

TARTU ÜLIKOOL
Loodus- ja täppisteaduste valdkond
Keemia instituut
Analüütilise keemia õppetool

Sofia Nazarova

**LC-MS analüüsimetoodika arendamine polütsükliliste aromaatsete
süsivesinike biomarkerite määramiseks**

Bakalaureusetöö (12 EAP)

Keemia

Juhendajad: kaasprofessor Koit Herodes
Michaela Hříbková, MSc

Tartu

2025

LC-MS analüüsimetoodika arendamine polütsükliliste aromaatsete süsivesinike biomarkerite määramiseks

Töö eesmärk oli välja töötada madalate määramispiiridega ja selektiivne LC-MS metoodika polütsükliliste aromaatsete süsivesinike metaboliitide määramiseks uriinis. Polütsüklilised aromaatsed süsivesinikud on tuntud oma toksiliste ja kantserogeensete omaduste poolest, mistõttu on oluline uurida nendega kokkupuudet biomarkerite (näiteks hüdroksüderivaatide) kaudu. Uuritavateks ühenditeks olid 1-hüdroksüpüreen, 1-hüdroksünaftaleen, 2-hüdroksünaftaleen ja 2-hüdroksüfluoreen. Analüütide lahutamiseks kasutati pöördfaaskromatograafiat, kus eluentidena kasutati atsetonitriili ja vee segu. Detekteerimiseks rakendati kolmekordse kvadрупooliga massispektromeetrit valitud ülemineku jälgimise režiimis.

Märksõnad: LC-MS, PAH, polütsüklilised aromaatsed süsivesinikud, 1-hüdroksüpüreen, uriin
CERCS: P300, Analüütiline keemia

Development of an LC-MS Method for Determination Biomarkers of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons

The aim of this study was to develop and optimize LC-MS method with a low quantitation limit for determining polycyclic aromatic hydrocarbon residues in urine. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are known for their toxic and carcinogenic properties, making it essential to study human exposure through their metabolites such as hydroxylated PAH (OH-PAH). The target compounds included 1-hydroxypyrene, 1-hydroxynaphthalene, 2-hydroxynaphthalene, and 2-hydroxyfluorene. Reversed-phase chromatography with acetonitrile and aqueous solution as eluents was selected for analyte separation. Detection was performed using a triple quadrupole mass spectrometer in multiple reaction monitoring mode.

Keywords: LC-MS, PAH, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, 1-hydroxypyrene, urine

CERCS: P300, Analytical chemistry

SISUKORD

1. SISSEJUHATUS.....	7
2. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	8
2.1. Polütsüklilised aromaatsed süsivesinikud	8
2.2. Polütsükliliste aromaatsete süsivesinike analüüsimise meetodikast.....	11
2.3. Polütsükliliste aromaatsete süsivesinike metaboliitide määramine	11
2.4. Analüüsimeetod.....	12
2.4.1. Kõrgefektiivne vedelikkromatograafia elektropihustusionisatsiooni massispektromeetria	12
2.4.2 Kõrgefektiivne vedelikkromatograafia.....	13
2.4.3. Eluendi valimine	14
2.4.4. Elektropihustusionisatsioon	15
2.4.5. Massispektromeetria.....	16
2.4.6. Muud võimalikud meetodid	16
2.5. Prooviettevalmistus	17
2.5.1. Ensümaatiline lagundamine	17
2.5.2. Tahkefaasi ekstraktsioon	17
3. EKSPERIMENTAALNE OSA.....	19
3.1. Aparatuur.....	19
3.2. Kasutatud kemikaalid	19
3.3. Standardlahuse valmistamine	19
3.4. Kalibreerimislahuste valmistamine	20
3.5. Mõõtmise meetodika	21
3.6. Tarkvara ja andmeanalüüs.....	22
4. TULEMUSTE ARUTELU	23
4.1. Vedelikkromatograafia parameetrite optimeerimine	23
4.2. Massispektromeetria parameetrite optimeerimine	26
4.3. Analüütide kinnitavad ioonid	31

4.4. Meetodi lineaarse ala ja instrumentaalse avastamispiiri määramine	32
4.5. Valideerimine.....	35
4.6. Metoodika arendamise järgmised etapid.....	37
KOKKUVÕTE.....	38
SUMMARY	39
KASUTATUD KIRJANDUS	40
LISAD.....	42
Lisa 1. ValChromi valideerimisplaan.....	42
Lisa 2. Valideerimise tulemused	45
Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks	47

KASUTATUD LÜHENDID

ESI (ingl *electrospray ionisation*) – elektropihustusionisatsioon

GC-MS (ingl *gas chromatography-mass spectrometry*) – gaas-kromatograafia - massispektromeetria

HFIP (ingl *hexafluoroisopropanol*) - 1,1,1,3,3,3-heksafluoro-2-propanool (heksafluoroisopropanool)

HPLC (ingl *high-performance liquid chromatography*) - kõrgefektiivne-vedelikkromatograafia

LC-MS (ingl *liquid chromatography-mass spectrometry*) – vedelikkromatograafia-massispektromeetria

LOQ - (ingl *limit of quantification*) - määramispiir

MeCN - atsetonitriil

MeOH - metanool

MRM (ingl *multiple reaction monitoring*) - mitme ülemineku jälgimise režiim

MS - massispektromeetria

m/z - massi ja laengu suhe

NH₄OAc - ammooniumatsetaat

OH-PAH – hüdroksü-PAH

PAH (ingl *polycyclic aromatic hydrocarbons*) - polütsüklilised aromaatsed süsivesinikud

POP (ingl *persistent organic pollutants*) - püsivad orgaanilised saasteained

ppm, ppb, ppt - *part per million, parts per billion, parts per trillion* massiühikutes esitatud kontsentratsiooni ühikud, mis vastavad aine massile milligrammides 1 kg proovi või lahuse kohta, 1 ppm = 1 mg/kg, 1 ppb = 0,001 mg/kg, 1 ppt = 0,000001 mg/kg,

PTS (ingl *persistent toxic substances*) - püsivad toksilised ained

SPE (ingl *solid phase extraction*) - tahkefaasi ekstraktatsioon

UV-Vis (ingl *ultraviolet–visible spectrophotometry*) – ultravioletse ja nähtava spektriala spektromeetria

2-OH-Flu - 2-hüdroksüfluoreen

1-OH-Nap - 1-hüdroksünaftaleen

2-OH-Nap - 2-hüdroksünaftaleen

1-OH-Pyr - 1-hüdroksüpireen

1. SISSEJUHATUS

Polütsüklilised aromaatsed süsivesinikud (PAH-id) on orgaanilised ühendid, mis koosnevad vähemalt kahest süsivesiniku kondenseeritud aromaatsesest tuumast. Neid leidub keskkonnas laialdaselt, kuna neid tekib peaaegu kõikide orgaaniliste materjalide põlemisel madalal temperatuuril või ka mittetäielikul põlemisel. Nende esinemine looduses on kahjulik nii ökosüsteemile kui ka inimestele ja sellepärast nende uurimine on oluline [1].

PAH-ide olemasolu on sageli seotud õhus levivate osakestega, mis võivad tekkida ka näiteks sigarettide suitsetamisest või tööstusest (näiteks koksitööstuses) [1]. Kokkupuute biomarkerite analüüs lubab hinnata, millises ulatuses jõuavad toksilised ained inimese organismi ja võimaldab leida seoseid toksiliste ainete ja inimese tervise vahel. PAH metaboliitide sisalduse määramine uriinis võimaldab hinnata PAH-idega kokkupuute mõju inimese tervisele. Käesolevas töös uuritakse nelja PAH metaboliiti, milleks on 1-hüdroksüpüreen (1-OH-Pyr), 1-hüdroksünaftaleen (1-OH-Nap), 2-hüdroksünaftaleen (2-OH-Nap) ja 2-hüdroksüfluoreen (2-OH-Flu).

1-hüdroksüpüreen on püreeni üks olulisemaid metaboliite, mis tekib organismis püreeni metaboliseerimise tagajärjel. Seda on eelnevalt juba analüüsitud põlevkivisektori töötajate organismis [2]. Keskkonnas leiduvate PAH-ide segudes on suhteliselt kõrge püreenisisaldus. 1-OH-Pyr on omakorda püreeni metabolismi produkt ja kuna selle moodustamise tõenäosus organismis on kõrge, siis enamasti kasutatakse selle sisaldust PAH-dega kokkupuute indikaatorina [2].

Töö eesmärk on nelja OH-PAH kokkupuute biomarkeri uriinis määramise meetodika arendamine.

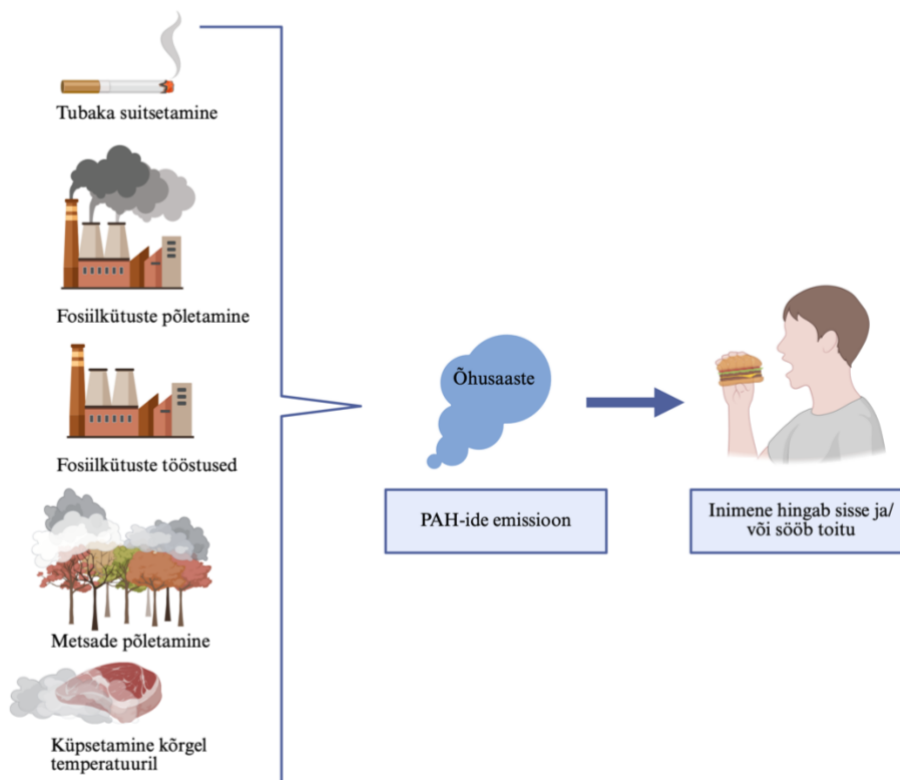
2. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

2.1. Polütsüklilised aromaatsed süsivesinikud

PAH-id kuuluvad püsivate toksiliste ühendite (PTS) rühma. Nende omadused on sarnased püsivate orgaaniliste saasteainetega (POP). PAH-idele on iseloomulik kõrge toksilisus, püsivus, ja kiire imendumine organismis. Kokkupuude kõrgetes kontsentratsioonides PAH-idega põhjustab inimesele tervisekahjustusi (näiteks kopsu- või nahavähki haigestumist) [3][4].

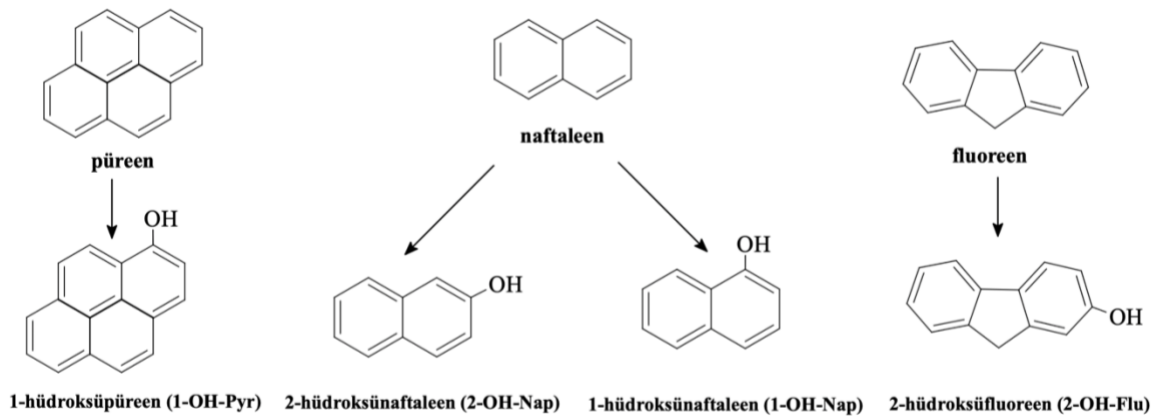
Kui PAH-id sisenevad kehasse, siis nad metaboliseeruvad organites (näiteks maksas, neerudes või kopsudes) ning väljuvad tavaliselt uriiniga [4]. PAH-ide lipofiilsus (hea lahustuvus mittepolaarsetes või vähepolaarsetes keskkondades) võimaldab neil kergesti läbida rakumembraane. Ainevahetuses nad muunduvad vees paremini lahustuvateks ühenditeks, mis lihtsustab nende väljumist organismist. Kuid PAH-id võivad muunduda ka mürgisemateks või kantserogeensemateks metaboliitideks [4].

Peamised kokkupuuted PAH-idega on näiteks tubaka suitsetamine, saastatud õhk ja saastunud toidu tarbimine (näiteks suitsukala) või saadud potentsiaalselt ohtlikul viisil nagu toidu praadimine või küpsetamine grillisöel [1] (vt Joonis 1).



Joonis 1. Inimeste peamised PAH-dega kokkupuute stenaariumid

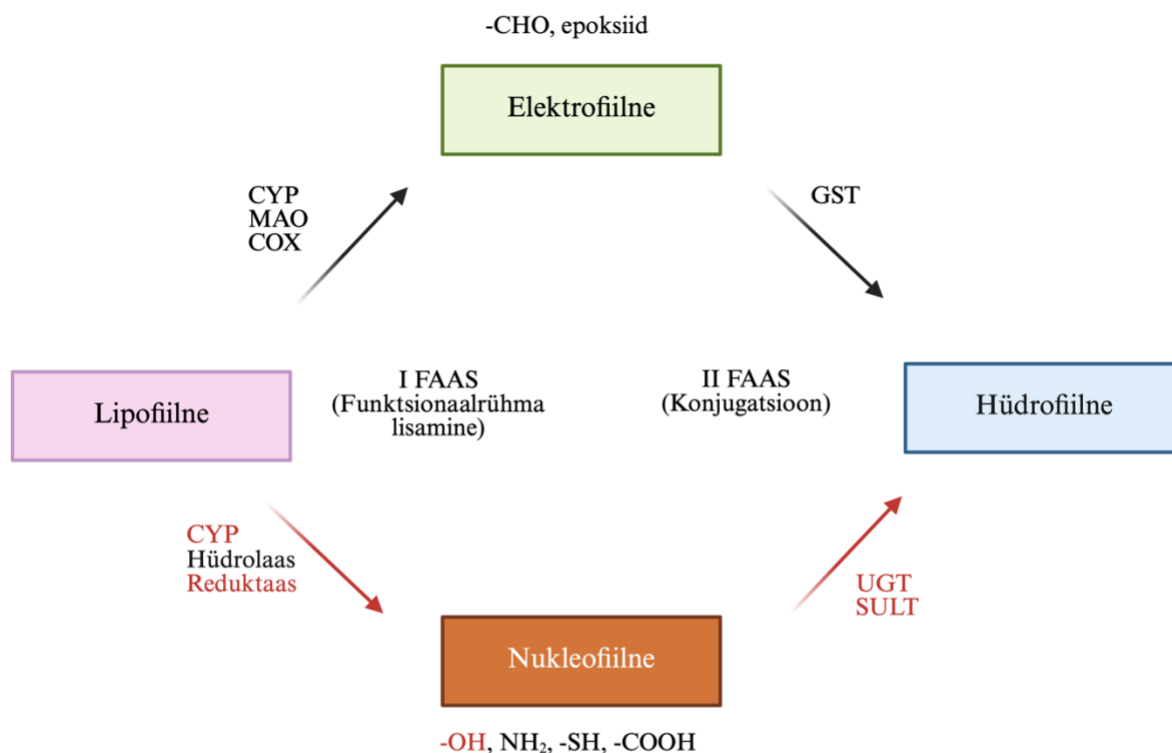
PAH-id esinevad peamiselt segudena (vt Joonis 2), mille üheks põhikomponendiks on püreen. Kuigi seda ei ole nimetatud kantserogeenseks, on sellel ikkagi mõned kantserogeensetele ainetele omased omadused. Näiteks nahaga kokkupuutel põhjustab püreen ärritust. Arvatakse, et püreen on mutageensete omadustega [5]. Püreen on üks levinumatest PAH-dest ja 1-OH-Pyr on kõige huvipakkavam vaadeldava nelja PAH metaboliidi seast.



Joonis 2. Polütsüklilised aromaatsed süsivesinikud (ülemised) ja vastavad metaboliidid (alumised)

Kui püreen satub organismi, siis see metaboliseerub 1-hüdroksüpüreeniks, mis uriinis muundub 1-OH-Pyr glükuroniidiks (1-OH-PyrG) [6]. Püreeni metaboliit on stabiilne ühend, mida on võimalik määrata suhteliselt kergesti uriinist näiteks kõrgefektiivse vedelikkromatograafia (HPLC) abil. Püreen metaboliseeritakse organismis tsütokroomi P-450 (näiteks CYP1A1) abil 1-hüdroksüpüreeniks [1].

Lipofiilsete PAH ühendite metabolism toimub tavaliselt etappidena ja võib toimuda kahte erinevat rada. Joonisel 3 on näidatud, et I faasis lisandub funktsionaalrühm, milleks saab olla nukleofiilne või elektrofiilne rühm. Selleks toimub vastavalt oksüdüreduktaas või hüdrolaas (CYP juuresolekul), millele järgneb konjugatsioon (II faas) [7]. Saadud metaboliidid on tavaliselt vees kergesti lahustuvad ja seetõttu kiiremini väljuvad organismist. Joonisel 3 on välja toodud võimalikud metabolismirajad, kus punaste nooltega on tähistatud selles töös uuritava püreeni hüdrofiilsesse vormi metaboliseerumise rada.



***Punasega on tähistatud selles töös vaadeldud rada**

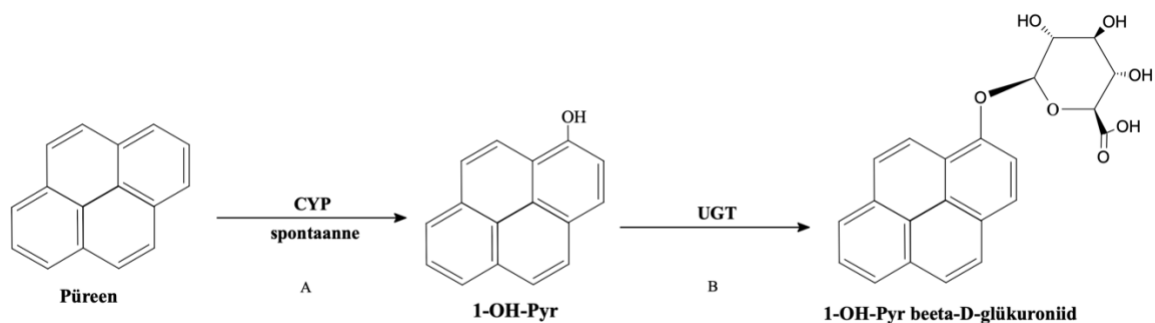
Ensüümid:

I:
 CYP - tsütokroom P450 monoooksügenaasid
 MAO - monoamiinoksüdaasid
 COX - tsüklooksügenaasid

II:
 GST - glutatioon-S-transferaasid
 UGT - UDP-glükuroonosüültransferaasid
 SULT - sulfo-transferaasid

Joonis 3. PAH-de võimalikud metabolismi rajad

Püreeni molekulid aktiveerivad I ja II faasi metabolismis osalevate ensüümide sünteesi (tsütokroom P-450). I faasis moodustub meid huvitav metaboliit (1-hüdroksüpüreen) metabolismi oksüdatsiooniprotsessis, milles osaleb tsütokroom P-450 [8] (vt Joonis 4A). Selle käigus lisandub püreeni struktuurile -OH funktsionaalrühm. Püreeni lahustuvust peab suurendama ja valmistama ette II faasiks, kus toimub konjugatsiooni reaktsioon. Teise faasi eesmärgiks on muuta ühendit veelgi polaarsemaks (soodustab ühendi kiiremat väljumist organismist). Selleks 1-OH-Pyr metaboliidile lisanduvad polaarsed rühmad läbi glükuronisatsiooni (glükuroonhape seotakse substraadile, mis sisaldab nukleofiilset funktsionaalrühma) [4]. 1-OH-Pyr ühendub glükuroonhappega, moodustades 1-OH-Pyr-glükuroniidi [8] (vt Joonis 4B).



Joonis 4. Püreen metaboliseeritakse CYP-de abil 1-hüdroksüpüreeniks (1-OH-Pyr) (A), mis konjugeeritakse edasi UDP-glükuronosültransferaaside (UGT) abil (B) hüdrofiilseks metaboliidiks

2.2. Polütsükliiliste aromaatsete süsivesinike analüüsimise meetodikast

PAH-id, mis ei ole metaboliseerunud, ladestuvad rasvkoos avaldades organismile pikaajalist mürgist mõju. Nende kontsentratsioon organismis võib olla väga madal, enamasti ppt-suurusjärgus (1 ppt = 0,000001 mg/kg), mis raskendab PAH-ide sisalduse määramist. Samas võib PAH-ide kontsentratsioon inimorganismis muutuda oluliselt paari tunni jooksul, varieerudes väga madalatest kõrgete väärtusteni (alates 0,01 kuni 10 µg/l) [5]. Kõige efektiivsem viis PAH-ide metaboliitide määramiseks inimkehas on kehavedelike (näiteks uriini) [1] analüüsimine.

2.3. Polütsükliiliste aromaatsete süsivesinike metaboliitide määramine

Kuna analüütide sisaldus proovis on madal ja proovi maatriks keeruline, siis analüüsimeetod peaks olema selektiivne, madala avastamis- ja määramispiiriga. Selleks kasutatakse peamiselt kromatograafilisi või kombineeritud meetodeid, nagu vedelikkromatograafia-massispektromeetria (LC-MS) [9]. Kromatograafilise lahutamise käigus eraldatakse analüüt proovi maatriksist ning standardaine olemasolul saab ka identifitseerida analüüte, võimaldades nii kvalitatiivset kui ka kvantitatiivset analüüsi.

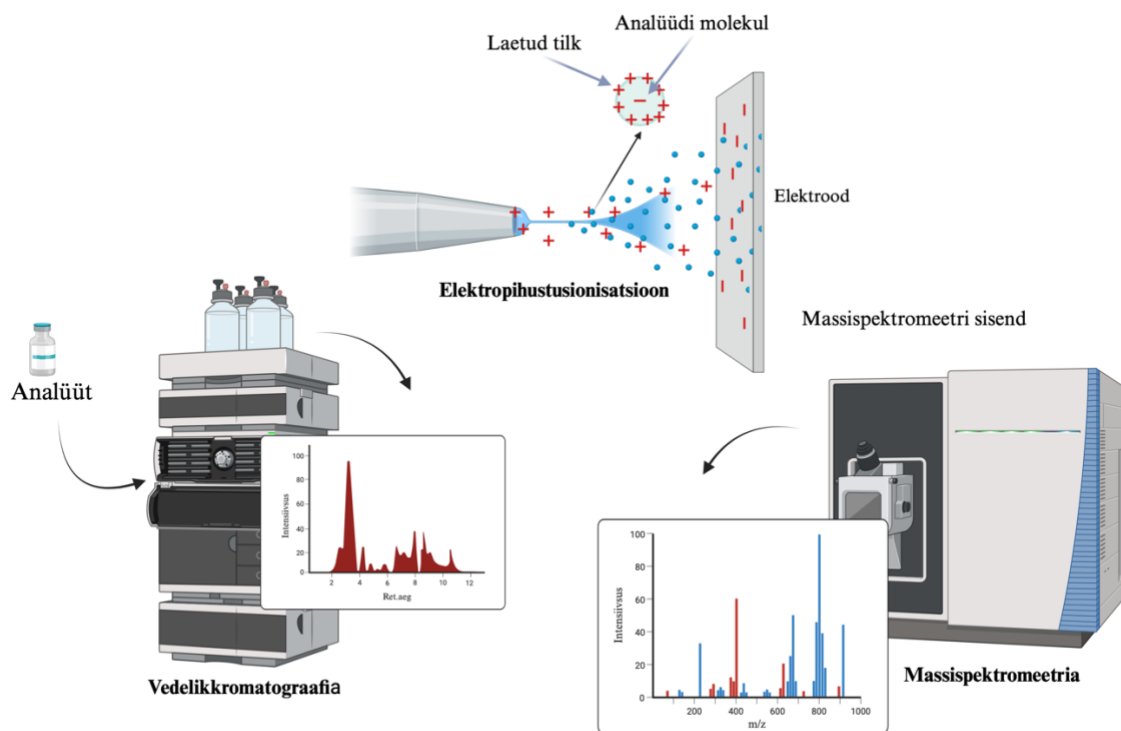
Analüüsimeetodi tundlikkus peab olema kõrge (määramispiir madal) ja võimaldama selektiivset detekteerimist, nii et mõõdetud signaaliks oleks uuritava aine signaal, mitte mõne muu proovi komponendi oma. Kuigi suure osa segavatest ainetest (näiteks soolad ja metabolismi jääkaineid) võib eemaldada juba proovi ettevalmistuse käigus, siis analüütide

kontsentratsioon on siiski jälgede tasemel, mis teeb proovi analüüsi keeruliseks ega taga iseenesest piisavat selektiivsust. Seega oleks vaja kasutada detektorit, mis on analüüdi suhtes selektiivne ning võimeline eristama erinevaid analüüdi koguseid. Selleks sobib massispektrometriline detektor, kuna see täidab kaks viimast kriteeriumit ning on kasutusel suure hulga erinevate omadustega analüütide määramiseks [10].

2.4. Analüüsimetod

2.4.1. Kõrgefektiivne vedelikkromatograafia elektropihustusionisatsiooni massispektrometria

Selles töös kasutatakse kõrgefektiivse vedelikkromatograafi elektropihustusionisatsiooni massispektrometria (HPLC-ESI-MS) meetodit, mis võimaldab keeruliste proovide lahutamist, ioniseerimist ja selektiivset analüüsimist. HPLC eraldab proovi komponendid, kasutades vedelat eluenti ja kolonni. Seejärel pihustatakse lahus ESI ionallikas, kus analüüdi molekulid ioniseeruvad ning seejärel suunatakse massispektrometrisse, mis määrab nende massi ja laengu suhte (m/z) ning võimaldab analüüdi määramist (vt Joonis 5) [11].

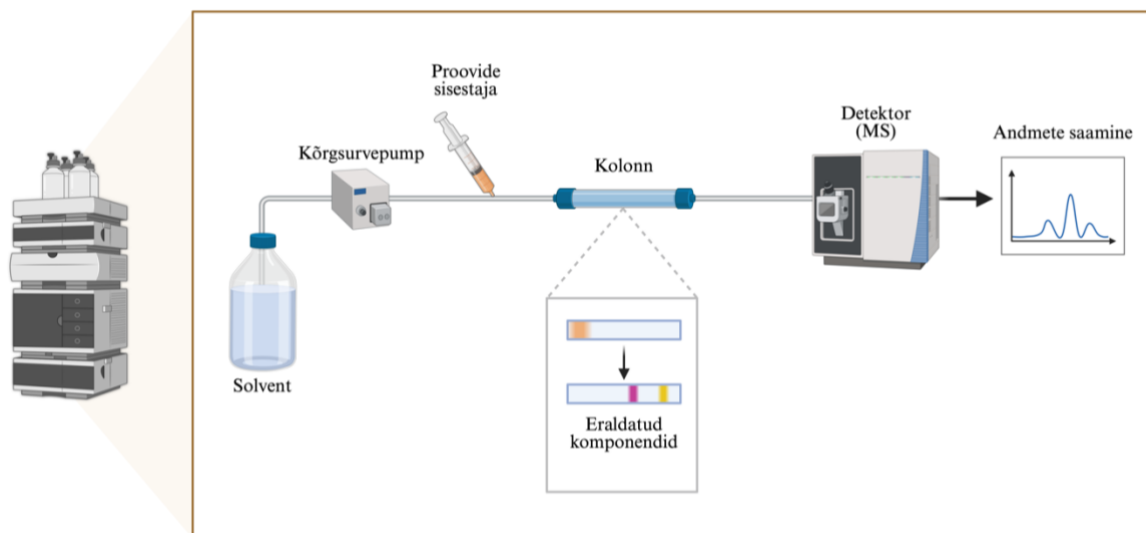


Joonis 5. HPLC-ESI-MS skeem

Kolmekordse kvadрупooliga MS kasutamine produktioonioonide jälgimise režiimis suurendab meetodi tundlikkust ja selektiivsust. Seega HPLC-ESI-MS võimaldab analüüsida keerulisi matrikseid (uriin) ning määrata väga madala kontsentratsiooniga ühendeid (metaboliidid).

2.4.2 Kõrgefektiivne vedelikkromatograafia

HPLC on kromatograafia liik, kus mobiilseks faasiks on vedelik (eluent), mis kannab uuritavaid aineid läbi kolonnis oleva statsionaarse faasi. Kuna statsionaarse faasi osakesed on väikesed, tuleb eluendi pumpamiseks läbi kolonni kasutada kõrget rõhku. Kolonnist läbi liikuvad analüüdi molekulid jaotuvad mobiilsest faasist statsionaarsesse ja tagasi tuhandeid kordi. Kuna sellel analüüsimeetodil on hea ainete segude lahutamise võime, siis kasutatakse HPLC-d keerukate segude analüüsil (vt Joonis 6). Signaali registreerimiseks kasutatakse enamasti UV-Vis, fluorestsents- või massispektromeetrilisi detektoreid [11].



Joonis 6. HPLC aparatuur

HPLC jagatakse normaal- ja pöördfaaskromatograafiaks statsionaarse ja mobiilse faasi alusel. Normaalfaaskromatograafia statsionaarne faas on polaarne (näiteks silikageel, mille pind on modifitseeritud propüülamiiniga) ja mobiilne faas on mittepolaarne (näiteks heksaan). Mida madalama polaarsusega aine satub kolonni, seda kiiremini see sealt elueerub. Pöördfaaskromatograafias on statsionaarne faas vähepolaarne (näiteks silikageeli terakesed, mille külge on seotud alküülrühmad) ning eluent ehk mobiilne faas on polaarne (näiteks vee ja atsetonitriili segu). Sel juhul elueerub esimesena kõige polaarsem aine.

Kromatograafia sobib nii kvantitatiivseks kui ka kvalitatiivseks analüüsiks. Kvalitatiivse analüüsi põhimõte seisneb selles, et ühele ja samale ainele vastab sama retentsiooniaeg, kui kromatografeerimise tingimused on samad. Ainet on võimalik täiendavalt tuvastada kasutades kromatograafi detektorit (näiteks MS). Kvantitatiivseks analüüsiks valmistatakse standardlahuseid teatud kontsentratsioonivahemikus, kus lahustes on ainult huvipakkuv aine. Standardlahuste piikide pindalad annavad infot aine koguse kohta. Kvantitatiivse analüüsi jaoks leitakse piikide alune pindala ja koostatakse kalibreerimisgraafik. Proovist leitud analüüdi piigi pindala alusel leitakse kalibreerimisgraafikult analüüdi kontsentratsioon proovis.

2.4.3. Eluendi valimine

LC-MS analüüsil kasutatavad eluendid peavad olema lenduvad (nt metanool, vesi, lisandiks metaanhape). Kirjanduse baasil valiti OH-PAH-de LC-MS analüüsiks võimalikud eluendid (vt Tabel 1). Üheks valikuks osutus 40 % Milli-Q vesi [12] ja 60 % atsetonitril. 0.1 % ammoniumatsetaat vees ning metanool [9] oli teiseks valikuks. Kuna töögrupis oli kogemus heksafluoroisopropanooli (HFIP) vesilahuse (pH 9) ja atsetonitril segu kasutamisel [13], siis osutus see kolmandaks valikuks. Samuti testiti traditsioonilisi LC-MS eluente 0.1 % metaanhape vesilahus [14] ja atsetonitril ning 0.1 % metaanhape lahus [14] ja metanool.

Tabel 1. Ülevaade OH-PAH analüüsil kasutatud eluentidest.

Võimalikud eluendid (mobiilne faas)		
MeCN	0,1% metaanhape	[14]
MeCN	Milli-Q vesi	[12]
MeCN	2.5 mM HFIP*	[13]
MeOH	0,1% metaanhape	[14]
MeOH	0,1% NH ₄ OAc	[9]

* ei ole varem OH-PAH analüüsil kasutatud

Instrumentaalsele avastamispiirile hinnangu andmisel püüti leida kõige madalama kontsentratsiooniga lahus, mille puhul on 1-OH-Pyr veel võimalik tuvastada. PAH-dega ametiaselt mittekokkupuutuvate inimeste uriinis leiti 1-OH-Pyr keskmiselt 0,064 ng/ml

(0,064 ppb)[9]. Analüüsimetoodika määramispiir oli 0,025 ppb [9]. Sellest lähtuvalt seati töös 1-OH-Pyr määramispiiri eesmärgiks 0,02 ppb.

Teise allika andmetel on 1-OH-Pyr avastamispiir 0,07 ppb, 2-OH-Nap on 0,06 ppb, 1-OH-Nap on 0,09 ppb ning 2-OH-Flu on 0,008 ppb [15]. Kõikide analüütide avastamis- ja määramispiiride sihtväärtused inimese uriinis on toodud tabelis 2.

Tabel 2. Analüütide LoD ja LoQ (uriinis) sihtväärtused , mida kasutati käesolevas töös

Analüüt	LoD (ppb)	LoQ (ppb)
1-OH-Pyr	0,007	0,02
1-OH-Nap	0,03	0,10
2-OH-Nap	0,03	0,10
2-OH-Flu	0,2	0,50

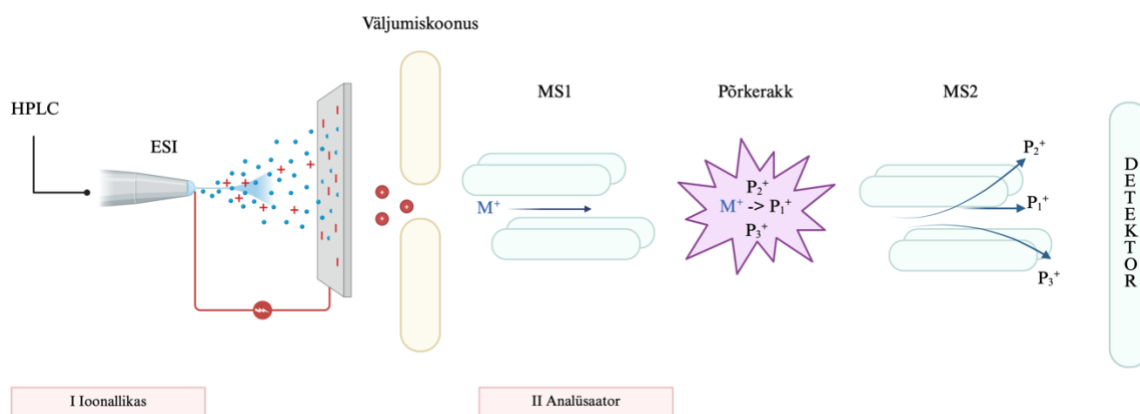
2.4.4. Elektropihustusionisatsioon

Elektropihustusionisatsioon (ESI) korral ioonid tekivad vahetult lahuses elektrivälja toimetel ja “aurustuvad“ sealt välja (vt Joonis 5). Ionisatsioon toimub enamasti molekuli protoneerumise või deprotoneerumise tulemusena ning tekivad $[M+H]^+$ ja $[M-H]^-$ ioonid. Ioniseerumise protsess on pehme, mistõttu saadakse peamiselt $[M-H]^-$ ja $[M+H]^+$ ioone, fragmentioone ei teki ning spektrid näevad selgemad välja ja on lihtsamini interpreteeritavad. meetodile iseloomulik mitmelaenguliste ionide teke. Need ioonid on MS analüüsil suureks eeliseks, kuna see lubab analüüsida suure molekulmassiga ühendeid, kasutades massianalüsaatoreid, millel on madal m/z ülempiir. ESI ioniseerumise protsess on keerukas, mistõttu analüüdi ioniseeruvuse ennustamine on raske [11].

ESI on kasutusel massispektromeetria ionallikana, millega saab omavahel ühendada vedelikkromatograafia ja MS (vt Joonis 7). Selle puhul lisatakse juurde gaasivoolud, mis soodustavad pihustumist. Sellega tagatakse analüüdi pihustumine peeneteks tilkadeks, millest “aurustunud” ioonid juhitakse MS sisendisse elektrivälja abil.

2.4.5. Massispektromeetria

Massispektromeetria (MS) on analüüsimeetod, mille korral mõõdetakse proovi molekulist tekitatud iooni massi ja laengu suhe (m/z). Põhimõtteliselt saab MS mõõtmist kasutada ka tundmatu aine molekulmassi leidmiseks. MS analüüsiks tuleb analüüsitava aine molekulid ioniseerida. Selleks viiakse molekulid gaasifaasi ja ioniseeritakse ionisatsiooniallikas. Tekivad molekulaarioonid (M^+) või protoneeritud molekulid $[M+H]^+$. Need ioonid eraldatakse massianalüsaatoris m/z järgi (vt Joonis 7). Edasi liiguvad ioonid detektorisse, kus määratakse vastavate ionide hulk. Saadud info põhjal koostatakse massispekter. MS detekteerib ainult laetud osakesi. Massispektromeetria abil võib analüüsida vere- ja uriiniproove, kuna analüüsimeetod on selektiivne ja võimaldab saavutada madalaid avastamisiire [10].



Joonis 7. Massispektromeetria kolmekordse kvadruupooliga massianalüsaator.

MS kasutatakse tihti koos kromatograafia ning üks levinumatest MS meetoditest on LC-MS, mis lahutab aine kromatograafiliselt määrares igale ainele kindla retentsiooniaja ning edasi MS võimaldab aineid m/z alusel tuvastada. LC-MS võimaldab analüüsida ainet kvalitatiivselt ja kvantitatiivselt. Mass-kromatogramm sisaldab kolmemõõtmelist informatsiooni, kus iga aine kohta saab teada retentsiooniaja, m/z , ja piigi kõrguse ning pindala.

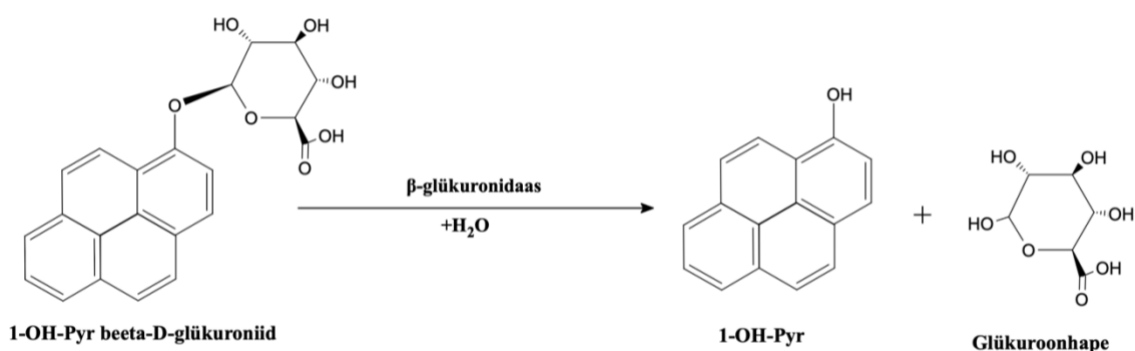
2.4.6. Muud võimalikud meetodid

OH-PAH metaboliitide määramiseks on kasutatud nii kõrgefektiivset vedelikkromatograafiat koos fluorestsentsdetektoriga [2] kui ka gaaskromatograafiat koos massispektromeetriaga (GC-MS) [2] ning viimati hakati kasutama vedelikkromatograafia tandem-massispektromeetria meetodit (LC-MS/MS), mille on kasutatud isotoopmärgistatud 1-OHP sisestandardit [2].

2.5. Prooviettevalmistus

2.5.1. Ensümaatiline lagundamine

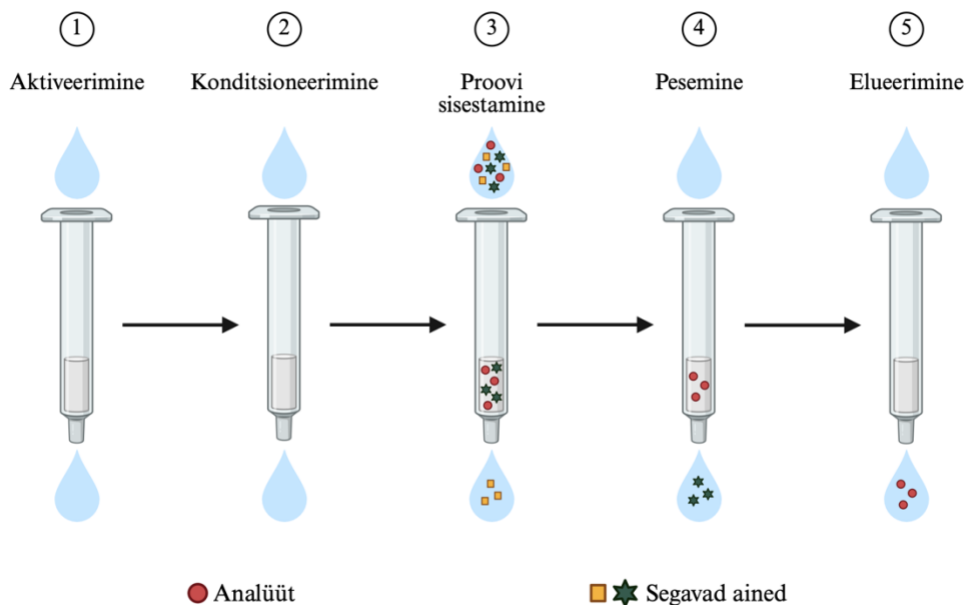
Prooviettevalmistuse meetodite uurimisel lähtuti B. Ramsaueri jt artiklis kirjeldatud meetodikast [9]. Proovide ettevalmistusel kasutatakse uriini PAH-de analüütilised meetodi ensümaatilist hüdrolüüsi β -glükuronidaasi/arüülsulfataasi seguga. β -glükuronidaas lõhub metabolismi tulemusel tekkinud OH-PAH ja glükuroonhappe vahelisi glükosiidsidemeid (näide 1-OH-Pyr-G kohta on toodud joonisel 8). Arüülsulfataas hüdrolüüsib konjugeeritud PAH metaboliidi (1-OH-sulfaat) sulfaatestersideme [16]. Ensümaatiline hüdrolüüs võimaldab kvantitatiivset analüüsi, et määrata PAH-ide vaba vormi. Sellele järgneb ekstraheerimine kas vedelik/vedelik ekstraheerimise, tahke faasi ekstraheerimise (SPE) või tahke faasi mikroekstraktsiooni meetodil [9].



Joonis 8. 1-OH-Pyr-G hüdrolüüs β -glükuronidaasiga.

2.5.2. Tahkefaasi ekstraktsioon

SPE (tahkefaasi ekstraktsioon) on levinud proovide eeltötlusmeetodeid, mida kasutakse enne HPLC analüüsi. See protsess põhineb analüüdi jagunemisel tahke ja vedela faasi vahel. Tahkeks faasiks on tavaliselt kolonni sees olev sorbent. Alustuseks sorbent konditsioneeritakse ja seejärel kantakse sellele proovilahus (analüüt koos proovimatriksiga). Tahke „püüab kinni“ analüüdi molekulid uuritavast proovist selektiivselt keemiliste interaktsioonide alusel, samas kui soovimatud matriksi komponendid läbivad sorbendi ja eemalduvad [11]. Joonisel 9 on välja toodud SPE töökäigu skeem.



Joonis 9. SPE töökäigu skeem

SPE võimaldab analüüsiprotsessi lihtsustada, aega kokku hoida ning saavutada ekstrakti kõrgema puhtuse ja analüüti kontsentreerida, mis omakorda suurendab meetodi tundlikkust (alandab määramispiiri) [17]. See meetod võimaldab puhastada keerulisi proovimatrikseid, eemaldades segavaid aineid ning mõjutades järgnevate analüüside usaldusväärsust. Samas SPE-l on ka mõningaid puudusi nagu seadme kõrge hind. Ekstraheerimise käigus võib osa analüüdist kaduma minna. Lisaks võivad SPE-padrunid ummistuda või nende maht võib olla piiratud, mis võib vähendada analüüdi eraldamise efektiivsust ja mõjutada meetodi üldist usaldusväärsust [18].

SPE meetodiga on OH-PAH-de analüüsiks töödeldud kuni 200 ml proovikoguseid ilma oluliste kadudeta. [19]. Praktikas on kogutavad uriiniproovi kogused siiski väiksemad, mistõttu on mõistlik arvestada 50 ml-ga. Kui SPE ekstrakti ruumala oleks 1 ml, siis see tähendab, et analüütide kontsentratsioon ekstraktides on 50 korda kõrgem kui proovis. LC-MS puhul saab töötada ka 0,1 ml proovikogustega. Kui 50 ml proovist saadakse SPE tulemusena 0,1 ml ekstrakti, siis vastab see 500-kordsele kontsentreerumisele. Seega võib meetodika arendamisel arvestada, et SPE-prooviettevalmistus võib proove kontsentreerida 50-500 korda.

3. EKSPERIMENTAALNE OSA

3.1. Aparatuur

Töös kasutati pöördfaaskoloni (C18) Acquity UPLC BEH siseläbimõõduga 2,1 mm ja pikkusega 50 mm, statsionaarse faasi täidiseosakeste läbimõõt oli 1,7 µm. Kasutati LC-MS süsteemi Agilent Technologies 1290 Infinity II ja Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS.

3.2. Kasutatud kemikaalid

Töös kasutatud standardained CAS numbri, tootja ja puhtus on toodud tabelis 3. Neid hoiustatakse külmkapis 4 - 6 °C juures.

Tabel 3. Eksperimentaalprojekti kasutatud standardained CAS-numbrite, tootja ja puhtusega

Ühend [CAS]	Tootja	Puhtus
1-hüdroksüpireen [5315-79-7]	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH	98,0%
1-hüdroksünaftaleen [90-15-2]	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH	99,0%
2-hüdroksünaftaleen [135-19-3]	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH	99,0%
2-hüdroksüfluoreen [2443-58-5]	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH	98,0%

Standardlahused valmistati 100% metanoolis (Honeywell, Prantsusmaa, LC-MS puhtus).

Lisaks kasutati kromatograafia eluendina atsetonitriili (MeCN) (Honeywell, Prantsusmaa, LC-MS puhtus) ja Milli-Q vett (erijuhtivus 18,2 MΩ·cm, TOC 2-5 ppb; Millipore IQ 700).

3.3. Standardlahuse valmistamine

Standardlahuste valmistamisel lähtuti B. Ramsaueri jt. artiklis kirjeldatud metoodikast [9].

1-OH-Pyr jaoks kaaluti umbes 2 mg ainet, mis lahustati 10 ml metanoolis. Algne emalahuse kontsentratsioon oli 200 mg/l (200 ppm).

1-OH-Nap ja 2-OH-Nap jaoks kaaluti vastavalt 2,17 mg ja 1,97 mg ainet, mida lahustati 10,85 ml ja 9,85 ml metanoolis. Seega oli mõlema ühendi emalahuse kontsentratsioon 200 mg/l (200 ppm).

1-OH-Flu jaoks kaaluti 2 mg ning lahustati 10 ml metanoolis. Analüüdi emalahuse kontsentratsiooniks oli 200 mg/l (200 ppm).

LC-MS jaoks tehti lahustest 100-kordsed lahjendused, kuna esialgne kontsentratsioon oli liiga kõrge. Selleks 2000 µl tuubi lisati 20 µl igat lahust (kokku 80 µl) ning 1920 µl metanooli. Hiljem tehti 2 ppm lahusest veel lahjendusi. Töölahuste kontsentratsioonid olid vahemikus 100 ppb – 0,1 ppb.

3.4. Kalibreerimislahuste valmistamine

Kalibreerimislahustes olid analüütide kontsentratsioonid erinevad ja need on toodud tabelis 4.

Kalibreerimislahused valmistati algse kalibreerimissegude järjestikuse lahjendamisel.

Tabel 4. Kalibreerimislahuste kontsentratsioonid (ppb) iga analüüdi puhul. (Kalibreerimislahustele viitamiseks kasutatakse 1-OH-Pyr kontsentratsioone.)

1-OH-Pyr (ppb)	1-OH-Nap (ppb)	2-OH-Nap (ppb)	2-OH-Flu (ppb)
1	4	4	20
5	20	20	100
10	40	40	200
25	100	100	500
50	200	200	1000
75	300	300	1500
100	400	400	2000
125	500	500	2500

3.5. Mõõtmise metoodika

Proovide sisestamiseks kasutati proovide automaatsisestajat. Süsti suurus oli 2 µl. Elueerimise voolukiirus oli 0,3 ml/min, kolonni temperatuur 40°C. OH-PAH metaboliitide jaoks gradientelueerimist uuriti vee (A) ja MeCN (B) lahusega (vt Tabel 5). Skaneerival režiimil uuritud ioonid ning vastavate ainete retentsiooniajad atsetonitriili ja vee eluendi komponendi korral on toodud tabelis 6.

Tabel 5. Gradiendi programm

Aeg (min)	Milli-Q (%)	MeCN (%)
0	70	30
2	70	30
8	2	98
10	2	98
12	70	30

Tabel 6. Analüüdid, nende m/z-d, ESI režiimid ja retentsiooniajad atsetonitriili ja vee korral

Ühend	m/z	Ioonallikas, polaarsus	Retentsiooniaeg t_R (min)
1-hüdroküpüreen	218	ESI, +	-
	217	ESI, -	6,97
1-hüdroksünaftaleen	145	ESI, +	-
	143	ESI, -	3,39

2-hüdroस्कүнафталеен	145	ESI, +	-
	143	ESI, -	2,82
2-hüdroksüfluoreen	183	ESI, +	-
	181	ESI, -	5,50

3.6. Tarkvara ja andmeanalüüs

LC-MS andmete registreerimiseks ja tulemuste analüüsiks kasutati tarkvara Agilent MassHunter (ver B.08.00) programme Quantitative Analysis (QQQ) ja Agilent MassHunter Qualitative Analysis Navigator.

Keemilised struktuurid joonistati MoleculeSketch M tarkvaraga ning töö illustratiivsed joonised on koostatud kasutades BioRender.com.

4. TULEMUSTE ARUTELU

4.1. Vedelikkromatograafia parameetrite optimeerimine

Selle töö käigus uuriti võimalust kasutada kromatografeerimisel eluendina erinevaid mobiilse faasi segusid (vt Tabel 7), mille hulgast valiti sobivaim edasiseks tööks. Selle alusel saab väita, et nii 1-OH-Nap kui ka 2-OH-Nap jaoks sobivad kõik eluendid, kuna retentsiooniajad on lähedased. Ühend 1-OH-Pyr aga elueerus kolonnist metanooli puhul pärast seda, kui metanoolisisaldus oli jõudnud 100%-ni. Kuna 100% metanoolisisalduse juures võivad kolonnist elueeruda ka maatriksi komponendid, siis jäeti metanooli ning ammoniumatsetaadi ja metaanhape kasutamine kõrvale. Üldiselt täheldati, et analüütide retentsiooniajad sõltuvad üsna vähe vesifaasi koostisest, kuid on lühemad atsetonitriili korral võrreldes metanooliga.

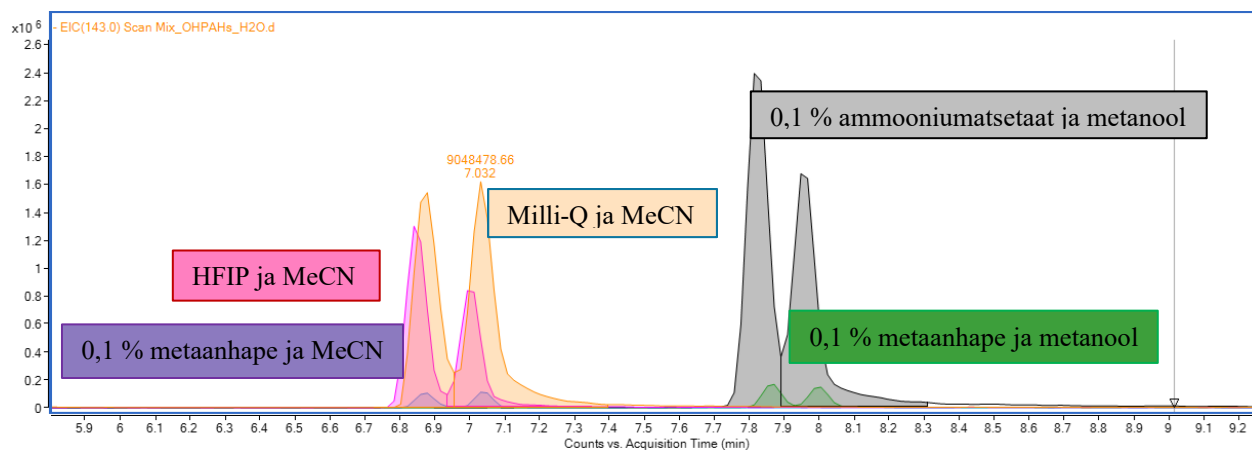
Eluendina katsetati järgmisi solventide segusid: atsetonitriili ja metanooli segud veega ja 0,1% metaanhappe vesilahusega. Kuna HFIP sisaldavaid eluente on kasutatud bioloogiliste vedelike analüüsil, siis otsustati uurida ka 2,5 mM HFIP vesilahuse (metaanhappega pH 9) ja atsetonitriili segu. Erinevate eluentide võrdlusest (vt Joonis 10) on näha, et vee ja atsetonitriili segu korral piigid on kõrgemad võrreldes kahe muu vesilahusega. Sama olukord on 1-OH-Pyr juures, kus kõige kõrgem piik on atsetonitriili ja vee kasutamisel (vt Joonis 11). Seega lõplikuks eluendiks valiti vee ja atsetonitriili segu.

Tabel 7. Analüüdid, nende m/z-d, ESI režiimid ning retentsiooniajad viie erineva eluendi korral

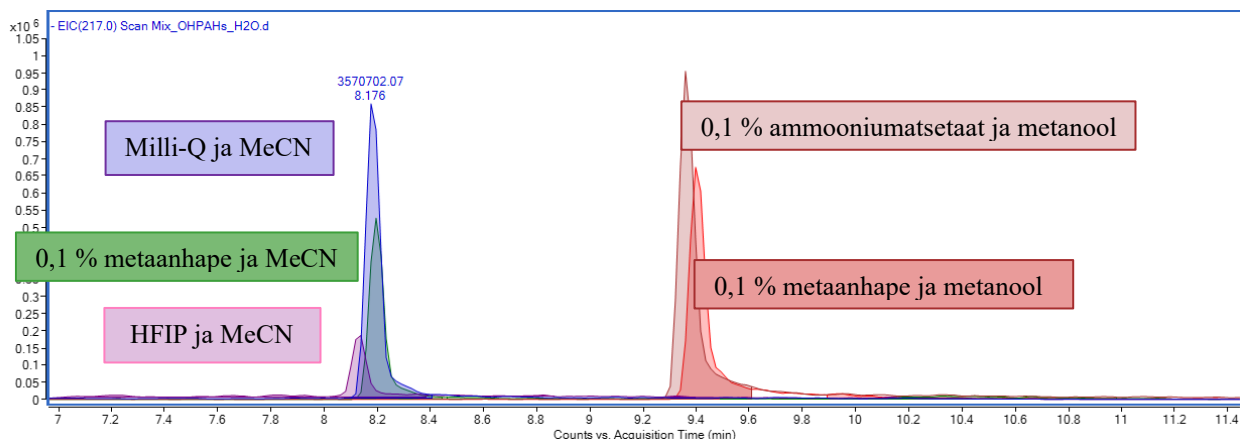
Mobiilne faas	2- ja 1-OH-Nap			1-OH-Pyr		
	m/z	Ioonallikas, polaarsus	Retentsiooniaeg (min)*	m/z	Ioonallikas, polaarsus	Retentsiooniaeg (min)
0,1% metaanhape ja MeCN	145	ESI, +	6,87;7,04	218	ESI, +	-
	143	ESI, -		217	ESI, -	8,19

0,1% metaanhape ja MeOH	145	ESI, +	7,87;8,00	219	ESI, +	-
	143	ESI, -		217	ESI, -	9,40
Milli-Q vesi ja MeCN	145	ESI, +	-	218	ESI, +	-
	143	ESI, -	6,88;7,03	217	ESI, -	8,18
0,1% NH ₄ OAc ja MeOH	145	ESI, +	-	219	ESI, +	-
	143	ESI, -	7,81;7,95	217	ESI, -	9,36
2.5 mM HFIP ja MeCN	145	ESI, +	-	218	ESI, +	-
	143	ESI, -	6,84;6,99	217	ESI, -	8,14

* *Esimene retentsiooniaeg vastab 2-OH-Nap-ile ja teine 1-OH-Nap-ile.*



Joonis 10. 1-OH-Nap ja 2-OH-Nap eluerumise võrdlus viies erinevas eluendis -ESI skaneerimise režiimis



Joonis 11.1-OH-Pyr elueerumise võrdlus viies erinevas eluendis -ESI skaneerimise režiimis

Nelja OH-PAH lahutuvus vastab nende trendidele nende polaarsuses ja molekulaarstruktuuris. Joonisel 12 on näha, et kõige polaarsem analüüt (2-OH-Nap) elueerub esimesena ning viimasena elueerub kõige hüdrofoobsem analüüt (1-OH-Pyr). Teineteisele kõige lähemal on kromatogrammil 2-OH-Nap ja 1-OH-Nap piigid. Piikide lahutuse piisavuse hindamiseks kasutatakse lahutuskriteeriumit (R_s), mis arvutatakse vastavalt valemile 1.

$$R_s = 1,18 \frac{t_{r2} - t_{r1}}{w_{0,5H1} + w_{0,5H2}} \quad (1)$$

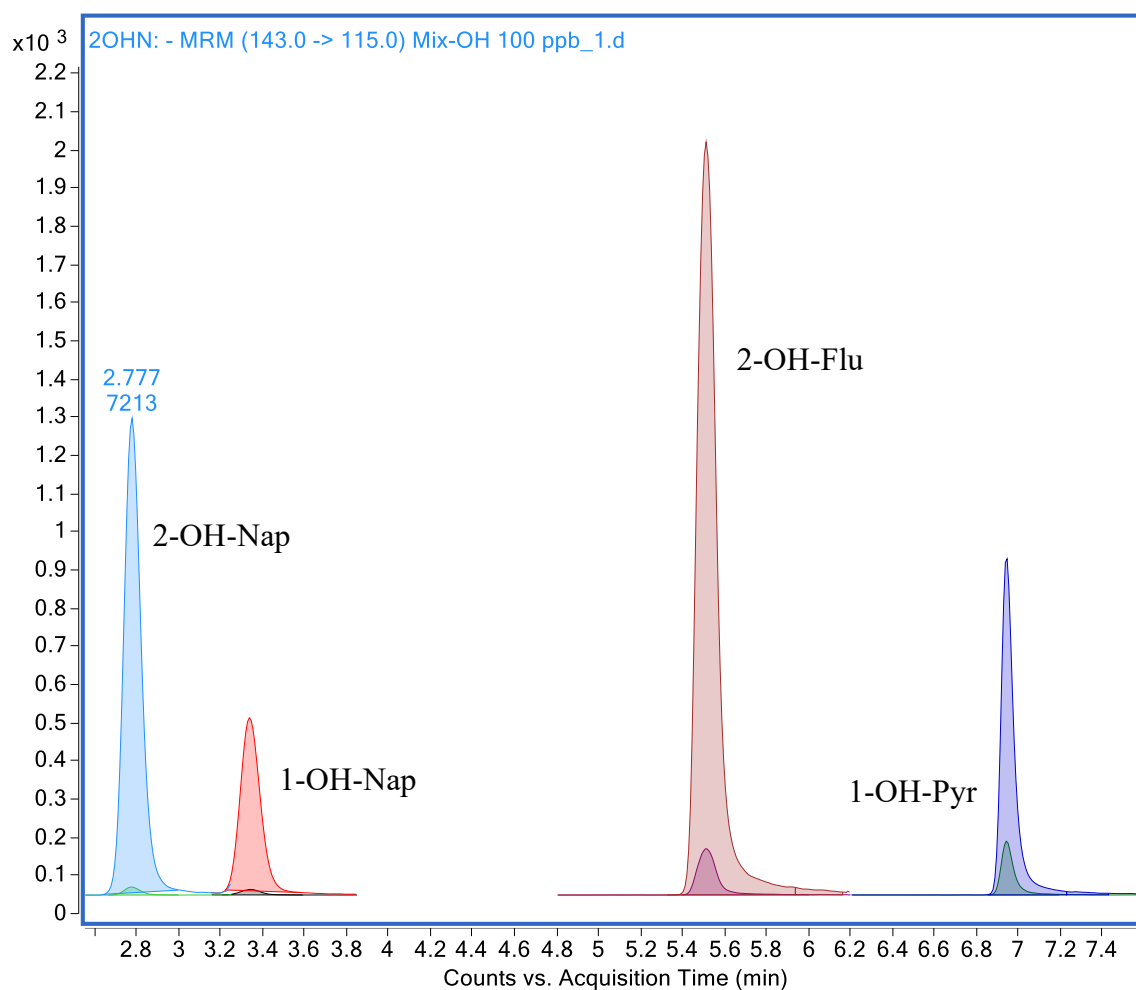
Kus R_s on lahutuskriteerium, t_{r1} ja t_{r2} on kahe lähestikku seisva piigi retentsiooniajad ning $w_{0,5H1}$ ja $w_{0,5H2}$ on nende piikide laius poolmaksimaalse kõrguse tasemel. 2-OH-Nap ja 1-OH-Nap lahutusaste on 3,5, mis näitab, et naftaleeni derivaadid on kolonnil hästi eraldunud ($R_s > 1,5$). Samuti on selgelt lahutunud 2-OH-Flu ja 1-OH-Pyr (vt Joonis 12).

Kolonna surnud aeg (t_m) iseloomustab kolonnist koos mobiilfaasiga, ilma statsionaarse faasiga seostumata läbi liikumiseks kuluvat aega. Surnud ajaga arvestamine aitab tagada analüüside kordustäpsust ja võimaldab hinnata kolonnisüsteemi korrasolekut [20]. Surnud aja määramiseks võib kasutada mitut lähenemist. Tavaliselt määratakse surnud aeg kromatogrammilt kas solvendi piigi abil või statsionaarse faasiga mitteinterakteeruvate ainete retentsiooniaega mõõtes. Kuna massispektromeetrilise detekteerimise korral ei ole näha surnud aega, siis võib selle arvutada. Esmalt saab arvutuslikult hinnata ruumala V_m , mis näitab kolonnis eluendile ligipäasetavat ruumala. Arvutus (valem 2) võtab arvesse kolonna mõõtmeid ja eeldab, et kolonna tahke täidis võtab enda alla ainult 32 % kolonna ruumalast. Teades V_m ja eluendi voolukiirust on lihtne arvutada surnud aeg t_m (valem 3).[20]

$$V_m = 0,68 \cdot \pi \cdot 50 \text{ mm} \cdot \left(\frac{2,1 \text{ mm}}{2}\right)^2 / 1000 = 0,117 \text{ ml} \quad (2)$$

$$t_m = \frac{0,117 \text{ ml}}{0,3 \text{ ml/min}} = 0,39 \text{ min} \quad (3)$$

On leitud, et surnud ajal elueeruvad komponendid ei avalda analüüdi piikidele mõju, kui analüüdi piikide retentsiooniaeg on vähemalt 2 korda suurem kui surnud aeg. Kromatogrammi esimese piigi (vt Joonis 12) retentsiooniaeg (2,8 min) on üle 7 korra pikem surnust ajast, mis aitab vältida surnud ajal elueerivate maatriksi komponentide mõju.



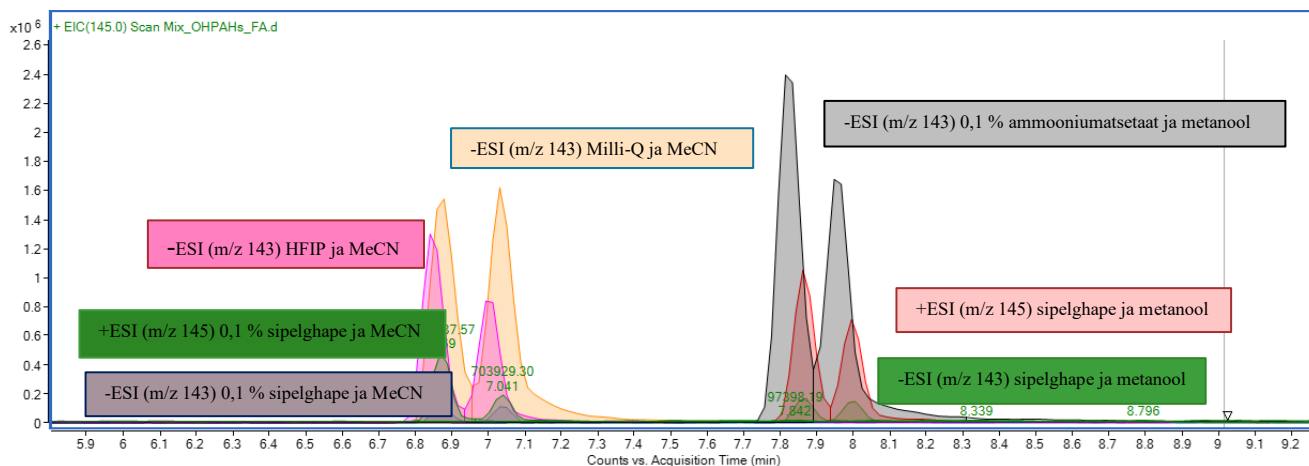
Joonis 12. Analüütide elueerimine Milli-Q ja MeCN eluendis -ESI 100 ppb kontsentratsiooni puhul MRM režiimis

4.2. Massispektrometria parameetrite optimeerimine

Elektropihustusionisatsiooni (ESI) käigus tekkisid 1-OH-Pyr analüüdi molekulaarioonid nii negatiivse kui positiivse režiimi korral (vt Tabel 7). Negatiivse režiimi (-ESI) korral registreeriti kõigi eluentide puhul m/z 217, mis vastab $[M-H]^-$ ioonile. Positiivse režiimi (+ESI) korral saadi eluendi koostisest sõltuvalt erinevad signaalid: metanooli kasutamisel registreeriti m/z 219, mis

vastab $[M+H]^+$ ioonile, samas kui atsetonitriili kasutamisel registreeriti m/z 218, mis viitab molekulaarsele M^+ ioonile. Need tulemused näitavad, et metanool soodustab analüüdi protoneerimist positiivses ioonide režiimis. 1- ja 2-OH-Nap analüütide puhul on näha signaali negatiivses ioonide režiimis kõikide eluentide korral, kus registreeriti m/z 143 $[M-H]^-$ ioon. Samas atsetonitriili ja metanooli ning vee, HFIP ja ammooniumatsetaadi puhul positiivses ioonide režiimis ei leitud analüütide signaali (m/z 145) (vt Joonis 13), mis samas on olemas metanooli ja atsetonitriili ning metaanhape kasutamisel.

Seega üle kõigi kasutatud eluentide ja mõlema ESI režiimi analüüsi tulemusi vaadeldes selgus, et Milli-Q vee ja atsetonitriili kasutamine koos MS negatiivsete ioonide režiimiga on nende kolme ühendi jaoks parim valik. Negatiivse -ESI režiimi korral registreeritud piigid on kõrgemad võrreldes +ESI režiimis registreeritud piikidega, mistõttu lõplikus meetodikas tuleb kasutada ainult -ESI režiimi.



Joonis 13.1- ja 2-OH-Nap elueerimine viies erinevas eluendis -ESI ja +ESI skaneerimise režiimis

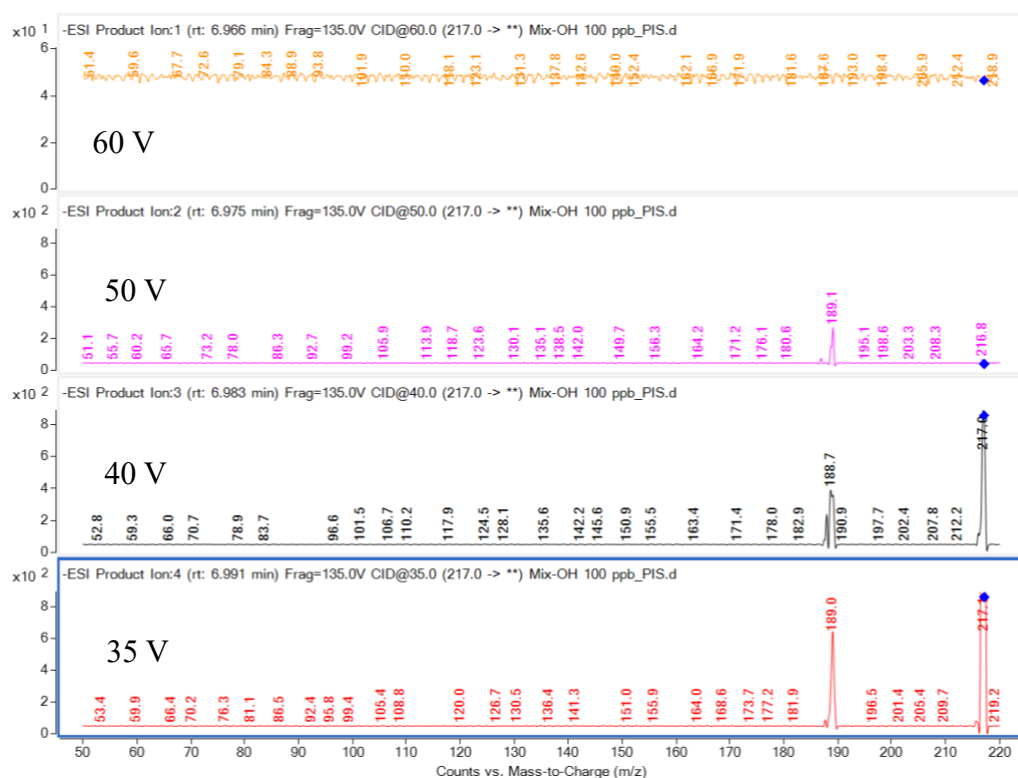
Kõikide analüütide fragmenteerumisel tekkis mitu fragmenti, mis tuvastati produktioonide skaneerimise režiimis. Leitud fragmentioone kasutati edaspidi MRM režiimis. Vastavad üleminekud on näidatud tabelis 8.

Joonisel 14 on toodud 1-OH-Pyr üleminekud erineva pörkeenergia juures. Sealt on näha, et 40 V juures on kõige intensiivsem signaal (m/z 188). Teiseks intensiivseks signaaliks osutus 189 m/z 35 V juures.

1-OH-Nap ja 2-OH-Nap juures oli samuti kaks fragmentiooni, milleks oli 115 m/z 25 V juures ja 114 m/z 40 V juures. Joonisel 15 on näha, et kõige intensiivsem signaal on 40 V juures võrreldes 25 V.

Joonisel 16 on näidatud 2-OH-Flu analüüdi üleminekud, kus 30 V juures on kõige intensiivsem signaal (m/z 180), mis vastab vesiniku lahkumisele. Samuti on leitud signaal 25 V juures (m/z 153).

Üks fragment, mis on tekkinud kõikidel uuritavatel ainetel, oli massiga 28 (vastab etüleenile), kus 1-OH-Pyr korral annab see fragmentiooni m/z 189, 1 – ja 2-OH-Nap korral m/z 115 ja 2-OH-Flu korral m/z 153. Kõiki neid üleminekuid kasutatakse edaspidi MRM režiimis. Samuti tabelis 8 on toodud välja pörkeraku pingeid -ESI korral.



Joonis 14.1-OH-Pyr üleminekud 35 V, 40 V, 50 V ja 60 V pörkeenergia juures -ESI produktiooni režiimis



Joonis 15.1-OH- Nap ja 2-OH-Nap üleminekud 25 V, 40 V, 50 V ja 60 V põrkeenergiate juures -ESI produktiooni režiimis



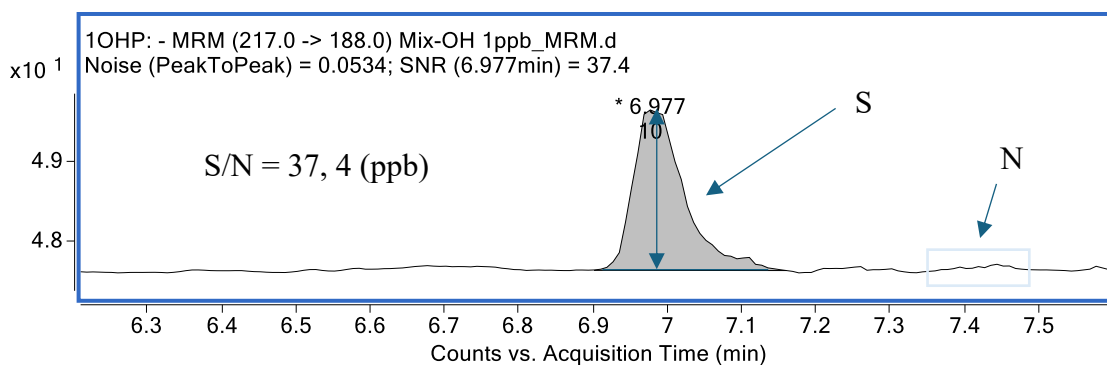
Joonis 16. 2-OH-Flu üleminekud 25 V, 40 V, 50 V ja 60 V põrkeenergiate juures -ESI produktiooni režiimis

Tabel 8. Analüüdid, nende ellasioonid, fragmnetioonid ja pörkeenergiad -ESI režiimis, kui eluendi komponentideks olid atsetonitriil ja vesi

Ühend	Eellasioon (m/z)	Fragmentioonid: kvantitatiivne, kinnitav (m/z)	Pörkeraku pinge (V)	Kvantitatiivse ja kinnitava pindala suhe
1-OH-Pyr	217	189, 188	35, 40	15,8
1-OH-Nap	143	115, 114	25, 40	3,0
2-OH-Nap	143	115, 114	25, 40	1,7
2-OH-Flu	181	153, 180	25, 30	6,0

Tabelis 8 toodud andmete põhjal kasutati mitme ülemineku jälgimise režiimi (MRM) jaoks leitud fragmentioone ja pörkeenergiat, et leida edasi iga analüüdi kromatogrammilt pindala ning signaal/müra suhe. Joonisel 12 on toodud kromatogramm kõigi nelja analüüdi MRM režiimis vee ja atsetonitriili korral.

Signaal/müra suhe võimaldab anda hinnangu meetodika määramis- ja avastamispiiridele. Selle leidmiseks kasutati tarkvara kahte eri režiimi, milleks olid *peak-to-peak* (vt Joonis 17) ja *auto-RMS*. *Peak-to-peak* meetodi põhimõtteks on leida analüüdi piigi baasjoonest lähtuva maksimumkõrguse ja defineeritud müra alast (tühi baasjoone ala enne või pärast piiki) selle ala kõige kõrgema mürapiiği maksimumkõrguse. *Auto-RMS* puhul arvutatakse samuti analüüdi piigi baasjoonest lähtuva maksimumkõrgus ning ette antud müraaknas arvutatakse kõigi andmepunktide standardhälve.

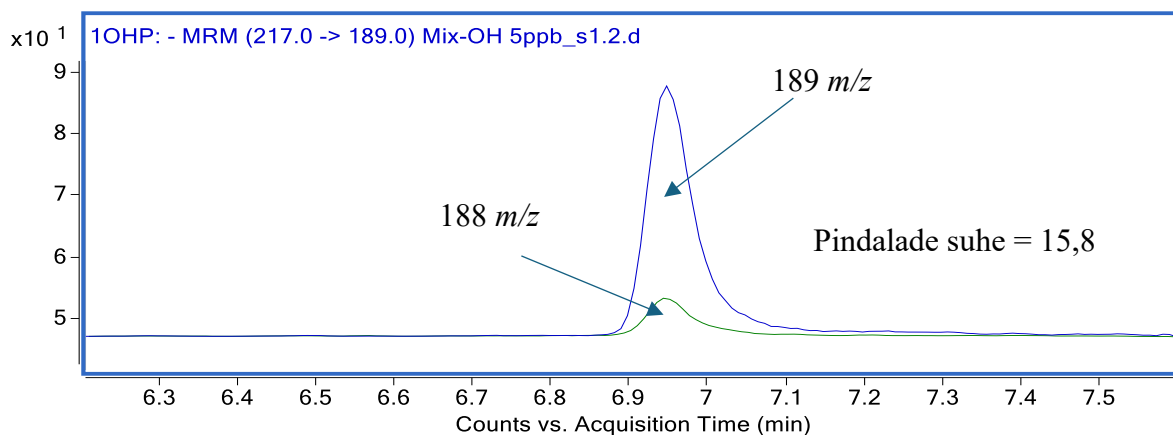


Joonis 17. Näitena 1-OH-Pyr signaal/müra suhe 1 ppb kontsentratsiooni puhul MRM režiimis

4.3. Analüütide kinnitavad ioonid

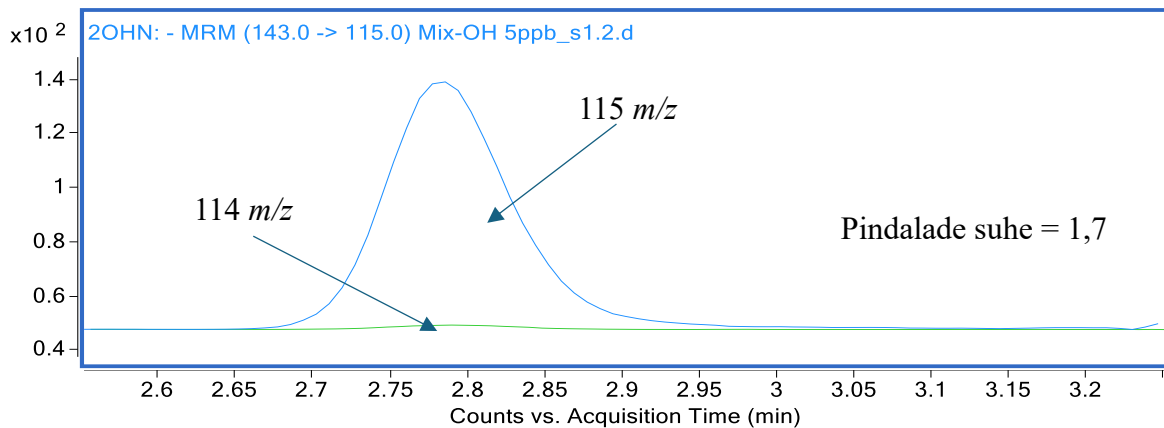
Selektiivsuse tagamiseks ja analüüdi usaldusväärseks tuvastamiseks proovides vajatakse lisaks retentsiooniajale, piikide lahutuvusele ja eellasiooni m/z -le veel täiendavaid kriteeriume, mistõttu kasutatakse analüüdi kinnitamiseks rohkem kui üht üleminekut (vt Tabel 8). See võimaldab veelgi kõrgema tõenäosusega kinnitada, et piik on tingitud analüüdist ja mitte mõnest segavast ühendist.

Kirjanduses ei ole OH-PAH analüüsimeetodikes kasutatud kahte MRM üleminekut [9], [15]. Eeldatakse, et selektiivsuse tagamiseks piisab ühest spetsiifilisest fragmendist. Vaatame näiteks joonisel 18 toodud 1-OH-Pyr kromatogrammi. Kui kinnitavat iooni ei ole, siis eeldatakse, et aine, mis antud tingimustel elueerub 6,97 min juures ning annab iooni m/z 217, mis fragmenteerumisel annab iooni m/z 189, on 1-OH-Pyr. Aga selliste omadustega aineid võib olla rohkem kui üks. Kui täiendavalt registreerida kinnitav üleminek 217->188 ja määrata üleminekutele vastavate piikide pindalade suhte väärtus (joonisel 18 on see 15,8), siis see lisab täiendava kinnituse, et vaadeldava piigi on tekitanud just see analüüt. Seetõttu on oluline igale analüüdile registreerida nii kvantitatiivsele kui kinnitavale ioonile vastav kromatogramm.



Joonis 18. 1-OH-Pyr kaks üleminekut 217-> 189 (kvantitatiivne) ja 217->188 (kinnitav)

Samas 2-OH-Nap puhul on kinnitava ülemineku intensiivsus ning pindalade suhe on märkimisväärselt madalam (vt Joonis 19), mistõttu seda fragmentiooni sageli jäetakse välja ja kasutatakse vaid kvantitatiivset üleminekut. Kõikide analüütide pindalade suhted on toodud tabelis 8.

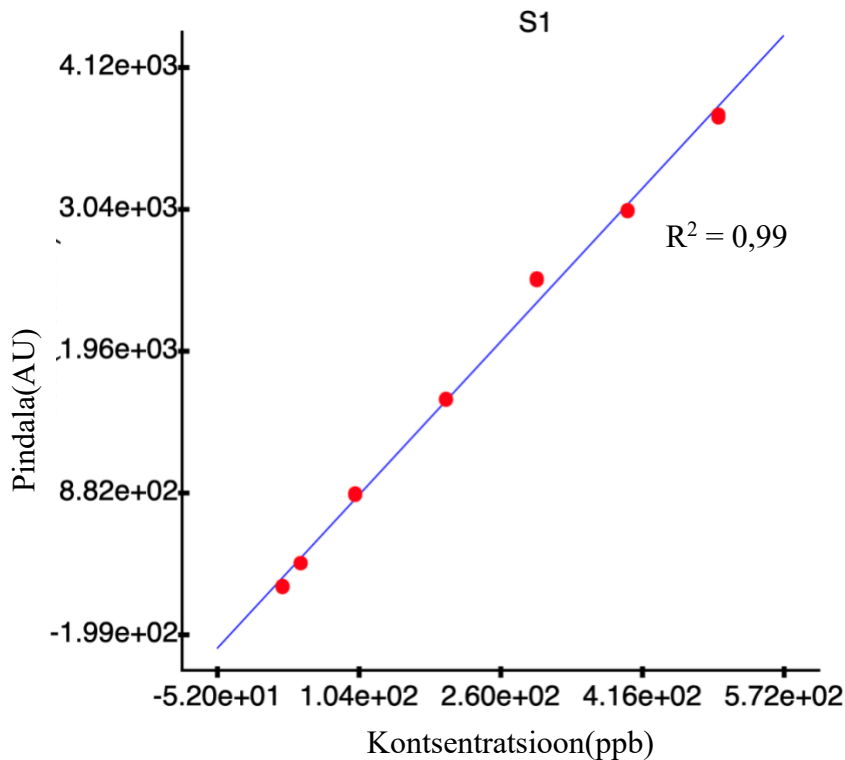


Joonis 19. 2-OH-Nap kaks üleminekut 143-> 115 (kvantitatiivne) ja 143->114 (kinnitav)

Seega teine, kinnitav üleminek aitab eristada õiget analüüti ja annab tõestust lisaks retentsioonijale, lahutuvusele ning m/z-le põhinevale tuvastusele. Kui fragmendi signaal on liiga nõrk, tuleks optimeerida instrumenti parameetreid (nt põrkeenergia) või valida alternatiivne fragment, et säilitada meetodi selektiivsus.

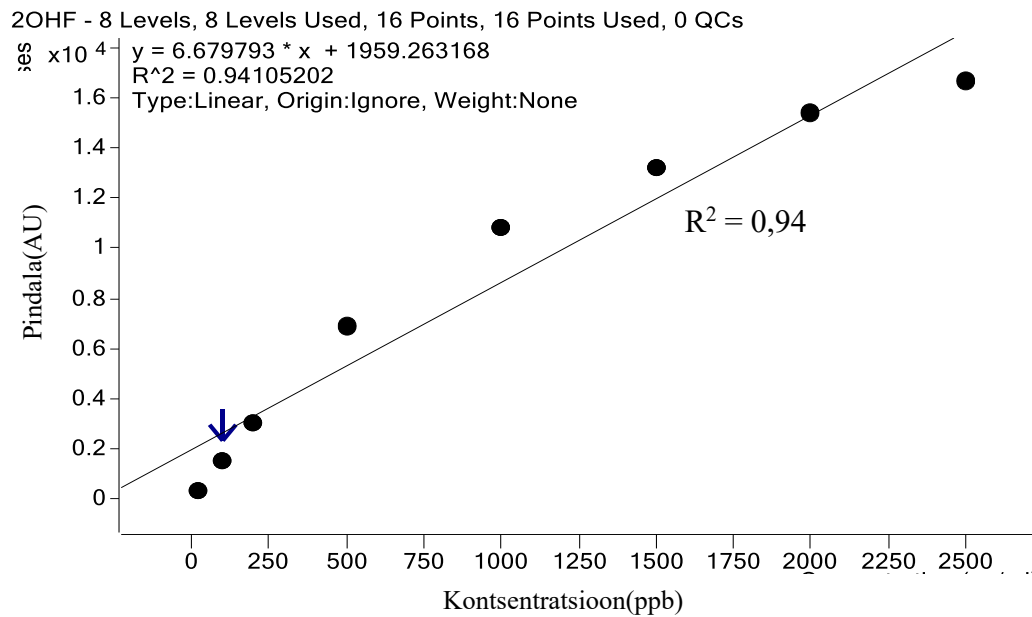
4.4. Meetodi lineaarse ala ja instrumentaalse avastamiskiiruse määramine

Kalibreermislahused valmistati seeriana kontsentratsioonidega 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100 ja 125 ppb (1-OH-Pyr järgi; teiste analüütide kontsentratsioonid on toodud tabelis 4). Analüüsiti kolm paralleeli ning kromatogrammidel registreeriti vastavate piikide pindalad. Lineaarse ala hindamiseks koostati iga ühendi jaoks kalibratsioonikõver (vt Joonis 20), mille signaal (piikide pindala) seostati kontsentratsiooniga kasutades veebipõhist valideerimise tarkvara ValChrom. Lineaarsuse kriteeriumiks oli regressiooni determinatsioonikordaja r^2 , mis pidi olema vähemalt 0,99.

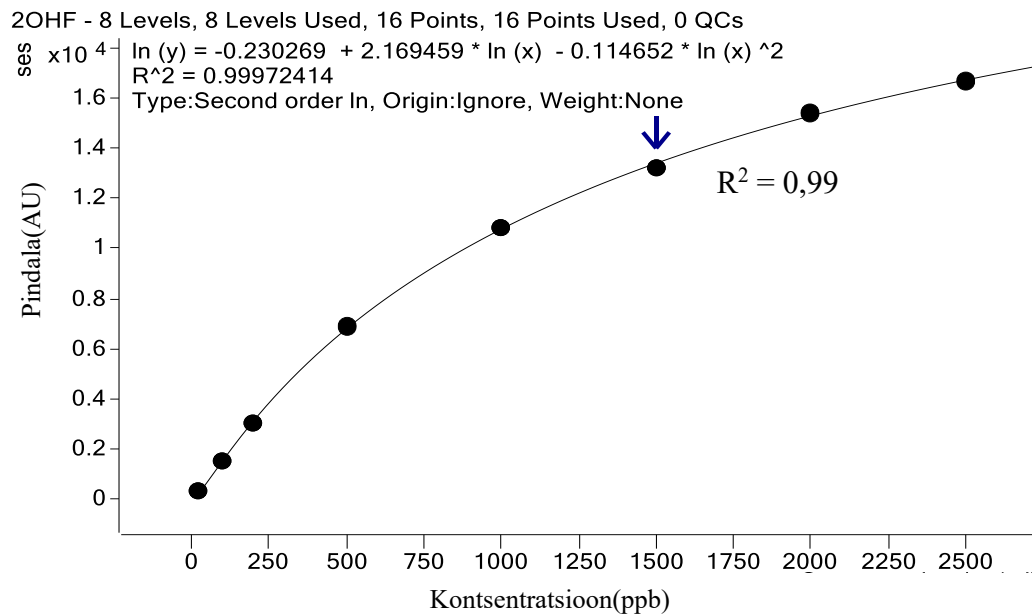


Joonis 20. Näitena ValChrom tarkvara koostatud kalibreerimissirge 1-OH-Nap. Igal kalibreerimistasemel on 2 paralleelmõõtmise punkti, mis joonisel praktiliselt täielikult kattuvad.

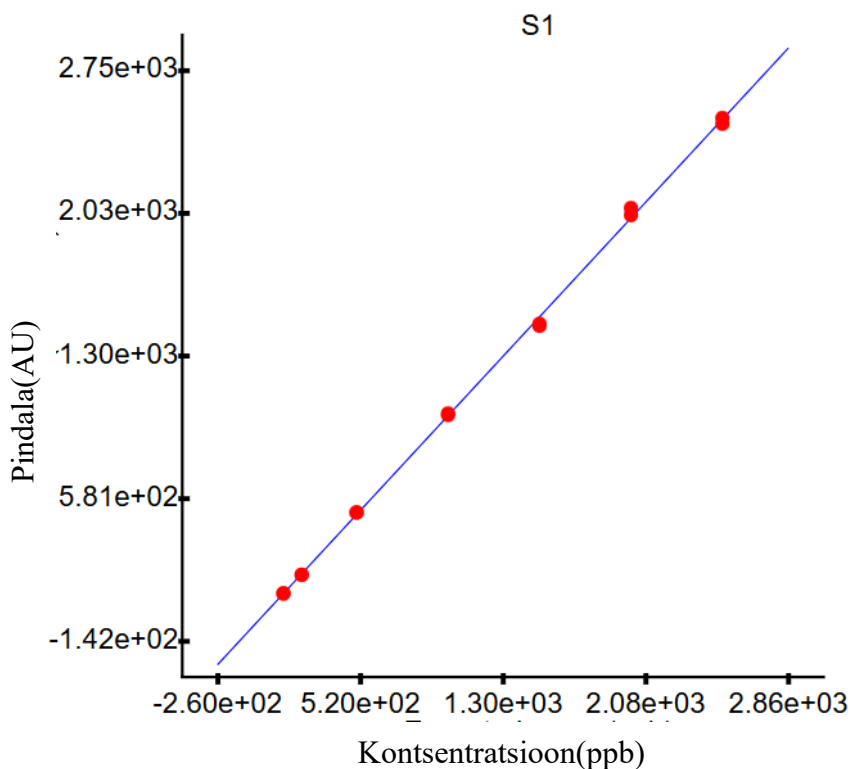
2-OH-Flu korral kasutati laia kontsentratsioonivahemikku (20-2500 ppb). LC-MS analüüsi korral on nii laia kontsentratsioonivahemiku korral piikide pindalade sõltuvus analüüdi kontsentratsioonist tihti mittelineaarne (vt Joonis 21). Väga sageli nõutakse linearsust signaali ja kontsentratsiooni vaheliselt seoselt, kuid õigem oleks jälgida, et linearsus kehtiks kalibreerimisfunktsioonist arvatud kontsentratsiooni ja tegeliku kontsentratsiooni vahel [21]. Sellest lähtuvalt kasutati 2-OH-Flu korral kalibreerimiseks logaritmilist ruutfunktsiooni (vt Joonis 22). Kalibreerimisfunktsiooni järgi tagasi arvatud kontsentratsioonide ja kalibreerimislahuste kontsentratsioonide vahel on lineaarne seos (vt Joonis 23).



Joonis 21. 2-OH-Flu kalibreerimisgraafik kasutades lineaarset funktsiooni



Joonis 22. 2-OH-Flu kalibreerimisgraafik kasutades logaritmilist ruutfunktsiooni



Joonis 23. Näide lineaarsest alast 2-OH-Flu korral, kus x-teljel on kalibreerimislahuse kontsentratsioon ja y-teljel kalibreerimisfunktsioonist tagasi arvatud lahuste kontsentratsioonid ($R^2 = 0,999$).

4.5. Valideerimine

Valideerimine on meetodika sobivuse ja usaldusväärsuse kontroll. Täielikult valideerimisel hinnatakse meetodika selektiivsust, lineaarset ala, avastamiskiir (LoD) ja määramiskiir (LoQ) ning täpsuslikke karakteristikuid.

Avastamiskiir (LoD) ja määramiskiir (LoQ) esialgseks hinnanguks analüüsiti madala kontsentratsiooniga standardlahust (nt 1 ppb) ning arvutati iga piigi signaal/müra suhe (S/N). Instrumentaalse avastamiskiiriks võeti kontsentratsioon, mille $S/N \approx 3$ ning vastav määramiskiir (LoQ) määrati $S/N \approx 10$ suhtega. LoD ja LoQ väärtused väljendati ppb-des ning neid kasutati meetodi kalibreerimisvahemiku alumise piiri hinnanguna. Kuna iga analüüdi jaoks oli LoQ ja LoD erinev, valmistati kalibreerimislahus, mille järjestikusel lahjendamisel jõuaksid kõik analüüdid samaaegselt oma määramis- ja avastamiskiirini (lahustele viidatakse 1-OH-Pyr, mille LoQ on 0,2 ppb ja LoD 0,07 ppb, väärtustega). Lineaarse ala laiuseks hinnati 2,5 suurusjärku (mõni ppb kuni mõnisada ppb). Sellistes vahemikes võib LC-MS meetodi puhul oodata, et signaali intensiivsus sõltuks analüüdi sisaldusest lineaarselt. Ainult 1-OH-Flu korral kasutati oluliselt laiemat kontsentratsioonivahemikku, et testida lineaarsuse leidmist tagasiarvatud kontsentratsiooni kaudu (vt ptk 4.4).

Lineaarsuse hindamine viidi läbi tarkvaraga ValChrom. Kasutati Euroopa Ravimiameti (EMA) [22] bioanalüütiliste meetodite valideerimise juhendit, kuid ValChromi programm kasutab vanemat EMA bioanalüütiliste meetodite valideerimise eeskirja (2011). Programm andis ette valideermisplaani (vt lisa 1), mida kasutades sai määratleda uuritavad karakteristikud.

Metoodika linearse ala uurimiseks valmistati ja analüüsiti kaheksa erineva kontsentratsiooniga kalibreerimislahust (vt Tabel 4) ning leiti regressiooni determinatsioonikordaja r^2 , mis pidi olema vähemalt 0,99. Determinatsioonikordaja oli >0,99 1-OH-Nap ja 1-OH-Flu korral, 2-OH-Nap ja 1-OH-Pyr korral, vastavalt 0,96 ja 0,98 (vt lisa 2).

Lisaks seab EMA valideerimisjuhend piirid tagasiarvutatud kalibreerimislahuste kontsentratsioonide täpsusele. Need peavad üldiselt langema kokku $\pm 15\%$ piires, välja arvatud LoQ tase, kus kokkulangevus võib olla kuni $\pm 20\%$. Lisas 2 toodud lineaarsuse hindamise tulemused näitavad, et kalibreerimisgraafiku alumiste punktide tagasiarvutatud kontsentratsioonid hälbivad oluliselt rohkem kui $\pm 20\%$. See näitab, et S/N järgi hinnatud LoQ-d olid liiga optimistlikud. Isegi pärast kõige madalama kontsentratsiooniga kalibreerimispunktide väljajätmist hälbisid mõned kalibreerimispunktid lubatust rohkem.

Kokku analüüsiti proove kolme seeriana ning saadud korduskatseid saab kasutada meetodika korduvuse hindamiseks.

Kalibreerimisstandarditest eraldi valmistati kontroll-lahust, mille kontsentratsioonid vastasid kalibreerimisgraafiku keskmisele osale. Tabelis 9 on toodud kontroll-lahuse analüüsimise tulemused, tegelikud kontsentratsioonid ja suhtelised vead.

Tabel 9. Analüüdid, kontroll-lahuse analüüsitud kontsentratsioonid ning nende tegelikud kontsentratsioonid

Analüüt	Kontsentratsioon(ppb)	Kalibreerimisgraafikul leitud kontsentratsioon(ppb)	Täpsus (%)
1-OH-Pyr	62	71	114%
2-OH-Nap	248	281	113%

1-OH-Nap	248	258	104%
2-OH-Flu	1240	1266	102%

Iga analüüdi tegelik kontsentratsioon jääb 102 – 114 % vahemikku, mis on aktsepteeritav, seega kalibreerimisgraafikul on tõesed kontsentratsioonid.

4.6. Metoodika arendamise järgmised etapid

Töös leitud instrumentaalsed määramispiirid erinevatele analüütidele on 10 ppb suurusjärgus. Kirjanduses on leitud, et metoodika määramispiir peaks olema 0,02 ppb uriinis. See tähendab, et prooviettevalmistuse (SPE) käigus tuleks proovi kontsentreerida vähemalt 500-kordselt, et viia analüüt instrumentaalsesse kvantifitseerimisvahemikku. See on võimalik, kuid mitte lihtne. Teine võimalus on instrumentaalsete määramispiiride alandamine. Selleks tuleks kaaluda tundlikuma instrumendi kasutamist.

Kui tundlikuma instrumendi määramispiirid on välja selgitatud, siis saab optimeerida SPE prooviettevalmistuse. See peab võimaldama proovi analüüsiks piisavalt kontsentreerida.

Analüütide madalate kontsentratsioonide korral tuleb arvestada võimalusega, et analüüdid adsorbeeruvad lahusest anumate pindadele. Samuti tuleb täpsustada kõik lahuste valmistamise protseduurid, et oleks minimeeritud lahuste ristsaastumise oht.

KOKKUVÕTE

Käesoleva töö eesmärk oli LC-MS meetodika arendamine nelja OH-PAH metaboliidi määramiseks uriiniproovidest. Töös leiti sobivad kromatografeerimise ja detekteerimise tingimused.

Analüütide kromatograafiliseks lahutamiseks uuriti võimalust kasutada viit erinevat solvendi kombinatsiooni: metanooli ja atsetonitriili ning vee, 0,1% sipelghappe ja HFIP vesilahuse segusid. Sobivaimaks osutus atsetonitriili ja vee segu, kuna saadud kromatogramm oli parema lahutusega, analüüdi piigi kõrgus oli suurim.

ESI ionisatsiooni optimeerimise käigus selgus, et 1-OH-Pyr ioniseerus hästi nii positiivses kui negatiivses ESI režiimis, samas kui 1-OH-Nap ja 2-OH-Nap andsid usaldusväärse signaali vaid negatiivses režiimis. Seetõttu kasutati edasiseks detekteerimiseks ja MRM režiimis vaid negatiivsete ionide režiimi.

Produktiooni režiimi kasutamine näitas, et kõigi analüütide puhul tekkis negatiivses ESI režiimis mitu fragmentiooni. See võimaldab edaspidi kasutada lisaks kvantitatiivsele üleminekule ka kinnitavat iooni, mis on oluline analüüdi tõestamiseks proovides. Mõlemad üleminekud võeti kasutusele MRM meetodis. Näidati, et meetod on lineaarne alates 10 ppb kontsentratsioonist kuni 125 ppb (1-OH-Pyr) või 500 ppb-ni (1- ja 2-OH-Nap). 1-OH-Flu korral uuriti alternatiivset võimalust määratleda lineaarset ala tagasiarvutatud kontsentratsioonide kaudu. See võimaldas lineaarset ala laiendada kuni 2500 ppb-ni.

Leiti, et analüüsi eesmärkide saavutamiseks tuleks meetodika üle viia tundlikumale instrumendile. Välja töötatud kromatograafiline meetod ja leitud MRM üleminekud on sellele väga heaks aluseks.

SUMMARY

The aim of the present work was to develop an LC-MS methodology for the determination of four OH-PAH metabolites in urine samples. Suitable chromatography and detection conditions were found.

For the chromatographic separation of the analytes, the possibility of using five different solvent combinations was investigated: methanol and acetonitrile, and mixtures of water, 0.1% formic acid, and HFIP aqueous solution. The mixture of acetonitrile and water was found to be the most suitable, as the resulting chromatogram showed better resolution with the highest peak height of the analyte.

The optimization of ESI ionization revealed that 1-OH-Pyr ionized well in both positive and negative ESI modes, while 1-OH-Nap and 2-OH-Nap gave a reliable signal only in the negative mode. Therefore, only the negative ion mode was used for further detection and MRM.

The use of the product ion mode showed that multiple fragmentations were produced in the negative ESI mode for all analytes. This allows for the future use of a confirmatory ion in addition to the quantitative transition, which is essential for the detection of the analyte in samples. Both transitions were introduced in the MRM method. The method was shown to be linear from a concentration of 10 ppb up to 125 ppb (1-OH-Pyr) or 500 ppb (1- and 2-OH-Nap). In the case of 1-OH-Flu, an alternative way of defining the linear range by back-calculated concentrations was investigated. This allowed the linear range to be extended up to 2500 ppb.

It was concluded that the methodology should be transferred to a more sensitive instrument to achieve the analytical objectives. The chromatographic method developed and the MRM transitions found provide a very good basis for this.

KASUTATUD KIRJANDUS

- [1] G.V. Zykova, S.Y. Semenov, and V.N. Smirnov, "Determination of the PAH metabolites in human urine by high-performance liquid chromatography - PDF (Russian) - Zykova - RUDN Journal of Ecology and Life Safety." Accessed: Apr. 09, 2024. [Online]. Available: <https://journals.rudn.ru/ecology/article/view/12406/11836>
- [2] H. Orru and A. Viitak, "Biomonitoringu läbiviimine põlevkivi sektoriga kokku puutuva elanikkonna seas (töötajad ja elanikud)", [Online]. Available: https://www.terviseamet.ee/sites/default/files/Keskkonnatervis/Biomonitoringu_läbivii_mine_põlevkivi_sektoriga_kokku_puutuva_elanikkonna_seas.pdf
- [3] B. Moorthy, C. Chu, and D. J. Carlin, "Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: From Metabolism to Lung Cancer," *Toxicol. Sci.*, vol. 145, no. 1, pp. 5–15, May 2015, doi: 10.1093/toxsci/kfv040.
- [4] H. Jin *et al.*, "Effects and mechanisms of polycyclic aromatic hydrocarbons in inflammatory skin diseases," *Sci. Total Environ.*, vol. 925, p. 171492, May 2024, doi: 10.1016/j.scitotenv.2024.171492.
- [5] Sotničenko A.I., Ohanov V.V., "Policikličeskie aromatičeskie uglevody (PAU)," *RUDN Journal of Ecology and Life Safety*, no. 2, pp. 128–131, 2014.
- [6] L. Ball, H. Carter, C. Baker, and R. Porter, "The development of rapid immunoassays for the urinary analysis of 1-hydroxypyrene glucuronide facilitate both laboratory and on-site polycyclic aromatic hydrocarbon biomonitoring," *Toxicol. Lett.*, vol. 401, pp. 116–124, Nov. 2024, doi: 10.1016/j.toxlet.2024.10.002.
- [7] B. Oesch-Bartlomowicz and F. Oesch, "Mechanisms of Toxicification and Detoxification which Challenge Drug Candidates and Drugs," in *Comprehensive Medicinal Chemistry II*, Elsevier, 2007, pp. 193–214. doi: 10.1016/B0-08-045044-X/00124-3.
- [8] B. Munoz and A. Albores, "DNA Damage Caused by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Mechanisms and Markers," in *Selected Topics in DNA Repair*, C. Chen, Ed., InTech, 2011. doi: 10.5772/22527.
- [9] B. Ramsauer *et al.*, "A liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for the determination of phenolic polycyclic aromatic hydrocarbons (OH-PAH) in urine of non-smokers and smokers," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 399, no. 2, pp. 877–889, Jan. 2011, doi: 10.1007/s00216-010-4355-7.
- [10] Demetria Dickinson, "Mass Spectrometry: A Powerful Analytical Tool in Biopharma | Technology Networks," 2022, Accessed: Jun. 02, 2024. [Online]. Available: <https://www.technologynetworks.com/biopharma/articles/mass-spectrometry-a-powerful-analytical-tool-in-biopharma-361064>
- [11] Douglas A. Skoog, F. James Holler, and Timothy A. Nieman, *Principles of instrumental analysis*, 5th ed. Saunders College Pub., 1998.
- [12] X. Zhang, H. Hou, W. Xiong, and Q. Hu, "Development of a Method to Detect Three Monohydroxylated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Human Urine by Liquid Chromatographic Tandem Mass Spectrometry," *J. Anal. Methods Chem.*, vol. 2015, pp. 1–8, 2015, doi: 10.1155/2015/514320.
- [13] K. Takkis *et al.*, "Signal Enhancement in the HPLC-ESI-MS/MS analysis of spironolactone and its metabolites using HFIP and NH₄F as eluent additives," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 409, no. 12, pp. 3145–3151, May 2017, doi: 10.1007/s00216-017-0255-4.
- [14] K. Nguyen *et al.*, "Improvement on recovery and reproducibility for quantifying urinary mono-hydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons (OH-PAHs)," *J. Chromatogr. B*, vol. 1192, p. 123113, Mar. 2022, doi: 10.1016/j.jchromb.2022.123113.
- [15] Julianne Cook Botelho and James L. Pirkle, "Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)".

- [16] A. Poterala-Hejmo, A. Golda, M. Pacholczyk, S. Student, A. Tylki-Szymańska, and A. Lalik, "A Possible Role for Arylsulfatase G in Dermatan Sulfate Metabolism," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 14, p. 4913, Jul. 2020, doi: 10.3390/ijms21144913.
- [17] T. Gorella, R. Pmn, and D. P. Wagh, "Development of a High Sensitivity, Sub- Picogram SPE LC-MS Method for Quantification of Mometasone from Human Plasma".
- [18] M. Hříbková, "Miniaturized solid-phase extraction in analysis of amino compounds by LC-MS/MS".
- [19] S. Jamaledin and F. Dehghi, "Solid Phase Extraction for 1-Hydroxypyrene as a Biomarker of Occupational Exposure to PAHs Prior to High Performance Liquid Chromatography," *Iran J Chem Chem Eng*, vol. 26, 2007.
- [20] M. Prokoptšik, "Kromatogrammid õppetöök ja FAIR andmeteks".
- [21] E. Rozet *et al.*, "Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation," *J. Chromatogr. A*, vol. 1158, no. 1–2, pp. 111–125, Jul. 2007, doi: 10.1016/j.chroma.2007.03.111.
- [22] "EMA, Committee for Medicinal Products for Human Use, Guideline on bioanalytical method validation, 2022."

Lisa 1. ValChromi valideerimisplaan

5/5/25, 6:10 PM

ValChrom

Experimental Plan

Name: OHP
Created on: 05 May 2025

Experiment plan for validation

1. Introduction

Current experiment plan is used to design and carry out analytical experiment for validation with ValChrom software according to the choices user has made in validation plan. Experimental plan is devised for minimal number of chromatographic runs. The plan focuses on performing as many experiments as possible in one series. It is always possible to upload more than the minimum number of series (or levels or parallels, etc.) in ValChrom.

2. Experiments to perform

Chosen assessment methods:

- Provide m/z data
- Provide resolution data
- Provide S/N data and/or upload chromatogram(s)
- 3 series with 6 levels in parallel with blank and zero, matrix matched
- Intermediate precision | 3 series with 4 concentration levels on least 2 different days using LoQ, low, medium and high QC
- Between-run: 3 series with 4 concentration levels on least 2 different days using LoQ, low, medium and high QC

General instructions for laboratory experiments:

Series 1 (day 1)

1. Level 1 (Mobile phase (start of gradient composition))
2. Level 2 (Blank)
3. Level 3 (Reference substance of known purity)
4. Level 4 (Sample, LoD and LoQ) (1)
5. Level 5 (Sample, LoD and LoQ) (1)
6. Level 6 (Calibration) x 2
7. Level 7 (Calibration) x 2
8. Level 8 (Calibration) x 2

9. Level 9 (Calibration) x 2
10. Level 10 (Calibration) x 2
11. Level 11 (Calibration) x 2
12. Level 12 (Zero)
13. Level 13 (Sample, defined conc. levels, see comments) (2)
14. Level 14 (Sample, defined conc. levels, see comments) (2)
15. Level 15 (Sample, defined conc. levels, see comments) (2)
16. Level 16 (Sample, defined conc. levels, see comments) (2)

Series 2 (day 1)

1. Level 6 (Calibration) x 2
2. Level 7 (Calibration) x 2
3. Level 8 (Calibration) x 2
4. Level 9 (Calibration) x 2
5. Level 10 (Calibration) x 2
6. Level 11 (Calibration) x 2
7. Level 2 (Blank)
8. Level 12 (Zero)
9. Level 13 (Sample, defined conc. levels, see comments) (2)
10. Level 14 (Sample, defined conc. levels, see comments) (2)
11. Level 15 (Sample, defined conc. levels, see comments) (2)
12. Level 16 (Sample, defined conc. levels, see comments) (2)

Series 3 (day 2)

1. Level 6 (Calibration) x 2
2. Level 7 (Calibration) x 2
3. Level 8 (Calibration) x 2
4. Level 9 (Calibration) x 2
5. Level 10 (Calibration) x 2
6. Level 11 (Calibration) x 2
7. Level 2 (Blank)
8. Level 12 (Zero)
9. Level 13 (Sample, defined conc. levels, see comments) (2)
10. Level 14 (Sample, defined conc. levels, see comments) (2)
11. Level 15 (Sample, defined conc. levels, see comments) (2)
12. Level 16 (Sample, defined conc. levels, see comments) (2)

Comments

1. Analyse Samples with known analyte concentration in LoD region and LoQ region.

2. Concentration levels of Samples have to cover linear range so that they are at LoQ, 3 x LoQ, middle of linear range (30-50% range) and high concentration (>75%) of linear range.

3. Additional information

Definitions:

- **Calibration** samples are solutions with analyte concentration at different levels, that are used for calibration of the analysis instrument. They should have the same composition as will be used in the routine use of the method.
- **Samples** are either (certified) reference materials or blank matrices spiked with known amount of analyte standard with known purity, that are not used for calibration.
- **Zero** sample is sample without analyte. Contains internal standard, if used.
- **Blank** sample is blank matrix which contains neither analyte nor internal standard.
- **Series** is a set of measurements done in one go without interruptions.
- **Levels** are used to denote samples that have intentionally different concentrations within a series (e.g. 80%, 100% and 120% of target level), not different concentrations from repeatability, sample pretreatment, etc. causes.
- **Parallels** [e.g. Level 1 (Calibration) x 3] are used to denote the different subsamples taken from the same homogenized sample. For each subsample a separate pretreatment and measurement procedure has been carried out. Parallel is not a repeated injection from the same sample vial.
- **Analyte** is the substance to be determined.

Lisa 2. Valideerimise tulemused

ValChrom tarkvara abil lineaarsuse hindamise tulemused on toodud järgnevatel joonistel, kus A – 2-OH-Nap, B- 1-OH-Nap, C – 2-OH-Flu, D – 1-OH-Pyr.

3 series with 6 levels in replicate with blank and zero, matrix matched

Criteria	Limit	Found	Decision
Back-calculated concentration - minimum per cent of parallels passing per level	50.0%	0.0%	✗
Back-calculated concentration - minimum per cent of levels passing	75.0%	85.7%	✓
Back-calculated concentration - minimum number of levels	6	7	✓
Maximum back-calculated concentration error for LoQ	20.0%	-4.91%	✓
Maximum back-calculated concentration error	15.0%	23.2%	✗
Minimum squared correlation coefficient (R2)	0.99	0.964	✗

A

3 series with 6 levels in replicate with blank and zero, matrix matched

Criteria	Limit	Found	Decision
Back-calculated concentration - minimum per cent of parallels passing per level	50.0%	0.0%	✗
Back-calculated concentration - minimum per cent of levels passing	75.0%	100.0%	✓
Back-calculated concentration - minimum number of levels	6	7	✓
Maximum back-calculated concentration error for LoQ	20.0%	-48.1%	✗
Maximum back-calculated concentration error	15.0%	-15.0%	✓
Minimum squared correlation coefficient (R2)	0.99	0.995	✓

B

3 series with 6 levels in replicate with blank and zero, matrix matched

Criteria	Limit	Found	Decision
Back-calculated concentration - minimum per cent of parallels passing per level	50.0%	0.0%	✗
Back-calculated concentration - minimum per cent of levels passing	75.0%	100.0%	✓
Back-calculated concentration - minimum number of levels	6	7	✓
Maximum back-calculated concentration error for LoQ	20.0%	-48.1%	✗
Maximum back-calculated concentration error	15.0%	-15.0%	✓
Minimum squared correlation coefficient (R2)	0.99	0.995	✓

C

3 series with 6 levels in replicate with blank and zero, matrix matched

Criteria	Limit	Found	Decision
Back-calculated concentration - minimum per cent of parallels passing per level	50.0%	0.0%	✘
Back-calculated concentration - minimum per cent of levels passing	75.0%	71.4%	✘
Back-calculated concentration - minimum number of levels	6	7	✔
Maximum back-calculated concentration error for LoQ	20.0%	107.0%	✘
Maximum back-calculated concentration error	15.0%	37.5%	✘
Minimum squared correlation coefficient (R2)	0.99	0.982	✘

D

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Sofia Nazarova,

1. Annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose

“LC-MS analüüsimetoodika arendamine polütsükliiliste aromaatsete süsivesinike biomarkerite määramiseks“, mille juhendajad on Koit Herodes ja Michaela Hřibková,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada Tartu Ülikooli digitaalarhiivi kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni;

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu

Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi kaudu Creative Commonsi

litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja

üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni

autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega

isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Sofia Nazarova

26.05.2025