

## VALIDÁCIA STANOVENIA 1-HYDROXYPYRÉNU V MOČI METÓDOU HPLC

IVICA BAJUSOVÁ a ĽUBOMÍR LEGÁTH

*Klinika pracovného lekárstva a klinickej toxikológie Lekárskej fakulty Univerzity P. J. Šafárika Košice a Univerzitnej nemocnice L. Pasteura Košice, Rastislavova 43, 040 01 Košice*

*ivica.bajusova@gmail.com, lubomir.legath@upjs.sk*

Došlo 1.8.13, prepracované 17.2.14, prijaté 23.5.14.

Kľúčové slová: polycyklické aromatické uhľovodíky, 1-hydroxypyren, HPLC, moč

### Úvod

V pracovnom a životnom prostredí je v súčasnosti možné identifikovať niekoľko sto polycyklických aromatických uhľovodíkov (PAU) s rôznymi toxikologickými vlastnosťami. K významným priemyselným prevádzkam s expozíciou PAU patria prevádzky s koksárenským spracovaním čierneho uhlia, plynárne, prevádzky s elektrolytickou výrobou hliníka, železiarne, oceliárne<sup>1</sup>. Komplexná problematika emisií vypúšťaných do životného prostredia z koksovni je dnes stále aktuálna.

Charakteristickým štruktúrnym znakom PAU je kondenzovaný systém dvoch alebo viacerých aromatických jadier obsahujúcich uhlík a vodík s jadrami spojenými párom atómov uhlíka. Zdrojom PAU v pracovnom prostredí je pyrolýza alebo nedokonalé spaľovanie látok organického pôvodu (koks, decht, smola, asfalt, olej)<sup>1</sup>. Zmes produktov pyrolýzy závisí od spaľovanej látky, teploty a dĺžky horenia. PAU sa emitujú ako plyny zo zóny horenia a kondenzujú na časticiach sadzí alebo sa formujú na malé častice. Tieto procesy vedú k vzniku zmesi rôznych PAU. Dominujú zlúčeniny s tromi a štyrmi jadrami, karcinogénne sú zlúčeniny s piatimi až šiestimi aromatickými jadrami<sup>1,2</sup>. K najvýznamnejším zlúčeninám PAU v pracovnom prostredí patria naftalén, antracén a benzo(a)pyrén<sup>2</sup>. Akútnu formu expozície PAU charakterizujú bolesti hlavy, nauzea, zvracanie, slzenie, hemolytická anémia, dermatitída, kožný erytém, pálenie, svrbenie, slzenie<sup>1</sup>. PAU sa do organizmu dostávajú inhaláciou, tráviacim systémom a čiastočne pokožkou<sup>2</sup>. PAU sa po resorbovaní do organizmu biotransformujú. V priebehu I. fázy metabolickej aktivity, epoxidácie prostredníctvom enzymatickej katalýzy cytochrómom P-450, vznikajú medziprodukty – PAU-epoxidy. Reaktívne epoxidy môžu byť konjugované s glutatiónom (detoxikačná reakcia). Epoxidy, ktoré nie sú konjugované s glutatiónom, sa ďalej transformujú na feno-

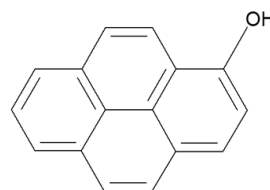
ly alebo dioly. Napr. pyrén sa metabolizuje na 1-hydroxypyren (1-HOP). 1-HOP však nie je dostatočne polárny, a preto sa v II. fáze biotransformácie spája, konjuguje s endogénnou látkou kyselinou glukuronovou, za vzniku netoxického konjugátu 1-HOP-glukuronidu (1-HOP-Glu). 1-HOP-Glu je polárnejší a biologicky menej aktívny než pôvodná látka. 1-HOP a jeho glukuronidový konjugát 1-HOP-Glu sú akceptovateľnými biomarkermi expozície PAU. Okrem nich možno sledovať i vylučovanie iných minoritných markerov, napr. 3-hydroxybenzo(a)pyrén alebo 7,8,9,10-tetrahydroxybenzo(a)pyrén<sup>3</sup>. Najuniverzálnejším testom monitorovania expozície PAU však ostáva stanovenie koncentrácie 1-HOP v moči<sup>4</sup> (obr. 1). Stanovenie 1-HOP v moči metódou HPLC s fluorescenčnou detekciou umožňuje stanoviť 1-HOP aj po uvoľnení z komplexu 1-HOP-Glu po enzymatickej hydrolyze (preanalytická fáza metódy).

Podľa Medzinárodnej agentúry pre výskum rakoviny (International Agency for Research on Cancer, IARC) patria sadze, čiernouhoľný decht a smola medzi dokázané humánne karcinogény (skupina 1). Benzo(a)pyrén, najčastejšie sa vyskytujúci indikátor PAU a kreozoty patria medzi pravdepodobné karcinogény (skupina 2A) s cieľovými orgánmi pľúca a koža<sup>2</sup>.

V Slovenskej republike sa na biologické monitorovanie expozície PAU odporúča stanovenie koncentrácie 1-HOP v moči. Pre 1-HOP je biologická medzná hodnota (BMH) legislatívou upravená na hodnotu 5,66  $\mu\text{g l}^{-1}$  1-HOP, resp. 3,77  $\mu\text{g g}^{-1}$  kreatinínu 1-HOP v moči. BMH sa uvádzajú ako orientačné hodnoty v  $\mu\text{g}$  zisťovaného faktora na 1000 mg kreatinínu za predpokladu, že obsah kreatinínu v moči je 1500  $\text{mg l}^{-1}$  moču<sup>5</sup>.

Chromatografické stanovenie 1-HOP v moči je analyticky najrozšírenejším testom biomonitorovania expozície PAU. Biomarker 1-HOP v moči je možné stanoviť metódou LC/MS<sup>6</sup>, alebo HPLC-ED<sup>7,8</sup>. K najčastejšie používaným technikám stanovenia patrí metóda HPLC s fluorescenčnou detekciou<sup>9–15</sup>. Na separáciu hydrolyzovanej matrice sa používajú extrakčné techniky. Publikované sú významné schémy rýchlej a selektívnej prípravy moču pred vlastným stanovením 1-HOP, ako SPE extrakcia (cit.<sup>6,11–13,15</sup>), alebo v rutinnej laboratórnej praxi vytlačaná LLE extrakcia<sup>9</sup>.

V článku je popísaná validácia už publikovanej metódy na stanovenie 1-HOP v moči technikou HPLC<sup>13,16</sup>, ktorú sme uviedli do rutinnej klinickej praxe, ako diagnostic-



Obr. 1. Štruktúrny vzorec 1-hydroxypyrenu, biomarkera expozície PAU

ky najvhodnejší postup biologického monitorovania pracovníkov exponovaných PAU.

## Experimentálna časť

### Chemikálie

1-HOP (98 %) a acetonitril (99,9 %) kvality HPLC boli získané od firmy Sigma-Aldrich (USA). Metanol (99,9 %) kvality HPLC a octan sodný bezvodý p.a. od firmy Merck (Nemecko). Na enzymatickú hydrolyzu bol použitý stabilizovaný vodný roztok enzýmu  $\beta$ -glukuronidáza/arylová sulfatáza z *Helix pomatia* od firmy Merck (Nemecko). Certifikovaný referenčný materiál (CRM) Clin Chek, kat.č. 8869, lyofilizovaný humánný moč s obsahom 1-HOP v dvoch rôznych koncentračných hladinách  $3,4 \mu\text{g l}^{-1}$  ( $2,2\text{--}4,6 \mu\text{g l}^{-1}$ ) a  $18,0 \mu\text{g l}^{-1}$  ( $13,0\text{--}23,0 \mu\text{g l}^{-1}$ ) bol získaný od firmy Recipe (Nemecko). Deionizovaná voda bola pripravená v laboratóriu zariadením Aqual 35, firmy Mercis Slovakia (Slovensko).

### Prístroje a zariadenia

Na separáciu a stanovenie 1-HOP v moči bol použitý kvapalinový chromatograf Shimadzu LC 20 Prominence (Japonsko) s fluorescenčným detektorom RF-10 AXL (excitácia pri 242 nm, emisia pri 388 nm). Na separáciu pri teplote  $30^\circ\text{C}$  bola použitá analytická kolóna Discovery® HS C18,  $15 \text{ cm} \times 4,6 \text{ mm}$ ;  $5 \mu\text{m}$  a predkolónka Supelguard® Discovery C18,  $2 \text{ cm} \times 4,6 \text{ mm}$ ;  $5 \mu\text{m}$  (Supelco, USA). Ako mobilná fáza bola použitá zmes acetonitril : voda ( $60 : 40$ , v/v), s prietokom  $1,0 \text{ ml min}^{-1}$ . Dávkovaný konečný objem vzorky na chromatografickú kolónu bol  $30 \mu\text{l}$ .

SPE extrakcia bola uskutočnená na dvanásťpolohovom vákuovom extraktore Visiprep SPE Vacuum Manifold (Supelco, USA) s použitím SPE kolóniek LiChrolut® RP-18,  $100 \text{ mg ml}^{-1}$  (Merck, Nemecko). Na prípravu zásobného roztoku 1-HOP bol použitý ultrazvukový prístroj Elmasonic S15H (Chromservis, Slovensko). Na enzymatickú hydrolyzu vzorky moču bola použitá trepacia vodná kúpeľ GFL 1083 (Labortechnik, Nemecko).

### Príprava štandardných roztokov

Zásobný roztok 1-HOP s koncentráciou  $1 \text{ mg ml}^{-1}$  bol pripravený rozpustením  $100 \text{ mg}$  1-HOP v  $100 \text{ ml}$  metanolu za pomoci ultrazvuku pri laboratórnej teplote. Pracovné roztoky s rádovo nižšími koncentraciami 1-HOP boli pripravené riedením zásobného roztoku metanolom. Uvedené pracovné roztoky štandardu boli uchovávané v chladničke, pri teplote  $2\text{--}8^\circ\text{C}$ .

Z pracovného roztoku 1-HOP ( $100 \mu\text{g l}^{-1}$ ) boli postupným riedením pripravené roztoky na získanie kalibračnej závislosti v rozsahu  $0,5\text{--}20,0 \mu\text{g l}^{-1}$  1-HOP. Na riedenie bol použitý moč od zdravého darcu, ktorý nebol exponovaný PAU. Kalibračná závislosť bola zostrojená použi-

tím šiestich roztokov štandardu 1-HOP v moči s koncentraciami  $0,5 ; 1,0 ; 5,0 ; 10,0 ; 18,0$  a  $20,0 \mu\text{g l}^{-1}$  1-HOP.

### Príprava vzoriek biologického materiálu

Moč na stanovenie 1-HOP bol odoberaný do plastových skúmaviek. Vzorky moču boli získané od pracovníkov exponovaných PAU v čase, keď bola predpokladaná koncentrácia analytu v moči najvyššia, t.j. na konci pracovnej zmeny, koncom pracovného týždňa. K  $5 \text{ ml}$  moču bolo pridaných  $5 \text{ ml}$   $0,2 \text{ M}$  octanového tlmivého roztoku ( $\text{pH } 5$ ). Zmes sa enzymaticky hydrolyzovala pôsobením enzýmu  $\beta$ -glukuronidáza/arylová sulfatáza, po dobu  $16$  hodín, v trepacej vodnej kúpeli pri teplote  $37^\circ\text{C}$  (cit.<sup>16</sup>). Enzým  $\beta$ -glukuronidáza/arylová sulfatáza hydrolyzoval konjugovaný glukuronid 1-HOP-Glu na glukuronát a 1-HOP.

### SPE extrakcia 1-HOP z biologickej matrice

Vyšetrovaný analyt 1-HOP bol extrahovaný z moču upraveného enzymatickou hydrolyzou, použitím SPE extrakcie, mierne modifikovaným postupom podľa<sup>13,17</sup>. Kondicionovanie SPE kolónky sa uskutočnilo premytím  $2 \text{ ml}$  metanolu a  $2 \text{ ml}$  deionizovanej vody. Na aktivovanú extrakčnú kolónku bol aplikovaný  $1 \text{ ml}$  moču. Kolónka bola premytá  $3 \text{ ml}$  deionizovanej vody. Na elúciu zadržaného analytu bol použitý  $1 \text{ ml}$  metanolu. Eluát bol následne zachytávaný do vialky a výstupný supernatant v objeme  $30 \mu\text{l}$  bol použitý na HPLC analýzu.

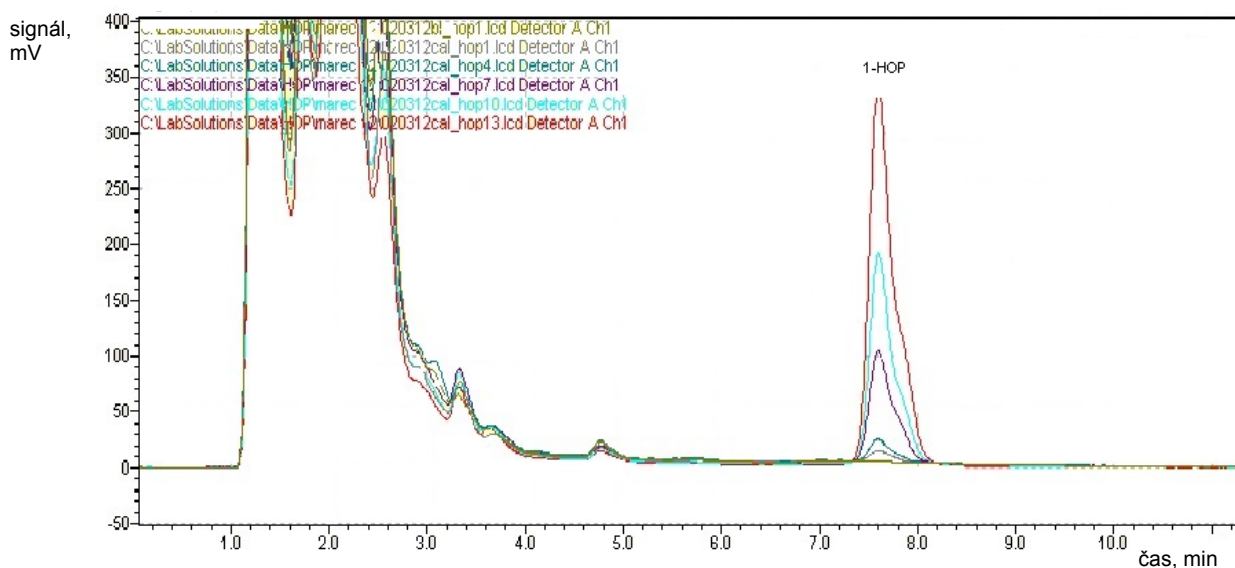
## Výsledky a diskusia

Validácia metódy ako proces stanovenia analytických požiadaviek a potvrdení, že metóda má výkonnostné parametre porovnateľné s parametrami, ktoré jej použitie vyžaduje, bola prevedená podľa ICH Harmonised Tripartite Guideline<sup>18</sup>.

### Potvrdenie identity a špecifickosti metódy

Na identifikáciu štandardu 1-HOP bol použitý jeho retenčný čas ( $t_R$ ), ktorý bol za našich uvedených experimentálnych podmienok  $7,5 \text{ min}$  (obr. 2).

Špecifickosť HPLC metódy je schopnosť stanoviť 1-HOP v prítomnosti zložiek, ktorých prítomnosť môžeme očakávať, napr. nečistoty alebo produkty rozkladu vyšetrovanej matrice, moču. Pri analýze blanku (obr. 2) sme nezaznamenali vplyv matrice, resp. iné so sledovaným analytom 1-HOP interferujúce alebo koelujúce látky, čím sme potvrdili špecifickosť našej HPLC metódy. Blankom bol moč dodaný od pacienta, nefajčiara, profesionálne neexponovaného PAU.



Obr. 2. Chromatogramy blanku a moču s prídavkami štandardov 1-HOP ( $t_R = 7,5$  min). Koncentrácie 1-HOP v moči sú 0,5; 1,0; 5,0; 10,0 a 20,0  $\mu\text{g l}^{-1}$  1-HOP

#### Pracovný rozsah a linearita

Pre HPLC metódu bol nastavený rozsah koncentrácií 1-HOP, v ktorom bude metóda aplikovaná nielen na neexponovanú časť populácie, ale aj na vyšetrovanie vzoriek moču u PAU exponovaných pracovníkov. Na obr. 2 je po SPE extrakcii zázornený chromatogram HPLC analýzy moču aj s prídavkom roztokov jednotlivých kalibračných štandardov 1-HOP, ktoré boli použité na zostrojenie kalibračnej závislosti. Slepou vzorkou bol natívny moč, získaný od darcu neexponovaného PAU. Odozva fluorescenčného detektora bola lineárna v rozsahu koncentrácií 0,5–20,0  $\mu\text{g l}^{-1}$ , čo zahŕňalo nami sledované terapeutické rozmedzie (obr. 3). Každý zo šiestich roztokov kalibračného štandardu bol dávkaný trikrát. Regresná rovnica kalibračnej závislosti pre sledovaný analyt, 1-HOP v moči po SPE extrakcii bola  $y = 281463x + 61721$  s korelačným

koefficientom  $r = 0,9994$ ; kde  $y$  je odozva fluorescenčného detektora, plocha píku 1-HOP ( $\text{mV min}$ ) a  $x$  je koncentrácia 1-HOP ( $\mu\text{g l}^{-1}$ ).

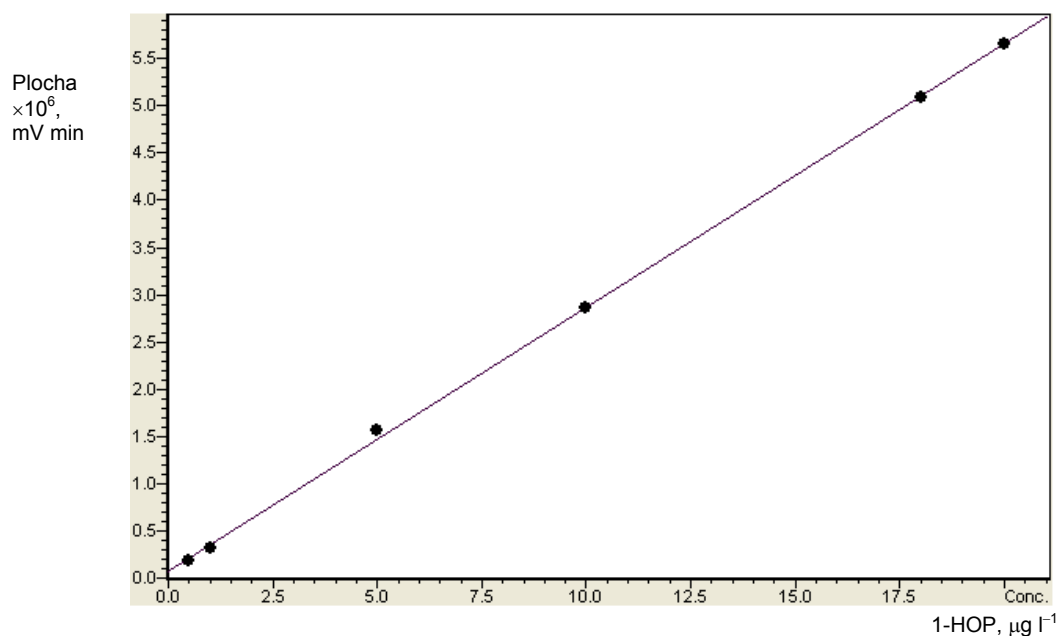
#### Medza detekcie (LOD) a medza stanoviteľnosti (LOQ) metódy

Hodnoty LOD a LOQ boli určené zo smerodajnej odchýlky opakovaných meraní slepých vzoriek. Hodnoty LOD a LOQ odpovedali trojnásobku, resp. desiatnásobku smerodajnej odchýlky signálu slepého pokusu. Hodnoty LOD a LOQ pre HPLC stanovenie 1-HOP v moči boli 0,08  $\mu\text{g l}^{-1}$  a 0,26  $\mu\text{g l}^{-1}$ . Dosiagnuté výsledky sú vyššie ako v podobných prácach<sup>11,13</sup>, ale porovnateľné s hodnotami LOD pre 1-HOP uvedenými napr. v publikácii<sup>19</sup>.

#### Tabuľka I

Presnosť stanovenia biomarkera 1-HOP v moči metódou HPLC

Biomarker 1-HOP [ $\mu\text{g l}^{-1}$ ]	Presnosť	Koncentrácia 1-HOP Priemer (SD) [ $\mu\text{g l}^{-1}$ ]	RSD [%]
1,0	opakovateľnosť	0,83 (0,08)	9,8
	reprodukovateľnosť	0,74 (0,06)	8,6
10,0	opakovateľnosť	9,86 (0,71)	7,2
	reprodukovateľnosť	9,92 (0,68)	6,9
20,0	opakovateľnosť	19,25 (1,13)	5,9
	reprodukovateľnosť	19,59 (0,93)	4,8

Obr. 3. Oblasť lineárnej odozvy detektora ( $0,5\text{--}20,0 \mu\text{g l}^{-1}$  1-HOP)

#### Presnosť metódy

Presnosť metódy sme overovali ako opakovateľnosť a vyjadrili hodnotou RSD (%) z desiatich opakovaných meraní vzoriek moču, ktoré sme uskutočnili v jeden deň. Opakovateľnosť sme určili v troch koncentračných hladinách 1,0, 10,0 a 20,0  $\mu\text{g l}^{-1}$  1-HOP. Výsledky sú uvedené v tab. I, z ktorej vyplýva, že dosiahnutá opakovateľnosť HPLC analýzy vyjadrená ako RSD v oboch koncentračných úrovniach neprekročila 9,8 %. V práci Pires de Rego bola hodnota RSD pod 8 % (cit.<sup>13</sup>), alebo v práci Lee bola pod 10 % (cit.<sup>16</sup>).

Reprodukovateľnosť sme určili opakovaným stanovením jednej vzorky moču v troch vybraných koncentračných hladinách 1,0, 10,0 a 20,0  $\mu\text{g l}^{-1}$  1-HOP, počas šiestich rôznych dní. Hodnoty RSD pri oboch sledovaných koncentráciách 1-HOP neboli vyššie než 8,6 %, ako dokumentuje tab. I. V práci Kawamota bola pri koncentrácii 1,0  $\mu\text{g l}^{-1}$  1-HOP hodnota RSD 10,7 % (cit.<sup>11</sup>).

#### Správnosť, výťažnosť metódy

Správnosť metódy (jej výťažnosť) bola overovaná analýzou CRM pre 1-HOP pri dvoch rôznych koncentráciách 1-HOP (tab. II). Analýza jednotlivých CRM sa zopakovala štyrikrát. Výťažnosť 1-HOP v oboch koncentračných hladinách po SPE extrakcii bola 78,8–93,5 %. Hodnoty získaných výťažností sa blížili podobným údajom publikovaným v literatúre<sup>12,13</sup>. Ako poznámku uvádzame, že v rámci preanalytickej fázy stanovenia bol 1-HOP izolovaný z moču aj LLE extrakciou podľa postupu<sup>9</sup> (z ekonomických, časových dôvodov). Moč sa po uvedenej enzymatickej hydrolyze zmiešal s metanolom a pri laboratórnej teplote 25 °C ultrazvukoval v lázni po dobu 4 minút. Získaných 30  $\mu\text{l}$  supernatantu (nutná predkolónka) bolo použitých na chromatografickú analýzu. Výťažnosť získaná uvedeným postupom bola v porovnaní s SPE extrakciou nižšia, 75 % (vyjadrená na koncentračnej úrovni CRM Level I 3,4  $\mu\text{g l}^{-1}$  1-HOP). V našich laboratórnych

Tabuľka II

Správnosť stanovenia biomarkera 1-HOP v moči metódou HPLC

CRM pre 1-HOP [ $\mu\text{g l}^{-1}$ ]	Koncentrácia 1-HOP Priemer (SD) [ $\mu\text{g l}^{-1}$ ]	RSD [%]	Výťažnosť [%]
Level I : 3,4 (2,2–4,6)	2,68 (0,33)	12,4	78,8
Level II : 18,0 (13,0–23,0)	16,83 (0,99)	5,7	93,5

## Tabuľka III

Správnosť HPLC metódy stanovenia 1-HOP v moči na úrovni externého hodnotenia kvality Ústavom a Klinikou pracovného lekárstva, sociálnej a environmentálnej medicíny Univerzity Erlangen-Nuremberg, G-EQUAS 51, v roku 2013

Biomarker 1-HOP	Dosiahnutý výsledok [ $\mu\text{g l}^{-1}$ ]	Referenčná hodnota [ $\mu\text{g l}^{-1}$ ]	Deklarované tolerančné rozmedzie [ $\mu\text{g l}^{-1}$ ]
A	0,19	0,23	0,11–0,35
B	0,44	0,49	0,31–0,67

podmienkach bola jednoznačne uprednostnená SPE extrakcia 1-HOP z moču.

## Robustnosť metódy

Pri testovaní robustnosti metódy bol sledovaný vplyv zmeny zloženia mobilnej fázy ( $60 \pm 2$  % acetonitrilu) a teploty kolóny ( $30 \pm 2$  °C) na retenciu a plochu pík 1-HOP. So zvyšujúcim sa podielom organickej zložky mobilnej fázy a so zvyšujúcou sa teplotou kolóny sa retenčný čas 1-HOP znižoval.

Pri zmene zloženia mobilnej fázy bol retenčný čas 1-HOP v intervale 6,73–8,46 min. Plocha píku bola v rozmedzí 98,6–102,1 % (plocha píku za optimálnych analytických podmienok bola 100 %). Zmena teploty kolóny spôsobila len malú zmenu v retenčných časoch (7,35–7,70 min) a ploche píku 1-HOP (97,7–98,4 %). Získané výsledky potvrdzujú robustnosť metódy.

## Verifikácia metódy

Overenie správnosti HPLC metódy na úrovni externého hodnotenia kvality bolo uskutočnené zapojením sa laboratória do cyklu hodnotenia kvality Ústavom a Klinikou pracovného lekárstva, sociálnej a environmentálnej medicíny Univerzity Erlangen-Nuremberg, Nemecko v jednom z kontinuálnych programov pre vzájomné porovnávanie toxikologických analýz v biologickom materiáli pre pracovné lekárstvo a environmentálnu medicínu, G-EQUAS 51, v roku 2013. Výstupy hodnotenia kvality pre biomarker 1-HOP v moči sú zdokumentované v tab. III. Výsledky nášho pracoviska, stanovenie koncentrácie 1-HOP pre dve vzorky A a B, sa nachádzali v tolerančnom rozmedzí deklarovanom Ústavom a Klinikou pracovného lekárstva, sociálnej a environmentálnej medicíny Univerzity Erlangen-Nuremberg. Výsledky pre naše pracovisko boli vyhodnotené pozitívne.

## Záver

Expozícia polycyklickým aromatickým uhl'ovodíkom predstavuje riziko pre ľudský organizmus. Metabolit pyrénu, 1-hydroxypyrén, je v praxi využívaným biomarkerom sledovania profesionálnej alebo neprofesionálnej (napr. nikotinizmus) expozície polycyklickým aromatickým uhl'ovodíkom. Článok sa zaoberá validáciou HPLC metódy

na stanovenie 1-HOP v moči. Pre následné použitie metódy v klinickej praxi je dôležité, aby sa vyznačovala efektívnou úpravou vzorky biologického materiálu, čo predstavuje SPE extrakcia. Hodnoty LOD a LOQ pre HPLC stanovenie 1-HOP v moči sú  $0,08 \mu\text{g l}^{-1}$  a  $0,26 \mu\text{g l}^{-1}$ . Presnosť a správnosť vyjadrené prostredníctvom hodnôt RSD sú nižšie ako 9,8 %. Výťažnosť sa pohybuje v rozmedzí 78,8–93,5 %. Metóda HPLC s citlivou fluorescenčnou detekciou je vhodnou metódou pre rutinné stanovenie 1-hydroxypyrénu v moči ako biomarkera expozície karcinogénnym PAU.

## LITERATÚRA

1. Tuček M., Bencko V., Volný J., Petánová J.: *Cesk. Prac. Lek.* 2, 72 (2006).
2. Buchancová J. (ed.): *Pracovné lekárstvo a toxikológia*. Vydavateľstvo Osveta spol s r.o., Martin 2003.
3. Strickland P., Kang D., Sithisarankul P.: *Environ. Health Perspect.* 104, 5 (1996).
4. Jongeneelen F. J.: *Ann. Occup. Hyg.* 45, 1 (2001).
5. Nariadenie vlády SR č. 471/2011, ktorým sa mení a dopĺňa nariadenie vlády SR č. 355/2006 Z. z. o ochrane zamestnancov pred rizikami súvisiacimi s expozíciou chemickým faktorom pri práci v znení nariadenia vlády SR č. 300/2007 Z. z., *Zbierka zákonov č. 471/2011, časť 142, str. 3858*.
6. Fan R., Dong Y., Zhang W., Wang Y., Yu Z., Sheng G., Fu J.: *J. Chromatogr. B* 836, 92 (2006).
7. Berek J., Bencko V., Cvačka J., Mejstřík V., Slámová A., Švagrová I., Zima J.: *Chem. Listy* 91, 871 (1997).
8. Yosypchuk O., Berek J.: *Chem. Listy* 104, 61 (2010).
9. Shahtaheri S. J., Ibrahim L., Golbabaie F., Hosseini M., Fouladi B.: *Iran. J. Public Health* 35, 33 (2006).
10. Ichiba M., Ogawa Y., Mohri I., Kondoh T., Horita M., Matsumoto A., Yoshida R., Matsumoto Y., Saito H., Ohba K., Yamashita Z., Tomokuni K.: *J. Occup. Health* 49, 159 (2007).
11. Kawamoto, T., Yang, M., Kim Y. D., Kim H., Oyama T., Isse T., Matsuno K., Katoh T., Uchiyama I.: *J. Occup. Health* 49, 183 (2007).
12. Chen H. W.: *Anal. Sci.* 23, 1221 (2007).
13. Pires de Rego E. C., Duarte Pereira Netto A.: *XIX. IMEKO World Congress Fundamental and Applied Metrology*. 2613 (2009), <http://www.imeko.org/>

- publications/wc-2009/IMEKO-WC-2009-TC24-448.pdf, stiahnuté z internetu 25.1.2014.
14. Van Rooij J. G. M., Jongeneelen F. J.: *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 83, 105 (2010).
  15. Ivan J., Hudák A., Szeghyová Z., Verbová E., Majoroš J.: *Prac. Lek.* 63, 63 (2011).
  16. Lee K. H., Byeon S. H.: *Int. J. Environ. Res.* 4, 439 (2010).
  17. Shahtaheri S. J., Ibrahimi L., Golbabaee F., Hosseini M., Fouladi B.: *Iran. J. Chem. Chem. Eng.* 26, 75 (2007).
  18. ICH Harmonised Tripartite Guideline, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1), Geneva (2005).
  19. Pan C. H., Chan C. C., Huang Y. L., Wu K. Y.: *Occup. Environ. Med.* 65, 732 (2008).

**I. Bajusová and E. Legáth** (*Department of Occupational Medicine and Clinical Toxicology, Faculty of Medicine, P. J. Šafárik University, Košice and L. Pasteur University Hospital, Košice, Slovakia*): **Validation of HPLC Determination of 1-Hydroxypyrene in Urine**

Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) is a serious hazard for human health. 1-Hydroxypyrene (1-HOP), a major metabolite of pyrene, is used as a biomarker for the assessment of an exposure to PAH. The article deals with the validation of the HPLC determination of 1-HOP with fluorescence detection. 1-HOP was isolated from urine by solid phase extraction. The detection and quantification limits are 0.08 and 0.26  $\mu\text{g l}^{-1}$ , respectively. RSD of precision and accuracy are lower than 9.8 %. The recoveries are 78.8–93.5 %. This method can be used to determine and monitor the urinary 1-HOP in workers exposed to PAH.