

KEMIJSKE METODE ODREĐIVANJA HIDROKSILIRANIH METABOLITA POLICIKLIČKIH AROMATSKIH UGLJIKOVODIKA I POLIKLORBIFENILA U BIOLOŠKOME MATERIJALU

Darija KLINČIĆ i Snježana HERCEG ROMANIĆ

Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb, Hrvatska

Primljeno u lipnju 2010.

CrossCheck provjera u listopadu 2010.

Prihvaćeno u prosincu 2010.

U ovome preglednom radu prikazani su postupci analize hidroksiliranih metabolita policikličkih aromatskih ugljikovodika i poliklorbifenila u ljudima i životinjama. Ti metaboliti služe kao biomarkeri izloženosti ljudi i životinja navedenim zagađivalima, no neki od njih i sami posjeduju toksična svojstva. Analiziraju se najčešće u urinu koji je kao uzorak najdostupniji, ali se isto tako mogu analizirati i u ljudskoj, odnosno životinjskoj jetri, žuči i masnom tkivu.

Analiza metabolita aromatskih zagađivala važna je zbog određivanja biodostupnosti aromatskih zagađivala, njihove potencijalne toksičnosti u ljudskom organizmu, ali i zbog toksičnosti samih metabolita. Napredak analitičkih metoda omogućio je simultanu analizu velikog broja metabolita u uzorcima. Nove tehnike ekstrakcije i selektivnije i preciznije kvalitativne i kvantitativne analize omogućuju detekciju vrlo niskih koncentracija metabolita. Pri tome dodatnu prednost imaju jednostavne tehnike koje zahtijevaju manje kemikalija i vremena za analizu.

KLJUČNE RIJEČI: *analitički postupci, biomarkeri, metabolizam, PAH, PCB, toksičnost, zagađivala*

Aromatska zagađivala velik su problem zbog svojih štetnih utjecaja na okoliš, a time i na zdravlje ljudi i životinja. Među najpoznatijim takvim zagađivalima su policiklički aromatski ugljikovodici (engl. *polycyclic aromatic hydrocarbons*; PAH), poliklorbifenili (engl. *polychlorinated biphenyls*; PCB), organoklorovi pesticidi kao heksaklorbenzen (engl. *hexachlorobenzene*; HCB) i 1,1,1-triklor-2,2-di(4-klorfenil)etan (engl. *dichlorodiphenyltrichloroethane*; DDT), poliklorirani dibenzo-*p*-dioksini (engl. *polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins*; PCDD), poliklorirani dibenzofurani (engl. *polychlorinated dibenzofurans*; PCDF), polibromirani difenil eteri (engl. *polybrominated diphenyl ethers*;

PBDE) i polibromirani bifenili (engl. *polybrominated biphenyls*; PBB). Neki od njih kao što su PAH-ovi, PCDD-i i PCDF-ovi nepoželjni su nusprodukti u raznim prirodnim i antropogenim procesima, dok su drugi kao npr. PCB-i dugi niz godina sintetizirani za komercijalnu primjenu. Posljednjih nekoliko desetljeća navedena su zagađivala u žarištu zanimanja i istraživanja zbog svoje toksičnosti i rasprostranjenosti u čitavom okolišu. Njihove razine ispitivane su i dalje se ispituju u uzorcima tla, sedimenta, vode, zraka, biljaka te životinja i ljudi, u kojima se zbog svoje lipofilnosti zadržavaju u tkivima koja sadržavaju mast (jetra, masno tkivo) te u krvi i majčinu mlijeku. Analiza navedenih zagađivala u ljudima i životinjama

nije sama po sebi dovoljna da se utvrdi njihova stvarna biodostupnost i toksičnost, stoga su se istraživači okrenuli analizi njihovih metabolita. Najzastupljeniji su hidroksilirani metaboliti, koji se uglavnom izlučuju kao konjugati glukuronske kiseline urinom ili fecesom, a nađeni su i u krvi, žuči, jetri. Njihova analiza sastoji se od ekstrakcije, po potrebi pročišćavanja ekstrakta te kvalitativne i kvantitativne instrumentne analize. U ovom će preglednom radu biti opisane metode analize hidroksiliranih metabolita PAH-ova i PCB-a.

SVOJSTVA I TOKSIČNOST PAH-OVA I PCB-A

Policiklički aromatski ugljikovodici (PAH) skupina su hidrofobnih organskih spojeva s dva ili više spojenih benzenskih prstena. Neki od pripadnika ove skupine spojeva prikazani su na slici 1.

Izvori PAH-ova su prirodni ili nastali zbog ljudskog djelovanja. U prirodne izvore ubrajaju se šumski požari i vulkanske erupcije, a u antropogene izgaranje fosilnih goriva, ugljena, smeća, komunalnog otpada te istjecanje nafte. Nastali PAH-ovi se zračnim masama mogu prenijeti na velike udaljenosti i njihova depozicija u kiši/snijegu smatra se značajnim izvorom PAH-ova u površinskim vodama. U atmosferi je glavna reakcija PAH-ova s hidroksilnim radikalima pri čemu nastaju hidroksilirani PAH-ovi (OH-PAH) (1).

To su zagađivala prisutna u svim dijelovima okoliša, a toksična su, mutagena i kancerogena (2). Za neke PAH-ove, kao što su benzo[*a*]piren, benzo[*a*]antracen i krizen pokazano je da su uzročnici raka pluća, jednjaka, želuca, debelog crijeva, mokraćnog mjehura, kože i prostate kod ljudi i životinjskih modela. Nadalje, u ljudima i laboratorijskim životinjama nađeno je da PAH-ovi posjeduju reproduktivnu, razvojnu, hemato-, kardio-, neuro- i imunotoksičnost (3).

Ljudi su PAH-ovima izloženi zbog njihove prisutnosti u svim dijelovima okoliša u koje dolaze iz prije navedenih izvora. U većoj su im mjeri izloženi pušači, ali i pasivni pušači. Za opću populaciju glavni putovi unosa su udisanje i hrana. Profesionalno su izloženi radnici koji rade s asfaltom, koksom, u proizvodnji aluminija, željeza i čelika te posljedično, unos putem kože kod njih može postati glavni put unosa. PAH-ovi se preko krvi distribuiraju u tkivima, posebno onim s visokim sadržajem lipida zbog svog nepolarnog karaktera, a metaboliziranjem im se

povećava polarnost i time olakšava izlučivanje iz organizma (3-5).

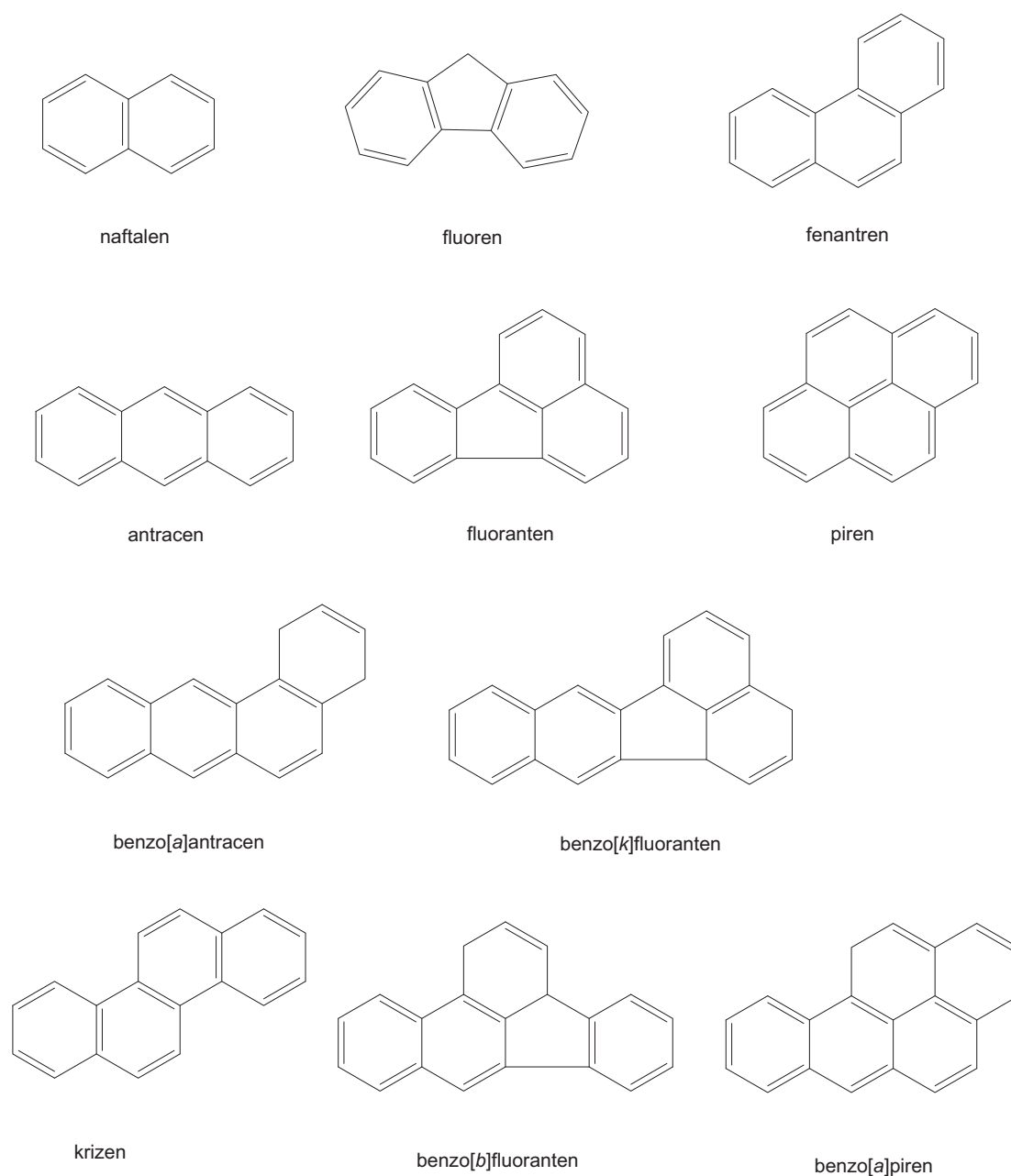
Poliklorbifenili (PCB) sintetski su spojevi opće kemijske formule $C_{12}H_{10-n}Cl_n$ (n - broj klorovih atoma), a strukturna im je formula prikazana na slici 2.

Postoji 209 mogućih izomera i homologa PCB-a koji se nazivaju kongeneri, a najčešće se analizira njih dvadesetak koji su značajni po svojoj toksičnosti i zastupljenosti u okolišu. PCB-i su pripravljeni direktnim kloriranjem bifenila, a nastale smjese imale su poželjna fizikalno-kemijska svojstva kao što su velika kemijska i termička stabilnost i visoke dielektrične konstante te su upotrebljavane u velikom broju tehničkih i komercijalnih primjena (kondenzatori, transformatori, dodaci bojama, lakovima, voskovima) (6-8). Njihova je proizvodnja i primjena zabranjena ili ograničena sedamdesetih godina 20. stoljeća, a danas su njihov izvor odlagališta materijala koji ih sadržavaju ili spaljivanje takvog otpada (9). U ljudski organizam mogu ući istim putovima kao i PAH-ovi: udisanjem, ingestijom i preko kože (7).

Toksičnost kongenera PCB-a je različita i ovisi o njihovoj strukturi. Najtoksičniji su kongeneri koji imaju jedan ili nijedan klorov atom supstituiran u *ortho* položaju, jer takvi kongeneri mogu najlakše poprimiti planarnu konfiguraciju (10). PCB-i se najčešće povezuju s učincima na ljudsko zdravlje koji uključuju promjene u neurološkom razvoju, neuroendokrinu funkciju, ponašanju te narušenoj imunskoj i reproduktivnoj funkciji.

METABOLIZAM PAH-OVA I PCB-A

Nakon ulaska u ljudsko tijelo PAH-ovi podliježu nizu biotransformacijskih procesa. Tijekom faze I metabolizma PAH-ovi se oksidiraju enzimima citokroma P450 i nastaju visokoreaktivni epoksidni intermedijeri, koji se onda reduciraju ili hidroliziraju u OH-PAH-ove s pomoću enzima epoksid hidroksilaze. Izvorni PAH-ovi mogu se i direktno hidroksilirati bez formiranja epoksidnog intermedijera. U fazi II OH-PAH-metaboliti konjugiraju s glukuronskom kiselinom ili sulfatom kako bi se olakšala detoksikacija i izlučivanje preko urina ili stolice. Općenito, metaboliti manjih PAH-ova sa dva do tri prstena pretežno se izlučuju urinom, uglavnom kao konjugati glukuronske kiseline, dok se PAH-ovi veće molekulske mase uglavnom izlučuju fecesom (11). PAH-metaboliti ne samo što su transformacijski produkti, nego neki od njih posjeduju estrogena svojstva, a neki se povezuju s mutagenim i kancerogenim efektima (12).



Slika 1 Strukture nekih PAH-ova

Važno je razumjeti i kinetiku izlučivanja metabolita PAH-ova, a ona se bolje može pratiti kontroliranim prehrambenim studijama nego određivanjem profesionalne izloženosti kod koje se ne može potpuno znati stvarna izloženost i primljena doza. No, iako se kod prehrambenih studija ispitanicima daje jednako pripravljena hrana, uočene su interindividualne razlike u apsorpciji, metabolizmu i/ili izlučivanju metabolita.

Kod životinja većina metabolita izlučuje se u urinu i žuči također kao glukuronidni ili sulfatni konjugati hidrosiliranih metabolita, a PAH-ovi veće molekulske

mase fecesom. Ribe apsorbiraju PAH-ove preko škrge i površine tijela, ali i hranom ili preko zagađenog sedimenta. U radu Johnson-Restrepo i suradnika (13) autori su za analiziranu vrstu ribe pokazali da je brzina biotransformacije PAH-ova manje molekulske mase brža nego onih veće mase, i to u redoslijedu: 3-prstena > 4-prstena > 5-prstena. Unatoč brojnim faktorima koji utječu na koncentraciju OH-PAH-ova u žuči ribe, kao što su vrsta i veličina ribe, okolišni faktori, biodostupnost i koncentracija izvornog PAH-a u sedimentu, nađeno je da se profil izvornih PAH-ova određen u sedimentu odražava u profilu njihovih

metabolita u žuči ribe. Uporabu žučnih metabolita PAH-ova kao biomarkera može omesti činjenica da volumen žuči raste između obroka i žučni mjehur se prazni nakon hranjenja. Kako bi se procijenio taj efekt, može se mjeriti apsorbancija žuči na valnoj duljini od 380 nm ili 660 nm (za biliverdin) ili odrediti proteinska koncentracija žuči. Smatra se da je dobro izmjeriti biliverdin u žuči prilikom uzorkovanja ribe jer još uvijek postoji malo podataka o faktorima koji utječu na rezultate te se još vode rasprave o tome je li potrebno normalizirati rezultate. Također se preporučuje da se žuč uzorkuje jedan ili dva dana nakon hvatanja ribe kako bi se omogućila akumulacija žuči (14).

Hidroksilirani derivati PCB-a (OH-PCB) nastaju istim metaboličkim procesom kao i OH-PAH-ovi. Oksidacija može ići preko PCB-epoksida ili direktnim umetanjem kisika u C_{Ar}-H-vezu. PCB-epoksid može reagirati i s glutationom, a nastali se adukt prevodi u metilsulfonil-derivate (MeSO₂-PCB) (8). OH-PCB lako prelaze u konjugate i izlučuju se, iako su neki od njih nađeni u krvi i jetri ljudi i životinja (15, 16). Omjeri stvaranja metabolita PCB-a ovise o stupnju kloriranosti supstrata, kao i o metaboličkom kapacitetu vrste (17). Većina identificiranih OH-PCB-a ima OH-skupinu u *para*- ili *meta*-položaju, s dva klorova atoma na susjednim ugljikovim atomima. Toksikološki utjecaj OH-PCB-a još nije poznat, no nekoliko studija pokazuje da ti metaboliti mogu imati negativan učinak na ljude te se preporučuje i njihovo uključivanje u procjenu rizika za ljudsko zdravlje (15).

Metabolizmom masti tijekom sezonskoga gladovanja PCB-i pohranjeni u izolacijskoj masti morskih sisavaca kao što su tuljani mogu doći u krv. Niži omjer OH-PCB/PCB nađen u jetri morskih sisavaca u usporedbi s onim nađenim u ljudima može biti zbog smanjenog kapaciteta morskih sisavaca da metaboliziraju PCB-e ili bržega konjugacijskog procesa u fazi II koji brzo iscrpi OH-PCB-e (16). To je potvrđeno i u radu Letchera i suradnika (18), jer u masnom tkivu tuljana nisu pronađeni OH-PCB-i. Isto je zaključeno i za bromirana aromatska zagađivala (18, 19). Viši omjeri OH-PCB/PCB nađeni u krvi morskih sisavaca u usporedbi s onima u njihovoj jetri indiciraju da OH-PCB-metaboliti preferiraju vezanje na krvne proteine nego jetrene masne kiseline i/ili jetrene proteine i enzime. Budući da su morski sisavci kao npr. tuljani smješteni na vrhu morskog hranidbenog lanca i relativno dugo žive (25 do 30 godina), izloženi su organoklorovim spojevima i zbog toga podložni raznim poremećajima i bolestima koje oni uzrokuju (16).

METABOLITI KAO BIOMARKERI IZLOŽENOSTI

Mjerenje PAH-metabolita u urinu omogućuje procjenu izloženosti organizma tim spojevima. Budući da je njihovo vrijeme poluživota u urinu kratko, ta se procjena odnosi samo na nedavnu izloženost (20). Uzorkovanje urina je neinvazivno i lako, a metaboliti u urinu korisni su za određivanje višestrukih putova unosa, pogotovo kada je teško određivanje vanjske izloženosti ili kada skupljanje krvi nije moguće. Schummer i suradnici u svom su radu (20) analizirali 12 OH-PAH-ova u ljudskoj kosi koja je za razliku od urina pogodna za praćenje kronične izloženosti PAH-ovima. No, problem koji se javlja kod interpretacije dobivenih rezultata jest taj što se ne mogu jasno razlikovati metaboliti PAH-ova u kosi nastali metaboličkim procesima u organizmu od onih koji su izvana kontaminirali kosu. Iako se uzorci kose peru organskim otapalima prije daljnje analize, ne može se jednoznačno isključiti prije navedeni problem.

Nekoliko je urinskih markera upotrijebljeno za određivanje izloženosti PAH-ovima. Takozvanom metodom obrnutog metabolizma kojom se metaboliti kemijski reduciraju u izvorne PAH-spojeve i analiziraju tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (engl. *high performance liquid chromatography*; HPLC) uz fluorescencijsku detekciju (engl. *fluorescence detection*; FLD) gube se informacije o pojedinačnim metabolitima. Jongeneelen i suradnici (21) razvili su HPLC-FLD-metodu za određivanje 1-hidroksipirena (1-OHP), glavnog metabolita pirena. Mnoga istraživanja profesionalne i uobičajene okolišne izloženosti PAH-ovima bazirala su se upravo na analizi tog metabolita u urinu. Iako se 1-OHP široko rabi kao urinski biomarker izloženosti PAH-ovima, on daje malo uvida u njihov ukupni metabolizam.

Nakon što je uporaba 1-OHP-a kao biomarkera dovedena u pitanje, počeo je razvoj raznih metoda kojima se analiziraju i drugi hidroksilirani derivati PAH-ova. Nađeno je da 1-hidroksipiren-glukuronid (1-OHPG) puno bolje fluorescira nego 1-OHP te tako predstavlja bolji i osjetljiviji biomarker za određivanje izloženosti pirenu (22). Singh i suradnici (23) razvili su HPLC-metodu za simultano određivanje 1-OHPG, 1-OHP sulfata i slobodnog 1-OHP u urinu ljudi s visokom izloženošću PAH-ovima. Zbog velike profesionalne izloženosti naftalenu, njegovi su metaboliti također određivani (24). Biomonitoring benzo[*a*]pirena od velikog je interesa zbog njegovih kancerogenih efekata, no zbog svoje hidrofobnosti i

molekulske mase, on se uglavnom izlučuje gastrointestinalnim traktom (25).

Razvojem i poboljšanjem analitičkih metoda znanstvenicima je omogućena simultana analiza većeg broja metabolita PAH-ova čime se dobiva opsežnija informacija za procjenu izloženosti PAH-ovima. Najčešće se analiziraju metaboliti PAH-ova s 2 do 5 prstenova.

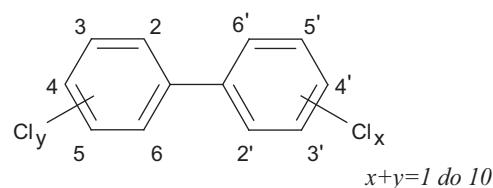
Smith i suradnici u svom su radu (26) simultano određivali 18 OH-PAH-ova (2 do 4 prstena), a Romanoff i suradnici 23 metabolita 9 izvornih PAH-ova (27). Johnson-Restrepo i suradnici (13) analizirali su u žuči ribe 23 OH-PAH-a (2 do 5 prstenova). U navedenim radovima rabila se je tehnika plinske kromatografije uz spektrometar masa.

Strickland i suradnici u svom radu (28) predlažu da se 1-OHPG ili neki drugi PAH-metabolit u urinu mogu rabiti kao biomarkeri ljudske izloženosti ne samo PAH-ovima nego i finim česticama iz zraka koje uzrokuju mnogo zdravstvenih problema, a ujedno su i glavni izvor PAH-ova u onečišćenom zraku.

OH-metaboliti PCB-a koji se rabe kao biomarkeri izloženosti PCB-ima analiziraju se uz izvorne PCB-e (15, 16, 18), a često se uz njih analiziraju i MeSO₂-PCB-metaboliti (8, 17). Pri tome se najčešće rabe tehnike plinske kromatografije uz spektrometar masa ili detektor zahvata elektrona.

PROFILI METABOLITA PAH-OVA I PCB-A

Li i suradnici u svom radu (3) iznose rezultate najveće studije biomonitoringa razina metabolita PAH-ova u populaciji koja nije profesionalno izložena PAH-ovima. Koncentracije OH-PAH-ova u urinu bile su obrnuto proporcionalne njihovoj veličini, što znači da su spojevi veće molekulske mase pokazivali niže koncentracije. Najviše koncentracije nađene su za dva izomera hidroksi-naftalena, slijede tri izomera hidroksi-fluorena, pet izomera hidroksi-fenantrena i 1-OHP. Dva metabolita naftalena, jedinoga dicikličkog aromatskog ugljikovodika, doprinosili su u prosjeku 75 % ukupnoj koncentraciji PAH-metabolita. Nasuprot tomu, 1-OHP-a je bilo oko 40 puta manje, a metaboliti PAH-ova većih molekulskih masa od pirena uglavnom nisu ni detektirani. Ti veliki rasponi u koncentracijama metabolita mogu djelomično biti zbog razlika u izloženosti i izvorima. Za pušače koji nisu profesionalno izloženi PAH-ovima dim cigareta može biti najvažniji



Slika 2 Strukturna formula PCB-a

izvor PAH-ova. U dimu cigarete nađene su najviše razine naftalena, a slijede fluoren, fenantren, piren i benzo[*a*]piren. U zraku i prehrambenim izvorima najzastupljeniji je fenantren. Dodatno objašnjenje za velike razlike u koncentracijama OH-PAH-ova u urinu između metabolita malih i velikih molekulskih masa može biti njihov različit biološki put. Molekulska struktura i masa PAH-a može utjecati na učinkovitost apsorpcije, biodostupnost, metabolički put i biološke efekte. Djeca su često glavna ciljana populacija u ispitivanjima utjecaja okoliša na zdravlje zbog toga što su u usporedbi s odraslima osjetljivija, imaju veći unos po jedinici tjelesne mase i veću izloženost okolišnim zagađivačima zbog svog ponašanja, kao što su aktivnosti na tlu ili u blizini tla i obrazac "ruka-usta". Kod djece u dobi od 6 do 11 godina nađene su značajno više koncentracije većine učestalo detektiranih OH-PAH-ova u usporedbi s koncentracijama kod adolescenata (od 12 do 19 godina) i odraslih (20 godina i stariji). Najveća je razlika nađena za 1-OHP čije su razine bile 64 % više nego kod adolescenata i 85 % više nego kod odraslih.

Što se tiče razlika u razinama OH-PAH-ova između muškaraca i žena, u većini studija nije nađena značajna razlika za 1-OHP, dok su u studiji (3) nađene značajno više razine 1- i 2-OH-naftalena i 1-OH-fenantrena kod žena. Također su nađene neke razlike među pripadnicima različitih rasnih/etničkih skupina.

Profili OH-PCB-a razlikuju se između individua zbog selektivnog zadržavanja ili selektivnog stvaranja metabolita te razlika u izloženosti PCB-ima. U krvi ljudi identificirano je približno 40 različitih OH-PCB-a, a najzastupljeniji su metaboliti PCB-a 105, 118, 138, 153 i 187. Neka su istraživanja pokazala da je 4-OH-PCB-187 primarni OH-PCB-metabolit u uzorcima ljudske krvi, dok su druga našla da je to 4-OH-PCB-107, 4-OH-PCB-146 u većini je studija drugi najzastupljeniji metabolit (15).

Analizom uzoraka jetre tuljana kao najzastupljeniji kongener nađen je 4-OH-PCB-107, koji uz 3-OH-PCB-153, 4-OH-PCB-146, 3'-OH-PCB-138 i 4-OH-PCB-187 čini (66 do 81) % ukupne koncentracije OH-PCB-a (16).

ANALIZA OH-PAH-OVA I OH-PCB-A

Priprava uzoraka za analizu

Uzorci urina čuvaju se do analize u zamrzivaču, najčešće na temperaturi od -20 °C ili nižoj. Prije same analize neki autori navode podešavanje pH urina s klorovodičnom kiselinom na pH=5 (24, 29). Zatim se dodaje pufer (najčešće acetatni; pH 5 do 5,5) kako bi se pH-vrijednost poderala na optimalne uvjete rada enzima za konjugaciju. Kako bi se glukuronski i sulfatni konjugati hidroksiliranih metabolita preveli natrag u hidroksilirane derivate, provodi se njihova enzimski hidroliza dodatkom smjese β -glukuronidaze i aril-sulfataze. Smjesa se inkubira od 2 h do 18 h, najčešće pri 37 °C uz miješanje (3, 5, 11, 24-27, 29, 30), a zatim se prelazi na ekstrakciju analita.

Žuč se skuplja bušenjem žučnog mjehura iglom spojenom s injekcijskom špricom i pohranjuje u tamnoj staklenoj posudi (14). Uzorci žuči i tkiva prije analize također se čuvaju pri niskim temperaturama (najčešće -20 °C). Uzorci tkiva prije same se ekstrakcije homogeniziraju.

Ekstrakcija

Prvi korak u analizi složenih bioloških uzoraka, kao i uzoraka okoliša jest odvajanje analita od matrice uzorka, a taj bi postupak trebao biti jednostavan, uz što manje gubitke analita i što manji utrošak kemikalija i vremena. Te je zahtjeve teško postići, pa se uvijek istražuju nove metode ekstrakcije koje bi ih trebale zadovoljiti.

Kod analize bioloških uzoraka preporučuje se upotreba unutarnjeg standarda kako bi se analit što točnije kvantificirao. Dodavanjem standarda u uzorak prije ekstrakcije smanjuje se utjecaj matrice uzorka i prisutnih interferencija na rezultat analitičkog povrata koji daje uvid u kvalitetu same metode. Uporaba unutarnjih standarda postala je praksa i nezaobilazan dio analize bioloških uzoraka.

Ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *solid-phase extraction*; SPE) metoda je ekstrakcije kod koje se odvajanje analita od matrice uzorka temelji na selektivnom vezanju analita na sorbens smješten u maloj koloni, nakon čega slijedi desorpcija ispiranjem odgovarajućim otapalom. To je često, ako ne i najčešće rabljena metoda ekstrakcije OH-PAH-ova iz uzoraka urina. Primjenjuje se kromatografija obrnutih faza (pokretna faza polarnija od nepokretne) na kolonama s vezanim C_{18} -skupinama (kondicionirane metanolom i zatim vodom). Nakon nanošenja uzorka kolona se

ispire vodom i/ili smjesom vode i metanola, a nakon toga metaboliti PAH-ova se eluiraju s kolone s pomoću metanola (5, 25, 30, 31).

Chetiyankornkul i suradnici (24) prikazali su malo izmijenjenu metodu gdje su nakon ispiranja i sušenja kolonu s vezanom C_{18} skupinom spojili na kolonu *Sep-Pak Silica Plus* koja je bila kondicionirana i isprana *n*-heksanom, a metaboliti su desorbirani smjesom ψ (*n*-heksan/etil acetat)=9:1, kroz dvije kolone.

U radu Lee i suradnika (22) prije HPLC-analize uzroci su direktno nanoseni na kolone koje su isprane vodom, a analit je desorbiran s 40 %-tnim acetonitrilom u vodi.

Romanoff i suradnici (27) razvili su automatiziranu metodu SPE za određivanje OH-PAH-ova na instrumentu *RapidTrace® SPE*. Kolone su kondicionirane metanolom i vodom. Uzorci su nanoseni na kolone koje su isprane najprije vodom, a zatim smjesom ψ (metanol/acetatni pufer)=4:6. Sorbens je osušen strujom dušika te je analit desorbiran diklormetanom.

Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *solid-phase microextraction*; SPME) metoda je koja se temelji na akumulaciji analita iz različitih uzoraka na sorbensu nanosenom na vlakno od taljenog silicijeva dioksida bez upotrebe organskog otapala. Metoda se može primjenjivati tako da vlakno bude uronjeno u tekući uzorak, izloženo parama analita iznad uzorka ili uronjeno u vodenu suspenziju krutog uzorka. Nakon ekstrakcije SPME vlakno se unosi u injektor plinskog kromatografa gdje se zbiva termička desorpcija analita s vlakna te daljnje odvajanje i analiza. Prednosti ove metode su brzina i jednostavnost, neuporaba organskih otapala, potrebni mali volumeni uzoraka te mogućnost primjene u *in situ* analizama.

U radu Smitha i suradnika (26) za ekstrakciju polarnih OH-PAH-ova rabi se polarni sorbens - poliakrilat. Pripravljeni uzorak urina miješan je i zagrijavan na 40 °C. SPME-vlakno stavljeno je u tekući uzorak i ondje zadržano 45 minuta, a nakon završene ekstrakcije sušeno nekoliko desetaka sekundi kako bi se uklonili mogući ostaci tekućine. Daljnje deriviranje potrebno prije instrumentne analize također je izvedeno na samom vlaknu, a to je postignuto *headspace* tehnikom s pomoću *N*-metil-*N*-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (MSTFA).

Ekstrakcija organskim otapalom ili ekstrakcija tekuće-tekuće (engl. *liquid-liquid extraction*; LLE) metoda je odvajanja sastojaka smjese na temelju njihove različite topljivosti u dvije tekućine koje se

ne miješaju. Nedostaci ove metode su upotreba velikih volumena otapala, utrošak vremena te mogućnost nastanka emulzije.

Ova metoda ekstrakcije također se rabila u analizi OH-PAH-ova uz pentan kao organsko otapalo u koje se prevode analiti. Ekstrakcija se najčešće ponavlja 2 do 3 puta, a dobiveni ekstrakti spajaju i zatim dalje analiziraju (11, 13).

Ova metoda ekstrakcije upotrebljavala se i za ekstrahiranje OH-PCB-a (16, 19) različitim smjesama otapala.

Itoh i suradnici objavili su dva rada s metodama za analizu OH-PAH-ova u vodi. Prva metoda (1) sastoji se od *in situ* deriviranja OH-metabolita s anhidridom octene kiseline kako bi se poboljšala učinkovitost ekstrakcije i GC-analize. Spojevi su ekstrahirani s pomoću sorbensa (polidimetilsiloksan - PDMS) nanesenog na magnet za miješanje (engl. *Stir-bar Sorptive Extraction*; SBSE). Metoda se temelji na uspostavljanju ravnoteže između koncentracija analita otopljenog u uzorku i sorbiranog na sorbensu. Zbog većeg kapaciteta sorpcije pokazuje veću efikasnost ekstrakcije u odnosu na SPME. Nakon ekstrakcije magnetič je stavljen u cijev za termalnu desorpciju (TD). Desorbirani OH-PAH-ovi su kriogeno zarobljeni u PTV (engl. *programmed temperature vaporizing*) injektoru i zatim premješteni na GC-kolonu zagrijavanjem od -80 °C do 300 °C. U drugom radu (32) deriviranje OH-PAH-ova izvedeno je direktno u TD-cijevi uz N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamid (BSTFA). U TD-cijev su uzorci vode naneseni na TENAX koji se sastoji od zrnaca polimera 2,6-difenil-*p*-fenilena te je pogodan za sorpciju organskih spojeva iz zraka ili uzoraka vode. Podnosi visoke temperature (>375 °C) i kemijski je inertan. TENAX je prethodno kondicioniran metanolom i vodom. Daljnja desorpcija i analiza bile su identične kao u prethodnom radu. Druga metoda pokazala se boljom zbog boljeg odvajanja analita i bolje ponovljivosti rezultata.

“Blue rayon” (umjetna svila) ili bakrov ftalocijanin trisulfonat na celuloznoj podlozi selektivni je sorbens za policikličke spojeve koji imaju tri ili više spojenih prstenova. Metoda se temelji na formiranju kompleksa između planarne površine bakrova ftalocijanina i planarne površine policikličkog spoja. Uzorci urina nakon enzimske hidrolize tretirani su s “blue rayon” 24 h uz miješanje. Nakon što je izvađena, “blue rayon” je isprana vodom, osušena i analit je ultrazvučno desorbiran s pomoću metanola. Eluat je zatim uparen do suha kako bi bio otopljen za daljnju analizu (29).

Dosad navedene metode ekstrakcije odnosile su se na analizu tekućih uzoraka. U krute uzorke u kojima se analiziraju metaboliti aromatskih zagađivala ubrajaju se uzorci tkiva kao što su masno tkivo i jetra, a dvije metode koje se rabe u svrhu ekstrakcije jesu ekstrakcija u aparaturi po Soxhletu i ekstrakcija uz povišeni tlak i temperaturu.

U radu Fernandez i suradnika (15) metaboliti PCB-a analizirani su u masnom tkivu žena koje su išle na operacije. Uzorci su ekstrahirani u aparaturi po Soxhletu toluenom 18 h do 24 h, a metoda se temelji na kontinuiranoj ekstrakciji analita otapalom koje cirkulira kroz aparaturu. Nedostaci ekstrakcije u aparaturi po Soxhletu jesu veliki volumeni otapala i dugo vrijeme ekstrakcije.

Ekstrakcija uz povišeni tlak i temperaturu (engl. *pressurized liquid extraction*; PLE) uhodana je tehnika pripreme uzoraka za ekstrakciju PCB-a i mnogih drugih spojeva iz mnoštva okolišnih uzoraka uključujući sediment, biljke i tkiva. PLE kombinira povišene temperature i visoke tlakove kako bi postigla brzu, učinkovitu i automatiziranu ekstrakciju analita iz čvrste matrice uzorka. Visoka temperatura (obično 100 °C) povećava difuziju otapala u matricu uzorka zbog smanjenja viskoznosti otapala, pomaže u prekidanju interakcija između analita i matrice, povećava topljivost i prijenos mase. Uporaba tlakova između 6,9 MPa i 17,2 MPa omogućuje ekstrakcije na temperaturama iznad vrelišta otapala i olakšava izdvajanje analita. Uz to, PLE reducira vrijeme ekstrakcije, omogućuje automatizaciju i zahtijeva manje otapala u usporedbi s tradicionalnom ekstrakcijom po Soxhletu. PLE ne samo da omogućuje efikasnu ekstrakciju analita iz različitih uzoraka nego i *in situ* pročišćavanje ekstrakta. To značajno smanjuje iscrpno pročišćavanje nakon ekstrakcije kao što su adsorpcijska ili gel-propusna kromatografija te omogućuje automatizaciju pročišćavanja. Uklanjanje lipida i drugih koekstrahirajućih materijala nakon ekstrakcije poseban je izazov u analizama PCB-a i metabolita PCB-a. *In situ* uklanjanje tih materijala može se postići postavljanjem Florisila ili silikagela, koji zadržavaju masti, na dno PLE-ćelije čime se sprečava ispiranje koekstrahirajućih materijala s PLE-ćelije.

U radu Kania-Korwel i suradnika (8) razvijena je PLE-metoda koja omogućuje ekstrakciju i *in situ* pročišćavanje PCB-a, MeSO₂-PCB-a i OH-PCB-a iz malog uzorka tkiva (jetra štakora). Uzorci su ekstrahirani sa smjesom ψ (heksan:diklormetan:metanol)=48:43:9 na 100 °C i tlaku 10 MPa, a Florisil

je rabljen za pročišćavanje. Ekstrakti tkiva razdvojeni su u zasebne frakcije analiziranih skupina spojeva s pomoću njihovih različitih fizikalno-kemijskih svojstava. U usporedbi s utemeljenom referentnom metodom, koja uključuje tri ekstrakcijska koraka s različitim kombinacijama otapala i dodatna pročišćavanja, PLE-metoda dala je jednako dobre rezultate.

Pročišćavanje ekstrakata

SPE omogućuje istodobno ekstrakciju analita iz uzorka i uklanjanje interferencija, no kod nekih drugih metoda potrebno je pročišćavanje nakon ekstrakcije. Kod analize OH-PAH-ova u urinu takvo se pročišćavanje katkad provodi imunoafinitetnom kromatografijom (engl. *immunoaffinity chromatography*; IAC). Afinitetna kromatografija je metoda tekućinske kromatografije koja se temelji na specifičnom prepoznavanju među određenim biološkim vrstama (npr. antitijelo-antigen, hormon-receptor) između kojih nastaju specifične, ali reverzibilne veze. Sam postupak sastoji se u vezanju odgovarajućeg liganda za čvrsti nosač te zatim propuštanju otopine uzorka kroz kolonu pri čemu dolazi do stvaranja veza između liganda i analita, dok ostali sastojci prolaze bez zadržavanja. Analit se s kolone uklanja najčešće primjenom druge pokretne faze.

Lee i suradnici (22) su nakon ekstrakcije na čvrstoj fazi ekstrakte uzoraka urina pročistili na imunoafinitetnim kolonama punjenim sefarozum 4B aktiviranom s CNBr i spregnutom s monoklonskim antitijelom 8E11. Ekstrakti su nanoseni na kolonu kroz koju je zatim propušten fosfatni pufer (engl. *phosphate buffered saline*; PBS) i 25 %-tni metanol u puferu. Frakcija 1-OHPG je s kolone isprana 55 %-tnim metanolom u puferu. Nađeno je da su HPLC-kromatogrami puno čišći i bez interferencija kad se uzorci, osim kroz SPE-kolone, propuste i kroz imunoafinitetne kolone.

U radu Mazeas i Budzinski (31) uveden je dodatni korak pročišćavanja na NH_2 kolonama kod analize žuči, a koji je nuždan za uklanjanje pigmenata žuči prije GC-MS-analize. Ispiranje s kolone izvedeno je smjesom ψ (metanol/metilen klorid)=20:80.

Za razliku od analize OH-PAH-ova, kod analize OH-PCB-a pročišćavanje nakon ekstrakcije je nužno i provodi se gotovo bez iznimke. U radu Parka i suradnika (16) pročišćavanje nakon ekstrakcije provedeno je najprije mućkanjem s koncentriranom H_2SO_4 , a zatim i adsorpcijskom kromatografijom na stupcu kiselog i aktiviranog silikagela kao sorbensa

[eluensi: *n*-heksan i smjesa ψ (DCM/*n*-heksan)=1:1]. Pročišćavanje nakon ekstrakcije na koloni silikagela modificiranog s H_2SO_4 , ali uz ispiranje *n*-heksanom provedeno je u radu Fernandez i suradnika (15).

Još jedna metoda pročišćavanja, koja se najviše rabi za pročišćavanje uzoraka bogatih mastima, jest gel-propusna kromatografija (engl. *gel permeation chromatography*; GPC) kojom se spojevi odvajaju na temelju razlike u molekulskim masama. Takvo pročišćavanje uz smjesu ψ (diklormetan/*n*-heksan)=1:1 kao pokretnu fazu primijenjeno je kod analize uzoraka tkiva u radu Haraguchi i suradnika (17).

Kvalitativna i kvantitativna analiza

Metode analize metabolita aromatskih zagađivala mogu se podijeliti u dvije skupine; prva uključuje metode mjerenja fluorescencije metabolita na određenim valnim duljinama ekscitacije/emisije, a druga uključuje metode kromatografskog razdvajanja tekućinskom ili plinskom kromatografijom uz odgovarajuću detekciju.

Metode mjerenja fluorescencije temelje se na ekscitaciji molekula čiji emisijski spektri daju informacije za kvalitativnu i kvantitativnu analizu, a posebno je pogodna za spojeve koji sadržavaju aromatske prstene. Mnogi PAH-ovi i njihovi metaboliti pokazuju jaka i karakteristična fluorescencijska svojstva. U ovu skupinu metoda analize ubrajaju se dvije metode: FF (engl. *fixed wavelength fluorescence*) i SFS (engl. *synchronous fluorescence spectroscopy*). FF-metoda temelji se na direktnom fluorimetrijskom određivanju metabolita PAH-ova, i to najčešće u žuči. Nije potrebna ekstrakcija, nego se žuč jednostavno razrijedi etanolom ili vodom i podvrgne FF-detekciji. Jednostavnost metode omogućuje jeftiniju i bržu analizu velikog broja uzoraka u usporedbi s kromatografskim metodama (33).

Za simultano određivanje većeg broja fluorescirajućih vrsta u smjesi prikladna je SFS-metoda. Ni ona ne zahtijeva prethodno razdvajanje analita, a spektar se dobiva simultanim pretraživanjem i ekscitacijskog i emisijskog monokromatora između kojih se održava fiksna razlika u valnoj duljini (34).

Objekti su metode rabljene za analizu PAH-metabolita u urinu rakova te su se pokazale brzim, jeftinim i nedestruktivnim metodama pogodnima za biomonitoring i *in situ* analize. Objekti su dale vrlo slične rezultate, a kvantitativno određivanje metabolita prema 1-OHP-u također je dalo slične rezultate i dobru korelaciju između dvije metode. SFS-metoda ima prednost pred FF zbog toga što je potrebno samo jedno

mjerjenje da bi se pretražili različiti spojevi te se na taj način štedi vrijeme i novac u usporedbi s FF-metodom (35).

Svakako najčešća tehnika analize hidroksiliranih metabolita je tekućinska kromatografija uz fluorescencijsku detekciju ili detekciju spektrometrijom masa (engl. *mass spectroscopy*; MS) te plinska kromatografija visokog razlučivanja (engl. *high resolution gas chromatography*; HRGC) uz spektrometar masa ili detektor zahvata elektrona (engl. *electron capture detector*; ECD). Prednost HPLC-a je to što ne zahtijeva prethodno deriviranje kao što je slučaj kod plinske kromatografije, čime se izbjegava dodatan korak u pripravi uzorka i time smanjuje mogućnost pogreške.

Razdvajanje polarnih metabolita aromatskih zagađivala omogućava tekućinska kromatografija obrnutih faza (pokretna faza polarnija od nepokretne). Najčešće se rabe analitičke kolone s nepolarnom nepokretnom fazom C₁₈ ili C₁₆, duljine kolona su najčešće 125 mm, 150 mm ili 250 mm, unutarnji promjeri 2 mm ili 4,6 mm, a veličina čestica nepokretne faze 3 μm ili 5 μm. Također je u većini slučajeva u upotrebi i pretkolona koja je istog sastava kao i kolona, ali manjih dimenzija, a služi za zaštitu glavne kolone. Ispiranje analita je gotovo u većini slučajeva gradijentno, a kao pokretne faze najčešće se rabe smjese polarnih organskih otapala (metanola ili acetonitrila) i vode ili vodenog pufera (najčešće fosfatnog pufera različitih pH-vrijednosti) (22, 24, 25, 29).

Ako se rabe fluorescencijski detektori, određivanje različitih metabolita zbiva se tijekom određenog vremena na određenim ekscitacijskim i emisijskim valnim duljinama (25).

Toriba i suradnici u svom su radu (29) rabili dvije kolone. Prva je bila kolona s vezanom C₁₆-skupinom s koje je ispiranje analita bilo izokratno sa smjesom ψ (acetonitril/fosfatni pufer pH=7)=55:45. Metaboliti koji se nisu razdvojili na prvoj koloni razdvojeni su na silikagel koloni spregnutoj s β-ciklodekstranom s koje je ispiranje bilo izokratno sa smjesom ψ (metanol/voda)=57:43. Upotrijebljena su i dva fluorescencijska detektora.

Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (engl. *ultra-performance liquid chromatography*; UPLC) pokazuje veću djelotvornost od HPLC-a. UPLC rabi manje (<2 μm) čestice punila kolone i njezine dimenzije omogućuju uporabu viših tlakova (do 96 MPa). Stoga UPLC pokazuje bolje razlučivanje, brže analize i poboljšanu osjetljivost određivanja u usporedbi s HPLC-om (36).

Lee i suradnici (22) usporedili su HPLC i SFS-metode analize OH-PAH-ova nakon SPE-ekstrakcije i pročišćavanja na imunoafinitetnim kolonama. Te dvije metode pokazale su odličan koeficijent korelacije. IAC-SFS-metoda jednostavna je i brza metoda analize jer se uzorci mogu simultano nanositi na imunoafinitetne kolone, a i neuporabom HPLC-a izbjegava se upotreba otapala i kolona. Iako obje metode daju dobre rezultate, zbog svoje brzine i ekonomičnosti IAC-SFS je prikladnija za opsežne epidemiološke studije ljudi s niskom izloženosti PAH-ovima.

Najprikladnija i daleko najupotrebljavanija metoda detekcije ne samo kod LC nego i kod GC, svakako je detekcija spektrometrijom masa visokog razlučivanja (engl. *high resolution mass spectrometry*; HRMS) uz praćenje odabranih iona (engl. *selected ion monitoring*; SIM) uporabom izotopnog razrjeđenja (engl. *isotope dilution*) za točnu identifikaciju i kvantifikaciju pikova. Tu metodu čini poželjnom podesiva selektivnost spektrometrije masa koja se postiže mogućnošću promatranja specifičnih karakterističnih iona u spektru sastojaka u kombinaciji s usporedbom vremena zadržavanja kod kromatografije. Upotreba izotopnog razrjeđenja s komercijalno dostupnim ¹³C₁₂ obilježenim unutarnjim standardima omogućuje točnu identifikaciju pika na temelju usporedbe vremena zadržavanja između običnih (¹²C) i obilježenih (¹³C) sastojaka, kao i točnu kvantifikaciju usporedbom visina/površina pikova (8).

Najčešća tehnika ionizacije je ionizacija elektronima (engl. *electron impact*; EI) jer nastaju i molekularni ion i ioni karakterističnih fragmenata što omogućuje određivanje relativne molekulske mase i strukture molekule. Velika je prednost ove metode ponovljivost spektara masa analiziranih spojeva što omogućuje identifikaciju nepoznatih spojeva usporedbom sa spektrima pohranjenim u bazama podataka. No, u nekim slučajevima EI zbog jake fragmentacije nije dovoljno osjetljiva za određivanje vrlo niskih koncentracija sastojaka u uzorcima okoliša. Tada se primjenjuju blaži načini ionizacije analita kao što je kemijska ionizacija (CI) kod koje je fragmentacija manja i može se kontrolirati izborom plina reagensa i koja ovisno o vrsti nastalih iona može biti pozitivna (PCI) ili negativna (NCI) (37).

Odabir analizatora u spektrometru masa ovisi o problemu koji se mora riješiti: trostruki kvadrupol odličan je za osjetljivu kvantifikaciju i kvalitativne analize, ionska stupica je posebno dobra za rješavanje struktura, dok je analizator koji mjeri vrijeme leta (engl.

time of flight; TOF) i kvadrupol-TOF (hibridna vrsta MS-a) idealan za određivanje molekulskih formula nepoznatih spojeva i za svrhe pretraživanja (38).

Prilikom MS-detekcije hidroksiliranih metabolita PAH-ova i PCB-a za ionizaciju uzorka najčešće se rabe EI (13, 26, 27, 31, 32), NCI uz metan (16, 20) ili argon kao plin reagens, a za tekuće uzorke ionizacija elektroraspršenjem (engl. *electrospray ionisation*; ESI) (5, 12, 39) i kemijska ionizacija pri atmosferskom tlaku (engl. *atmospheric pressure chemical ionisation*; APCI) (36).

Povezivanje tekućinske kromatografije sa spektrometrijom masa bilo je problem zbog toga što je bilo teško održati vakuum u spektrometru masa pri uvođenju tekuće pokretne faze. Razvojem različitih metoda ionizacije (APCI, ESI) koje omogućuju djelomično uvođenje tekuće faze i uklanjanje suviška otapala problem je riješen i LC-MS je odličan analitički alat u analizi polarnih spojeva u tekućim uzorcima. Eliminira potrebu za deriviranjem OH-PAH-ova za plinsku kromatografiju i nadilazi manjak specifičnosti u metodama koje se baziraju na fluorescencijskoj detekciji.

Tekućinska kromatografija povezana s tandemnom spektrometrijom masa (LC-MS/MS) najveći je napredak u analitičkoj kemiji u posljednjem desetljeću i omogućuje brzo i selektivno određivanje mnoštva spojeva u biološkim uzorcima. Uporabljena je za analizu 13, odnosno 16 OH-PAH-ova u uzorcima urina u radovima Xu i suradnika (39) te Onyemauwa i suradnika (5). U obje metode razdvajanje je sastojaka provedeno na koloni s vezanom C₁₈-skupinom uz gradijentno ispiranje metanolom. Kao metoda ionizacije upotrijebljena je ionizacija elektroraspršenjem u negativnom načinu rada, a analizator masa bio je trostruki kvadrupol.

Plinska kromatografija druga je najupotrebljavanija metoda razdvajanja u analizama metabolita PAH-ova i PCB-a zbog svoje brzine i učinkovitosti te dobrog odvajanja izomernih metabolita. Međutim, zbog problema s kromatografskim odvajanjem zbog njihove polarnosti te nastanka širokih i asimetrično razvučenih pikova nužno je deriviranje metabolita u manje polarne derivate (27). Deriviranje se provodi alkilirajućim ili sililirajućim agensima kao što su MSTFA i diazometan. Kapilarne kromatografske kolone koje se najčešće rabe kao selektivnu tekućinu sadržavaju polifenilmetilsiloksan s 5 % fenila (komercijalna imena DB-5MS, HP-5MS), duljine su im 25 m ili 30 m, unutarnji promjer 0,25 mm, a debljina filma 0,25 µm (13, 20, 26, 27, 31). Kao plin

nosilac upotrebljava se najčešće He. Temperaturni program zagrijavanja kolone se najčešće sastoji od nekoliko koraka u kojima se temperatura povisuje, s time da je najčešće u početnom koraku porast temperature najbrži.

Detektor zahvata elektrona najupotrebljavaniji je detektor u analizi organoklorovih spojeva za koje je osjetljiv i selektivan, a osjetljivost odziva raste s brojem klorovih atoma u molekuli. Najčešće je u upotrebi ⁶³Ni-detektor. Osim u analizi izvornih PCB-kongenera, rabi se i u analizama OH-PCB-a (8, 17).

Opsežna dvodimenzionalna plinska kromatografija (engl. *comprehensive two-dimensional chromatography*) ili GCxGC pokazala se kao moćna i pouzdana metoda za povećavanje kapaciteta razdvajanja u složenim uzorcima u odnosu prema konvencionalnim GC-tehnikama. U ovoj metodi opsežno, kontinuirano odvajanje svih sastojaka postiže se na dvije direktno spojene kolone različitih dimenzija, različite polarnosti i time i različite selektivnosti.

Iako se u većini radova rabi spektrometrija masa za određivanje OH-PAH-ova nakon plinske kromatografije, uporabom GCxGC postiže se dobra rezolucija, pa se može rabiti plamenoionizacijski detektor (engl. *Flame Ionization Detector*; FID) za kvalitativnu i kvantitativnu analizu OH-PAH-ova u biološkim uzorcima, kao u radu Amorim i suradnika (11). Prva kolona u GCxGC-sustavu bila je DB-5 dimenzija 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, a druga RTX-50 (polifenilmetilsiloksan s 50 % fenila) dimenzija 1 m x 0,1 mm x 0,1 µm.

Kapilarna elektroforeza razdvaja sastojke ovisno o razlici u brzini gibanja iona u električnom polju. Kapilarna elektrokromatografija hibrid je kapilarne elektroforeze i HPLC-a koji omogućava razdvajanje i nabijenih i nenabijenih vrsta. Micelarna elektrokinetička kapilarna kromatografija (MECC) neutralne sastojke međusobno odvaja dodatkom površinski aktivnih spojeva koji prave micle (npr. natrijev dodecilsulfat, SDS). MECC, uz dodatak γ-ciklodekstrina za postizanje bolje selektivnosti, istraživana je i za moguću primjenu u analizi OH-metabolita PAH-ova (40, 41). Pri tome se za detekciju rabio detektor koji mjeri fluorescenciju induciranu laserom.

ZAKLJUČAK

Prikazane su metode ekstrakcije, pročišćavanja te kvalitativne i kvantitativne analize koje se rabe za

određivanje i kvantifikaciju hidroksiliranih metabolita PAH-ova i PCB-a. Neke od njih su već u širokoj primjeni, dok se druge tek najavljuju i za čiju su širu primjenu potrebna daljnja ispitivanja njihovih mogućnosti. Metoda koja pokazuje izvrsne mogućnosti analize polarnih spojeva u biološkim uzorcima i koja se nameće kao vodeća svakako je tekućinska kromatografija povezana s tandemnom spektrometrijom masa. Danas se teži sve bržim, jednostavnijim, jeftinijim i po mogućnosti automatiziranim metodama ekstrakcije i pročišćavanja te pouzdanim i osjetljivim metodama detekcije i identifikacije analita.

Zahvala

Rad je napisan u okviru projekta „Organska onečišćenja u okolišu - raspodjela, interakcije, izloženost ljudi” (br. 022-0222882-2896) koji podupire Ministarstvo znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske.

LITERATURA

1. Itoh N, Tao H, Ibusuki T. Optimization of aqueous acetylation for determination of hydroxy polycyclic aromatic hydrocarbons in water by stir bar sorptive extraction and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 2005;535:243-50.
2. Haritash AK, Kaushik CP. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *J Hazard Mater* 2009;169:1-15.
3. Li Z, Sandau CD, Romanoff LC, Caudill SP, Sjodin A, Needham LL, Patterson Jr. DG. Concentration and profile of 22 urinary polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in the US population. *Environ Res* 2008;107:320-31.
4. Strickland P, Kang D, Sithisarankul P. Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in urine as biomarkers of exposure and effect. *Environ Health Perspect* 1996;104:927-32.
5. Onyemauwa F, Rappaport SM, Sobus JR, Gajdošova D, Wu R, Waidyanatha S. Using liquid chromatography-tandem mass spectrometry to quantify monohydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine. *J Chromatogr B* 2009;877:1117-25.
6. De Voogt P, Brinkman UATH. Production, properties and usage of polychlorinated biphenyls. U: Kimbrough RD, Jensen AA, urednici. Halogenated biphenyls, terphenyls, naphthalenes, dibenzodioxins and related products. Amsterdam: Elsevier; 1989. str. 3-45.
7. Danse IR, Jaeger RJ, Kava R, Kroger M, London WM, Lu FC, Maickel RP, McKetta JJ, Newell GW, Shindell S, Stare FJ, Whelan EM. Position paper of the American Council on Science and Health: Public health concerns about environmental polychlorinated biphenyls (PCBs). *Ecotoxicol Environ Safety* 1997;38:71-84.
8. Kania-Korwel I, Zhao H, Norstrom K, Li X, Hornbuckle KC, Lehmler H-J. Simultaneous extraction and clean-up of polychlorinated biphenyls and their metabolites from small tissue samples using pressurized liquid extraction. *J Chromatogr A* 2008;1214:37-46.
9. Borlakoglu JT, Haegle KD. Comparative aspects on the bioaccumulation, metabolism and toxicity with PCBs. *Comp Biochem Physiol* 1991;3:327-38.
10. Weiss B. Pesticides as a source of developmental disabilities. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 1997;3:246-56.
11. Amorim LCA, Dimandja J-M, de Lourdes Cardeal Z. Analysis of hydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons in urine using comprehensive two-dimensional gas chromatography with a flame ionization detector. *J Chromatogr A* 2009;1216:2900-4.
12. Van de Wiele TR, Peru KM, Verstraete W, Siciliano SD, Headley JV. Liquid chromatography-mass spectrometry analysis of hydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons, formed in a simulator of the human gastrointestinal tract. *J Chromatogr B* 2004;806:245-53.
13. Johnson-Restrepo B, Olivero-Verbel J, Lu S, Guette-Fernández J, Baldiris-Avila R, O'Byrne-Hoyos I, Aldous KM, Addink R, Kannan K. Polycyclic aromatic hydrocarbons and their hydroxylated metabolites in fish bile and sediments from coastal waters of Colombia. *Environ Pollut* 2008;151:452-9.
14. Vuorinen PJ, Keinänen M, Vuontisjärvi H, Baršien J, Broeg K, Förlin L, Gercken J, Kopecka J, Köhler A, Parkkonen J, Pempkowiak J, Schiedek D. Use of biliary PAH metabolites as a biomarker of pollution in fish from the Baltic Sea. *Mar Pollut Bull* 2006;53:479-87.
15. Fernandez MF, Kiviranta H, Molina-Molina JM, Laine O, Lopez-Espinosa MJ, Vartiainen T, Olea N. Polychlorinated biphenyls (PCBs) and hydroxy-PCBs in adipose tissue of women in Southeast Spain. *Chemosphere* 2008;71:1196-205.
16. Park J-S, Kalantzi OI, Kopec D, Petreas M. Polychlorinated biphenyls (PCBs) and their hydroxylated metabolites (OH-PCBs) in livers of harbor seals (*Phoca vitulina*) from San Francisco Bay, California and Gulf of Maine. *Mar Environ Res* 2009;67:129-35.
17. Haraguchi K, Koga N, Kato Y. Comparative metabolism of polychlorinated biphenyls and tissue distribution of persistent metabolites in rats, hamsters, and guinea pigs. *Drug Metab Dispos* 2004;33:373-80.
18. Letcher RJ, Gebbink WA, Sonne C, Born EW, McKinney MA, Dietz R. Bioaccumulation and biotransformation of brominated and chlorinated contaminants and their metabolites in ringed seals (*Pusa hispida*) and polar bears (*Ursus maritimus*) from East Greenland. *Environ Int* 2009;35:1118-24.
19. Bennett ER, Ross PS, Huff D, Alae M, Letcher RJ. Chlorinated and brominated organic contaminants and metabolites in the plasma and diet of a captive killer whale (*Orcinus orca*). *Mar Pollut Bull* 2009;58:1078-95.
20. Schummer C, Appenzeller BMR, Millet M, Wennig R. Determination of hydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in human hair by gas chromatography-negative chemical ionization mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2009;1216:6012-9.
21. Jongeneelen FJ. Methods for routine biological monitoring of carcinogenic PAH-mixtures. *Sci Total Environ* 1997;199:141-9.
22. Lee C-K, Cho S-H, Kang J-W, Lee S-J, Ju Y-S, Sung J, Strickland PT, Kang D. Comparison of three analytical methods for 1-hydroxypyrene glucuronide in urine after

- non-occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicol Lett* 1999;108:209-15.
23. Singh R, Tucek M, Maxa K, Tenglerova J, Weyand EH. A rapid and simple method for the analysis of 1-hydroxypyrene glucuronide - a potential biomarker for polycyclic aromatic hydrocarbon exposure. *Carcinogenesis* 1995;16:2909-15.
 24. Chetianukornkul T, Toriba A, Kameda T, Tang N, Hayakawa K. Simultaneous determination of urinary hydroxylated metabolites of naphthalene, fluorene, phenanthrene, fluoranthene and pyrene as multiple biomarkers of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Anal Bioanal Chem* 2006;386:712-8.
 25. Hollender J, Koch B, Dott W. Biomonitoring of environmental polycyclic aromatic hydrocarbon exposure by simultaneous measurement of urinary phenanthrene, pyrene and benzo[*a*]pyrene hydroxides. *J Chromatogr B* 2000;739:225-9.
 26. Smith CJ, Walcott CJ, Huang W, Maggio V, Grainger J, Patterson Jr. DG. Determination of selected monohydroxy metabolites of 2-, 3- and 4-ring polycyclic aromatic hydrocarbons in urine by solid-phase microextraction and isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B* 2002;778:157-64.
 27. Romanoff LC, Li Z, Young KJ, Blakely III NC, Patterson Jr. DG, Sandau CD. Automated solid-phase extraction method for measuring urinary polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in human biomonitoring using isotope-dilution gas chromatography high-resolution mass spectrometry. *J Chromatogr B* 2006;835:47-54.
 28. Strickland P, Kang D. Urinary 1-hydroxypyrene and other PAH metabolites as biomarkers of exposure to environmental PAH in air particulate matter. *Toxicol Lett* 1999;108:191-9.
 29. Toriba A, Nakamura H, Chetianukornkul T, Kizu R, Makino T, Nakazawa H, Yokoi T, Hayakawa K. Method for determining monohydroxybenzo[*a*]pyrene isomers using column-switching high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 2003;312:14-22.
 30. Castro AA, de L.R. Wagener A, Farias PAM, Bastos MB. Adsorptive stripping voltammetry of 1-hydroxypyrene at the thin-film mercury electrode - basis for quantitative determination of PAH metabolite in biological materials. *Anal Chim Acta* 2004;521:201-7.
 31. Mazéas O, Budzinski H. Solid-phase extraction and purification for the quantification of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in fish bile. *Anal Bioanal Chem* 2005;383:985-90.
 32. Itoh N, Tao H, Ibusuki T. In-tube silylation in combination with thermal desorption gas chromatography-mass spectrometry for the determination of hydroxy polycyclic aromatic hydrocarbons in water. *Anal Chim Acta* 2006;555:201-9.
 33. Aas E, Beyef J, Gokwy A. PAH in fish bile detected by fixed wavelength fluorescence. *Mar Environ Res* 1998;46:225-8.
 34. Divya O, Mishra AK. Combining synchronous fluorescence spectroscopy with multivariate methods for the analysis of petrol-kerosene mixtures. *Talanta* 2007;72:43-8.
 35. Koenig S, Savage C, Kim JP. Non-destructive assessment of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposure by fluorimetric analysis of crab urine. *Mar Pollut Bull* 2008;56:2003-8.
 36. Zhu S, Li L, Thornton C, Carvalho P, Avery BA, Willett KL. Simultaneous determination of benzo[*a*]pyrene and eight of its metabolites in *Fundulus heteroclitus* bile using ultra-performance liquid chromatography with mass spectrometry. *J Chromatogr B* 2008;863:141-9.
 37. Santos FJ, Galceran MT. Modern developments in gas chromatography-mass spectrometry-based environmental analysis. *J Chromatogr A* 2003;1000:125-51.
 38. Reemtsma T. Liquid chromatography-mass spectrometry and strategies for trace-level analysis of polar organic pollutants. *J Chromatogr A* 2003;1000:477-501.
 39. Xu X, Zhang J, Zhang L, Liu W, Weisel CP. Selective detection of monohydroxy metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine using liquid chromatography/triple quadrupole tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2004;18:2299-308.
 40. Smith CJ, Grainger J, Patterson Jr. DG. Separation of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites by γ -cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography with laser-induced fluorescence detection. *J Chromatogr A* 1998;803:241-7.
 41. Kuijt J, García-Ruiz C, Stroomberg GJ, Marina ML, Ariese F, Brinkman UATH, Gooijer C. Laser-induced fluorescence detection at 266 nm in capillary electrophoresis. Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in biota. *J Chromatogr A* 2001;907:291-9.

Summary

CHEMICAL METHODS FOR DETERMINATION OF HYDROXYLATED METABOLITES OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS AND POLYCHLORINATED BIPHENYLS IN BIOLOGICAL MATERIAL

This review presents methods for the analysis of hydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in humans and animals. These metabolites serve as biomarkers of human and animal exposure to the mentioned pollutants, but some metabolites also have toxic properties. Most are analysed in urine, which is the most accessible sample, but they can also be analysed in human and animal liver, bile, and adipose tissue.

Their analysis is important for assessing bioavailability of aromatic pollutants and their toxicity in human organism, but also the toxicity of metabolites themselves. Advancements in analytical methods have made it possible to analyse multiple metabolites in a sample at the same time. New extraction techniques and more precise and selective qualitative and quantitative analyses can now detect very low metabolite concentrations. An extra advantage is that these simple techniques require less chemicals and time.

KEY WORDS: *analytical procedures, biomarkers, metabolism, PAH, PCB, pollutants, toxicity*

CORRESPONDING AUTHOR:

Darija Klinčić, dipl. ing. kemije
Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada
Ksaverska cesta 2, p.p. 291, 10001 Zagreb, Hrvatska
E-mail: darija@imi.hr