

*Lucyna Konieczna, Alina Plenis*

## EKSPOZYCJA NA DYM TYTONIOWY A POZIOM 1-HYDROKSYPIRENU U OSÓB PALĄCYCH I NIEPALĄCYCH

Katedra i Zakład Chemii Farmaceutycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego  
Kierownik: dr hab. P. Kowalski

*W pracy zaprezentowano metodę wykrywania i ilościowego oznaczania 1-hydroksypirenu (1-HOP) w moczu ludzkim z zastosowaniem ekstrakcji do fazy stałej (SPE). Przedstawiona metoda charakteryzuje się dobrą wydajnością, powtarzalnością i dokładnością oznaczenia z pominięciem drogiej i pracochłonnej hydrolizy enzymatycznej. Osiągnięto niższą granicę oznaczalności (0,01 ng/ml), w stosunku do metod opisanych w literaturze. Zasadniczym celem pracy było oznaczenie poziomu zawartości 1-hydroksypirenu w moczu 112 badanych osób jako wskaźnika narażenia na wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA) wynikającego z palenia papierosów. Otrzymane wyniki wykazały zwiększone ryzyko narażenia na WWA u osób palących. Zaobserwowano dużą zmienność osobniczą w poziomie 1-HOP w badanej populacji.*

Hasła kluczowe: 1-hydroksypiren, wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, moczu, detekcja fluorescencyjna.

Key words: 1-hydroxypyrene, polycyclic aromatic hydrocarbons, urine, fluorescence detection.

1-Hydroksypiren (1-HOP) obecny w moczu ludzkim jest głównym metabolitem wielopierścieniowego węglowodoru aromatycznego, pirenu, który zawsze występuje w mieszaninach WWA zawierających składniki kancerogenne takie jak benzo(a)piren. Jest on powszechnie akceptowanym biomarkerem narażenia na WWA (1–4). Jego źródłem dla organizmu ludzkiego są zanieczyszczenia powietrza atmosferycznego, narażenie zawodowe, palenie tytoniu (zarówno aktywne jak i bierne), woda oraz pożywienie (2, 4, 5). Związek ten jest absorbowany przez płuca, przewód pokarmowy oraz skórę, a jego metabolizm uzależniony jest od cech osobniczych. Wykazano, że poziom 1-HOP u osób palących jest około dwukrotnie wyższy w stosunku do niepalących (5, 6), przy czym palenie tytoniu w większym stopniu wpływa na stężenie WWA w moczu niż ekspozycja na zanieczyszczenia powietrza wynikające z działalności ludzkiej (7, 8). Z badań przeprowadzonych w 2008 roku przez Centrum Badania Opinii Społecznej wynika, że około jedna trzecia Polaków pali papierosy (9). Wśród około 4800 zidentyfikowanych dotąd składników dymu papierosowego aż 69 z nich uznano za kancerogenne, w tym policykliczne węglowodory aromatyczne (10). W Polsce około 100 tys. zgonów rocznie ma bezpośredni związek z negatywnymi następstwami palenia tytoniu, przy czym ponad 60% z nich dotyczy osób w wieku 35–69 lat. Są to m.in. nowotwory płuc, jamy ustnej, krtani,

zatok nosowych, przełyku, żołądka, wątroby, trzustki, pęcherza moczowego, macicy oraz nerki (2). Z chorób układu sercowo-naczyniowego powodowanych przez palenie należy wymienić chorobę niedokrwienną serca, zawał serca, miażdżycę naczyń krwionośnych czy nadciśnienie tętnicze. Palacze cierpią także na schorzenia układu oddechowego (przewlekłe zapalenie oskrzeli, gruźlica), układu nerwowego (udar mózgu) oraz układu pokarmowego (wrzody żołądka i dwunastnicy, przepukliny jelitowe). Poza tym palenie papierosów może być przyczyną gruczolowego raka szyjki macicy i białaczki szpikowej (2). Szacuje się, że spośród wszystkich żyjących obecnie na świecie ludzi 500 milionów osób umrze z powodu palenia tytoniu, głównie przez nowotwory płuc (6, 11, 12). Istotne jest zatem badanie poziomu narażenia na toksyczne i rakotwórcze składniki dymu tytoniowego. Kluczową rolę odgrywają tu biomarkery, w tym najpowszechniej uznany i stosowany marker ekspozycji na wielopierścieniowe węglowodory – 1-HOP. Stąd głównym celem przeprowadzonych badań była próba oceny wpływu palenia papierosów (czynnego i biernego) na stężenie 1-HOP w moczu u 112 osób obojga płci.

Wśród opisanych w literaturze metod oznaczania 1-HOP w moczu można wymienić wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC) w połączeniu ze spektrometrią mas (MS) (13). Jednakże wysoki koszt detektora MS oraz konieczność uzyskania do analizy czystych ekstraktów moczu sprawia, że zastosowanie jej do rutynowych oznaczeń jest ograniczone w wielu laboratoriach. Odzyski uzyskiwane po czasochłonnej, wieloetapowej procedurze przygotowania prób nie zawsze są zadowalające. Stąd poszukiwane są nowe, lepsze pod względem selektywności i czułości i mniej pracochłonne metody oznaczania 1-HOP w materiale biologicznym. W pracy zaproponowano zastosowanie metody RP-HPLC z detekcją fluorescencyjną, która jest wydajna, czuła i charakteryzuje się krótkim czasem analizy.

## MATERIAŁ I METODY

**Materiał badany.** Materiał do badań stanowiła poranna porcja moczu pobrana od zdrowych ochotników. W badaniach wzięło udział 76 kobiet i 36 mężczyzn. Protokół badań został zatwierdzony przez Komisję Bioetyczną przy Akademii Medycznej w Gdańsku. Badania zostały przeprowadzone przy współpracy z Katedrą i Zakładem Toksykologii AMG, a uczestnicy wyrazili pisemną zgodę na ich przeprowadzenie. Badane osoby podzielono na trzy grupy (palący, niepalący, bierni palacze) zgodnie z podanymi w wywiadzie ankietowym deklaracjami o ekspozycji czynnej lub biernej na dym tytoniowy.

**Procedura ekstrakcyjna.** Analizie poddano mocz ludzki, który stanowi bezpieczne dla analityka i stosunkowo łatwo dostępne źródło prób do analizy, nawet w znacznych ilościach i pobierane w sposób nieinwazyjny dla osób badanych. Z tego względu jest on najczęściej wykorzystywanym materiałem biologicznym w ocenie stężenia 1-HOP. Pierwszym etapem przygotowania próbki moczu (1 ml) do analizy chromatograficznej była hydroliza w środowisku stężonego HCl (150  $\mu$ l) na łaźni wodnej w temperaturze 90°C w czasie 1 h. Do każdej próbki hydrolizatu (1 ml) dodano wzorzec wewnętrzny (naproksen) w ilości 2000 ng/ml i 2 ml wody. Otrzymaną mieszaninę wytrząsano mechanicznie, a następnie na łaźni ultradźwiękowej

i poddano ekstrakcji typu ciecz-ciało stałe (SPE) na kolumnach LiChrolut RP-C18. Po przepłukaniu kolumn wodą dejonizowaną, analizowane związki wyeluowano za pomocą 2 ml dichlorometanu, który następnie odparowano na łaźni wodnej z przedmuchem sprężonego powietrza, a suchą pozostałość rozpuszczono w mieszaninie acetonitryl-woda (70:30 v/v). Po odwirowaniu (7 min, 10000 g), próbki przechowywano w temp.  $-20^{\circ}\text{C}$  do czasu analizy.

Do separacji chromatograficznej zastosowano chromatograf cieczowy firmy Knauer (Niemcy) z detektorem fluorescencyjnym (Schimadzu) oraz system akwizycji danych Eurochrom 2000. W badaniach wykorzystano kolumnę LiChrospher 100 C18 ( $125 \times 4,0$  mm,  $5\mu\text{m}$ ). Fazę ruchomą stanowiła mieszanina acetonitryl-woda (42:58 v/v) doprowadzona do pH 3,4 za pomocą 85% kwasu ortofosforowego. Długość fali wzbudzenia detektora fluorescencyjnego wynosiła 240 nm, a długość fali emisji 400 nm. W tych warunkach czas retencji 1-HOP wynosił 8,6 min, a wzorca wewnętrznego (naproksenu) 3,6 min. Liniowość została doświadczalnie potwierdzona w szerokim zakresie stężeń od 0,01 do 200 ng/ml. Równanie regresji prostej wyznaczone metodą najmniejszych kwadratów z współczynnikiem korelacji ( $r > 0,999$ , posłużyło do wyliczenia wartości stężeń 1-HOP w moczu ludzkim. Dokonano oceny statystycznej opracowanej metody, wykazano również stabilność prób biologicznych zawierających 1-HOP i naproksenu (test zamrażania i rozmrażania przeprowadzono po 1 i po 3 miesiącach). Uzyskane wyniki walidacji metody w pełni odpowiadają wymogom stawianym oznaczeniom ilościowym.

## WYNIKI I WNIOSKI

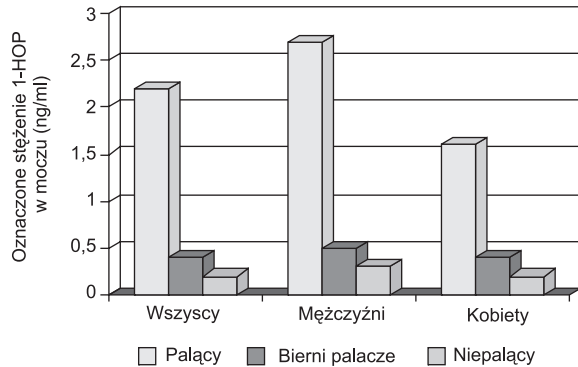
W ostatnich latach obserwuje się wzrost zainteresowania oznaczeniami zawartości 1-HOP w materiale biologicznym jako biomarkera narażenia na WWA, stąd uzasadnione jest poszukiwanie nowych, bardziej czułych, precyzyjnych i specyficznych metod jego jakościowej i ilościowej analizy.

Z uwagi na niskie wartości 1-HOP w moczu jego analiza sprawia analitykom wiele trudności, zwłaszcza w trakcie procesu jego wyizolowania ze skomplikowanej matrycy biologicznej (1, 2, 8, 14, 15). W prezentowanej pracy odpowiedni dobór sposobu ekstrakcji do fazy stałej z zastosowaniem kolumnienek C18 odegrał kluczową rolę przy oznaczaniu śladowych ilości tego związku i pozwolił uzyskać wysoką wydajność procesu (96%). Zastosowanie detektora fluorescencyjnego o wysokiej czułości umożliwiło uzyskanie niższej granicy oznaczalności (0,01 ng/ml) w porównaniu do wcześniej opisanych w literaturze (2, 8, 14, 15).

Istotnym elementem pracy była analiza zawartości 1-HOP w próbach moczu uzyskanych od 112 losowo wybranych osób (76 kobiet i 36 mężczyzn). Oznaczone wartości stężeń u badanych ochotników mieściły się w zakresie od 0,01 do 4,42 ng/ml. Wartości te są porównywalne do stężeń 1-HOP opisanych w literaturze (1, 2, 8, 14, 15). Najwyższe stężenia 1-HOP zaobserwowano u osób palących, podczas gdy najniższe u niepalących. U ochotników biernie narażonych na dym tytoniowy osiągały one wartości pośrednie (ryc. 1). Różnice w średnich wartościach stężeń 1-HOP dla osób palących i niepalących okazały się statystycznie istotne, co potwierdzono za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA i testu *t-Studenta* na

poziomie istotności 0,05. Na tej podstawie można wnioskować o związku stężenia 1-HOP z ilością wypalanych papierosów, co jest zgodne z doniesieniami literaturowymi (2, 14, 15). Zaobserwowano wyższe wartości stężeń 1-HOP u mężczyzn w porównaniu do kobiet we wszystkich badanych grupach (palących, niepalących i biernych palaczy), jednakże różnice te nie są statystycznie znamienne.

W przedstawionej pracy zaprezentowano procedurę oznaczenia 1-HOP w moczu ludzkim za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją fluorescencyjną. Zaproponowana metodyka z powodzeniem nadaje się do oznaczeń seryjnych, nie wymaga skomplikowanych procesów oczyszczania prób, a koszt pojedynczej analizy w porównaniu z innymi metodami jest znacznie mniejszy. Nie wielka ilość badanego materiału biologicznego (1 ml) oraz pominięcie kosztownej i pracochłonnej hydrolizy enzymatycznej dodatkowo potwierdzają przydatność opracowanej metody do oznaczeń 1-HOP ze względów ekonomicznych. Osiągnięto niższą granicę oznaczalności badanego związku, a czas pojedynczego oznaczenia (10 min) jest krótszy w porównaniu z metodami opisanymi w literaturze. Przedstawiona procedura oznaczania 1-HOP jako biomarkera narażenia na wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne może być z powodzeniem wykorzystana w praktyce klinicznej. Z badań własnych wynika, że 1-HOP jest specyficznym biomarkerem dla odróżnienia osób palących od niepalących. Analiza wpływu płci na stężenie hydroksypirenu w moczu u kobiet i mężczyzn wskazuje na brak statystycznie istotnych różnic pomiędzy wymienionymi grupami, jednakże zauważono znaczną zmienność osobniczą w poziomie badanego biomarkera.



Ryc. 1. Stężenie 1-HOP (ng/ml) w moczu palących tytoń, biernie narażonych i niepalących w trzech badanych grupach: wszyscy ochotnicy, mężczyźni, kobiety.

Fig. 1. Concentration of 1-HOP in urine of smoking, passive smoking and non smoking in three groups: all volunteers, females and males.

L. Konieczna, A. Plenis

#### EXPOSITION TO TOBACCO SMOKE AND 1-HYDROXYPYRENE LEVEL IN SMOKERS AND NONSMOKERS

#### Summary

We have developed an improved method for the analysis of 1-hydroxypyrene (1-HOP), an accepted biomarker of polycyclic aromatic hydrocarbon uptake. Proposed simplified liquid chromatographic method (HPLC) with fluorescence detection based on solid-phase extraction (SPE) was optimized and validated to determinate 1-HOP in human urine. Method validation was performed by evaluation of the analytical parameters: linearity, accuracy, precision, specificity as well limit of detection and quantitation.

The recoveries for all samples were better than 96%. Comparing to chromatographic method, the presented procedure is cheaper and much easier to perform for analysis of 1-HOP. Moreover, our study of 1-HOP level in the urine of 112 volunteers, including smokers, nonsmokers and passive smokers showed considerable intra-individual variation in polycyclic aromatic hydrocarbon exposure (PAH). The obtained results confirmed the higher risk of exposure to PAH on the base of determination of 1-HOP in urine.

## PIŚMIENNICTWO

1. *Camella S.G., Le K., Hecht S.S.*: Improved method for determination of 1-hydroxypyrene in human urine. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2004; 13: 1261-1264.
2. *Hecht S.S.*: Tobacco carcinogen biomarkers: old and new. *American Association for Cancer Research Education Book*, 2005: 85-88.
3. *Jongeneelen F.J., Anzion R.B., Leijdekkers C.M., Bos R.P., Henderson P.T.*: 1-hydroxypyrene in human urine after exposure to coal tar and a coal tar derived product. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 1985; 57: 47-55.
4. *Mielżyńska D.*: Markery biologiczne w ocenie narażenia zawodowego i środowiskowego ludzi na wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne. *Instytut Medycyny Pracy im. prof. J. Nofera*, 2008: 139.
5. *Li H., Krieger R.I., Li Q.X.*: Improved HPLC method for analysis of 1-hydroxypyrene in human urine specimens of cigarette smokers. *Sci. Total Environ.*, 2000; 257: 147-153.
6. *Hecht S.S.*: Human urinary metabolites: biomarkers for investigating tobacco and cancer. *Carcinogenesis*, 2002; 23: 907-922.
7. *Lamotte M., Belfutni R., Fournier de Violet P., Garrigues P., Lafontaine M., Dumas C.* Detection of 1-hydroxypyrene in urine by direct fluorometric analysis on a solid phase. Validation and application of the method to biological monitoring of PAH-exposed persons. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2003; 376: 816-821.
8. *Lee C., Cho S., Kang J., Lee S., Ju Y., Sung J., Strickland P.T., 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: 209-215.
9. Centrum Badań Opinii Społecznej. Postawy wobec palenia papierosów wśród Polaków, Czechów, Słowaków i Węgrów. Komunikat z badań CBOS, Warszawa, 2008.
10. *Hoffmann D., Hoffmann I., El-Bayoumy K.*: The less harmful cigarette: a controversial issue. *Chem. Res. Toxicol.*, 2001; 14: 767-790.
11. *Jemal A., Murray T., Samuels A., Ghafoor A., Ward E., Thun M.J.* Cancer statistics, 2003. *CA Cancer J. Clin.*, 2003; 53: 5-26.
12. International Agency for Research on Cancer. Tobacco smoke and involuntary smoking. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.*, WHO, Lyon, 2002.
13. *Kakimoto K., Toriba A., Ohno T., Ueno M., Kameda T., Tang N., Hayakawa K.*: Direct measurement of the glucuronide conjugate of 1-hydroxypyrene in human urine by using liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, 2008; 867: 259-263.
14. *Murphy S.E., Link C.A., Jansen J., Le Ch. Puumala S.S., Hecht S.S.*: A comparison of urinary biomarkers of tobacco and carcinogen exposure in smokers. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2004; 13: 1617-1623.
15. *Florek E., Piekoszewski W., Kornacka K.M., Szmańko A.*: Ocena narażenia na wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne kobiet ciężarnych palących tytoń. *Przegl. Lek.*, 2005; 62: 1013-1018.

Adres: 80-416 Gdańsk, ul. Hallera 107.