

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

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

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Научный руководитель:

д.х.н., профессор Пирогов А.В.

Москва 2018

Оглавление

Список используемых сокращений	5
Введение	6
Глава 1. Обзор литературы	10
1.1. Вещества-биомаркеры в сточных водах.....	10
1.1.1. Общие сведения	10
1.1.2. Применение биомаркеров в качестве популяционного маркера	10
1.2. Метаболит никотина – котинин	14
1.2.1. Физико-химические свойства котинина.....	14
1.2.2. Метаболизм никотина	15
1.2.3. Хроматографические методы определения котинина	17
1.3. Метаболит серотонина - 5-гидроксииндол-3-уксусная кислота	32
1.3.1. Физико-химические свойства 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты.....	32
1.3.2. Метаболизм серотонина.....	32
1.3.3. Хроматографические методы определения 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты	35
1.4. Метаболит этилового спирта – этилсульфат	44
1.4.1. Физико-химические свойства этилсульфата.....	44
1.4.2. Метаболизм этилового спирта	45
1.4.3. Хроматографические методы определения этилсульфата	46
1.5. Пробоподготовка биологических объектов	51
Глава 2. Аппаратура, материалы и техника эксперимента.....	59
2.1. Используемые реактивы	59
2.2. Аппаратура.....	59
2.3. Условия определения котинина методом ВЭЖХ-МС/МС.....	60
2.3.1. Пробоподготовка образцов.....	60
2.3.2. Условия хроматографического разделения с масс-спектрометрическим детектированием.....	62
2.4. Условия определения 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты методом ВЭЖХ- МС/МС.....	62
2.4.1. Приготовление растворов	62
2.4.2. Условия хроматографического разделения с масс-спектрометрическим детектированием.....	65
2.5. Условия определения этилсульфата методом ВЭЖХ-МС/МС.....	65

2.6. Условия совместного определения котинина, 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты и этилсульфата методом ВЭЖХ-МС/МС.....	66
2.6.1. Пробоподготовка образцов.....	66
2.6.2. Условия хроматографического разделения с масс-спектрометрическим детектированием.....	66
Глава 3. Определение котинина в моче и сточных водах методом ВЭЖХ-МС/МС	68
3.1. Выбор условий пробоподготовки	68
3.1.1. Выбор условий жидкостной экстракции.....	68
3.1.2. Выбор условий твердофазной экстракции.....	71
3.2. Выбор хроматографических условий определения котинина	73
3.2.1. Выбор неподвижной фазы.....	73
3.2.2. Выбор условий масс-спектрометрического детектирования.....	76
3.2.3. Характеристики хроматографического определения котинина с масс-спектрометрическим детектированием.....	81
3.3. Анализ реальных объектов. Определение котинина.....	83
Глава 4. Определение 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты в моче и сточных водах методом ВЭЖХ-МС/МС.....	86
4.1. Выбор хроматографических условий определения 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты.....	86
4.2. Выбор условий масс-спектрометрического детектирования 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты.....	89
4.3. Разработка способа пробоподготовки при определении 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты.....	91
4.3.1. Выбор сорбента для твердофазной экстракции.....	91
4.3.2. Жидкость-жидкостная экстракция.....	92
4.4. Метрологические характеристики определения 5-ГИУК методом ВЭЖХ-МС/МС	93
4.4.1. Предел обнаружения	93
4.4.2. Линейность и предел обнаружения	94
4.6. Анализ реальных объектов. Определение 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты. ..	94
4.6.1. Анализ сточных вод	94
4.6.2. Анализ мочи.....	95
Глава 5. Совместное определение котинина, 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты и этилсульфата в моче и сточных водах методом ВЭЖХ-МС/МС	97
5.1. Определение этилсульфата методом ВЭЖХ-МС/МС	97

5.1.1. Выбор неподвижной фазы	97
5.1.2. Выбор подвижной фазы	98
5.1.3. Выбор условий масс-спектрометрического детектирования этилсульфата	99
5.1.4. Пробоподготовка	100
5.1.5. Предел обнаружения	101
5.1.6. Линейность и нижняя граница определяемой концентрации	102
5.2. Разработка способа совместного определения котинина, 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты и этилсульфата методом ВЭЖХ-МС/МС.....	103
5.2.1. Пробоподготовка	103
5.2.2. Условия хромато-масс-спектрометрического определения котинина, 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты и этилсульфата в сточных водах	103
Глава 6. Оценка численности населения, употребления табака и алкоголя на душу населения по данным анализа биомаркеров	105
6.1. Исследование стабильности популяционных биомаркеров.....	105
6.2. Анализ сточных вод	106
6.2.1. Оценка численности населения	107
6.2.2. Оценка потребления сигарет на душу населения.....	109
6.2.3. Оценка потребления алкоголя на душу населения	110
Выводы	113
Список литературы.....	115

Список используемых сокращений

5-ГИУК	–	5-гидроксииндол-3-уксусная кислота
C_{min}	–	концентрация, соответствующая пределу обнаружения
Dilute-and-Shoot	–	прямой ввод с разбавлением
m/z	–	соотношение массы к заряду
S_r	–	стандартное отклонение
ВЭЖХ	–	высокоэффективная жидкостная хроматография
ВЭЖХ-ДМД	–	высокоэффективная жидкостная хроматография с диодно-матричным детектором
ГХ – МС	–	газовая хроматография-масс-спектрометрия
ГХ – МС/МС	–	газовая хроматография-танDEMная масс-спектрометрия
ЖЖЭ	–	жидкость-жидкостная экстракция
ЖХ – МС	–	жидкостная хроматография-масс-спектрометрия
ИФА	–	иммуноферментный анализ
ИЭР	–	ионизация с электрораспылением
МИП	–	молекулярно-импринтированные полимеры
ММР	–	мониторинг множественных реакций
НПКО	–	Нижний предел определяемых концентраций
НФ ВЭЖХ	–	нормально-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография
ОФ ВЭЖХ	–	обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография
ПИ	–	полевая ионизация
ПВД	–	пламенно-ионизационный детектор
ПФ	–	подвижная фаза
ТФМЭ	–	твёрдофазная микроэкстракция
ТФЭ	–	твёрдофазная экстракция
УЗВ	–	ультразвуковая ванна
УФ	–	ультрафиолетовый
ХИ	–	химическая ионизация
ХИАД	–	химическая ионизация при атмосферном давлении
ЦФ	–	центрифуга
ЭДТА	–	этилендиаминтетрауксусная кислота
ЭС	–	энергия соударений

Введение

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 тандемным 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 отдельного 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 тандемным 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), «XIX Euroanalysis 2017» (Стокгольм, Швеция, 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 3 статьи (все в журналах, индексируемых в базах данных РИНЦ и в изданиях из перечня, рекомендованных Минобрнауки РФ) и 4 тезиса докладов.

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Вещества-биомаркеры в сточных водах

1.1.1. Общие сведения

Термин «биомаркер», который в настоящее время часто встречается в научной литературе, впервые был предложен как параметр в начале 1950 г. [1, 2]. В 1998 г. термин был утвержден Национальным институтом здоровья США. Понятие биомаркера сформулировано как некая характеристика, «которую можно количественно измерить, и которая может служить в качестве индикатора патологических и физиологических биологических процессов или фармакологических ответов на терапевтическое вмешательство, например, кровяное давление, температура, частота пульса» [3]. Однако, в настоящее время существуют различные термины биомаркеров. Биомаркерами могут быть вещества, которые специально вводятся в организм, а также могут представлять собой вещество, чье обнаружение указывает на состояние человека [4].

Основными решаемыми задачами с помощью биомаркеров являются возможность проверять предполагаемый механизм или токсикологическую модель, выявление лиц с повышенным риском, т.е. с повышенным содержанием в организме тех или иных опасных веществ, обеспечение большой точности при оценке экспозиции к воздействию и возможность оценить правильность фармакокинетических моделей. Использование биомаркеров полезно при оценке воздействия физических факторов или специфических веществ, однако их трудно использовать при воздействии многокомпонентной смеси [5, 6].

Научные исследования в области биомаркеров являются перспективным и чрезвычайно важным направлением в настоящее время. Так, количество публикаций по поисковому запросу [biomarker] в базе данных «ScienceDirect» на февраль 2018 г. составляет 256711, из них 33306 приходится на 2017 год.

1.1.2. Применение биомаркеров в качестве популяционного маркера

Анализ биомаркеров в сточных водах всё чаще рассматривается как важный инструмент оценки здоровья, питания и употребления различных веществ человеком [7]. 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» [8-10]. В настоящее время все известные биомаркеры, содержащиеся в сточной воде, подразделяются на 4 группы (табл. 1) [11].

Таблица 1. Классификация биомаркеров, содержащихся в сточных водах

Группа	Биомаркеры	Информация
I	Наркотические вещества и их метаболиты: кокаин, амфетамин, метамфетамин, тетрагидроканнабинол, кетамин, метадон, различные психоактивные вещества. Метаболиты этилового спирта: этилсульфат и этилглюкуронид. Никотин и его метаболиты, котинин, транс-3'- гидроксикотинин. Кофеин и его метаболиты.	Оценка факторов образа жизни и употребления психоактивных веществ
II	Пестициды, микотоксины, парабены, пластики, антипирены.	Оценка воздействия токсикантов, присутствующих в окружающей среде и пище
III	Антибиотики, бензодиазепины, ДНК, другие лекарственные средства, эндогенные вещества.	Информация о здравоохранения и болезнях
IV	Искусственные подсластители: ацетульфам, алитам, аспартам, цикламат, неотам, неогесперидиндигидрохалькон, сахарин, сукралоза. Никотин и его метаболиты, котинин, транс-3'- гидроксикотинин; кофеин и его метаболиты; фармацевтические препараты; эндогенные компоненты; ДНК.	Оценка численности населения

Влияние факторов, соответствующих группам I-III, нормируется на душу населения. При расчётах могут использоваться как официальное количество человек, проживающих в соответствующих населенных пунктах (если такие данные доступны) так и количество, найденное с помощью определения концентрации биомаркеров IV группы.

От выбора биомаркера полностью зависят результаты исследования и их интерпретация. В связи с этим потенциальный биомаркер должен удовлетворять следующим критериям: [11-13]

- ✓ возможность количественного определения;
- ✓ небольшое сродство к твердым частицам сточной воды и системам фильтрации (в том числе к фильтрам при пробоподготовке);
- ✓ быть стабильными в сточных водах, при транспортировке и хранении, а также на протяжении всего анализа;
- ✓ не накапливаться в организме;
- ✓ концентрация биомаркеров должна однозначно коррелировать с количеством населения.

Помимо общих требований, к биомаркерам IV группы также предъявляются следующие требования [11]:

- ✓ воспроизводимость результатов и известное количество ежедневного выведения вещества-биомаркера на душу населения;
- ✓ желательно отсутствие влияния на выведение биомаркера из организма таких факторов, как погода, сезон, географическое положение.

В последнее время все чаще биомаркеры рассматривают в качестве популяционного маркера, т.е. 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. Для оценки количества населения могут использоваться как результаты анализа эндогенных веществ, так и веществ, выделяемых человеком в результате употребления различных продуктов, таких как сигареты, алкоголь, продукты,

содержащие сахарозаменители и т.п. [12, 13]. Актуальность этого направления подтверждается растущим числом научных исследований. Количество публикаций по определению маркеров в сточных водах в базе данных Национального института здоровья США PubMed на февраль 2018 г. составляет 8322, из них 2049 приходится за последние 3 года. С точки зрения химиков-аналитиков, актуальна задача разработки селективных и высокочувствительных способов и методик определения биомаркеров в сточных водах.

1.2. Метаболит никотина – котинин

Курение табака является важной проблемой общественного здравоохранения. Табачный дым содержит в себе более 4000 соединений, 50 из которых являются канцерогенными и представляют одну из основных причин смертности и заболеваемости. Никотин является самым распространенным алкалоидом в составе табака (98% от общего количества алкалоидов) [14].

Основным метаболитом никотина является котинин. Уровень котинина в моче пропорционален сумме воздействия табачного дыма, поэтому он является ценным индикатором воздействия табачного дыма на организм. И хотя содержание котинина может варьироваться в зависимости от формы употребления табака (электронные сигареты, никотин-замещающая терапия), его широко используют в качестве биологического маркера для определения статуса курения табака [15].

Содержание котинина в сточных водах может служить параметром суммарного потребления табака и уровня его потребления на душу населения. Развитие этого направления может позволить определять количество жителей, обслуживаемых соответствующими очистными сооружениями в режиме реального времени, что в свою очередь откроет широкие возможности для эпидемиологических исследований [16].

1.2.1. Физико-химические свойства котинина

Котинин – алкалоид, содержащий в структуре пирролидиновый и пиридиновый цикл. Химическая формула котинина представлена на рис. 1.

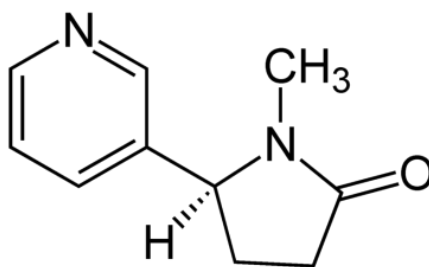


Рис. 1. Химическая формула котинина.

В табл. 2 представлены физико-химические параметры котинина при стандартных условиях.

Таблица 2. Физико-химические параметры котинина [14]

М, г/моль	176.21
ρ , г/см ³	1.146
T пл, °С	41
T кип, °С	360
logP	1.01
pK _{a1}	4.72
pK _{a2}	-2.67
Растворимость в воде, г/л	45

Котинин хорошо растворим в воде, а также в органических растворителях: метанол, этанол, хлороформ, дихлорметан и др. Раствор котинина готовят растворением в метаноле и хранят при низкой температуре (-4 °С). Это обусловлено тем, что котинин через некоторое время разлагается, при низкой температуре этот процесс замедляется [17].

1.2.2. Метаболизм никотина

Главный путь метаболизма никотина – через котинин (70-80%), период полураспада которого в свою очередь составляет 15-20 часов и может быть обнаружен в течение нескольких дней после употребления табака [18]. Метаболизм никотина происходит под действием ферментов семейства P450, цитохрома CYP2A6 [19, 20] в организме человека. Схема метаболизма приведена на рис. 2 [21-23].

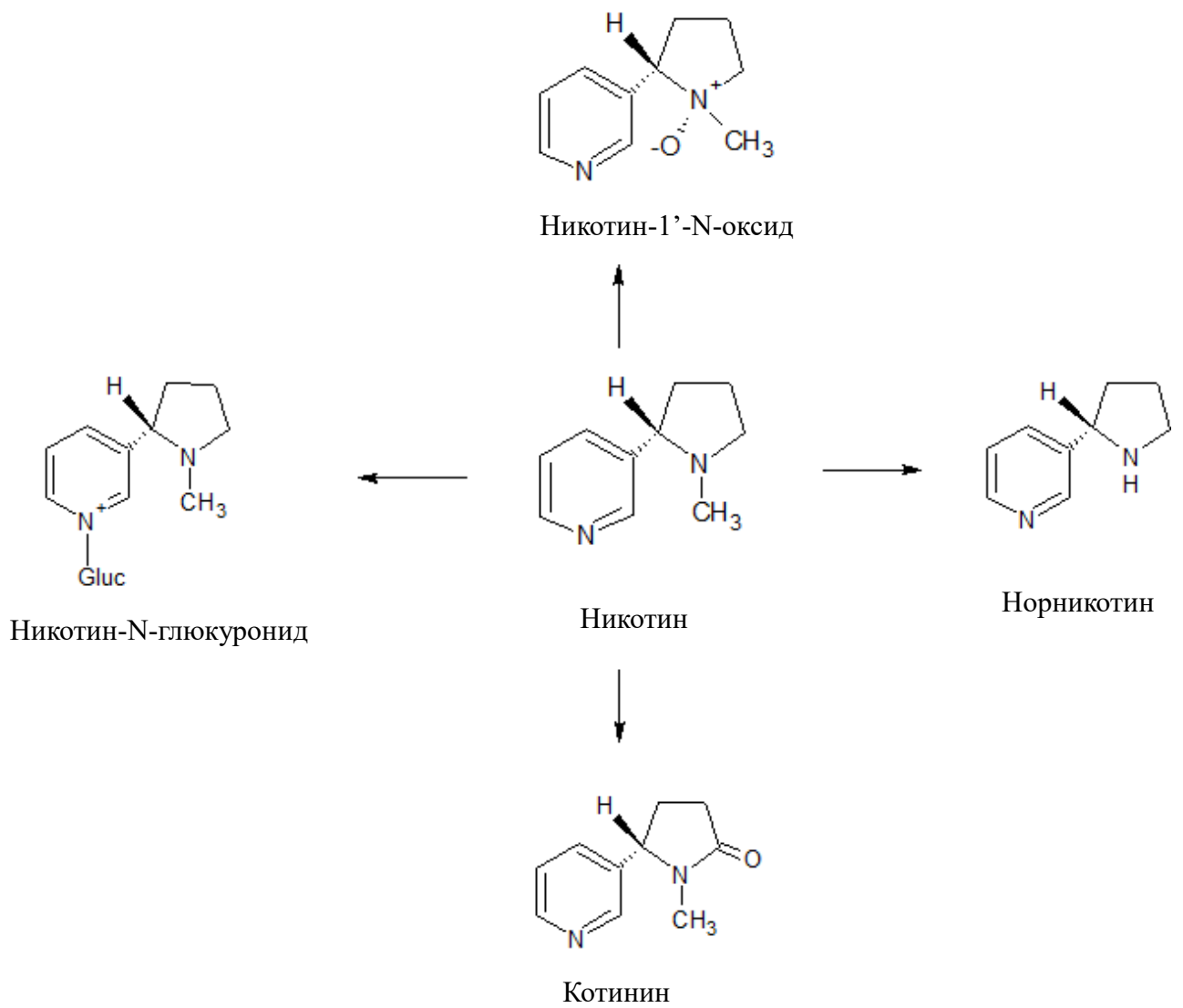


Рис. 2. Упрощенная схема метаболизма никотина [21].

В течение нескольких дней под действием фермента цитохрома CYP2A6, в организме происходит процесс метаболизма котинина, схема которого приведена на рис. 3 [24].

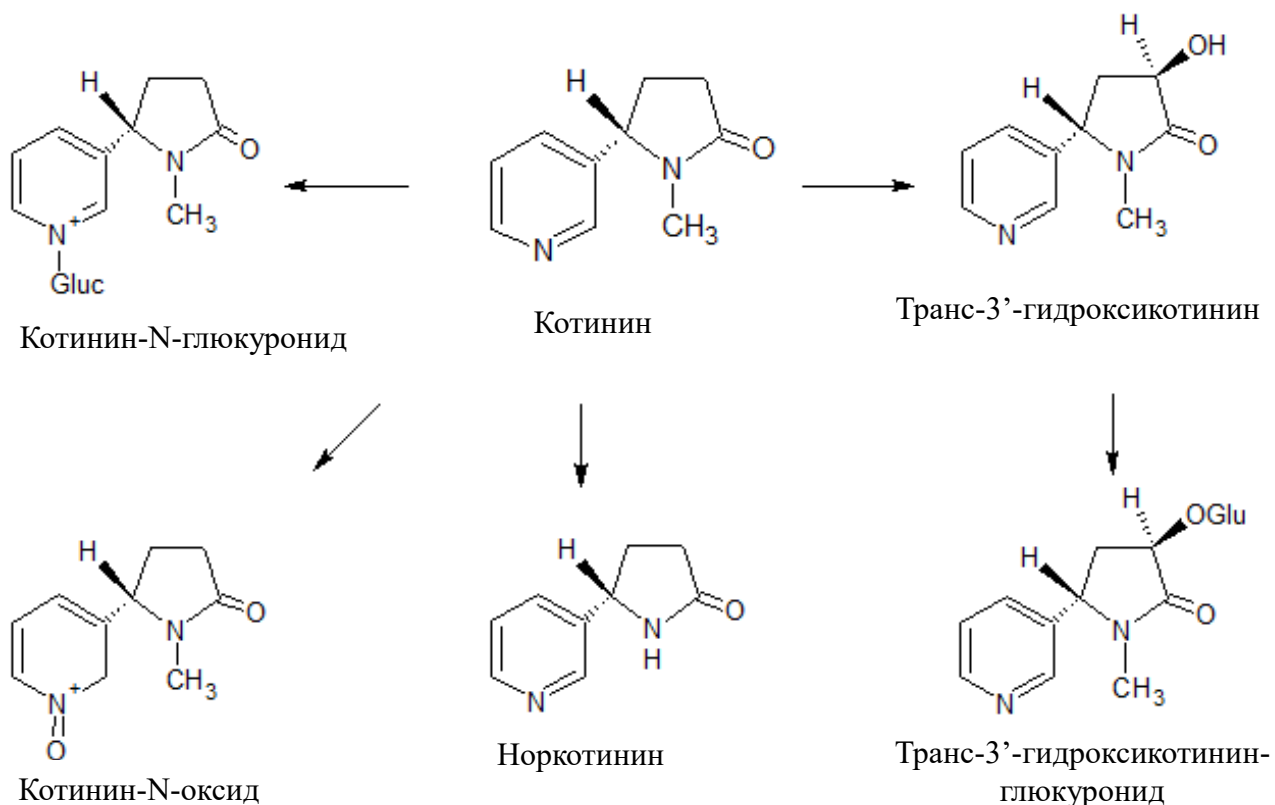


Рис. 3. Упрощенная схема метаболизма котинина [24].

Обнаружение и определение котинина возможно до тех пор, пока процесс метаболизма полностью не завершился. Наряду с определением котинина есть и исследования по определению его метаболитов, однако, в основном, в биологических объектах. Поскольку концентрация котинина в сточных водах очень низка, необходимо разработать высокочувствительный и селективный метод его определения.

1.2.3. Хроматографические методы определения котинина

Основными требованиями к методикам химического анализа являются необходимая чувствительность, достаточная селективность и точность, возможность одновременного определения всех аналитов. Для определения содержания котинина в качестве образца пробы могут выступать кровь [25], плазма крови [26], сыворотка [27], моча [28], слюна [29, 30], волосы, ногти [31], семенная жидкость [32, 33]. Анализ мочи является наиболее распространенным способом тестирования на наличие котинина в организме человека, в виду дешевизны и простоты в исполнении.

При количественном определении котинина часто используют метод

внутреннего стандарта, который предусматривает введение в анализируемый образец известного количества эталонного соединения. Внутренний стандарт должен соответствовать требованиям: иметь химическую структуру, максимально близкую к структуре определяемого соединения; химически инертен; не присутствует в анализируемой пробе; полностью отделяется от компонентов пробы, но время удерживания близко к времени удерживания определяемых компонентов; концентрация близка к концентрации определяемых компонентов [34, 35].

Метод внутреннего стандарта может быть использован для одновременного определения нескольких схожих по строению соединений. В сочетании с МС-детектированием он позволяет использовать в качестве внутреннего стандарта изотопомеченные определяемые соединения [36]. Наиболее предпочтительным является дейтерированный котинин: котинин-d₃ [37], -d₄ [38], -d₉ [39, 40]. Использование дейтерированного котинина довольно дорого, поэтому в методах определения котинина в качестве внутреннего стандарта используют и другие соединения: лидокаин [41], фенилимидазол [26, 42], фенилгидразин и норэфедрин, 6-метил-2,3-бипиридил [27], N-(2-метоксиэтил)-норкотинин [43], феназон [44], 6-аминохинолин [45].

Жидкостная хроматография

Для количественного определения котинина в основном используют жидкостную хроматографию. Ввиду гидрофильности котинина ($\log P \approx 1.01$) нормально-фазовую высокоэффективную жидкостную хроматографию практически не используют. В литературе есть примеры определения котинина методом ОФ ВЭЖХ. Так, например, в работе [43] изучали влияние кофеина на определение никотина и котинина в моче методом ОФ ВЭЖХ. В качестве ПФ использовали смесь воды, ацетонитрила, метанола и ацетатного буферного раствора с рН 4.3 (65:2:29:4) в режиме изократического элюирования. Разделение проводили на колонке Hypersil C18 ODS (250 мм × 5 мм, размер частиц – 5 мкм), скорость потока ПФ 0.7 мл/мин. Спектрофотометрическое детектирование проводили при 260 нм. Предел обнаружения составил 1 мг/л.

Зачастую при анализе реальных объектов чувствительность метода ухудшается, и увеличивается время пробоподготовки. Поэтому необходим более

чувствительный метод анализа, чем ВЭЖХ с УФ-детектором. Сочетание ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием соответствует указанным критериям: чувствительность и селективность метода увеличивается в разы.

Один из способов определения котинина методом ВЭЖХ-МС приведен в статье [39]. Хроматографическое разделение проводили на колонке X-Bridge C18 (150 мм × 2.1 мм, размер частиц – 3.5 мкм). ПФ – вода-ацетонитрил (80:20), скорость потока 0.2 мл/мин. Ионизацию осуществляли методом распыления в электрическом поле, масс-спектрометрическое детектирование проведено в режиме мониторинга выделенных ионов. Линейность градуировочного графика 5-200 мг/л. Найдена зависимость содержания котинина в сыворотке крови от содержания никотина через 24 часов после курения:

$$C_{\text{котинин}} = 5.03 \times C_{\text{никотин}}^{1.47},$$

где $C_{\text{котинин}}$ – концентрация котинина, $C_{\text{никотин}}$ – концентрация никотина в сыворотке крови. Графическая зависимость представлена на рис. 4.

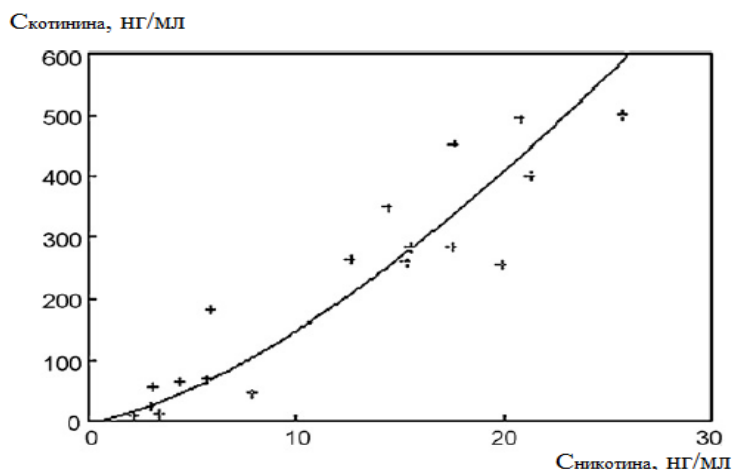


Рис. 4. Зависимость концентрации котинина в сыворотке от концентрации никотина [39].

Еще более перспективным вариантом определения содержания котинина является ВЭЖХ с тандемной масс-спектрометрией. Возможные пути фрагментации котинина представлены на рис. 5. Наиболее оптимальным из представленных на рисунке является вариант, в котором образуются наиболее устойчивые фрагменты: пиридиновый и пирролидиновый ионы. Обычно используют регистрацию по выбранному иону $177 \text{ m/z} \rightarrow 80 \text{ m/z}$.

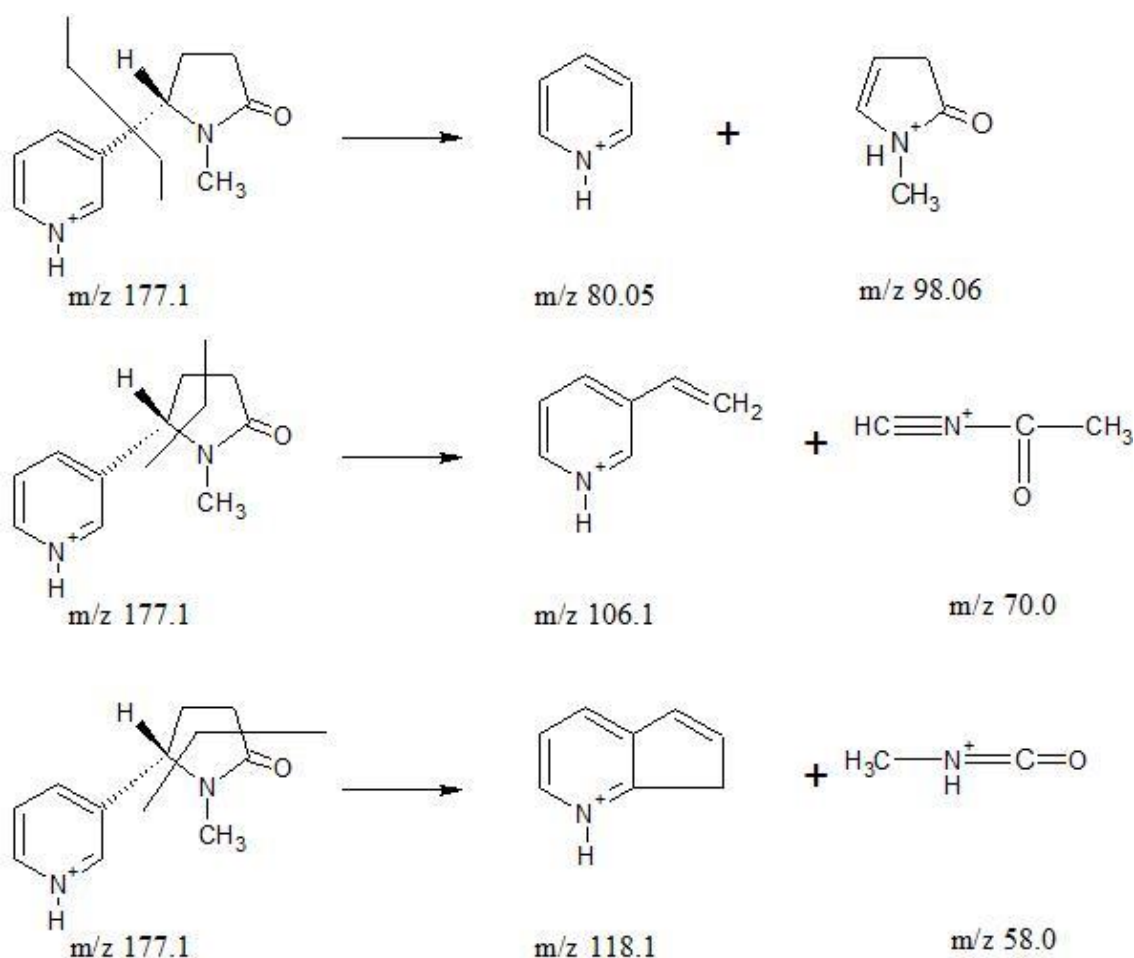


Рис. 5. Основные пути фрагментации котинина в масс-спектрметре [38].

В работе [24] использовали колонку Synergi Polar-RP (150 мм × 4.6 мм) с частицами размером 4 мкм, с предзащитной колонкой Polar-RP. В качестве подвижной фазы использовали 10 мМ ацетат аммония / 0.1% уксусная кислота в воде (А) – 10 мМ ацетат аммония / 0.1% уксусная кислота в метаноле (В) со скоростью потока 0.7 мл/мин в режиме градиентного элюирования. В работе использовали два варианта ионизации: ХИАД и ИЭР. Хотя метод с использованием ИЭР считается более чувствительным, он склонен подавлять ионизацию (как частный случай матричных эффектов) [46]. Обнаружено, что ИЭР в 10 раз чувствительнее по отношению к водным растворам котинина по сравнению с ХИАД. Масс-спектрометрическое детектирование проводили в режиме образования положительных ионов, газ-носитель – аргон. В качестве внутреннего стандарта использовали котинин-d₉ (186 m/z → 84 m/z).

Другие примеры определения котинина в биологических объектах методом жидкостной хроматографии приведены в табл. 3.

Таблица 3. Примеры использования жидкостной хроматографии при анализе котинина в биологических объектах

Объект	Условия проведения хроматографического анализа	Способ детектирования	Предел обнаружения котинина, мкг/л	Линейный диапазон, мкг/л	Литература
Моча	Колонка Hypersil C18 ODS ПФ: вода- ацетонитрил- метанол- ацетатный буферный раствор (рН4)	УФ	20	50-200	[43]
	Колонка Luna HILIC (150 мм × 3.0 мм, размер частиц – 5 мкм) ПФ: буферный растор 10 мМ формиата аммония (рН3,0) – ацетонитрил (градиентное элюирование), скорость ПФ 0.3 мл/мин.	МС/МС	3	10-10000	[47]
	Колонка Synergy MAX RP (150 мм × 4.6 мм, размер частиц – 4 мкм) ПФ: водный раствор 5 мМ ацетата аммония рН 6.8 – метанол (20:80) скорость ПФ 1мл/мин.	МС/МС, ХИАД	10	50-50000	[48]
	Колонка Acquity UPLC BEH Phenyl (50 мм × 2.1 мм, размер частиц – 1.7 мкм) ПФ: вода – метанол, содержащий 0.1% муравьиной кислоты и 2 мМ ацетата аммония (градиентное элюирование) скорость ПФ 0.5 мл/мин.	МС/МС, ИЭР	0.4	5-35000	[49]
	Колонка BetaBasic C18 (150 мм × 1 мм, размер частиц – 3 мкм) ПФ: ацетонитрил –5 мМ ацетат аммония рН 5, (60:40) скорость ПФ 50 мкл/мин.	МС/МС, ИЭР	0.3	0.8-100	[50]

Объект	Условия проведения хроматографического анализа	Способ детектирования	Предел обнаружения котинина, мкг/л	Линейный диапазон, мкг/л	Литература
Сыворотка крови	Колонка X-Brigge C18 (150 мм × 2.1 мм, размер частиц – 3.5 мкм) ПФ: вода-ацетонитрил (80:20 v/v), скорость ПФ 0.2 мл/мин.	МС, регистрация по выделенным ионам	1	5-500	[39]
	Колонка Shim-Pack HRC-ODS (150 мм × 4.6 мм, размер частиц – 5 мкм) ПФ: буферный раствор 0,1 М ацетата натрия (рН 4.0)- ацетонитрил (80:20 v/v), содержащая 0.024 М 1-октансульфоната натрия, скорость ПФ 1.0 мл/мин.	Флуориметрический с предварительной дериватизацией	0.5	1.5-25000	[51]
Плазма, слюна, моча	Колонка Synergi Polar-RP (150 мм × 4.6 мм, размер частиц – 4 мкм) ПФ: 10 mM ацетат аммония / 0.1% уксусная кислота в воде – метаноле (градиентное элюирование) скорость ПФ 0.7 мл/мин.	МС/МС	не указан	0.02-15	[24]
	Колонка Supelco Discovery HSF5 (150 мм × 4.0 мм, размер частиц – 5 мкм) ПФ: 10 mM ацетат аммония в воде - 10 mM ацетат аммония в метаноле (градиентное элюирование) скорость ПФ 0.7 мл/мин.		не указан	10-200	
Плазма крови, моча крыс	Колонка Acquity UPLC BEH C18 (50 мм × 2.1 мм, размер частиц – 1.7 мкм) ПФ: ацетонитрил-5 mM ацетат аммония (градиентное элюирование) скорость ПФ 0.25 мл/мин.	МС, мониторинг выделенных ионов ИЭР	2.5	10-600	[52]

Объект	Условия проведения хроматографического анализа	Способ детектирования	Предел обнаружения котинина, мкг/л	Линейный диапазон, мкг/л	Литература
Меконий	Колонка Zorbax Eclipse C18 (150 мм × 2.0 мм, размер частиц – 4 мкм) ПФ: 10 мМ ацетат аммония (рН 6.8) – ацетонитрил с 0.01% муравьиной кислотой (градиентное элюирование), скорость ПФ 1.0 мл/мин.	МС/МС, ХИАД	1.6	не указан	[53]
Плазма крови	НІІС ВЕН (100 мм × 2.1 мм, размер частиц – 1.7 мкм) ПФ: буферный раствор 10 мМ формиата аммония (рН3) – 0.1% муравьиная кислота в ацетонитриле (градиентное элюирование), скорость ПФ 0.4 мл/мин.	МС/МС, ИЭР	не указан	1-1000	[54]
Слюна	Колонка Luna НІІС (250 мм × 4.6 мм, размер частиц – 5 мкм) ПФ: вода-ацетонитрил (50:50 v/v), скорость ПФ 1.0 мл/мин.	УФ, 260 нм	1.5	5-500	[55]
Плазма и мозговая ткань крыс	Колонка Kinetex ТМ НІІС (50 мм × 2.1 мм, размер частиц – 2.6 мкм) ПФ: буферный раствор 10 мМ формиата аммония с 0,1% муравьиной кислоты –ацетонитрил (градиентное элюирование), скорость ПФ 0.3 мл/мин.	МС/МС, ИЭР	0.3	1-100	[56]
Моча, слюна	Колонка Synergi 4u polar-RP 80A (50 мм × 3мм, размер частиц – 4 мкм) ПФ: 5 мМ формиат аммония-метанол (55:45 v/v), скорость ПФ 0.8 мл/мин.	МС, мониторинг выделенных ионов	0.015	0.5-20	[57]

Объект	Условия проведения хроматографического анализа	Способ детектирования	Предел обнаружения котинина, мкг/л	Линейный диапазон, мкг/л	Литература
Сточная вода	Колонка Ultra Biphenyl (100 мм × 2.1 мм, 5 мкм) ПФ: 0.1% муравьиная кислота в воде-метанол (градиентное элюирование)	МС/МС, ИЭР	0.005 (конц. в 100 раз)	0.01-1	[58]
	Колонка X-Terra C18 (100 мм × 2.1 мм, 3.5 мкм) ПФ: 10 мМ ацетата аммония – ацетонитрил (градиентное элюирование), скорость ПФ 0.47мл/мин.	МС/МС, ИЭР	0.05 (конц. в 30 раз)	0.2-600	[59]
	Колонка Synergi Fusion-RP (100 мм × 2.0 мм, 4 мкм) ПФ: 5 мМ ацетата аммония в воде-5 мМ ацетата аммония в ацетонитриле (градиентное элюирование), скорость ПФ 0.2 мл/мин.	МС/МС, ИЭР	0.05	0.2-200	[60]

Газовая хроматография

При количественном определении котинина газовую хроматографию используют редко, ее применение актуально для определения относительно высоких концентраций. Капиллярная газовая хроматография иногда применяется для определения котинина в биологических жидкостях.

В работе [61] описан способ определения никотина, котинина и других алкалоидов в образцах мочи и слюны с помощью газовой хроматографии с пламенно-ионизационным детектором. Разделение проводили на колонке 25 м × 0.32 мм (BP21). Условия проведения анализа приведены в табл. 4. На хроматограмме (рис. 6) наблюдается хорошее разделение пиков каждого определяемого алкалоида: никотин, котинин, анабазин, фенилгидразина, используемого в качестве внутреннего стандарта.

Таблица 4. Условия проведения анализа методом ГХ-ПИД

Колонка	25 м × 0.32 мм, толщина пленки 0.5 мкм BP21, 5% фенилметилсиликон
Подвижная фаза	Гелий, 29 мл/мин
Ввод образца	Режим с делением потока, 270 °С
Температурный градиент	100°С (1 мин) => (30°С/мин) => 180°С => (40°С/мин) => 210°С (1 мин) => (40°С/мин) => 270°С (5 мин)
Детектирование	ПИД

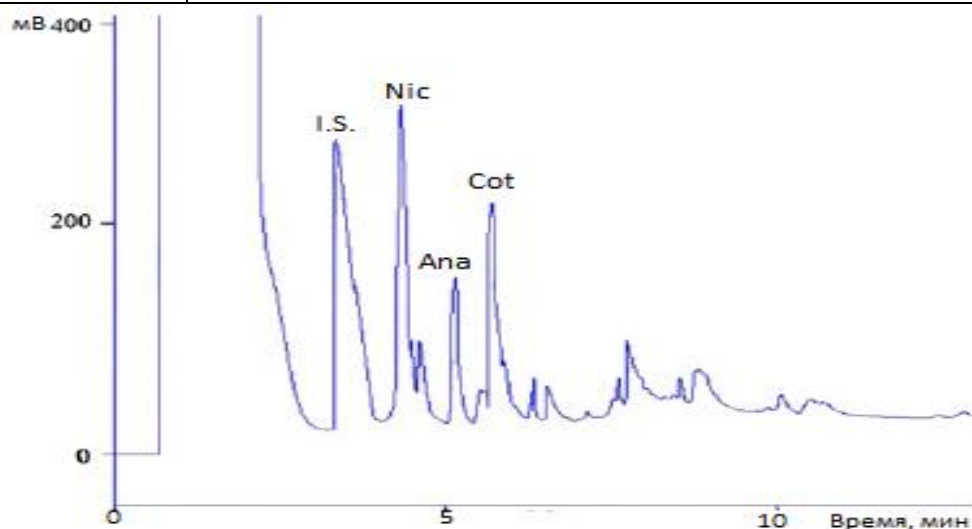


Рис. 6. Хроматограмма, полученная методом ГХ-ПИД. Образец – слюна активного курильщика с добавлением 0.5 г/мл никотина(Nic), котинина(Cot), анабазина(Ana) и внутреннего стандарта(I.S.). Колонка BP21 (25 м × 0.32 мм, 0.5 мкм). Газ-носитель – гелий. Скорость потока 29 мл/мин с делением потока 20:1 [61].

Наиболее используемый детектор при определении котинина методом газовой хроматографии – масс-спектрометр. Чаще применяют масс-спектрометрическое детектирование в режиме мониторинга выделенных ионов. Мониторинг множественных реакций проводят для идентификации соединения. Также используют масс-спектрометрическое детектирование по полному ионному току.

В статье [62] сообщается о достижении широкого линейного диапазона определения котинина 5-1000 мкг/л. В работе использовали 30 м × 0.25 мм колонку HP 5MS (толщина пленки – 0.25 мкм), в качестве газа-носителя использовали гелий со скоростью 1 мл/мин. Применяли градиентное элюирование, режим без деления потока. Внутренний стандарт – котинин-d₃. Общее время разделения составило 16 минут. Мягкие методы ионизации (ХИ, ПИ) приводят к интенсивным пикам ионов-предшественников, однако отсутствие фрагментации затрудняет установление структуры соединений.

В табл. 5 приведены примеры определения котинина в биологических жидкостях методом газовой хроматографии.

Таблица 5. Примеры использования газовой хроматографии при анализе котинина в биологических жидкостях

Объект	Условия проведения хроматографического анализа	Способ детектирования	Предел обнаружения котинина, мкг/л	Линейный диапазон, мкг/л	Литература
Моча, слюна	Колонка ВР21 (25 м × 0.32 мм, толщина пленки – 0.5 мкм), газ-носитель – гелий, скорость подвижной фазы 29 мл/мин, градиентное элюирование, режим с делением потока	ПИД	340	1130-45000	[61]
Слюна	Колонка НР 6890 (30 м × 0.25 мм, толщина пленки – 0.25 мкм), газ-носитель – гелий, скорость ПФ 1 мл/мин, градиентное элюирование, режим без деления потока	Масс-спектрометр, мониторинг выделенных ионов	5	5-1000	[62]
Моча	Колонка НР 5890 (12 м × 0.2 мм, толщина пленки – 0.33 мкм), 5% фенилметилсиликон, газ-носитель – гелий, скорость подвижной фазы 1 мл/мин, градиентное элюирование, режим без деления потока	Масс-спектрометр, мониторинг выделенных ионов	не указан	0.14-3.01	[44]
	Колонка ZВ-1(30 м × 0.53 мм, толщина пленки – 0.5 мкм), газ-носитель – азот, скорость ПФ 1.2 мл/мин, градиентное элюирование, режим без деления потока	Масс-спектрометр, мониторинг выделенных ионов	0.06	10-6000	[63]
	Колонка UB5 (30 м × 0.25 мм, толщина пленки – 0.25 мкм), газ-носитель – гелий, скорость подвижной фазы 1.2 мл/мин, градиентное элюирование, режим без деления потока	Азотно-фосфорный детектор	3 (с ЖЖЭ) 5 (с ТФЭ)	10-4000 15-4000	[64]

Другие методы анализа

Применение иммуноферментных методов анализа широко используют в тест-системах для полуколичественного определения котинина в биологических жидкостях. Данный лабораторный иммунологический метод чаще всего используется для выявления антигенов и антител, основанный на определении комплекса «антиген-антитело» за счет введения в один из компонентов реакции ферментативной метки с последующим детектированием с помощью соответствующего субстрата.

Наиболее используемым методом иммуноферментного анализа является метод определения с помощью иммуносорбентов, связанных с ферментами, представляющий собой вариант твердофазного анализа (тИФА). В работе [65] описан чувствительный способ ИФА, который позволяет измерять концентрации котинина в диапазоне от 1 нг/мл до 1 мкг/мл в сыворотке крови. Предел обнаружения и нижний предел определяемых концентраций составил 31 пг/мл и 1 нг/мл, соответственно. Полученные результаты были подтверждены результатами анализа ВЭЖХ-МС, проведенного в этом же исследовании. Концентрация котинина в сыворотке крови пассивных курильщиков составляла от 0.93 до 14.99 нг/мл.

В работе [66] описаны три подхода определения содержания котинина в моче и слюне человека: ГХ с азотно-фосфорным детектором, ВЭЖХ и ИФА со спектрофотометрическим детектированием. Сообщается, что содержание котинина в моче при определении методами ГХ и ВЭЖХ оказывается выше, чем при определении с помощью ИФА. Обнаружено, что содержание котинина в слюне ниже, чем в моче, и, как правило, значительно колеблется и зависит от многих факторов. Поэтому концентрация котинина в моче является более точным биомаркером воздействия табакокурения и лучше подходит для эпидемиологических исследований. В табл. 6 приведены результаты сравнения трех способов определения котинина.

Таблица 6. Сравнение содержания котинина в моче и слюне у активных, пассивных курильщиков и некурящих [66]

Образец	Метод	Активное курение (n=27), мкг/л	Нет активного курения (n=67)	
			Пассивное курение, мкг/л	Курение отсутствует, мкг/л
Моча	ВЭЖХ	3055.17±2092.85	Ниже предела обнаружения	Ниже предела обнаружения
	ГХ-АФД	3054.61±2407.24	46.03±45.76	27.90±17.25
	ИФА	2784.65±2779.84	27.93±33.19	16.16±15.78
Слюна	ИФА	19.63±16.89	5.68±9.22	1.96±1.09

Разработаны пьезокварцевые иммуносенсоры для проточно-инжекционного определения котинина [67]. Антитела к котинину получены иммунизацией овец иммуногеном на основе транс-4'-карбоксикотинина, синтезировали котинин-белковые конъюгаты. На стадии детектирования котинин, содержащийся в анализируемой пробе и иммобилизованный на поверхности сенсора, конкурировал за взаимодействие с фиксированным количеством антител. В исследованных образцах мочи концентрация котинина составляла 4 – 6 мг/л у курящих, 0,5–0,7 мг/л у некурящих [67].

ИФА при высокой специфичности и чувствительности имеет ряд существенных недостатков: длительность по времени, сложность в получении компонентов и стандартизации реакции, в связи с этим зачастую низкая воспроизводимость результатов по сравнению с методами ВЭЖХ и ГХ.

Также имеются данные использования метода спектроскопии комбинационного рассеяния света (Рамановская спектроскопия) для определения котинина [68-70]. Спектроскопия комбинационного рассеяния света – эффективный метод химического анализа, изучения состава и строения веществ.

Существует ряд усовершенствованных типов Рамановской спектроскопии, в частности, поверхностно-усиленная Рамановская спектроскопия. В последние годы показано, что данный метод позволяет добиться уникальной чувствительности измерений и детектировать даже единичные молекулы. Усиление достигается за счет

эффекта гигантского комбинационного рассеяния света на молекулах аналита, находящихся вблизи наночастиц металла (Ag, Au и др.). В результате такого усовершенствования сигнал увеличивается до 10^{14} раз. На рис. 7 приведены спектры, полученные методом комбинационного рассеяния [68].

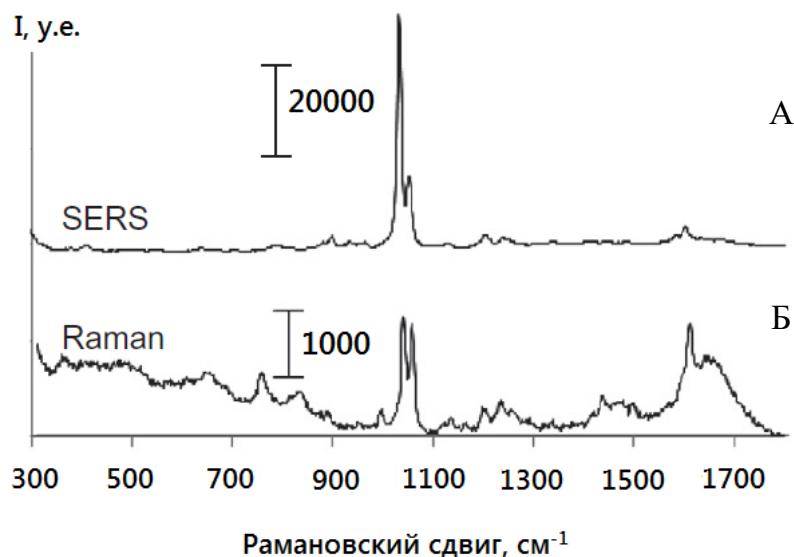


Рис. 7. Спектр комбинационного рассеяния котинина, полученный методами Рамановской спектроскопии (А) и поверхностно-усиленной Рамановской спектроскопии (Б) [68].

Следует отметить, что на воспроизводимость результатов методом поверхностно-усиленной рамановской спектроскопии значительно влияют такие факторы как кислотность среды и концентрация агрегирующих агентов [68-70]. По-видимому, лучшие условия для определения котинина: нейтральная среда (рН 7) и содержание хлорида магния 1.5 ммоль/л. При данных условиях предел обнаружения котинина составил 35.4 нг/л, а линейный диапазон – от 1.77 до 17.7 мкг/л [68].

Из обзора литературы по биомаркеру - котинину можно сделать вывод, что он является основным метаболитом никотина, который выводится организмом. Котинин достаточно стабилен в воде и может служить в качестве популяционного маркера для эпидемиологических исследований. В настоящее время в литературе существуют сравнительно большое количество методик определения котинина в биологических жидкостях, таких как моча, плазма, сыворотка крови и пр., однако найдено всего 3 методики определения котинина в сточных водах методом ВЭЖХ-

МС/МС с предварительным концентрированием в 30-100 раз с пределом обнаружения 5-50 нг/л. Учитывая варьирующееся содержание котинина в сточных водах, необходимо разработать более селективный и чувствительный способ определения котинина в такого рода объектах.

1.3. Метаболит серотонина - 5-гидроксииндол-3-уксусная кислота

5-гидроксииндол-3-уксусная кислота является основным метаболитом серотонина. 5-ГИУК 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 [7, 71, 72].

1.3.1. Физико-химические свойства 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты

Структурная формула 5-ГИУК представлена на рис. 8. Физико-химические свойства 5-ГИУК отражены в табл. 7 [73].

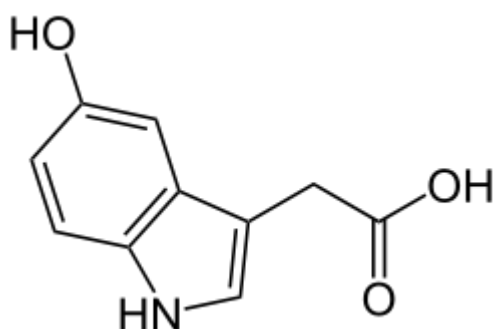


Рис. 8. Структурная формула 5-гидроксииндолуксусной кислоты.

Таблица 7. Физико-химические свойства 5-гидроксииндолуксусной кислоты

Молярная масса, г/моль	191.186
Температура плавления, °С	161-163
Растворимость в воде, г/л	24
logP	1.28
pKa	4.22

1.3.2. Метаболизм серотонина

Серотонин представляет собой природное соединение из класса триптаминов, и действует как нейромедиатор в центральной и периферической нервной системы в организме [74]. Он контролирует многие функции мозга, регулирует артериальное давление и сокращение гладких мышц [75]. Содержание

серотонина также влияет на возникновение проблем со сном, агрессией и восприятием к боли.

Серотонин образуется в результате декарбоксилирования 5-гидрокситриптофана, метаболита триптофана. Далее, под действием моноаминоксидазы серотонин превращается в 5-гидроксииндолацетальдегид, метаболизм которого происходит в двух направлениях: с образованием 5-гидроксииндолэтанола под действием альдегидредуктазы и с образованием 5-ГИУК под действием альдегиддегидрогеназы.

Схема метаболизма триптофана с образованием серотонина и дальнейшим синтезом мелатонина, 5-гидроксииндолуксусной кислоты и 5-гидроксииндолэтанола представлена на рис. 9.

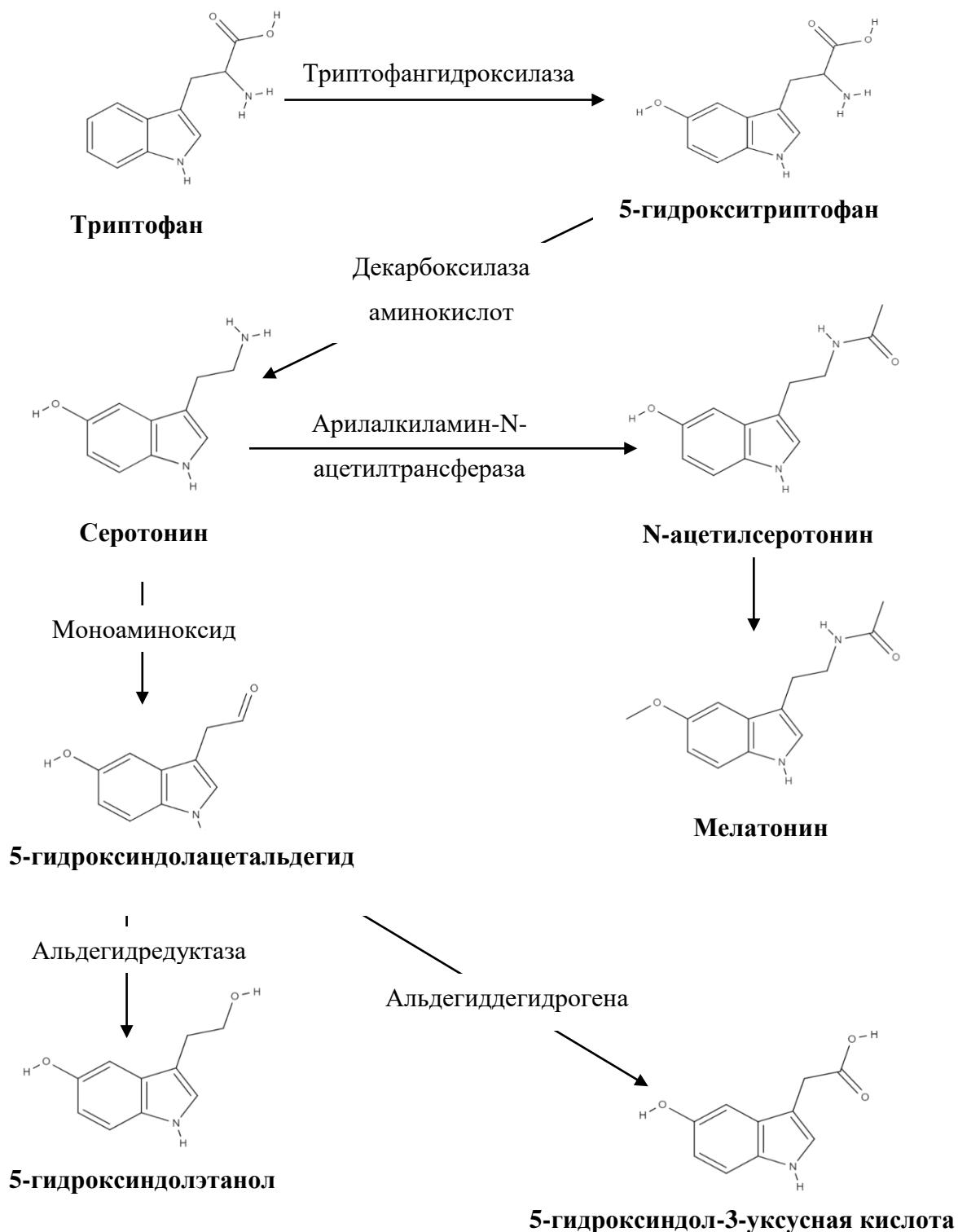


Рис. 9. Схема образования 5-ГИУК в организме человека [75].

Среднесуточное выделение 5-гидроксииндолуксусной кислоты у здорового человека составляет в среднем от 2 до 8 мг [76]. Концентрация 5-ГИУК в моче составляет в среднем от 0.4 до 9 мкг/мл [77].

1.3.3. Хроматографические методы определения 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты

В литературе есть единичные данные по уровню содержания кислоты в сточных водах. Уровень 5-ГИУК в сточных водах г. Валенсии варьируется от 5.5 до 14.3 мкг/л [7]. Существует множество методик определения 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты в биологических объектах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием. В литературе удалось найти всего 2 работы по определению данного соединения в сточных водах [7, 13], однако не найдены способы определения ниже предела обнаружения 0.5 нг/мл. Учитывая столь низкое и варьирующееся в широких пределах содержание кислоты в сточных водах, необходимо разработать надежную и высокочувствительную методику определения 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты, методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием.

Жидкостная хроматография

В работе [7] описан способ совместного определения 5-ГИУК, котинина, кофеина, креатинина, гидрохлортиазида, напроксена, салициловой кислоты и атенолола в сточной воде методом тандемной хромато-масс-спектрометрией. В качестве метода пробоподготовки использовали твердофазную экстракцию, однако, ввиду низкой степени извлечения 5-ГИУК и креатинина из сточных вод, для определения этих двух соединений использовали метод разбавления и прямого ввода. Предел обнаружения 5-ГИУК составил 1 мкг/л.

В работе [13] использовали колонку Zorbax Eclipse XDB-C18 (50 мм × 4.6 мм) с частицами размером 1.8 мкм, с предзащитной колонкой SG-C18. В качестве подвижной фазы использовали метанол(А) – 0.1% муравьиная кислота в воде (В) со скоростью потока 0.5 мл/мин в режиме градиентного элюирования. Объем вводимой пробы составил 10 мкл. В качестве источника ионизации использовали ИЭР. Однако в данной работе отсутствует информация по пределу обнаружения и других метрологических характеристиках метода.

Примеры обнаружения и определения 5-ГИУК в биологических объектах методом жидкостной хроматографии систематизированы в табл. 8.

Таблица 8. Примеры использования жидкостной хроматографии при анализе 5-ГИУК в биологических объектах

Объект	Условия проведения хроматографического анализа	Способ детектирования	Предел детектирования 5-ГИУК, мкг/л	Линейный диапазон, мкг/л	Литература
Ткани человеческого мозга	НФ: Bondapak C-18 column (300x3.9 мм). ПФ: 0.1 М ацетатный буферный раствор (рН=4.5, 1 мМ ЭДТА) : метанол (95:5 v/v) Скорость ПФ: 3 мл/мин.	Амперометрический	не указан	200- 100×10 ³	[78]
Спинальная жидкость крысы, мозг крысы	НФ: Lichrosorb RP-18 (250x 4.6 мм, 10 мкм). ПФ: смесь (84:16 v/v) 0.1 М раствора NaH ₂ PO ₄ с метанолом с добавлением октана (2.6*10 ⁻³ М), ЭДТА (1.0*10 ⁻⁴ М) и триэтиламина (2.5*10 ⁻³ М). Скорость ПФ: 1 мл/мин.	Амперометрический	не указан	200- 100×10 ³	[79]
Спинальная жидкость человека	НФ: Ultrasphere ODS (250x4.6 мм, 5 мкм). ПФ: смесь 0.1 М раствора ацетата натрия, лимонной кислоты (0.01 М), 0.25 мМ Na ₂ ЭДТА с метанолом (82:8 v/v). Скорость ПФ: 1.3 мл/мин.	Амперометрический	200	не указан	[80]
Спинальная жидкость человека	НФ: Bondapak C18 (300x3.9 мм, 10 мкм). ПФ: смесь 0.01 М буферного р-ра ацетата натрия (рН 4.0) с метанолом (85:15 v/v). Скорость ПФ: 1.5 мл/мин	Амперометрический	1	100-5000	[81]
		Флуориметрический	4.5		

Объект	Условия проведения хроматографического анализа	Способ детектирования	Предел детектирования 5-ГИУК, мкг/л	Линейный диапазон, мкг/л	Литература
Спинальная жидкость человека	НФ: Bondapak C18 (300x3.9 мм, 10 мкм). ПФ: смесь буферного раствора 0.01 М ацетата натрия : ацетонитрил (90:10 v/v) Скорость ПФ: 2 мл/мин	Флуориметрический	2.2	не указан	[82]
Мозг крысы	НФ: Ultrasphere ODS (150x4.6 мм, 5 мкм). ПФ: смесь 0.02 М р-ра KH_2PO_4 с добавлением 1 г/л натриевой соли гептасульфоновой кислоты: 60% водный раствор метанола (66:34 v/v). Скорость ПФ: 2 мл/мин	Флуориметрический	не указан	50-1000	[83]
Плазма крови человека	НФ: Inertsil-2 (100x1.0 мм, 5 мкм). ПФ: смесь 75 мл ацетонитрила, 5 мл тетрагидрофурана, 2.1 мМ 1-октансульфоната натрия, 14.7 мМ NaH_2PO_4 , 30 мМ цитрата натрия, 0.027 мМ ЭДТА и 1 мл триэтиламина в 1 л воды (рН 3.5). Скорость ПФ: 50 мкл/мин.	Амперометрический	~1	не указан	[84]
Мозг крысы и человека	НФ: Bondapak C18 (300x3.9 мм, 10 мкм) ПФ: смесь буферного раствора 0.01 М ацетата натрия : ацетонитрил (92:8 v/v) Скорость ПФ: 2 мл/мин	Флуориметрический	4	не указан	[85]

Объект	Условия проведения хроматографического анализа	Способ детектирования	Предел детектирования 5-ГИУК, мкг/л	Линейный диапазон, мкг/л	Литература
Нервная ткань крысы	НФ: Nucleosil 5 C18 ПФ: буферный раствор Макилвейна : метанол (85:15 v/v) Скорость ПФ: 1.0-1.2 мл/мин	Амперометрический	0.25	не указан	[86]
Мозг крысы и человека	НФ: Spherisorb ODS C18 (150x4.6 мм, 5 мкм) ПФ: смесь 0.1 М раствора К ₂ НРО ₄ с лимонной кислотой с добавлением ЭДТА (1.0*10 ⁻⁴ М):метанола (95:5 v/v) Скорость ПФ: 1.0 мл/мин	Амперометрический	0.2	не указан	[87]
Моча и плазма крови человека	НФ: Bondapak C18 RP (240x4.6 мм, 10 мкм) ПФ: смесь 0.08 М раствора ацетата натрия с добавлением ЭДТА (100 мг/л) Скорость ПФ: 1.3 мл/мин	Амперометрический	не указан	0.96-480×10 ³	[88]
Мозг кролика	НФ: TSK-Gel ODS-80 Ts (250x4.6 мм, 5 мкм) ПФ: смесь 0.1% трифторуксусной кислоты в воде:ацетонитрил (90:10 v/v) Скорость ПФ: 0.8 мл/мин	Флуориметрический	0.8	не указан	[89]
		Спектрофотометрический	6.37		

Объект исследования	Условия проведения хроматографического анализа	Способ детектирования	Предел детектирования 5-ГИУК, мкг/л	Линейный диапазон, мкг/л	Литература
Моча	НФ: HSS C18 (100x2.1 мм, 1.8 мкм) ПФ: смесь 0.1% трифторуксусной кислоты в воде:ацетонитрил (90:10 v/v) Скорость ПФ: 0.4 мл/мин	МС/МС	не указан	10-19×10 ³	[90]
		Амперометрический	500	не указан	
Моча	НФ: Discovery HS C18 ПФ: смесь 115мМ лимонной кислоты, 1% метанола, 51 мкМ ЭДТА, 25мкМ октилсульфат натрия Скорость ПФ: 0.75 мл/мин	Амперометрический	500	не указан	[91]
Плазма крови человека	НФ: Phenomenex Gemini C18 (150x2.0мм, 3 мкм) ПФ: А-смесь 0.1% муравьиной кислоты, 20мМ ацетата аммония в воде; В-ацетонитрил (А/В=65/35, с 20 мин А/В=10/90, с 24 мин А/В=65/35, v/v) Скорость ПФ: 0.25 мл/мин	МС/МС	не указан	0.2 - 50	[92]
Моча	НФ: Atlantis dC18 (100x3.0 мм, 3 мкм) ПФ: А-смесь 0.2% муравьиной кислоты в воде; В-ацетонитрил (70/30, v/v) Скорость ПФ: 0.4 мл/мин	МС/МС	не указан	30 - 229×10 ³	[93]

Объект	Условия проведения хроматографического анализа	Способ детектирования	Предел детектирования 5-ГИУК, мкг/л	Линейный диапазон, мкг/л	Литература
Мозг крысы	НФ: Acquity UPLC BEH C18 (50x2.1 мм, 1.7 мкм) ПФ: А-смесь 0.05% муравьиной кислоты и 1мМ гептафтормасляной кислоты в воде; В-метанол (А/В=5/95 до 0.5 мин, А/В=100/0 до 3.5 мин, v/v) Скорость ПФ: 0.2 мл/мин	МС/МС	36	не указан	[94]
Моча	НФ: HSS C18 (100x2.1 мм, 1.8 мкм) ПФ: смесь 0.1% трифторуксусной кислоты в воде:ацетонитрил (90:10 v/v) Скорость ПФ: 0.4 мл/мин	МС	1	13 - 19×10 ³	[95]
Гиппокамп крысы	НФ: BEH C18 (100x2.1 мм, 1.7 мкм) ПФ: А - 0.1% муравьиная кислота в воде; В-ацетонитрил (0–4 мин, 2% В; 6 мин, 80% В; 8–10 мин, 90% В) Скорость ПФ: 0.1 мл/мин	МС/МС	0.5	1 - 1×10 ³	[96]
Моча	НФ: Discovery RP Amide C16 (50x4.6 мм, 5 мкм) ПФ: А - 0.1% муравьиная кислота в воде; В-ацетонитрил (80:20 v/v) Скорость ПФ: 0.2 мл/мин	МС/МС	30	500 - 150×10 ³	[97]

Объект	Условия проведения хроматографического анализа	Способ детектирования	Предел детектирования 5-ГИУК, мкг/л	Линейный диапазон, мкг/л	Литература
Моча	НФ: Phenomenex Luna RP C18 (150x2.0 мм, 5 мкм) ПФ: А - 0.1% муравьиная кислота в воде; В - ацетонитрил (0–1 мин, 15% В; 1–3 мин, 90% В) Скорость ПФ: 0.2 мл/мин	МС/МС	15	50 - 50×10 ³	[98]
Моча	НФ: Hypersil Gold RP C18 (150x2.1 мм, 3 мкм) ПФ: А - 0.1% муравьиная кислота в воде; В - 0.1% муравьиная кислота в метаноле (0 мин 90% А; 3 мин 80% А; 3.01 мин 20% А; 5.5 мин 50% А; 7→12 мин 20% А; 12.5→20 мин 90% А.) Скорость ПФ: 0.2 мл/мин	МС/МС	2.1	10 – 500	[75]
Моча	НФ: HSS C18 (100x2.1 мм, 1.8 мкм) ПФ: А - 0.1% муравьиная кислота в воде; В - ацетонитрил (0 мин 97% А; 2 мин 80% А; 2.5 мин 0% А; 3.01 мин 97% А.) Скорость ПФ: 0.4 мл/мин	МС/МС	4	13 - 19×10 ³	[77]
Мозг крысы	НФ: Thermo C18 (250x4.6 мм, 5 мкм) ПФ: А - 0.05% муравьиная кислота в воде; В - ацетонитрил (82:18 v/v) Скорость ПФ: 0.8 мл/мин	МС/МС	не указан	12 - 1000	[99]

Объект	Условия проведения хроматографического анализа	Способ детектирования	Предел детектирования 5-ГИУК, мкг/л	Линейный диапазон, мкг/л	Литература
Мозг крысы	<p>НФ: Synergi Fusion-RP 80A (150x2.0 мм, 4 мкм)</p> <p>ПФ: А - 0.05% муравьиная кислота в воде; В - ацетонирил (0 мин 98% А; 2.5→8.0 мин с 98% до 70% А; 8 мин с 70% до 98% А.)</p> <p>Скорость ПФ: 0.2 мл/мин</p>	МС/МС	не указан	4 - 2000	[100]
Мозг крысы	<p>НФ: Hypersil BDS-C18</p> <p>ПФ: А – 30 мМ формиат аммония в воде; В - ацетонирил (0 мин 15% В; 5 мин 15% В, 15 мин 25% В; 25 мин 100% В.)</p> <p>Скорость ПФ: 1.0 мл/мин</p>	Флуориметрический	9200	47×10^3 - 1×10^6	[101]

Другие методы анализа

Помимо жидкостной хроматографии применяются и другие методы определения 5-ГИУК в биологических объектах [102-107]. Например, в работе [102] описан способ определения 5-ГИУК в образцах человеческой спинномозговой жидкости с помощью газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектором. Разделение проводили на колонке 1 м × 0.3 мм, заполненной с 3% ХЕ-60. Подвижной фазой служил гелий со скоростью потока 25 мл/мин. В качестве внутреннего стандарта была использована дейтерированная 5-ГИУК. Нижняя граница определяемой концентрации составила 2 мкг/л с линейным диапазоном от 2 до 50 мкг/л. Общее время разделения составило около 2 минут.

В статьях [105, 108, 109] сообщается о возможности определения 5-ГИУК спектрофотометрическим методом при 645 нм (590 нм [109]) с предварительной дериватизацией 1-нитрозо-2-нафтолом в присутствии 2-меркаптоэтанола. Время дериватизации составляет 5 мин, однако полная продолжительность пробоподготовки составляет 60 мин. Нижняя граница определяемой концентрации составила 10 мг/л.

Проведенный обзор литературы показывает, что 5-ГИУК является основным метаболитом серотонина. Физико-химические свойства позволяют ей служить в качестве популяционного маркера для эпидемиологических исследований. В настоящее время в литературе описан ряд методик определения 5-ГИУК в различных биологических объектах. Учитывая очень низкое и варьирующееся в широких пределах содержание кислоты в сточных водах, необходимо разработать надежную и высокочувствительную методику определения 5-ГИУК, методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием.

1.4. Метаболит этилового спирта – этилсульфат

Высокая скорость окисления этанола и ацетальдегида и быстрая элиминация продуктов их окислительного метаболизма ограничивает возможность использования этих соединений в качестве биомаркеров его употребления [110, 111]. Специфическими биомаркерами употребления этанола человеком являются продукты его метаболизма – этилглюкуронид и этилсульфат, несмотря на то, что их содержания в моче не превышает 0.02 и 0.011%, соответственно, от исходной дозы употребляемого этанола [112 -121].

1.4.1. Физико-химические свойства этилсульфата

Этилсульфат – моноэтиловый эфир серной кислоты, представляет собой производное серной кислоты, в которой один атом водорода замещен на этильный радикал. Структурная формула и основные физико-химические свойства этилсульфата представлены на рис. 10 и табл. 9.

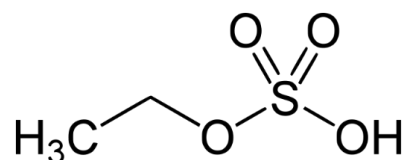


Рис. 10. Структурная формула этилсульфата.

Таблица 9. Физико-химические параметра этилсульфата

М, г/моль	126.126
ρ , г/см ³	1.366
Т кип, °С	258
Т пл, °С	53
logP	0.08
pKa	-3.14

Этилсульфат является стабильным маркером *in vitro*. В образцах мочи, хранившихся при 4°C в течение 5 недель, не обнаружили изменений в концентрации этилсульфата [122, 123].

1.4.2. Метаболизм этилового спирта

Метаболизм потребляемого организмом этилового спирта происходит в основном в печени в ходе двухстадийного процесса окисления, катализируемого ферментами. На первой стадии большая часть этанола превращается в ацетальдегид под действием алкогольдегидрогеназы и далее окисляется до ацетата под действием альдегиддегидрогеназы. Небольшая часть этилового спирта, не подвергаясь вышеописанному превращению, может выводиться организмом в неизменном виде с мочой, потом или выдыхаемом воздухом, или вступать в побочные процессы метаболизма в печени (рис. 11) [124].

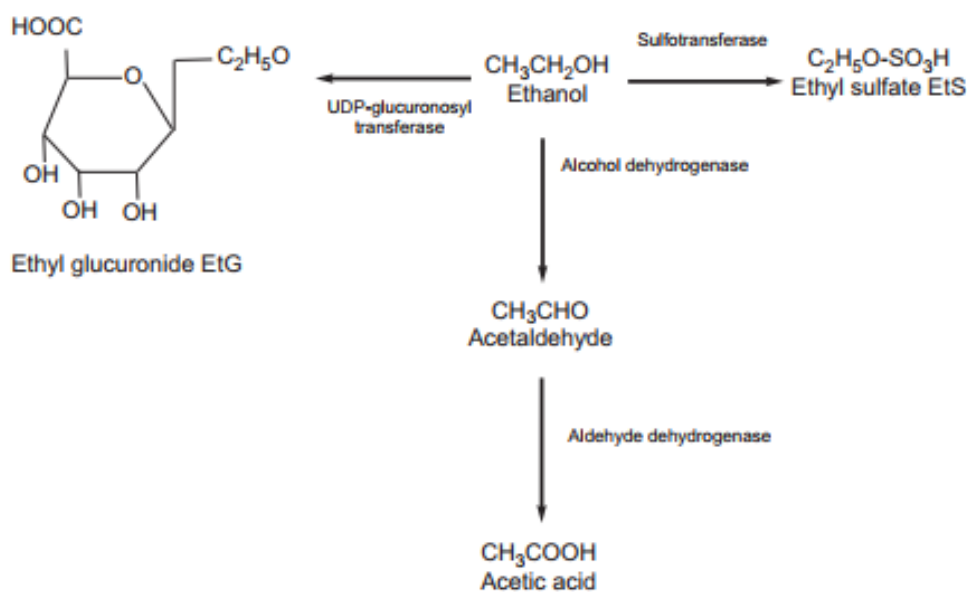


Рис. 11. Схема метаболизма этилового спирта [124].

Важнейшими из таких продуктов являются этилглюкуронид и этилсульфат. Этилглюкуронид образуется при взаимодействии этанола с глюкуроновой кислотой под действием фермента глюкуронозилтрансферазы, находящейся на поверхности митохондриальной мембраны клеток печени. Этилсульфат образуется путем взаимодействия этилового спирта с сульфотрансферазой [125].

Менее 1% попадающего в человеческий организм спирта образует этилсульфат и этилглюкуронид, тем не менее они являются основными биологическими маркерами на содержание алкоголя в организме. Будучи гидрофильными, они выводятся из организма с мочой, где чаще всего и проводят их определение. Кроме того, иногда этилсульфат и этилглюкуронид определяют в плазме крови, сыворотке крови, слюне и ряде других биологических жидкостях и тканях [126].

Максимальная концентрация этилсульфата в биологических жидкостях достигается позже, чем собственно самого спирта. Исследования [127-129] показали, что максимум концентрации этилглюкуронида в слюне достигался через 2-3 часа после приема организмом спирта (содержание этанола в крови от 0.5 до 0.78 г на 1 кг веса человека) и достигал 4000 мкг/л, а максимум для этилсульфата был достигнут через 1-2 часа и составил 2000 мкг/л. Однако имеют место значительные межиндивидуальные вариации во времени достижения максимума концентрации метаболитов в биологических жидкостях и тканях [130].

Согласно [131-133] распад метаболитов происходит экспоненциально со средним периодом полураспада 4 часа. Как правило, этилглюкуронид и этилсульфат можно обнаружить в организме в течение 72 часов. Степень элиминации этилсульфата выглядит неодинаково у здоровых субъектов и страдающих алкоголизмом. Показано, что снижение скорости элиминации и увеличение концентрации этилсульфата в крови у пациентов с почечной болезнью, которая замедляет выделение этих метаболитов [132].

Концентрация этилсульфата зависит от возраста, пола, употребления марихуаны, заболевания почек и количества потребляемого этанола в предыдущем месяце. Раса, курение табака, индекс массы тела, цирроз печени, возраст, в котором исследуемые начали регулярно употреблять алкоголь, и общее содержание воды в организме не оказывают существенного влияния на концентрацию этилсульфата в моче [134-137].

1.4.3. Хроматографические методы определения этилсульфата

Наиболее распространенным методом определения этилсульфата в биологических объектах является ВЭЖХ в тандеме с МС детектированием. В табл. 10 приведены примеры определения этилсульфата в различных биологических объектах.

Таблица 10. Примеры использования жидкостной хроматографии при анализе этилсульфата в биологических объектах и сточных водах

Объект	Условия проведения хроматографического анализа	Способ детектирования	Предел обнаружения этилсульфата, мкг/л	Линейный диапазон, мкг/л	Литература
Ткани плаценты и эмбриона	НФ: Chrompack Inertsil ODS-3 (100 мм×3.0 мм, 3 мкм) ПФ: 0.1% муравьиной кислоты/ацетонитрил (1:99) Скорость ПФ – 0.2 мл/мин	МС/МС, ИЭР	2.8 нг/г	не указан	[138]
Сточные воды	НФ: Purospher STAR RP-18 (125 мм×2.0 мм, 5 мкм) ПФ: метанол – вода, оба с добавкой ион-парного реагента (5мМ ацетат дибутиламмония), градиентный режим Скорость ПФ – 0.3 мл/мин	МС/МС, ИЭР	0.02	не указан	[139]
	НФ: Synergy Fusion-RP (100 мм×2.0 мм, 4 мкм) ПФ: 0.1% муравьиной кислоты в воде, 0.1% муравьиной кислоты в метаноле, градиентный режим. Скорость ПФ – 0.2 мл/мин	Квадрупольная времяпролетная МС (QTOF)	0.1	0.3 - 1000	[140]

Объект	Условия проведения хроматографического анализа	Способ детектирования	Предел обнаружения этилсульфата, мкг/л	Линейный диапазон, мкг/л	Литература
Сыворотка крови	НФ: Acquity BEH Amide HILIC (125 мм×2.1 мм, 1.7 мкм) ПФ: 0.1% муравьиной кислоты в 50%-ном растворе ацетонитрила – 0.1% муравьиной кислоты в ацетонитриле	МС/МС	1 мкг/г	40-3000 мкг/г	[141]
	НФ: Chrompack Inertsil ODS-3 column (100 мм×3.0 мм, 3 мкм) ПФ: 0.1% муравьиной кислоты в воде : ацетонитрил, градиентный режим Скорость ПФ – 0.2 мл/мин	МС/МС, ИЭР	не указан	50 - 2000	[142]
Моча	НФ: Hupercarb (150 мм×2.1 мм, 5 мкм) ПФ: (а) вода, 0.1% муравьиная кислота, 10 ммоль/л формиат аммония : (б) ацетонитрил, 0.1% муравьиная кислота и 10 ммоль/л формиат аммония.	МС/МС	100	не указан	[143]
	НФ: Acquity UPLC CSH C ₁₈ (100 мм×2.1 мм, 1.8 мкм) ПФ: ацетонитрил – 0.1% муравьиной кислоты, градиентный режим Скорость ПФ – 0.3 мл/мин	МС/МС	100	не указан	[144]

Объект	Условия проведения хроматографического анализа	Способ детектирования	Предел обнаружения этилсульфата, мкг/л	Линейный диапазон, мкг/л	Литература
Моча	НФ: Synergy Polar-RP (250 мм×2.0 мм, 4 мкм) ПФ: 0.1% муравьиной кислоты : ацетонитрил, градиентный режим Скорость ПФ – 0.2 мл/мин	МС/МС	50	110 - 5×10 ⁴	[119]
	НФ: Synergy Polar-RP (250 мм×2.0 мм, 4 мкм) ПФ: 0.1% муравьиной кислоты: ацетонитрил, градиентный режим Скорость ПФ – 0.2 мл/мин	МС/МС	15	не указан	[145]
	НФ: VDS Optilab WAX (50 мм×2.0 мм, 5 мкм) ПФ: 0-3.5 мин анализа: 25 мМ раствор уксусной кислоты в смеси ацетонитрила: вода (77:23), 3.5-4.5 мин анализа – 50мМ раствор уксусной кислоты в смеси ацетонитрила: вода (77:23), изократический режим при скорости ПФ – 0.5 мл/мин.	МС/МС	не указан	100 - 75×10 ⁴	[146]
	НФ: ZIC-HILIC (150 мм×2.1 мм, 3.5 мкм) ПФ: 5 мМ ацетата аммония: ацетонитрил, градиентный режим Скорость ПФ – 0.2 мл/мин	МС/МС	0.2	50 - 1×10 ⁴	[147]

Другие методы анализа

В работе [148] представлен метод определения этилсульфата в моче методом капиллярного электрофореза с УФ детектированием. В качестве фонового электролита использовали водный раствор 1 мМ фталевой кислоты, 15 мМ малеиновой кислоты, и 0.05 мМ цетилтриметиламмоний бромида (СТАВ), доведенный до рН 2.5 гидроксидом натрия. Определение проводили методом внутреннего стандарта (винилсульфоокислота) с помощью косвенного УФ-детектирования при длине волны 220 нм. На рис. 12 представлены электрофореграммы образцов мочи, содержащих этилсульфат. Линейный диапазон определяемых концентраций составил 5-700 мг/л.

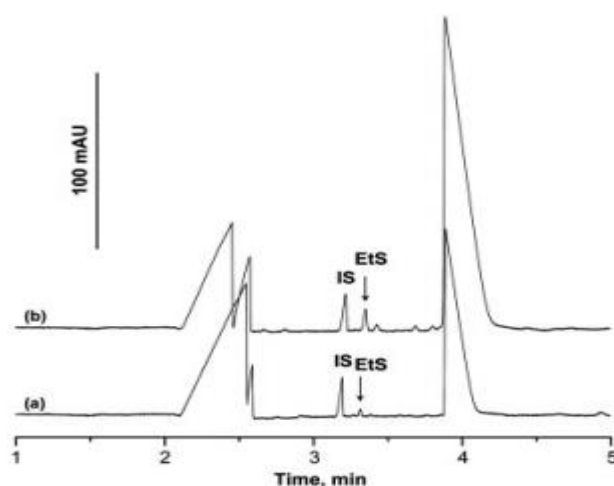


Рис. 12. Электрофореграммы образцов мочи (а) – содержание этилсульфата (EtS) -9.7 мг/л, (b) - содержание этилсульфата (EtS) – 39.9 мг/л [148].

Из обзора литературы можно сделать вывод, что этилсульфат, несмотря на его низкое содержание в моче (около 0.01% от исходной дозы употребляемого алкоголя), является подходящим биомаркером потребления этанола. В литературе найдено сравнительно небольшое число методик определения этилсульфата. Основным методом определения данного анализита является ВЭЖХ-МС/МС с пределом обнаружения до 0.02 мкг/л с предварительным концентрированием. Учитывая низкое содержание этилсульфата в сточных водах, необходимо повысить чувствительность и селективность определения на фоне мешающих компонентов в реальных объектах и добиться лучших метрологических характеристик.

1.5. Пробоподготовка биологических объектов

Моча – наиболее распространенный объект исследования на лекарственные токсичные соединения и характеризуется низким содержанием белковых компонентов. Это сложная по составу биологическая жидкость, в которую, помимо воды (97%), входят различные органические и неорганические соединения (белки, желчные пигменты, 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. [149].

Преданалитическая обработка реальных объектов может состоять из различных операций: прямое концентрирование (упаривание некоторого количества мочи до небольшого объема на водяной бане либо роторном испарителе), экстракция растворителями, хроматографическое разделение или сорбция на твердом сорбенте или комбинация различных операций. В клиническом анализе метод экстракции широко используется для очистки вытяжек из биологического материала от примесей, для выделения соединений из предварительно очищенных вытяжек, для концентрирования исследуемых веществ, находящихся в сильно разбавленных растворах [150].

Универсальность ЖЖЭ по отношению к природе выделяемых веществ и зачастую высокая селективность являются важными достоинствами этого метода. Селективность обуславливается возможностью выбора органических растворителей и использованием для регулирования селективности экстракции таких параметров, как кислотность, состав водной фазы и температуры [151].

В зависимости от свойств экстрагируемых соединений и характера решаемой аналитической задачи в качестве экстрагентов для извлечения органических соединений применяют несмешивающиеся с водой органические растворители

различных классов, которые должны отвечать ряду требований. Растворитель должен извлекать определяемое соединение или группу соединений с высокими коэффициентами распределения.

Содержание котинина, 5-ГИУК и этилсульфата в биологических объектах сравнительно низко по отношению других химических веществ, макрокомпоненты могут загрязнить используемое оборудование и мешать определению аналитов. В связи с этим современные способы их определения требуют тщательную пробоподготовку. Также можно отметить, что ввиду высокой гидрофильности определяемых соединений возникают сложности при ЖЖЭ. Примеры пробоподготовки биологических объектов, содержащих котинин, 5-ГИУК и этилсульфат, методом ЖЖЭ с последующим определением их содержания методом жидкостной хроматографии приведены в табл. 11.

Таблица 11. Примеры использования метода ЖЖЭ при анализе котинина, 5-ГИУК и этилсульфата в биологических объектах

Объект	Определяемые соединения	Экстрагент	Степень извлечения, %	Литература
Моча	Котинин	Гептан	4	[45]
		Толуол	13	
		Диэтиловый эфир	8	
		Этилацетат	33	
		Октанол-1	80	
		Дихлорметан	88	
		Бутанол-1	85	
		Хлороформ	92	
Моча	Котинин	Хлороформ	97	[43]
Моча	Котинин	Хлороформом: изопропанол (95:5)	95.7-99.8	[47]
Моча	Котинин	Хлористый метилен	90	[50]
Моча	5-ГИУК	Этилацетат	87	[88]
Сточная вода	5-ГИУК	Этилацетат	>90	[13]

Пробоподготовка методом ЖЖЭ имеет свои недостатки, среди которых: низкая скорость экстракции; использование токсичных растворителей; образование устойчивой эмульсии, затрудняющей разделение органической и водной фаз. Многие годы основными методами выделения, очистки и концентрирования определяемых веществ были жидкостная экстракция, осаждение, центрифугирование, колоночная и тонкослойная хроматографии. Такая подготовка образцов является длительным и многоступенчатым процессом, требующим расхода большого количества особо чистых растворителей и реактивов, дополнительного оборудования и трудозатрат. Альтернативным вариантом, исключающим многие недостатки жидкостной экстракции, является твердофазная экстракция [151].

Твердофазная экстракция – это быстрый метод пробоподготовки, в котором применяется сорбент для концентрирования и отделения целевого компонента или компонентов с последующим элюированием подходящим растворителем. Пробы большого объема могут быть обработаны с использованием сравнительно малых количеств твердой фазы, что в свою очередь требует малого объема растворителей для последующей десорбции сконцентрированных соединений, следовательно, отсутствует необходимость дополнительного выпаривания, и существенно уменьшается риск загрязнения образца [151]. Для ТФЭ характерны более широкие возможности варьирования природы и силы взаимодействий образца с сорбентом и элюентом, чем для жидкость-жидкостной экстракции, вследствие чего осуществляется более селективное и количественное выделение или более тонкая очистка интересующих компонентов. За счет специфических взаимодействий можно селективно концентрировать и извлекать каждое из определяемых соединений или отделять их от мешающих компонентов. К преимуществам ТФЭ относят такие параметры как: высокая степень извлечения целевых соединений (> 75%); отличная воспроизводимость; селективность и специфичность - чистые экстракты; существенное снижение времени пробоподготовки по сравнению с жидкостно-жидкостной экстракцией; возможность оптимизации процесса; простота в использовании; экономия дорогих растворителей. Примеры пробоподготовки биологических объектов, содержащих котинин, 5-ГИУК и этилсульфат, методом ТФЭ с последующим определением их содержания методом жидкостной хроматографии приведены в табл. 12.

Таблица 12. Примеры использования метода ТФЭ при анализе котинина, 5-ГИУК и этилсульфата в биологических объектах

Объект	Определяемые соединения	Сорбент	Условия экстракции	Степень извлечения, %	Литература
Моча	5-ГИУК	Gilson ASPEC C18	Активация: 1 мл метанола, 1 мл воды Загрузка: смесь 0.5 мл мочи с 0.5 мл метанола Промывка: 0.5 мл воды Элюирование: 1 мл ПФ (смесь 200 мкл ацетонитрила с 800 мкл р-ра (0.5 г/л муравьиной кислоты))	100-118	[97]
Моча	5-ГИУК	Isolute C18	Активация: 3 мл метанола, 3 мл воды (рН 3.5) Загрузка: смесь 0,2 мл мочи с 0.8 мл воды (рН 3.5) и 0.2 мл водного р-ра ВС Промывка: 1 мл 5% р-ра метанола Элюирование: 5 мл 0,1 М ацетата аммония Упаривание под током азота при 40°C. Растворение в 200 мкл воды	101-106	[75]
Сыворотка крови, плазма крови, мозг крысы	Котинин	Strata SCX	Активация: 1 мл метанола, 1 мл 0.5 М соляной кислоты Загрузка: 1 мл анализа Промывка: 1 мл воды, 1 мл 0.5 М соляной кислоты, 1 мл метанола Элюирование: 1 мл смеси дихлорметана, изопропанола, р-р аммиака (78:20:2) Упаривание под током азота при 40°C. Растворение в 500 мкл ПФ	92-96	[152]

Объект	Определяемые соединения	Сорбент	Условия экстракции	Степень извлечения, %	Литература
Плазма крови	Котинин	Chromabond SA	Активация: 1 мл ацетонитрила, 1 мл воды Загрузка: 1 мл аналита Промывка: 1 мл 2% муравьиной кислоты, 1 мл ацетонитрила Элюирование: 0.25 мл смеси ацетонитрила, 25% гидроксид аммония (90:10)	95-108	[153, 154]
Моча	Котинин	Chromabond C18	Активация: 3 мл метанола, 3 мл воды Загрузка: 5 мл мочи, 1 мл 2 М гидроксида натрия Промывка: 3 мл воды Элюирование: 3 мл метанола	98-103	[155]
Моча	Этилсульфат	Isolute-NH2	Активация: 2 мл метанола, 2 мл воды, 2 мл 0.1% муравьиной кислоты в ацетонитриле Загрузка: 0.125 мл мочи, 2 мл ацетонитрила, 50 мкл 6М соляной кислоты Промывка: 2 мл пентана Элюирование: 2 мл смеси воды, 0.1% муравьиной кислоты, 10 мМ формиата аммония	не указана	[143]

Для анализа образцов с высоким содержанием определяемых соединений, таких как моча, мозг, используется осаждение белков ацетонитрилом, метанолом, хлорной кислотой. Для повышения чувствительности метода можно комбинировать осаждение белков ацетонитрилом [92] и метанолом [96, 99, 100] с последующим концентрированием.

Также в литературе часто встречаются способ пробоподготовки «Dilute-and-Shoot» при анализе биологических жидкостей [156, 157, 158]. Данный метод является предпочтительным в тандеме с высокочувствительным методом определения аналитов. В работе [7, 159] используют метод ввод пробы после разбавления для определения 5-ГИУК и органических кислот, соответственно, в сточных водах, отмечая, что степень экстракции аналитов методом ЖЖЭ и ТФЭ мала для использования данного метода. В большинстве случаев при определении этилсульфата в биологических жидкостях также использовали ввод пробы после разбавления или без разбавления. Образец биологических жидкостей отфильтровывали через шприцевые фильтры с размером пор 0.20-0.45 мкм и центрифугировали, затем надосадочную жидкость вводили в хроматограф [115, 119, 136, 142, 146, 160].

Таким образом, определение биомаркеров в биологических образцах и сточных водах является важной и привлекающей задачей, однако, необходимо подобрать правильный метод пробоподготовки и способ определения. В настоящее время в литературе описаны способы пробоподготовки только одного специфического биомаркера, что сильно влияет на экспрессность методики определения популяционных биомаркеров. Несмотря на то, что с каждым годом в области эпидемиологии, основанном на анализе содержания в сточных водах специфических маркеров потребления алкоголя, никотина и других наркотиков, экскретируемых с мочой, публикуется все больше статей, остаются практически неизученными следующие вопросы: применение гидрофильной жидкостной хроматографии для определения биомаркеров в моче и сточных водах; возможность совместного определения специфических популяционных веществ-маркеров для

оценки численности населения, уровня потребления алкоголя и никотина; оценка стабильности биомаркеров в сточных водах; содержание популяционных биомаркеров в сточных водах городов России (в литературе есть данные для различных городов Испании, Италии, Китая и Бельгии).

Глава 2. Аппаратура, материалы и техника эксперимента

2.1. Используемые реактивы

В работе использовали следующие реактивы: котинин, дейтерированный котинин (D₃), 5-гидроксииндол-3-уксусная кислота, этилсульфат, дейтерированный этилсульфат (D₅) ($\geq 98\%$, все *Sigma Aldrich*, США), метанол (*HPLC grade*), ацетонитрил (*HPLC grade*), 0.1% водный раствор муравьиной кислоты, гидроксид натрия, гидрофосфат натрия двуводный, дигидрофосфат натрия двуводный, водный аммиак (25%), ацетат аммония, дигидрофосфат аммония, хлороформ (все «*Panreac*», Испания, х.ч.), дихлорметан, этилацетат («*Компонент-реактив*», Россия, ч.д.а.), уксусная кислота («*Химмед*», Россия, х.ч.), деионизованная вода.

2.2. Аппаратура

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); Agilent 1200, оснащенного бинарным градиентным насосом, онлайн дегазатором подвижной фазы, автоматическим устройством ввода пробы, термостатом колонок, диодно-матричным детектором (*Agilent Tech.*, США).

Использованы 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).

Для отбора аликвот использовали ручные дозаторы с диапазонами установки отбираемого объема в интервалах 10-100 мкл, 20-200 мкл, 100–1000 мкл, 1000–5000 мкл, соответственно (предел допустимой относительной погрешности измерения не более $\pm 5\%$; LABMATE, Польша).

Взвешивание точных навесок проводили на весах ExplorerPro (Ohaus Corporation, США), точность которых составляла 0.1 мг; XSE Analytical Balance (Mettler Toledo, Швейцария), точность которых составляла 0.01 мг.

Для центрифугирования образцов использовали центрифугу CM-50 (Elmi, Латвия); центрифугу Eppendorf 5418R с охлаждением (Eppendorf, Германия); SIGMA 1-15P (Sigma, Германия).

Для проведения ультразвуковой жидкостной экстракции и дегазации подвижной фазы применяли ультразвуковую ванну УЗВ-4.0 (ПКФ Сапфир, Россия).

Для перемешивания образцов использовали универсальный электромеханический шейкер (Россия).

Для упаривания растворителя использовали роторный испаритель с автоматизированной вакуумной станцией (Buchi, Швейцария); концентратор Eppendorf Concentrator Plus 5305 (Eppendorf, Германия).

Измерение pH растворов проводили на pH-метре PB-11 (Sartorius AG, Германия).

Для проведения твердофазной экстракции использовали вакуумную установку (манифолд), вакуумный насос Buchi V-100 (Швейцария), картриджи для твердофазной экстракции Chromabond SA (сорбент основе силикагеля, с привитыми группами бензолсульфокислоты) размер пор 60 мкм, размер частиц 45 мкм, удельная поверхность 500 м²/г (Macherey-Nagel, Германия), Strata-X (200 мг/3 мл), Chromabond C18 (500 мг/3 мл), Chromabond HR-P (500 мг/3 мл), AccuBOND C18 (100 мг/1 мл).

2.3. Условия определения котинина методом ВЭЖХ-МС/МС

2.3.1. Пробоподготовка образцов

Рабочие растворы готовили непосредственно в день анализа разбавлением аликвот стандартного раствора деионизованной водой. При подготовке образцов мочи пробу центрифугировали (15 тыс. оборотов /5 минут), затем надосадочную

жидкость разбавляли деионизованной водой в 3 раза. Полученный раствор снова подвергали центрифугированию (15 тыс. оборотов/5 минут). Затем добавляли необходимое количество внутреннего стандарта и проводили экстракцию. При подготовке образцов сточной воды пробу центрифугировали (15 тыс. оборотов/5 минут), добавляли раствор внутреннего стандарта и проводили экстракцию.

Жидкость-жидкостная экстракция

1. К точному объему пробы добавляли равный объем органического растворителя (хлороформ) и водный раствор гидроксида натрия (5 М) в необходимом количестве.
2. Полученную смесь перемешивали и выдерживали на ультразвуковой ванне в течение 10 минут.
3. После установления границы раздела фаз удаляли часть водной фазы, оставшееся количество центрифугировали (15 тыс. оборотов/5 минут).
4. Затем органическую фазу переносили в колбу и упаривали досуха при 30°C на роторном испарителе.
5. Остаток растворяли в точно измеренном объеме смеси вода:ацетонитрил (50:50).

Твердофазная экстракция

1. К точному объему пробы добавляли точный объем раствора внутреннего стандарта, перемешивали.
2. Кондиционирование и уравнивание сорбента патрона проводили последовательным пропусканием через картридж 3 мл метанола, а затем 3 мл воды.
3. Пробу вносили в объеме 2 мл и пропускали через сорбент со скоростью 5 мл/мин.
4. Промывку картриджа проводили последовательным добавлением 3 мл 5% уксусной кислоты, 3 мл смеси метанол:вода (50:50) и 3 мл смеси метанол : ацетонитрил : уксусная кислота (40:40:20).
5. Аналиты элюировали 2 мл смеси метанол:ацетонитрил:аммиак (25%) (47.5:47.5:5).

2.3.2. Условия хроматографического разделения с масс-спектрометрическим детектированием

Разделение компонентов пробы проводили в изократическом режиме на колонке Synergi Hydro (250 × 4.6 мм), диаметр зерна сорбента – 4 мкм (Phenomenex, США) с предзащитной колонкой Thermo scientific с фазой C18 (10 × 4 мм, 3 мкм). Объем вводимой пробы 4 мкл. В качестве источника ионизации использовали источник ИЭР в режиме регистрации положительно заряженных ионов. Напряжение на капилляре составило 3.5 кВ. Температура на распылителе 325°C, скорость потока газа (азота) 8 л/мин. Напряжение в ячейке соударений 5 В, напряжение на фрагменторе 110 В.

Для детектирования котинина использовали ММР-переходы m/z 177 → m/z 80, m/z 177 → m/z 98, для детектирования внутреннего стандарта – m/z 180 → m/z 80, m/z 180 → m/z 101. Для первого ММР-перехода энергия соударения 20 эВ, для второго ММР-перехода – 30 эВ. Время сканирования одного ММР-перехода 200 мс.

2.4. Условия определения 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты методом ВЭЖХ-МС/МС

2.4.1. Приготовление растворов

Приготовление буферного раствора А: 5.1 г ацетата аммония растворяли в 50 мл воды, рН раствора доводили до 4.6 уксусной кислотой. Приготовление буферного раствора Б: к 100 мл воды добавляли 1 мл буферного раствора А. рН доводили до 4.6, используя 2% раствор муравьиной кислоты. Приготовление буферного раствора В: к 100 мл воды добавляли 1 мл буферного раствора А. рН доводили до 6.3, используя 5% раствор аммиака.

Приготовление 0.1% раствора муравьиной кислоты в воде: аликвоту муравьиной кислоты объемом 1 мл помещали в мерную колбу вместимостью 1 л, растворяли в 300 мл деионизованной воды и доводили до метки тем же растворителем.

Приготовление 2% раствора муравьиной кислоты в воде: аликвоту муравьиной кислоты объемом 1 мл помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл,

растворяли в 10 мл деионизованной воды и доводили до метки тем же растворителем.

Приготовление исходного раствора 5-ГИУК: навеску 5-ГИУК массой 10 мг помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл и растворяли в 10 мл метанола, доводили объем до метки тем же растворителем и перемешивали. Конечная концентрация 5-ГИУК в растворе составила 200 мг/л.

Приготовление калибровочных растворов: калибровочные растворы готовили последовательным разбавлением деионизованной водой.

Жидкость-жидкостная экстракция

Без добавления буферного раствора: к 400 мкл водного раствора 5-ГИУК с концентрацией 60 мкг/л добавляли 1200 мкл органического растворителя. Перемешивали в течение 10 минут, затем центрифугировали в течение 3 минут при скорости 12000 об/мин. Отбирали 1000 мкл верхнего органического слоя и упаривали в концентраторе досуха при температуре 45°C в течение 30 минут. Полученный осадок растворяли в 200 мкл подвижной фазы, перемешивали в течение 5 минут и центрифугировали в течение 3 минут. 180 мкл конечного раствора помещали в виалу.

Пробоподготовка (с добавлением буферного раствора): к 400 мкл раствора добавляли 40 мкл аммиачно-ацетатного буферного раствора с pH=4.6. Дальнейшая пробоподготовка идентична пробоподготовке выше.

Твердофазная экстракция

При подборе условий твердофазной экстракции пробоподготовку осуществляли следующим образом:

pH 2.7

К 10 мл раствора 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты добавляли 10 мкл муравьиной кислоты, затем полученный раствор пропускали через предварительно подготовленный картридж (подготовка картриджа: последовательное пропускание 6 мл метанола и 6 мл 0.1% раствора муравьиной кислоты). Картридж высушивали в течении 15 мин, затем элюировали 5 мл метанола. Отбирали 1.5 мл метанола в пробирку, высушивали в концентраторе. Сухой остаток растворяли в 200 мкл

подвижной фазы и перемешивали в течение 5 мин.

pH 4.6

К 10 мл раствора 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты добавляли 0.1 мл буферного раствора А. рН раствора доводили до 4.6, используя 2% раствор муравьиной кислоты. Полученный раствор пропускали через предварительно подготовленный картридж (подготовка картриджа: последовательное пропускание 6 мл метанола и 6 мл буферного раствора Б). Затем через картридж пропускали 6 мл буферного раствора Б и высушивали в течении 15 мин и последовательно элюировали порциями метанола по 1.5 мл. Отбирали 1.5 мл метанола в пробирку, высушивали в концентраторе. Сухой остаток растворяли в 200 мкл подвижной фазы и перемешивали в течение 5 мин.

pH 6.3

К 10 мл раствора 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты добавляли 0.1 мл буферного раствора А. рН раствора доводили до 6.3, используя 5% раствор аммиака, полученный раствор пропускали через предварительно подготовленный картридж (подготовка картриджа: последовательное пропускание 6 мл метанола и 6 мл буферного раствора В). Затем через картридж пропускали 6 мл буферного раствора В и высушивали в течении 15 мин и элюировали 5 мл метанола. Отбирали 1.5 мл метанола в пробирку, высушивали в концентраторе. Сухой остаток растворяли в 200 мкл подвижной фазы и перемешивали в течение 5 мин.

При осуществлении твердофазной экстракции на картридже АссuBOND C18 (100 мг/1 мл) вместо 10 мл пропускали 5 мл образца сточной воды. Для подготовки картриджа и последующего промывания буферным раствором использовали 2 мл растворителя вместо 6 мл. Промывку картриджа осуществляли 1.5 мл метанола.

Приготовление образцов сточных вод, мочи и калибровочных растворов для определения 5-ГИУК

К 2 мл анализируемого образца добавляли 20 мкл муравьиной кислоты. Добавляли 2 мл этилацетата и перемешивали в течение 10 минут, затем центрифугировали при 3000 об/мин в течение 2 минут. Отбирали 1.5 мл органического слоя и упаривали в концентраторе досуха. Сухой остаток растворяли

в 200 мкл подвижной фазы, перемешивали 10 минут и центрифугировали при 14000 об/мин в течение 5 минут.

2.4.2. Условия хроматографического разделения с масс-спектрометрическим детектированием

Разделение компонентов пробы проводили в изократическом режиме на колонке Poroshell 120 HILIC (250 × 4.6 мм), диаметр зерна сорбента – 4 мкм (Agilent Technologies, США) с предзащитной колонкой Thermo scientific с фазой C18 (10 × 4 мм, 3 мкм). Объем вводимой пробы 20 мкл. В качестве источника ионизации использовали источник ИЭР в режиме регистрации положительно заряженных ионов. Напряжение на капилляре составило 3.5 кВ. Температура ионной трубки 350 °С, температура ионизационной камеры 400 °С, скорость потока газа (азота) 8 л/мин, скорость потока газа периферийного слоя 5.6 л/мин. Напряжение в ячейке соударений 5 В, напряжение на фрагменторе 10 В.

Для детектирования 5-ГИУК в режиме мониторинга множественных реакций использовали ММР-переходы m/z 192 → m/z 146, m/z 192 → m/z 117. Для первого ММР-перехода энергия соударения составляла 10 эВ, для второго ММР-перехода – 36 эВ. Время сканирования одного ММР перехода 167 мс.

2.5. Условия определения этилсульфата методом ВЭЖХ-МС/МС

Разделение компонентов пробы проводили в изократическом режиме на колонке Poroshell 120 HILIC (250 × 4.6 мм), диаметр зерна сорбента – 4 мкм (Agilent Technologies, США) с предзащитной колонкой Thermo scientific с фазой C18 (10 × 4 мм, 3 мкм). Объем вводимой пробы 4 мкл. ПФ: 5мМ ацетата аммония в воде(А)/0.1% муравьиная кислота в ацетонитриле(Б). Элюирование в изократическом режиме (А:Б/60:40). В качестве источника ионизации использовали источник ИЭР в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов. Напряжение на капилляре составило 3.5 кВ. Температура на распылителе 325°С, скорость потока газа (азота) 8 л/мин. Напряжение в ячейке соударений 5 В, напряжение на фрагменторе 86 В.

Для детектирования этилсульфата использовали ММР-переходы m/z 125 →

m/z 80, m/z 125 \rightarrow m/z 97, для детектирования внутреннего стандарта – m/z 130 \rightarrow m/z 80, m/z 130 \rightarrow m/z 97. Для первого ММР-перехода энергия соударения 12 эВ, для второго ММР-перехода – 34 эВ. Время сканирования одного ММР-перехода 200 мс.

2.6. Условия совместного определения котинина, 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты и этилсульфата методом ВЭЖХ-МС/МС

2.6.1. Пробоподготовка образцов

Образец мочи и сточных вод доводили до рН 2.7 добавлением соляной кислоты в день отбора пробы. Образцы хранили в морозильнике при -60°C . В день анализа образец размораживали и фильтровали через шприцевые мембранные насадки Chromafil Xtra PA с размером пор 0.45 мкм (Macherey-Nagel, Германия). В качестве способа пробоподготовки использовали метод «Dilute-and-Shoot» с предварительной очисткой пробы патроном с сорбентом C18.

К точному объему пробы добавляли точный объем раствора внутреннего стандарта, перемешивали. Кондиционирование и уравнивание сорбента патрона проводили последовательным пропуском через картридж 1 мл воды, а затем 1 мл метанола. Пробу вносили в объеме 0.5 мл и пропускали через сорбент со скоростью 1 мл/мин. Промывку патрона проводили добавлением 0.5 мл смеси метанол:вода (5:95). Раствор, собранный во время загрузки и промывки, использовали для дальнейшего анализа методом ВЭЖХ-МС/МС.

2.6.2. Условия хроматографического разделения с масс-спектрометрическим детектированием

Разделение компонентов пробы проводили в градиентном режиме на колонке Poroshell 120 HILIC (250×4.6 мм), диаметр зерна сорбента – 4 мкм (Agilent Technologies, США) с предзащитной колонкой Thermo scientific с фазой C18 (10×4 мм, 3 мкм). ПФ: 5мМ ацетата аммония в воде(А)/0.1% муравьиная кислота в ацетонитриле(Б). Элюирование в градиентном режиме (с 0 до 5 мин 60(А):40(Б); с 5 мин увеличение до 5(А):95(Б)). Объем вводимой пробы 10 мкл. В качестве источника ионизации использовали источник ИЭР в режиме регистрации положительно (котинин, 5-ГИУК) и отрицательно (этилсульфат) заряженных ионов.

Напряжение на капилляре составило 3.5 кВ. Температура на распылителе 325°C, скорость потока газа (азота) 8 л/мин. Напряжение в ячейке соударений 5 В, напряжение на фрагменторе 86 В.

Для детектирования аналитов использовали ММР-переходы указанные выше в п. 2.3.2 / 2.4.2 / 2.5.

Глава 3. Определение котинина в моче и сточных водах методом ВЭЖХ-МС/МС

3.1. Выбор условий пробоподготовки

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.

3.1.1. Выбор условий жидкостной экстракции

Выбор органического растворителя.

Начальным шагом при проведении жидкостной экстракции является выбор подходящего растворителя. Он должен обладать способностью экстрагировать котинин из образцов с высокой степенью извлечения, воспроизводимой в широком диапазоне концентраций, должен быть чистым и не содержать примесей.

В данной работе проведен сравнительный анализ тетрахлорметана, хлороформа, дихлорметана и этилацетата в качестве экстрагентов. В качестве образцов исследования использовали модельный раствор котинина (10 мг/л). Полученные результаты приведены в табл. 13.

Таблица 13. Сравнение степени извлечения для различных органических растворителей ($n=3$, $P=0.95$).

Органический растворитель	Диэлектрическая проницаемость, Ф/м (при 25 ⁰ С)	Степень извлечения, %
CH ₂ Cl ₂	8.9	79±5
CHCl ₃	4.8	82±5
CCl ₄	2.2	32±4
EtAc	6.0	10±3

Исходя из полученных данных, в дальнейшем жидкостную экстракцию проводили с использованием хлороформа в качестве органического растворителя.

Выбор времени механического перемешивания.

Ввиду того, что в экстракционных системах равновесие достигается не сразу, одним из важных факторов является время контакта двух фаз и установления равновесия. На рис. 13 предоставлена зависимость степени извлечения котинина от времени механического перемешивания.

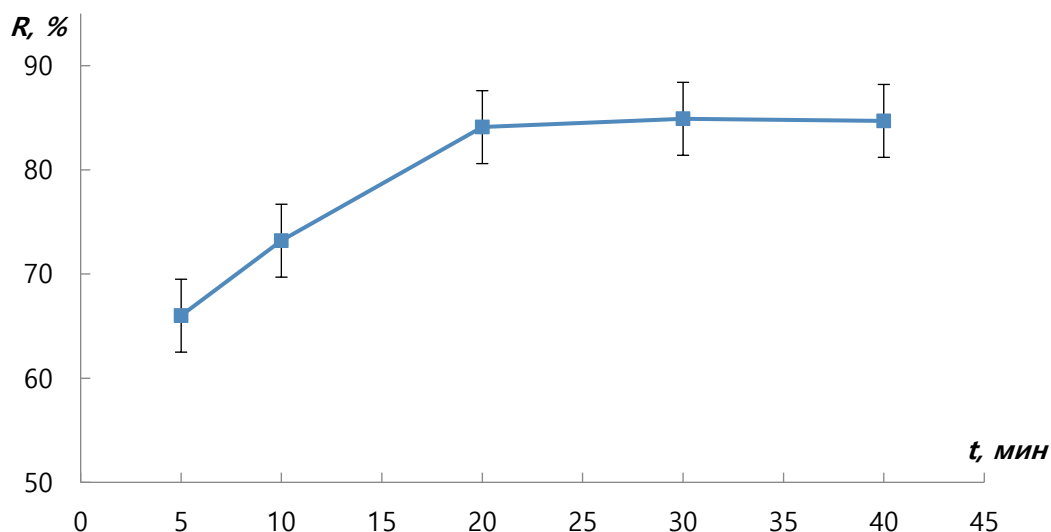


Рис. 13. Зависимость степени извлечения котинина от времени перемешивания. Органический растворитель – хлороформ. $c_{\text{котинин}}=1$ мкг/л. ($n=3$, $P=0.95$)

Как видно из графика, степень извлечения через 20 минут перемешивания выходит на плато. Время механического перемешивания выбрано 20 минут.

Выбор pH

Изучали зависимость степени извлечения котинина из водной в органическую фазу от pH среды. Для этого готовили буферные растворы со значениями pH 4.4, 7.5, 9.0, 12.0. Извлечение из модельного раствора котинина с концентрацией 1 мг/л проводили с использованием хлороформа. На рис. 14 показана степень извлечения при разных pH водного раствора котинина.

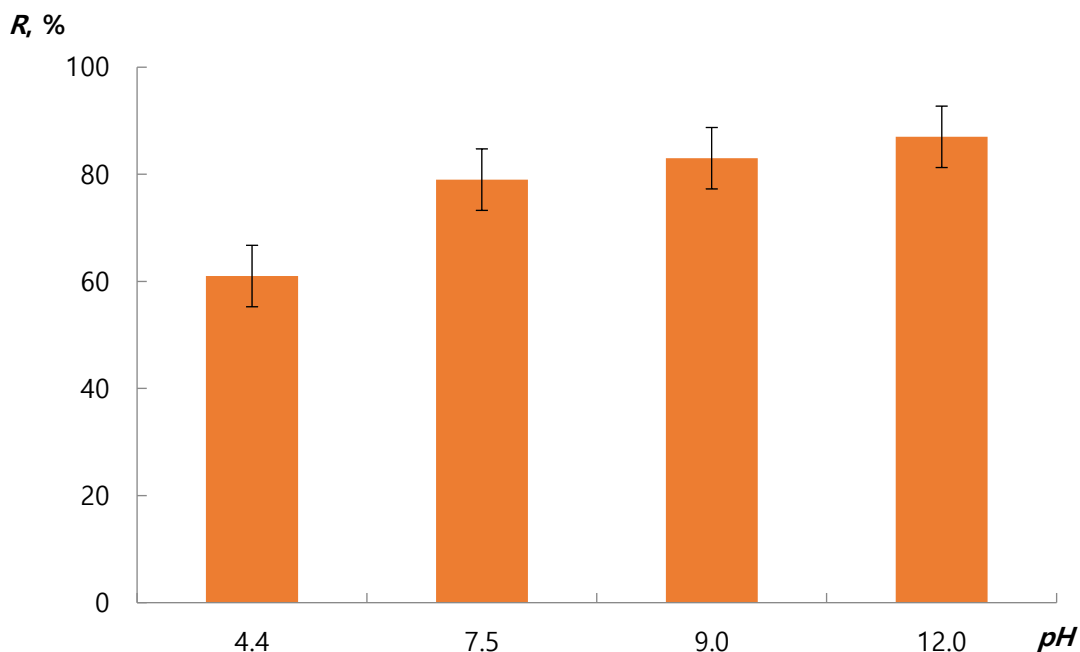


Рис. 14. Степень извлечения котинина из модельного раствора (2 мл) ($c = 1$ мг/л) при разных рН. Органический растворитель – хлороформ (2 мл), время перемешивания 20 минут ($n=3$, $P=0.95$).

Как видно из диаграммы степень извлечения котинина, как органического основания, с уменьшением рН падает, что связано с переходом котинина в соль, и возрастает с увеличением рН. В ходе дальнейшей работы экстрагирование проводили с добавлением 5М гидроксида натрия до рН 12.

Воспроизводимость экстракции

Для оценки воспроизводимости степени извлечения готовили серию модельных растворов котинина концентрацией 0.5, 5, 10, 50 мг/л, для каждой концентрации проводили три параллельных опыта. Результаты представлены в табл. 14.

Таблица 14. Степень извлечения котинина из модельных растворов разных концентраций методом ЖЖЭ. Органический растворитель – хлороформ ($n=3$, $P=0.95$).

Концентрация котинина, мг/л	Степень извлечения %
0.5	68±8
1	75±7
5	92±7
10	66±8
50	74±6

На основе полученных результатов сделали вывод о том, что результаты метода жидкость-жидкостной экстракции не подходят для определения котинина в широком диапазоне концентраций, сильно зависят от концентраций котинина в пробе и из-за недостаточной воспроизводимости результатов.

3.1.2. Выбор условий твердофазной экстракции

Твердофазная экстракция основана на процессе сорбции определяемого соединения на специальных сорбентах, способных селективно извлекать определяемое соединение из объекта анализа. Идеальным вариантом проведения ТФЭ можно считать использование картриджа с сорбентом, который позволяет сорбировать 100% определяемого соединения из любой матрицы при любых концентрациях.

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.

Порядок проведения ТФЭ с помощью Chromabond SA

1. Кондиционирование и уравнивание сорбента картриджа проводили последовательным пропусканием через картридж 3 мл метанола, 3 мл воды.
2. Пробу объемом 2 мл пропускали через сорбент со скоростью 5 мл/мин.
3. Промывку картриджа с определяемым соединением проводили последовательным добавлением 3 мл 5% уксусной кислоты, 3 мл смеси метанол:вода (50:50) и 3 мл смеси метанол:ацетонитрил:уксусная кислота (40:40:20) для удаления нейтральных и кислотных примесей.
4. Элюирование проводили 2 мл смеси метанол:ацетонитрил:аммиак в соотношении (47.5:47.5:5).

Порядок проведения ТФЭ с помощью Chromabond C₁₈

1. Кондиционирование и уравнивание сорбента картриджа проводили последовательным пропусканием через картридж 4 мл метанола и 4 мл воды.
2. Пробу объемом 2 мл пропускали через сорбент со скоростью 5 мл/мин.
4. Промывку картриджа проводили 3 мл воды, а затем сушили сорбент пропуская через него воздух в течение 3 минут.
5. Элюирование проводили 1.5 мл дихлорметана, а затем 1 мл смеси дихлорметан:изопропанол: аммиак в соотношении 78:20:2.
6. Полученный экстракт упаривали на роторном испарителе досуха при температуре 50°C. Остаток растворяли в 2 мл смеси ацетонитрил:вода (50:50).

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. Можно сделать вывод из рис. 14, что при уменьшении pH 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. 15.

Таблица 15. Степень извлечения котинина из модельных растворов разных концентраций методом ТФЭ с использованием картриджей 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

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.

3.2. Выбор хроматографических условий определения котинина

3.2.1. Выбор неподвижной фазы

Природа и состав неподвижной и подвижной фаз являются основными параметрами, влияющими на удерживание в жидкостной хроматографии. Котинин – гидрофильное соединение ($\log P \approx 1.01$), поэтому для хроматографического определения проблематично использовать неподвижные фазы на основе модифицированного силикагеля C₁₈.

Сравнение различных колонок

Для определения котинина использовали колонку Eclipse C18 (150 × 4.6 мм, размер частиц – 5 мкм), являющейся селективной по отношению к гидрофобным и малополярным соединениям. На рис. 15 приведено наложение хроматограмм, полученных на разных колонках. Как видно из рис. 15 котинин не удерживается на колонке Eclipse C18 (хроматограмма 1), и его время удерживания совпадает с мертвым временем.

В поиске подходящего сорбента использовали колонку Synergi Fusion-RP (250 × 4.6 мм, размер частиц – 4 мкм). Сочетание фазы силикагеля C18 с добавкой полярных лигандов должны приводить к сбалансированному удерживанию полярных, основных, кислых и гидрофобных соединений с хорошим разрешением.

Однако на колонке 2 наблюдается сильное размытие пика, и она признана непригодной.

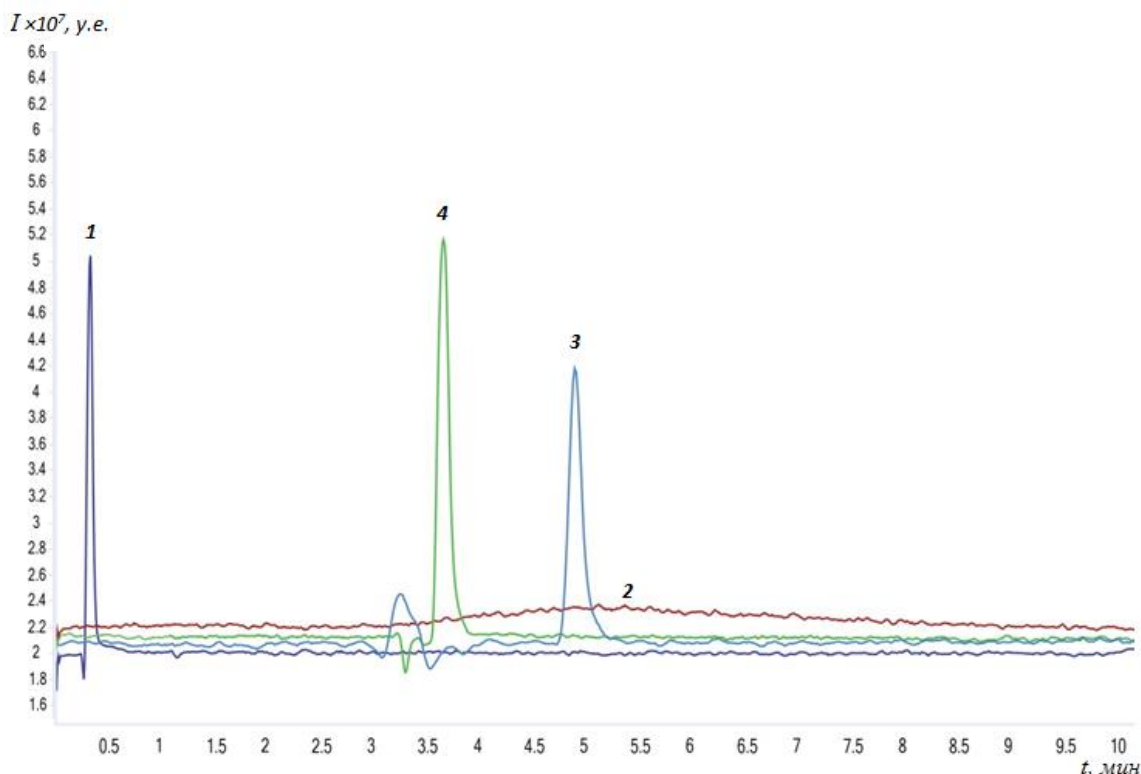


Рис. 15. Наложение хроматограмм, полученных с использованием следующих колонок: **1** – Eclipse C18 (150 × 4.6 мм), **2** – Synergi Fusion-RP (250 × 4.6 мм), **3** – Poroshell HILIC (150 × 4.6 мм), **4** – Synergi Hydro (250 × 4.6 мм). Объем вводимой пробы 4 мкл. $c_{\text{котинин}}=1$ мкг/л. Подвижная фаза: ацетонитрил:вода (50:50), скорость подвижной фазы 0.7 мл/мин. Масс-спектрометрическое детектирование, ИЭР.

Хроматографический анализ проводили с использованием полярной неподвижной фазы, а именно колонки Poroshell HILIC (250 × 4.6 мм, размер частиц – 4 мкм), которая содержит обогащенный водой слой около поверхности силикагеля. Этот водный слой облегчает перенос полярных соединений к стационарной фазе и увеличивает удерживание. На хроматограмме наблюдается четко выраженный пик (рис. 15, хроматограмма 3), время удерживания котинина составляет 4.65 мин.

Следующей исследуемой неподвижной фазой явилась Synergi Hydro (250 × 4.6 мм, размер частиц 4 мкм), которая обладает крайне гидрофобной поверхностью в совокупности с полярным эндкеппингом, обеспечивая тем самым хорошее удерживание неполярных и сильно полярных соединений. Полярный эндкеппирующий реагент обуславливает стабильность колонки в 100% водной среде

и увеличивает удерживание полярных соединений. Такую неподвижную фазу хорошо использовать при разделении неполярных и сильнополярных соединений.

Из рис. 15 видно, что наибольшую интенсивность сигнала детектора при значимом удерживании аналита, обеспечивает колонка Synergi Hydro (рис 15, хроматограмма 4).

Для сравнения эффективности колонок провели расчет числа теоретических тарелок на 1 м колонки, данные представлены в табл.16.

Таблица 16. Эффективность пика котинина для различных колонок ($c_{\text{котинин}}=1$ мкг/л)

Колонка	Длина колонки, м	Число теоретических тарелок, м ⁻¹
Synergi Hydro	0.25	34200
Poroshell HILIC	0.25	26900
Synergi <i>Fusion</i>	0.15	не оцениваем
Eclipse C18	0.25	1200

Как видно из таблицы, наилучшую эффективность обеспечивает колонка Synergi Hydro, поэтому в дальнейших экспериментах использовали эту колонку.

Выбор температуры подвижной фазы

Для снижения предела обнаружения котинина и сокращения времени анализа варьировали температуру термостата колонки ВЭЖХ от 25 до 45°C (рис. 16). Исходя из полученных данных, выбрана температура термостата колонки 35°C. Уменьшение сигнала при температуре выше 35°C, вероятно связано с деструкцией котинина.

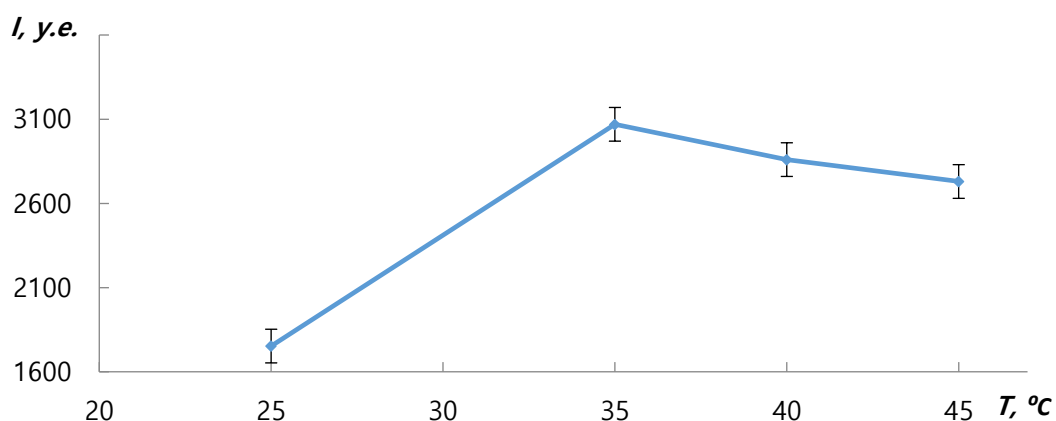


Рис. 16. Зависимость интенсивности пика котинина в зависимости от температуры термостата колонки. Колонка Synergi Hydro (250 × 4.6 мм, размер частиц 4 мкм). ПФ: ацетонитрил:вода (50:50), скорость потока ПФ 0.7 мл/мин, $c_{\text{котинин}}=1$ мг/л. Масс-спектрометрическое детектирование, ИЭР ($n=3$, $P=0,95$).

Таким образом были выбраны условия для хроматографического определения котинина. Работу проводили с использованием колонки Synergi Hydro (250 × 4.6 мм, размер частиц 4 мкм) при температуре 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.

3.2.2. Выбор условий масс-спектрометрического детектирования

Повысить чувствительность определения котинина можно с использованием tandemного масс-спектрометрического детектирования в сочетании с ВЭЖХ.

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, 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. 17.

Таблица 17. Оптимальные параметры источника ИЭР для определения котинина

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

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 определено отношение массы к заряду иона-предшественника, равная 177 (Рис. 17).

$I \times 10^6, \text{y.e.}$

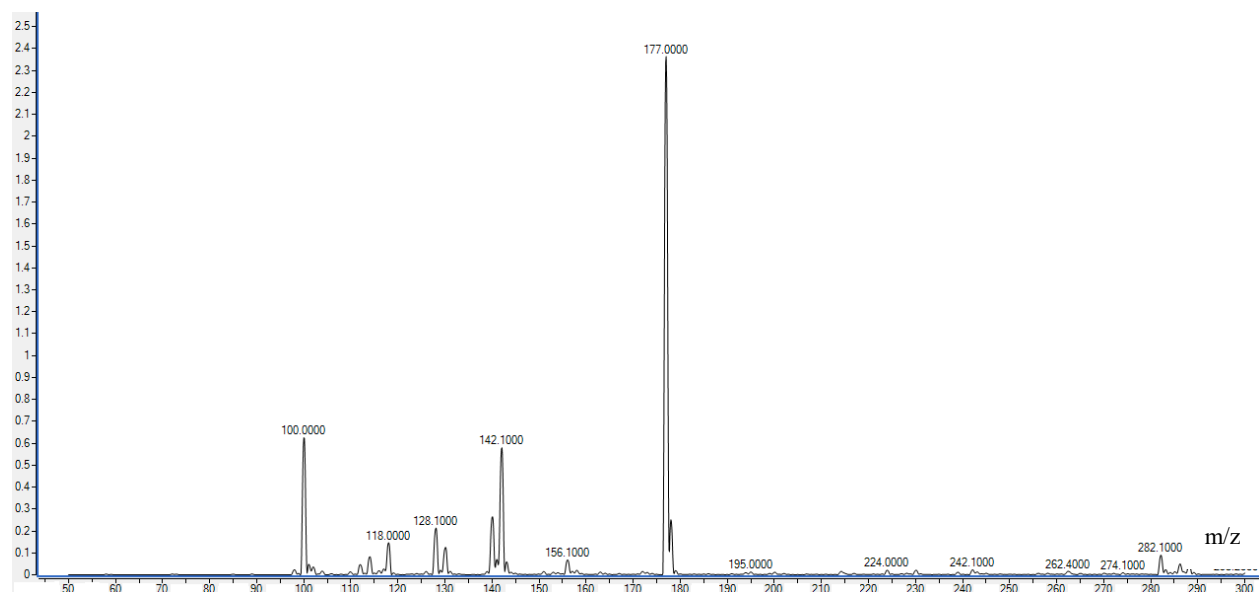


Рис. 17. Масс-спектр раствора котинина с концентрацией котинина 100 мкг/л. НФ: Synergi Hydro RP 80A (250 × 4.6 мм × 4 мкм). Объем вводимой пробы 4 мкл. ПФ: ацетонитрил:вода (50:50), скорость подвижной фазы 0.7 мл/мин. Детектирование в режиме сканирования ионов в диапазоне m/z : 50 - 300.

Наибольшую чувствительность можно достичь, используя режим ММР в варианте тандемного масс-спектрометрического детектирования. Для этого необходимо выбрать наиболее интенсивные переходы и энергии соударений. На рис. 18, приведена зависимость интенсивности ММР-перехода в спектре от m/z иона-продукта при значении энергии соударения 50 эВ.

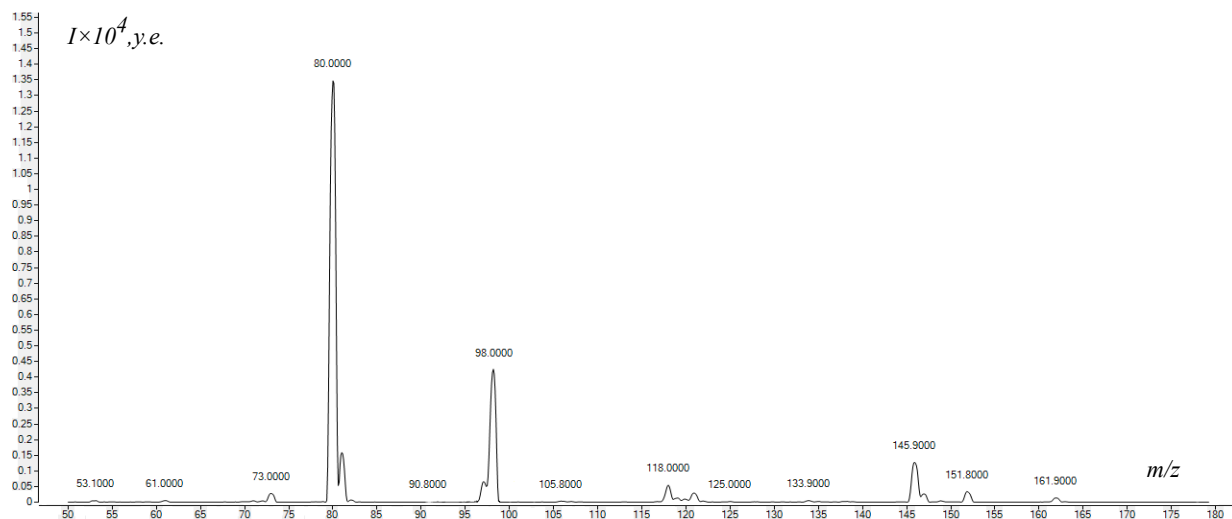
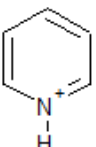
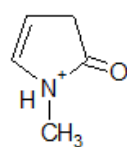


Рис. 18. Масс-спектр ионов-продуктов. ЭС = 50эВ. Колонка Synergi Hydro RP 80A (250 × 4.6 мм × 4 мкм). Объем вводимой пробы 4 мкл, $c_{\text{котинин}}=100$ мкг/л. Подвижная фаза: ацетонитрил:вода (50:50), скорость подвижной фазы 0.7 мл/мин.

Для количественного анализа обычно выбирают ММР-переход с максимальной интенсивностью. Также для подтверждения выбран дополнительный переход с значением m/z 98. ММР-переходы для количественного анализа котинина выбрали следующие: m/z 177 \rightarrow m/z 80, m/z 177 \rightarrow m/z 98, их структурные формулы предоставлены в табл. 18.

Таблица 18. Структуры фрагментных ионов наиболее интенсивных пиков.

m/z	80	98
Структура фрагментного иона		

На интенсивность сигнала определенного ММР-перехода большое влияние оказывает энергия соударений (ЭС). Ее выбор в основном зависит от устойчивости исходного иона 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. 19). Выбранные из построенных зависимостей значения ЭС представлены в табл. 19.

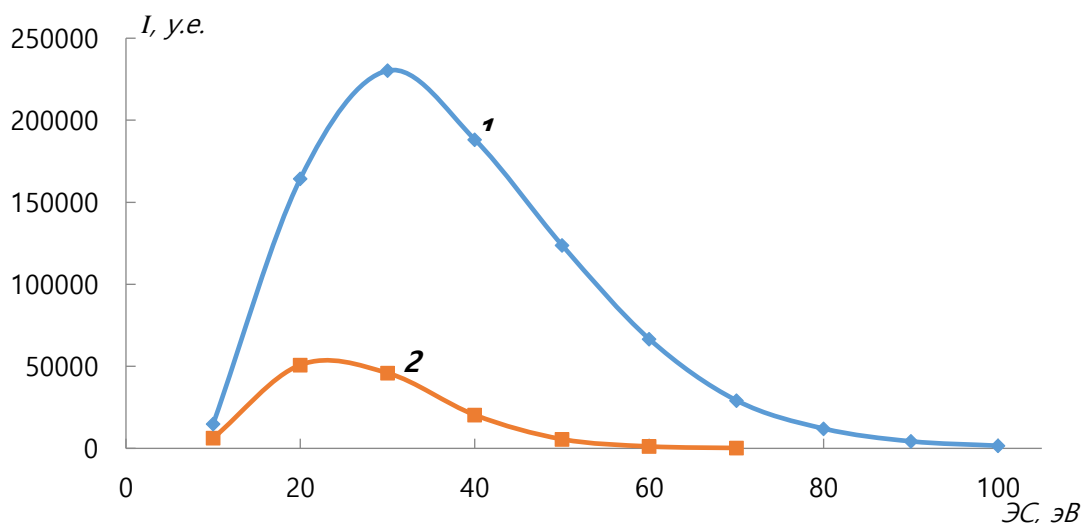


Рис. 19. Зависимость интенсивности сигналов переходов (1) m/z 177.10 \rightarrow m/z 80.05, (2) m/z 177.10 \rightarrow m/z 98.06 от значений энергии соударения. НФ: Synergi Hydro RP 80A (250 \times 4.6 мм \times 4 мкм). Объем вводимой пробы 4 мкл, $c_{\text{котинин}}=10$ мкг/л. ПФ: ацетонитрил:вода (50:50), скорость подвижной фазы 0.7 мл/мин.

Таблица 19. Значения энергии соударения для выбранных ММР-переходов

ММР-переход	Энергия соударения, эВ
m/z 177 → m/z 80	30
m/z 177 → m/z 98	20

Напряжение на фрагменторе может оказывать значительное влияние на выход ионизации аналита, и соответственно на чувствительность определения. В рамках данной работы построены зависимости интенсивности сигнала котинина от напряжения на фрагменторе (рис. 20). 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.

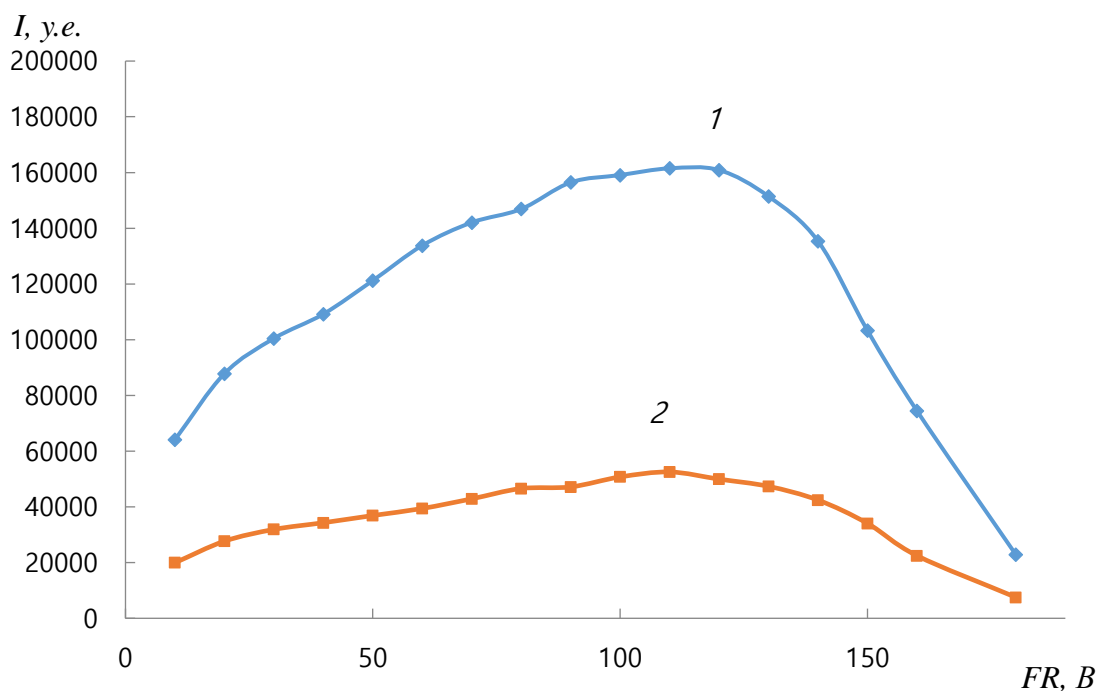


Рис. 20. Зависимость интенсивности сигнала котинина от напряжения на фрагменторе для выбранных ММР-переходов (1) m/z 177.10 → m/z 80.05, (2) m/z 177.10 → m/z 98. Колонка Synergi Hydro RP 80A (250 × 4.6 мм × 4 мкм). Объем вводимой пробы 4 мкл, $c_{\text{котинин}}=1$ мкг/л. Подвижная фаза: ацетонитрил:вода (50:50), скорость подвижной фазы 0.7 мл/мин.

3.2.3. Характеристики хроматографического определения котинина с масс-спектрометрическим детектированием

Хроматографические условия с масс-спектрометрическим детектором и спектрофотометрическим детектором совпадают: колонка Synergi Hydro RP 80A (250×4.6 мм, размер частиц 4 мкм), $T_{\text{термостата}}=35^{\circ}\text{C}$, объем вводимой пробы 4 мкл. Изократический режим элюирования, подвижная фаза А – 0.1% водный раствор муравьиной кислоты, В–ацетонитрил (50:50), скорость потока – 0.7 мл/мин. Время анализа 10 минут.

Для оценки метрологических характеристик предложенного подхода готовили серию модельных растворов в диапазоне концентраций 0.05- 1000 мкг/л (0.05, 0.1, 0.5, 0.75, 1, 5, 10, 50, 100, 250, 500, 750, 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 холостом 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. 20.

Таблица 20. Диапазоны линейности градуировочной зависимости при определении котинина методом ВЭЖХ-МС/МС. ($n=3$, $P=0.95$)

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

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

Наложение хроматограмм модельных растворов котинина после ТФЭ приведено на рис. 21. На основании градуировочной зависимости получены некоторые метрологические характеристики предложенного подхода. Они представлены в табл. 21. Предел обнаружения составляет 0.03 мкг/л без предварительного концентрирования.

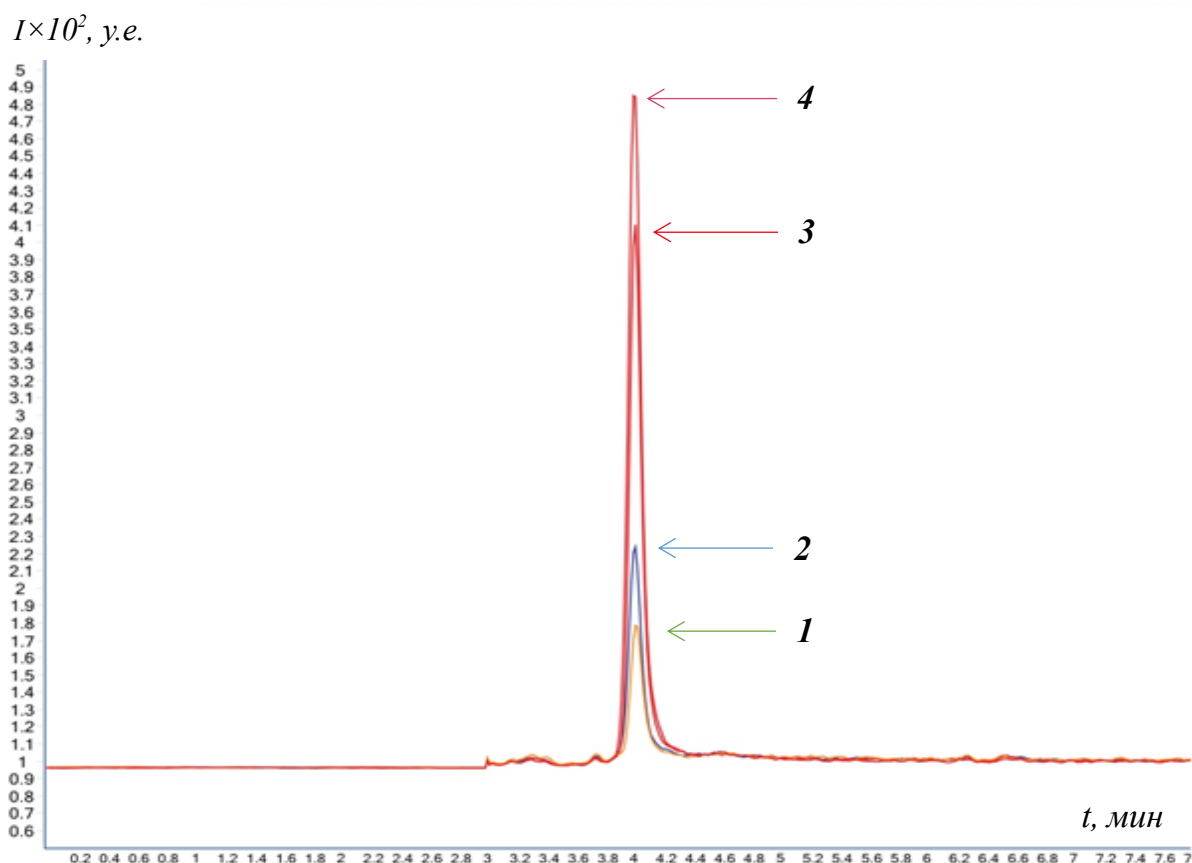


Рис. 21. Наложение хроматограмм котинина концентраций (1) 0.05, (2) 0.1, (3) 0.5, (4) 0.75 мкг/л. Колонка Synergi Hydro RP 80A (250 × 4.6 мм × 4 мкм). Объем вводимой пробы 4 мкл. Подвижная фаза: ацетонитрил:вода (50:50), скорость подвижной фазы 0.7 мл/мин. Масс-спектрометрическое детектирование, ИЭР, ММР-переходы m/z 177 → m/z 80, m/z 177 → m/z 98.

Таблица 21. Метрологические характеристики определения котинина методом ВЭЖХ-МС/МС для двух линейных диапазонов ($n=3$, $P=0.95$).

Диапазон	ЛДОК, мкг/л	s_r^* , %
1	0.1-100	15
2	5-1000	9

*Относительное стандартное отклонение приведено для нижней границы диапазона линейности

3.3. Анализ реальных объектов. Определение котинина.

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. Анализ мочи и сточных вод проводили по приведенной методике хроматографического определения котинина с масс-спектрометрическим детектированием. Нижний предел определяемых концентраций для метода со спектрофотометрическим детектированием – 250 мкг/л, поэтому анализ сточных вод и мочи некурильщика методом ВЭЖХ-ДМД не позволил количественно определить котинин в этих объектах. В табл. 22 приведены результаты анализа объектов с помощью спектрофотометрического и масс-спектрометрического детектирования.

Таблица 22. Результаты хроматографического определения котинина в реальных объектах ($n=3$, $P=0.95$).

Метод	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. 22, полученные при анализе мочи – на рис. 23.

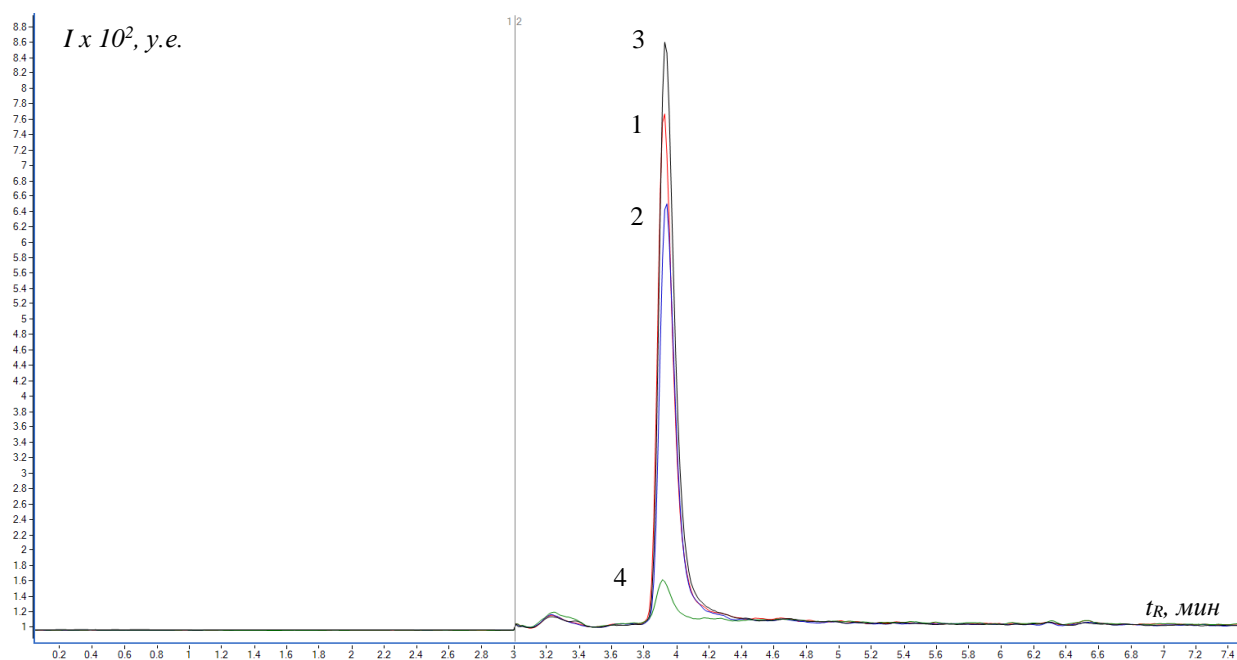


Рис. 22. Наложение хроматограмм образцов сточных вод, отобранные в Московской области. 1 - канал №1, 2 – канал №2, 3 – канал №3, 4 – холостой раствор. Колонка Synergi Hydro RP 80A (250 × 4.6 мм × 4 мкм). Объем вводимой пробы 4 мкл. Подвижная фаза: ацетонитрил:вода (50:50), скорость подвижной фазы 0.7 мл/мин. Масс-спектрометрическое детектирование, ИЭР, ММР-переходы m/z 177 → m/z 80, m/z 177 → m/z 98.

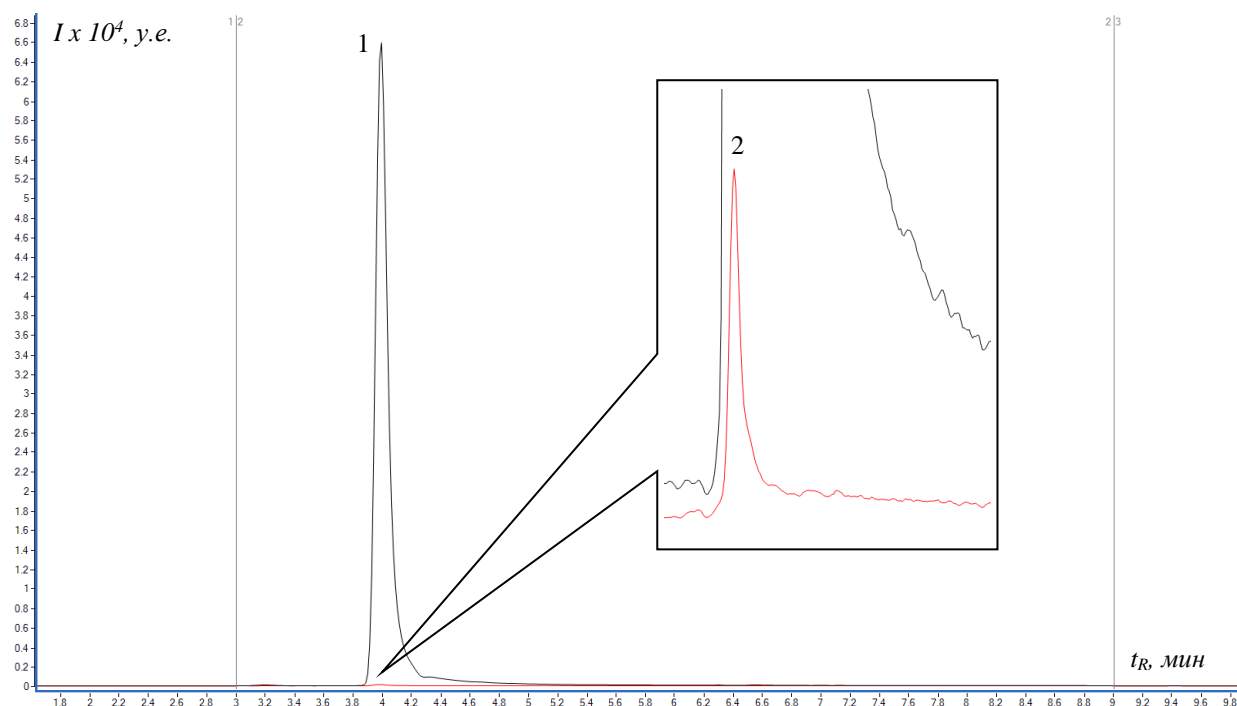


Рис. 23. Наложение хроматограмм мочи активного курильщика «1» и пассивного курильщика «2». Колонка Synergi Hydro RP 80A (250 × 4.6 мм × 4 мкм). Объем вводимой пробы 4 мкл. Подвижная фаза: ацетонитрил:вода (50:50), скорость подвижной фазы 0.7 мл/мин. Масс-спектрометрическое детектирование, ИЭР, ММР-переходы m/z 177 → m/z 80, m/z 177 → m/z 98.

Предложенный подход к определению котинина методом ВЭЖХ-МС/МС характеризуется высокой чувствительностью (предел обнаружения составляет 0.03 мкг/л без предварительного концентрирования). Подразделение 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.

Глава 4. Определение 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты в моче и сточных водах методом ВЭЖХ-МС/МС

4.1. Выбор хроматографических условий определения 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты

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. 24.

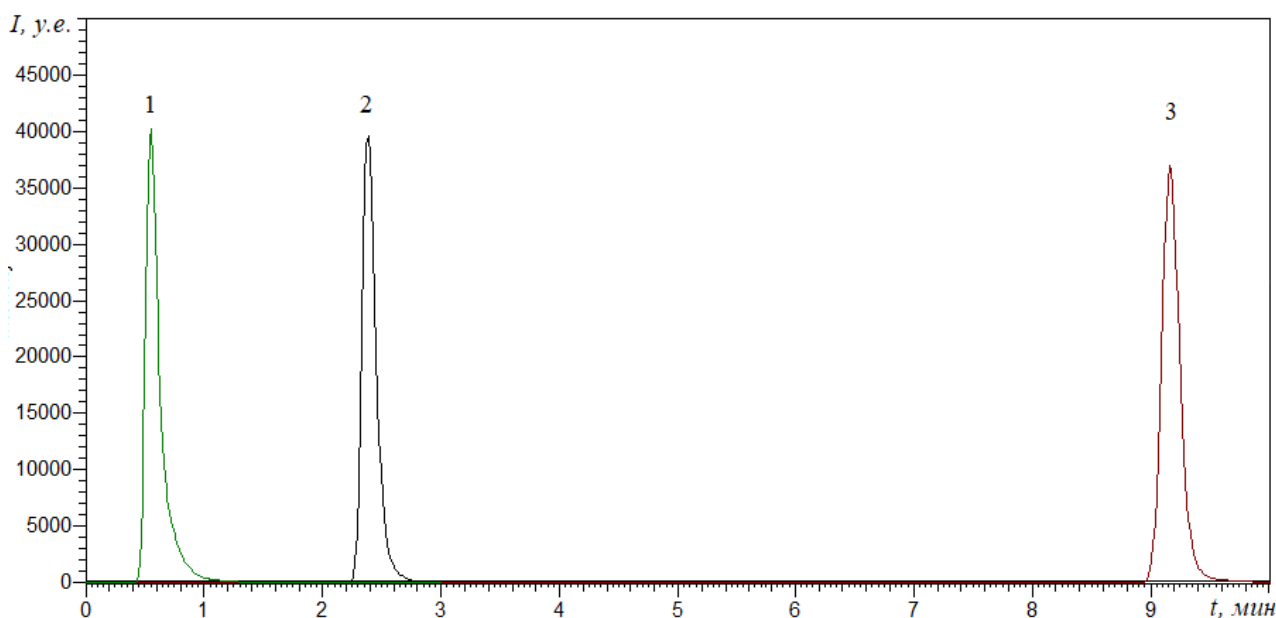


Рис. 24. Наложение хроматограмм 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты, полученных с использованием следующих колонок: *1* – Eclipse Plus C18 RRHD, *2* – Zorbax Eclipse C18, *3* – Poroshell HILIC.

Для сравнения удерживания 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты на различных хроматографических колонок использовали следующие условия:

- ✓ изократический режим элюирования;
- ✓ состав ПФ: 0,1% раствор муравьиной кислоты в воде: ацетонитрил (50:50);
- ✓ скорость потока: 0,3 мл/мин;
- ✓ концентрация 5-ГИУК в растворе: 2 мг/л;
- ✓ объем вводимой пробы: 10 мкл.

Сравнивали следующие хроматографические колонки:

- ✓ Poroshell 120 HILIC (250 × 4.6 мм), диаметр зерна сорбента – 4 мкм (Agilent Technologies, США);
- ✓ Poroshell 120 EC-C18 (150 × 3.0 мм), диаметр зерна сорбента – 2.7 мкм (Agilent Technologies, США);
- ✓ Eclipse Plus C18 RRHD (50 × 2.1 мм), диаметр зерна сорбента – 1.8 мкм (Agilent Technologies, США).

Результаты приведены в табл. 23.

Таблица. 23. Число теоретических тарелок, приведенное число теоретических тарелок, время удерживания 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты.

Poroshell 120 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)
N=35200 N'=35.2 мм ⁻² t _R =9.16 мин	N=10700 N'=10.7 мм ⁻² t _R =2.40 мин	N=34000 N'=34.0 мм ⁻² t _R =0.89 мин

где N – число теоретических тарелок, N'=N/l – приведенное число теоретических тарелок, t_R – время удерживания 5-ГИУК.

Колонка Poroshell 120 HILIC выбрана как самая эффективная и обеспечивающая наибольшее удерживание. Дальнейшее определение 5-ГИУК проводили с использованием данной колонки.

В работе выбраны состав и скорость подвижной фазы. 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 температуры подвижной фазы

Для снижения предела обнаружения 5-ГИУК и сокращения времени анализа варьировали температуру термостата колонки от 25 до 45°C (рис. 25). 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 выбрана 30°C.

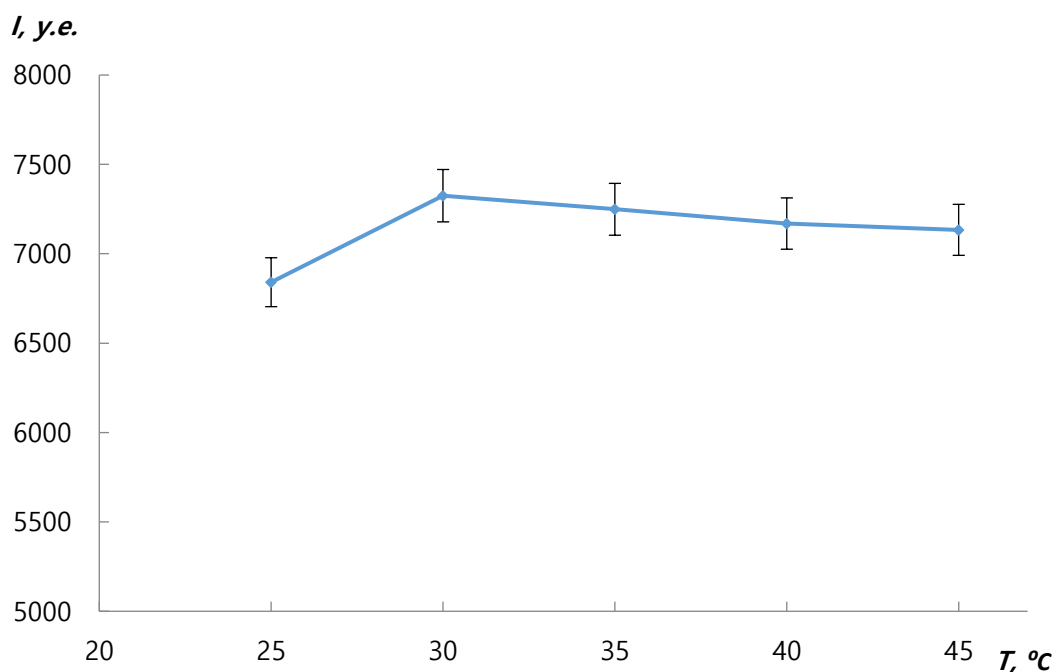


Рис. 25. Зависимость интенсивности пика 5-ГИУК в зависимости от температуры термостата колонки. Колонка Poroshell 120 HILIC (250 × 4.6 мм × 4 мкм). ПФ: ацетонитрил:вода (50:50), скорость потока ПФ 0.7 мл/мин, $c_{5\text{-ГИУК}}=50$ мкг/л. Масс-спектрометрическое детектирование, ИЭР ($n=3$, $P=0,95$).

Выбранные условия хроматографического разделения при определении 5-ГИУК представлены в экспериментальной части. Хроматограмма модельного раствора 5-ГИУК представлена на рис. 26.

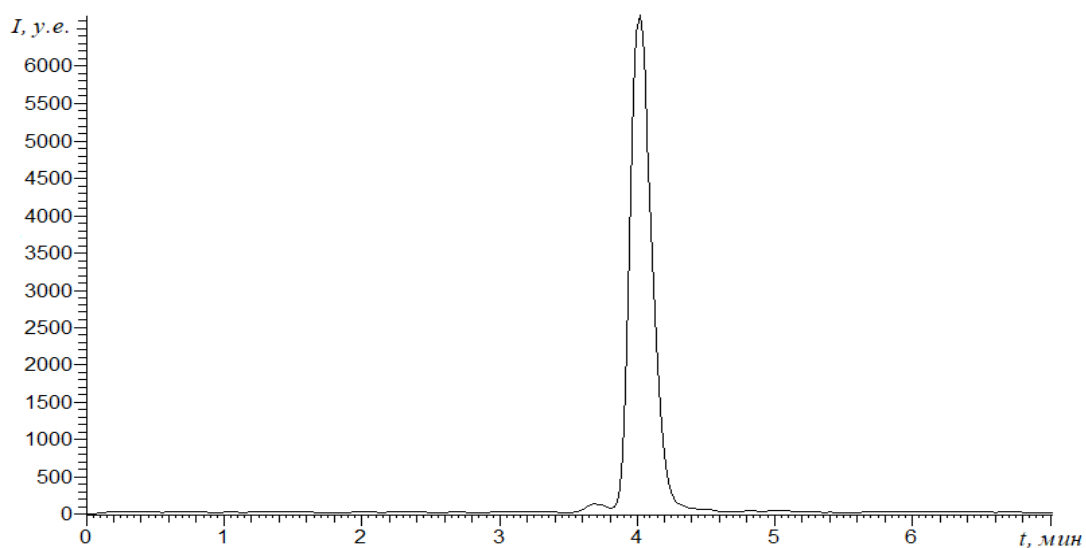


Рис. 26. Хроматограмма модельного 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты. Колонка Poroshell 120 HILIC (250 × 4.6 мм × 4 мкм). Объем вводимой пробы 20 мкл, c (5-ГИУК) = 200 мкг/л. Подвижная фаза: 0.1% муравьиная кислота: ацетонитрил (50:50), скорость подвижной фазы 0.7 мл/мин. Масс-спектрометрическое детектирование, ИЭР, ММР-переходы m/z 192 → m/z 146, m/z 192 → m/z 117.

4.2. 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. Подбор проводился для положительного иона с $m/z=192$.

По наиболее интенсивному пику была определено соотношение массы к заряду исходного иона 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты, равное 192 (рис. 27). Наибольшую чувствительность можно достичь, используя режим ММР в варианте tandemного масс-спектрометрического детектирования. На рис. 28 приведен масс-спектр ион-продуктов при значении энергии соударения 25 эВ.

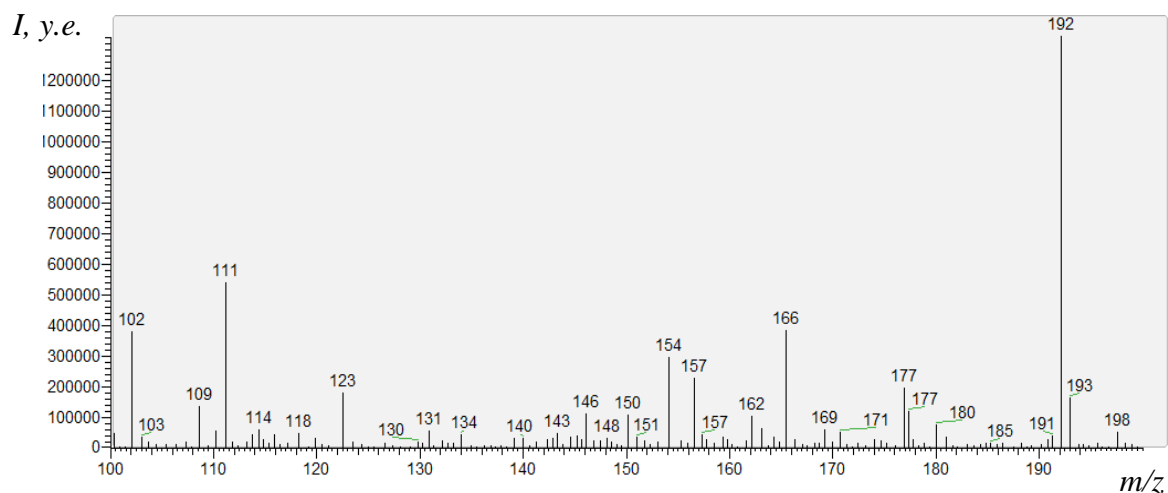


Рис. 27. Масс-спектр раствора 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты с концентрацией 1 мкг/мл. Детектирование по полному ионному току в диапазоне m/z : 100 - 200.

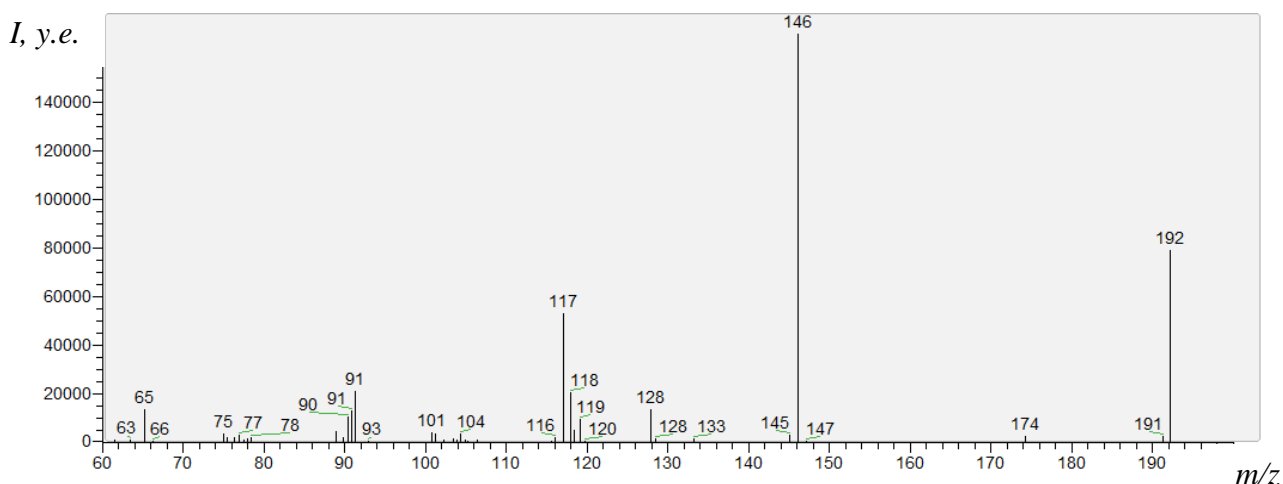


Рис. 28. Масс-спектр ион-продуктов 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты. ЭС = 25 эВ. Колонка Poroshell 120 HILIC (250 × 4.6 мм × 4 мкм). Объем вводимой пробы 20 мкл, с (5-ГИУК) = 1 мг/л. Подвижная фаза: 0.1% муравьиная кислота: ацетонитрил (50:50), скорость подвижной фазы 0.7 мл/мин.

Для количественного анализа выбран ММР-переход с максимальной интенсивностью: m/z 192 → m/z 146. Также для подтверждения выбран дополнительный переход с максимальным значением m/z : m/z 192 → m/z 117. Предположительные структуры ионов с m/z 192 и 117 представлены на рис. 29, рис. 30.

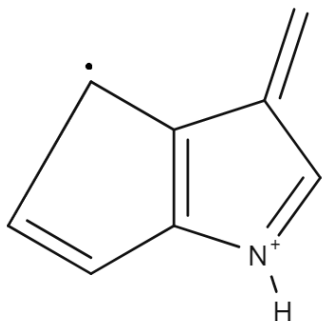


Рис. 29. Предположительная структура иона с m/z 117.

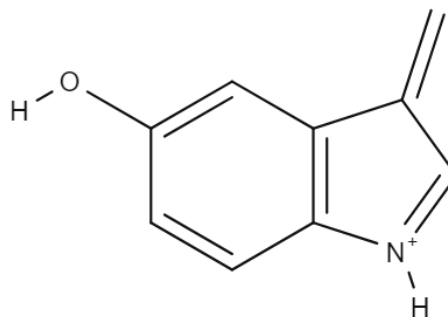


Рис. 30. Предположительная структура иона с m/z 146.

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. 31). Выбраны энергии соударения 10 эВ для перехода m/z 192 → m/z 146 и 36 эВ для m/z 192 → m/z 117.

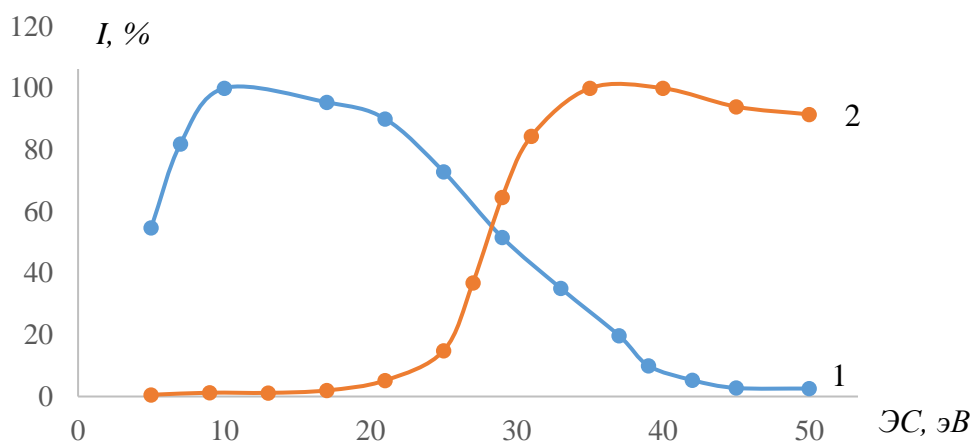


Рис. 31. Зависимость интенсивности сигналов переходов (1) m/z 192 \rightarrow m/z 146, (2) m/z 192 \rightarrow m/z 117 от значений энергии соударения.

4.3. 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.

4.3.1. Выбор сорбента для твердофазной экстракции

Установлены степени извлечения 5-ГИУК при использовании 4 типов патронов (Strata-X (200 мг/3 мл), Chromabond C18 (500 мг/3 мл), Chromabond HR-P (500 мг/3 мл), AccuBOND C18 (100 мг/1 мл)) при 3 различных значениях pH (2.7, 4.6, 6.3). Найденные степени извлечения представлены в табл. 24.

Таблица 24. Степень извлечения 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты ($c=20$ мкг/л) из модельных растворов методом ТФЭ с использованием разных картриджей ($n=3$, $P=0.95$).

pH	Strata-X	Chromabond C18	Chromabond HR-P	AccuBOND C18
2.7	0	41±9	0	37±2
4.6	63±13	31±10	5±1	24±3
6.3	50±10	3±2	0	0

Из таблицы видно, что при использовании сорбента Chromabond HR-P с привитыми группами сополимера полистирола-дивинилбензола 5-ГИУК почти не извлекается при любом из рН. На сорбенте с привитыми C₁₈ группами степень извлечения больше.

Наибольшая степень извлечения получена при использовании сорбента Strata-X с привитыми модифицированными лигандами пирролидона, обеспечивающими различные типы удерживания. Однако, хотя данный сорбент и имеет наилучшие из исследованных значения степени извлечения 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты из сточных вод, но воспроизводимость результатов недостаточна. На основании этого сделан вывод о том, что вероятно использование жидкость-жидкостной экстракции предпочтительнее.

4.3.2. Жидкость-жидкостная экстракция

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 рН 2.7 и 4.6. Результаты сравнения представлены в табл. 25.

Таблица 25. Степень извлечения 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты из водного раствора с концентрацией 20 мкг/л при различных рН методом жидкость-жидкостной экстракции. (n=3, P=0.95).

Растворитель	Аммонийно-ацетатный буферный раствор, рН=4.6	Муравьиная кислота, рН=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

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 рН недопустимо. Поэтому сравнительный анализ экстрагентов проводился при «кислых» значениях рН (2.7, 4.6).

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

На основании полученных данных, жидкость-жидкостная этилацетатом при рН=2.7 была выбрана в качестве метода пробоподготовки при проведении анализа сточных вод и мочи.

4.4. Метрологические характеристики определения 5-ГИУК методом ВЭЖХ-МС/МС

При разработке способа определения 5-ГИУК оценены следующие метрологические характеристики: предел обнаружения, нижний предел определяемых концентраций и линейность.

4.4.1. Предел обнаружения

За предел обнаружения принята концентрация 5-ГИУК, при которой соотношение сигнал пика/шум равен 5. Предел обнаружения 5-ГИУК составил 0.2 мкг/л (с учетом концентрирования). Хроматограмма раствора 5-ГИУК после концентрирования, соответствующей пределу обнаружения, представлена на рис.32.

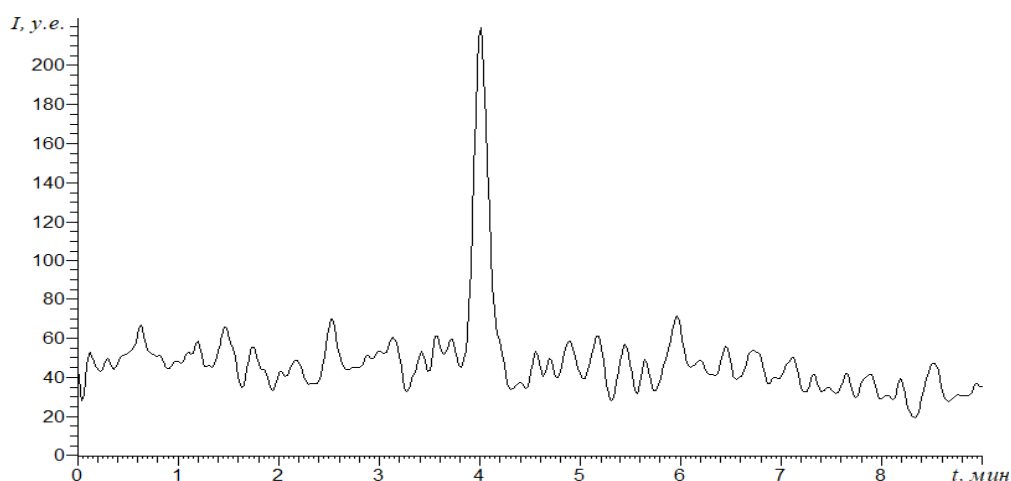


Рис. 32. Хроматограмма раствора 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты, соответствующая пределу обнаружения. Колонка Poroshell 120 HILIC ($250 \times 4.6 \text{ мм} \times 4 \text{ мкм}$). Объем вводимой пробы 20 мкл, $c(5\text{-ГИУК}) = 0.2 \text{ мкг/л}$. Подвижная фаза: 0.1% муравьиная кислота: ацетонитрил (50:50), скорость подвижной фазы 0.7 мл/мин. Масс-спектрометрическое детектирование, ИЭР, ММР-переходы $m/z 192 \rightarrow m/z 146$, $m/z 192 \rightarrow m/z 117$.

4.4.2. Линейность и предел обнаружения

Для оценки линейности определения 5-ГИУК методом ВЭЖХ-МС/МС построены по две градуировочные зависимости. Для этого готовили серии модельных растворов в следующих диапазонах концентраций и проводили пробоподготовку по выше описанным процедурам:

5-ГИУК: 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. 26).

Таблица 26. Метрологические характеристики предложенного способа определения 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты методом ВЭЖХ-МС/МС (n=3, P=0.95).

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

4.6. Анализ реальных объектов. Определение 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты.

4.6.1. 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. 33. Результаты анализа приведены в табл. 27. Концентрация 5-ГИУК в исследуемых сточных водах составила от 8 до 18 мкг/л.

Таблица 27. Результаты хроматографического определения 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты в сточных водах (n=3, P=0.95).

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

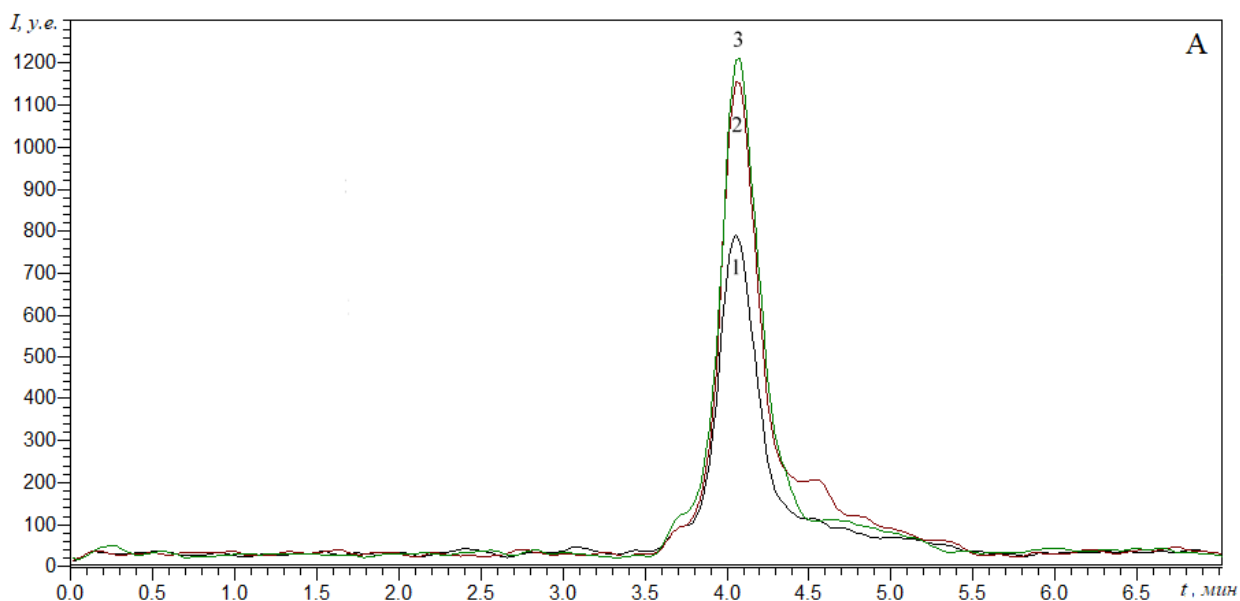


Рис. 33. Наложение хроматограмм образцов сточных вод, отобранных в Московской области. 1 - канал №1, 2 – канал №2, 3 – канал №3. Колонка Poroshell 120 HILIC (250 × 4.6 мм × 4 мкм). Объем вводимой пробы 20 мкл. Подвижная фаза: 0.1% муравьиная кислота: ацетонитрил (50:50), скорость подвижной фазы 0.7 мл/мин. Масс-спектрометрическое детектирование, ИЭР, ММР-переходы m/z 192 → m/z 146, m/z 192 → m/z 117.

4.6.2. Анализ мочи

В качестве примера проведен анализ мочи активного курильщика и человека, не подвергающегося воздействию табака. Хроматограммы мочи представлены на рис. 34. Результаты анализа приведены в табл. 28.

Таблица 28. Результаты хроматографического определения 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты в моче (n=3, P=0.95).

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

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.

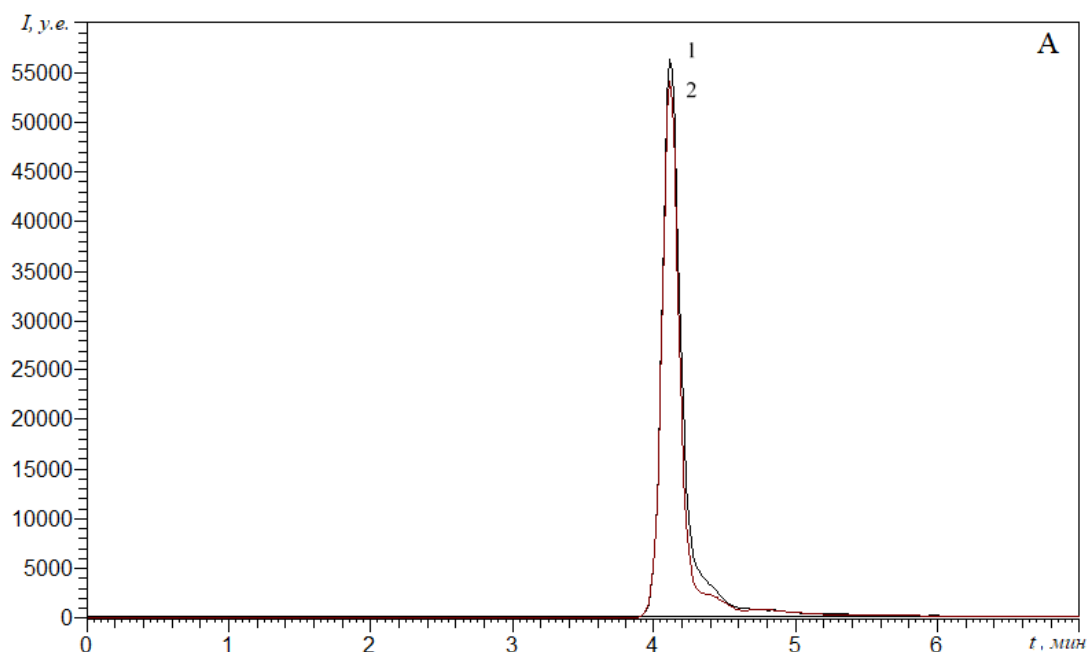


Рис. 34. Наложение хроматограмм, полученных при анализе мочи. 1 – моча курящего человека, 2 – моча некурящего человека. Колонка Poroshell 120 HILIC (250 × 4.6 мм × 4 мкм). Объем вводимой пробы 20 мкл. Подвижная фаза: 0.1% муравьиная кислота: ацетонитрил (50:50), скорость подвижной фазы 0.7 мл/мин. Масс-спектрометрическое детектирование, ИЭР, ММР-переходы m/z 192 → m/z 146, m/z 192 → m/z 117.

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.

Глава 5. Совместное определение котинина, 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты и этилсульфата в моче и сточных водах методом ВЭЖХ-МС/МС

5.1. Определение этилсульфата методом ВЭЖХ-МС/МС

5.1.1. 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. 35. В работе сравнивали следующие хроматографические колонки:

1. Zorbax phenyl hexyl C18 (50 × 2.1 мм, 1.8 мкм)
2. Synergi Polar RP (250 × 2.0 мм, 4 мкм)
3. Poroshell C18 (150 × 3.0 мм, 2.7 мкм)
4. Zorbax Bonus-RP (50 × 2.1 мм, 1.8 мкм)
5. Zorbax Eclipse C18 (150 × 3.0 мм, 2.7 мкм)
6. Luna SCX (250 × 4.6 мм, 5 мкм)
7. Zorbax SB C18 (250 × 4.6 мм, 5 мкм)
8. Poroshell HILIC (250 × 4.6 мм, 4 мкм)
9. Synergi Fusion-RP (250 × 4.6 мм, 4 мкм)

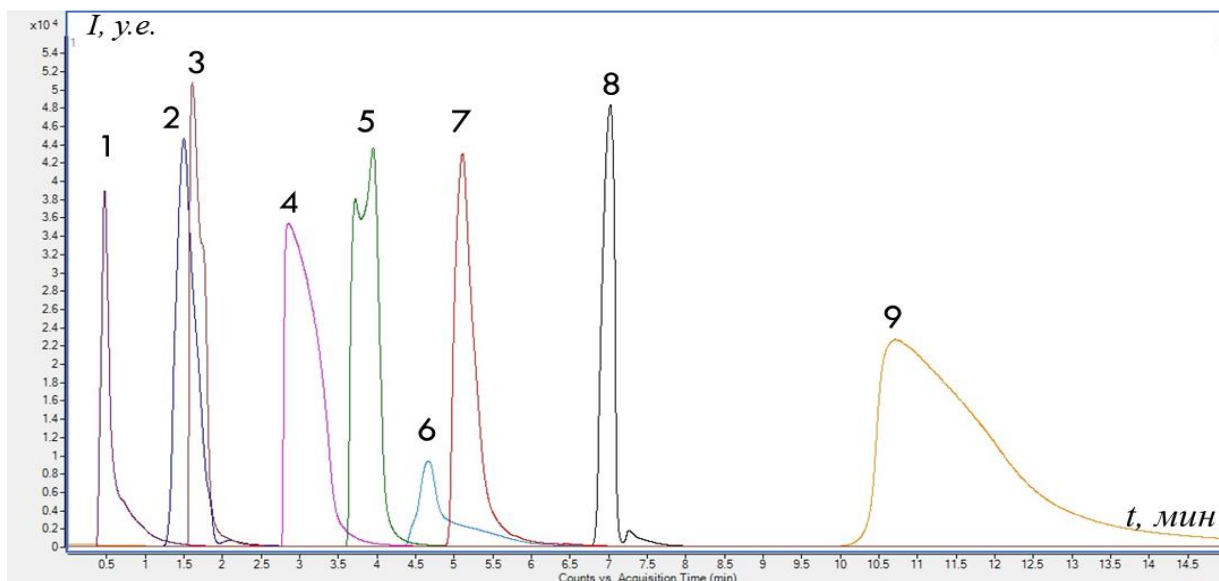


Рис. 35. Наложение хроматограмм этилсульфата, полученных с использованием следующих колонок: **1**-Zorbax phenyl hexyl C18; **2**-Synergi Polar RP; **3**-Poroshell C18; **4**-Zorbax Bonus-RP; **5**-Zorbax Eclipse C18; **6**-Luna SCX; **7**-Zorbax SB C18; **8**-Poroshell HILIC; **9**-Synergi Fusion-RP.

Для сравнения удерживания этилсульфата на различных хроматографических колонок использовали следующие условия:

- изократический режим элюирования;
- состав подвижной фазы: 0.1% раствор муравьиной кислоты в воде: ацетонитрил (50:50);
- скорость потока: 0.7 мл/мин;
- объем вводимой пробы: 10 мкл.

Для сравнения эффективности колонок провели расчет числа теоретических тарелок на 1 м колонки, данные представлены в табл. 29.

Таблица. 29. Число теоретических тарелок, приведенное число теоретических тарелок, время удерживания этилсульфата.

Хроматографическая колонка	N, ч.т.т./м	t _R , мин
Zorbax phenyl hexyl C18 (50 × 2.1 мм, 1.8 мкм)	2000	0.47
Synergi Polar RP (250 × 2.0 мм, 4 мкм)	600	1.50
Poroshell C18 (150 × 3.0 мм, 2.7 мкм)	2000	1.61
Zorbax Bonus-RP (50 × 2.1 мм, 1.8 мкм)	3400	2.86
Zorbax Eclipse C18 (150 × 3.0 мм, 2.7 мкм)	1500	3.51
Luna SCX (250 × 4.6 мм, 5 мкм)	7500	4.67
Zorbax SB C18 (250 × 4.6 мм, 5 мкм)	7500	5.11
Poroshell HILIC (250 × 4.6 мм, 4 мкм)	32000	7.02
Synergi Fusion-RP (250 × 4.6 мм, 4 мкм)	1100	10.71

где N – число теоретических тарелок, t_R – время удерживания этилсульфата.

Колонка Poroshell 120 HILIC выбрана как самая эффективная и обеспечивающая хорошее удерживание. Дальнейшее определение этилсульфата проводили с использованием данной колонки.

5.1.2. 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 (рис. 36):

- 5 мМ раствор ацетата аммония / 0.1% раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (50:50) (**A**)
- 0.1% раствор муравьиной кислоты в воде / ацетонитрил (50:50) (**B**)

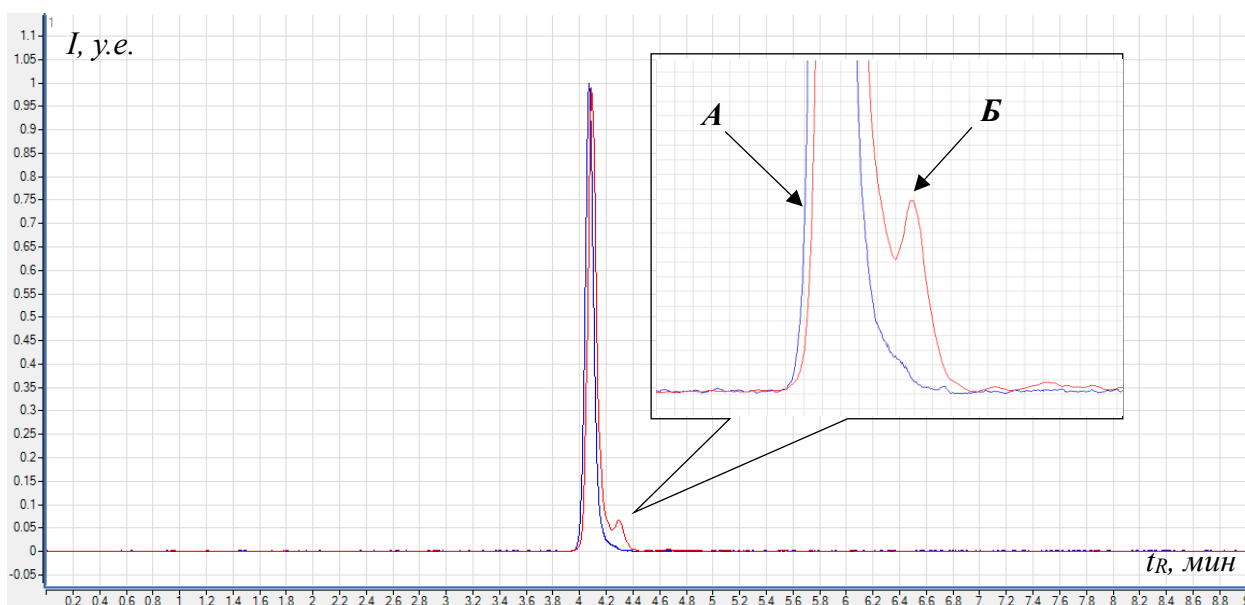


Рис. 36. Наложение хроматограмм этилсульфата, полученных с использованием следующих ПФ: *А*-5 мМ раствор ацетата аммония / 0.1% раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (50:50); *Б*-0.1% раствор муравьиной кислоты в воде / ацетонитрил (50:50). Колонка: Poroshell 120 HILIC (250 × 4.6 мм × 4 мкм). Скорость подвижной фазы 0.7 мл/мин.

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

5.1.3. 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 была определено соотношение массы к заряду исходного иона этилсульфата, равное 125. Наибольшую чувствительность можно достичь, используя режим ММР в варианте тандемного масс-спектрометрического детектирования. На рис. 37 приведен масс-спектр ион-продуктов при значении энергии соударения 12 эВ.

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

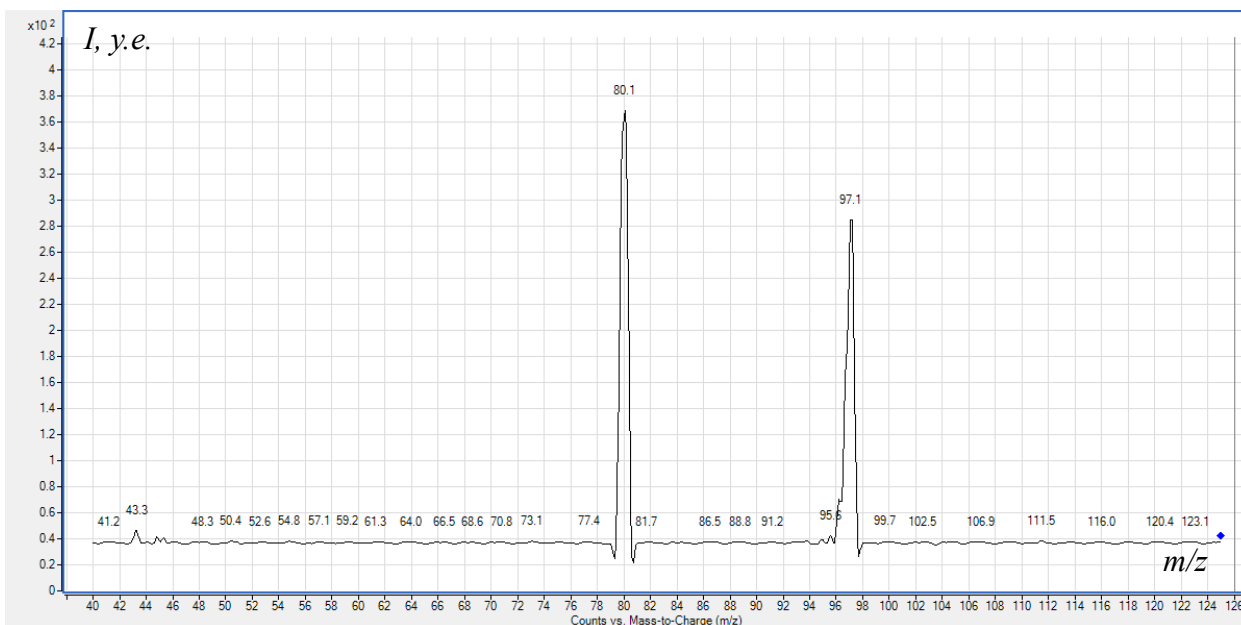


Рис. 37. Масс-спектр ион-продуктов этилсульфата. ЭС = 12 эВ. Колонка Poroshell 120 HILIC (250 × 4.6 мм × 4 мкм). Объем вводимой пробы 10 мкл, $c(\text{этилсульфат}) = 1 \text{ мг/л}$. Подвижная фаза: 5 мМ ацетата аммония : 0.1% муравьиной кислоты в ацетонитриле (50:50), скорость подвижной фазы 0.7 мл/мин.

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).

5.1.4. 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. Учитывая, что процент метаболизма этанола в этилсульфат составляет 0.11% от исходной дозы, 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 сложной матрицей 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 C₁₈. 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.

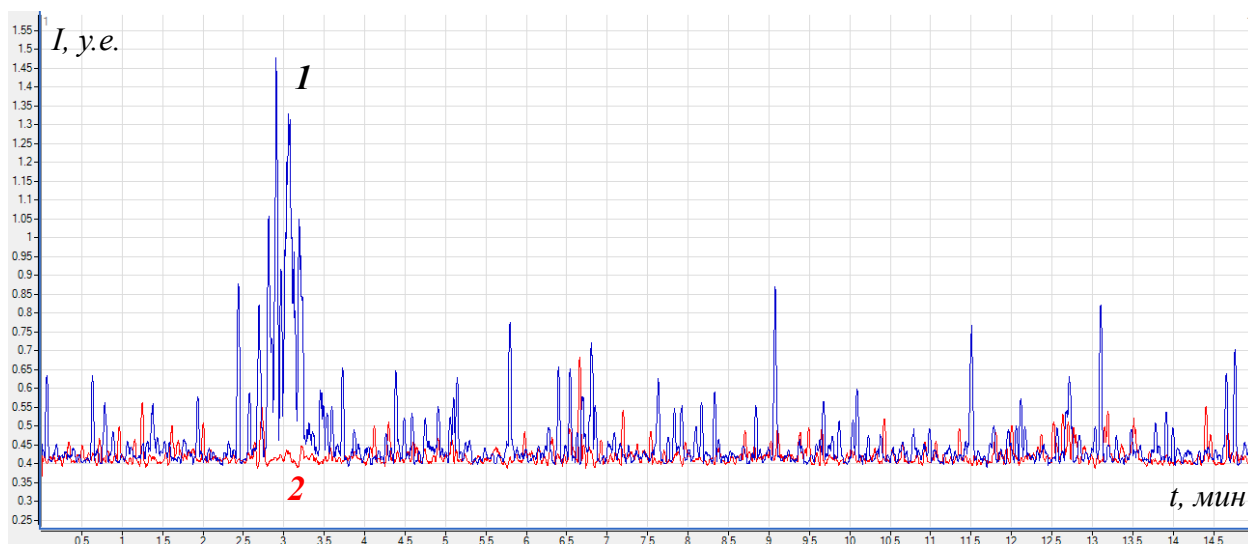


Рис. 38. Наложение хроматограмм сточных вод до (1) и после (2) предварительной очистки пробы. Колонка Poroshell 120 HILIC (250 × 4.6 мм × 4 мкм). Объем вводимой пробы 1 мкл. Подвижная фаза: 5 мМ ацетата аммония : 0.1% муравьиной кислоты в ацетонитриле (50:50), скорость подвижной фазы 0.7 мл/мин. Детектирование по полному ионному току в диапазоне m/z 60 - 300.

Как видно из рис. 38, 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.

5.1.5. Предел обнаружения

Предел обнаружения этилсульфата составил 0.5 мкг/л. Хроматограмма раствора этилсульфата, соответствующей пределу обнаружения, представлена на рис. 39.

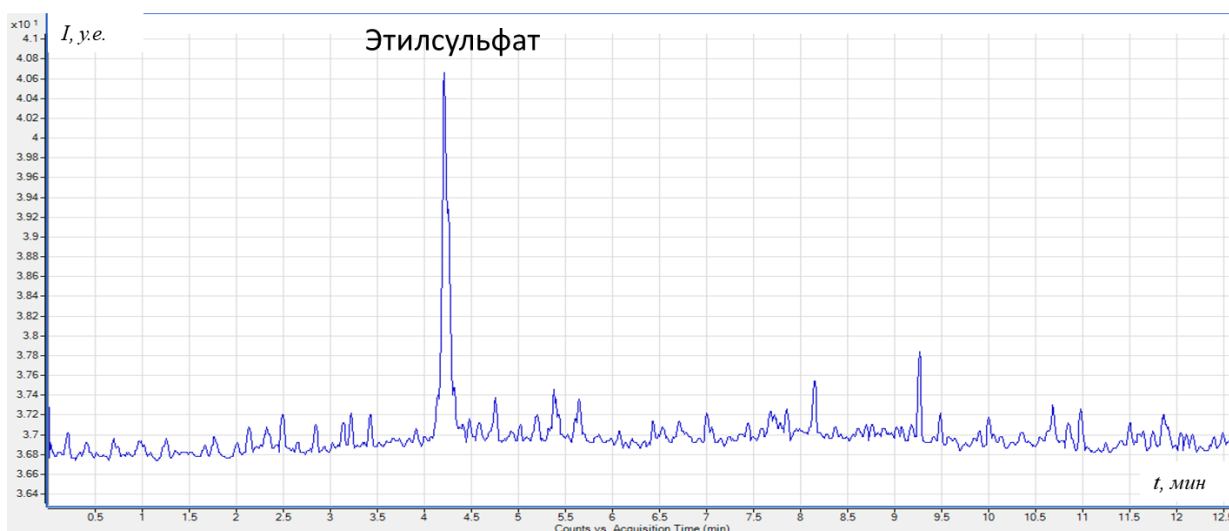


Рис. 39. Хроматограмма раствора этилсульфата, соответствующая пределу обнаружения. Колонка Poroshell 120 HPLC (250 × 4.6 мм × 4 мкм). Объем вводимой пробы 10 мкл. Подвижная фаза: 5 мМ ацетата аммония : 0.1% муравьиной кислоты в ацетонитриле (50:50), скорость подвижной фазы 0.7 мл/мин. Масс-спектрометрическое детектирование, ИЭР, ММР-переходы m/z 125 → m/z 80, m/z 125 → m/z 97.

5.1.6. 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. 30). 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 30. Метрологические характеристики способа определения этилсульфата методом ВЭЖХ-МС/МС (n=3, P=0.95).

Аналит	C_{min} , мкг/л	СНПКО, мкг/л	Диапазон линейности, мкг/л	Уравнение градуировочной зависимости
Этилсульфат	0.5	2	2 – 500 ($r=0.999$)	$S_i/S_{IS}=(0.084\pm 0.005)\times c_i+(0.013\pm 0.006)$

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

5.2.1. Пробоподготовка

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, если задать определенный интервал времени регистрации иона. Учитывая эти факторы нами предложен метод прямого ввода с разбавлением для совместного определения всех интересующих популяционных маркеров. Процедура пробоподготовки описана в п. 2.6.1. Данный подход позволяет одновременно извлечь интересующие маркеры и очистить пробу от тяжелых загрязнителей.

5.2.2. 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 идентичны при определении их индивидуально.

Пределы обнаружения популяционных веществ-маркеров представлены в табл. 31. Хроматограмма модельных растворов представлена на рис. 40.

Таблица 31. Метрологические характеристики способа совместного определения 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 ($r=0.999$)	$S_i/S_{IS}=(0.024\pm 0.003)\times c_i+(0.012\pm 0.004)$
5-ГИУК	0.1	0.5	0.5 – 500 ($r=0.998$)	$S = (810\pm 20)\times c_i + (4300\pm 400)$
Этилсульфат	0.5	2	2 – 500 ($r=0.999$)	$S_i/S_{IS}=(0.084\pm 0.005)\times c_i+(0.013\pm 0.006)$

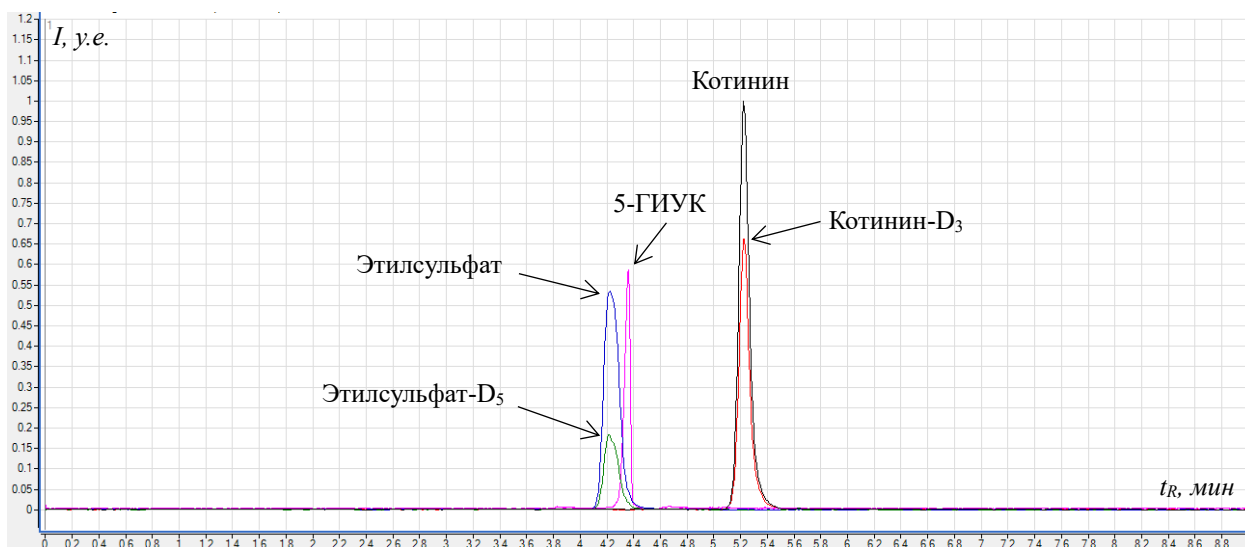


Рис. 40. Хроматограмма модельных растворов. Колонка Poroshell 120 HILIC (250 × 4.6 мм × 4 мкм). Объем вводимой пробы 10 мкл. Подвижная фаза: 5 мМ ацетата аммония : 0.1% муравьиной кислоты в ацетонитриле (градиент), скорость подвижной фазы 0.7 мл/мин. Масс-спектрометрическое детектирование, ИЭР, ММР-переходы: 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.

Глава 6. Оценка численности населения, употребления табака и алкоголя на душу населения по данным анализа биомаркеров

6.1. Исследование стабильности популяционных биомаркеров

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

- А: после отбора сточную воду хранили при комнатной температуре без изменения рН
- Б: после отбора сточную воду подкисляли до рН=2 и хранили при -25°C

Результаты представлены на рис. 41, 42, 43. 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.

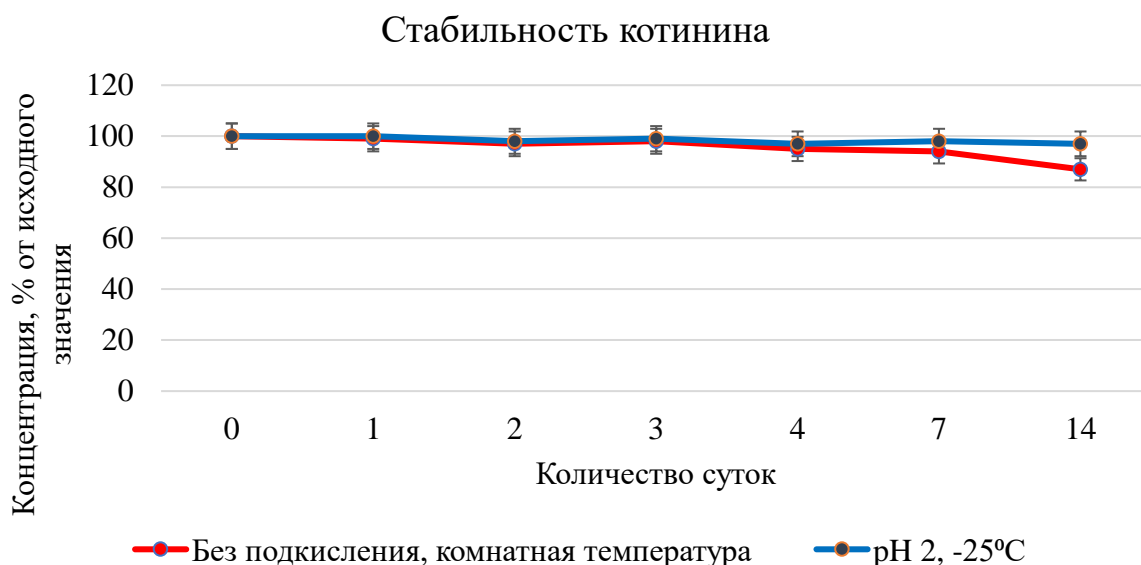


Рис. 41. Стабильность котинина в сточных водах в течение 14 суток при хранении в следующих условиях: А – без подкисления при комнатной температуре, Б – при рН=2 и хранении при температуре -25°C .

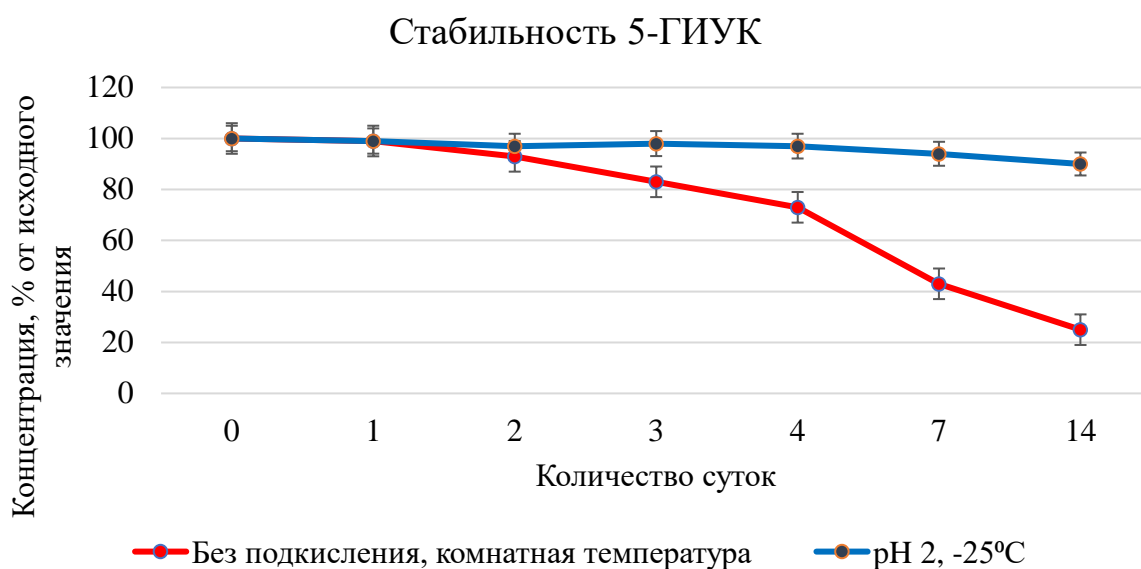


Рис. 42. Стабильность 5-ГИУК в сточных водах в течение 14 суток при хранении в следующих условиях: А – без подкисления при комнатной температуре, Б – при pH=2 и хранении при температуре -25°C.

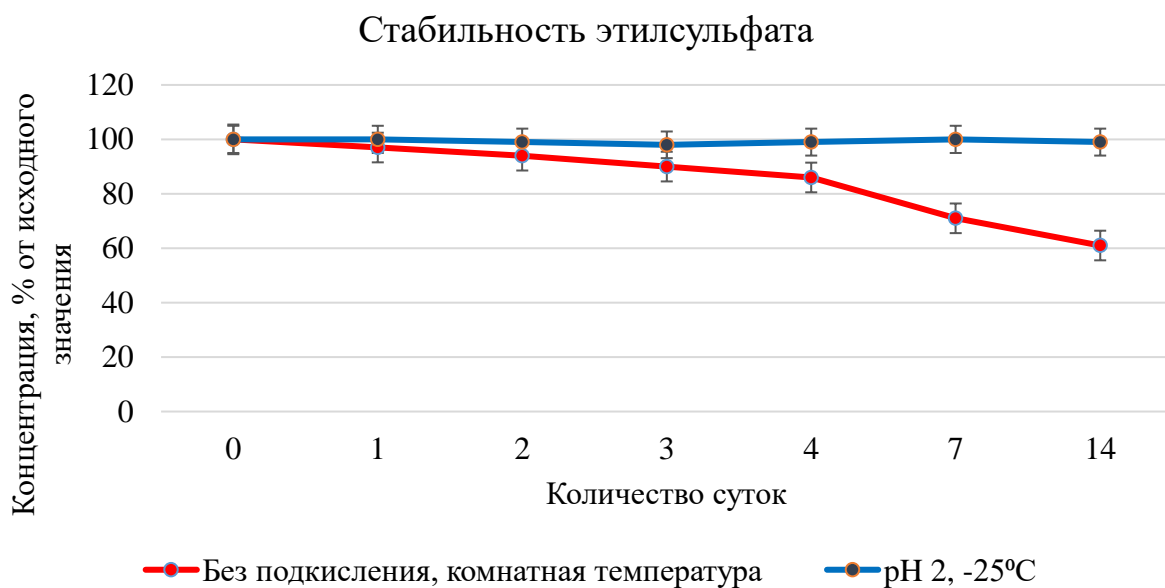


Рис. 43. Стабильность этилсульфата в сточных водах в течение 14 суток при хранении в следующих условиях: А – без подкисления при комнатной температуре, Б – при pH=2 и хранении при температуре -25°C.

6.2. 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 рН 2 и хранились в морозильнике при -80°C .

6.2.1. Оценка численности населения

Построена зависимость концентрации 5-ГИУК от времени суток (рис. 44). Как видно из графика, максимальный уровень содержания 5-ГИУК в сточных водах наблюдается в 10 и 20 часов.

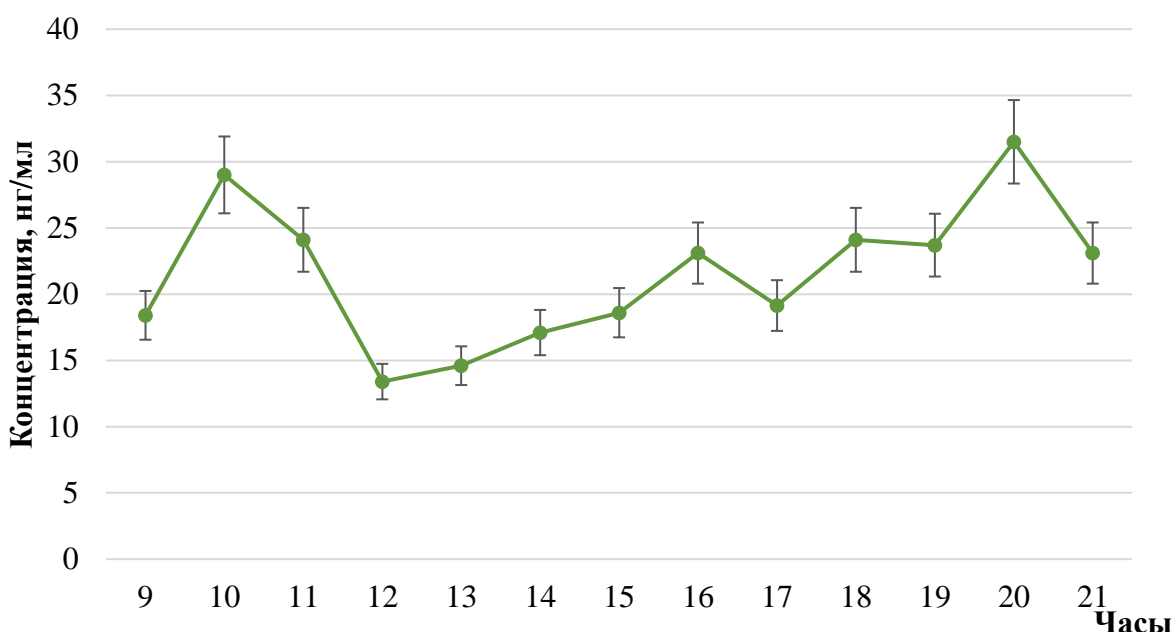


Рис. 44. Зависимость концентрации 5-ГИУК в сточных водах от времени суток.

После ежедневного отбора проб в течение 30 дней получена посуточная зависимость концентрации 5-ГИУК в сточных водах. Как видно из рис. 45, 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.

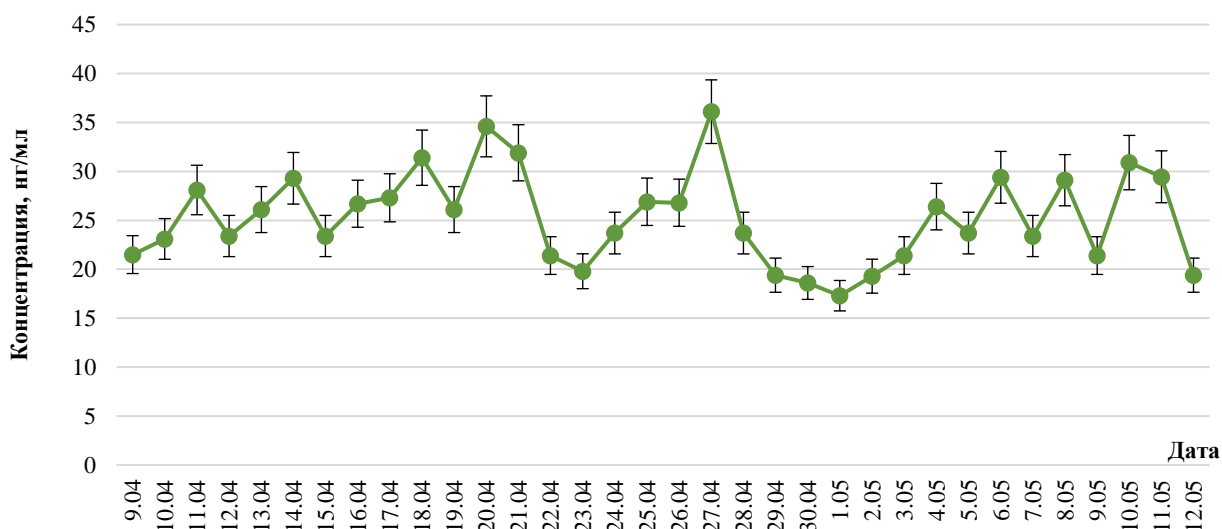


Рис. 45. Посуточная зависимость концентрации 5-ГИУК в сточных водах.

В табл. 32 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 32. Оценка численности населения одного из поселка 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 ($1530 \text{ м}^3/\text{сутки}$). Расчетная численность населения основана на ранее известных данных о суточном выделении 5-ГИУК человеком $4.16 \pm 0.56 \text{ мг/день/чел.}$

6.2.2. Оценка потребления сигарет на душу населения

Построена зависимость концентрации котинина в сточных водах от времени суток (рис. 46). Как видно из графика, максимальный уровень содержания котинина в сточных водах наблюдается в 10 и 20 часов.

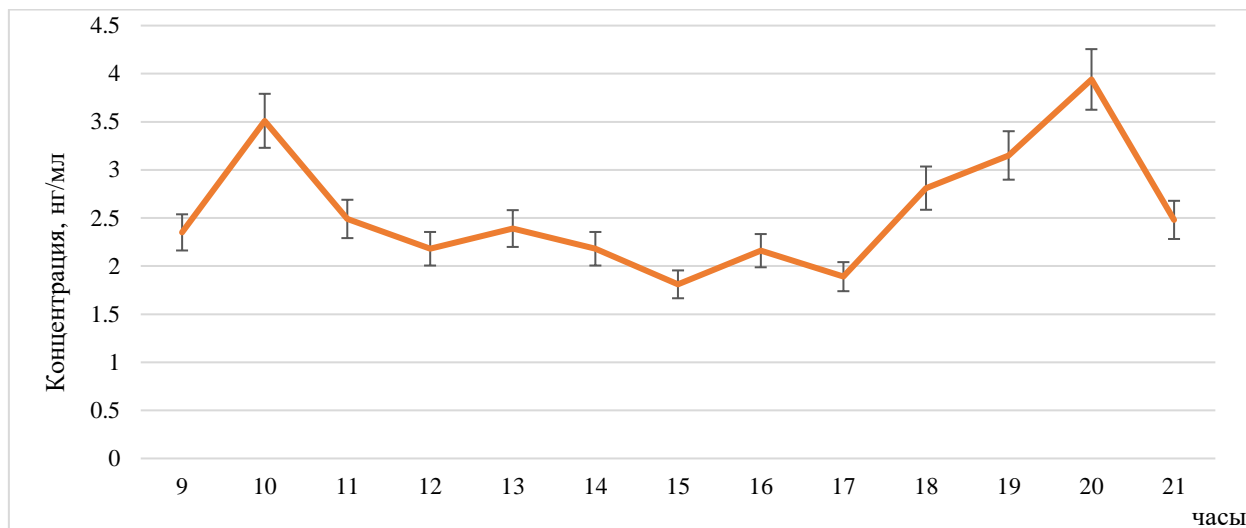


Рис. 46. Зависимость концентрации котинина в сточных водах от времени суток.

После ежедневного отбора проб в течение 30 дней построена посуточная зависимость концентрации котинина в сточных водах. Как видно из рис. 47, не наблюдается явный максимум концентрации. Это достаточно логично, так как люди обычно употребляют примерно одинаковое количество сигарет независимо от дня недели.

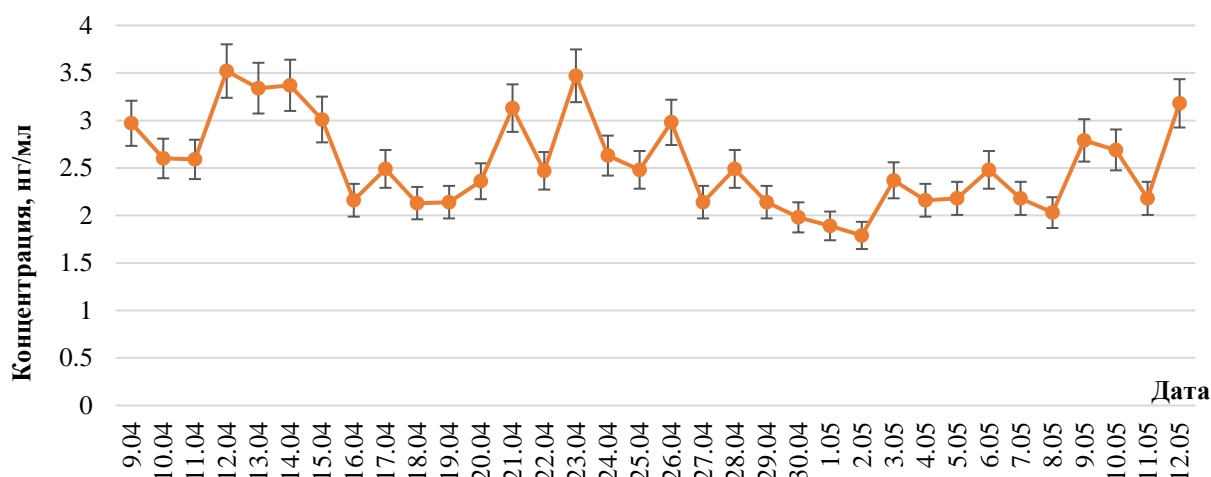


Рис. 47. Посуточная зависимость концентрации котинина в сточных водах.

В табл. 33 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 33. Оценка потребления табака в одном из поселке 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, описанной в работе [161]. 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) [60], г. Далянь, Китай (2.0 г/день/1000 жителей) [58], но ниже, чем г. Лиссабон, Португалия (5.86 г/день/1000 жителей) [161].

6.2.3. Оценка потребления алкоголя на душу населения

Построена зависимость концентрации этилсульфата от времени суток (рис. 48). Как видно из графика, максимальный уровень содержания этилсульфата в сточных водах наблюдается в 10 и 21 часов.

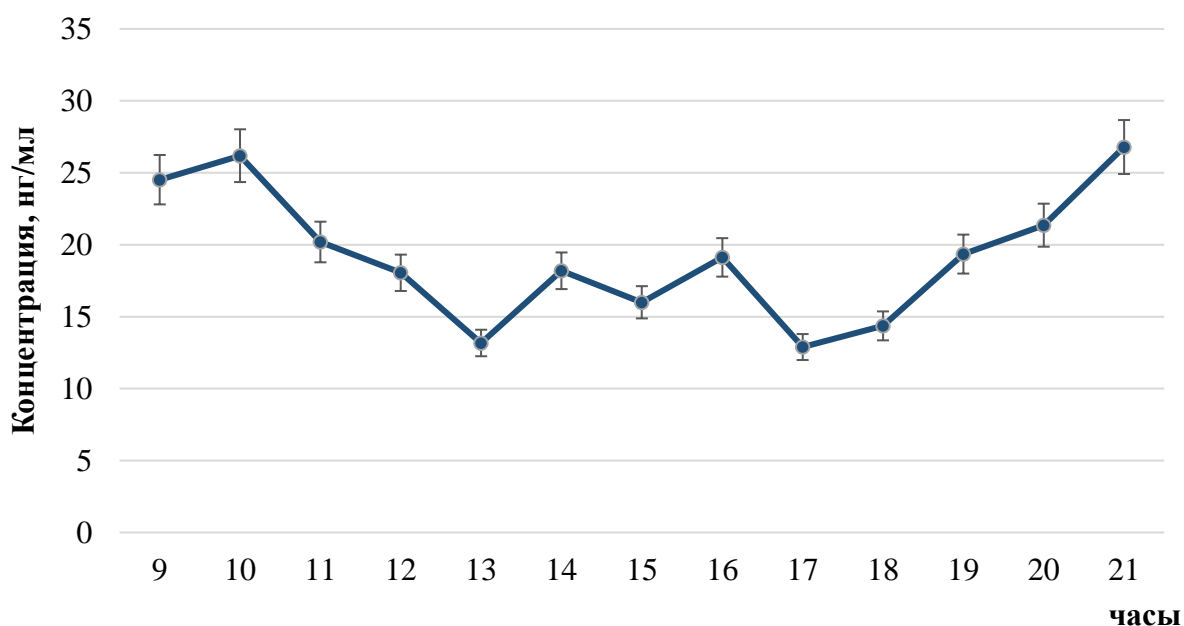


Рис. 48. Зависимость концентрации этилсульфата в сточных водах от времени суток.

После ежедневного отбора проб в течение 30 дней получена посуточная зависимость концентрации этилсульфата в сточных водах. Как видно из рис. 49, 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. 34 представлены данные по уровню потребления алкоголя от дня недели.

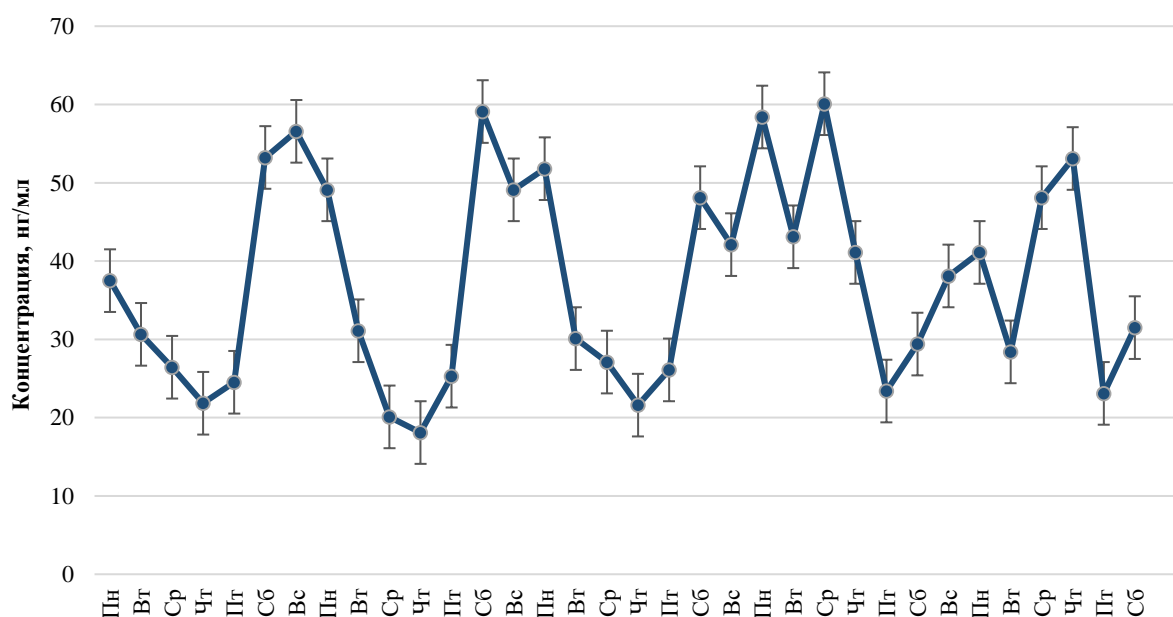


Рис. 49. Зависимость концентрации этилсульфата в сточных водах от дня недели.

Таблица 34. 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. 35 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 35. Оценка потребления этанола в одном из поселке 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.) [123], г. Митилини, Греция (≈ 5.4 мл/день/чел.) [162], 7 городов Бельгии (≈ 15.3 мл/день/чел.) [163], но ниже, чем г. Валенсии, Испания (макс. 56.1 мл/день/чел.) [164].

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 рН 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 рН. Образцы необходимо хранить не выше -25°C и при рН 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 поселка 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 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.) и ниже, чем г. Валенсии, Испания (макс. 56.1 мл/день/чел.). 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) и ниже, чем г. Лиссабон, Португалия (5.86 г/день/1000 жителей).

Список литературы

1. Porter K.A. Effect of homologous bone marrow injections in x-irradiated rabbits. // Br. J. Exp. Pathol. 1957. V. 38. № 4. P. 401-412.
2. Basu P.K., Miller I., Ormsby H.L. Sex chromatin as a biologic cell marker in the study of the fate of corneal transplants. // Am. J. Ophthalmol. 1960. V. 49. P. 513-515.
3. Biomarkers and risk assessment: concept and principles. // World Health Organization. Switzerland, Geneva. 1993. P. 11-15.
4. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. // Clin. Pharmacol. Ther. 2001. V. 69. № 3. P. 89-95.
5. Strimbu K., Tavel J.A. What are Biomarkers. // Curr. Opin. HIV AIDS. 2010. V. 5. № 6. P. 463-466.
6. Goossens N., Nakagawa S., Sun X., Hoshida Y. Cancer biomarker discovery and validation. // Transl. Cancer Res. 2015. V. 4. № 3. P. 256-269.
7. Rico M., Andrés-Costa M.J., Picó Y. Estimating population size in wastewater-based epidemiology. Valencia metropolitan area as a case study. // J. Hazard. Mater. 2017. V. 323. P. 156-165.
8. Hukkanen J., Jacob P., Benowitz N.L. Metabolism and disposition kinetics of nicotine. // Pharmacol. Rev. 2005. V. 57. № 1. P. 79-115.
9. Van Nuijs A.L., Mougel J.F., Tarcomnicu I., Bervoets L., Blust R., Jorens P.G., Neels H., Covaci A. Sewage epidemiology—a real-time approach to estimate the consumption of illicit drugs in Brussels, Belgium. // Environ. Int. 2011. V. 37. № 3. P. 612-621.
10. Van Wel J.H., Gracia-Lor E., van Nuijs A.L., Kinyua J., Salvatore S., Castiglioni S., Bramness J.G., Covaci A., Van Hal G. Investigation of agreement between wastewater-based epidemiology and survey data on alcohol and nicotine use in a community. // Drug Alcohol Depend. 2016. V. 162. P. 170-175.
11. Gracia-Lor E., Castiglioni S., Bade R., Been F., Castrignanò E., Covaci A., González-

Mariño I., Hapeshi E., Kasprzyk-Hordern B., Kinyua J., Lai F.Y., Letzel T., Lopardo L., Meyer M.R., O'Brien J., Ramin P., Rousis N.I., Rydevik A., Ryu Y., Santos M.M., Senta I., Thomaidis N.S., Veloutsou S., Yang Z., Zuccato E., Bijlsma L. Measuring biomarkers in wastewater as a new source of epidemiological information: Current state and future perspectives. // *Environ. Int.* 2017. V. 99. P. 131-150.

12. McCall A., Bade R., Kinyua J., Lai F.Y., Thai P. K., Covaci A., Bijlsma L., van Nuijs A.L.N., Ort C. Critical review on the stability of illicit drugs in sewers and wastewater samples. // *Water Res.* 2016. V. 88. P. 933-947.

13. Chen C., Kostakis C., Gerber J.P., Tschärke B.J., Irvine R.J., White J.M. Towards finding a population biomarker for wastewater epidemiology studies. // *Sci. Total Environ.* 2014. V. 487. № 1. P. 621-628.

14. Bazylak G., Brózik H., Sabanty W. Combined SPE and HPTLC as a screening assay of urinary cotinine from male adolescents exposed to environmental tobacco smoke. // *Pol. J. Environ. Stud.* 2000. V. 9. № 2. P. 113-124.

15. Рожанец В.В. Эпидемиология на основе анализа сточных вод: новый подход к оценке потребления наркотических средств и психотропных соединений. Часть I. Этанол и никотин. // *Вопросы наркологии.* 2016. № 7-8. С. 54-74.

16. Рожанец В.В., Чжан М. Эпидемиология на основе анализа сточных вод: Оценка потребления этанола и никотина. // *Наркология.* 2017. № 8. С. 11-23.

17. Dunlop A.J., Clunie I., Stephen D.W., Allison J.J. Determination of Cotinine by LC-MS-MS with automated solid-phase extraction. // *J. Chromatogr. Sci.* 2014. V. 52. № 4. P. 351-356.

18. Pianezza M.L., Sellers E.M., Tyndale R.F. Nicotine metabolism defect reduces smoking. // *Nature.* 1998. V. 393. № 6687. P. 750-750.

19. Nakajima M., Yokoi T. Interindividual variability in nicotine metabolism: c-oxidation and glucuronidation. // *Drug Metab. Pharmacokinet.* 2005. V. 20. № 4. P. 227-235.

20. Apinan R., Tassaneeyakul W., Mahavorasirikul W., Satarug S., Kajanawart S., Vannaprasaht S., Ruenweerayut R., Na-Bangchang K. The influence of CYP2A6 polymorphisms and cadmium on nicotine metabolism in Thai population. // *Environ.*

Toxicol. Pharmacol. 2009. V. 28. № 3. P. 420-424.

21. Murphy S.E., Johnson L.M., Pullo D.A. Characterization of multiple products of cytochrome P450 2A6-catalyzed cotinine metabolism. // Chem. Res. Toxicol. 1999. V. 12. № 7. P. 639-645.

22. Chen G., Giambone N.E., Lazarus P. Glucuronidation of trans-3'-hydroxycotinine by UGT2B17 and UGT2B10. // Pharmacogenet. Genomics. 2012. V. 22. № 3. P. 183-190.

23. Kosmider L., Delijewski M., Koszowski B., Sobczak A., Benowitz N.L., Goniewicz M.L. Slower nicotine metabolism among postmenopausal Polish smokers. // Pharmacol Reports. 2017. V. 70. № 3. P. 434-438.

24. Jacob III P., Yu L., Duan M., Ramos L., Yturralde O., Benowitz N.L. Determination of the nicotine metabolites cotinine and trans-3'-hydroxycotinine in biologic fluids of smokers and non-smokers using liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Biomarkers for tobacco smoke exposure and for phenotyping cytochrome P450 2A6 activity. // J. Chromatogr. B. 2011. V. 879. № 3-4. P. 267-276.

25. Tretzel L., Thomas A., Piper T., Hedeland M., Geyer H., Schänzer W., Thevis M. Fully automated determination of nicotine and its major metabolites in whole blood by means of a DBS online-SPE LC-HR-MS/MS approach for sports drug testing. // J. Pharm. Biomed. Anal. 2016. V. 123. P. 132-140.

26. Hariharan M., VanNoord T., Greden J.F. A high-performance liquid-chromatographic method for routine simultaneous determination of nicotine and cotinine in plasma. // Clin. Chem. 1988. V. 34. № 4. P. 724-729.

27. Abdallaha I.A., Hammell D.C., Stinchcomb A.L., Hassan H.E. A fully validated LC MS/MS method for simultaneous determination of nicotine and its metabolite cotinine in human serum and its application to a pharmacokinetic study after using nicotine transdermal delivery systems with standard heat application in adult smokers. // J. Chromatogr. B. 2016. V. 1020. № 1. P. 67-77.

28. Hu C.W., Hsu Y.W., Chen J.L., Tam L.M., Chao M.R. Direct analysis of tobacco-specific nitrosamine NNK and its metabolite NNAL in human urine by LC-MS/MS: evidence of linkage to methylated DNA lesions. // Arch. Toxicol. 2014. V. 88. № 2. P. 291-299.

29. Sommerfeld K., Lukasic-Glebocka M., Kulza M., Druzdz A., Panienski P., Zielinska-Psuja B. Intravenous and oral suicidal e-liquid poisonings with confirmed nicotine and cotinine concentrations. // *Forensic Sci. Int.* 2016. V. 262. P. e15-e20.
30. Robson N., Bond A.J., Wolff K. Salivary nicotine and cotinine concentrations in unstimulated and stimulated saliva. // *J. Pharm. Pharmacol.* 2010. V. 4. № 2. P. 61-65.
31. СИМОНОВ Е.А., ИЗОТОВ Б.Н., ФЕСЕНКО А.В. Наркотики: методы анализа на коже, в ее придатках и выделениях. М.: Анахарсис. 2000. Т. 130. 60 с.
32. Abu-awwad A., Arafat T., Schmitz O.J. Simultaneous determination of nicotine, cotinine, and nicotine N-oxide in human plasma, semen, and sperm by LC-orbitrap MS. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2016. V. 408. № 23. P. 6473-6481.
33. Gorrod J.W., Jacob III P. Analytical determination of nicotine and related compounds and their metabolites. // Elsevier. Amsterdam, 1999. P. 45-67.
34. Шаповалова Е.Н., Пирогов А.В. Хроматографические методы анализа. Методическое пособие для специального курса. М.: Изд-во МГУ. 2007. 109 с.
35. Wieling J. LC-MS-MS experiences with internal standards. // *Chromatographia.* 2002. V. 55. P. s107-s113.
36. Penner N., Ramanathan R., Zgoda-Pols J., Chowdhury S. Quantitative determination of hippuric and benzoic acids in urine by LC-MS/MS using surrogate standards. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2010. V. 52. № 4. P. 534-543.
37. Wright S.L., Rowe D., Reid M.J., Thomas K.V., Galloway T.S. Bioaccumulation and biological effects of cigarette litter in marine worms. // *Sci. Rep.* 2015. № 5. P. 1-10.
38. Medana C., Aigotti R., Sala C., Dal Bello F., Santoro V., Gastaldi D., Baiocchi C. Analysis of nicotine alkaloids and impurities in liquids for e-cigarettes by LC-MS, GC-MS and ICP-MS. // *Spectroscopy.* 2016. V. 14. № 2. P. 20-28.
39. Baumann F., Regenthal R., Burgos-Guerrero I.L., Hegerl U., Preiss R. Determination of nicotine and cotinine in human serum by means of LC/MS. // *J. Chromatogr. B.* 2010. V. 878. № 1. P. 107-111.
40. Man C.N., Gam L., Ismail S., Awang R. Simple, rapid and sensitive assay method for simultaneous quantification of urinary nicotine and cotinine using gas chromatography-

mass spectrometry. // J. Chromatogr. B. 2006. V. 844. № 2. P. 322-327.

41. Cao W., Liu J., Qiu H., Yang H., Wang E. Simultaneous determination of tramadol and lidocaine in urine by end-column capillary electrophoresis with electrochemiluminescence detection. // Electroanalysis. 2002. V. 14. № 22. P. 1571-1576.

42. Piller M., Gilch G., Scherer G., Scherer M. Simple, fast and sensitive LC–MS/MS analysis for the simultaneous quantification of nicotine and 10 of its major metabolites. // J. Chromatogr. B. 2014. V. 951. № 1. P. 7-15.

43. Lequang Thuan N.T., Miguales M.L., Roche D., Roussel G., Mahuzler G., Chretlen J., Ekindjian O.G. Elimination of caffeine interference in HPLC determination of urinary nicotine and cotinine. // Clin. Chem. 1989. V. 35. № 7. P. 1456-1459.

44. Jacob III P., Yu L., Liang G., Shulgin A.T., Benowitz N.L. Gas chromatographic-mass spectrometric method for determination of anabasine, anatabine and other tobacco alkaloids in urine of smokers and smokeless tobacco users. // J. Chromatogr. B. 1993. V. 619. № 1. P. 49-61.

45. Jacob III P., Wilson M., Benowitz N.L. Improved gas chromatographic method for the determination of nicotine and cotinine in biological fluids. // J. Chromatogr. B. 1981. V. 222. № 1. P. 61-70.

46. Van Eeckhaut A., Lanckmans K., Sarre S., Smolders I., Michotte Y. Validation of bioanalytical LC–MS/MS assays: evaluation of matrix effects. // J. Chromatogr. B. 2009. V. 877. № 23. № 1. P. 2198-2207.

47. Marclay F., Saugy M. Determination of nicotine and nicotine metabolites in urine by hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry: Potential use of smokeless tobacco products by ice hockey players. // J. Chromatogr. A. 2010. V. 1217. № 48. P. 7528-7538.

48. Meger M., Meger-Kossien I., Schuler-Metz A, Janket D., Scherer G. Simultaneous determination of nicotine and eight nicotine metabolites in urine of smokers using liquid chromatography tandem mass spectrometry. // J. Chromatogr. B. 2002. V. 778. № 1-2. P. 251-261.

49. Kuhn J., Vollmer T., Martin C., Hendig D., Knabbe C. Fast and sample cleanup-free

measurement of nicotine and cotinine by stable isotope dilution ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry studies. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2012. V. 67-68. P. 137-143.

50. Song L., Davis W., Abrams S.M., Hemiup J., Kazim A.L., Cummings K.M., Mahoney M.C. Sensitive and rapid method for the determination of urinary cotinine in non-smokers: an application for studies assessing exposures to second hand smoke (SHS). // *Anal. Chim. Acta.* 2005. V. 545. № 4. P. 200-208.

51. Yasuda M., Ota T., Morikawa A., Mawatari K., Fukuuchi T., Yamaoka N., Kaneko K., Nakagomi K. Simultaneous determination of nicotine and cotinine in serum using high-performance liquid chromatography with fluorometric detection and postcolumn UV-photoirradiation system. // *J. Chromatogr. B.* 2013. V. 934. № 1. P. 41-45.

52. Onoue S., Yamamoto N., Seto Y., Yamada S. Pharmacokinetic study of nicotine and its metabolite cotinine to clarify possible association between smoking and voiding dysfunction in rats using UPLC/ESI-MS. // *Drug Metab. Pharmacokinet.* 2011. V. 26. № 4. P. 416-422.

53. Tsinisizeli N., Sotiroudis G., Xenakis A., Lykeridou K.E. Determination of nicotine and cotinine in meconium from Greek neonates and correlation with birth weight and gestational age at birth. // *Chemosphere.* 2015. V. 119. P. 1200-1207.

54. Dobrinas M., Choong E., Noetzli M., Cornuz J., Ansermot N., Eap C.B. Quantification of nicotine, cotinine, trans-3'-hydroxycotinine and varenicline in human plasma by a sensitive and specific UPLC tandem mass-spectrometry procedure for a clinical study on smoking cessation. // *J. Chromatogr. B.* 2011. V. 879. № 30. P. 3574-3582.

55. Ramdzan A.N., Barreros L., Almeida M.I., Kolev S.D., Segundo M.A. Determination of salivary cotinine through solid phase extraction using a bead-injection lab-on-valve approach hyphenated to hydrophilic interaction liquid chromatography. // *J. Chromatogr. A.* 2016. V. 1429. № 15. P. 284-291.

56. Li P., Beck W.D., Callahan P.M., Terry Jr. A.V., Barlett M.G. Quantitation of cotinine and its metabolites in rat plasma and brain tissue by hydrophilic interaction chromatography tandem mass spectrometry (HILIC MS/MS). // *J. Chromatogr. B.* 2012. V. 907. № 1. P. 117-125.

57. Kataoka H., Inoue R., Yagi K., Saito K. Determination of nicotine, cotinine, and related alkaloids in human urine and saliva by automated in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2009. V. 49. № 1. P. 108-114.
58. Subedi B., Kannan K. Mass loading and removal of select illicit drugs in two wastewater treatment plants in New York State and estimation of illicit drug usage in communities through wastewater analysis. // *Environ. Sci. Technol.* 2014. V. 48. № 12. P. 6661-6670.
59. Senta I., Gracia-Lor E., Borsotti A., Zuccato E., Castiglioni S. Wastewater analysis to monitor use of caffeine and nicotine and evaluation of their metabolites as biomarkers for population size assessment. // *Water Res.* 2015. V. 74. P. 23-33.
60. Rodríguez-Álvarez T., Rodil R., Rico M., Cela R., Quintana J.B. Assessment of local tobacco consumption by liquid chromatography-tandem mass spectrometry sewage analysis of nicotine and its metabolites, cotinine and trans-3'-hydroxycotinine, after enzymatic deconjugation. // *Anal. Chem.* 2014. V. 86. № 20. P. 10274-10281.
61. Kardani F., Daneshfar A., Sahrai R. Determination of nicotine, anabasine, and cotinine in urine and saliva samples using single-drop microextraction. // *J. Chromatogr. B.* 2010. V. 878. № 28. P. 2857-2862.
62. Kim I., Darwin W.D., Huestis M.A. Simultaneous determination of nicotine, cotinine, norcotinine, and trans-3'-hydroxycotinine in human oral fluid using solid phase extraction and gas chromatography mass spectrometry. // *J. Chromatogr. B.* 2005. V. 814. № 2. P. 233-240.
63. Chiadmi F., Schlatter J. Simultaneous determination of cotinine and trans-3'-hydroxycotinine in urine by automated solid-phase extraction using gas chromatography mass spectrometry. // *Biomed. Chromatogr.* 2014. V. 28. № 4. P. 453-458.
64. Martins M.C.G., Maia P.P., Boralli V.B., Figueiredo E.C., Martins I. Determination of cotinine in urine by molecularly imprinted polymer solid phase and liquid liquid extraction coupled with gas chromatography. // *Anal. Lett.* 2015. V. 48. № 2. P. 1245-1256.
65. Kuo H., Yang J., Chiu M. Determination of urinary and salivary cotinine using gas and liquid chromatography and enzyme-linked immunosorbent assay. // *J. Chromatogr. B.* 2002.

V. 768. № 2. P. 297-303.

66. Park S., Lee D., Park J., Lee Y., Chung J. A sensitive enzyme immunoassay for measuring cotinine in passive smokers. // *Clin. Chim. Acta*. 2010. V. 411. № 17-18. P. 1238-1242.

67. Калмыкова Е.Н., Ермолаева Т.Н., Еремин С.А. Разработка пьезокварцевых иммуносенсоров для проточно-инжекционного анализа высоко- и низкомолекулярных соединений. // *Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 2. 2002. Химия. Т. 43. № 6. С. 399-403.*

68. Han S., Hong S., Li X. Effects of cations and anions as aggregating agents on SERS detection of cotinine (COT) and trans-3 α -hydroxycotinine (3HC). // *J. Colloid Interface Sci*. 2013. V. 410. P. 74-80.

69. Alharbi O., Xu Y., Goodacre R. Simultaneous multiplexed quantification of nicotine and its metabolites using surface enhanced Raman scattering. // *Analyst*. 2014. V. 139. № 19. P. 4820-4827.

70. Mamian-Lopez M.B., Poppi R.J. Standard addition method applied to the urinary quantification of nicotine in the presence of cotinine and anabasine using surface enhanced Raman spectroscopy and multivariate curve resolution. // *Anal. Chim. Acta*. 2013. V. 760. P. 53-59.

71. Энциклопедия клинических лабораторных тестов. - М.: ЮНИМЕД-пресс, 2003, С. 4.

72. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. 4 ed. // Elsevier: New Delhi, 2006. 2412 p.

73. Asero B., Colo V.A., Vercellone A. Preparation of 5-hydroxy-3-indoleacetic acid. // *Farmaco, Edizione Scientifica*. 1956. V. 11. P. 219-220.

74. Martínez A., Knappskog P.M., Haavik J. A structural approach into human tryptophan hydroxylase and its implications for the regulation of serotonin biosynthesis. // *Current medicinal chemistry*. 2001. V. 8. № 9. P. 1077-1091.

75. Moriarty M., Lee A., O'Connell B., Kelleher A., Keeley H., Furey A. Development of an LC-MS/MS method for the analysis of serotonin and related compounds in urine and

the identification of a potential biomarker for attention deficit hyperactivity/hyperkinetic disorder. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2011. V. 401. № 8. P. 2481-2493.

76. Feldman J.M., Lee E.M. Serotonin content of foods: effect on urinary excretion of 5-hydroxyindoleacetic acid. // *Am. J. Clin. Nutr.* 1985. V. 42. № 4. P. 639-643.

77. Stephanson N., Helander A., Beck O. Alcohol biomarker analysis: simultaneous determination of 5-hydroxytryptophol glucuronide and 5-hydroxyindoleacetic acid by direct injection of urine using ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. // *J. Mass Spectrom.* 2007. V. 42. № 7. P. 940-949.

78. Sperk G. Simultaneous determination of serotonin, 5-hydroxyindoleacetic acid, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid and homovanillic acid by high performance liquid chromatography with electrochemical detection. // *J. Neurochem.* 1982. V. 38. № 3. P. 840-843.

79. Wagner J., Vitali P., Palfreyman M.G., Zraika M., Huot S. Simultaneous determination of 3,4-dihydroxyphenylalanine, 5-hydroxytryptophan, dopamine, 4-hydroxy-3-methoxyphenylalanine, norepinephrine, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, homovanillic acid, serotonin, and 5-hydroxyindoleacetic acid in rat cerebrospinal fluid and brain by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. // *J. Neurochem.* 1982. V. 38. № 5. P. 1241-1254.

80. Scheinin M., Chang W.H., Kirk K.L., Linnoila M. Simultaneous determination of 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol, 5-hydroxyindoleacetic acid, and homovanillic acid in cerebrospinal fluid with high-performance liquid chromatography using electrochemical detection. // *Anal. Biochem.* 1983. V. 131. № 1. P. 246-253.

81. Anderson G.M., Young J.G., Cohen D.J. Rapid liquid chromatographic determination of tryptophan, tyrosine, 5-hydroxyindoleacetic acid and homovanillic acid in cerebrospinal fluid. // *J. Chromatogr. B.* 1979. V. 164. № 4. P. 501-505.

82. Anderson G.M., Purdy W.C., Anderson G.M. Liquid chromatographic-fluorometric system for the determination of indoles in physiological samples. // *Anal. Chem.* 1979. V. 51. № 2. P. 283-286.

83. Peat M.A., Gibb J.W. High-performance liquid chromatographic determination of indoleamines, dopamine, and norepinephrine in rat brain with fluorometric detection. //

Anal. Biochem. 1983. V. 128. № 2. P. 275-280.

84. Lee M.S., Cheng F.C., Yeh H.Z., Liou T.Y., Liu J.H. Determination of Plasma Serotonin and 5-Hydroxyindoleacetic Acid in Healthy Subjects and Cancer Patients. // Clin Chem. 2000. V. 46. № 3. P. 422-423.

85. Anderson G.M., Young J.G., Cohen D.J. Determination of indoles in human and rat pineal. // J. Chromatogr. 1982. V. 228. P. 155-163.

86. Westerink B.H.C., Mulder T.B.A. Determination of picomole amounts of dopamine, noradrenaline, 3,4-dihydroxyphenylalanine, 3,4 dihydroxyphenylacetic acid, homovanillic acid, and 5-hydroxyindoleacetic acid in nervous tissue after one-step purification on sephadex g-10, using high-performance liquid chromatography with a novel type of electrochemical detection. // J. Neurochem. 1981. V. 36. № 4. P. 1449-1462.

87. Semerdjian-Rouquier L., Bossi L., Scatton B. Determination of 5-hydroxytryptophan, serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid in rat and human brain and biological fluids by reversed-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. // J. Chromatogr. A. 1981. V. 218. P. 663-670.

88. Petruccelli B., Bakris G., Miller T., Korpi E.R., Linnoila M. A liquid chromatographic assay for 5-hydroxytryptophan, serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid in human body fluids. // Acta pharmacol. et toxicol. 1982. V. 51. № 5. P. 421-427.

89. Lesniak W.G., Jyoti A., Mishra M.K., Louissaint N., Romero R., Chugani D.C., Kannan S., Kannan R.M.. Concurrent quantification of tryptophan and its major metabolites. // Anal. Biochem. 2013. V. 443. № 2. P. 222-231.

90. Beck O., Stephanson N., Bottcher M., Dahmen N., Fehr C., Helander A. Biomarkers to disclose recent intake of alcohol: potential of 5-hydroxytryptophol glucuronide testing using new direct uplc-tandem ms and elisa methods. // Alcohol&Alcoholism. 2007. V. 42. № 4. P. 321-325.

91. Borucki K., Schreiner R., Dierkes J., Jachau K., Krause D., Westphal S., Wurst F.M., Luley C., Schmidt-Gayk H. Detection of recent ethanol intake with new markers: comparison of fatty acid ethyl esters in serum and of ethyl glucuronide and the ratio of 5-hydroxytryptophol to 5-hydroxyindole acetic acid in urine. // Alcoholism: Clinical and Experimental Research. 2005. V. 29. № 5. P. 781-787.

92. Cai H.L., Zhu R.H., Li H.D. Determination of dansylated monoamine and amino acid neurotransmitters and their metabolites in human plasma by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. // *Anal. Biochem.* 2010. V. 396. № 1. P. 103-111.
93. De Jonga W.H.A., Grahamb K.S., de Vriesc E.G.E., Kema I.P. Urinary 5-HIAA measurement using automated on-line solid-phase extraction–high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. // *J. Chromatogr. B.* 2008. V. 868. № 1-2. P. 28-33.
94. González R.R., Fernández R.F., Vidal J.L.M., Frenich A.G., Pérez M.L.G.. Development and validation of an ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass-spectrometry (UHPLC–MS/MS) method for the simultaneous determination of neurotransmitters in rat brain samples. // *J. Neuroscience Methods.* 2011. V. 198. № 2. P. 187-194.
95. Høiseth G., Bernard J.P., Stephanson N., Normann P.T., Christophersen A.S., Mørland J., Helander A. Comparison between the urinary alcohol markers EtG, EtS, and GTOL/5-HIAA in a controlled drinking experiment. // *Alcohol&Alcoholism.* 2008. V. 43. № 2. P. 187-191.
96. Huang F., Li J., Shi H., Wang T., Muhtar W., Du M., Zhang B., Wu H., Yang L., Hu Z., Wu X. Simultaneous quantification of seven hippocampal neurotransmitters in depression mice by LC–MS/MS. // *J. Neuroscience Methods.* 2014. V. 229. P. 8-14.
97. Kroll C.A., Magera M.J., Helgeson J.K., Matern D., Rinaldo P. Liquid chromatographic–tandem mass spectrometric method for the determination of 5-hydroxyindole-3-acetic acid in urine. // *Clin. Chem.* 2002. V. 48. № 11. P. 2049-2051.
98. Lionetto L., Lostia A.M., Stigliano A., Cardelli P., Simmaco M. HPLC–mass spectrometry method for quantitative detection of neuroendocrine tumor markers: Vanillylmandelic acid, homovanillic acid and 5-hydroxyindoleacetic acid. // *Clin. Chim. Acta.* 2008. V. 398. № 1-2. P. 53-56.
99. Su F., Wang F., Zhu R., Li H. Determination of 5-hydroxytryptamine, norepinephrine, dopamine and their metabolites in rat brain tissue by LC–ESI–MS–MS. // *Chromatographia.* 2009. V. 69. № 3-4. P. 207-213.

100. Wei B., Li Q., Fan R., Su D., Chen X., Ji Y., Bi K. Determination of monoamine and amino acid neurotransmitters and their metabolites in rat brain samples by UFLC–MS/MS for the study of the sedative-hypnotic effects observed during treatment with *S. chinensis*. // *J. Pharmac.&Biomed. Anal.* 2014. V. 88. P. 416-422.
101. Zhao X., Suo Y. Simultaneous determination of monoamine and amino acid neurotransmitters in rat endbrain tissues by pre-column derivatization with high-performance liquid chromatographic fluorescence detection and mass spectrometric identification. // *Talanta.* 2008. V. 76. № 3. P. 690-697.
102. Bertilsson L., Atkinson A.J., Althaus J.R., Harfast A., Lindgren J., Holmstedt B. Quantitative determination of 5-hydroxyindole-3-acetic acid in cerebrospinal fluid by gas chromatography-mass spectrometry. // *Anal. Chem.* 1972. V. 44. № 8. P. 1434-1438.
103. Horning E.C., Horning M.G. Human metabolic profiles obtained by GC and GC/MS. // *J. Chromatogr. Sci.* 1971. V. 9. № 3. P. 129-140.
104. Hoskins J.A., Pollitt R.J. Quantitative aspects of urinary indole-3-acetic acid and 5-hydroxyindole-3-acetic acid excretion. // *J. Chromatogr.* 1975. V. 109. № 2. P. 436-438.
105. Goldenberg H. Specific photometric determination of 5-hydroxyindoleacetic acid in urine. // *Clin. Chem.* 1973. V. 19. № 1. P. 38-44.
106. Swahn C., Sandgarde B., Wiesel F., Sedvall G. Simultaneous determination of the three major monoamine metabolites in brain tissue and body fluids by a mass fragmentographic method. // *Psychopharmacology.* 1976. V. 48. № 2. P. 147-152.
107. Zuetenhorst J.M., Korse C.M., Bonfrer J.M.G., Peter J., Lamers C.B.H.W., Taal B.G. Daily cyclic changes in the urinary excretion of 5-hydroxyindoleacetic acid in patients with carcinoid tumors. // *Clin. Chem.* 2004. V. 50. № 9. P. 1634-1639.
108. Udenfriend S., Titus E., Weissbach H. The identification of 5-hydroxy-3-indoleacetic acid in normal urine and a method for its assay. // *J. Biol. Chem.* 1955. V. 216. № 2. P. 499-505.
109. Mustala O. Specificity of the nitrosonaphthol reaction in the determination of urinary 5-hydroxyindoleacetic acid. // *Ann. Med. Exp. Biol. Fenn.* 1965. V. 43. № 8. P. 1-48.
110. Рожанец В.В., Нужный В.П. Первичный метаболизм этанола в желудочно-

кишечном тракте. // Вопросы наркологии. 2007. Т. 5. С. 104-119.

111. Тарасова О.И., Огурцов П.П., Мазурчик Н.В., Моисеев В.С. Современные лабораторные маркеры употребления алкоголя. // Клиническая фармакология и терапия. 2007. Т. 16. № 1. С. 2-5.

112. Allen J.P., Wurst F.M., Thon N., Litten R.Z. Assessing the drinking status of liver transplant patients with alcoholic liver disease. // Liver Transpl. 2013. V. 19. № 4. P. 369-376.

113. Cabarcos P., Alvarez I., Tabernero M.J., Bermejo A.M. Determination of direct alcohol markers: a review. // Anal. Bioanal. Chem. 2015. V. 407. № 17. P. 4907-4925.

114. Hegstad S., Helland A., Hagemann C., Michelsen L., Spigset O. EtG/EtS in Urine from sexual assault victims determined by UPLC-MS-MS. // J. Anal. Toxicol. 2013. V. 37. № 4. P. 227-232.

115. Helander A., Beck O. Ethyl sulfate: a metabolite of ethanol in humans and a potential biomarker of acute alcohol intake. // J. Anal. Toxicol. 2005. V. 29. № 5. P. 270-274.

116. Jatlow P.I., Agro A., Wu R., Nadim H., Toll B.A., Ralevski E., Nogueira C., Shi J., Dziura J.D., Petrakis I.L., O'Malley S.S. Ethyl glucuronide and ethyl sulfate assays in clinical trials, interpretation, and limitations: results of a dose ranging alcohol challenge study and 2 clinical trials. // Alcohol Clin. Exp. Res. 2014. V. 38. № 7. P. 2056-2065.

117. Nanau R.M., Neuman M.G. Biomolecules and biomarkers used in diagnosis of alcohol drinking and in monitoring therapeutic interventions. // Biomolecules. 2015. V. 5. № 3. P. 1339-1385.

118. Winkler M., Skopp G., Alt A., Miltner E., Jochum T., Daenhardt C., Sporkert F., Gnann H., Weinmann W., Thierauf A. Comparison of direct and indirect alcohol markers with PEth in blood and urine in alcohol dependent inpatients during detoxication. // Int. J. Legal Med. 2013. V. 127. № 4. P. 761-768.

119. Dresen S., Weinmann W., Wurst F.M. Forensic confirmatory analysis of ethyl sulfate - a new marker for alcohol consumption - by liquid-chromatography/electrospray ionization/tandem mass spectrometry. // J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2004. V. 15. № 11. P. 1644-1648.

120. Helander A., Böttcher M., Fehr C., Dahmen N., Beck O. Detection times for urinary ethyl glucuronide and ethyl sulfate in heavy drinkers during alcohol detoxification. // *Alcohol Alcohol.* 2009. V. 44. № 1. P. 55-61.
121. Wurst F.M., Vogel R., Jachau K., Varga A., Alling C., Alt A., Skipper G.E. Ethyl glucuronide discloses recent covert alcohol use not detected by standard testing in forensic psychiatric inpatients. // *Alcohol Clin. Exp. Res.* 2003. V. 27. № 3. P. 471-476.
122. Schloegl H., Dresen S., Spaczynski K., Stoertzel M., Wurst F.M., Weinmann W. Stability of ethyl glucuronide in urine, post mortem tissue and blood samples. // *Int. J. Leg. Med.* 2006. V. 120. № 2. P. 83-88.
123. Reid M.J., Langford K.H., Morland J., Thomas K.V. Analysis and interpretation of specific ethanol metabolites, ethyl sulfate, and ethyl glucuronide in sewage effluent for the quantitative measurement of regional alcohol consumption. // *Alcohol Clin. Exp. Res.* 2011. V. 35. № 9. P. 1593-1599.
124. Walsham N.E., Sherwood R.A. Ethyl Glucuronide and Ethyl Sulfate. // *Adv. Clin. Chem.* 2014. V. 67. P. 47-71.
125. Dahl H., Stephanson N., Beck O., Helander A. Comparison of urinary excretion characteristics of ethanol and ethyl glucuronide. // *J. Anal. Toxicol.* 2002. V. 26. № 4. P. 2001-2004.
126. Høiseth G., Morini L., Poletini A., Christophersen A.S., Johnsen L., Karinen R. Serum/whole blood concentration ratio for ethyl glucuronide and ethyl sulphate. // *J. Anal. Toxicol.* 2009. V. 22. № 4. P. 208-211.
127. Halter C.C., Dresen S., Auwaerter V., Wurst F.M., Weinmann W. Kinetics in serum and urinary excretion of ethyl sulphate and ethyl glucuronide after medium dose ethanol intake. // *Int. J. Leg. Med.* 2008. V. 122. № 2. P. 123-128.
128. Høiseth G., Bernard J.P., Karinen R., Johnsen L., Helander A., Christophersen A.S. A pharmacokinetic study of ethyl glucuronide in blood and urine: applications to forensic toxicology. // *Forensic Sci. Int.* 2007. V. 172. № 2-3. P. 119-124.
129. Foti R.S., Fisher M.B. Assessment of UDP-glucuronosyl-transferase catalyzed formation of ethyl glucuronide in human liver microsomes and recombinant UGTs. //

Forensic Sci. Int. 2005. V. 153. № 2-3. P. 109-116.

130. Ingall G.B. Alcohol biomarkers. // Clin. Lab. Med. 2012. V. 32. № 3. P. 391-406.

131. Hannuksela M.L., Liisanantti M.K., Nissinen A.E., Savolainen M.J. Biochemical markers of alcoholism. // Clin. Chem. Lab. Med. 2007. V. 45. № 8. P. 953-961.

132. Lostia A.M., Vicente J.L., Cowan D.A. Measurement of ethyl glucuronide, ethyl sulphate and their ratio in the urine and serum of healthy volunteers after two doses of alcohol. // Alcohol. 2013. V. 48. № 1. P. 74-82.

133. Høiseth G., Morini L., Poletini A., Christophersen A., Mørland J. Blood kinetics of ethyl glucuronide and ethyl sulphate in heavy drinkers during alcohol detoxification. // Forensic Sci. Int. 2009. V. 188. № 1-3. P. 52-56.

134. Wurst F.M., Wiesbeck G.A., Metzger J.W., Weinmann W. On sensitivity, specificity, and the influence of various parameters on ethyl glucuronide levels in urine— results from the WHO/ISBRA study. // Alcohol. Clin. Exp. Res. 2004. V. 28. № 8. P. 1220-1228.

135. Kip M.J., Spies C.D., Neumann T., Nachbar Y., Alling C., Aradottir S., Weinmann W., Wurst F.M. The usefulness of direct ethanol metabolites in assessing alcohol intake in nonintoxicated male patients in an emergency room setting. // Alcohol. Clin. Exp. Res. 2008. V. 32. № 7. P. 1284-1291.

136. Wurst F.M., Kempter C., Seidl S., Alt A. Ethyl glucuronide—a marker of alcohol consumption and a relapse marker with clinical and forensic implications. // Alcohol. 1999. V. 34. № 1. P. 71-77.

137. Maenhout T.M., De Buyzere M.L., Delanghe J.R. Non-oxidative ethanol metabolites as a measure of alcohol intake. // Clin. Chim Acta. 2013. V. 415. P. 322-329.

138. Morini L., Falcón M., Pichini S., Garcia-Algar O., Danesino P., Groppi A., Luna A. Ethyl-glucuronide and ethyl-sulfate in placental and fetal tissues by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. // Anal. Biochem. 2011. V. 418. № 1. P. 30-36.

139. Mastroiannia N., Lopez de Aldaa M., Barceloa D. Analysis of ethyl sulfate in raw wastewater for estimation of alcohol consumption and its correlation with drugs of abuse in the city of Barcelona. // J. Chromatogr. A. 2014. V. 1360. P. 93-99.

140. Rodríguez-Álvarez T., Rodil R., Cela R., Quintana J.B. Ion-pair reversed-phase liquid

chromatography-quadrupole-time-of-flight and triple-quadrupole-mass spectrometry determination of ethyl sulfate in wastewater for alcohol consumption tracing. // *J. Chromatogr. A*. 2014. V. 1328. P. 35-42.

141. Nguyen V. L., Paull P., Haber P.S., Chitty K., Seth D. Evaluation of a novel method for the analysis of alcohol biomarkers: Ethyl glucuronide, ethyl sulfate and phosphatidylethanol. // *Alcohol*. 2017. V. 67. P. 7-13.

142. Morini L., Politi L., Zucchella A., Poletti A. Ethyl glucuronide and ethyl sulphate determination in serum by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. // *Clin. Chim. Acta*. 2007. V. 376. № 1-2. P. 213-219.

143. Favretto D., Nalesso A., Frison G., Viel G., Traldi P., Ferrara S.D. A novel and an effective analytical approach for the LC-MS determination of ethyl glucuronide and ethyl sulfate in urine. // *Int. J. Legal Medicine*. 2010. V. 124. № 2. P. 161-164.

144. Kummer N., Wille S., Di Fazio V., Lambert W., Samyn N. A fully validated method for the quantification of ethyl glucuronide and ethyl sulphate in urine by UPLC–ESI-MS/MS applied in a prospective alcohol self-monitoring study. // *J. Chromatogr. B*. 2013. V. 929. № 1. P. 149-154.

145. Albermann M.E., Musshoff F., Madea B. A high-performance liquid chromatographic tandem mass spectrometric method for the determination of ethyl glucuronide and ethyl sulfate in urine validated according to forensic guidelines. // *J. Chromatogr. Sci*. 2012. V. 50. № 1. P. 51-56.

146. Bicker W., Lämmerhofer M., Keller T., Schuhmacher R., Krska R., Lindner W. Validated method for the determination of the ethanol consumption markers ethyl glucuronide, ethyl phosphate, and ethyl sulfate in human urine by reversed-phase/weak anion exchange liquid chromatography-tandem mass spectrometry. // *Anal. Chem*. 2006. V. 78. № 16. P. 5884-5892.

147. Al-Asmari A., Anderson R.A., Appelbald P. Direct determination of ethyl glucuronide and ethyl sulfate in postmortem urine specimens using hydrophilic interaction liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. // *J. Anal. Toxicol*. 2010. V. 34. № 5. P. 261-272.

148 . Esteve-Turrillas F.A., Bicker W., Lämmerhofer M., Keller T., Lindner W.

Determination of ethyl sulfate - A marker for recent ethanol consumption - In human urine by CE with indirect UV detection. // *Electrophoresis*. 2006. V. 27. № 23. P. 4763-4771.

149. Huerta-Fontela M., Galceran M.T., Martin-Alonso J., Ventura F. Occurrence of psychoactive stimulatory drugs in wastewaters in north-eastern Spain. // *Sci. Total Environ.* 2008. V. 397. № 1-3. P. 31-40.

150. Селеменов В.Ф., Сливкин А.И. Химико-токсикологический анализ на группу веществ, изолируемых экстракцией и сорбцией. Наркотические и другие одурманивающие средства. // Учебно-метод. пособие. Воронеж 2004. С.17-26.

151. Дмитриенко С.Г. Методы разделения и концентрирования. // Учебно-метод. пособие. Москва 2008. 70 с.

152. Shakleya D.M., Huestis M.A. Simultaneous and sensitive measurement of nicotine, cotinine, trans-3'-hydroxycotinine and norcotinine in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. // *J. Chromatogr. B*. 2009. V. 877. № 29. P. 3537-3542.

153. You G., Rhee J., Park Y., Park S. Determination of nicotine, cotinine and trans-3'-hydroxycotinine using LC/MS/MS in forensic samples of a nicotine fatal case by oral ingestion of e-cigarette liquid. // *J. Forensic Sci.* 2016. V. 61. № 4. P. 1149-1154.

154. Lord H., Pawliszyn J. Evolution of solid phase microextraction technology. // *J. Chromatogr. A*. 2000. V. 885. № 1-2. P. 153-193.

155. De Cremer K., Van Overmeire I., Van Loco J. On-line solid-phase extraction with ultra-performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry for the detection of nicotine, cotinine and trans-3'-hydroxycotinine in urine to strengthen human biomonitoring and smoking cessation studies. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2013. V. 76. P. 126-133.

156. Esposito S., Bracacel E., Nibbio M., Speziale R., Orsatti L., Veneziano M., Monteagudo E., Bonelli F. Use of 'dilute-and-shoot' liquid chromatography-high resolution mass spectrometry in preclinical research: application to a DMPK study of perhexiline in mouse plasma. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2016. V. 118. P. 70-80.

157. Enders J.R., McIntire G.L. A dilute-and-shoot LC-MS method for quantitating opioids

in oral fluid. // J. Anal. Toxicol. 2015. V.39. № 8. P. 662-667.

158. Mathias P.C., Hayden J.A., Laha T.J., Hoofnagle A.N. Evaluation of matrix effects using a spike recovery approach in a dilute-and-inject liquid chromatography-tandem mass spectrometry opioid monitoring assay. // Clin. Chim. Acta. 2014. V. 437. P. 38-42.

159. de Sena Aquino A.C., Azevedo M.S., Ribeiro D.H., Costa A.C., Amante E.R. Validation of HPLC and CE methods for determination of organic acids in sour cassava starch wastewater. // Food Chem. 2015. V. 172. P. 725-730.

160. Politi L., Morini L., Groppi A., Poloni V., Pozzi F., Polettini A. Direct determination of the ethanol metabolites ethyl glucuronide and ethyl sulfate in urine by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. // Rapid. Commun. Mass. Spectrom. 2005. V. 19. № 10. P. 1321-1331.

161. Lopes A., Silva N., Bronze M.R., Ferreira J., Morais J. Analysis of cocaine and nicotine metabolites in wastewater by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Cross abuse index patterns on a major community. // Sci. Total. Environ. 2014. V. 487. P. 673-680.

162. Gatidou G., Kinyua J., van Nuijs A.L., Gracia-Lor E., Castiglioni S., Covaci A., Stasinakis A.S. Drugs of abuse and alcohol consumption among different groups of population on the Greek Island of Lesbos through sewage-based epidemiology. // Sci. Total. Environ. 2016. V. 563. P. 633-640.

163. Boogaerts T., Covaci A., Kinyua J., Neels H., van Nuijs A.L. Spatial and temporal trends in alcohol consumption in Belgian cities: A wastewater-based approach. // Drug Alcohol Depend. 2016. V. 160. P. 170-176.

164. Andrés-Costa M.J., Escrivá Ú., Andreu V., Picó Y. Estimation of alcohol consumption during "Fallas" festivity in the wastewater of Valencia city (Spain) using ethyl sulfate as a biomarker. // Sci. Total. Environ. 2015. V. 541. P. 616-622.