



Зайцева Н.В.<sup>1,2</sup>, Нурисламова Т.В.<sup>1,3</sup>, Карнажицкая Т.Д.<sup>1</sup>, Старчикова М.О.<sup>1</sup>

## Количественное определение полициклических ароматических углеводородов в крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с флуориметрическим детектированием для задач социально-гигиенического мониторинга

<sup>1</sup>ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», 614045, Пермь, Россия;

<sup>2</sup>ФГБУ «Российская академия наук», 119071, Москва, Россия;

<sup>3</sup>ФГАОУ ВО «Пермский национальный исследовательский политехнический университет», 614990, Пермь, Россия

**Введение.** Полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) относятся к группе приоритетных загрязнителей окружающей среды, которые поступают в организм человека ингаляционным, пероральным путём или через кожу, вызывая при длительном воздействии нарушение метаболических процессов, хронические и онкологические болезни. Для оценки воздействия полициклических ароматических углеводородов на здоровье населения актуальным является контроль их содержания в биологических средах человека.

**Цель исследования** – разработка и применение методики определения полициклических ароматических углеводородов (нафталина, 2-метилнафталина, антрацена, 9-метилантрацена пирена и бенз(а)пирена) в крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с флуориметрическим детектированием (ВЭЖХ-ФЛД) для задач социально-гигиенического мониторинга.

**Материалы и методы.** Объектом исследований являлись биологические среды (пробы крови). Исследования по разработке методики проведены на жидкостном хроматографе Shimadzu с флуориметрическим детектором RF-20A. Апробация методики проведена в рамках углублённых исследований здоровья детей, проживающих на территориях с различным уровнем экспозиции ( $n = 116$ ).

**Результаты.** Отработаны условия пробоподготовки и параметры проведения хроматографического анализа ПАУ в крови методом ВЭЖХ/ФЛД. Степень извлечения ПАУ из крови методом жидкостной экстракции составила 77–100%. Анализ полициклических ароматических углеводородов в крови показал достоверно более высокие ( $p < 0,05$ ) среднегрупповые концентрации в биосредах детей, проживающих в зоне влияния выбросов промышленных предприятий. Приоритетными соединениями, обнаруженными в крови обследуемых детей, являются пирен, 2-метилнафталин и нафталин.

**Ограничения исследования.** Ограничение исследований связано с периодом отбора проб биологических сред разных возрастных групп на территориях Российской Федерации с различным уровнем экспозиции. Расширение перечня обследуемых групп населения может стать направлением дальнейших исследований по оценке воздействия полициклических ароматических углеводородов на здоровье человека.

**Заключение.** Разработанная методика может быть использована в гигиенических исследованиях при оценке риска для здоровья населения в условиях экспозиции полициклическими ароматическими углеводородами, проживающего на территориях с различной антропогенной нагрузкой.

**Ключевые слова:** полициклические ароматические углеводороды; кровь; детское население; высокоэффективная жидкостная хроматография

**Соблюдение этических стандартов.** Медико-биологические исследования одобрены локальным этическим комитетом при ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения» (выписка из протокола № 2 от 17 февраля 2014 г.). Исследования проведены с соблюдением этических принципов Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (1975 г. с доп. 1983 г.) и Национального стандарта Российской Федерации ГОСТ Р 52379–2005 «Надлежащая клиническая практика» (ICH E6 GCP) при наличии письменного информированного добровольного согласия законных представителей детей.

**Для цитирования:** Зайцева Н.В., Нурисламова Т.В., Карнажицкая Т.Д., Старчикова М.О. Количественное определение полициклических ароматических углеводородов в крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с флуориметрическим детектированием для задач социально-гигиенического мониторинга. *Гигиена и санитария*. 2023; 102(12): 1381–1388. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2023-102-12-1381-1388> <https://elibrary.ru/wpbgaq>

**Для корреспонденции:** Карнажицкая Татьяна Дмитриевна, канд. биол. наук, зав. лаб. методов жидкостной хроматографии ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», 614045, Пермь. E-mail: [tdkam@fcrisk.ru](mailto:tdkam@fcrisk.ru)

**Участие авторов:** Зайцева Н.В. – концепция и дизайн исследования, научная консультация, редактирование; Нурисламова Т.В. – концепция и дизайн исследования, консультация, редактирование; Карнажицкая Т.Д. – написание текста, обработка материала; Старчикова М.О. – сбор и обработка материала. Все соавторы – утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи.

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов в связи с публикацией данной статьи.

**Финансирование.** Исследование выполнено за счёт федерального бюджета.

Поступила: 05.09.2023 / Принята к печати: 15.11.2023 / Опубликовано: 28.12.2023

Nina V. Zaytseva<sup>1,2</sup>, Tatyana V. Nurislamova<sup>1,3</sup>, Tatyana D. Karnazhitskaya<sup>1</sup>,  
Mariya O. Starchikova<sup>1</sup>

## Quantitative determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in the blood by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection for the tasks of socio-hygienic monitoring

<sup>1</sup>Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, 614045, Russian Federation;

<sup>2</sup>Russian Academy of Sciences, 119071, Moscow, Russian Federation; <sup>3</sup>Perm National Research Polytechnic University, Perm, 614990, Russian Federation

**Introduction.** The polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) refer to the group of priority environmental pollutants that enter the human body by inhalation, orally, through the skin, causing a long-term impact on metabolic processes, chronic and oncological diseases. To assess the impact of polycyclic aromatic hydrocarbons on the health of the population, it is actual to evaluate their content in human biological media.

**The purpose of the study** is to develop and apply a methodology for determining the polycyclic aromatic hydrocarbons (naphthalene, 2-methylnaphthalene, anthracene, the 9-methylanthracene, pyrene and benz (a) pyrene) in the blood by a method of highly efficient liquid chromatography with fluorimetric detection (HPLC–FDD) for social and hygienic monitoring problems.

**Materials and methods.** The object of research was biological media (blood samples). Studies on the development of the technique were carried out on the Shimadzu liquid chromatograph with a fluorimetric detector RF-20A. The approximation of the technique was carried out within the framework of deeper studies of children health in residents in territories with various exposure levels.

**Results.** The conditions for sample production and parameters of the chromatographic analysis of blood PAH by the HPLC / FDD method were established. The degree of extraction of PAH from the blood by the method of liquid extraction was 77–100%. The analysis of blood PAH showed average group concentrations to be reliably higher ( $p < 0.05$ ) in the biological media in children living in the zone of influence of emissions of industrial enterprises. Priority compounds detected in the blood of the students are pyrene, naphthalene, 2-methylnaphthalene,

**Limitations** are due to the period of selection of biological media of the different age groups in the territories of the Russian Federation with various levels of exposure. The expansion of the list of the populations can become a direction of further research on assessing the impact of polycyclic aromatic hydrocarbons on human health.

**Conclusion.** The developed methodology can be used in hygienic studies for assessing the risk of conditions of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons for health of residents in the territories with different anthropogenic loads.

**Keywords:** polycyclic aromatic hydrocarbons; blood; children's population; highly efficient liquid chromatography

**Compliance with ethical standards.** Medical and biological studies are approved by the local ethical committee at the Federal Scientific Center for Medical and Preventive Technologies for Risk Management for Health of the Population” (a statement from Protocol No. 2 of February 17, 2014). Studies were carried out with the objectives of the ethical principles of the Helsinki Declaration of the World Medical Association (1975 with additional 1983) and the National Standard of the Russian Federation GOST R 52379-2005 “Proper Clinical Practice” (ICH E6 GCP) in the presence of a written informed voluntary agreement from legal representatives of children.

**For citation:** Zaytseva N.V., Nurislamova T.V., Karnazhitskaya T.D., Starchikova M.O. Quantitative determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in the blood by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection for the tasks of sociohygienic monitoring. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2023; 102(12): 1381–1388. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2023-102-12-1381-1388> <https://elibrary.ru/wpbgaq> (In Russ.)

**For correspondence:** Tatyana D. Karnazhitskaya, MD, PhD, head of the Laboratory of liquid chromatography, Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, 614045, Russian Federation. E-mail: [tdkarn@fcrisk.ru](mailto:tdkarn@fcrisk.ru)

### Information about the authors:

Zaytseva N.V., <https://orcid.org/0000-0003-2356-1145>

Nurislamova T.V., <https://orcid.org/0000-0001-6768-0045>

Karnazhitskaya T.D., <https://orcid.org/0000-0001-6768-0045>

Starchikova M.O., <https://orcid.org/0000-0002-3259-1509>

**Contribution:** Zaytseva N.V. – Concept and design of research, scientific consultation, editing; Nurislamova T.V. – Concept and design of research, consultation, editing; Karnazhitskaya T.D. – writing text, processing of material; Starchikova M.O. – Collection and processing of material. All authors are responsible for the integrity of all parts of the manuscript and approval of the manuscript final version.

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

**Acknowledgement.** The study was performed with support of the federal budget.

Received: September 5, 2023 / Accepted: November 15, 2023 / Published: December 28, 2023

## Введение

Полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) относятся к группе приоритетных загрязнителей окружающей среды, которые образуются преимущественно в результате неполного сгорания органического материала [1, 2]. Наиболее распространёнными источниками выделения ПАУ являются предприятия нефтехимической, нефтеперерабатывающей, коксохимической и других отраслей промышленности, выхлопы автомобилей, предприятия теплоэнергетики, сжигание мусора, сигаретный дым, лесные пожары, вулканическая деятельность, жареная пища, приготовленная на углях и огне, и другие источники. В объектах среды ПАУ встречаются в виде сложных смесей в природных водоёмах, донных отложениях, на взвешенных частицах сажи и пыли в воздухе, частицах почвы, растениях, животных и в других средах. ПАУ попадают в организм человека ингаляционным, пероральным путём или через кожу [3], вызывая

при длительном воздействии даже в малых дозах нарушение метаболизма, хронические и онкологические болезни [4–7].

В организме ПАУ подвергаются биотрансформации. Метаболизм начинается с окисления ПАУ ферментами цитохрома P450 (преимущественно CYP1A1) с образованием первичных метаболитов – гидроксированных ПАУ (ОН-ПАУ). Образовавшиеся продукты метаболизма взаимодействуют с эндогенными гидрофильными соединениями (глюкуроновой кислотой и сульфатами) и выводятся из организма с экскретами [8, 9]. После воздействия период полураспада исходных полициклических ароматических углеводородов составляет примерно 1,4–3,3 ч, гидроксированных ПАУ – от 6 до 35 ч [10]. Для оценки степени неблагоприятного воздействия химических факторов среды обитания и диагностики экозависимых изменений состояния здоровья применяется анализ химических соединений в биологических средах человека (кровь, моча, грудное молоко, слюна, волосы и др.) [11–20].

В настоящее время проводятся исследования низкоуровневого воздействия ПАУ на население в целом. Результаты биомониторинга ПАУ на популяционном уровне, проведённого в ряде стран, свидетельствуют о присутствии широкого спектра ПАУ и их метаболитов в биосредах населения. Так, в пробах крови родительские ПАУ обнаружены в концентрациях от долей  $\text{нг}/\text{см}^3$  до десятков  $\text{нг}/\text{см}^3$  с частотой обнаружения 3–95% [21, 22]. Установлено, что средняя концентрация ПАУ в сыворотке крови взрослого населения, проживающего в условиях мегаполиса, составляет  $4,05 \text{ нг}/\text{см}^3$ , которая в два раза ниже, чем среднее содержание соответствующих гидроксильных метаболитов в моче ( $8,33 \text{ нг}/\text{см}^3$ ). По данным Morgan M. и соавт. [23], концентрация метаболита пирена (1-гидрокси-пирена) в моче детей достигает  $2,7 \text{ нг}/\text{см}^3$ . В исследовании V. Wirnkoj и соавт. [13] в качестве биологических маркёров оценивалось содержание 15 ПАУ (нафталина, аценафтилена, аценафтена, флуорена, антрацена, фенантрена, флуорантена, пирена, бенз(а)антрацена, хризена, бенз(к)флуорантена, бенз(а)пирена, дибенз(аh)антрацена, индено(1,2,3-сd)пирена, бенз(ghi)перилена) в крови детей ( $n = 36$ ) возрастной группы 4–10 лет. Соединения ПАУ обнаружены в крови в концентрациях от  $0,31 \text{ мкг}/\text{дм}^3$  (для аценафтилена) до  $521,9 \text{ мкг}/\text{дм}^3$  (для дибенз(аh)антрацена). Средняя концентрация нафталина в пробах крови составила  $4,7 \text{ мкг}/\text{дм}^3$ , пирена –  $2,1 \text{ мкг}/\text{дм}^3$ , бенз(а)пирена –  $0,12 \text{ мкг}/\text{дм}^3$ , антрацена –  $0,6 \text{ мкг}/\text{дм}^3$ . В Российской Федерации исследования по определению полициклических ароматических углеводородов в биологических средах населения, не подверженного профессиональному воздействию, немногочисленны. Опубликованы материалы по разработке и применению методик анализа 1-гидрокси-пирена в пробах мочи [8, 24], бенз(а)пирена и его метаболитов в биологических средах<sup>1</sup>.

**Цель исследования** – разработка и апробация методики измерения массовых концентраций полициклических ароматических углеводородов (нафталина, 2-метилнафталина, антрацена, 9-метилантрацена пирена и бенз(а)пирена) в крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с флуориметрическим детектированием (ВЭЖХ-ФЛД) для задач социально-гигиенического мониторинга.

## Материалы и методы

Объектом исследований являлись биологические среды (пробы крови). Исследования по разработке методики и количественному определению ПАУ в крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии были проведены на жидкостном хроматографе Shimadzu с флуориметрическим детектором RF-20A.

Изучена эффективность хроматографического разделения нафталина, 2-метилнафталина, антрацена, 9-метилантрацена, пирена, бенз(а)пирена на колонках с обращённой фазой Eclipse XDB C18 ( $4,6 \times 150 \text{ мм}$ ) зернением  $5 \text{ мкм}$  и ZORBAX Eclipse PAH ( $4,6 \times 50 \text{ мм}$ ) зернением  $3,5 \text{ мкм}$  (Agilent Technologies, США). Для оценки хроматографического разделения ПАУ рассчитывали коэффициент селективности  $\alpha$  (фактор разделения) и разрешение пиков  $R$  (степень разделения)<sup>2</sup>.

Подобраны условия работы флуориметрического детектора в режиме перенастройки длин волн возбуждения и эмиссии с использованием программного продукта LabSolution (Shimadzu, Япония). Градуировочные характеристики, выражающие зависимость площади хроматографического пика (единицы люминесценции, е. л.) от концентрации ПАУ

в анализируемом растворе ( $\text{мкг}/\text{см}^3$ ), устанавливали методом абсолютной градуировки с использованием стандартных образцов состава раствора 2-метилнафталина, антрацена, пирена, бенз(а)пирена и чистых веществ нафталина (99%) и 9-метилантрацена (98,5%) (Россия). Расчёт пределов качественного обнаружения LOD (Limit of Detection) и количественного определения LOQ (limit of quantitation) ПАУ проводили как отношение высоты хроматографического пика анализируемого соединения (Signal) к высоте шума (Signal/Noise, S/N) [24].

Определение степени экстракции ПАУ из образцов крови проведено способом «введено – найдено» вблизи нижней и верхней границ и в середине диапазона измеряемых концентраций. Извлечение проводили методом жидкостной экстракции метанолом и ацетонитрилом в условиях кислой и щелочной среды и по методу QuEChERS с использованием экстракционного набора VetExQ-tox кат. № IL-5550-4956 (Interlab, Россия). Перед внесением добавки в холостую пробу крови проверяли присутствие в ней целевых компонентов, в случае обнаружения которых вычитали их содержание из образцов крови с добавкой. Степень экстракции ( $R$ ) рассчитывали по формуле<sup>3</sup>:

$$R = \frac{A \cdot 100}{N},$$

где  $R$  – степень экстракции вещества, %;  $A$  – количество вещества, извлечённое органическим растворителем;  $N$  – заданное количество вещества в образце крови.

В рамках углублённых исследований здоровья детского населения проведён анализ биологических сред детей в возрасте от 7 до 14 лет, проживающих в зоне влияния выбросов предприятий горнодобывающей промышленности ( $n = 39$ , группа наблюдения № 1), цветной металлургии ( $n = 23$ , группа наблюдения № 2), чёрной металлургии ( $n = 32$ , группа наблюдения № 3) и условно чистой территории вне зоны действия промышленных предприятий ( $n = 22$ , группа сравнения).

Статистическую обработку результатов проводили методами математической статистики с использованием программы Microsoft Office Excel 2003 и пакета прикладных программ Statistica 6.0 (StatSoft, США). Различия между группами считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ . При расчёте среднегрупповых показателей содержания ПАУ в крови значения, обнаруженные ниже уровня НПО (нижнего предела определения), приравнивались к нулю.

## Результаты

**Разработка методики.** Изучены условия разделения шести ПАУ на колонках с обращённой фазой C18. Качественное разделение нафталина, 2-метилнафталина, антрацена, 9-метилантрацена пирена и бенз(а)пирена достигнуто на колонке ZORBAX Eclipse PAH ( $4,6 \times 50 \text{ мм}$ ) зернением  $3,5 \text{ мкм}$  в условиях градиентной подачи подвижной фазы, состоящей из смеси ацетонитрила и дистиллированной воды, со скоростью  $0,4 \text{ см}^3/\text{мин}$  (табл. 1) и при увеличении скорости подвижной фазы до  $0,5 \text{ см}^3/\text{мин}$  в период с  $8,5$  до  $15$  мин.

Оптимальные условия работы флуориметрического детектора в режиме перенастройки длин волн возбуждения и эмиссии в зависимости от времени выхода индивидуального ПАУ представлены в табл. 2.

Значения параметров хроматографического разделения нафталина, 2-метилнафталина, антрацена, 9-метилантрацена, пирена и бенз(а)пирена (коэффициента селективности  $\alpha$  и коэффициента разрешения пиков  $R$ ) в оптимальных условиях проведения анализа представлены в табл. 3.

Хроматограмма стандартной смеси шести ПАУ в ацетонитриле с концентрациями  $0,003 \text{ мкг}/\text{см}^3$  в оптимальных условиях разделения представлена на рис. 1.

<sup>1</sup> ФР 1.31.2018.31469 «Методика измерений содержания бенз(а)пирена и его метаболитов в экскретах (моче и кале) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии»; ФР 1.31.2018.31470 «Методика измерений массовой концентрации бенз(а)пирена и его метаболитов в крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии».

<sup>2</sup> Пругло Г.Ф., Фёдорова О.В., Смит Р.А. Хроматографические методы анализа: учебное пособие. ВШТЭ СПбГУПТД. СПб., 2017. 85 с.

<sup>3</sup> Т. Байзолданов. Токсикологическая химия: учебник. Алматы: Эверо, 2021. 240 с. ISBN 978-601-310-684-7

Таблица 1 / Table 1

**Режим градиентной подачи подвижной фазы для эффективного разделения изучаемых компонентов**  
**Gradient supply mode of the mobile phase for efficient separation of the studied components**

Время, мин Time, min	Объёмная доля, % Volume fraction of acetonitrile, %	Объёмная доля дистиллированной воды, % Volume fraction of distilled water, %
0	80	20
0–8.5	80–100	0–20
8.5–15.0	100	0
15.0–15.5	100–80	0–20
15.5–25.0	80	20

Таблица 2 / Table 2

**Режим программирования длин волн возбуждения  $\lambda_{ex}$  и эмиссии  $\lambda_{em}$  детектора**

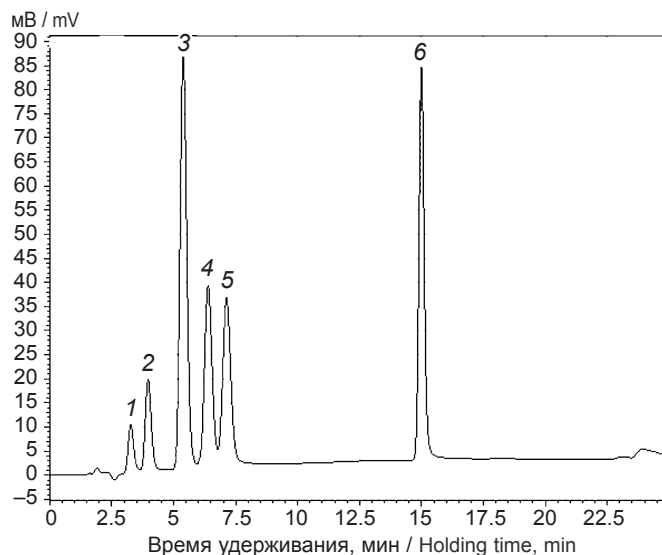
**Programming mode of excitation wavelengths  $\lambda_{ex}$  and emission  $\lambda_{em}$  of the detector**

Соединение Compound	Событие, мин Event, min	$\lambda_{ex}$ , нм (nm)	$\lambda_{em}$ , нм (nm)	Время выхода ПАУ, мин PAH release time, min
Нафталин Naphthalene	0	270	335	3.34 ± 0.2
2-метилнафталин 2-methylnaphthalene	4.9	270	335	4.08 ± 0.2
Антрацен Anthracene	6.0	249	402	5.58 ± 0.2
9-метилантрацен 9-methylanthracene	7.4	238	390	6.65 ± 0.2
Пирен Pyrene	8.5	238	390	7.38 ± 0.2
Бенз(а)пирен Benz(a)pyrene	9.5	264	412	15.02 ± 0.2

Таблица 3 / Table 3

**Хроматографические параметры разделения ПАУ**  
**Chromatographic parameters for the separation of PAHs**

Соединение Compound	Коэффициент селективности, $\alpha$ Selectivity coefficient, $\alpha$	Коэффициент разрешения пиков, $R$ Peak resolution factor, $R$	Ширина пиков $W$ , мин Peak width $W$ , min
Нафталин Naphthalene	1.33	2.6	0.5
2-метилнафталин 2-methylnaphthalene	1.22	1.2	0.75
Антрацен Anthracene	1.37	1.7	1.0
9-метилантрацен 9-methylanthracene	1.19	1.2	0.75
Пирен / Pyrene	1.12	1.0	0.75
Бенз(а)пирен Benz(a)pyrene	2.02	8.7	1.0



- 1 – Нафталин / Naphthalene  
 2 – 2-метилнафталин / 2-methylnaphthalene  
 3 – Антрацен / Anthracene  
 4 – 9-метилантрацен / 9-methylanthracene  
 5 – Пирен / Pyrene  
 6 – Бенз(а)пирен / Benz(a)pyrene

**Рис. 1.** Хроматограмма разделения стандартной смеси ПАУ в ацетонитриле с концентрацией 0,003 мкг/см<sup>3</sup>.

**Fig. 1.** Chromatogram of the separation of a standard mixture of PAHs in acetonitrile with a concentration of 0.003 µg/cm<sup>3</sup>.

Построены градуировочные зависимости  $y = ax + b$  в диапазоне концентраций от 0,00005 до 0,005 мкг/см<sup>3</sup> для нафталина и 2-метилнафталина, от 0,000025 до 0,005 мкг/см<sup>3</sup> для пирена, 9-метилантрацена и бенз(а)пирена, от 0,0001 до 0,0025 мкг/см<sup>3</sup> для антрацена. Рассчитаны градуировочные коэффициенты ( $K$ ) для измерения массовых концентраций ПАУ в анализируемой пробе (экстракте). Достоверность аппроксимаций ( $R^2$ ) варьировала в пределах 0,9988–0,9999, погрешность построения градуировочных зависимостей составила 10–14%. В заданном диапазоне измерений сохраняется линейность зависимости сигнала флуориметрического детектора от концентрации ПАУ в ацетонитриле.

Следующим этапом исследований являлось изучение способов извлечения ПАУ из крови (табл. 4).

**Сравнение эффективности извлечения ПАУ из крови различными способами** показало более высокую степень извлечения шести ПАУ из матрицы методом жидкостной экстракции при подщелачивании образцов крови. Процедуру жидкостной экстракции проводят следующим образом. В полипропиленовую пробирку вместимостью 15 см<sup>3</sup> помещают 1 см<sup>3</sup> крови, 150 мм<sup>3</sup> водного раствора NaOH 0,2 М, содержимое пробирки перемешивают вручную, добавляют 1 см<sup>3</sup> ацетонитрила, интенсивно перемешивают в течение 1 мин, добавляют 0,5 г NaCl, пробу перемешивают и центрифугируют при комнатной температуре со скоростью 5000 об./мин в течение 10 мин. После расслоения отделяют верхний слой, фильтруют через фильтр из политетрафторэтилена и анализируют аликвоту 10 мм<sup>3</sup> в отработанном режиме хроматографирования. Степень экстракции учитывали при анализе массовых концентраций ПАУ в крови. Хроматограммы анализа образца крови и образца крови с добавлением стандартов ПАУ с применением жидкостной экстракции представлены на рис. 2.

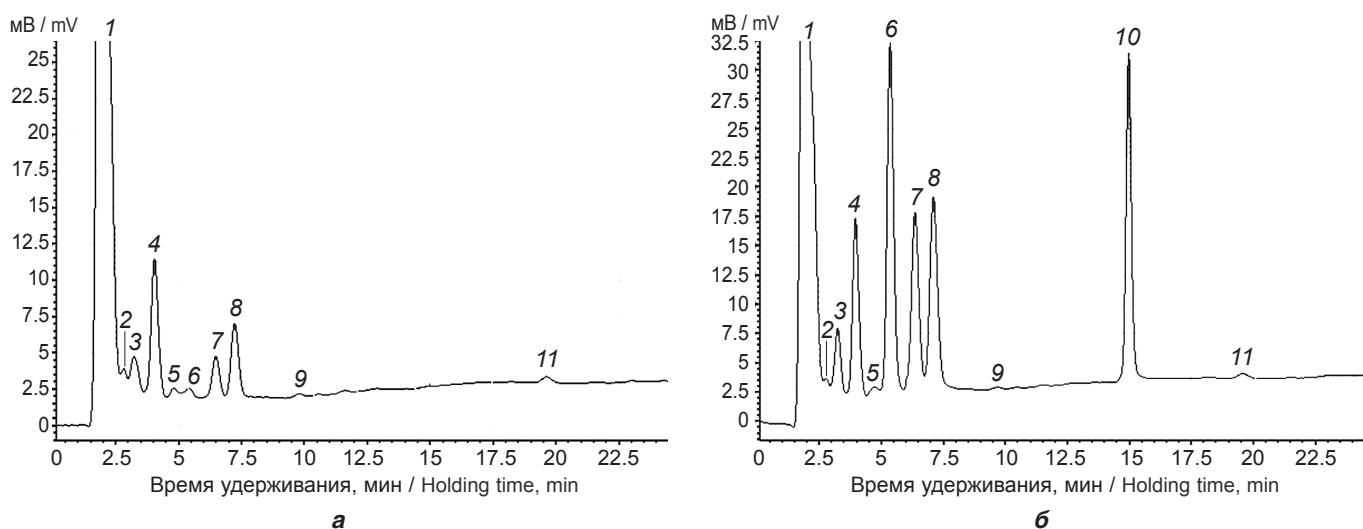
В соответствии с данной методикой проанализированы биологические среды (кровь) детей в рамках проведения углублённого наблюдения за здоровьем детского населения, проживающего в условиях экспозиции и относительного экологического благополучия. Результаты анализа представлены в табл. 5.

Таблица 4 / Table 4

Эффективность извлечения нафталина, 2-метилнафталина, антрацена, 9-метилантрацена, пирена, бенз(а)пирена из крови методами жидкостной экстракции и QuEChERS

Efficiency of extraction of naphthalene, 2-methylnaphthalene, anthracene, 9-methylanthracene, pyrene, benzo(a)pyrene from blood by liquid extraction methods and QuEChERS

Соединение Compound	Степень экстракции (%) методом жидкостной экстракции Extraction degree (%) by liquid extraction method		Степень экстракции (%) методом QuEChERS Extraction degree (%) by QuEChERS method	
	pH 6.0	pH 5.0	pH 6.0	pH 5.0
Нафталин / Naphthalene	95 ± 4	81	86 ± 2	77
2-метилнафталин / 2-methylnaphthalene	80 ± 4	53	86 ± 2	74
Антрацен / Anthracene	100 ± 2	83	89 ± 3	80
9-метилантрацен / 9-methylanthracene	100 ± 3	78	73 ± 4	79
Пирен / Pyrene	100 ± 3	78	80 ± 4	86
Бенз(а)пирен / Benz(a)pyrene	77 ± 4	63	63 ± 3	67



		Время удерживания, мин Holding time, min	
		а	б
1, 2, 5, 9, 11	Неидентифицированные пики компонентов крови / Unidentified peaks of blood components	–	–
3	Нафталин / Naphthalene	3.236	3.243
4	2-метилнафталин / 2-methylnaphthalene	4.042	3.957
6	Антрацен / Anthracene	5.424	5.358
7	9-метилантрацен / 9-methylanthracene	6.477	6.360
8	Пирен / Pyrene	7.231	7.104
10	Бенз(а)пирен / Benz(a)pyrene	–	14.976

Рис. 2. Хроматограммы анализа образца крови (а) и образца крови с добавкой стандартов ПАУ ( $C = 0,00055 \text{ мкг/см}^3$ ) (б).

Fig. 2. Chromatograms of the analysis of a blood sample (a) and a blood sample with the addition of PAH standards ( $C = 0.00055 \text{ } \mu\text{g/cm}^3$ ) (b).

Максимальные среднегрупповые концентрации в крови детей установлены для нафталина, 2-метилнафталина и 9-метилантрацена в зоне влияния предприятия чёрной металлургии (группа наблюдения № 3), антрацена и пирена в зоне влияния выбросов горнодобывающего предприятия (группа наблюдения № 1). Бенз(а)пирен в группе наблюдения № 1 обнаружен в одной пробе, в группе наблюдения № 2 определён в двух пробах, в группе наблюдения № 3 – в пяти пробах, в группе № 4 бенз(а)пирен в крови детей отсутствует. По сумме шести полициклических ароматических углеводородов максимальные среднегрупповые концентрации установлены в крови детей группы № 1, проживающих в зоне влияния предприятия горнодобывающей промышленности. На территории сравнения (группа № 4) установлены достоверно более низкие ( $p \leq 0,01$ ) по срав-

нению с группами наблюдения среднегрупповые концентрации в крови детей антрацена с частотой обнаружения 59,1%, 9-метилантрацена и пирена с частотой обнаружения 97,4%, что может свидетельствовать о широком распространении этих соединений в среде обитания и хроническом воздействии в малых дозах. Остальные ПАУ в крови детей группы сравнения не обнаружены. Максимальные концентрации ПАУ в крови детей установлены для пирена, нафталина и 2-метилнафталина, что согласуется с литературными данными [15].

Наиболее часто (в 90,9–100% проанализированных проб) обнаруживался пирен, реже всего определялся бенз(а)пирен – в 2,5–15,6% проб. Нафталин обнаружен в 65,9% проб, 2-метилнафталин – в 88,8% проб, антрацен – в 78,8%, 9-метилантрацен обнаружен в 91,8% проб.

Таблица 5 / Table 5

**Среднегрупповые концентрации, диапазоны концентраций и % обнаружения ПАУ в образцах крови детей групп наблюдения и сравнения**

**Average group concentrations, concentration ranges and % detection of PAHs in blood samples in children from observation and control groups**

Показатель Indicator	Концентрация в крови, мкг/см <sup>3</sup>   Blood concentration, µg/cm <sup>3</sup>						
	Группа наблюдения № 1 Observation group No. 1	p <sub>1</sub> *	Группа наблюдения № 2 Observation group No. 2	p <sub>2</sub> *	Группа наблюдения № 3 Observation group No. 3	p <sub>3</sub> *	Группа сравнения № 4 Comparison group No. 4
<i>Нафталин / Naphthalene</i>							
Среднее по группе Group average	0.00010 ± 0.00009	0.03	0.00024 ± 0.00011	≤ 0.01	0.00038 ± 0.00029	0.01	< НПО** < LDL**
Диапазон обнаруженных концентраций Range of detected concentrations	0.00005–0.00178	–	0.00005–0.00102	–	0.00005–0.00331	–	< НПО < LDL
% положительных проб % positive samples	36.0	–	86.9	–	75.0	–	0
<i>2-метилнафталин / 2-methylnaphthalene</i>							
Среднее по группе Group average	0.00088 ± 0.00024	≤ 0.01	0.00060 ± 0.00024	≤ 0.01	0.00113 ± 0.00013	≤ 0.01	< НПО*** < LDL***
Диапазон обнаруженных концентраций Range of detected concentrations	0.000136–0.00225	–	0.00015–0.00230	–	0.000613–0.00198	–	< НПО < LDL
% положительных проб % positive samples	79.5	–	86.9	–	100	–	0
<i>Антрацен / Anthracene</i>							
Среднее по группе Group average	0.00005 ± 0.00001	≤ 0.01	0.000022 ± 0.000006	≤ 0.01	0.00003 ± 0.000007	≤ 0.01	0.00001 ± 0.000003
Диапазон обнаруженных концентраций Range of detected concentrations	0.000027–0.00013	–	0.000013–0.000052	–	0.000011–0.000082	–	0.00001–0.000021
% положительных проб % positive samples	76.9	–	82.6	–	96.8	–	59.1
<i>9-метилантрацен / 9-methylanthracene</i>							
Среднее по группе Group average	0.00022 ± 0.00006	≤ 0.01	0.00011 ± 0.00003	≤ 0.01	0.00027 ± 0.00004	≤ 0.01	0.00004 ± 0.000006
Диапазон обнаруженных концентраций Range of detected concentrations	0.000026–0.00096	–	0.000031–0.00029	–	0.000073–0.000441	–	0.000029–0.000067
% положительных проб % positive samples	94.8	–	78.2	–	96.8	–	97.4
<i>Пирен / Pyrene</i>							
Среднее по группе Group average	0.00264 ± 0.00073	≤ 0.01	0.00067 ± 0.00023	≤ 0.01	0.00142 ± 0.00040	≤ 0.01	0.00014 ± 0.00004
Диапазон обнаруженных концентраций Range of detected concentrations	0.000040–0.011	–	0.000096–0.001975	–	0.000128–0.00486	–	0.000036–0.000307
% положительных проб % positive samples	97.4	–	90.9	–	100	–	97.4
<i>Бенз(а)пирен / Benz(a)pyrene</i>							
Среднее по группе Group average	–	–	–	–	0.000006 ± 0.000005	0.03	< НПО**** < LDL****
Диапазон обнаруженных концентраций Range of detected concentrations	0–0.000093 1 проба / 1 sample	–	0–0.00003 2 пробы / 2 samples	–	0.000031–0.000055 5 проб / 5 samples	–	< НПО < LDL
% положительных проб % positive samples	2.5	–	8.6	–	15.6	–	0
Сумма среднегрупповых концентраций ПАУ Sum of average PAH group concentrations	0.00389	≤ 0.01	0.00165	≤ 0.01	0.00323	≤ 0.01	0.00019

Примечание. \* p<sub>1</sub>, p<sub>2</sub>, p<sub>3</sub> – межгрупповые различия по средним групп наблюдения № 1–3 с группой сравнения № 4. НПО (нижний предел определения) в крови: \*\* нафталина – 0,00005 мкг/см<sup>3</sup>; \*\*\* 2-метилнафталина – 0,00005 мкг/см<sup>3</sup>; \*\*\*\* бенз(а)пирена – 0,000025 мкг/см<sup>3</sup>.

Note: \* p<sub>1</sub>, p<sub>2</sub>, p<sub>3</sub> – intergroup differences between observation group averages № 1–3 with comparison group № 4; \*\* LDL = 0,00005 µg/cm<sup>3</sup> (blood naphthalene); \*\*\* LDL = 0,00005 µg/cm<sup>3</sup> (lower detection limit) of blood 2-methylnaphthalene; \*\*\*\* LDL = 0,000025 µg/cm<sup>3</sup> (lower detection limit) of blood benzo(a)pyrene.

## Обсуждение

Приоритетным методом анализа родительских ПАУ в крови является метод газовой хроматографии/масс-спектрометрии, который обладает высокой чувствительностью и селективностью определения ПАУ. Вместе с тем имеются данные о применении метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с флуориметрическим детектированием для анализа ПАУ в крови. Эффективность анализа в большой степени зависит от процедуры пробоподготовки. В настоящей работе предложен простой и эффективный способ извлечения анализируемых ПАУ из цельной крови методом жидкостной экстракции ацетонитрилом в присутствии хлорида натрия с предварительной обработкой пробы щелочным раствором. Для подтверждения наличия или отсутствия ПАУ в анализируемой пробе применяли метод добавок при повторном анализе пробы с добавлением в неё стандартного раствора с известным количеством целевых компонентов.

По данным литературы, результаты биомониторинговых исследований содержания ПАУ в крови и других средах у взрослых и детей, проживающих на территориях с различным уровнем экспозиции, демонстрируют повсеместное воздействие этих загрязнителей на население. Преобладающими среди ПАУ соединениями, обнаруживаемыми в биологических средах, являются пирен, нафталин, а также флуорен и аценафтен [15, 25–27]. Бенз(а)пирен, по данным зарубежной литературы, обнаруживается в единичных пробах с частотой обнаружения менее 25% в концентрациях на уровне нижнего предела определения (НПО) [25, 27].

В настоящем исследовании содержание ПАУ в образцах крови детей обнаружено в концентрациях от НПО до

0,00001 (НПО антрацена) до 0,011 мкг/см<sup>3</sup>. Пирен был преобладающим соединением и обнаруживался чаще других ПАУ (96,4% проб) с максимальной среднегрупповой концентрацией, составляющей 0,0026 мкг/см<sup>3</sup>, и максимальной индивидуальной концентрацией 0,011 мкг/см<sup>3</sup>. Бенз(а)пирен в крови детей обнаружен в 6,6% проб из 116 проанализированных. Установлено достоверно более высокое ( $p \leq 0,05$ ) среднегрупповое содержание анализируемых соединений в крови детей, проживающих в зоне влияния выбросов промышленных предприятий, в отличие от детей группы сравнения, у которых обнаружены три (пирен, антрацен и 9-метилантрацен) из шести контролируемых ПАУ. В целом проведённые исследования коррелируют с литературными данными о содержании полициклических ароматических углеводородов в крови детского и взрослого населения.

**Ограничения исследования.** Ограничение исследований связано с периодом отбора проб биологических сред разных возрастных групп на территориях Российской Федерации с различным уровнем экспозиции. Расширение перечня обследуемых групп населения может стать направлением дальнейших исследований для оценки воздействия полициклических ароматических углеводородов на здоровье человека.

## Заключение

Разработанная методика может быть использована в гигиенических исследованиях для оценки риска для здоровья населения в условиях экспозиции полициклическими ароматическими углеводородами на территориях с различной антропогенной нагрузкой.

## Литература

(п.п. 1–3, 5–7, 9, 10, 12–20, 22–24, 26–28 см. References)

- Лужецкий К.П., Устинова О.Ю., Маклакова О.А., Палагина Л.Н. Особенности эндокринных нарушений у детей, проживающих в условиях высокого риска ингаляционного воздействия бензола, фенола и без(а)-пирена. *Анализ риска здоровью*. 2014; (2): 97–103. <https://elibrary.ru/sijhzt>
- Зыкова Г.В., Семёнов С.Ю., Смирнов В.Н. Определение метаболитов ПАУ в моче человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. *Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Экология и безопасность жизнедеятельности*. 2014; (2): 128–31. <https://elibrary.ru/sdfgjn>
- Зайцева Н.В., Онищенко Г.Г., Май И.В., Шур П.З. Развитие методологии анализа риска здоровью в задачах государственного управления санитарно-эпидемиологическим благополучием населения. *Анализ риска здоровью*. 2022; (3): 4–20. <https://doi.org/10.21668/health.risk/2022.3.01> <https://elibrary.ru/imrune>
- Карнажицкая Т.Д., Старчикова М.О. Анализ результатов мониторинга полициклических ароматических углеводородов в крови для оценки риска воздействия на здоровье. В кн.: *Анализ риска здоровью – 2023. Совместно с международной встречей по окружающей среде и здоровью RISE-2023. Материалы XIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием*. Пермь: 2023: 160–7. <https://elibrary.ru/zdlkus>
- Шаяхметов С.Ф., Журба О.М., Алексеев А.Н., Меринов А.В. Применение хромато-масс-спектрометрических методов определения маркеров экспозиции в биомониторинговых исследованиях у работников производств поливинилхлорида и алюминия. *Гигиена и санитария*. 2020; 99(10): 1159–64. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2020-99-10-1159-1164> <https://elibrary.ru/kplyr>

## References

- Abdel-Shafy H.I., Mansour M.S.M. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egypt. J. Pet.* 2016; 25(1): 107–23. <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2015.03.011>
- Gao P., da Silva E., Hou L., Denslow N.D., Xiang P., Ma L.Q. Human exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: Metabolomics perspective. *Environ. Int.* 2018; 119: 466–77. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.07.017>
- Ma Y., Harrad S. Spatiotemporal analysis and human exposure assessment on polycyclic aromatic hydrocarbons in indoor air, settled house dust, and diet: A review. *Environ. Int.* 2015; 84: 7–16. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.07.006>
- Luzhetskiy K.P., Ustinova O.Yu., Maklakova O.A., Palagina L.N. Characteristics of endocrine disorders in children, living in conditions of high level risk of inhalation exposure to benzene, phenol, benzo (a) pyrene. *Анализ риска здоровью*. 2014; (2): 111–20. <https://elibrary.ru/pmxyu>
- Smith M., Walker D., Uppal K., Utell M., Hopke P., Mallon T., et al. Benzo[a]pyrene perturbs mitochondrial and amino acid metabolism in lung epithelial cells and has similar correlations with metabolic changes in human serum. *Occup. Environ. Med.* 2019; 61(Suppl. 12): S73–81. <https://doi.org/10.1097/JOM.0000000000001687>
- Cao L., Wang D., Zhu C., Wang B., Cen X., Chen A., et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon exposure and atherosclerotic cardiovascular disease risk in urban adults: The mediating role of oxidatively damaged DNA. *Environ. Pollution*. 2020; 265(Pt. A): 114860. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114860>
- Patel A., Mehta S., White A., Niehoff N., Arroyave W., Wang A., et al. Urinary polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites and mortality in the United States: A prospective analysis. *PLoS One*. 2021; 16(6): e0252719. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0252719>
- Zykova G.V., Semenov S.Yu., Smirnov V.N. determination of the PAH metabolites in human urine by high-performance liquid chromatography. *Vestnik Rossiyskogo universiteta druzhby narodov. Seriya: Ekologiya i bezopasnost' zhiznedeyatel'nosti*. 2014; (2): 128–31. <https://elibrary.ru/sdfgjn> (in Russian)
- Garcia-Garcia S., Matilla-Gonzalez H., Pena J., Sanchez M., Casas-Ferreira A., Pavon J. Determination of hydroxy polycyclic aromatic hydrocarbons in human urine using automated microextraction by packed sorbent and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Environ. Res. Public Health*. 2022; 19(20): 13089. <https://doi.org/10.3390/ijerph192013089>
- Guo Y., Senthikumar K., Alomirah H., Moon H., Minh T., Mohd M., et al. Concentrations and profiles of urinary polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites (OH-PAHs) in several Asian countries. *Environ. Sci. Technol.* 2013; 47(6): 2932–8. <https://doi.org/10.1021/es3052262>
- Zaytseva N.V., Onishchenko G.G., May I.V., Shur P.Z. Developing the methodology for health risk assessment within public management of sanitary-epidemiological welfare of the population. *Анализ риска здоровью*. 2022; (3): 4–20. <https://doi.org/10.21668/health.risk/2021.4.03> <https://elibrary.ru/mdrqak>
- Gruber B., Schneider J., Föhlinger M., Buters J., Zimmermann R., Matuschek G. A minimal-invasive method for systemic bio-monitoring of the environmental pollutant phenanthrene in humans: Thermal extraction and gas chromatography-mass spectrometry from 1 mL capillary blood. *J. Chromatogr. A*. 2017; 1487: 254–7. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.01.045>

13. Wirnkor V., Ngozi V., Ajero C., Charity L., Ngozi O., Ebere E., et al. Biomonitoring of concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons in blood and urine of children at playgrounds within Owerri, Imo State, Nigeria. *Environ. Anal. Health Toxicol.* 2019; 34(4): e2019011-0. <https://doi.org/10.5620/eaht.e2019011>
14. Hua L., Guo S., Wang Y., Sun H., Zhao H. Simultaneous determination of multiple isomeric hydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons in urine by using ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2021; 1184: 122983. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.122983>
15. Yang Z., Guo C., Li Q., Zhong Y., Ma S., Zhou J., et al. Human health risks estimations from polycyclic aromatic hydrocarbons in serum and their hydroxylated metabolites in paired urine samples. *Environ. Pollut.* 2021; 290: 117975. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117975>
16. Urbancova K., Lankova D., Rossner P., Rossnerova A., Svecova V., Tomaniova M., et al. Evaluation of 11 polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in urine of Czech mothers and newborns. *Sci. Total Environ.* 2017; 577: 212–9. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.10.165>
17. Martin-Tornero E., Luque-Uria A., Durán-Meras 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>
18. Santos P., Carracedo C., Sánchez M., Pavón J., Cordero B. A sensitive and automatic method based on microextraction by packed sorbents for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in saliva samples. *Microchem. J.* 2020; 152: 104274. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104274>
19. Yamamoto Y., Ishizaki A., Kataoka H. Biomonitoring method for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in hair by online in-tube solid-phase microextraction coupled with high performance liquid chromatography and fluorescence detection. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2015; 1000: 187–91. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.07.033>
20. Wang C., Zhou S., Wu S., Tang J., Li H., Du J. Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in people living in urban and rural areas as revealed by hair analysis. *Chemosphere.* 2020; 246: 125764. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125764>
21. Karnazhitskaya T.D., Starchikova M.O. Analysis of the results of monitoring polycyclic aromatic hydrocarbons in the blood to assess the risk of health effects. *Health Risk Analysis – 2023. Together with the International Meeting on Environment and Health RISE-2023. Materials of the XIII All-Russian Scientific-Practical Conference with International Participation [Analiz riska zdorov'yu – 2023. Sovmestno s mezhduнародnoy vstrechey po okruzhayushchey srede i zdorov'yu RISE-2023. Materialy XIII Vserossiyskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii s mezhduнародnym uchastiem]*. Perm'; 2023: 160–7. <https://elibrary.ru/zdlkus> (in Russian)
22. Salami F., Hajizadeh Y., Yadegarfar G., Ebrahimpour K., Pourzamani H., Poursafa P. Urinary levels of PAH metabolites in pregnant women and their correlation with sociodemographic factors and PM<sub>2.5</sub> exposure in an urban and a suburban area. *Air Qual. Atmos. Health.* 2021; 14(5): 653–65. <https://doi.org/10.1007/s11869-020-00969-6>
23. Morgan M., Jones P., Sobus J., Chuang J., Wilson N. Using urinary biomarkers to evaluate polycyclic aromatic hydrocarbon exposure in 126 preschool children in Ohio. *Int. J. Environ. Health Res.* 2015; 25(6): 628–39. <https://doi.org/10.1080/09603123.2014.1003039>
24. Wirnkor V., Ngozi V., Ajero C., Charity L., Ngozi O., Ebere E., Emeka A. Biomonitoring of concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons in blood and urine of children at playgrounds within Owerri, Imo State, Nigeria. *Environmental Analysis Health and Toxicology.* 2019. 34(4): e2019011. <https://doi.org/10.5620/eaht.e2019011>
25. Shayakhmetov S.F., Zhurba O.M., Alekseenko A.N., Merinov A.V. Application of chromatographic-mass-spectrometric methods of determination of exposure markers in biomonitoring researches in workers of productions of polyvinyl chloride and aluminum. *Gigiena i Sanitaria (Hygiene and Sanitation, Russian journal).* 2020; 99(10): 1159–64. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2020-99-10-1159-1164> <https://elibrary.ru/kplary> (in Russian)
26. Yin S., Tang M., Chen F., Li T., Liu W. Environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): The correlation with and impact on reproductive hormones in umbilical cord serum. *Environ. Pollut.* 2017; 220(Pt. B): 1429–37. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.10.090>
27. Chrysochou E., Kanellopoulos P., Koukoulakis K., Sakellari A., Karavoltos S., Minaidis M., et al. Heart failure and PAHs, OHPAHs, and trace elements levels in human serum: results from a preliminary pilot study in Greek population and the possible impact of air pollution. *Molecules.* 2021; 26(11): 3207. <https://doi.org/10.3390/molecules26113207>
28. Jia Y., Li W., Li Y., Zhao L., Li C., Wang L., et al. The levels of polycyclic aromatic hydrocarbons and their derivatives in plasma and their effect on mitochondrial DNA methylation in the oilfield workers. *Toxics.* 2023; 11(5): 466. <https://doi.org/10.3390/toxics11050466>