

УДК 543.054:[547.6:612.46]

ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГИДРОКСИЛИРОВАННЫХ ПОЛИАРОМАТИЧЕСКИХ УГЛЕВОДОРОДОВ В МОЧЕ С ПОМОЩЬЮ ДИСПЕРСИОННОЙ ЖИДКОСТНО-ЖИДКОСТНОЙ МИКРОЭКСТРАКЦИИ И ДЕРИВАТИЗАЦИИ В ПОРТУ ИНЖЕКТОРА

© 2024 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 мкр-н, 3, 665826 Ангарск, Россия

* E-mail: alexeenko85@mail.ru

Поступила в редакцию 06.02.2024 г.

После доработки 27.04.2024 г.

Принята к публикации 28.04.2024 г.

Разработана простая, экспрессная и чувствительная методика определения гидроксированных полициклических ароматических углеводородов (2-гидроксиафталина, 2-гидроксифлуорена, 9-гидроксифенантрена, 3-гидроксифенантрена, 2-гидроксифенантрена, 1-гидроксипирена, 6-гидроксихризена) в моче методом газовой хромато-масс-спектрометрии. Пробоподготовка основана на дисперсионной жидкостно-жидкостной микроэкстракции трихлорметаном в кислой среде. Дериватизация осуществляется в разогретом порту инжектора реагентом N,O-бистриметилсилилтрифторацетамидом. Экспериментально выбран тип диспергирующего растворителя, а с помощью трехфакторного эксперимента установлено оптимальное соотношение следующих факторов: значения pH, объема диспергирующего растворителя, времени экстракции. Для хромато-масс-спектрометрического анализа применяли высокотемпературную капиллярную колонку НТ-8 в режиме температурного градиента. Установлен диапазон линейности градуировочной функции 0.5–100 нг/мл. Разработанная методика определения гидроксированных ПАУ в моче опробована на образцах мочи работников производства алюминия.

Ключевые слова: гидроксированные полиароматические углеводороды, дисперсионная жидкостно-жидкостная микроэкстракция, силилирование в порту инжектора, моча.

DOI: 10.31857/S0044450224100086, EDN: TEYDJE

Полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) метаболизируются в полярные гидроксильные производные (ОН-ПАУ) с помощью оксидантной системы со смешанными функциями в присутствии молекулярного кислорода и никотинамидадениндинуклеотида или никотинамидадениндинуклеотидфосфата [1, 2].

Опубликовано несколько работ по определению метаболитов ПАУ методом высокоэффективной жидкостной хроматографии [3, 4]. Тем не менее газовая хромато-масс-спектрометрия (ГХ-МС) имеет преимущества из-за ее высоких селективности, чувствительности и эффективности разделения [5, 6]. ГХ-МС-методы определения полярных метаболитов ПАУ требуют дериватизации для преобразования их в неполярные и летучие производные.

Силилирование — наиболее часто используемый метод дериватизации для превращения полярных метаболитов ПАУ в неполярные производные. Однако применение силилирования имеет ряд недостатков: для дериватизации требуются строго безводные условия, поскольку и реагент, и производные склонны к гидролизу; время реакции силилирования составляет от 30 до 60 мин; для завершения реакции необходимо повышение температуры (до 60°C).

Существует вариант онлайн дериватизации, а именно: силилирование в порту инжектора (ИПС), который лишен ограничений традиционного силилирования во флаконе [7, 8]. Процесс ИПС включает реакцию в газовой фазе между силилирующим реагентом и полярным аналитом, которая происходит внутри разогретого порта

инжектора ГХ или ГХ-МС. Это почти мгновенная реакция, завершающаяся в течение нескольких секунд внутри горячего инъекционного порта ГХ, что снижает возможность разложения производных, при этом их воздействие на окружающую среду незначительно. Дополнительные комплектующие экспериментального оборудования, такие как нагревательный блок или термостат и реакционные сосуды, не требуются для ИПС, поскольку реагент и аналит вводятся одновременно внутрь порта инжектора ГХ-МС. Кроме того, значительно сокращаются необходимые количества дериватирующего реагента и образца. Эффективность дериватизации в реальном времени также повышается по сравнению с дериватизацией в автономном режиме, что впоследствии приводит к увеличению чувствительности и точности метода.

Способы пробоподготовки, такие как жидкостно-жидкостная экстракция и твердофазная микроэкстракция (ТФМЭ), широко используются для извлечения метаболитов ПАУ из различных проб [8–12]. Так, например, пробоподготовка в ГХ-МС-методике определения гидроксированных ПАУ основана на извлечении аналитов жидкостной экстракцией гексаном с последующим упариванием экстракта в токе азота при комнатной температуре и дериватизации сухого остатка реагентом N,O-бистриметилсилилтрифторацетамид (БСТФА) при 90°C в течение 45 мин [13]. К недостаткам данной методики можно отнести длительность процедур экстракции и дериватизации и возможность потерь 2-, 3-ядерных ОН-ПАУ в процессе упаривания экстракта. В методике определения гидроксированных ПАУ с применением ТФМЭ требуется длительная выдержка волокна от 45 мин до 12 ч, что делает ее неприменимой для рутинного анализа [14].

Дисперсионная жидкостно-жидкостная микроэкстракция (ДЖЖМЭ) — экспрессный, экологичный, экономичный и простой способ пробоподготовки, который широко применяют для экстракции органических аналитов из различных матриц сложной природы [15–22]. Так, например, методика ГХ-МС-определения ОН-ПАУ в донных отложениях включает ускоренную экстракцию из твердой матрицы смесью вода–ацетонитрил (80 : 20, по объему) при 150°C и давлении 1500 psi в течение 10 мин, последующую дисперсионную жидкостно-жидкостную микроэкстракцию хлорбензолом (100 мкл) из водно-ацетонитрильной смеси, упаривание экстракта до сухого остатка, силилирование сухого остатка реагентом метил(*трет*-бутил)диметилсилилтрифторацетамидом (МТБСТФА) при 60°C в течение 1 ч с получением *трет*-бутилдиметилсильных производных [23]. Однако данный способ обладает рядом недостатков, к которым можно отнести возможность потерь легких ОН-ПАУ в процессе

упаривания экстракта до сухого остатка, длительность силилирования (1 ч) ОН-ПАУ в сухом остатке и значительное время ГХ-МС-анализа (48 мин). Анализ применяемых условий определения ОН-ПАУ в моче показал, что во всех методиках используется длительная дериватизация во флаконе, а ДЖЖМЭ применяется редко.

Цель настоящей работы — разработка методики ГХ-МС-определения ОН-ПАУ (2-гидроксинафталина, 2-гидроксифлуорена, 9-гидроксифенантрена, 3-гидроксифенантрена, 2-гидроксифенантрена, 1-гидроксипирена, 6-гидроксихризена) в моче с использованием ДЖЖМЭ и силилирования в порту инжектора.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Аппаратура. Газовый одноквадрупольный хромато-масс-спектрометр Agilent 7890/5975C с ионизацией электронным ударом, оснащенный автосамплером Agilent 7693 и капиллярной колонкой НТ-8 (30 м × 0.25 мм, 0.25 мкм); блочный термостат Stuart (30–130°C) и центрифуга Eppendorf 5804.

Стандарты и реактивы. 2-гидроксинафталин (99.8%, Fluka, Швейцария), 2-гидроксифлуорен (98%, Aldrich, США), 9-гидроксифенантрен (98.2%, Aldrich, США), 3-гидроксифенантрен (99.5%, Dr. Ehrenstorfer, Германия), 2-гидроксифенантрен (94%, Dr. Ehrenstorfer, Германия), 1-гидроксипирен (98.2%, Aldrich, США), 6-гидроксихризен (99.8%, Dr. Ehrenstorfer, Германия), ацетонитрил (Криохром, Россия), 0.1 М соляная кислота, дистиллированная вода, этанол (96%), ацетон (Экос, Россия), метанол, трихлорметан перегнанный х.ч. (Экос, Россия), водный раствор β-глюкуронидазы Helix Pomatia Н-2 (> 85 000 ед/мл, Aldrich, США), силилирующие реагенты N,O-бистриметилсилилтрифторацетамид с 1% триметилхлорсилана и N-метилтретбутилдиметилсилилтрифторацетамид (Fluka, Швейцария).

Приготовление растворов. Исходный раствор ОН-ПАУ (1 мг/мл) готовили растворением точной навески в ацетонитриле. Разбавлением исходного раствора ОН-ПАУ ацетонитрилом получали раствор ОН-ПАУ с концентрацией 100 мкг/мл, из которого готовили растворы следующих концентраций: 40, 20, 10, 5, 2, 0.5 мкг/мл. Растворы ОН-ПАУ в моче (25 мл) с концентрациями 100, 40, 20, 10, 5, 2, 0.5 нг/мл готовили добавлением в мочу 25 мкл растворов ОН-ПАУ в ацетонитриле с концентрациями 100, 40, 20, 10, 5, 2, 0.5 мкг/мл.

Пробоподготовка. Во флакон емк. 5 мл с острым коническим дном вносили пробу мочи (2 мл), 20 мкл внутреннего стандарта (1-гидроксипирен-d9, 1 мкг/мл), 0.2–2 мл 0.1 М соляной кислоты, 100–500 мкл этанола (диспергирующий растворитель), 100 мкл трихлорметана (экстрагирующий растворитель); вручную встряхивали

в течение 5–25 с для образования эмульсии; центрифугировали при 5000 об/мин в течение 10 мин; переносили нижний (трихлорметановый) слой во флакон емк. 250 мкл и автоматически вводили микрошприцом в инъекционный порт хроматографа 3-фазную систему (1 мкл силилирующего реагента БСТФА, 0.2 мкл воздуха и 1 мкл трихлорметанового экстракта) для последующего ГХ-МС-анализа.

ГХ-МС-анализ осуществляли в капиллярной колонке НТ-8 (30 м × 0.25 мм, 0.25 мкм) в следующих условиях: температура испарителя 300°C; режим ввода образца без деления потока 0.7 мин; поток газа-носителя в колонке 1.2 мл/мин; режим термостата колонки: выдержка 100°C в течение 2 мин, подъем со скоростью 20 град/мин до 320°C, выдержка в течение 2 мин, температура интерфейса 320°C, ионного источника ЭИ 230°C, квадруполя 150°C; задержка включения нити накала 7 мин. Сбор хромато-масс-спектрометрической информации осуществляли в режиме мониторинга выделенных ионов.

Идентификацию проводили по времени удерживания и по соотношению интенсивностей

регистрируемых ионов (табл. 1). Для определения ОН-ПАУ предлагаемым способом использовали метод внутреннего стандарта и растворы известной концентрации ОН-ПАУ в моче в диапазоне от 0.5 до 100 нг/мл.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Хромато-масс-спектрометрия. Полученные производные ОН-ПАУ после силилирования реагентами БСТФА и МТБСТФА содержат триметилсилильную (ТМС) и *трет*-бутилдиметилсилильную группы (ТБДМС) соответственно. Сопоставили следующие хромато-масс-спектральные характеристики ТМС- и ТБДМС-производных аналитов: молекулярную массу (ММ), характерные ионы в масс-спектре (m/z) и линейные индексы удерживания (RI), оцененные по смеси *n*-алканов C₁₄–C₃₀ (табл. 2).

В случае ТМС-производных молекулярный ион, соответствующий молекулярной массе, наиболее интенсивный (100%), только для 2-ОН-нафталина его интенсивность составляет 76.5%. Для ТБДМС-производных интенсивность молекулярного иона колеблется от 25 до 84%. Линейные

Таблица 1. Данные для идентификации производных ОН-ПАУ на масс-хроматограммах

Аналит	t_R , мин	Основной ион, m/z (интенсивность, %)	Подтверждающий ион, m/z (интенсивность, %)
2-ОН-Нафталин	8.01	216 (76.5)	201 (100)
2-ОН-Флуорен	10.509	254 (100)	239 (69)
9-ОН-Фенантрен	11.264	266 (100)	251 (55)
3-ОН-Фенантрен	11.4	266 (100)	251 (59)
2-ОН-Фенантрен	11.618	266 (100)	251 (78)
1-ОН-Пирен	13.182	290 (100)	275 (22)
6-ОН-Хризен	14.3	316 (100)	301 (25)

Таблица 2. Хромато-масс-спектральные характеристики производных ОН-ПАУ

ОН-ПАУ	ММ	ТМС-производные			ТБДМС-производные		
		ММ	m/z	RI	ММ	m/z	RI
2-ОН-Нафталин	144	216	201 (100%), 216 (76.5%)	1636	258	201 (100%), 202 (29%), 258 (25%)	1897
2-ОН-Флуорен	182	254	254 (100%), 239 (69%)	2096	296	239 (100%), 165 (39%), 296 (45%)	2379
9-ОН-Фенантрен	194	266	266 (100%), 251 (55%)	2256	308	251 (100%), 235 (33%), 308 (38%)	2545
3-ОН-Фенантрен	194	266	266 (100%), 251 (59%)	2286	308	251 (100%), 308 (45%)	2566
2-ОН-Фенантрен	194	266	266 (100%), 251 (78%)	2335	308	251 (100%), 308 (37%)	2634
1-ОН-Пирен	218	290	290 (100%), 275 (22%)	2718	332	275 (100%), 332 (84%)	3039
6-ОН-Хризен	244	316	316 (100%), 301 (25%)	2972	358	301 (100%), 285 (36%), 358 (69%)	3259

индексы удерживания ТБДМС-производных превышают индексы ТМС-производных, что приведет к увеличению продолжительности анализа, если применять дериватизацию реагентом МТБСТФА. Отсюда следует, что наилучшими хромато-масс-спектральными характеристиками обладают ТМС-производные, и для силилирования ОН-ПАУ лучше использовать реагент БСТФА.

Силилирование БСТФА в порту инжектора. Поскольку силилирование происходит внутри порта инжектора системы ГХ-МС, температуру инжекционного порта можно рассматривать как температуру реакции силилирования. Влияние температуры порта инжектора на эффективность силилирования в виде максимальной площади пика ТМС-производного ОН-ПАУ исследовали в диапазоне 150–370 °С (рис. 1). При повышении температуры порта инжектора от 150 до 300 °С площади пиков всех производных ОН-ПАУ увеличиваются, однако при превышении 300 °С не наблюдается значительного увеличения площадей пиков производных ОН-ПАУ. Также следует учесть то, что при температуре выше 350 °С может разрушаться капиллярная колонка. В связи с этим 300 °С выбрали в качестве оптимальной температуры порта инжектора при силилировании ОН-ПАУ реагентом БСТФА.

Дисперсионная жидкостно-жидкостная микроэкстракция. В ДЖЖМЭ диспергирующий растворитель должен смешиваться как с экстрагентом, так и с водно-солевой фазой (пробой мочи). Роль диспергирующего растворителя заключается в диспергировании экстрагента в водно-солевой фазе в виде мелких капель и в образовании эмульсии (проба/диспергирующий растворитель/экстрагент). При образовании мутного раствора площадь контакта между экстрагентом и водной фазой

значительно увеличивается, что помогает быстро достичь равновесия и приводит к сокращению времени экстракции, повышению коэффициентов распределения и степени извлечения. Исходя из этого, для выбора лучшего диспергирующего растворителя сопоставили ацетон, ацетонитрил, этанол и метанол. При этом этанол показал самую высокую степень извлечения R для всех метаболитов ОН-ПАУ, кроме 2-ОН-нафталина (рис. 2).

Другими факторами, влияющими на ДЖЖМЭ, являются рН пробы, объем этанола, время экстракции. Кислотность пробы регулировали, внося определенные количества 0.1 М соляной кислоты и дистиллированной воды. Например, для достижения рН 1.6 к 2 мл пробы добавляли 2 мл 0.1 М HCl, а рН 4.8 — 0.2 мл 0.1 М HCl и 1.8 мл дистиллированной воды. Данные факторы оптимизировали с помощью математического планирования эксперимента [24] (табл. 3). В многофакторном эксперименте одновременно варьировали три фактора по заданному плану. Матрица планирования состояла из восьми опытов. За параметр оптимизации у приняли степень экстракции, которую рассчитывали как отношение экспериментально измеренной массы аналита в экстракте к введенной массе аналита в образец мочи. Каждый опыт в матрице планирования повторяли два раза. Статистическим путем получили уравнения, представленные в табл. 4.

Интерпретация математических моделей извлечения ОН-ПАУ показала, что с увеличением рН степень экстракции уменьшается. Только для 2-гидроксиафталина величина рН не вносит вклад в степень экстракции, что можно объяснить тем, что 2-гидроксиафталин по сравнению с другими ОН-ПАУ более полярное и лучше раствори-

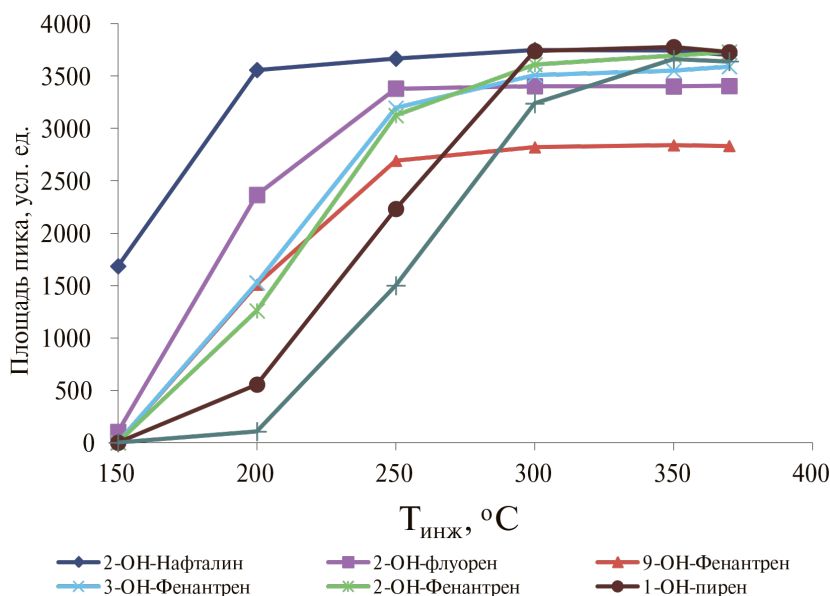


Рис. 1. Зависимость площади пика триметилсилильного производного ОН-ПАУ от температуры инжектора.

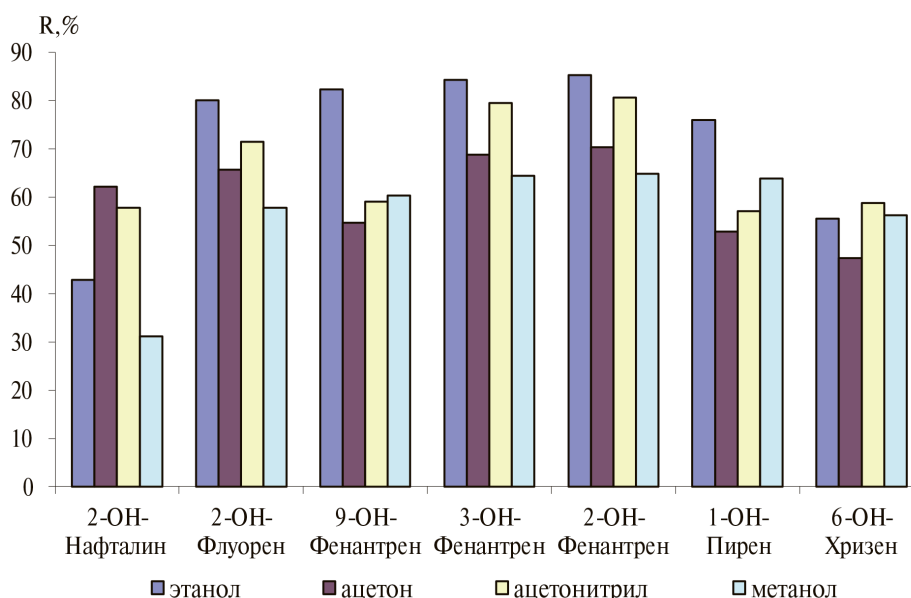


Рис. 2. Зависимость степени извлечения ОН-ПАУ из мочи от природы диспергирующего растворителя.

мое в воде соединение. Увеличению степени экстракции способствуют увеличение объема диспергирующего растворителя (этанола) и времени экстракции. Следует также отметить, что при увеличении времени экстракции вклад величины рН и объема этанола уменьшается. Подставляя в уравнения кодированные значения факторов, рассчитали теоретические значения степени экстракции, которые

показали, что степень экстракции возрастает с увеличением времени экстракции (табл. 5).

Таким образом, оптимальные условия ДЖ-ЖМЭ ОН-ПАУ из мочи следующие: рН 1.6, объем этанола 300 мкл, время экстракции 25 с.

Метрологические характеристики. Установили следующие характеристики: предел обнаружения, предел количественного определения, линейный

Таблица 3. Условия планирования трехфакторного эксперимента по дисперсионной жидкостно-жидкостной микроэкстракции

Фактор	Нулевой уровень	Интервал варьирования	Нижний уровень фактора	Верхний уровень фактора
x_1 – рН	3.2	1.6	1.6	4.8
x_2 – объем этанола, мкл	300	200	100	500
x_3 – время экстракции, с	15	10	5	25

Таблица 4. Математические модели процесса дисперсионной жидкостно-жидкостной микроэкстракции ОН-ПАУ

Аналит	Уравнение математической модели
2-ОН-Нафталин	$y = 62.3 + 6.1x_2 + 11.6x_3$
2-ОН-Флуорен	$y = 85 - 3.7x_1 + 12.07x_2 + 22x_3$
9-ОН-Фенантрэн	$y = 86.3 - 4.7x_1 + 15.08x_2 + 12.8x_3 - 2.4x_1x_2 - 2.4x_1x_3$
3-ОН-Фенантрэн	$y = 101 - 4.6x_1 + 13.7x_2 + 25.5x_3 - 1.76x_1x_2 - 2.6x_1x_3 - 2.6x_2x_3$
2-ОН-Фенантрэн	$y = 101 - 3.71x_1 + 13.4x_2 + 25x_3 - 2.2x_1x_2 - 2.5x_1x_3 - 2.7x_2x_3$
1-ОН-Пирен	$y = 85 - 5.2x_1 + 16.6x_2 + 10.2x_3 - 3.3x_1x_2 - 3.5x_1x_3 - 3.05x_1x_2x_3$
6-ОН-Хризен	$y = 63 - 4.3x_1 + 13.3x_2 - 2.9x_1x_3 - 3.4x_1x_2x_3$

Таблица 5. Условия экспериментов и теоретические значения степени экстракции

№ опыта	рН	Объем этанола, мкл	t , с	Степень экстракции, %						
				2-ОН-нафталин	2-ОН-флуорен	9-ОН-фенантрэн	3-ОН-фенантрэн	2-ОН-фенантрэн	1-ОН-пирен	6-ОН-хризен
1	1.6	300	5	50.7	66.7	75.5	77.5	79.7	76.5	64.4
2	1.6	300	15	62.3	88.7	90.7	105.6	104.7	90.2	67.3
3	1.6	300	25	73.9	110.7	105.9	133.7	129.7	103.9	70.2

диапазон, повторяемость, внутрилабораторная прецизионность, правильность, селективность.

Предел обнаружения и предел количественного определения рассчитывали по соотношению сигнал/шум (табл. 6). Линейный диапазон установили по шести модельным образцам мочи с раз-

ными концентрациями ОН-ПАУ (0.5, 2, 5, 10, 40, 100 нг/мл), коэффициент корреляции $r > 0.999$. Приемлемый критерий для r не ниже 0.990. Таким образом, линейный диапазон составил от 0.5 до 100 нг/мл. Прецизионность и правильность оценивали для трех образцов мочи с введенными концентрациями ОН-ПАУ 0.5, 10 и 40 нг/мл, каждый образец анализировали четыре раза в течение пяти дней. По результатам анализа рассчитали относительное стандартное отклонение ($s_r, \%$) повторяемости и внутрилабораторной прецизионности, оценили значимость систематической погрешности по t -критерию (табл. 7). Расчетные значения t -критерия соответствовали условию $t_{расч} < t_{табл}$ ($t_{табл}(0.05; 15) = 2.13$), что говорит о незначимости систематической погрешности. Исключение составили 2-ОН-нафталин для концентрации 0.5 нг/мл и 9-ОН-фенантрен для концентраций 0.5 и 40 нг/мл.

Таблица 6. Пределы обнаружения и количественного определения ОН-ПАУ в моче

Аналит	$c_{мин},$ нг/мл	$c_{н},$ нг/мл
2-Гидроксиафталин	0.05	0.2
2-Гидроксифлуорен	0.08	0.3
9-Гидроксифенантрен	0.16	0.5
3-Гидроксифенантрен	0.03	0.1
2-Гидроксифенантрен	0.03	0.1
1-Гидроксипирен	0.10	0.4
6-Гидроксихризен	0.09	0.3

Таблица 7. Прецизионность и правильность определения ОН-ПАУ в моче

Введено, нг/мл	Найдено, нг/мл	Повторяемость, $s_r, \%$ ($n = 4$)	Внутрилабораторная прецизионность $s_r, \%$ ($n = 5$)	$t_{расч}$
2-Гидроксиафталин				
0.5	0.58 ± 0.03	8.7	5.5	2.8
10	9.9 ± 0.8	4.6	8.2	0.1
40	38 ± 2	4.1	5.4	1.1
2-Гидроксифлуорен				
0.5	0.56 ± 0.08	7	14.3	1.4
10	10.04 ± 1.2	4.5	11.7	0.06
40	41 ± 3	4.0	8.1	0.66
9-Гидроксифенантрен				
0.5	0.60 ± 0.08	12.4	14	2.3
10	9.00 ± 0.94	6.4	10.4	1.5
40	33.8 ± 4.5	4.7	13.2	2.3
3-Гидроксифенантрен				
0.5	0.55 ± 0.11	10.2	20.5	0.84
10	10.7 ± 1.1	5.7	10.9	1.06
40	41 ± 3.3	5.2	8.1	0.50
2-Гидроксифенантрен				
0.5	0.51 ± 0.08	10.2	15.4	0.24
10	10.7 ± 1.1	5.6	10.8	0.87
40	40.9 ± 3.3	5.1	8.09	0.32
1-Гидроксипирен				
0.5	0.54 ± 0.05	2.5	8.7	1.3
10	10.1 ± 0.6	3.5	5.8	0.18
40	40.0 ± 1.6	3.9	4.1	0.03
6-Гидроксихризен				
0.5	0.47 ± 0.11	25.6	24.5	0.5
10	10 ± 0.6	5.2	5.8	0.08
40	38 ± 2	4.06	5.2	1.09

На рис. 3 приведена масс-хроматограмма образца мочи с концентрацией каждого ОН-ПАУ 10 нг/мл. Как видно, пики производных ОН-ПАУ узкие (полуширина пика 1.7 с), симметричные, не накладываются на пики других веществ.

Апробация методики. Разработанная методика определения ОН-ПАУ в моче опробована на образцах разовой порции мочи работников производства алюминия и контрольной группы (не контактирующие с ПАУ в производственных условиях). Предварительно осуществляли ферментативный гидролиз, добавляя 20 мкл β -глюкуронидазы к 2 мл образца мочи и выдерживая в течение 1 ч при 55°C. Далее проводили ДЖЖМЭ в выбранных оптимальных условиях: рН 1.6, объем этанола 300 мкл, время экстракции 25 с и анализировали образец методом ГХ-МС.

Благодаря повышенной селективности и чувствительности предлагаемого способа удалось определить содержание ОН-ПАУ в моче не только работников производства алюминия, но и лиц контрольной группы (табл. 8).

* * *

Для простого и экспрессного ГХ-МС-определения ОН-ПАУ в моче лиц, не контактирующих с ПАУ в производстве, применили сочетание ДЖЖМЭ с дериватизацией в порту

инжектора. Использование ДЖЖМЭ вместо классической жидкостной экстракции с упариванием экстракта упростило и ускорило пробоподготовку, а также обеспечило извлечение 70–100% аналитов. Благодаря силилированию в инъекционном порту удалось исключить стадию упаривания трихлорметанового экстракта и обеспечить экспрессность дериватизации. Быстрый ГХ-МС-анализ за 15 мин стал возможен благодаря высокотемпературной колонке НТ-8.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Федерального государственного бюджетного научного учреждения “Восточно-сибирский институт медико-экологических исследований”. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Лица, включенные в исследования, получили информацию о целях обследования и подписали информированное согласие, выданное в соответствии с Хельсинской декларацией Всемирной медицинской ассоциации (2008 г.). Они также были одобрены локальным этическим Комитетом по этике Восточно-сибирского института медико-

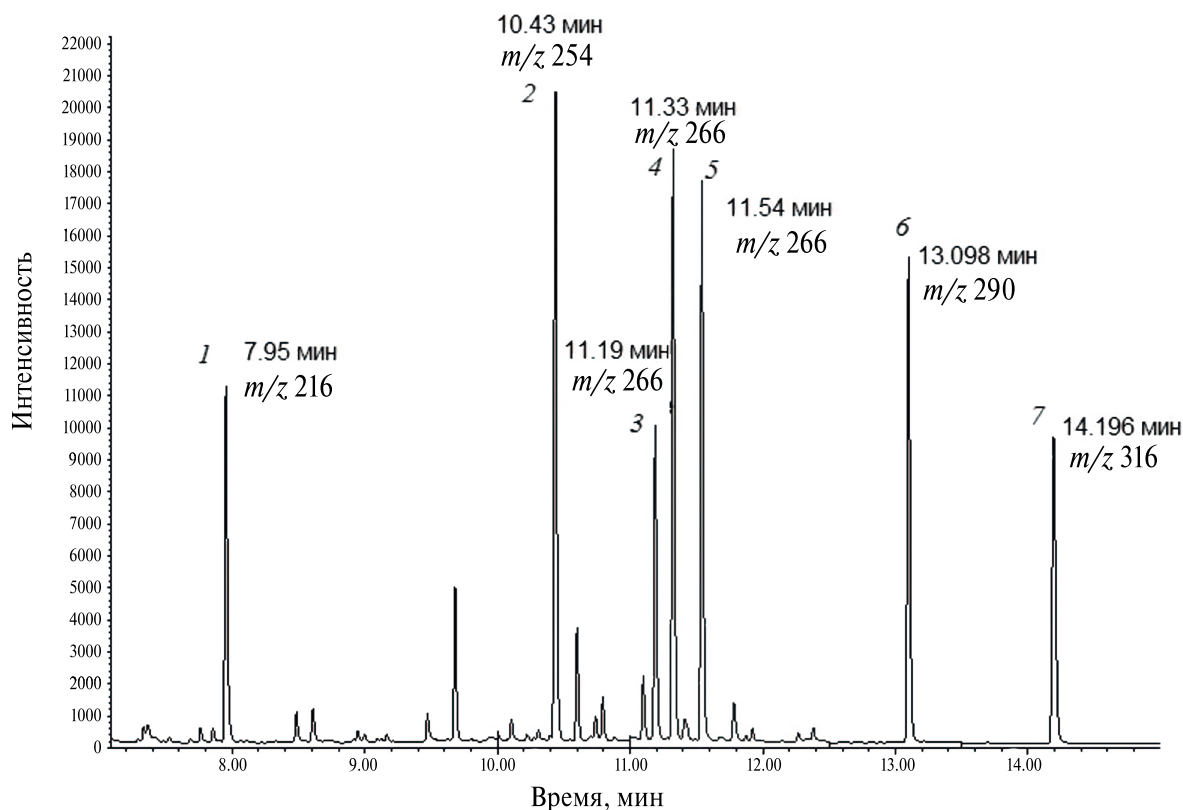


Рис. 3. Масс-хроматограмма образца мочи с концентрацией ОН-ПАУ 10 нг/мл. 1 – 2-гидроксинафталин, 2 – 2-гидроксифлуорен, 3 – 9-гидроксифенантрен, 4 – 3-гидроксифенантрен, 5 – 2-гидроксифенантрен, 6 – 1-гидроксипирен, 7 – 6-гидроксихризен.

Таблица 8. Результаты определения ОН-ПАУ в моче

ОН-ПАУ	Концентрация (медиана), нг/мл	
	производство алюминия (<i>n</i> = 75)	контрольная группа (<i>n</i> = 22)
2-Гидроксинафталин	6.30	4.50
2-Гидроксифлуорен	6.70	0.95
9-Гидроксифенантрен	0.80	0.50
3-Гидроксифенантрен	4.30	0.56
2-Гидроксифенантрен	2.80	0.26
1-Гидроксипирен	9.70	0.58
6-Гидроксихризен	0.46	0.40

экологических исследований (г. Ангарск), Заключение № 6 от 16 ноября 2023 г.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hemminki K., Dickey C., Karlsson S., Bell D., Hsu Y., Tsai W.Y., Mooney L.A., Savela K., Perera F.P. Aromatic DNA adducts in foundry workers in relation to exposure, life style and CYP1A1 and glutathione transferase M1 genotype // *Carcinogenesis*. 1997. V. 18. P. 345.
- Shaw G.R., Connell D.W. Prediction and monitoring of the carcinogenicity of polycyclic aromatic compounds (PACs) // *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 1994. V. 135 P. 1.
- Jongeneelen F.J., Anzion R.B.M., Henderson P.T. Determination of hydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine // *J. Chromatogr.* 1987. V. 413. P. 227.
- Bentsen-Farman R.K., Botnen I.V., Noto H., Jacob J., Ovrebo S. Detection of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites by high-pressure liquid chromatography after purification on immunoaffinity columns in urine from occupationally exposed workers // *Int. Arch. Occup. Environ. Health*. 1999. V. 72. P. 161.
- Carmella S.G., Le K.A., Hecht S.S. Improved method for determination of 1-hydroxypyrene in human urine // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2004. V. 13. P. 1261.
- Santos F.J., Galceran M.T. Modern developments in gas chromatography-mass spectrometry-based environmental analysis // *J. Chromatogr. A*. 2003. V. 1000. P. 125.
- Rasmussen K.E. Quantitative morphine assay by means of gas-liquid chromatography on-column silylation // *J. Chromatogr. A*. 1976. V. 120. P. 491.
- Wang Q., Ma L., Yin C.R., Xu L. Developments in injection port derivatization // *J. Chromatogr. A*. 2013. V. 1296. P. 25.
- Shin H.S., Lim H.Y. Simultaneous determination of 2-naphthol and 1-hydroxypyrene in urine by gas chromatography-mass spectrometry // *J. Chromatogr. B*. 2011 V. 879. P. 489.
- Smith C.J., Huang W., Walcott C.J., Turner W., Grainger J., Patterson D.G. Quantification of monohydroxy-PAH metabolites in urine by solid-phase extraction with isotope dilution-GC-MS // *Anal. Bioanal. Chem.* 2002. V. 372. P. 216.
- Wang Y., Zhang W., Dong Y., Fan R., Sheng G., Fu J. Quantification of several monohydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection // *Anal. Bioanal. Chem.* 2005. V. 383. P. 804.
- Li Z., Romanoff L.C., Trinidad D.A., Hussain N., Jones R.S., Porter E.N., Donald G. Patterson Jr, Sjödin A. Measurement of urinary monohydroxy polycyclic aromatic hydrocarbons using automated liquid-liquid extraction gas chromatography/isotope dilution high-resolution mass spectrometry // *Anal. Chem.* 2006. V. 78. P. 5744.
- 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. Chromatogr. B*. 2008. V. 875. P. 531.
- Luan T., Fang S., Zhong Y., Lin L., Chan S.M.N., Lan C., Tam N.F.Y. Determination of hydroxyl metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons by fully automated solid-phase microextraction derivatization and gas chromatography-mass spectrometry // *J. Chromatogr. A*. 2007. V. 1173. P. 37.
- Rezaee M., Assadi Y., Hosseini M.R.M., Aghaee E., Ahmadi F., Berijani S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction // *J. Chromatogr. A*. 2006. V. 1116. P. 1.
- Rezaee M., Yamini Y., Faraji M. Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method // *J. Chromatogr. A*. 2010. V. 1217. P. 2342.
- Nuhu A.A., Basheer C., Saad B. Liquid-phase and dispersive liquid-liquid microextraction techniques

- with derivatization: Recent applications in bioanalysis // *J. Chromatogr. B*. 2011. V. 879. P. 1180.
18. *Benede J.L., Chisvert A., Salvador A., Quiles D.S., Sanchez A.T.* Determination of UV filters in both soluble and particulate fractions of seawaters by dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry // *Anal. Chim. Acta*. 2014. V. 812. P. 50.
 19. *Campone L., Piccinelli A.L., Pagano I., Carabetta S., Sanzo R.D., Russo M., Rastrelli L.* Determination of phenolic compounds in honey using dispersive liquid-liquid microextraction // *J. Chromatogr. A*. 2014. V. 1334. P. 9.
 20. *Cortada C., Reis L.C.D., Vidal L., Llorca J., Canals A.* Determination of cyclic and linear siloxanes in wastewater samples by ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry // *Talanta*. 2014. V. 120. P. 191.
 21. *Tseng W.C., Chen P.S., Huang S.D.* Optimization of two different dispersive liquid-liquid microextraction methods followed by gas chromatography-mass spectrometry determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) analysis in water // *Talanta*. 2014. V. 120. P. 425.
 22. *Дмитриенко С.Г., Аяри В.В., Толмачева В.В., Горбунова М.В.* Дисперсионная жидкостно-жидкостная микроэкстракция органических соединений. Обзор обзоров // *Журн. аналит. химии*. 2020. Т. 75. № 10. С. 867. (*Dmitrienko S.G., Ayari V.V., Tolmacheva V.V., Gorbunova M.V.* Dispersive liquid-liquid microextraction of organic compounds: An overview of reviews // *J. Anal. Chem.* 2020. V. 75. № 10. P. 1237.)
 23. *Wang X., Lin L., Yang L., Tam N.F.Y.* Determination of hydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments samples by combining subcritical water extraction and dispersive liquid-liquid microextraction with derivatization // *Anal. Chim. Acta*. 2012. V. 753. P. 57.
 24. *Смагунова А.Н., Пашкова Г.В., Белых Л.И.* Математическое планирование эксперимента в методических исследованиях аналитической химии. Иркутск: Изд-во ИГУ, 2015. 137 с.

CHROMATO-MASS SPECTROMETRIC DETERMINATION OF HYDROXYLATED POLYAROMATIC HYDROCARBONS IN URINE BY DISPERSION LIQUID-LIQUID MICROEXTRACTION AND DERIVATIZATION IN THE INJECTOR PORT

A. N. Alekseenko^{a,*}, O. M. Zhurba^a, A. V. Merinov^a, S. F. Shayakhmetov^a

^a*East-Siberian Institute of Medical and Ecological Research
12-a district, 3, 665826 Angarsk, Russia*

^{*}*E-mail: alexeenko85@mail.ru*

Abstract. A simple, rapid and sensitive method has been developed for the determination of hydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons (2-hydroxynaphthalene, 2-hydroxyfluorene, 9-hydroxyphenanthrene, 3-hydroxyphenanthrene, 2-hydroxyphenanthrene, 1-hydroxypyrene, 6-hydroxychryzene) in urine by gas chromatography-mass spectrometry. Sample preparation is based on dispersion liquid-liquid microextraction with trichloromethane in an acidic medium. Derivatization is carried out in the heated port of the injector with the reagent N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide. The type of dispersing solvent was experimentally selected, and using a three-factor experiment, the optimal ratio of the following factors was established: pH values, volume of the dispersing solvent, and extraction time. For chromatography-mass spectrometric analysis, a high-temperature NT-8 capillary column was used in the temperature gradient mode. The linearity range of the calibration function is 0.5–100 ng/ml. The developed method for the determination of hydroxylated PACs in urine has been tested on urine samples of aluminum production workers.

Keywords: hydroxylated polyaromatic hydrocarbons, dispersion liquid-liquid microextraction, silylation in the injector port, urine.