

УДК 613.632

**ОБЗОР ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
АКРОЛЕИНА В БИОСРЕДАХ ЧЕЛОВЕКА
ДЛЯ ЗАДАЧ БИОМОНИТОРИНГА**

Уланова Т.С., Карнажицкая Т.Д., Заверненкова Е.О.

*ФБУН «ФНЦ медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения»,
Пермь, e-mail: root@frisk.ru*

Проведен аналитический обзор научной литературы по определению микроколичеств акролеина в биологических средах различными инструментальными методами. Установлено, что с целью осуществления биомониторинговых исследований анализ свободного и связанного акролеина проводится в моче, тканях, цельной крови, плазме и сыворотке. Для определения акролеина в биологических средах в настоящее время в основном используют методы высокоэффективной жидкостной и газовой хроматографии. Высокая реакционная способность свободного акролеина определяет специфику подготовки проб. В зависимости от способа пробоподготовки матрицы анализируют непосредственно акролеин или его производное. Предпочтительнее отдается высокоэффективной жидкостной хроматографии с флуориметрическим или ультрафиолетовым детектором в сочетании с реакцией дериватизации. Высокая чувствительность определения обеспечивается флуориметрическим детектированием за счет способности производных акролеина к флуоресценции.

Ключевые слова: акролеин, биосреды, методы анализа, дериватизация, газовая и жидкостная хроматография

**REVIEW OF THE PHYSICAL -CHEMICAL METHODS ACROLEIN
DETERMINATION IN BIOLOGICAL SAMPLES FOR BIOMONITORING**

Ulanova T.S., Karnazhitskaya T.D., Zavernenkova E.O.

*Federal budget scientific institution «Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk
Management Technologies», Perm, e-mail: root@frisk.ru*

The analysis of scientific literature concerning acrolein trace amount determination in biological samples with different instrumental methods was carried out. It is established that acrolein determination is carried out in urine, tissue, blood, plasma and serum. Methods of a high performance liquid chromatography and gas chromatography are generally used for determination of acrolein in biological samples. The high reactivity of free acrolein determines the specific sample preparation. Methods consists of direct acrolein analysis or its derivative. The preference is given to a high performance liquid chromatography with the fluorimetric or ultra-violet detection in combination with derivatization reaction. High sensitivity of determination is provided with ability of acrolein derivatives to fluorescence.

Keywords: acrolein, biological samples, methods of analysis, derivatization, gas and liquid chromatography

Угроза здоровью человека и его благо-
состоянию, связанная с загрязнением окру-
жающей среды, является в настоящее вре-
мя одной из самых актуальных проблем.
По данным ВОЗ, загрязнение окружающей
среды обуславливает во всем мире при-
мерно 25% всех заболеваний, при этом на
долю детей приходится более 60%, вызван-
ных этой причиной. В докладах экспертов
Всемирной организации здравоохранения
по критериям качества окружающей сре-
ды в связи с воздействием на организм че-
ловека наиболее токсичных соединений
рекомендуется проводить биомониторинг
с определением их содержания в биосре-
дах [2]. Исследование биосред человека на
содержание компонентов антропогенной
нагрузки в большей степени определяется
точностью и чувствительностью существу-
ющих аналитических методов определения.

К числу приоритетных загрязнителей
окружающей среды относится акролеин
(класс опасности 2) – простейший нена-
сыщенный альдегид, который поступает
в окружающую среду с выбросами авто-

транспорта, предприятий органического
синтеза, химического, нефтехимического,
электротехнического, литейного и ряда
других производств [1, 3]. Немаловажное
значение имеет загрязнение акролеином
воздуха жилых и служебных помещений,
связанное с выделением этого соединения
из высокотемпературных полимерных ма-
териалов, бумаги и текстильных изделий,
табачного дыма, при приготовлении пищи
(жарка, копчение) [1, 3]. В условиях хро-
нической экспозиции акролеин оказывает
общераздражающее, аллергенное, мутаген-
ное, эмбриотоксическое действие, [3].

Следует отметить, что акролеин явля-
ется естественным метаболитом организма
человека, он образуется эндогенно в про-
цессе окисления биогенных полиаминов.
Другой источник образования – биотранс-
формации лекарственных препаратов [9].

Для оценки риска воздействия акроле-
ина на здоровье человека в условиях хро-
нической экспозиции актуальным является
определение содержания акролеина в биоло-
гических средах населения, проживающих

на территориях с различным уровнем воздействия. Решение этой задачи связано с разработкой и совершенствованием химико-аналитических методов, обеспечивающих высокую чувствительность, селективность и надежность определения.

Цель исследования – провести аналитический обзор физико-химических методов определения акролеина в биологических средах, представленных в отечественной и зарубежной литературе.

Обзор аналитических методов. Для определения акролеина в биологических средах в настоящее время используют в основном методы высокоэффективной жидкостной и газовой хроматографии. В зависимости от способа пробоподготовки матрицы анализируют непосредственно акролеин или его производное. Обобщенные сведения хроматографических методов определения акролеина приведены в таблице.

Хроматографические методы определения акролеина в биологических средах

Образец	Пробоподготовка	Метод анализа	Диапазоны и предел обнаружения	Процент открываемости	Источник литературы
Моча	Мочу нагревают до 80 °С, отбирают пары и вводят непосредственно в газовый хроматограф	ГХ/МС ^а	0,056–0,28 мкг/дм ³	7–87,9% (100 нМ)	[9]
Моча	В мочу добавляют реагент для дериватизации (м-аминофенол/гидроксилламин/сульфат железа) и нагревают до 100 °С в течение 15 минут	ВЭЖХ/ФЛД ^б	1–20 мкг/дм ³	99–104,1%	[8]
Моча	Мочу центрифугируют, высушивают и перерастворяют в воде. Анализируют метаболит акролеина – 3-гидроксипропил-цистеин	ВЭЖХ/УФ ^в	1,25 мг/дм ³	Нет данных	[9]
Плазма	В плазму добавляют реагент ламинарин в 0,1 М растворе серной кислоты, экстрагируют метиленхлоридом, высушивают, перерастворяют в ацетонитриле	ВЭЖХ/ФЛД	5,6 мкг/дм ³	78–82%	[9]
Ткани	Гомогенизированные ткани смешиваются с реактивом 2,4-ДНФГ ^г , дериват экстрагируют хлороформом. Экстракт высушивают и перерастворяют в метаноле	ВЭЖХ/УФ	< 0,2 нг (в 0,5 см ³ метанола)	4,6–43,8% (8 мг акролеина)	[5]

Примечания: а – газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектированием, б – высокоэффективная жидкостная хроматография с флуориметрическим детектированием, в – высокоэффективная жидкостная хроматография с ультрафиолетовым детектированием, г – 2,4-динитрофенилгидразин.

Метод прямого обнаружения акролеина в моче разработан Sakura и др. [10]. В процессе анализа образец мочи объемом 0,5 см³ нагревают до 80 °С, переводят акролеин в паровоздушную среду над жидкостью. Пары анализируются с использованием метода ГХ/МС, который обеспечивает чувствительность обнаружения от 1 до 5 нМ (0,056–0,28 мкг/дм³) акролеина в моче. Процент открываемости составляет 7–87,9%. Авторами была отмечена невозможность результатов из-за различной спо-

собности акролеина переходить в паровую фазу из различных образцов мочи во время нагревания.

Авторы Voog P. и Ansari G. [5] разработали метод обнаружения нанограммовых количеств акролеина в биологических образцах. Реагент для дериватизации 2,4-динитрофенилгидразин инкубируют с гомогенатом печени или почек в течение короткого периода времени. Производное акролеина с ДНФГ затем экстрагируют из образцов хлороформом. Анализ акролеина

осуществляют путем элюирования на обращенно-фазной колонке с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и обнаружению аддукта по ультрафиолетовому поглощению. Предел обнаружения < 0,2 нг в 0,5 см³ метанола. Мешающее влияние могут оказывать другие альдегиды и кетоны.

Известен способ определения акролеина при взаимодействии его с реагентом ламиарином в 0,1 М растворе серной кислоты, экстракции деривата метилхлоридом, высушивании и растворении в ацетонитриле. Анализ проводится методом ВЭЖХ/ФЛД. Предел обнаружения 5,6 мкг/дм³, процент открываемости 78–82% [1].

Авторы Blair E. Miller и Neil D. Danielson [4] предлагают предколонную ВЭЖХ дериватизацию виниловых альдегидов (акролеина, кронового альдегида и метакролеина), присутствующих в спиртовых напитках, с использованием реагента антрона. Преимущество данного реагента – в его селективности по отношению к непредельным альдегидам, т.к. реакция дериватизации идет по двойной связи. Проведенные авторами исследования показали, что для полной реакции дериватизации с антроном достаточно 10 мин при комнатной температуре. Разделение образующихся при этом флуоресцирующих производных бензантрона достигнуто на колонке с обращенной фазой C₁₈. Предел обнаружения альдегидов при флуориметрическом детектировании достигает 0,005 ppm.

Большое количество методов анализа свободного акролеина основано на его взаимодействии с 3-аминофенолом в кислой среде и анализе производного акролеина – 7-гидроксихинолина. Методы отличаются высокой чувствительностью и селективностью [7, 8, 6].

Sameer Al-Rawithi с соавторами [8] предлагают определение акролеина в моче в виде производного, образующегося при взаимодействии с 3-аминофенолом в присутствии гидросиламина и сульфата железа при нагревании до 100°C в течение 15 минут. Анализ акролеина в виде флуоресцирующего производного проводят методом ВЭЖХ/ФЛД. В качестве подвижной фазы используют смесь 0,05 М раствора 2-х основного фосфата аммония (рН = 2,5), ацетонитрила и метанола в соотношении 90:6:2 (об. %). Выход регистрируют флуориметрически при длине волны возбуждения и излучения 360 и 495 нм соответственно. Авторы метода исследовали условия проведения реакции дериватизации и предложили оптимальный вариант для максимального образования производного

в моче. Диапазон измеряемых концентраций 1–20 мкг/см³. Процент открываемости 99–104,1%.

Kaori Sakata, Keiko Kashiwagi, Shahara Sharmin и др. [7] исследовали содержание пуртесцина, его метаболита акролеина и аминоксидазы в плазме крови пациентов с почечной недостаточностью. В процессе пробоподготовки плазмы крови тщательно очищают от эритроцитов: кровь, содержащую 1 мг/мл динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты, центрифугируют со скоростью 1500 об/мин 30 минут при температуре 4°C. Определение свободного акролеина проводят в виде его производного, для чего реакцию смесь (0,2 мл), содержащую 0,1 мл плазмы, 23 мМ 3-аминофенола, 43 мМ гидросиламина гидрохлорида и 1,5 N хлористоводородную кислоту, кипятят 10 мин. Измерение образующегося производного акролеина – 7-гидроксихинолина проводят методом ВЭЖХ, отбирая для анализа 0,08 см³ супернатанта после центрифугирования реакционной смеси. Анализируют обработанную пробу на жидкостном хроматографе с флуориметрическим детектором при длине волны возбуждения 358 нм и длине волны эмиссии 510 нм.

В работе Gugliucci A. и соавторов [6] описывается методика флуориметрического определения акролеина в плазме и сыворотке крови. К отобранной крови добавляют цитрат натрия (5 ммоль/л) или динатриевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (5 ммоль/л) в качестве антикоагулянта. Кровь центрифугируют при 1600 g, при температуре 4°C в течение 7 минут, и разделенную сыворотку или плазму немедленно анализируют, или подвергают замораживанию до –80°C до проведения анализа. Далее акролеин подвергается реакции с 3-аминофенолом в кислой среде. К 250 мм³ сыворотки добавляют 70 мм³ 8М HCl и 70 мм³ 3-аминофенол-гидросиламина, центрифугируют при 10000 g, выдерживают в течение 30 минут при 4°C, далее 30 минут при 37°C. Анализ проводят при длине волны возбуждения 350 нм и эмиссии 505 нм. Калибровочный график на акролеин выполняют в этих же условиях. Анализ проводят на спектрофлуориметре SPECTRAmax Gemini XPS с программным обеспечением SOFTmax PRO (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

Стоит отметить, что в организме человека акролеин может находиться не только в свободном, но и в связанном виде. Анализ акролеина в связанном виде основан на его определении в виде метаболитов, например, S-(3-гидроксипропил)-L-цистеина.

Alarcon (1976) [10] разработал метод определения метаболита акролеина в моче – 3-гидроксипропилмеркаптуровой кислоты. Метод заключается в подкислении мочи для преобразования метаболита в S-(3-гидроксипропил)-L-цистеин, количество которого можно определить с помощью аминокислотного анализатора.

Sanduja и др. (1989) [10] определял метаболит акролеина S-(3-гидроксипропил)-L-цистеин непосредственно в моче методом ВЭЖХ с УФ-детектором при длине волны 210 нм. Мочу центрифугируют, высушивают и перерастворяют в воде. Чувствительность определения составляет 1,25 мкг/см³.

Заклучение

В ходе проведенного анализа существующих на сегодняшний день методов определения акролеина в биологических средах можно сделать следующие выводы:

– при осуществлении биомониторинговых исследований проводится анализ свободного или связанного акролеина в моче, цельной крови, плазме и сыворотке;

– высокая реакционная способность свободного акролеина определяет специфику подготовки проб с проведением реакции дериватизации и анализ в виде стабильного соединения;

– селективность анализа акролеина в биологических средах обеспечивается методами газовой и жидкостной хроматографии;

– высокая чувствительность определения обеспечивается флуориметрическим детектированием за счет способности производных акролеина к флуоресценции;

– предпочтение в анализе акролеина отдается методам высокоэффективной жидкостной хроматографии с флуориметрическим или ультрафиолетовым детектором в сочетании с реакцией дериватизации.

Список литературы

1. Акролеин // Серия «Научные обзоры советской литературы по токсичности и опасности химических веществ» / под ред. Н.Ф. Измерова. – М., 1984. – № 50. – 15 с.
2. Онищенко Г.Г., Зайцева Н.В., Уланова Т.С. Контроль содержания химических соединений и элементов в биологических средах. – Пермь: Книжный формат, 2011. – 520 с.
3. Филон В.А., Тиунов Л.А. Вредные химические вещества. Галоген- и кислородсодержащие органические соединения: справочник. – СПб.: Химия, 1994. – 286 с.
4. Blair E. Miller, and Neil D. Danielson. Derivatization of vinyl aldehydes with anthrone prior to high-performance liquid chromatography with fluorometric detection // *Anal. Chem.* – 1988. – 60 (7). – 622–626 p.
5. Boor P., Ansari G. A high performance liquid chromatographic method for quantitation of acrolein in biological samples // *J Chromatogr.* – 375. – 1986. – P. 159–164.
6. Gugliucci A., Tsuji M., Kinugasa E., Ogata H., Ikeda H., Shikama Y., Kimura S. de Gruyter. Reference Global High free serum acrolein levels in bacterial infection and other disease

states associated with oxidative stress: a potential biomarker? // *J. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine.* – 2007. – Vol. 45. – № 11. – P. 1559–1560.

7. Kaori Sakata, Keiko Kashiwagi, Shahara Sharmin et al. Increase in putrescine, amine oxidase, and acrolein in plasma of renal failure patients // *Biochem. And Biophysical Research Communications.* – 2003. – 305. – P. 143–149.

8. Sameer Al-Rawithi, Adnan El-Yazigi, and Paul J. Nicholls. Determination of Acrolein in Urine by Liquid Chromatography and Fluorescence Detection of Its Quinoline Derivative // *J. Pharmaceutical Research.* – Vol. 10. – № 11. – 1993. – P. 1587–1591.

9. Schulte-Ladbeck R., Lindahl R., Levin J. O., Karst U. J. // *Environ. Monit.* 2001, 3, 306–310.

10. Toxicological Profile for Acrolein. Toxic Substances Portal – Acrolein. – August 2007. – Интернет-источник <http://www.atsdr.cdc.gov/substances/toxsubstance.asp?toxid=102>.

References

1. Acrolein. Seriya «Nauchnye obzory sovetskoy literatury po toksichnosti i opasnosti khimicheskikh veshhestv. Pod red. Izmerova N.F.M, 1984, no. 50, 15 p.
2. Onishhenko G.G., Zajceva N.V., Ulanova T.S. Kontrol' soderzhanija himicheskikh soedinenij i jelementov v biologicheskikh sredah. Perm: Knizhnyj format, 2011. 520 r.
3. Filov V.A., Tiunov L.A. Vrednye khimicheskie veshhestva. Galogen- I kislorodsoderzhashhie organicheskie soedineniya. Spravochnik. Sankt-Peterburg, «Khimiya». 1994. 286 p.
4. Blair E. Miller, Neil D. Danielson Derivatization of vinyl aldehydes with anthrone prior to high-performance liquid chromatography with fluorometric detection, *Anal. Chem.* 1988, 60 (7), pp. 622–626.
5. Boor P., Ansari G.A. high performance liquid chromatographic method for quantitation of acrolein in biological samples, *J Chromatogr.* 1986, 375, pp. 159–164.
6. Gugliucci A., Tsuji M., Kinugasa E., Ogata H., Ikeda H., Shikama Y., Kimura S. de Gruyter Reference Global High free serum acrolein levels in bacterial infection and other disease states associated with oxidative stress: a potential biomarker, *J. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2007, Vol. 45, no. 11, pp. 1559–1560.
7. Kaori Sakata, Keiko Kashiwagi, Shahara Sharmin Increase in putrescine, amine oxidase, and acrolein in plasma of renal failure patients, *Biochem. and Biophysical Research Communications*, 2003, 305, pp. 143–149.
8. Sameer Al-Rawithi, Adnan El-Yazigi, and Paul J. Nicholls. Determination of Acrolein in Urine by Liquid Chromatography and Fluorescence Detection of Its Quinoline Derivative, *J. Pharmaceutical Research*, 1993, Vol. 10, no. 11, pp. 1587–1591.
9. Schulte-Ladbeck R., Lindahl R., Levin J. O., Karst U. J. // *Environ. Monit.* 2001, 3, 306–310.
10. Toxicological Profile for Acrolein. Toxic Substances Portal – Acrolein. – August 2007. – Интернет-источник <http://www.atsdr.cdc.gov/substances/toxsubstance.asp?toxid=102>.

Рецензенты:

Дегтев М.И., д.х.н., профессор, заведующий кафедрой аналитической химии Пермского государственного национального исследовательского университета, г. Пермь;

Онорин С.А., д.х.н., профессор кафедры химии и биотехнологии Пермского государственного технического университета, г. Пермь.

Работа поступила в редакцию 26.03.2014.