
ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕТАБОЛИТОВ ПАУ В МОЧЕ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Г.В. Зыкова, С.Ю. Семёнов, В.Н. Смирнов

Федеральное государственное унитарное предприятие
«Научно-технический центр радиационно-химической
безопасности и гигиены» ФМБА России
ул. Щукинская, 40, Москва, Россия, 123182

Для целей биомониторинга воздействия полициклических ароматических углеводородов на человека разработана методика измерений основного индикаторного метаболита — 1-гидроксипирена в моче человека. Методика основана на использовании метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с флуоресцентным детектором с использованием метода внутреннего стандарта.

Ключевые слова: полициклические ароматические углеводороды, ПАУ, методика измерений метаболита ПАУ, 1-гидроксипирен, моча, биомониторинг, высокоэффективная жидкостная хроматография, флуоресцентный детектор.

Полициклические ароматические углеводороды (ПАУ), относящиеся к группе стойких токсических веществ (СТВ), практически всегда попадают в список приоритетных загрязнителей как в России, так и за рубежом. Они обладают свойствами, близкими к стойким органическим загрязнителям (СОЗ), т.е. высокой токсичностью, стойкостью, способностью накапливаться в объектах окружающей среды, способностью переноситься на большие расстояния. ПАУ, обладая высокой канцерогенной и мутагенной активностью, представляют серьезную угрозу здоровью человека и его потомству. Раковые заболевания легких, мочеполовых органов и кожи отмечаются на производствах с повышенным уровнем экспозиции ПАУ. Воздействие на работников опасных производств обычно обусловлено смесью ПАУ. Международное агентство по изучению рака (МАИР) относит к группе 1 — веществам канцерогенным для человека — химические смеси, содержащие ПАУ (сажу, кокс, выбросы печей и угольные смолы), а также наиболее опасный — бенз[а]пирен, содержание которого определяют наиболее часто при мониторинге окружающей и производственной среды. Циклопента[с,d]пирен, дибенз[а,h]антрацен и дибензо[а,l]пирен отнесены к группе 2А — веществам, вероятно, канцерогенным для человека. Одиннадцать соединений ПАУ относятся к группе 2В — веществам, возможно, канцерогенным для человека [1].

Работа на таких производствах, как коксохимия, газификация угля, литье железа и стали, работы по смолению крыш и укладке асфальта, очистка труб от сажи, работа на мусоросжигательных печах, очистке газа и плавке алюминия, на производстве угольных электродов, технического углерода, карбида кальция и др. приводит к повышенной экспозиции ПАУ работников. Уровень концентраций бенз[а]пирена в воздухе может достигать десятков мкг/м³ при предельно допустимой концентрации (ПДК) 1 нг/м³. Число работников, потенциально подвер-

женных воздействию высоких концентраций ПАУ, по некоторым оценкам, может составить десятки тысяч человек как занятых на указанных производствах, так и проживающих на близлежащих территориях.

Основными источниками экспозиции населения, не занятого на производствах такого рода, являются табакокурение, загрязненный воздух и пища, приготовленная либо из загрязненных ПАУ продуктов, либо потенциально опасным способом (жарением и печением на углях, копчением и др.).

В связи с высокой опасностью ПАУ в России и в большинстве стран проводится мониторинг наиболее опасного из ПАУ — бенз[а]пирена — в объектах окружающей среды и в пищевых продуктах. Однако альтернативный способ оценки влияния ПАУ на человека по измерению их метаболитов в биосредах применяют только в развитых странах. Между тем этот способ определения экспозиции ПАУ человека — биомониторинг — позволяет решать задачу более эффективно.

Концентрация остаточных, не превратившихся в продукты метаболизма количеств ПАУ как в кровеносной системе, так и в моче человека настолько мала, что с трудом поддается измерению современными аналитическими методами. Кроме того, характерное время изменения концентрации ПАУ в организме составляет несколько часов. Вместе с тем уровень содержания некоторых метаболитов достаточно высок и определяется аналитическими методами. Самой обычной и легкодоступной биосредой при определении содержания метаболитов ПАУ в организме человека являются жидкие выделения в виде мочи. В этих жидких выделениях в детектируемых количествах присутствуют метаболиты ПАУ небольшого молекулярного веса, включая метаболиты нафталина, фенантрена, флуорена и пирена. Эти вещества согласно данным биомониторинга хорошо подходят в качестве «индикаторов» внешнего присутствия ПАУ.

В подавляющем числе случаев ПАУ присутствуют в виде смесей, одним из основных компонентов которых по уровню концентрации является пирен, который хотя и не признан канцерогенным, но проявляет некоторые свойства, присущие канцерогенным веществам. Пирен, впитываясь в кожу, вызывает раздражающий эффект. Он подозревается как мутаген. У работников, подвергавшихся воздействию от 3 до 5 мг/м³ пирена, наблюдались некоторые тератогенные эффекты. Воздействие пирена на человека осуществляется практически исключительно через желудочно-кишечный тракт и дыхательные пути. Агентство окружающей среды США (EPA US) установило референтную дозу для перорального приема внутрь (ежедневного перорального воздействия в течение всей жизни без заметного риска пагубного воздействия) пирена — 0,03 мг/кг/день.

Метаболит пирена является стабильным соединением, относительно легко и надежно определяемым в моче, в том числе методом высокоэффективной жидкостной хроматографии [2]. На основании большого количества работ можно с достаточной уверенностью признать пирен маркером ПАУ в окружающей среде, а его моногидрокси метаболит 1-гидроксипирен (1-ОН-Пир) адекватным биомаркером присутствия ПАУ в окружающей среде [4]. Важно отметить достаточно высокий (0,5 мкг/дм³) уровень содержания 1-ОН-Пир в моче. Пирен метаболизируется в организме в 1-ОН-Пир изоформами цитохрома P450: CYP1A1, CYP1B1 и CYP1A2 [3]. На рис. 1 приведена схема метаболизма пирена.

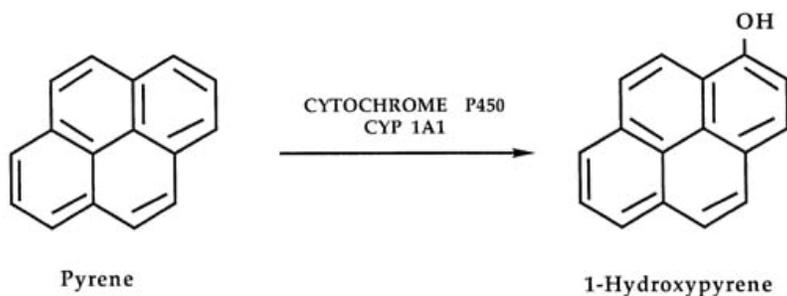


Рис. 1. Схема метаболизма пирена в организме

Учитывая, что в России подобных исследований не проводилось, ФГУП НТЦ РХБГ ФМБА России разработал высокочувствительную и избирательную методику определения метаболита ПАУ 1-гидроксипирена, в наибольшей степени отражающего уровень экспозиции этими ксенобиотиками.

Эта методика позволяет проводить измерения метаболита ПАУ в моче широко используемым в химико-аналитических лабораториях методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Этот метод не только является высокочувствительным и селективным, но и достаточно простым в применении. Кроме того, он не требует большого количества операций при подготовке проб к инструментальному анализу.

Из-за отсутствия нормативов по содержанию 1-гидроксипирена в моче были тщательно проанализированы сведения, имеющиеся в литературе, об уровне содержания этого аналита в моче работников потенциально опасных производств и населения по воздействию ПАУ. Определен диапазон наблюдаемых концентраций. Установлено, что использование фотометрического детектора для этого соединения в ряде случаев может привести к значительной неопределенности в результате измерений. Лучшим способом детектирования можно считать флуоресцентный детектор, который обеспечивает уверенное определение 1-гидроксипирена в моче при небольшом объеме образца.

При анализе используемых методов измерений 1-гидроксипирена в моче, основанных на ВЭЖХ, было установлено, что во всех используется метод внешнего стандарта, надежность которого уступает методу внутреннего стандарта — методу добавок.

Разработанная методика измерений 1-гидроксипирена в моче методом ВЭЖХ основана на гидролизе образцов мочи глюкуронидазой/арилсульфатазой, экстракции 1-гидроксипирена из пробы органическим растворителем пентаном, в которую предварительно внесен раствор внутреннего стандарта 1-гидроксихризена, концентрировании экстракта и последующем его анализе методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с флуоресцентным детектором. Идентификацию 1-гидроксипирена проводят по времени удерживания, устанавливаемого с помощью градуировочного раствора, приготовленного из аттестованного образца. Концентрацию 1-гидроксипирена определяют по площадям соответствующих хроматографических пиков с использованием внутреннего стандарта 1-гидроксихризена. Диапазон измеряемых массовых концентраций 1-гидроксипирена состав-

ляет 0,01—10 мкг/дм³, что обеспечивает получение необходимой информации у работников потенциально опасных производств и населения, подвергающегося воздействию ПАУ. Методика измерений прошла метрологическую экспертизу на соответствие предъявляемым метрологическим требованиям.

Таким образом, методика, разработанная на основе высокочувствительного и селективного метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с флуоресцентным детектором с использованием внутреннего стандарта-имитатора, позволяет эффективно проводить биомониторинг работников производств и населения для адекватной оценки экспозиции высокотоксичными веществами класса ПАУ.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 92 Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. — 2010.
- [2] *Jongeneelen F.J., Bos RPB, Anzion RBMet et al.* Biological monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons metabolites in urine // *Scand. J. Work Environ. Health.* — 1986. — P. 43.
- [3] *Kim Y.-D., et al.* Identification of cytochrome P450 isoforms involved in 1-hydroxylation of pyrene // *Environ. Res.* — 2004. — Vol. 94(3). — P. 262—266.
- [4] *Tsai P.J., Shih T.S., Chen H.L. et al.* Urinary 1-hydroxypyrene as an indicator for assessing the exposures of booth attendants of a highway toll station to polycyclic aromatic hydrocarbons // *Environ Sci. Technol.* — 2004. — Vol. 38. — P. 56—61.

DETERMINATION OF THE PAH METABOLITES IN HUMAN URINE BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

G.V. Zyкова, S.Y. Semenov,
V.N. Smirnov

Federal State Unitary Enterprise Research and Technical
Center of Radiation-Chemical Safety and Hygiene FMBA of Russia
Shchukinskaya str., 40, Moscow, Russia, 123182

Measurement technique of the primary metabolite indicator — 1-hydroxypyrene in human urine is developed for the purposes of the human exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons biomonitoring. The technique is based on the HPLC with a fluorescence detector use employing an internal standard method.

Key words: polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs, measurement technique of the PAH metabolite, 1-hydroxypyrene, urine, biomonitoring, high performance liquid chromatography, fluorescence detector.