

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОНОГИДРОКСИЛИРОВАННЫХ МЕТАБОЛИТОВ
ПОЛИЦИКЛИЧЕСКИХ АРОМАТИЧЕСКИХ УГЛЕВОДОРОДОВ В МОЧЕ ГХ-МС
МЕТОДОМ**

Блинков А.А., Новиков С.В., Семёнов С.Ю.

*Федеральное государственное унитарное предприятие научно-технический центр
радиационно-химической безопасности и гигиены
Федерального медико-биологического агентства,
123103 г. Москва, ул. Щукинская д.40,
Тел. 8 (499) 190-51-31; E-mail: ntc_rhbg@fmbamail.ru*

Резюме. Была разработана и апробирована методика измерений десяти метаболитов полициклических ароматических углеводородов (ПАУ), включая: 1- и 2-гидроксинафталин, 2-, 3-, 9-гидроксифлуорен, 1-, 2-, 3-, 4-гидроксифенантрен и 1-гидроксипирен. Методика основана на ферментативном гидролизе образцов мочи, в которые предварительно вносился раствор соответствующих изотопно-меченых стандартов-имитаторов; твёрдофазной экстракции (ТФЭ) моногидроксилированных метаболитов из гидролизата; концентрировании экстракта; дериватизации пробы N-метил-N-(триметилсилил)-трифторацетамидом (МСТФА) и последующем её анализе с помощью хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС). Коэффициенты корреляции градуировочной зависимости составили более 0,99. Методика была апробирована на когорте добровольцев.

Ключевые слова: биомониторинг, метаболиты ПАУ, биомаркер, газовая хромато-масс-спектрометрия (ГХ-МС), твёрдофазная экстракция (ТФЭ), дериватизация.

**DETERMINATION OF MONOHYDROXYLATED METABOLITES OF POLYCYCLIC
AROMATIC HYDROCARBONS IN URINE BY GC-MS METHOD**

Blinkov A.A., Novikov S.V., Semenov S.Y.

*Federal State Unitary Enterprise Research and Technical Center of Radiation-Chemical
Safety and Hygiene*

Abstract. A procedure was developed and tested for measuring ten metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons PAHs, including: 1- and 2-hydroxynaphthalene, 2-, 3-, 9-hydroxyfluorene, 1-, 2-, 3-, 4-hydroxyphenanthrene and 1-hydroxypyrene. The technique is based on the enzymatic hydrolysis of urine samples into which a solution of the corresponding isotope-labeled standards-imitators was previously introduced; solid phase extraction (SPE) of monohydroxylated metabolites from the hydrolyzate; concentrating the extract; derivatization of the sample with N-methyl-N- (trimethylsilyl)trifluoroacetamide (MSTFA) and its subsequent

analysis using chromatography–mass spectrometry (GC/MS). The correlation coefficients of the calibration dependence were more than 0.99. The technique was tested on a cohort of volunteers.

Key words: biomonitoring, ПАУ metabolites, biomarker, gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS), solid phase extraction (SPE), derivatization.

Введение

Стремительное развитие современной химической промышленности привело к выбросам в окружающую среду больших количеств загрязняющих веществ, в том числе полициклических ароматических углеводородов (ПАУ). ПАУ – это класс органических соединений с несколькими конденсированными ароматическими ядрами и их производные. Производственные процессы, связанные с термообработкой и неполным сгоранием органического сырья, служат основными источниками загрязнения окружающей среды ПАУ. Эти вещества являются убиквитарными соединениями, так как они обнаруживаются повсеместно, например, в воздухе, почве, воде, морских отложениях, пищевых продуктах и т.д.

Экологический, санитарно-гигиенический мониторинг среды обитания: объектов окружающей среды, воздуха рабочей зоны и продуктов питания, по химическому фактору проводится с использованием разнообразных методов аналитической химии, позволяющих решать в той или иной степени задачу определения содержания химических соединений в различных объектах. Однако этот подход имеет принципиальный недостаток, связанный с тем, что определение концентрации загрязнителей проводится в окружающей среде, а не в организме человека. Следствием этого является то, что оценка риска тяжести воздействия загрязнителей на человека может быть менее точна, чем в случае непосредственного измерения ксенобиотиков и их метаболитов в организме.

Для решения подобных задач используется метод биомониторинга, который основан на анализе соединений и/или их метаболитов в моче, крови, грудном молоке, волосах и др. Данный подход позволяет использовать живой организм как достаточно чувствительный детектор состояния объектов окружающей среды. Количество возможных метаболитов ПАУ для биомониторинга может достигать нескольких десятков, они распределяются особым образом в биологических жидкостях и органах-мишенях организма, исходя из индивидуальных свойств. Повышенный уровень метаболитов нафталина, флуорена, фенантрена и пирена говорит о недавнем воздействии (12-20 часов) смесей ПАУ.

Население в целом может подвергаться экспозиции ПАУ при курении табака или ингаляции загрязнённым воздухом, употреблении жареных и копчёных продуктов питания, а также продуктов питания выращенных в условиях загрязненной окружающей

среды. Помимо этого, персонал предприятий и заводов, которые термически обрабатывают горючие органические вещества: сланец, каменный уголь, нефть, смолы, деготь, битум и масла, контактируют с продуктами переработки, подвергаются экспозиции ПАУ в ещё больших объёмах.

Влияние ПАУ на организм характеризуется многофакторными мутагенными и канцерогенными последствиями. Это воздействие часто носит синергический взаимоотноотягощающий характер, что отражается на всех без исключения системах жизнеобеспечения организма. Множество исследований, проводимых в настоящее время в мире, доказывают, что развитие ряда заболеваний возникает вследствие контакта человека с ПАУ. Было установлено, что значительная доля обнаруженных случаев рака у человека имеет химическое происхождение [1] и в большинстве своём является результатом влияния негативных факторов окружающей среды [2]. В начале 1900-х годов учёные начали поиск возможных веществ, индуцирующих рак. В результате были выявлены: бензо[а]антрацен, дибензо[аh]антрацен, бензо[а]пирен и другие соединения ПАУ, у которых была исследована канцерогенная активность на экспериментальных животных [3]. Бензо[а]пирен наиболее распространён в исследованиях из-за его ярко выраженного эффекта вызывать образование опухолей, однако, имеются данные, что некоторые ПАУ, например, дибензо[аl]пирен, является ещё более мощными индукторами рака легких и кожи в экспериментальных системах [4, 5].

Международное Агентство по Изучению Рака (МАИР) классифицировало соединения ПАУ по канцерогенным свойствам в группы (таблица 1), например, бензо[а]пирен отнесен к 1 группе – вещество канцерогенное для человека и дибензо[аh]антрацен к 2А группе – вероятно канцерогенное для человека.

Таблица 1 – Канцерогенные свойства некоторых ПАУ по данным Международного Агентства по Изучению Рака (МАИР) [6]

Соединение ПАУ	Число колец	Группа
Пирен	4	3
Хризен	4	2В
Бензо[а]антрацен	4	2В
Бензо[б]флуорантен	5	2В
Бензо[к]флуорантен	5	2В
Бензо[а]пирен	5	1
Дибензо[аh]антрацен	5	2А
Дибензо[аh]пирен	6	2В
Дибензо[ai]пирен	6	2В
Дибензо[al]пирен	6	2А

Непосредственно ПАУ не вызывают тяжёлых нарушений биологических систем живых организмов, но этим действием обладают их метаболиты. После того как ПАУ попадают в организм - ингаляционно, кожно-резорбтивно, через желудочно-кишечный тракт с пищей – они метаболизируются в печени и почках, а затем экскретируются в желчь и мочу [7]. Молекулы ПАУ метаболизируются семейством цитохромоксидаз Р-450 и подвергаются модификации. На первой фазе биотрансформации первоначально образуются эпоксиды, которые могут затем преобразовываться в фенолы эпоксидгидролазой (фенольный путь). Также эпоксиды могут быть преобразованы в тетрагидротетрольные производные через дигидродиольные и дигидродиолэпоксидные промежуточные продукты (диолэпоксидный путь). Третьим путем биотрансформации ПАУ является каскад радикальных реакций с участием активных форм кислорода с образованием хинонов (радикальный путь). Стабильные производные, такие как фенолы, дигидродиолы, тетролы подвергаются дальнейшей биотрансформации ферментами второй фазы метаболизма с образованием глюкуронидных, сульфатных и глутатионных конъюгатов, которые выделяются в мочу или в желчь [8]. В процессе биотрансформации молекула ПАУ становится более гидрофильной, что облегчает её удаление из организма естественными путями. Такой механизм наиболее характерен для ПАУ с низкой молекулярной массой, например, для нафталина, флуорена, фенантрена и пирена. Но ПАУ с большим молекулярным весом могут метаболизироваться в более токсичные и/или канцерогенные метаболиты, которые медленно выводятся из организма, склонны к биоаккумуляции, например, бензо[а]пирен образует аддукты с белками и нуклеиновыми кислотами, которые нарушают их нормальное функционирование [9].

Понимание механизмов взаимодействия и путей биоактивации экспонированных ПАУ даёт возможность разрабатывать высокочувствительные и селективные методы обнаружения и определения этих метаболитов и, соответственно, адекватно оценивать риски тяжести воздействия ПАУ. Важно не только осуществлять постоянный контроль выбросов промышленных предприятий и осуществлять мониторинг объектов окружающей среды на содержание ПАУ и их смесей, но также следить за уровнем метаболитов ПАУ каждого человека, так или иначе подвергающегося экспозиции токсикантов.

Основными метаболитами нафталина, флуорена, фенантрена и пирена, выделяющимися в мочу в конъюгированной форме, являются: 1- и 2-гидрокси нафталин, 2-, 3-, 9-гидрокси флуорен, 1-, 2-, 3-, 4-гидрокси фенантрен и 1-гидрокси пирен. Концентрации этих метаболитов в моче могут варьироваться в широком диапазоне. Аналитическое определение следовых количеств метаболитов ПАУ усложняется высоким

фоновым содержанием сложных по химическому строению органических веществ, постоянно присутствующих в матрице (стероиды, метаболиты лекарственных веществ, коферменты и т.д.). Поэтому наиболее оправданным в этом случае является применение метода хромато-масс-спектрометрии.

Большое количество публикаций посвящено экспериментальным исследованиям уровней метаболитов ПАУ, например, в рамках программ биомониторинга [10]. Ряд исследований связан с разработкой методик измерений (МИ), направленных на повышение чувствительности, воспроизводимости, точности идентификации и определения [11]. Экспериментальные данные по концентрациям метаболитов, полученные с использованием таких МИ, позволяют адекватно оценивать уровень экспозиции ПАУ в когорте испытуемых.

Целью настоящей работы является разработка МИ, которая позволяет одновременно определять десять метаболитов ПАУ в моче человека с высокой чувствительностью, точностью и воспроизводимостью, а также проверка этой методики на отобранной когорте добровольцев с целью установления её пригодности.

Материалы

В работе использовались стандартные растворы изотопномеченых ($^{13}\text{C}_6$) и нативных моногидроксилированных ПАУ производства фирмы Cambridge Isotope Laboratories (CIL): 1-гидроксинафталин- $^{13}\text{C}_6$, 2-гидроксинафталин- $^{13}\text{C}_6$, 2-гидроксифлуорен- $^{13}\text{C}_6$, 9-гидроксифлуорен- $^{13}\text{C}_6$, 1-гидроксифенантрен- $^{13}\text{C}_4$, 2-гидроксифенантрен- $^{13}\text{C}_6$, 3-гидроксифенантрен- $^{13}\text{C}_6$, 1-гидроксипирен- $^{13}\text{C}_6$ и 1-гидроксинафталин, 2-гидроксинафталин, 2-гидроксифлуорен, 3-гидроксифлуорен, 9-гидроксифлуорен, 1-гидроксифенантрен, 2-гидроксифенантрен, 3-гидроксифенантрен, 4-гидроксифенантрен, 1-гидроксипирен. Также использовались ацетон, толуол, метиленхлорид, метанол, ацетонитрил, вода деионизованная, азид натрия, ацетат натрия, ледяная уксусная кислота, силикагель модифицированный C18, сульфат натрия, гелий марки 5.5, азот марки 5.5, аргон марки 5.5, N-Метил-N-(триметилсилил)-трифторацетамид (МСТФА), раствор β -глюкоронидаза/арилсульфатаза, тип Н-2 (100000 ед.Фишмана/мл и 800000 ед.Роя/мл).

Методы

Характеристики инструментального метода. При исследовании и разработке применялся инструментальный метод капиллярной газовой хроматографии в сочетании с масс-спектрометрическим детектированием. Система состояла из газового хроматографа (модель 7890) и масс-спектрометра (модель 5975 TAD) фирмы Agilent Technologies. В МИ регистрацию осуществляли как в сканирующем режиме (SCAN) от 50-500 а.е.м., так и в режиме регистрации выбранных ионов (SIM). Для хроматографического разделения была

использована неполярная капиллярная колонка ВРХ5 30 м × 0,25 мм × 0,25 мкм, газ-носитель гелий, скорость потока 0,74 см³/мин. Режим работы инжектора без деления потока (splitless). Температура инжектора 280 °С. Температурная программа: начальная температура колонки 95 °С выдерживалась 2 мин, затем со скоростью 15 °С/мин она нагревалась до 160 °С, далее со скоростью 10 °С/мин до 295 °С и со скоростью 40 °С/мин до 320 °С. Для повышения чувствительности масс-спектрометрического анализа был создан метод регистрации выбранных ионов (SIM). Он был оптимизирован по различным параметрам с целью получения наиболее интенсивного отклика масс-спектрометрической системы при регистрации характеристических ионов аналитов. Далее уже оптимизированный метод ГХ-МС использовался для последующего анализа градуировочных растворов и подготовленных проб мочи.

Подготовка проб к инструментальному анализу. Отбор проб мочи производился донором непосредственно в специальный стерильный контейнер в объёме не менее 50 см³. Далее контейнер с пробой маркировался и замораживался при минус 18 °С, а затем доставлялся в лабораторию для анализа. Перед исследованием образец размораживался при комнатной температуре и делился на аликвоты по 10 см³ – одна для определения концентраций аналитов, а остальные для исследования стабильности и воспроизводимости методики измерения. В случае длительного хранения добавлялся консервант азид натрия (0,01 – 0,1 %) и пробы замораживались при минус 70 °С.

Аликвота образца мочи 10 мл очищалась от бактериального загрязнения мембранным фильтром 0,22 мкм, а затем помещалась в колбу Эрленмейера с притёртой пробкой. В колбу вносили 10 мм³ раствора внутренних стандартов и 20 см³ 0,1 М раствора ацетатного буфера рН 5,5, содержащий смесь ферментов - глюкуронидаза/арилсульфатаза (10 мм³ энзима/см³ буфера). Колбу закрывали притёртой пробкой и помещали в воздушный шейкер-инкубатор при 37 °С на 20-21 ч. После ферментативного гидролиза колбу с образцом выдерживали при комнатной температуре 30 мин. Извлечение из гидролизата аналитов, лишённых глюкуронидных и сульфатных групп, проводили методом ТФЭ с использованием специального коллектора на 20 позиций. Применялась концентрирующая ТФЭ на С18 модифицированном силикагеле (картридж 500 мг, 6 мл), условия которой были тщательно оптимизированы для извлечения аналитов. Для реализации процедуры были осуществлены следующие основные стадии:

а) предварительная подготовка – доведение образца мочи до гомогенного состояния, исключая образование взвешенных частиц, суспензий и осадков путем центрифугирования, фильтрования осадка с последующим его перерастворением и возвратом в образец для предотвращения потери аналитов и их внутренних стандартов;

б) сольватация сорбента для его активации и обеспечения эффективного взаимодействия с водной матрицей и высокой степени извлечения аналита и его внутреннего стандарта;

в) уравнивание сорбента деионизованной водой и 0,1 М ацетатным буфером;

г) обеспечение нанесения образца на сорбент с минимальной скоростью для предотвращения потерь при проскоке;

д) промывка сорбента с нанесённым образцом смесью 30 % метанола в 0,1 М ацетатном буфере для отмывки от мешающих примесей;

е) сушка сорбента азотом для осуществления замены растворителя;

ж) элюирование аналитов и внутренних стандартов дихлорметаном через осушающий картридж с сульфатом натрия.

После ТФЭ осуществляли концентрирование экстрактов путём упаривания на роторно-плёночном испарителе досуха. Далее образец перерастворяли в ацетонитриле и переносили в вialу со вставкой. Полученный раствор подвергали дериватизации для ГХ-МС анализа силилирующим реагентом МСТФА в атмосфере аргона при температуре 60 °С в течение 30 мин. Далее анализировали пробу методом ГХ-МС.

Результаты и их обсуждение

При разработке МИ проведено исследование хроматографических и масс-спектрометрических характеристик аналитов с использованием соответствующих стандартов с целью определения оптимальных параметров для высокочувствительного и селективного измерения метаболитов ПАУ в моче человека, обеспечивающих надежность идентификации и точность определения. Времена удерживания дериватов аналитов в оптимизированных условиях газохроматографического разделения приведены в таблице 2. Значения m/z выбранных для регистрации характеристичных ионов дериватов аналитов приведены в таблице 2, а значения m/z дериватов изотопномеченых ($^{13}\text{C}_6$) моногидроксилированных ПАУ были больше на 6 единиц, соответственно.

Для установления градуировочной зависимости растворы готовились путём объединения стандартных растворов изотопномеченых ($^{13}\text{C}_6$) и нативных моногидроксилированных ПАУ в один исходный раствор с заданной концентрацией 10000 нг/дм³ и дальнейшего последовательного разбавления до концентрации 10 нг/дм³ каждого компонента. Для ГХ-МС анализа приготовленные растворы подвергались дериватизации МСТФА в условиях, описанных выше.

В условиях градуировки проводили по пять измерений каждого раствора, подвергнутого дериватизации (рисунок 1). Градуировочная зависимость считалась линейной, если коэффициент корреляции (R^2) при построении градуировочной

зависимости составлял не менее 99 %. Установленные градуировочные зависимости линейны в диапазоне концентраций аналитов 10-10000 нг/дм³ (таблица 2 и рисунок 1).

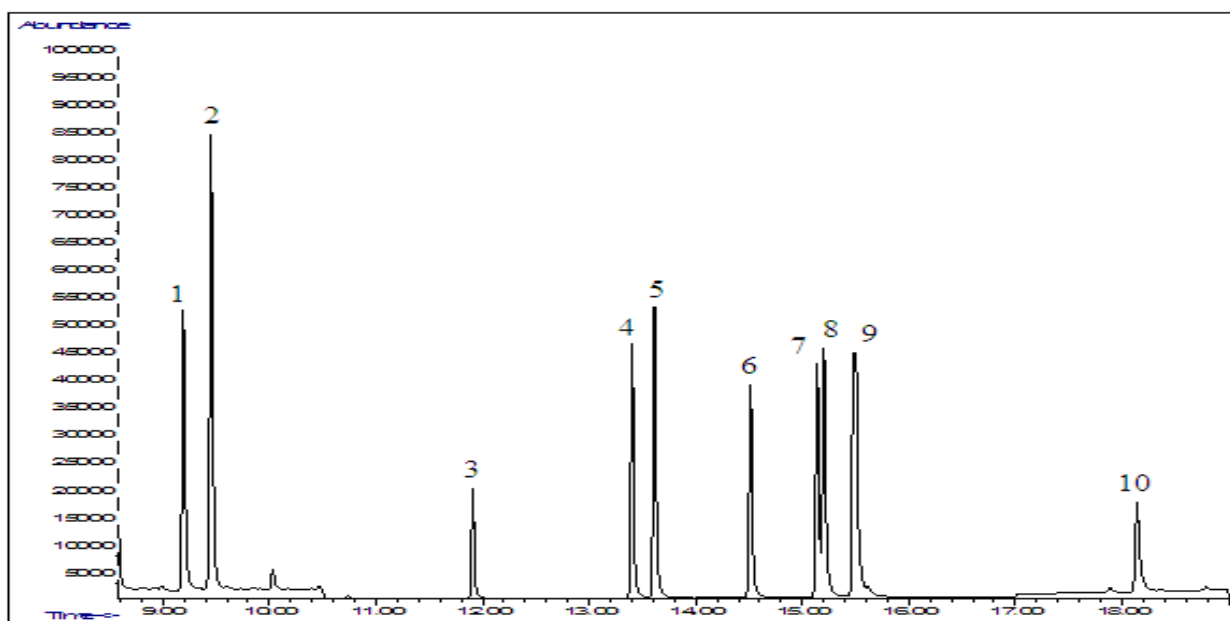


Рисунок 1 – Хромато-масс-спектрограмма градуировочного раствора 1000 нг/дм³ в режиме регистрации выбранных ионов (SIM)

Таблица 2 – Характеристики градуировочной зависимости метаболитов ПАУ

№ пика (рисунок 1)	Аналиты	Время удер., мин	m/z	Коэффициент корреляции, R ²	Y=KX
1	1-Гидроксинафталин	9,20 ± 0,1	216	0,9945	y=260,65x
2	2-Гидроксинафталин	9,46 ± 0,1	216	0,9959	y=352,71x
3	9-Гидроксифлуорен	11,92 ± 0,1	254	0,9956	y=189,07x
4	3-Гидроксифлуорен	13,42 ± 0,1	254	0,9966	y=305,20x
5	2-Гидроксифлуорен	13,62 ± 0,1	254	0,9960	y=370,96x
6	4-Гидроксифенантрен	14,53 ± 0,1	266	0,9952	y=311,01x
7	3-Гидроксифенантрен	15,15 ± 0,1	266	0,9922	y=264,76x
8	1-Гидроксифенантрен	15,22 ± 0,1	266	0,9954	y=361,07x
9	2-Гидроксифенантрен	15,50 ± 0,1	266	0,9919	y=351,03x
10	1-Гидроксипирен	18,15 ± 0,1	290	0,9967	y=194,98x

Также целью данного исследования, являлось определение содержания десяти метаболитов ПАУ в моче добровольцев. Для получения достоверной информации о взаимосвязи уровня метаболитов ПАУ в моче человека и уровня экспозиции ПАУ при проведении исследования необходимо было исключить воздействие факторов, оказывающих существенное влияние на поступление ПАУ из источников. К таким факторам относятся: профессиональное воздействие (связанное с эмиссией ПАУ), а также курение табака, прием лекарственных препаратов и поступление в организм с продуктами питания, приготовленными либо из загрязненных ингредиентов, либо потенциально

опасным способом (жаркой или копчением на углях и др.). Для апробации методики измерения была особым образом сформирована когорта добровольцев.

Отбор испытуемых для включения в когорту проводили по результатам анкетирования, с обязательным указанием: пола, года рождения, роста, веса, района проживания, характера работы, продолжительности рабочей недели в часах, отношения к курению табака (включая информацию о пассивном курении), описания рациона питания с учетом потребления в пищу продуктов, приготовленных потенциально опасным способом.

В результате с помощью разработанной МИ были определены концентрации десяти моногидроксилированных метаболитов ПАУ хромато-масс-спектрометрическим методом. Были идентифицированы и определены: 1-гидроксинафталин, 2-гидроксинафталин, 2-гидроксифлуорен, 3-гидроксифлуорен, 9-гидроксифлуорен, 1-гидроксифенантрен, 2-гидроксифенантрен, 3-гидроксифенантрен, 4-гидроксифенантрен и 1-гидроксипирен у когорты из 29 добровольцев, не подвергавшихся профессиональной экспозиции ПАУ. Типичная хромато-масс-спектрограмма образца мочи представлена на рисунке 2.

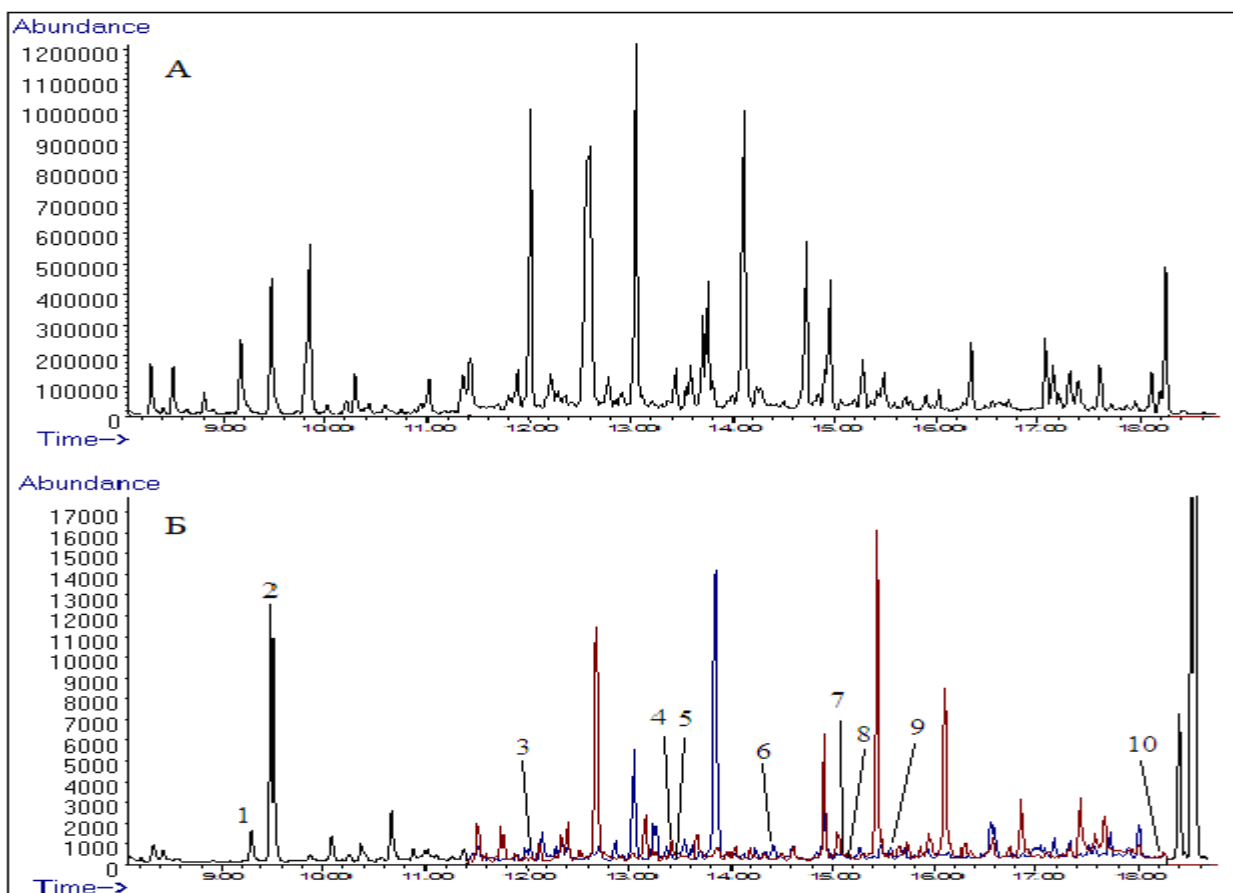


Рисунок 2 – Типичная хромато-масс-спектрограмма образца мочи по полному ионному току (А) и в режиме регистрации выбранных ионов (SIM) (Б).

Диапазон измеренных концентраций моногидроксилированных метаболитов ПАУ представлен в таблице 3. Предел определения составил около 10 нг/дм³.

Таблица 3 – Диапазон концентраций метаболитов ПАУ в моче человека

Биомаркер	Концентрация, нг/дм ³	Медиана, нг/дм ³
1-Гидроксинафталин	97 - 5200	551
2-Гидроксинафталин	640 - 14000	1 601
9-Гидроксифлуорен	94 - 1400	167
3-Гидроксифлуорен	150 - 830	203
2-Гидроксифлуорен	220 - 3100	515
4-Гидроксифенантрен	98 - 410	119
3-Гидроксифенантрен	120 - 550	202
1-Гидроксифенантрен	110 - 1500	245
2-Гидроксифенантрен	120 - 600	179
1-Гидроксипирен	27 - 540	120

На основании результатов апробации МИ десяти моногидроксилированных метаболитов ПАУ на добровольцах, не подвергающихся профессиональной экспозиции, можно сделать вывод о её пригодности. Концентрации, определённые в рамках этой работы коррелируют с данными, описанными в исследованиях [8, 10]. Благодаря использованию метода хромато-масс-спектрометрии, метода ТФЭ, применения изотопного разбавления и инструментального внутреннего стандарта, удалось добиться необходимой воспроизводимости и точности анализа для уверенного обнаружения и определения аналитов.

Заключение

Разработана МИ, которая позволяет одновременно определять десять моногидроксилированных метаболитов ПАУ в моче человека с высокой чувствительностью (10 нг/дм³), точностью и воспроизводимостью. Результаты её апробации на образцах мочи 29 добровольцев, не подвергающихся профессиональной экспозиции ПАУ, показали её работоспособность.

Концентрации моногидроксилированных метаболитов ПАУ, определённые в настоящем исследовании по разработанной МИ, вполне коррелируют с данными, описанными в литературных источниках. Следует отметить, что концентрации метаболитов ПАУ в моче имеют достаточно большой разброс, который обусловлен не только индивидуальными особенностями организма испытуемых, но связан с внешними факторами, такими как курение, питание, использование лекарственных препаратов и т.д. Уменьшению влияния внешних причин и индивидуальных особенностей организма, способствуют более тщательный выбор когорты испытуемых и мониторинг более

широкого спектра метаболитов, характеризующих другие пути биотрансформации (дигидродиолы, тетролы и их конъюгаты), соответственно.

Литература

1. Boyland E. The correlation of experimental carcinogenesis and cancer in man // Progress in Tumor Research. – 1969. – Vol. 11. – P. 222-234. doi: 10.1159/000391396.
2. Epstein S.S. Carcinogenicity as a public health hazard. Environmental determinants of human cancer // Cancer Res. – 1974. – Vol. 34. – P. 2425-2435.
3. Phillips DH. Fifty years of benzo(a)pyrene // Nature. – 1983. – Vol. 303. – P. 468–472. doi: 10.1038/303468a0.
4. Rengarajan T., Rajendran P., Nandakumar N., Lokeshkumar B., Rajendran P., Nishigaki I. Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons with special focus on cancer // Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. – 2015. – Vol. 5. – P. 182–189.
5. Manoli E., Kouras A., Karagkiozidou O., Argyropoulos G., Voutsas D., Samara C. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) at traffic and urban background sites of northern Greece: source apportionment of ambient PAH levels and PAH-induced lung cancer risk // Environ. Sci. Pollut. R. – 2016. – Vol. 23. – P. 3556–3568. doi: 10.1007/s11356-015-5573-5.
6. Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. // IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. – 2010. – Vol. 92. – P. 1–853.
7. Busbee D.L., Normal J.O., Ziprin R.L. Comparative uptake, vascular transport and cellular internalization of aflatoxin B1 and benzo[a]pyrene // Arch Toxicol. – 1990. – Vol. 64(4). – P. 285–290. doi: 10.1007/bf01972988.
8. Third National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals. Centers for Disease Control and Prevention. 2005. – Режим доступа: <https://www.cdc.gov/exposurereport/index.html>, свободный.
9. Shimada T. Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons // Drug Metabolic Pharmacokinetics. – 2006. – Vol. 21(4). – P. 257-276. doi: 10.2133/dmpk.21.257.
10. Li Z., Romanoff L.C., Trinidad D.A., Pittman E.N., Hilton D., Hubbard K., Carmichael H., Parker J., Calafat A.M., Sjödin A. Quantification of 21 metabolites of methylnaphthalenes and polycyclic aromatic hydrocarbons in human urine // Anal. Bioanal. Chem. – 2014. – Vol. 406(13). – P. 3119-3129. doi: 10.1007/s00216-014-7676-0.

11. Y. Wang, L. Meng, E. N. Pittman, A. Etheredge, K. Hubbard, D. A. Trinidad, K. Kato, X. Ye, A. M. Calafat. Quantification of Urinary Mono-hydroxylated Metabolites of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by on-line Solid Phase Extraction-High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry // Anal. Bioanal. Chem. – 2017. – Vol. 409(4). – P. 931–937. doi: 10.1007/s00216-016-9933-x