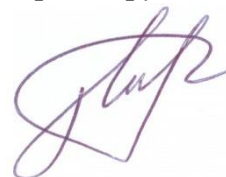


МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи



Чжан Мончжу

**Высокочувствительное хромато-масс-спектрометрическое определение
популяционных веществ-маркеров на примере котинина, 5-гидроксииндол-3-
уксусной кислоты и этилсульфата в моче и сточных водах**

02.00.02. – Аналитическая химия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва 2018

Работа выполнена на кафедре аналитической химии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

Научный руководитель:

доктор химических наук, профессор
Пирогов Андрей Владимирович

Официальные оппоненты:

доктор химических наук, профессор
Боголицын Константин Григорьевич
ФГАОУ ВО Северный (Арктический)
федеральный университет имени М.В. Ломоносова

доктор фармацевтических наук, профессор
Кузьменко Алексей Николаевич
ФГАОУ ВО Первый Московский государственный
медицинский университет имени И.М. Сеченова
Минздрава России

кандидат химических наук
Мазур Дмитрий Михайлович
ФГБОУ ВО Московский государственный
университет имени М.В. Ломоносова

Защита диссертации состоится «31» октября 2018 г. в 16 часов 30 минут на заседании диссертационного совета МГУ.02.05 по химическим наукам при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, МГУ, д. 1, стр. 3, химический факультет, ауд. 446.

E-mail: dissovet02.00.02@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <http://istina.msu.ru/dissertations/140607729/>

Автореферат разослан «20» сентября 2018 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат химических наук



И.А. Ананьева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Определение концентраций веществ - биомаркеров (далее – биомаркеров) в сточных водах всё чаще рассматривается как важный инструмент оценки здоровья, питания и употребления различных веществ человеком. Развитие аналитических методов сделало возможным выявление специфических продуктов метаболизма лекарственных средств, алкоголя, табака и наркотиков, выделяемых потребителями с мочой, при анализе сточных вод, поступающих на водоочистные сооружения. В большинстве современных источников данный подход обозначают термином «Эпидемиология на основе анализа сточных вод». Некоторые биомаркеры используются для оценки численности населения, так как фактическое население в городах может значительно отличаться от официальных цифр, что неизбежно приводит к ошибкам оценки воздействия различных факторов на людей при расчёте их на душу населения. Для оценки количества населения могут использоваться как результаты определения эндогенных веществ, так и веществ, выделяемых человеком в результате употребления различных продуктов, таких как сигареты, алкоголь, продукты, содержащие сахарозаменители и т.п.

Основным метаболитом никотина является котинин. Уровень котинина в моче пропорционален сумме воздействия табачного дыма, поэтому он является ценным индикатором воздействия табачного дыма на организм. Содержание котинина в сточных водах может служить параметром суммарного потребления табака и уровня его потребления на душу населения.

5-гидроксииндол-3-уксусная кислота является основным метаболитом серотонина, который выводится мочой и может быть использована в качестве биомаркера для оценки численности населения. Определение этого метаболита серотонина считается более предпочтительным, чем измерение самого серотонина с точки зрения правильности результатов.

Специфическими прямыми биомаркерами употребления этанола человеком являются продукты его метаболизма – этилглюкуронид и этилсульфат несмотря на то, что содержания этилглюкуронида и этилсульфата в моче не превышает 0.02 и 0.011%, соответственно, от исходной дозы употребляемого этанола. Учитывая то, что концентрация вышеперечисленных метаболитов в сточных водах крайне низка, присутствует сложная матрица образца и отсутствуют конкретные уровни их содержания в моче и сточных водах, чрезвычайно важно разработать высокочувствительный способ определения данных веществ-маркеров.

Цель работы состояла в разработке способов количественного определения микроконцентраций специфических биомаркеров (котинина, 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты и этилсульфата), экскретируемых с мочой в сточных водах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием. Выявить основные аналитические характеристики разработанных способов. Оценить содержание этих биомаркеров в сточных водах, отобранных на водоочистой станции Московской области и использовать их в качестве популяционных маркеров для определения численности населения, а также в качестве курсоров употребления табака и алкоголя (для данных к новому направлению в эпидемиологии – wastewaters-based epidemiology). Достижение поставленной цели предусматривало решение следующих задач:

- ✓ Разработка способа количественного определения котинина в моче и сточных водах методом ВЭЖХ-МС/МС на уровне 0.01 нг/мл.

- ✓ Разработка способа количественного определения 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты в моче и сточных водах методом ВЭЖХ-МС/МС на уровне 0.1 нг/мл.
- ✓ Определение этилсульфата в моче и сточных водах методом ВЭЖХ-МС/МС на уровне 0.5 нг/мл.
- ✓ Оценка возможности совместного определения котинина, 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты и этилсульфата методом ВЭЖХ-МС/МС в сточных водах.
- ✓ Сбор, обработка и интерпретация полученных данных по содержаниям этих биомаркеров в сточных водах одного локального поселения и предприятия в Московской области.
- ✓ Первичное сравнение с результатами, полученными традиционным эпидемиологическими методами.

Научная новизна. Предложены новые способы высокочувствительного раздельного и совместного определения котинина, 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты и этилсульфата в моче и сточных водах. Они основаны на применении гидрофильной жидкостной хроматографии (HILIC) в сочетании с tandemным масс-спектрометрическим детектированием. Продемонстрированы преимущества такого варианта перед традиционным ОФ-ВЭЖХ.

На примере анализа реальных объектов показано, что чувствительность предложенного способа определения котинина и 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты и этилсульфата в сточных водах в 4-5 раз (усреднено) выше по сравнению с лучшими из существующих способов определения данных веществ методом ВЭЖХ-МС/МС. Устранено мешающее влияние матричных компонентов объектов анализа.

Практическая значимость. Продемонстрировано значительное упрощение процедуры пробоподготовки сточной воды. Время подготовки сокращается в 4 раза (с 60 до 15 минут) при совместном определении метаболитов.

Разработанный способ определения биомаркеров открывает возможность к получению экспериментальных результатов по уровню потребления в исследуемой популяции алкоголя и никотина для нового направления в эпидемиологии – wastewaters-based epidemiology. Впервые в России получены такие данные и проведено их сравнение с соответствующими показателями ряда городов Европы.

На защиту выносятся следующие положения:

- Закономерности и степени извлечения котинина (методом твердофазной экстракции), 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты (методом жидкость-жидкостной экстракции) из мочи и сточных вод.
- Результаты по удерживанию, эффективности, селективности определения и другие аналитические характеристики способов определения котинина, 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты и этилсульфата в моче и сточных водах методом ВЭЖХ-МС/МС.
- Условия и аналитические характеристики способа совместного определения котинина, 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты и этилсульфата.
- Данные по интерпретации экспериментальных результатов по уровню потребления алкоголя и никотина в локальной популяции.

Апробация работы. Основное содержание работы изложено в 8 публикациях. Результаты исследования докладывались на Всероссийская конференция «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез» (Краснодар, 2017), 46th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques HPLC 2017 Jeju Чечжу, Республика Корея, 2017), The 21st Annual Meeting of the Israel Analytical Chemistry Society Conference&Exhibition «Isranalytica 2018»

(Тель-Авив, Израиль, 2018), XI International Mass Spectrometry Conference on Petrochemistry, Environmental and Food Chemistry «Petromass 2018» (Блед, Словения, 2018).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 4 статьи (все в журналах, индексируемых в базах данных RSCI и в изданиях из перечня, рекомендованных Минобрнауки РФ) и 4 тезиса докладов.

Личный вклад автора. Личный вклад автора заключается в постановке задач исследования, планировании и проведении экспериментов непосредственно автором, обработке, анализе и обобщении полученных результатов, написании статей, подготовке докладов и выступлениях на конференциях.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, 4 глав обсуждения результатов, общих выводов и списка цитируемой литературы. Материал изложен на 132 страницах машинописного текста, содержит 49 рисунков, 35 таблиц, в списке цитируемой литературы 164 наименование.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Введение

Во введении обоснована актуальность выбранной темы, сформулированы цель исследования и поставленные задачи, показана научная новизна работы и ее практическая значимость.

Обзор литературы

В первой главе систематизированы сведения о популяционных биомаркерах, процессе метаболизма и хроматографические методы их определения. Подробно рассмотрены их физико-химические свойства, возможность их применения в качестве популяционных веществ-маркеров. Представлены наиболее распространенные хроматографические методы определения котинина, 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты и этилсульфата в различных объектах. В разделе «Пробоподготовка биологических объектов» приведены примеры извлечения популяционных веществ-маркеров из мочи и сточных вод. Сделанные на основании обзора литературы выводы подтверждают актуальность выбранной темы исследования.

Аппаратура, материалы и техника эксперимента

Эксперимент проводили на хроматографических системах Agilent 1290 (Agilent Technologies, США) с автоматическим инжектором, диодно-матричным детектором и tandemных трехквadrupольных масс-спектрометрах Agilent 6460 и 6470 (Agilent Technologies, США), оснащенных источником ионизации электрораспылением (ИЭР); Ultimate 3000 (Dionex, США) с автоматическим инжектором и tandemным трехквadrupольным масс-спектрометром TSQ Endura (Thermo Scientific, США), оснащенный источником электрораспылительной ионизации и генератором азота Genius 1022 (Peak Scientific); Сбор данных и обработку хроматограмм проводили с помощью программного обеспечения Xcalibur (Thermo Scientific, США), Chemstation и MassHunter версии B.08.02 и B.07.00 SP2 (Agilent Technologies, США). В работе использовали следующие хроматографические колонки: Eclipse C18 (150 × 4.6 мм, 5 мкм), Synergi Hydro (250 × 4.6 мм, 4 мкм), Synergi Fusion-RP (250 × 4.6 мм, 4 мкм), Synergi Polar (250 × 2.0 мм, 4 мкм), Luna SCX (250 × 4.6 мм, 5 мкм) (все Phenomenex, США), Poroshell HILIC (250 × 4.6 мм, 4 мкм), Poroshell 120 EC-C18 (150 × 3.0 мм, 2.7 мкм), Eclipse Plus C18 RRHD (50 × 2.1 мм, 1.8 мкм), Zorbax Phenyl-Hexyl C18 (50 × 2.1 мм, 1.8 мкм) (все Agilent Technologies, США), Thermo Scientific C18 (10 × 4 мм, 3 мкм).

Определение котинина в моче и сточных водах методом ВЭЖХ-МС/МС

Моча представляет собой сложную по составу биологическую жидкость, в которую, помимо воды (97%), входят различные органические и неорганические соединения (минеральные соли, продукты распада белковых веществ: мочевины, аминокислоты, креатинин, а также различные микроэлементы, инактивированные гормоны, ферменты и пр.). В сточных водах значительная доля химических веществ - загрязнений присутствует в составе взвешенных в воде мелких частиц, представляющих дисперсную фазу стока. Во взвешенном состоянии в воде находятся многие минеральные загрязнители: песок, глина, шлаки и органические вещества растительного и животного происхождения: остатки растений, плодов, злаков, овощей, бумага и т.д.

Главные сложности, которые возникают на стадии пробоподготовки образцов – это неполнота извлечения, поступление в пробу мешающих компонентов из матриц, разрушение и потери вещества при проведении пробоподготовки. Исходя из этого, выбор условий проведения экстракции котинина является важным этапом анализа.

Выбор сорбента для ТФЭ

В работе сравнивали степень извлечения котинина в следующих картриджах: *Chromabond SA* (сорбент на основе силикагеля, с привитыми группами бензолсульфокислоты), *Chromabond C₁₈* (сорбент – эндкепированный силикагель с привитыми октадецилсилильными группами). Процесс экстракции проводили по рекомендованным производителем условиям для каждого сорбента.

Найдено, что использование картриджа *Chromabond C₁₈* с октадецилсилильными группами позволяет извлечь лишь 57% котинина, в то время как степень извлечения с использованием картриджа *Chromabond SA* составляет 98%. В ходе дальнейшей работы использовали последний – сорбент с бензолсульфоновыми группами, где котинин удерживается по ионообменному механизму. В щелочных средах котинин переходит в соль, поэтому в качестве приемлемого значения pH использовали собственное значение pH образцов сточных вод (pH 2).

Воспроизводимость степени извлечения методом ТФЭ

Для оценки воспроизводимости степени извлечения котинина методом ТФЭ готовили серию модельных растворов котинина с концентрацией 0.1, 1, 10, 100, 500 мкг/л. Для каждой концентрации провели три параллельных опыта. Результаты приведены в табл. 1.

Исходя из полученных данных, видно, что степень извлечения котинина с использованием картриджа *Chromabond SA* достаточно высока, мало зависит от концентраций аналита в пробе и обладает хорошей воспроизводимостью.

Сравнение различных колонок

Для определения котинина использовали следующие колонки: *Eclipse C₁₈* (150 × 4,6 мм, 5 мкм), *Synergi Fusion-RP* (250 × 4,6 мм, 4 мкм), *Poroshell HILIC* (250 × 4,6 мм, 4 мкм), *Synergi Hydro* (250 × 4,6 мм, 4 мкм). На рис. 1 приведено наложение хроматограмм, полученных на разных колонках. Как видно из хроматограммы, котинин не удерживается на колонке *Eclipse C₁₈* (хроматограмма 1), и его время

Таблица 1. Степень извлечения котинина методом (*Chromabond SA*) ($n=3$, $P=0.95$).

Концентрация котинина, мкг/л	Степень извлечения, %
500	92±2
100	93±3
10	98±2
1	95±3
0.1	93±4

удерживания совпадает с мертвым временем. При использовании хроматографической колонки Synergi Fusion-RP наблюдается сильное размытие пика, и она признана непригодной. При разделении на колонках Poroshell HILIC и Synergi Hydro котинин хорошо удерживается. Расчет теоретических тарелок показал, что наилучшую эффективность обеспечивает колонка Synergi Hydro (34200 т/м) по сравнению с Poroshell HILIC (26900 т/м).

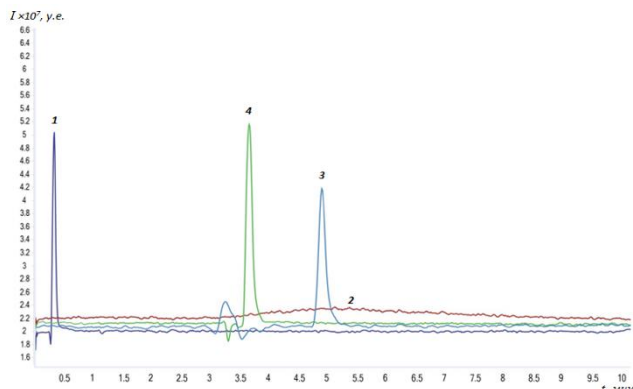


Рис. 1. Наложение хроматограмм, полученных с использованием следующих колонок: 1 – Eclipse C18 (150 × 4.6 мм), 2 – Synergi Fusion-RP (250 × 4.6 мм), 3 – Poroshell HILIC (150 × 4.6 мм), 4 – Synergi Hydro (250 × 4.6 мм). Объем вводимой пробы 4 мкл. $c_{\text{котинин}}=1$ мкг/л. Подвижная фаза: ацетонитрил:вода (50:50), скорость подвижной фазы 0.7 мл/мин. Масс-спектрометрическое детектирование, ИЭР.

Для повышения интенсивности пика и сокращения времени анализа варьировали температуру термостата колонки от 25 до 45°C. Исходя из полученных данных, выбрана температура термостата колонки 35°C. Подвижную фазу состава ацетонитрил:вода (50:50) пропускали со скоростью 0.7 мл/мин. Давление в такой хроматографической системе не превышало 120 бар.

Выбор условий масс-спектрометрического детектирования

Для достижения максимальной чувствительности и селективности анализа необходимо проводить детектирование в режиме ММР, предварительно оптимизировав параметры детектирования и ионизации пробы. Наиболее распространенные способы ионизации в ВЭЖХ-МС/МС – ХИАД и ИЭР. Для соединений,

Таблица 2. Параметры источника ИЭР

Параметр	Значение
Температура газа периферийного слоя, Т°С	300
Поток газа периферийного слоя, л/мин	11
Температура осушающего газа, Т°С	325
Поток осушающего газа, л/мин	8
Давление распылителя, атм	4.5
Напряжение на капилляре, В	3500

способных присоединять протоны, обычно используют вариант ИЭР в режиме регистрации положительно заряженных ионов. В данной работе исследования проводили с источником ИЭР в режиме регистрации положительно заряженных ионов.

В качестве оптимальных значений температуры и потока периферийного газа выбрана температура 300°C и поток 11 л/мин. Для температуры и потока газа-осушителя по рекомендациям производителя были выбраны оптимальные значения: 325°C и 8 л/мин. Остальные параметры источника ИЭР приведены в табл. 2.

Выбор ММР-переходов, энергии соударений и напряжения на фрагменторе

Для подбора приемлемых условий масс-спектрометрического детектирования в режиме прямого ввода использовали раствор котинина (100 мкг/л) в режиме сканирования ионов (от $m/z = 50$ до $m/z = 300$). По наиболее интенсивному пику была определена масса иона-предшественника, равная 177.

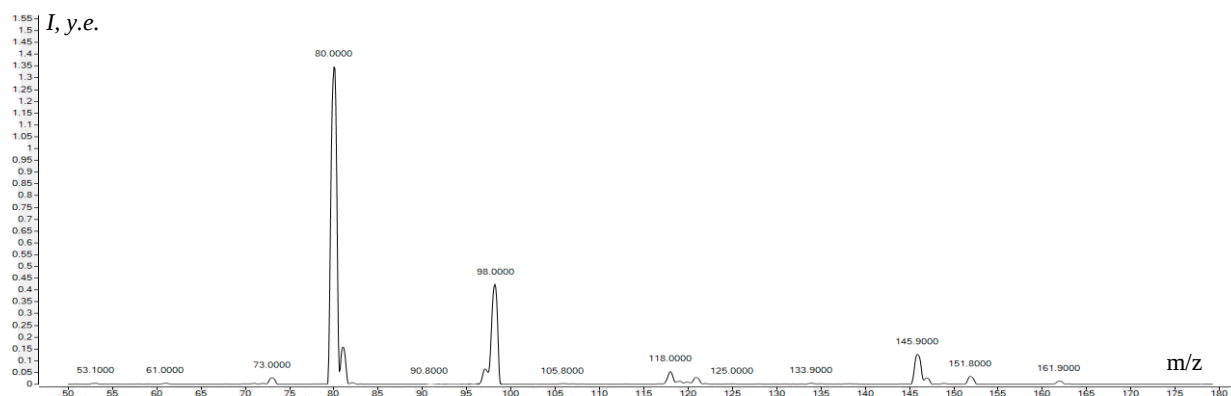


Рис. 2. Масс-спектр ион-продуктов. ЭС = 50 эВ. Колонка Synergi Hydro RP 80A (250 × 4.6 мм × 4 мкм). Объем вводимой пробы 4 мкл, $C_{\text{котинин}}=100$ мкг/л. Подвижная фаза: ацетонитрил:вода (50:50), скорость подвижной фазы 0.7 мл/мин.

На рис. 2, представлен масс-спектр электронной ионизации котинина при значении энергии соударений 50 эВ. ММР-переход для количественного анализа котинина выбран $m/z\ 177 \rightarrow m/z\ 80$, а для подтверждения $m/z\ 177 \rightarrow m/z\ 98$. Их предполагаемые структурные формулы представлены в табл. 3.

Таблица 3. Структуры фрагментных ионов наиболее интенсивных пиков.

m/z	80	98
Структура фрагментного иона		

На интенсивность сигнала определенного ММР-перехода большое влияние оказывает величина энергии соударений (ЭС). Ее выбор в основном зависит от устойчивости иона-предшественника и требуемой степени его фрагментации. Для определения величин ЭС, при которых наблюдается максимальная интенсивность выбранных ММР-переходов построены зависимости интенсивности их сигналов от величины ЭС. Выбранные из построенных зависимостей значения ЭС представлены в табл. 4.

Напряжение на фрагменторе может оказывать значительное влияние на выход ионизации пробы, и, соответственно, на чувствительность определения. В рамках данной работы были построены зависимости интенсивности сигнала котинина от напряжения на фрагменторе. Для выбора оптимального потенциала фрагментации сравнивали интенсивность сигналов ММР-переходов от 10 до 180 В с шагом изменения потенциала 10 В. Оптимальное значение напряжения на фрагменторе выбрано 110 В.

Таблица 4. Значения энергии соударения для выбранных ММР-переходов.

ММР-переход	Энергия соударений, эВ
$m/z\ 177 \rightarrow m/z\ 80$	30
$m/z\ 177 \rightarrow m/z\ 98$	20

Характеристики хроматографического определения котинина с масс-спектрометрическим детектированием

Для оценки метрологических характеристик предложенного подхода готовили серию модельных растворов в диапазоне концентраций 0.05- 1000 мкг/л, затем проводили твердофазную экстракцию по описанной методике. Для учета возможных отклонений в работе вместо зависимостей площадей хроматографических пиков

котинина от концентрации строили зависимости отношения площадей этих пиков к площади пика внутреннего стандарта (S_i/S_{IS}) от концентрации котинина.

Пики, соответствующие котинину, обнаружены в «холостом» растворе. Холостой раствор получали путем проведения процедуры ТФЭ образца воды с добавлением дейтерированного котинина. Так как никотин из атмосферного воздуха может превращаться в котинин в обычных условиях окружающей среды (в лаборатории есть курящие люди), это может объяснять его присутствие в растворителях и реагентах. Содержание котинина в холодом растворе характеризуется хорошей воспроизводимостью, дальнейшие расчеты проводили, учитывая присутствие котинина в фоновых концентрациях. При низких концентрациях (от 50 нг/мл и ниже) значительное влияние оказывает фоновое содержание котинина. При анализе реальных объектов целесообразно рассматривать два линейных участка: от 0.1 мкг/л до 10 мкг/л и от 5 мкг/л до 1000 мкг/л. Параметры зависимостей этих диапазонов приведены в табл. 5.

Таблица 5. Метрологические характеристики определения котинина методом ВЭЖХ-МС/МС для двух линейных диапазонов ($n=3$, $P=0.95$).

№	Линейный диапазон, мкг/л	Уравнение градуировочной зависимости	Предел обнаружения, мкг/л	s_r , %
1	0.1 – 10	$S_i/S_{IS} = (65.1 \pm 5.8) \times 10^{-2} \times c_i + (0.18 \pm 0.23)$, ($P=0.95$, $n=3$, $r=0.999$)*	0.03	15
2	5 – 1000	$S_i/S_{IS} = (62.3 \pm 1.0) \times 10^{-2} \times c_i + (1.46 \pm 5.20)$, ($P=0.95$, $n=3$, $r=0.998$) *		9

* S_{IS} – площадь хроматографического пика внутреннего стандарта (дейтерированный котинин, 0.91 мкг/л);

Анализ реальных объектов

В качестве примера анализа реальных объектов был проведен анализ мочи активного курильщика, человека, не подвергающегося воздействию табака, а также образцов сточных вод, отобранных на трех водоочистных станциях Московской области. Нижний предел определяемых концентраций для метода со спектрофотометрическим детектированием составляет 250 мкг/л, поэтому анализ сточных вод и мочи некурильщика методом ВЭЖХ-ДМД не позволил количественно определить котинин в этих объектах. В табл. 6 приведены результаты анализа объектов с помощью спектрофотометрического и масс-спектрометрического детектирования.

Таблица 6. Результаты хроматографического определения котинина в реальных объектах ($n=3$, $P=0.95$).

Метод Объект	ВЭЖХ-ДМД		ВЭЖХ-МС/МС	
	Концентрация, мкг/л	s_r , %	Концентрация, мкг/л	s_r , %
Сточная вода (№1)	–	–	1.4 ± 0.1	9
Сточная вода (№2)	–	–	1.0 ± 0.1	11
Сточная вода (№3)	–	–	1.5 ± 0.1	9
Моча (отсутствие курения)	–	–	0.8 ± 0.2	14
Моча (активное курение)	1087 ± 106	16	996 ± 21	6

Наложение полученных хроматограмм при анализе сточных вод приведено на рис. 3, полученных при анализе мочи – на рис. 4.

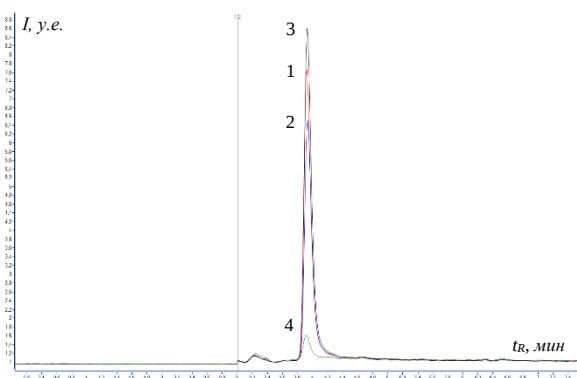


Рис. 3. Наложение хроматограмм образцов сточных вод, отобранных в Московской области. 1 - канал №1, 2 – канал №2, 3 – канал №3, 4 – холостой раствор. Колонка Synergi Hydro RP 80A. Объем вводимой пробы 4 мкл. Подвижная фаза: ацетонитрил:вода (50:50), скорость подвижной фазы 0.7 мл/мин. Масс-спектрометрическое детектирование, ИЭР, ММР-переходы m/z 177 $\rightarrow$ m/z 80, m/z 177 $\rightarrow$ m/z 98.

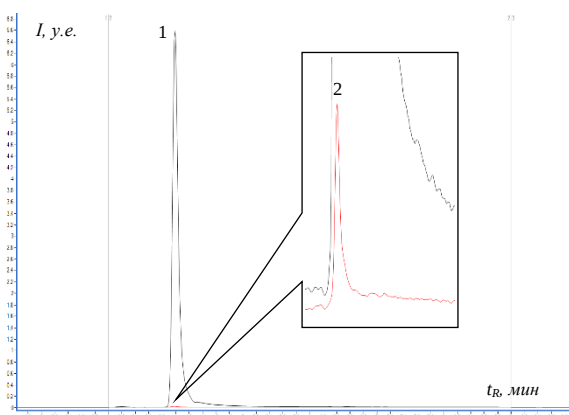


Рис. 4. Наложение хроматограмм мочи активного курильщика «1» и пассивного курильщика «2». Колонка Synergi Hydro RP 80A (250 $\times$ 4.6 мм $\times$ 4 мкм). Объем вводимой пробы 4 мкл. Подвижная фаза: ацетонитрил:вода (50:50), скорость подвижной фазы 0.7 мл/мин. Масс-спектрометрическое детектирование, ИЭР, ММР-переходы m/z 177 $\rightarrow$ m/z 80, m/z 177 $\rightarrow$ m/z 98.

Таким образом, предложенный подход к определению котинина методом ВЭЖХ-МС/МС характеризуется высокой чувствительностью (предел обнаружения составляет 0.03 мкг/л без предварительного концентрирования). Разделение градуировочного графика на два линейных диапазона позволяет определять содержание котинина в широком диапазоне концентраций. При использовании сорбента Chromabond SA (силикагель с привитыми группами бензолсульфокислоты) степень извлечения составляет $94 \pm 3\%$. Стадия пробоподготовки занимает 30 минут, а время хроматографического анализа – не более 10 мин, таким образом, разработанная методика является довольно экспрессной. Предложенная методика характеризуется хорошей воспроизводимостью ($s_r = 14\%$). Использование МС/МС-детектирования в режиме ММР обеспечивает высокую селективность. Разработанный вариант определения ультрамалых количеств котинина применим для анализа не только мочи, но и сточных вод, что показано в данной работе. Найдено содержание котинина в моче активного курильщика на уровне 1 мкг/мл, пассивного курильщика 0.8 нг/мл и в сточных водах 1 нг/мл.

Определение 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты в моче и сточных водах методом ВЭЖХ-МС/МС

Выбор хроматографических условий определения 5-ГИУК

5-гидроксииндол-3-уксусная кислота является гидрофильным соединением ($\log P$ 1.28), в связи с этим при ее определении целесообразно использовать неподвижную фазу с полярным эндкеппингом, обеспечивая хорошее удерживание полярных соединений. В работе сравнивали неподвижные фазы, отличающиеся функциональными группами, привитыми к неподвижной фазе, длиной, а также

диаметром зерна. Хроматограммы представлены на рис. 5. При разделении на колонках Poroshell HILIC и Eclipse C₁₈ 5-ГИУК хорошо удерживается. Расчет теоретических тарелок показал, что наилучшую эффективность обеспечивает колонка Poroshell HILIC (35200 т/м) по сравнению с Eclipse C₁₈ (10700 т/м). Колонка Poroshell 120 HILIC выбрана как самая эффективная и обеспечивающая наибольшее удерживание.

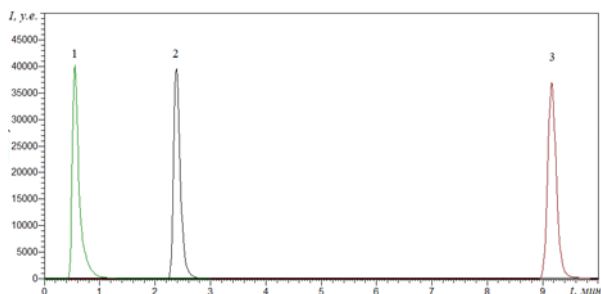


Рис. 5. Наложение хроматограмм 5-ГИУК, полученных с использованием следующих колонок: 1 – Eclipse Plus C18 RRHD, 2 – Zorbax Eclipse C18, 3 – Poroshell HILIC.

Дальнейшее определение 5-ГИУК проводили с использованием данной колонки.

Также для повышения интенсивности пика и сокращения времени анализа варьировали температуру термостата колонки от 25 до 45°C. Исходя из полученных данных, можно сделать вывод о том, что интенсивность сигнала 5-ГИУК мало зависит от температуры термостата. В качестве приемлемого значения температуры термостата колонки выбрано 30°C.

В работе выбраны состав и скорость подвижной фазы, температура термостата колонки. Сравнивали 5 мМ раствор ацетата аммония и 0.1% раствор муравьиной кислоты в качестве водной фазы. Сравнение показало, что удерживание 5-ГИУК и интенсивность пика выше при использовании 0.1% раствора муравьиной кислоты.

Выбор условий масс-спектрометрического детектирования 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты

Для выбора условий масс-спектрометрического детектирования в режиме прямого ввода использовали раствор 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты (1 мкг/мл) в режиме сканирования ионов (от $m/z = 100$ до $m/z = 200$). С помощью программного обеспечения TSQ Endura Tune подобраны характеристики ионного источника и ММР-переходы 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты. По наиболее интенсивному пику была определено соотношение массы к заряду исходного иона 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты, равное 192. Наибольшую чувствительность можно достичь, используя режим ММР в варианте tandemного масс-спектрометрического детектирования. На рис. 6 приведен масс-спектр ионов-продуктов при значении энергии соударений 25 эВ.

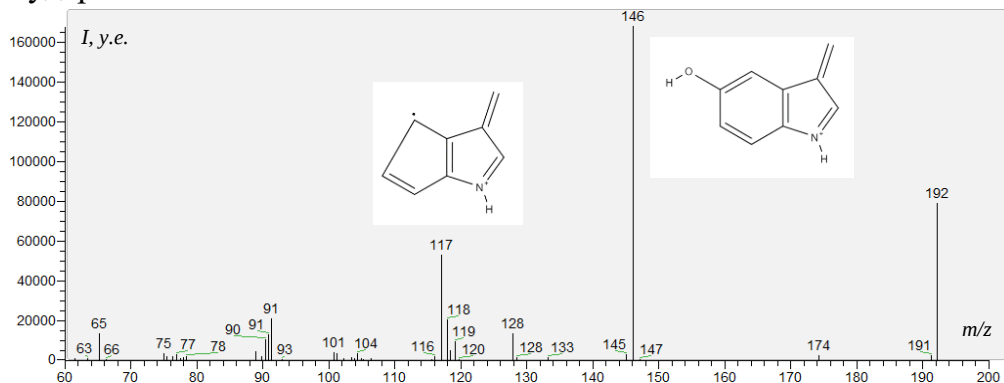


Рис. 6. Масс-спектр ионов-продуктов 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты. ЭС = 25 эВ. Колонка Poroshell 120 HILIC (250 × 4.6 мм × 4 мкм). Объем вводимой пробы 20 мкл, С(5-ГИУК) = 1 мг/л. Подвижная фаза: 0.1% муравьиная кислота: ацетонитрил (50:50), скорость подвижной фазы 0.7 мл/мин.

Для количественного анализа выбран ММР-переход с максимальной интенсивностью: m/z 192 $\rightarrow$ m/z 146. Также для подтверждения выбран дополнительный переход с максимальным значением m/z : m/z 192 $\rightarrow$ m/z 117. На интенсивность сигнала ММР-переходов большое влияние оказывает величина энергии соударений (ЭС). Ее выбор зависит от устойчивости иона-предшественника и требуемой степени его фрагментации. Для определения величин ЭС, при которых наблюдается максимальная интенсивность выбранных ММР-переходов, построены зависимости интенсивности их сигналов от величины ЭС (рис. 7). Выбраны значения энергии соударений 10 эВ для перехода m/z 192 $\rightarrow$ m/z 146 и 36 эВ для m/z 192 $\rightarrow$ m/z 117.

Разработка способа пробоподготовки при определении 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты

Для разработки способа пробоподготовки при определении 5-ГИУК в сточных водах и моче проведен сравнительный анализ методов ТФЭ и ЖЖЭ. В сточных водах значительная доля химических веществ - загрязнений присутствует в сорбированном виде в составе взвешенных в воде мелких частиц, представляющих дисперсную фазу стока. Моча имеет сложный состав и содержит в себе большое количество неорганических и органических веществ. Поэтому разработка способа пробоподготовки является важным этапом при подготовке к анализу.

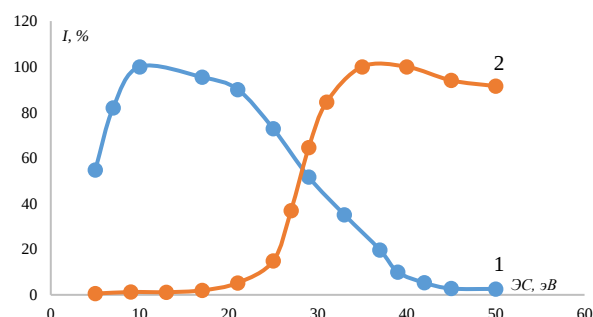


Рис. 7. Зависимость интенсивности сигналов переходов (1) m/z 192 $\rightarrow$ m/z 146, (2) m/z 192 $\rightarrow$ m/z 117 от значения энергии соударений.

Установлены степени извлечения 5-ГИУК при использовании различных органических растворителей (этилацетата, гексана, хлороформа, дихлорметана, трет-бутилового эфира и смеси гексана/диэтилового эфира (50:50)) при значениях pH 2.7 и 4.6. Результаты сравнения представлены в табл. 7.

При использовании жидкость-жидкостной экстракции органическими растворителями важно, чтобы извлекаемое вещество находилось в незаряженной форме. Так как 5-ГИУК является слабой кислотой ($pK_a=4.22$), использование щелочных pH недопустимо. Поэтому сравнительный анализ экстрагентов проводился при «кислых» значениях pH (2.7, 4.6).

Таблица 7. Степень извлечения 5-ГИУК из водного раствора с концентрацией 20 мкг/л при различных pH методом жидкость-жидкостной экстракции. ($n=3$, $P=0.95$).

Растворитель	Аммонийно-ацетатный буфер, pH=4.6	Муравьиная кислота, pH=2.7
Этилацетат	51±4	74±3
Гексан	7±2	9±1
Хлороформ	0	52±4
Дихлорметан	10±2	16±3
Трет-бутилметиловый эфир	48±4	73±3
Гексан/диэтиловый эфир (50:50)	12±2	15±2

Найдено, что степень извлечения увеличивается при уменьшении pH с 4.6 до 2.7. Максимальная степень извлечения (74%) получена при использовании этилацетата и

подкислении пробы до pH 2.7. На основании полученных данных, жидкость-жидкостная экстракция этилацетатом при pH 2.7 выбрана в качестве метода пробоподготовки при проведении определения 5-ГИУК в сточных водах и мочи.

Предел обнаружения

Предел обнаружения 5-ГИУК составил 0.2 мкг/л (с учетом концентрирования). Хроматограмма раствора 5-ГИУК после концентрирования, соответствующая пределу обнаружения, представлена на рис. 8.

Линейность и нижний предел определяемых концентраций

Для оценки линейности определения 5-ГИУК методом ВЭЖХ-МС/МС построены две градуировочные зависимости. Для этого готовили серии модельных растворов в следующих диапазонах концентраций и проводили пробоподготовку по вышеописанным процедурам: 0.5 – 50000 мкг/л (0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 500, 1000, 2000, 5000, 10000, 20000, 50000 мкг/л)

Методом наименьших квадратов рассчитывали уравнения линейной регрессии зависимости площади пика от концентрации для 5-ГИУК и метрологические характеристики (табл. 8).

Таблица 8. Метрологические характеристики градуировочных зависимостей при определении 5-ГИУК методом ВЭЖХ-МС/МС (n=3, P=0.95).

C_{min} , мкг/л	СНПКО, мкг/л	Диапазон линейности, мкг/л	Уравнение градуировочной зависимости
0.2	0.5	0.5 – 100 ($r=0.995$)	$S = (720 \pm 30) \times c_i + (5600 \pm 500)$
	100	100 – 50000 ($r=0.996$)	$S = (710 \pm 30) \times c_i + (29700 \pm 7600)$

Анализ сточных вод

Проведен анализ образцов сточных вод, отобранных на трех водоочистных станциях одного из поселков городского типа в Московской области. Наложение полученных хроматограмм при анализе сточных вод представлено на рис. 9. Результаты анализа приведены в табл. 9. Концентрации 5-ГИУК в исследуемых сточных водах составили от 8 до 18 мкг/л.

Таблица 9. Результаты хроматографического определения 5-ГИУК в сточных водах (n=3, P=0.95).

Объект	C(5-ГИУК), мкг/л
Сточная вода (№1)	8 ± 1
Сточная вода (№2)	16 ± 1
Сточная вода (№3)	18 ± 1

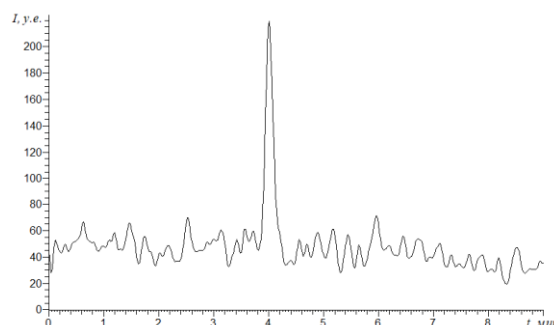


Рис. 8. Хроматограмма раствора 5-ГИУК, соответствующая пределу обнаружения. Колонка Poroshell 120 HILIC. Объем вводимой пробы 20 мкл, C(5-ГИУК) = 0.2 мкг/л. Подвижная фаза: 0.1% муравьиная кислота: ацетонитрил (50:50), скорость подвижной фазы 0.7 мл/мин. Масс-спектрометрическое детектирование, ИЭР, ММР-переходы m/z 192 → m/z 146, m/z 192 → m/z 117.

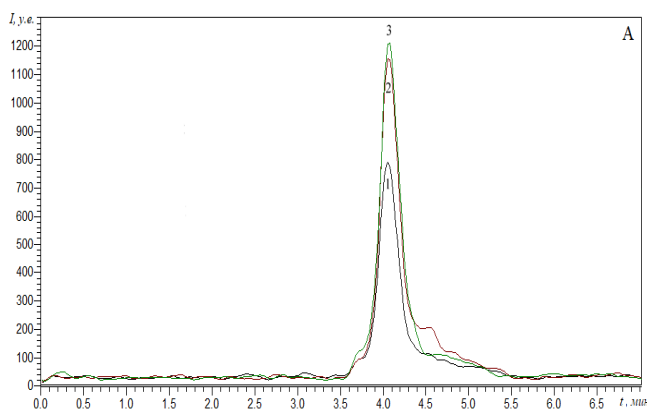


Рис. 9. Наложение хроматограмм образцов сточных вод, отобранных в Московской области. 1 - канал №1, 2 – канал №2, 3 – канал №3. Колонка Poroshell 120 HILIC (250 × 4.6 мм × 4 мкм). Объем вводимой пробы 20 мкл. Подвижная фаза: 0.1% муравьиная кислота: ацетонитрил (50:50), скорость подвижной фазы 0.7 мл/мин. Масс-спектрометрическое детектирование, ИЭР, ММР-переходы m/z 192 → m/z 146, m/z 192 → m/z 117.

Анализ мочи

В качестве примера проведен анализ мочи активного курильщика и человека, не подвергающегося воздействию табака. Хроматограммы мочи представлены на рис. 10. Результаты анализа приведены в табл. 10. Концентрация 5-ГИУК в моче составила от 4 до 4.5 мг/л, и, как и ожидалось, слабо зависит от того, курит человек или нет.

Таблица 10. Результаты хроматографического определения 5-ГИУК в моче ($n=3$, $P=0.95$).

Объект	C(5-ГИУК), мкг/л
Моча курильщика	4500 ± 200
Моча некурящего человека	3900 ± 300

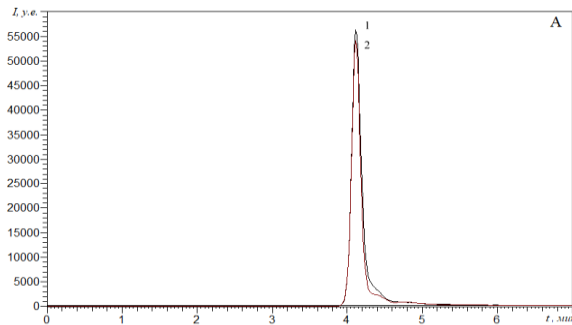


Рис. 10. Наложение хроматограмм, полученных при анализе мочи. 1 – моча курящего человека, 2 – моча некурящего человека. Колонка Poroshell 120 HILIC (250 × 4.6 мм × 4 мкм). Объем вводимой пробы 20 мкл. Подвижная фаза: 0.1% муравьиная кислота: ацетонитрил (50:50), скорость подвижной фазы 0.7 мл/мин. Масс-спектрометрическое детектирование, ИЭР, ММР-переходы m/z 192 → m/z 146, m/z 192 → m/z 117.

Таким образом, предложенный подход к определению 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты методом ВЭЖХ-МС/МС характеризуется высокой чувствительностью. Предел обнаружения составляет 0.2 нг/мл с предварительным концентрированием. Сравнены возможности проведения ТФЭ и ЖЖЭ, оказалось, что ТФЭ имеет плохую воспроизводимость, когда как ЖЖЭ обладает хорошей воспроизводимостью и приемлемым значением степени извлечения ($74 \pm 3\%$). Стадия пробоподготовки занимает 1 час, а время хроматографического анализа – не более 10 мин. Использование МС/МС-детектирования в режиме ММР обеспечивает высокую селективность. Предложенная методика характеризуется хорошей воспроизводимостью ($s_r = 8\%$). Разработанный вариант определения малых количеств 5-ГИУК применим как для анализа сточных вод, что показано на примере анализа сточных вод водоочистных станций одного из поселков Московской области (от 8 до 18 мкг/л), так и для анализа мочи (от 4 до 4.5 мг/л), и может использоваться в дальнейшем для оценки численности населения.

Определение этилсульфата методом ВЭЖХ-МС/МС

Выбор неподвижной фазы

Этилсульфат представляет собой производное серной кислоты, в которой один атом водорода замещен на этильный радикал., в связи с этим при ее определении

целесообразно использовать неподвижную фазу с ионогенной или полярной группой, обеспечивая хорошее удерживание. В работе сравнивали неподвижные фазы, отличающиеся функциональными группами, привитыми к неподвижной фазе, длиной, а также диаметром зерна. Хроматограммы представлены на рис. 11.

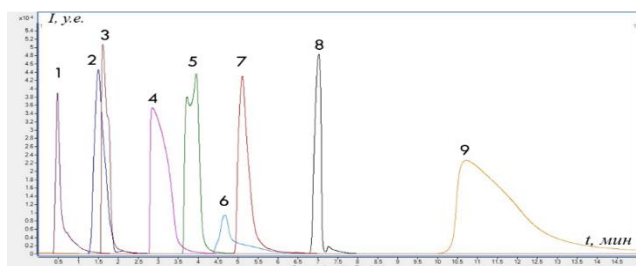


Рис. 11. Наложение хроматограмм этилсульфата, полученных с использованием следующих колонок: 1-Zorbax phenyl hexyl C18; 2-Synergi Polar RP; 3-Poroshell C18; 4-Zorbax Bonus-RP; 5-Zorbax Eclipse C18; 6-Luna SCX; 7-Zorbax SB C18; 8-Poroshell HILIC; 9-Synergi Fusion-RP

Колонка Poroshell 120 HILIC (32000 ч.т.т./м) выбрана как самая эффективная и обеспечивающая хорошее удерживание. Дальнейшее определение этилсульфата проводили с использованием данной колонки.

Выбор подвижной фазы

При хроматографическом определении этилсульфата иногда наблюдали раздвоение пика, что возможно связано с разными механизмами взаимодействия этилсульфата с функциональными группами неподвижной фазы. В работе выбраны состав и скорость подвижной фазы. Сравнивали следующие составы ПФ: 5 мМ раствор ацетата аммония / 0.1% раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (50:50); 0.1% раствор муравьиной кислоты в воде / ацетонитрил (50:50).

Сравнение показало, что время удерживания и интенсивность пика этилсульфата выше при использовании 5 мМ раствор ацетата аммония / 0.1% раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле, и также устраняет раздвоение пика. Дальнейшие исследования проводились с использованием ацетата аммония.

Выбор условий масс-спектрометрического детектирования этилсульфата

Для выбора условий масс-спектрометрического детектирования в режиме прямого ввода использовали раствор этилсульфата (1 мкг/мл) в режиме сканирования ионов (от $m/z = 100$ до $m/z = 150$). По наиболее интенсивному пику определено соотношение массы к заряду исходного иона этилсульфата, равное 125. Наибольшую чувствительность можно достичь, используя режим ММР в варианте tandemного масс-спектрометрического детектирования. На рис. 12 приведен масс-спектр ионов-продуктов при значении энергии соударения 12 эВ.

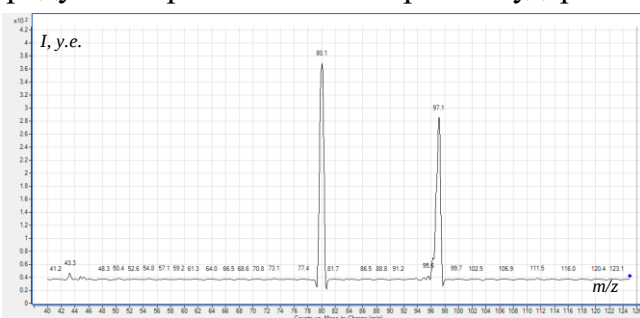


Рис. 12. Масс-спектр ионов-продуктов этилсульфата. ЭС = 12 эВ. Колонка Poroshell 120 HILIC (250 × 4.6 мм × 4 мкм). Объем вводимой пробы 10 мкл, С(этилсульфат) = 1 мг/л. Подвижная фаза: 5 мМ ацетата аммония : 0.1% муравьиной кислоты в ацетонитриле (50:50), скорость подвижной фазы 0.7 мл/мин.

С помощью программного обеспечения Optimizer (Agilent Technologies, США) подобраны характеристики ионного источника и ММР-переходы этилсульфата. Подбор проводился для отрицательного иона с $m/z=125$.

Для количественного анализа выбран ММР-переход с максимальной интенсивностью: $m/z 125 \rightarrow m/z 80$ (ЭС 12 эВ). Также для подтверждения выбран дополнительный переход с максимальным значением m/z : $m/z 125 \rightarrow m/z 97$ (ЭС 34 эВ).

Пробоподготовка

В связи с высокой гидрофильностью этилсульфата предпочтительнее применять ТФЭ, чем ЖЖЭ. Целесообразнее в качестве сорбента для извлечения этилсульфата использовать ионообменники. Однако, ввиду высокого содержания различных ионов в реальных объектах, обычно недостаточна емкость сорбента. При использовании в качестве пробоподготовки метода ТФЭ по литературным данным наблюдаются большие потери, что приводит к неправильным результатам. Также, учитывая, что содержание этилсульфата в моче составляет 0.11% от исходной дозы употребляемого этанола, использование ТФЭ представляется нецелесообразным.

Ввиду сложности извлечения этилсульфата из мочи и сточных вод чаще всего используют метод прямого ввода с разбавлением. Однако, необходимо учитывать, что сточная вода и моча являются сложными матрицами с различными загрязнителями, например, жиры, ПАВ, мелкие дисперсные частицы и т.п. В связи с этим предложен метод прямого ввода с разбавлением и предварительной очисткой пробы на картридже с сорбентом C_{18} . Целесообразность использования предварительной очистки пробы подтверждена при сравнении хроматограмм до (разбавлена в 5 раз) и после очистки пробы при регистрации ионов по полному ионному току.

Как видно из рис. 13, процедура предварительной очистки позволяет избавиться от тяжелых матриц с загрязнителями. Метод прямого ввода с разбавлением позволил определить этилсульфат на низких уровнях и сократить время общего анализа.

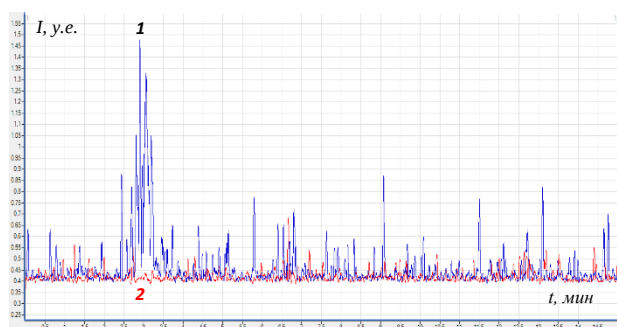


Рис. 13. Наложение хроматограмм сточных вод до (1) и после (2) предварительной очистки пробы. Колонка Poroshell 120 HILIC (250 × 4.6 мм × 4 мкм). Объем вводимой пробы 1 мкл. Подвижная фаза: 5 мМ ацетата аммония : 0.1% муравьиной кислоты в ацетонитриле (50:50), скорость подвижной фазы 0.7 мл/мин. Детектирование по полному ионному току в диапазоне m/z 60 - 300.

Предел обнаружения

Предел обнаружения этилсульфата данным способом составляет 0.5 мкг/л. Хроматограмма раствора этилсульфата, соответствующая пределу обнаружения, представлена на рис. 14.

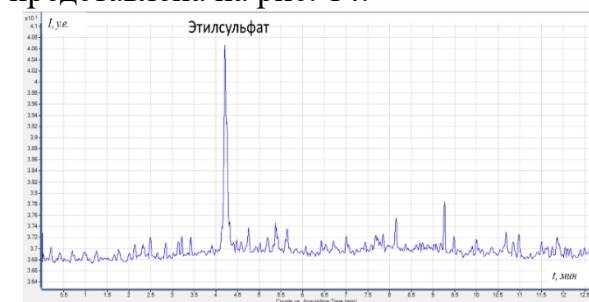


Рис. 14. Хроматограмма раствора этилсульфата, соответствующая пределу обнаружения. Колонка Poroshell 120 HILIC. Объем вводимой пробы 10 мкл. Подвижная фаза: 5 мМ ацетата аммония : 0.1% муравьиной кислоты в ацетонитриле (50:50), скорость подвижной фазы 0.7 мл/мин. МС детектирование, ИЭР, ММР-переходы m/z 125 → m/z 80, m/z 125 → m/z 97.

Линейность и нижняя граница определяемой концентрации

Для оценки диапазона линейности градуировочного графика при определении этилсульфата методом ВЭЖХ-МС/МС готовили серии модельных растворов в следующих диапазонах концентраций и проводили пробоподготовку по описанным методикам: 2 – 500 мкг/л (2, 5, 10, 20, 50, 100, 500 мкг/л).

Методом наименьших квадратов рассчитывали уравнения линейной регрессии зависимости площади пика от концентрации для этилсульфата и метрологические

характеристики (табл. 11). В работе вместо зависимостей площадей хроматографических пиков этилсульфата от концентрации строили зависимости отношения площадей этих пиков к площади пика внутреннего стандарта (дейтерированный этилсульфат) от концентрации этилсульфата (S_i/S_{IS}).

Таблица 11. Метрологические характеристики способа определения этилсульфата методом ВЭЖХ-МС/МС ($n=3$, $P=0.95$).

C_{min} , мкг/л	$C_{НПКО}$, мкг/л	Диапазон линейности, мкг/л	Уравнение градуировочной зависимости
0.5	2	2 – 500 ($r=0.999$)	$S_i/S_{IS}=(0.084\pm0.005)\times c_i+(0.013\pm0.006)$

Разработка способа совместного определения котинина, 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты и этилсульфата методом ВЭЖХ-МС/МС

Пробоподготовка при совместном определении биомаркеров методом ВЭЖХ-МС/МС

При определении вышеуказанных метаболитов методом ВЭЖХ-МС/МС применялись различные способы пробоподготовки. Эти методы имеют свои плюсы и минусы. В случае пробоподготовки образцов котинина методом ТФЭ, плюсом может быть селективность и высокая степень извлечения, а недостатком является долгая время пробоподготовки. В случае пробоподготовки 5-ГИУК методом ЖЖЭ недостатком оказывается низкая степень извлечения и селективность.

При определении этилсульфата методом прямого ввода с разбавлением минусом может быть высокий сигнал шума, низкая селективность, загрязнение оборудования и колонки. Однако метод ВЭЖХ-МС/МС дает возможность минимизировать загрязнение детектора, задав определенный интервал времени регистрации иона.

Учитывая эти факторы нами предложен метод прямого ввода с разбавлением для совместного определения всех интересующих популяционных веществ-маркеров. Процедура пробоподготовки включала в себя первичную очистку пробы шприцевым мембранным фильтром, активирование картриджа с сорбентом C_{18} , загрузку и промывку пробы. Раствор, собранный во время загрузки и промывки, использовали для дальнейшего анализа методом ВЭЖХ-МС/МС. Данный подход позволяет одновременно извлечь интересующие маркеры и очистить пробу от тяжелых загрязнителей.

Условия хромато-масс-спектрометрического определения котинина, 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты и этилсульфата в сточных водах

Условия хроматографического разделения идентичны условиям для этилсульфата. В качестве неподвижной фазы использована хроматографическая колонка Poroshell HILIC (Agilent Technologies, США), а в качестве подвижной фазы использовали 5 мМ ацетата аммония в воде / 0.1% муравьиная кислота в ацетонитриле. Элюирование проводили в градиентном режиме (с 0 до 5 мин 60(А):40(В); с 5 мин увеличение до 5(А):95(В)). Условия масс-спектрометрического детектирования метаболитов данным способом идентичны с условиями детектирования при отдельном определении.

Метрологические характеристики хроматографического определения веществ-маркеров с tandemным масс-спектрометрическим детектированием

Пределы обнаружения популяционных биомаркеров представлены в табл. 12. Хроматограмма модельных растворов представлена на рис. 15.

Таблица 12. Метрологические характеристики градуировочных зависимостей при совместном определении котинина, 5-ГИУК и этилсульфата методом ВЭЖХ-МС/МС (n=3, P=0.95).

Аналит	C _{min} , мкг/л	C _n , мкг/л	Диапазон линейности, мкг/л	Уравнение градуировочной зависимости
Котинин	0.01	0.05	0.05 – 50 (r=0.999)	$S_i/S_{IS}=(0.024\pm0.003)\times c_i+(0.012\pm0.004)$
5-ГИУК	0.1	0.5	0.5 – 500 (r=0.998)	$S = (810\pm20)\times c_i + (4300\pm400)$
Этилсульфат	0.5	2	2 – 500 (r=0.999)	$S_i/S_{IS}=(0.084\pm0.005)\times c_i+(0.013\pm0.006)$

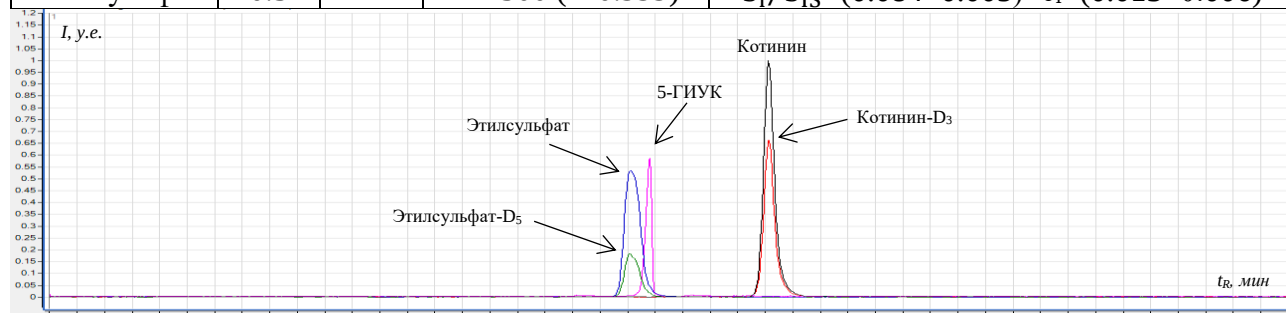


Рис. 15. Хроматограмма модельных растворов. Колонка Poroshell 120 HILIC (250 × 4.6 мм × 4 мкм). Объем вводимой пробы 10 мкл. Подвижная фаза: 5 мМ ацетата аммония : 0.1% муравьиной кислоты в ацетонитриле (градиент), скорость подвижной фазы 0.7 мл/мин. Масс-спектрометрическое детектирование, ИЭР, ММР-переходы: m/z 177 → m/z 80 (**котинин**); m/z 192 → m/z 146 (**5-ГИУК**); m/z 125 → m/z 80 (**этилсульфат**); m/z 180 → m/z 80 (**котинин-D₃**); m/z 130 → m/z 98 (**этилсульфат-D₅**).

Таким образом, разработан способ высокочувствительного совместного определения котинина, 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты и этилсульфата в сточных водах методом ВЭЖХ-МС/МС. Предложен способ пробоподготовки прямого ввода с разбавлением для совместного определения всех интересующих популяционных веществ-маркеров. Продемонстрирована возможность количественного определения следовых количеств популяционных веществ-маркеров с пределами обнаружения 0.01, 0.1, 0.5 нг/мл для котинина, 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты и этилсульфата, соответственно. По сравнению с рассматриваемыми методиками предложенный способ обладает в 5-10 раз большей чувствительностью и сокращает время проведения анализа в 4 раза.

Оценка численности населения, потребления табака и алкоголя на душу населения

Исследование стабильности популяционных маркеров

Проверку стабильности котинина, 5-ГИУК и этилсульфата проводили в течение 2 недель. Сравнивали стабильность компонентов при следующих условиях:

А: после отбора сточная вода хранилась при комнатной температуре без изменения pH

Б: после отбора сточную воду подкисляли до pH=2 и хранили при -25°C

Результаты представлены на рис. 16. Найдено, что исследуемые биомаркеры стабильны в течение двух недель при подкислении и хранении при температуре -25°C. В случае, если сточную воду хранили без подкисления при комнатной температуре, концентрация котинина претерпевала небольшие изменения, однако 5-ГИУК и этилсульфат оказались нестабильны в данных условиях.

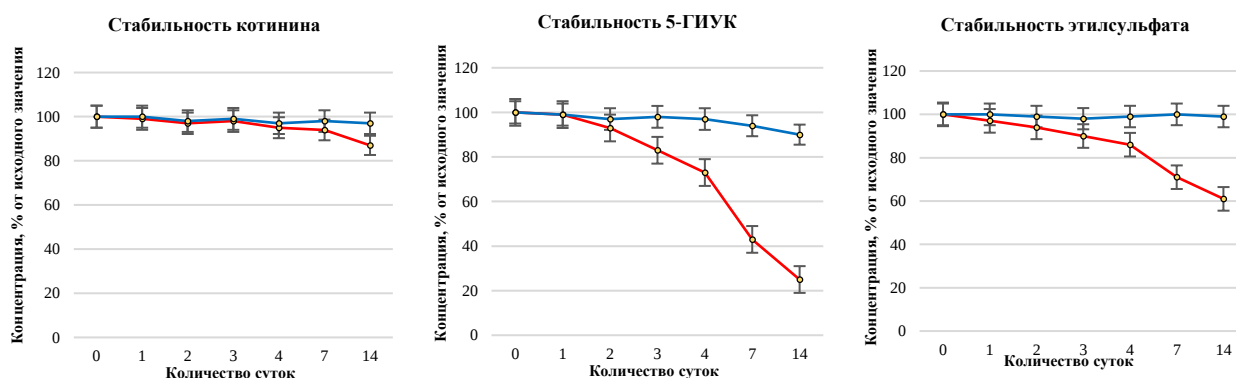


Рис. 16. Стабильность котинина, 5-ГИУК и этилсульфата в сточных водах в течение 14 суток при хранении в следующих условиях: А (красн.) – без подкисления при комнатной температуре, Б (син.) – при pH=2 и хранении при температуре -25°C.

Анализ сточных вод

Отбор проб сточных вод проводили из канализационной насосной станции одного из поселка Московской области. Ежечасный отбор проводили 4 мая 2018 г. с 9 до 21 часа по 3 пробы в час. Ежедневный отбор проводили с 9 апреля по 12 мая по 3 пробы в 10 часов утра. Пробы после отбора были подкислены соляной кислотой до pH 2 и хранились в морозильнике при -80°C.

Оценка численности населения

Построена зависимость концентрации 5-ГИУК от времени суток (рис. 17). Как видно из графика, максимальный уровень содержания 5-ГИУК в сточных водах наблюдается в 10 и 20 часов. После ежедневного отбора проб в течение 30 дней получена посуточная зависимость концентрации 5-ГИУК в сточных водах. Как видно из рис. 18, не наблюдается явный максимум концентрации, что в свою очередь подтверждает о возможности использования 5-ГИУК (25.3 ± 1.6 нг/мл) в качестве популяционного биомаркера, слабо зависящего от дней недели.

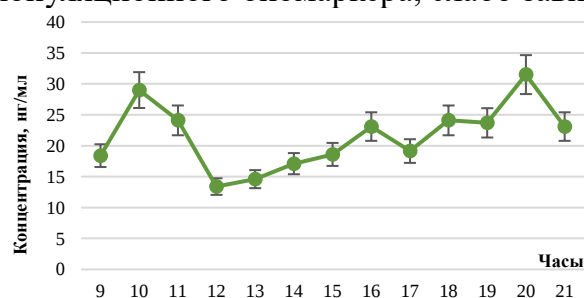


Рис. 17. Зависимость концентрации 5-ГИУК в сточных водах от времени суток.

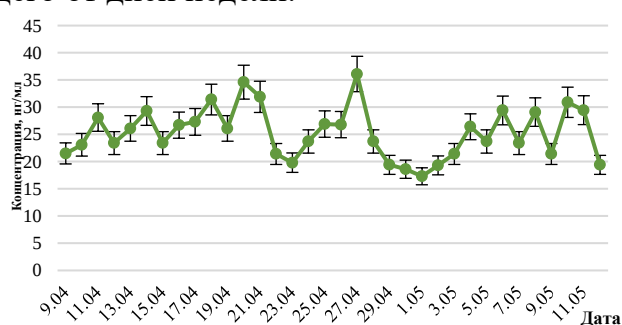


Рис. 18. Посуточная зависимость концентрации 5-ГИУК в сточных водах.

В табл. 13 сравнены расчетная численность населения и номинальная по переписи населения. Расчетная численность населения составляет 9300 ± 600 человек (по переписи населения 7500 чел.). Завышенные значения, возможно, связаны с тем, что в данном населенном пункте могут проживать нелегальные иммигранты (в связи с большим количеством заводов), дачных товариществ и т.п.

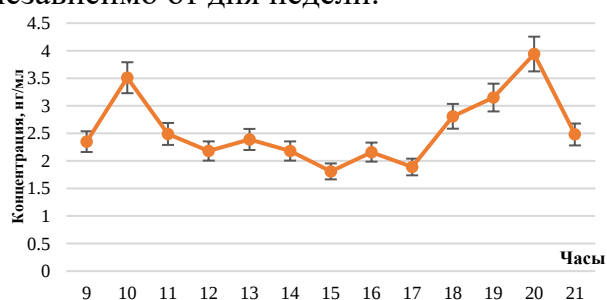
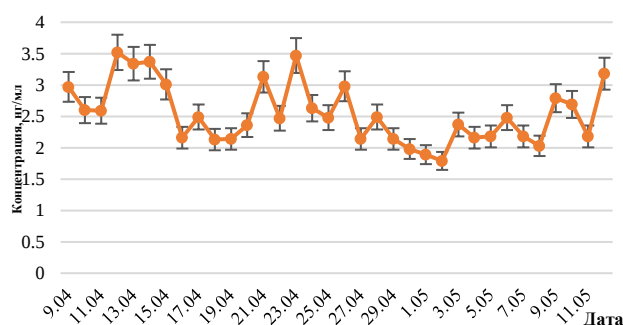
Таблица 13. Оценка численности населения одного из поселков Московской области

Параметры	Значения
Средняя концентрация 5-ГИУК в сточных водах, нг/мл	25.3
Суточное содержание 5-ГИУК в сточных водах, мг/сут.	38700
Популяция расчетная, чел.	9300±600
Популяция номинальная по переписи (2016 г.), чел.	7500
Популяция по гидрохимическим показателям (ХПК и БПК), чел.	8100

Суточное содержание 5-ГИУК в сточных водах рассчитано с учетом среднего суточного объема потребления сточных вод (1530 м³/сутки). Расчетная численность населения основана на ранее известных данных о суточном выделении 5-ГИУК человеком 4.16 ± 0.56 мг/день/чел.

Оценка потребления сигарет на душу населения

Построена зависимость концентрации котинина в сточных водах от времени суток (рис. 19). Как видно из графика, максимальный уровень содержания котинина в сточных водах наблюдается в 10 и 20 часов. После ежедневного отбора проб в течение 30 дней построена посуточная зависимость концентрации котинина в сточных водах. Как видно из рис. 20, не наблюдается явный максимум концентрации. Это достаточно логично, так как люди обычно употребляют примерно одинаковое количество сигарет независимо от дня недели.

**Рис. 19.** Зависимость концентрации котинина в сточных водах от времени суток.**Рис. 20.** Посуточная зависимость концентрации котинина в сточных водах.

В табл. 14 представлены расчетные данные по уровню потребления табака. Для сравнения с данными зарубежных авторов, приводящих значения для жителей, достигших 15-летнего возраста (15+), учитывается, что в России процент населения, превышающий 15 лет составляет 81.7%. Следовательно, при номинальном размере обследуемой популяции в 7 500 человек, количество жителей, достигших 15-летнего возраста (15+) составляет 6128 человек.

Таблица 14. Оценка потребления табака в одном из поселков Московской области

Параметры	Значения
Средняя концентрация котинина в сточных водах, нг/мл	2.5
Суточное содержание котинина в сточных водах, г/сут.	3.9
Суточное количество ингаляционного никотина, г/сут.	29.9
Потребление никотина (г/день/1000 жителей 15+)	4.9

Суточное содержание котинина в сточных водах рассчитано с учетом среднего суточного объема потребления сточных вод (1530 м³/сутки). Суточное количество ингаляционного никотина оценено на основе алгоритма расчета, описанном в работе. Уровень потребления никотина в данном населенном пункте составляет 4.9 г/день/1000 жителей, значение которого превышает уровень потребления никотина в г. Сантьяго-де-Компостела, Испания (1.8 г/день/1000 жителей), г. Далянь, Китай (2.0 г/день/1000 жителей), но ниже, чем г. Лиссабон, Португалия (5.86 г/день/1000 жителей).

Оценка потребления алкоголя на душу населения

Построена зависимость концентрации этилсульфата от времени суток и (рис. 21). Как видно из графиков, максимальный уровень содержания этилсульфата в сточных водах наблюдается в 10 и 21 часов. После ежедневного отбора проб в течение 30 дней получена посуточная зависимость концентрации этилсульфата в сточных водах. Как видно из рис. 22, наблюдается явные максимумы концентрации (суббота, воскресенье и понедельник). С учетом того, что пробы были отобраны в 10 часов утра, данные находятся в хорошем согласии с постулатом, что люди больше всего употребляют алкоголь вечером пятницы, субботы и в воскресенье. В табл. 15 представлены данные по уровню потребления алкоголя от дня недели.

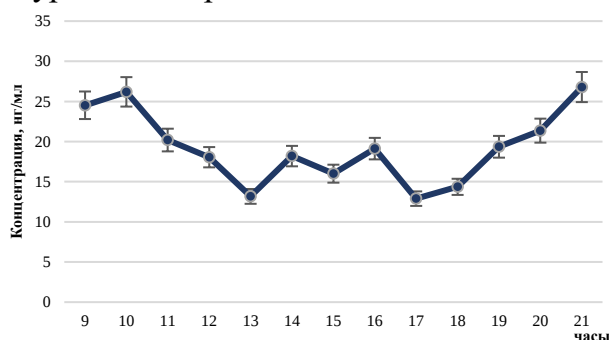


Рис. 21. Зависимость концентрации этилсульфата в сточных водах от времени суток.

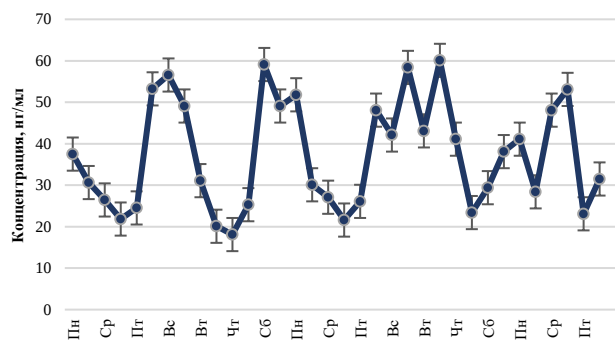


Рис. 22. Зависимость концентрации этилсульфата в сточных водах от дня недели.

Таблица 15. Расчетный уровень потребления этанола в исследуемой популяции по содержанию этилсульфата в сточных водах от дня недели.

День недели	Пн	Вт	Ср	Чт	Пт	Сб	Вс	Среднее	Суммарное значение за неделю
Среднее содержание EtS, мкг/л	43.9	32.7	36.4	31.2	24.5	44.3	46.5	36.8	259.3
процент от суммарного значения, %	17.0	12.6	14.0	12.0	9.4	17.1	17.9		100

В табл. 16 рассчитан уровень потребления этанола в данном населенном пункте. Как в случае расчета потребления табака, для сравнения с данными зарубежных авторов, приводящих значения для взрослых жителей, учитывали количество жителей, достигших 15-летнего возраста.

Таблица 16. Оценка потребления этанола в одном из поселков Московской области

Параметры	Значения
Средняя концентрация этилсульфата в сточных водах, нг/мл	36.8
Суточное содержание этилсульфата в сточных водах, кг/сут.	0.056
Потребление этанола, кг/сут	187.7
Потребление этанола, л/сут	237.9
Потребление этанола, мл/д/чел. (15+)	38.8

Суточное содержание этилсульфата в сточных водах рассчитано с учетом среднего суточного объема потребления сточных вод (1530 м³/сутки). Уровень потребления этанола в данном населенном пункте на душу населения составляет 38.8 мл/день/чел., значение которого превышает уровень потребления этанола в г. Осло, Норвегия (≈16.1 мл/день/чел.), г. Митилини, Греция (≈5.4 мл/день/чел.), 7 городов Бельгии (≈15.3 мл/день/чел.), но ниже, чем г. Валенсии, Испания (макс. 56.1 мл/день/чел.).

Выводы

1. Разработан способ высокочувствительного определения котинина в моче и сточных водах с использованием сочетания твердофазной экстракции и метода гидрофильной высокоэффективной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием. При использовании сорбента Chromabond SA (силикагель с привитыми группами бензолсульфокислоты) степень извлечения составляет $94 \pm 3\%$. Предел обнаружения котинина составляет 0.03 нг/мл ($s_r = 14\%$). Найдено содержание котинина в моче активного курильщика на уровне 1 мкг/мл , пассивного курильщика 0.8 нг/мл и в сточных водах 1 нг/мл .
2. Предложен способ высокочувствительного определения 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты в моче и сточных водах с использованием жидкость-жидкостной экстракции методом ВЭЖХ-МС/МС. При использовании этилацетата в качестве экстрагента степень извлечения составляет $74 \pm 3\%$ (при pH образца 2.7). Предел обнаружения составляет 0.2 нг/мл ($s_r = 8\%$). Найдено содержание 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты в моче активного курильщика на уровне 4-5 мкг/мл, некурящего человека – 4 мкг/мл и в сточных водах – 18 нг/мл .
3. Осуществлено высокочувствительное совместное определение котинина, 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты и этилсульфата в моче и сточных водах. Продемонстрирована возможность количественного определения следовых количеств биомаркеров с пределами обнаружения 0.01, 0.1, 0.5 нг/мл для котинина, 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты и этилсульфата, соответственно.
4. Проведено сравнение с существующими методиками в литературе. Результаты показали, что предложенный в работе способ обладает в 5-10 раз большей чувствительностью, к тому же сокращает время проведения анализа в 4 раза по сравнению с рассматриваемыми методиками.
5. Оценена стабильность котинина, 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты и этилсульфата в сточных водах. Установлено, что данные популяционные маркеры нестабильны при комнатной температуре и нейтральном pH. Образцы необходимо хранить не выше -25°C и при pH 2 не более чем 14 дней.
6. Разработанный способ применен для определения котинина, 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты и этилсульфата в сточных водах, отобранных в канализационной насосной станции одного из поселков Московской области в течение 30 дней и ежечасно в течение 12 часов. Найдено, что максимум концентрации метаболитов в сточных водах наблюдается около 10 и 20 часов. Показано, что уровень котинина и 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты незначительно варьируется в зависимости от дня недели, однако, в пятницу и субботу уровень потребления алкоголя увеличивается в 2-3 раза.
7. На примере анализа сточных вод получены следующие показатели. Расчетная численность населения составляет 9300 ± 600 человек (по переписи населения 7500 чел.). Уровень потребления алкоголя на душу населения в данном населенном пункте составляет $38.8 \text{ мл/день/чел.}$, значение которого превышает уровень потребления этанола в г. Осло, Норвегия ($\approx 16.1 \text{ мл/день/чел.}$), г. Митилини, Греция ($\approx 5.4 \text{ мл/день/чел.}$), 7 городов Бельгии ($\approx 15.3 \text{ мл/день/чел.}$) и ниже, чем г. Валенсии, Испания (макс. $56.1 \text{ мл/день/чел.}$). Уровень потребления никотина в данном населенном пункте составляет $4.9 \text{ г/день/1000 жителей}$, значение которого превышает уровень потребления никотина в г. Сантьяго-де-Компостела, Испания ($1.8 \text{ г/день/1000 жителей}$), г. Далянь, Китай ($2.0 \text{ г/день/1000 жителей}$) и ниже, чем г. Лиссабон, Португалия ($5.86 \text{ г/день/1000 жителей}$).

Основные результаты работы изложены в следующих публикациях:
Статьи, опубликованные в рецензируемых журналах из перечня ВАК
Минобрнауки РФ и индексируемых в базах Web of Science и/или Scopus:

1. Рожанец В.В., Чжан М. Эпидемиология на основе анализа сточных вод. Оценка потребления этанола и никотина. // Наркология. 2017. Т. 16. № 8. С. 11-23.
2. М. Чжан, А.В. Пирогов, А.А. Максимова, В.И. Добровольский, А.А. Стахеев, Ю.В. Абрамова, А.А. Прядка, А.П. Жариков, А.Е. Носырев, В.В. Рожанец, О.А. Шпигун. Определение котинина в моче и сточных водах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием. // Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 2. Химия. 2018. Т. 59. № 6. С. 404-415.
3. М. Чжан, В.Д. Чернышов, А.В. Пирогов, О.Г. Татаурова, В.В. Рожанец, О.А. Шпигун. Определение 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты в сточных водах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием. // Завод. лаборатория. Диагностика материалов. 2018. Т. 84. № 4. С. 5-11.
4. Чжан М., Пирогов А.В., Силантьев А.С., Гандлевский Н.А., Рожанец В.В., Носырев А.Е., Шпигун О.А. Оценка потребления табака в ограниченной популяции с помощью анализа сточных вод. // Вопросы наркологии. 2018. № 7 (16). С. 72-82.

Иные публикации

1. М. Чжан, А.В. Пирогов, А.А. Максимова, В.В. Рожанец, О.А. Шпигун. Определение котинина в моче и сточных водах методом ВЭЖХ-УФ и ВЭЖХ-МС/МС. // Всероссийская конференция «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез» - Краснодар. 2017. С. 37.
2. Jang M., Maksimova A.A., Pirogov A.V., Shpigun O.A., Rozhanets V.V. Determination of cotinine in urine and wastewater by HPLC coupled with spectrometric and mass-spectrometric detection. // 46th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques *HPLC 2017 Jeju* – Чечжу, Республика Корея. 2017. P. 57.
3. Jang M., Chernyshov V.D., Pirogov A.V., Rozhanets V.V., Shpigun O.A. Determination of 5-hydroxyindole-3-acetic acid in wastewater by HPLC coupled with tandem mass-spectrometric detection. // The 21st Annual Meeting of the Israel Analytical Chemistry Society Conference & Exhibition *Isranalytica 2018*. - Тель-Авив, Израиль. 2018. P. 22.
4. Jang M., Chernyshov V.D., Pirogov A.V., Rozhanets V.V., Shpigun O.A. Determination of cotinine and 5-hydroxyindole-3-acetic acid in wastewater by HPLC coupled with tandem mass-spectrometric detection. // XI International Mass Spectrometry Conference on Petrochemistry, Environmental and Food Chemistry *Petromass 2018*. - Блед, Словения. 2018. P. 27.

Автор выражает искреннюю признательность научному руководителю д.х.н., проф. А.В. Пирогову за участие и помощь в постановке задач и обсуждении результатов исследования; д.х.н., проф. О.А. Шпигуну за консультацию по тематике работы; всем членам лаборатории хроматографии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова и НИИ наркологии, филиала «ФМИЦПН» имени В.П. Сербского за отзывчивость, теплую атмосферу и помощь в работе; сотрудникам ФГУП «Всероссийский научно-исследовательский институт физико-технических и радиотехнических измерений» за предоставленные образцы сточных вод.