}$ – измеренная концентрация производного 1-гидроксипирена в БСТФА, нг/мл; $V_{БСТФА}$ – объём реагента БСТФА, мл; $C_{т}$ – теоретическая концентрация 1-гидроксипирена, нг/мл; $V_{пробы}$ – объём пробы мочи взятого на анализ, мл.

Провели расчёт дисперсий воспроизводимости $S^2_{в}$ для каждого опыта и оценили их однородность по критерию Кохрена ($G < G_{таб}$). Затем рассчитали среднюю дисперсию $S^2_{в}$ и стандартное отклонение $S_{в}$ и доверительный интервал Δa . Число степеней свободы составило 16.

Из средних значений степени извлечения рассчитали 8 коэффициентов (a) математической модели с обязательным учётом знака кодированных значений факторов. Оценили значимость коэффициентов, сравнивая их с доверительным интервалом $\Delta a = 1,7$. При условии $|a| < \Delta a$ сделали вывод, что коэффициент не значим, то есть приняли его равным нулю (табл. 3).

Статистическим путём получили следующую математическую модель, описываемую уравнением:

$$y = 84 + 8x_3 + 2,07x_1x_2 - 2x_1x_2x_3 \quad (2)$$

Оценили адекватность математической модели, сравнив дисперсию адекватности $S^2_{ад}$, характеризующую расхождение между экспериментальными (y_i) и теоретическими значениями (y_j) степени извлечения с дисперсией воспроизводимости ($S^2_{в}$) (табл. 4).

Таблица 4

Оценка адекватности математической модели

№ опыта	x_0	x_3	x_{12}	x_{123}	y_i	y_j	$S^2_{ад}$	$S^2_{в}$	Вывод
1	+	-	+	-	80,25	80,1	9,56	14,56	$S^2_{ад} < S^2_{в}$
2	+	-	-	+	73,23	71,9	9,56	14,56	$S^2_{ад} < S^2_{в}$
3	+	-	-	+	71,63	71,9	9,56	14,56	$S^2_{ад} < S^2_{в}$
4	+	-	+	-	80,01	80,1	9,56	14,56	$S^2_{ад} < S^2_{в}$
5	+	+	+	+	92,98	92,1	9,56	14,56	$S^2_{ад} < S^2_{в}$
6	+	+	-	-	93,40	91,9	9,56	14,56	$S^2_{ад} < S^2_{в}$
7	+	+	-	-	89,84	91,9	9,56	14,56	$S^2_{ад} < S^2_{в}$
8	+	+	+	+	90,18	92,1	9,56	14,56	$S^2_{ад} < S^2_{в}$

Таблица 5

Теоретические значения степени извлечения

№ опыта	Фактор						Теоретическое значение степени извлечения
	натуральный			кодированный			
	x_1	x_2	x_3	x_1	x_2	x_3	
1	0,5	1	2	0	-1,0	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	1,0	1	92,0
6	0,6	3	2	0,2	0	1	92,0
7	0,8	3	2	0,6	0	1	92,0
8	1	3	2	1,0	0	1	92,0

Поскольку $S^2_{ад} < S^2_{в}$, следовательно, математическая модель, описываемая уравнением (1), адекватно описывает процесс жидкостно-жидкостной экстракции при извлечении 1-гидроксипирена из биоматрицы гексаном.

Опираясь на уравнение (2), дали толкование жидкостно-жидкостной экстракции 1-гидроксипирена гексаном. Кратность экстракции (x_3) вносит больший вклад в формирование степени извлечения, чем масса сульфата магния и время экстракции. Степень извлечения 1-ОНР выше при двукратной экстракции вследствие увеличения концентрации определяемого вещества в гексановом экстракте. Если подставить в уравнение кодированные значения факторов, то можно рассчитать теоретические значения параметра оптимизации, которые показывают, что степень извлечения не меняется (табл. 5).

Отсюда следует, что увеличивать массу сульфата магния x_1 и время экстракции x_2 нет смысла. Таким образом, осуществление математического планирования и получение математической модели (2) помогли точно подобрать следующие оптимальные условия жидкостно-жидкостной экстракции 1-гидроксипирена из биологической пробы: масса сульфата магния 0,5 г, время экстракции 2 мин, число экстракций – 2.

Обсуждение

Известные ГХ-МС методики определения 1-гидроксипирена в моче основаны на извлечении данного анализа жидкостной экстракцией с последующим упариванием экстракта до сухого остатка, дериватизацией силилирующим агентом БСТФА с последующим ГХ-МС анализом. Предел обнаружения составляет от 0,5 до 1 нг/мл. Существенным недостатком вышеупомянутых методик являются высокие пределы обнаружения, по которым нельзя определить 1-гидроксипирен в моче лиц, не работающих на производствах с экспозицией ПАУ. Предложенный авторами вариант пробоподготовки, основанный на извлечении 1-гидроксипирена 2-кратной жидкостной экстракцией гексаном в течение 2 мин с добавкой 0,5 г сульфата магния в биологическую пробу, позволил достичь предела обнаружения 0,1 нг/мл.

Линейность градуировочного графика в диапазоне от 0,1 до 100 нг/мл, характеризуемая коэффициентом корреляции r , составила 0,999. Оценка метрологических характеристик^{1,2} [30] показала, что СКО воспроизводимости

¹ РМГ 61-2010. Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки. М.: Стандартинформ. 2013.

² РМГ 76-2014. ГСИ. Внутренний контроль качества результатов количественного химического анализа. М.: Стандартинформ. 2016.

не превышает 6,4%, систематическая погрешность незначима, так как $t_{расч} < t_{таб}(0,95; 4) = 2,8$, показатель точности в виде суммарной погрешности не выше 15%.

Разработанная методика была использована при изучении результатов содержания 1-гидроксипирена в моче работников производства алюминия и у лиц контрольной группы (14 человек, не имеющих профессионального контакта с ПАУ).

Уровни содержания 1-гидроксипирена в моче работников алюминиевого производства в 48,9–416 раз выше, чем в контрольной группе. Сравнение результатов между работниками разных профессий показало, что у анодчиков наблюдается более высокий уровень содержания 1-гидроксипирена в моче, чем у лиц других профессий. Фоновые уровни 1-гидроксипирена в моче у лиц контрольной группы составили $0,28 \pm 0,07$ нг/мл, что в 3 раза выше предела обнаружения 0,1 нг/мл. Таким образом, предел обнаружения 1-гидроксипирена в моче 0,1 нг/мл по данной методике вполне удовлет-

ворительный, так как позволяет обнаружить уровни концентраций в моче у лиц, не контактирующих с ПАУ.

Заключение

С помощью математического планирования эксперимента установлены следующие оптимальные условия извлечения 1-гидроксипирена из биологической пробы методом жидкостной экстракции: масса сульфата магния 0,5 г и время встряхивания 2 мин, число экстракций – 2. Выбор оптимальных условий жидкостной экстракции 1-гидроксипирена методом математического планирования позволил разработать методику определения данного аналита в моче методом ГХ-МС для проведения биологического мониторинга. С использованием данной методики с пределом обнаружения 0,1 нг/мл определили концентрации 1-гидроксипирена в моче не только у работников производства алюминия, но и у лиц контрольной группы (не подвергающихся воздействию ПАУ).

Литература

(п.п. 1–6, 8–26 см. References)

7. Зибарев Е.В., Эллинген Д.Г., Томассен И., Чашин В.П., Чашин М.В., Кузьмин А.В. Биологический мониторинг как способ управления профессиональными рисками. *Уральский медицинский журнал*. 2011; (9): 16–8.
27. Вершинин В.И., Перцев Н.В. *Планирование и математическая обработка результатов химического эксперимента*. Омск; 2005.
28. Адлер Ю.П., Маркова Е.В., Грановский Ю.А. *Планирование эксперимента при поиске оптимальных условий*. М.: Наука; 1971.
29. Смагунова А.Н., Пашкова Г.В., Белых Л.И. *Математическое планирование эксперимента в методических исследованиях аналитической химии*. Иркутск; 2015.
30. Смагунова А.Н., Карпукова О.М. *Методы математической статистики в аналитической химии*. Ростов-на-Дону: Феникс; 2012.

References

1. Brandt H.C., Watson W.P. Monitoring human occupational and environmental exposures to polycyclic aromatic compounds. *Ann. Occup. Hyg.* 2003; 47(5): 349–78. <https://doi.org/10.1093/annhyg/meg052>
2. Jacob J., Seidel A. Biomonitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons in human urine. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2002; 778(1–2): 31–47. [https://doi.org/10.1016/s0378-4347\(01\)00467-4](https://doi.org/10.1016/s0378-4347(01)00467-4)
3. Bosetti C., Boffetta P., La Vecchia C. Occupational exposures to polycyclic aromatic hydrocarbons, and respiratory and urinary tract cancers: a quantitative review to 2005. *Ann. Oncol.* 2005; 18(3): 431–46. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdl172>
4. Al-Saleh I., Alsabbahen A., Shinwari N., Billede G., Mashhour A., Al-Sarraj Y., et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) as determinants of various anthropometric measures of birth outcome. *Sci. Total Environ.* 2013; 444: 565–78. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.12.021>
5. Barbeau D., Persoons R., Marques M., Hervé C., Laffitte-Rigaud G., Maitre A. Relevance of urinary 3-hydroxybenzo(a)pyrene and 1-hydroxypyrene to assess exposure to carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures in metallurgy workers. *Ann. Occup. Hyg.* 2014; 58(5): 579–90. <https://doi.org/10.1093/annhyg/meu004>
6. Klöslóvá Z., Drimal M., Balog K., Koppová K., Dubajová J. The relations between polycyclic aromatic hydrocarbons exposure and 1-OHP levels as a biomarker of the exposure. *Cent. Eur. J. Public Health.* 2016; 24(4): 302–7. <https://doi.org/10.21101/cejph.a4179>
7. Zibarev E.V., Ellingsen D.G., Tomassen I., Chashchin V.P., Chashchin M.V., Kuz'min A.V. Biological monitoring as method occupational risk assessment. *Ural'skiy meditsinskiy zhurnal*. 2011; (9): 16–8. (in Russian)
8. Grover P.L. Pathways involved in the metabolism and activation of polycyclic hydrocarbons. *Xenobiotica.* 1986; 16(10–11): 915–31. <https://doi.org/10.3109/00498258609038974>
9. Unwin J., Cocker J., Scobbie E., Chambers H. An assessment of occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in the UK. *Ann. Occup. Hyg.* 2006; 50(4): 395–403. <https://doi.org/10.1093/annhyg/mel010>
10. Boogaard P.J. Urinary biomarkers in the risk assessment of PAHs. *Occup. Environ. Med.* 2008; 65(4): 221–2. <https://doi.org/10.1136/oem.2007.034157>
11. Hansen A., Mathiesen L., Pedersen M., Knudsen L.E. Urinary 1-hydroxypyrene (1-HP) in environmental and occupational studies – a review. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 2008; 211(5–6): 471–503. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2007.09.012>
12. Rossella F., Campo L., Pavanello S., Kapka L., Siwinska E., Fustinoni S. Urinary polycyclic aromatic hydrocarbons and monohydroxy metabolites as biomarkers of exposure in coke oven workers. *Occup. Environ. Med.* 2009; 66(8): 509–16. <https://doi.org/10.1136/oem.2008.042796>
13. Leroyer A., Jeandel F., Maitre A., Howsam M., Deplanque D., Mazuca M., et al. 1-Hydroxypyrene and 3-hydroxybenzo(a)pyrene as biomarkers of exposure to PAH in various environmental exposure situations. *Sci. Total Environ.* 2010; 408(5): 1166–73. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.10.073>
14. Hadrup N., Mielżyńska-Švach D., Kozłowska A., Campisi M., Pavanello S., Vogel U. Association between a urinary biomarker for exposure to PAH and blood level of the acute phase protein serum amyloid A in coke oven workers. *Environ. Health.* 2019; 18(1): 81. <https://doi.org/10.1186/s12940-019-0523-1>
15. Samir A.M., Shaker D.A., Fathy M.M., Hafez S.F., Abdullatif M.M., Rashed L.A., et al. Urinary and genetic biomonitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons in egyptian coke oven workers: associations between exposure, effect, and carcinogenic risk assessment. *Int. J. Occup. Environ. Med.* 2019; 10(3): 124–36. <https://doi.org/10.15171/ijoom.2019.1541>
16. Du M., Mullins B.J., Franklin P., Musk A.W., Elliot N.S.J., Sodhi-Berry N., et al. Measurement of urinary 1-aminopyrene and 1-hydroxypyrene as biomarkers of exposure to diesel particulate matter in gold miners. *Sci. Total Environ.* 2019; 685: 723–8. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.242>
17. Adetona A.M., Martin W.K., Warren S.H., Hanley N.M., Adetona O., Zhang J.J., et al. Urinary mutagenicity and other biomarkers of occupational smoke exposure of wildland firefighters and oxidative stress. *Inhal. Toxicol.* 2019; 31(2): 73–87. <https://doi.org/10.1080/08958378.2019.1600079>
18. Vimercati L., Bisceglia L., Cavone D., Caputi A., De Maria L., Delfino M., et al. Environmental monitoring of PAHs exposure, biomarkers and vital status in coke oven workers. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2020; 17(7): 2199. <https://doi.org/10.3390/ijerph17072199>
19. Ratelle M., Khoury C., Adlard B., Laird B. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) levels in urine samples collected in a subarctic region of the Northwest Territories, Canada. *Environ. Res.* 2020; 182: 109112. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109112>
20. Cao L., Wang D., Wen Y., He H., Chen A., Hu D., et al. Effects of environmental and lifestyle exposures on urinary levels of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites: A cross-sectional study of urban adults in China. *Chemosphere.* 2020; 240: 124898. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124898>
21. Oliveira M., Costa S., Vaz J., Fernandes A., Slezakova K., Delerue-Matos C., et al. Firefighters exposure to fire emissions: Impact on levels of biomarkers of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and genotoxic/oxidative-effects. *J. Hazard. Mater.* 2020; 383: 121179. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121179>
22. Blau K., Halket J.M. *Handbook of Derivates for Chromatography*. New-York: Wiley; 1993.
23. Schummer C., Delhomme O., Bstfenzler B.M., Millet M. Comparison of MTBSTFA and BSTFA in derivatization reaction of polar compounds prior to GC/MS analysis. *Talanta.* 2009; 77(4): 1473–82. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.09.043>

24. Shin H.S., Lim H.H. Simultaneous determination of 2-naphthol and 1-hydroxy pyrene in urine by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2011; 879(7–8): 489–94. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.01.009>
25. Chen D., Xu H. Simultaneous HPLC-MS determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, 3-hydroxyphenanthrene and 1-hydroxypyrene after online in-tube solid phase microextraction using a graphene oxide/poly(3,4-ethylenedioxythiophene)/polypyrrole composite. *Mikrochim. Acta.* 2019; 186(5): 300. <https://doi.org/10.1007/s00604-019-3429-2>
26. Martín-Tornero E., Luque-Uría A., Durán-Merás I., Espinosa-Mansilla A. A novel analytical methodology for the determination of hydroxy polycyclic aromatic hydrocarbons in breast and cow milk samples. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2020; 1136: 121912. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.121912>
27. Vershinin V.I., Pertsev N.V. *Planning and Mathematical Processing of Chemical Experiment Results [Planirovanie i matematicheskaya obrabotka rezul'tatov khimicheskogo eksperimenta]*. Omsk; 2005. (in Russian)
28. Adler Yu.P., Markova E.V., Granovskiy Yu.A. *Planning an Experiment when Searching for Optimal Conditions [Planirovanie eksperimenta pri poiske optimal'nykh usloviy]*. Moscow: Nauka; 1971. (in Russian)
29. Smagunova A.N., Pashkova G.V., Belykh L.I. *Mathematical Planning of an Experiment in Methodological Research of Analytical Chemistry [Matematicheskoe planirovanie eksperimenta v metodicheskikh issledovaniyakh analiticheskoy khimii]*. Irkutsk; 2015. (in Russian)
30. Smagunova A.N., Karpukova O.M. *Methods of Mathematical Statistics in Analytical Chemistry [Metody matematicheskoy statistiki v analiticheskoy khimii]*. Rostov-na-Donu: Feniks; 2012. (in Russian)