



Разработка и валидация биоаналитической методики количественного определения гетероциклов (фуран и метилфуран) в крови человека методом хромато-масс-спектрометрией (ГХ-МС)

Т.В. Нурисламова, О.А. Мальцева, Н.А. Попова, Т.В. Чинько

ФБУН «ФНЦ медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», ул. Монастырская, д. 82, г. Пермь, 614045, Российская Федерация

Резюме

Введение. Фураны входят в перечень основных экополлютантов, составляющих ксенобиотический профиль. Высокая канцерогенность и мутагенность фуранов даже при низких концентрациях в организме человека, порядка 10^{-12} – 10^{-15} г/кг, могут создавать реальную угрозу здоровью настоящего и будущих поколений.

Цель исследования: разработка и валидация авторской методики количественного определения потенциально опасных фурана и метилфурана в крови человека для обеспечения контроля за содержанием экзогенных соединений в биологических средах, для выполнения работ по оценке риска здоровью населения при воздействии химических веществ.

Материалы и методы. Разработка методики определения фурана и метилфурана в крови человека основана на принципах: установление хромато-масс-спектрометрических условий анализа; экспериментальная отработка эффективных способов подготовки образца биосреды (кровь) к хромато-масс-спектрометрическому анализу; экспериментальное доказательство пригодности разработанной методики для решения задач по количественному определению фурана и метилфурана в крови.

Результаты. Разработанная методика базируется на жидко-жидкостной экстракции органическим растворителем с целью извлечения и концентрирования аналитов в щелочной среде в течение 5 минут до установления межфазного равновесия и дальнейшем анализе экстракта методом капиллярной газовой хроматографии. Достигнута высокая степень извлечения фурана и метилфурана из образцов крови 98 и 98,5 %. Для идентификации фуранов в биосреде применяли масс-спектрометрическое детектирование с регистрацией спектра масс-ионов.

Выводы. На основании выполненных исследований разработана и валидирована в условиях лаборатории высокочувствительная и специфичная методика газохроматографического определения фурана и метилфурана в крови с масс-спектрометрическим детектированием. Диапазон измеряемых концентраций для фурана и метилфурана составил от 0,0019 до 0,09 мг/дм³. В процессе валидации методики установлены пределы обнаружения (LOD) изучаемых соединений в крови, которые составили для фурана до 0,00011 мкг/см³ и до 0,000021 мкг/см³ для метилфурана.

Ключевые слова: экстракция, фуран и метилфуран, газовая капиллярная хроматография, масс-спектрометрическое детектирование, LOD, LOQ.

Для цитирования: Нурисламова Т.В., Мальцева О.А., Попова Н.А., Чинько Т.В. Разработка и валидация биоаналитической методики количественного определения гетероциклов (фуран и метилфуран) в крови человека методом хромато-масс-спектрометрией (ГХ-МС) // Здоровье населения и среда обитания. 2023. Т. 31. № 9. С. 7–15. doi: 10.35627/2219-5238/2023-31-9-7-15

Development and Validation of a Bioanalytical Method of Measuring Heterocyclic Organic Compounds (Furan and Methylfuran) in Human Blood Using GC-MS

Tatyana V. Nurislamova, Olga A. Mal'tseva, Nina A. Popova, Tatyana V. Chinko

Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, 82 Monastyrskaya Street, Perm, 614045, Russian Federation

Summary

Background: Furans are global ecotoxicants making up the xenobiotic profile. High carcinogenicity and mutagenicity of these chemicals for humans even at concentrations as low as 10^{-12} – 10^{-15} g/kg, can pose health risks for the present and future generations.

Our objective was to develop and validate the authors' method of measuring potentially dangerous furan and methylfuran in human blood to ensure control over the levels of exogenous compounds in biological fluids for further assessment of related human health risks.

Materials and methods: Development of the technique of measuring in human blood levels of furan and methylfuran was based on the following principles: establishment of gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analytical conditions; experimental search for effective methods of blood sample preparation for the GC-MS analysis, and validation of the developed procedure.

Results: The method includes liquid-liquid extraction with a polar organic solvent in an alkaline medium during 5 minutes until the inter-phase equilibrium is reached and further capillary gas chromatography. It ensures a high degree of recovery of furan and methylfuran from blood samples equaling 98 % and 98.5 %, respectively. Mass spectrometry detection with registering the mass spectrum of ions was used for identifying furans in the biological fluid.

Conclusions: We have developed and validated a highly sensitive and specific method for GC-MS measurement of furan and methylfuran in human blood within the range of 0.0019 to 0.09 mg/dm³. The limits of detection of the chemicals were established within method validation, which appeared to be up to 0.00011 µg/cm³ for furan and up to 0.000021 µg/cm³ for methylfuran.

Keywords: extraction, furan, methylfuran, capillary gas chromatography, mass spectrometric detection, LOD, LOQ.

For citation: Nurislamova TV, Maltseva OA, Popova NA, Chin'ko TV. Development and validation of a bioanalytical method of measuring heterocyclic organic compounds (furan and methylfuran) in human blood using GC-MS. *Zdorov'e Naseleniya i Sreda Obitaniya*. 2023;31(9):7–15. (In Russ.) doi: 10.35627/2219-5238/2023-31-9-7-15

Введение. Общий подъем индустриализации, а также агрохимический прогресс в сельском хозяйстве приводят к общей «химизации» среды обитания и, как следствие, к повышению роли химико-аналитического контроля при решении проблем взаимодействия человека с окружающей средой. В этом случае происходит непроизвольное расширение номенклатуры как объектов исследования, так и числа антропогенных ксенобиотиков. Среди них загрязнители, воздействующие на среду обитания на чрезвычайно низком уровне (нижний предел обнаружения – 10^{-10} – 10^{-11} %), таких токсичных соединений, как фураны [1].

Опасность фуранов для человека и окружающей среды обусловлена целым рядом свойств: токсичность, устойчивость к разложению, способность к биоаккумуляции, предрасположенность к атмосферному переносу на большие расстояния. В организм человека из воздуха и с пылью поступает ежедневно 3 пг/день фурана (российская ПДК фурана для атмосферного воздуха – 0,5 пг/м³) и его производных, если рядом есть постоянные источники стойких органических загрязнителей (СОЗ) [2–4].

Фураны входят в перечень основных экополютантов, составляющих ксенобиотический профиль [5]. Высокая канцерогенность и мутагенность фуранов даже при низких концентрациях в организме человека, порядка 10^{-12} – 10^{-15} г/кг, могут создавать реальную угрозу здоровью настоящего и будущих поколений. Концентрация фуранов по мере перемещения по пищевой цепочке может возрастать в тысячи и десятки тысяч раз. В связи с этим возникает необходимость его качественного и количественного контроля [6, 7]. Кроме того, фуран является гетероциклическим органическим промышленным химическим и пищевым загрязнителем. Канцерогенные эффекты фурана объясняются генотоксическими и негенотоксичными механизмами; накопленные данные показали возникновение устойчивого гипометилирования цитозинной ДНК, гиперметилирования промоторной области в генах-супрессорах опухолей и вилочковой коробке E1 (FOXE1) и деацетилирования гистона H3 в лизинах 9 и 56 в печени при воздействии фурана. Это указывает на то, что эпигенетические изменения не являются случайным событием и играют фундаментальную роль в гепатобилиарном канцерогенезе, связанном с фураном [8–12].

Концентрация фуранов по мере перемещения по пищевой цепочке может возрастать в тысячи и десятки тысяч раз [13, 14]. Проведение биомониторинга с использованием современных прецизионных аналитических методик контроля содержания токсичных соединений в биологических средах направлено на совершенствование системы контроля качества, оценки риска и безопасности объектов окружающей среды, что, в свою очередь, будет способствовать сохранению здоровья населения [15, 16].

Актуальность разработки методики определения потенциально опасных фурана и метилфурана в крови заключается во внедрении методологии биомониторинга в РФ для повышения объективности оценки вреда здоровью в условиях хими-

ческого загрязнения окружающей среды на базе существующей системы социально-гигиенического мониторинга в учреждениях Роспотребнадзора во взаимодействии с лечебными учреждениями Минздрава РФ.

Цель исследования – разработка и валидация авторской методики количественного определения потенциально опасных фурана и метилфурана в крови человека для обеспечения контроля за содержанием экзогенных соединений в биологических средах, для выполнения работ по оценке риска здоровью населения при воздействии химических веществ.

Материалы и методы исследования. Предметом исследований являлись биосреда (гемолимфа человека), технологическая разработка хромато-масс-спектрометрической методики: экспериментальном установлении хромато-масс-спектрометрических условий анализа фурана и метилфурана с использованием стандартного образца на капиллярных колонках различной полярности и способы подготовки биопробы (кровь) для химического анализа, изучении степени экстракции методом «введено-найдено», количественного определения и валидации методики. Период разработки методики определения фурана и метилфурана в крови составил январь – июль 2023 г.

Химические материалы и реагенты: фуран и метилфуран (Sigma-Aldrich), массовая доля основного вещества фурана и метилфурана $\geq 99,0$ %; гептан нормальный эталонный (ГОСТ 25828-83¹); газообразный гелий марки «А», в баллонах (ТУ 20.11.11-002-01868373); газообразный азот осч (чистота 99,996 %).

Инструменты и условия анализа: хромато-масс-спектрометрическая система, («Хроматэк-Кристалл» (Россия)) в составе: хроматограф с отечественным квадрупольным масс-спектрометрическим (масс-селективный) детектором, режим Split ratio азот: воздух – 12,5, температура ионного источника – 200 °С, температура квадрупольного масс-анализатора – 150 °С, ток эмиссии – 70 эВ; кварцевая колонка серии DB-5MS 60 m × 0,250 mm × 0,250 μ m.

Этапы исследования:

1 – экспериментальная отработка хромато-масс-спектрометрических условий определения фурана и метилфурана с применением стандартных растворов;

2 – выбор органического растворителя для исследований;

3 – изучение зависимости полноты экстракции фурана и метилфурана из биоматериала (кровь) методами экстракции органическим растворителем;

4 – количественное определение гетероциклов в крови.

Экспериментальная отработка хромато-масс-спектрометрических условий анализа фурана и метилфурана в пробах крови

Регулируя полярность соответствующим подбором неподвижных жидких фаз или используя капиллярные колонки с различными по полярности НЖФ, можно достигать высокой эффективности разделения.

¹ ГОСТ 25828-83. Гептан нормальный эталонный. М.: Стандартинформ, 2009. 5 с.

Экспериментально отработаны и подобраны условия разделения фурана, метилфурана и сопутствующих компонентов на кварцевых капиллярах для хроматографических колонок, заполненных неподвижными жидкими фазами с различными характеристиками: полярная цианопропильная фаза, слабополярная фаза с покрытием нитротерефталевой кислотой и DB-5MS 60 m × 0,250 mm × 0,250 μm, на которой было достигнуто разделение фурана и метилфурана. Хроматографическое разделение компонентов пробы основывается на селективности сорбента и термодинамических свойствах аналитов по отношению к хроматографической системе. На селективность оказывает влияние температура, а на эффективность влияет скорость потока газа-носителя. С увеличением температуры снижается селективность, но при этом повышается эффективность. В процессе разделения фурана и метилфурана во времени применяли режим программирования температуры колонки, т. е. температуру капиллярной колонки повышали от 40 до 200 °C со скоростью 40 °C/мин, что позволило разделить и выделить все компоненты биологического образца.

Результаты. В условиях эксперимента были отработаны расход газа-носителя с делением потока азот:воздух и без деления потока азот:воздух. Диапазон сканирования выполнен от 37 до 150 а.е.м. Результаты экспериментально отработанных условий хроматографирования представлены в табл. 1.

Эффективное разделение следовых количеств легколетучих органических соединений (фуран и метилфуран) основано на экспериментально отработанных оптимальных газохроматографических

параметрах и вводе пробы в поток газа-носителя с делением потока с коэффициентом деления 12,5 (режим 2, табл. 1). Хроматограмма стандартного раствора фурана и метилфурана при отработанных хромато-масс-спектрометрических условиях анализа представлена на рис. 1.

Использование органического растворителя для экстракции фурана и метилфуран из биологической среды (кровь)

Метод экстракции – процесс изолирования органическими растворителями химических соединений из различных биообъектов [15].

Сложность экстракции фурана и метилфурана из крови обусловлена достаточно высокой степенью связывания данных соединений с белками крови (50–60 %) [17]. Поэтому для изолирования фурана и метилфурана из крови применяли ряд органических полярных и неполярных растворителей и изучали влияние различных факторов на эффективность экстракции фурана и метилфурана из крови: объем экстрагента и биосреды, температуру экстракции, водородный показатель (pH) биосреды, высаливающие агенты.

Выбор органического растворителя. Для выбора экстрагента для извлечения фурана и метилфурана из крови использовали ряд органических растворителей различной полярности и изучали зависимость степени экстракции. Результаты экспериментальных исследований представлены в табл. 2.

Максимальная полнота извлечения фурана и метилфурана 62–86 % (табл. 2) из крови достигнута при использовании в качестве растворителя гептана.

Таблица 1. Результаты экспериментально отработанных условий хроматографирования образца крови
Table 1. Results of experimentally worked out conditions for chromatography of a blood sample

Режим / Mode	Режим колонки с программированием, °C / Column mode with programming, °C		Газ-носитель (азот), мл/мин / Carrier gas flow, ml/min	Температурный режим испарителя, °C / Evaporator temperature, °C	Коэффициент деления потока азот: воздух / Nitrogen to air flow split ratio
	Колонка / Column	Скорость нагрева, °C/мин / Heating rate, °C/min			
2	40–200	40	1,6	230	12,5

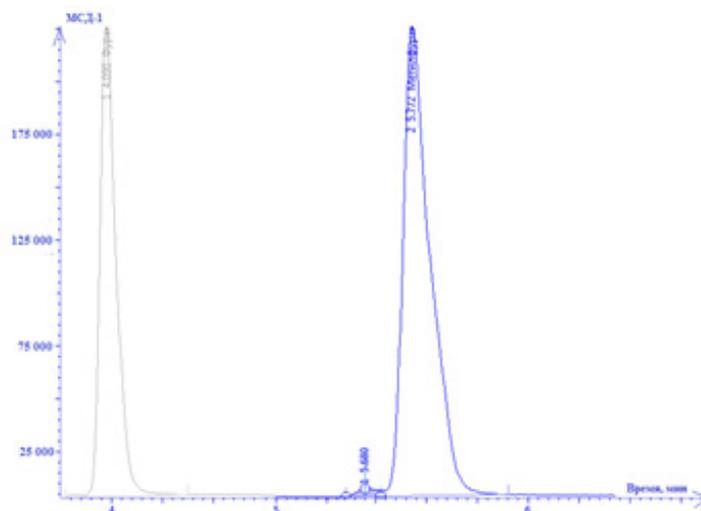


Рисунок. Масс-хроматограмма стандартного раствора фурана (m/z = 68,53) и метилфурана (m/z = 82,81) из крови
Figure. Mass chromatogram of a standard solution of furan (m/z = 68.53) and methylfuran (m/z = 82.81) from blood

Объем экстрагента. Максимальная степень извлечения фурана и метилфурана из образца крови установлена при уменьшении объема органического растворителя (экстрагента) $V_{орг}$. Результаты представлены в табл. 3.

Полученные результаты (табл. 3) показали, что при использовании органического растворителя гептана в объеме 1,0 см³ для экстракции степень извлечения из крови составила для фурана 62,8 % и для метилфурана 86,7 %.

Изучение зависимости степени экстракции фурана и метилфурана из цельной крови и плазмы от объема биоматериала и органических растворителей

Изолирование токсичных соединений методом экстракции проводили из цельной крови. Экспериментально установлена степень извлечения фурана и метилфурана из пробы крови с применением стандартного образца в зависимости от объема органического растворителя и объема крови (табл. 4).

Анализ полученных результатов (табл. 4) показал, что использование 1 см³ экстрагента (гептан) и 2,5 см³ крови, 2 последовательных экстракций в течение 5 минут и центрифугировании пробы крови в течение 10 минут при 5000 об./мин позволило достичь степени экстракции для фурана 77 % и метилфурана 91 %. При использовании плазмы крови полнота извлечения фурана и метилфурана составила для фурана 15 % и для метилфурана 16 %.

Изучение зависимости степени экстракции фурана и метилфурана из крови от высаливающих агентов (электролитов)

Для повышения степени извлечения фурана и метилфурана из проб крови использовали ряд

нейтральных солей щелочных и щелочноземельных металлов: сульфат и хлорид натрия, гидрофосфат аммония и смесь солей (4 г MgSO₄ безводного, 1 г NaCl, 1 г натрия лимоннокислого трехзамещенного и 0,5 г натрия лимоннокислого двузамещенного, 1,5 водного, общий вес 6,5 г) [18].

Средние значения полноты экстракции фурана и метилфурана из крови с применением нейтральных солей представлены в табл. 5.

При использовании высаливающих агентов удалось достичь извлечение фурана и метилфурана из крови не более 67 % (табл. 5).

Изучение зависимости степени экстракции фурана и метилфурана из крови от pH

Экстракция органических соединений из биосреды зависит в том числе от водородного показателя (pH среды). При экстракции недиссоциированные молекулы переходят в органическую фазу, повышая тем самым полноту извлечения органического соединения из биосреды.

С целью максимального извлечения фурана и метилфурана из крови и установления параметров экстракции в экспериментальных исследованиях применяли и подкисление неорганической кислотой и подщелачивание щелочью щелочноземельных металлов биопробы для разрушения связей фурана и его производных с белками крови. При взаимодействии фурана и его производных с сильными кислотами уменьшается стабильность кольца – фурановое кольцо расщепляется и полимеризуется [19]. Неустойчивость фурана в кислой среде сопровождается сильным осмолением и промежуточным образованием диеновых соединений. Вместе с тем фуран устойчив к действию щелочей щелочноземельных металлов, и поэтому фурановое кольцо не разрушается [20]. Полученные результаты представлены в табл. 6.

Таблица 2. Зависимость степени извлечения фурана и метилфурана из крови от различной полярности органических растворителей (n = 5, p = 0,95)

Table 2. The relationship between the polarity of organic solvents and the degree of furan and methylfuran extraction from blood (n = 5, p = 0.95)

Органический растворитель / Organic solvent	Фуран / Furan		Полнота экстракции, % / Recovery, %	Метилфуран / Methylfuran		Полнота экстракции, % / Recovery, %
	Введено, мкг/мл / Injected, µg/ml	Получено, мкг/мл / Measured, µg/ml		Введено, мкг/мл / Injected, µg/ml	Получено, мкг/мл / Measured, µg/ml	
1. Метанол / Methanol	0,18 ± 0,05	0,09 ± 0,0035	50	0,18 ± 0,05	0,176 ± 0,043	97,7
2. Изо-пропанол / Isopropanol		н/о	0		н/о	0
3. Этилацетат / Ethyl acetate		0,033 ± 0,005	18,3		0,128 ± 0,035	71
4. Гептан / Heptane		0,112 ± 0,056	62		0,155 ± 0,047	86
5. Гексан / Hexane		0,105 ± 0,024	58,4		н/о	0

Таблица 3. Зависимость степени экстракции фурана и метилфурана из крови от объема органического растворителя

Table 3. The relationship between the injected volume of the organic solvent and the degree of furan and methylfuran extraction from blood

Растворитель / Гептан, мл / Heptane, ml	Фуран, мкг/мл / Furan, µg/ml		Полнота экстракции, % / Recovery, %	Метилфуран, мкг/мл / Methylfuran, µg/ml		Полнота экстракции, % / Recovery, %
	Введено / Injected	Найдено / Measured		Введено / Injected	Найдено / Measured	
2,5	0,18	0,059 ± 0,0036	33,3	0,18	0,079 ± 0,0048	44,4
2,0 мл		0,058 ± 0,0043	32,2		0,091 ± 0,0075	50,6
1,5 мл		0,102 ± 0,058	56,7		0,146 ± 0,038	81,1
1,0 мл		0,113 ± 0,053	62,8		0,174 ± 0,056	86,7

https://doi.org/10.35627/2219-5238/2023-31-9-7-15
Original Research Article

Таблица 4. Зависимость степени экстракции фурана и метилфурана из крови от объема органического растворителя и объема крови для анализа

Table 4. The relationship between the volume of the organic solvent and blood sample and the degree of furan and methylfuran extraction from blood

Этапы пробоподготовки / Sample preparation stages	Фуран (мкг/мл) / Furan (µg/ml)		Полнота экстракции, % / Recovery, %	Метилфуран (мкг/мл) / Methylfuran (µg/ml)		Полнота экстракции, % / Recovery, %
	Введено / Injected	Найдено / Measured		Введено / Injected	Найдено / Measured	
1. Кровь 1,0 мл / Blood, 1.0 ml Гептан 2,5 мл / Heptane, 2.5 ml Ручная экстракция, 5 минут / Manual extraction, 5 minutes Центрифугирование, 10 минут 5000 оборотов / Centrifugation, 10 minutes at 5,000 r/min	0,18	0,125 ± 0,035	69,4	0,18	0,158 ± 0,054	87,7
2. Кровь 2,5 см ³ / Blood, 2.5 cm ³ Гептан 1 см ³ / Heptane, 1 cm ³ Ручная экстракция, 5 минут / Manual extraction, 5 minutes Центрифугирование, 10 минут 5000 оборотов / Centrifugation, 10 minutes at 5,000 r/min	0,18	0,139 ± 0,028	77,22	0,18	0,163 ± 0,045	90,56
3. Кровь 2,5 см ³ / Blood, 2.5 cm ³ Гептан 1,5 мл / Heptane, 1.5 ml Центрифугирование (10 минут 5000 оборотов) / Centrifugation, 10 minutes at 5,000 r/min	0,18	0,00265 ± 0,0003	14,72	0,18	0,0287 ± 0,0048	15,95
4. Плазма крови / Blood plasma Гептан 2,5 см ³ / Heptane, 2.5 cm ³ Ручная экстракция, 5 минут / Manual extraction, 5 minutes Центрифугирование, 10 минут 5000 оборотов / Centrifugation, 10 minutes at 5,000 r/min						

Таблица 5. Зависимость степени экстракции фурана и метилфурана из крови от высаливающих агентов (n = 5, p = 0,95)

Table 5. The relationship between the salting-out agents and the degree of furan and methylfuran extraction (n = 5, p = 0.95)

Высаливающие агенты / Salting-out agents	Фуран / Furan		Степень экстракции, % / Recovery, %	Метилфуран / Methylfuran		Степень экстракции, % / Recovery, %
	Введено, мкг/мл / Injected, µg/ml	Получено, мкг/мл / Measured, µg/ml		Введено, мкг/мл / Injected, µg/ml	Получено, мкг/мл / Measured, µg/ml	
1. Na ₂ SO ₄	0,18	0,020 ± 0,005	11	0,18	0,066 ± 0,0036	36,7
2. NaCl		0,025 ± 0,004	13,9		0,057 ± 0,0046	31,7
3. Na ₂ SO ₄ + NaCl		0,014 ± 0,005	7,7		0,018 ± 0,0048	10
4. смесь солей (4 г MgSO ₄ безводного, 1 г NaCl, 1 г натрия лимоннокислого трехзамещенного и 0,5 г натрия лимоннокислого двухзамещенного, 1,5 водного, общий вес 6,5 г) / A mixture of salts (4 g of anhydrous MgSO ₄ , 1 g of NaCl, 1 g of tri-substituted sodium citric acid, and 0.5 g di-substituted sodium citric acid, 1.5 water, total weight = 6.5 g)	0,18	0,079 ± 0,005	43,9	0,18	0,12 ± 0,0048	66,7

Применение в качестве экстрагента гептана (табл. 6) объемом 1 см³ и 10 % р-ра щелочи (NaOH) позволяет повысить степень экстракции фурана и метилфурана из образца крови до 98 %.

Валидационные характеристики биоаналитической методики. С использованием отработанного способа подготовки образцов крови к химическому анализу фурана и метилфурана проведена оценка пригодности (валидация) разработанной методики в деятельности испытательной лаборатории по

перечисленным ниже характеристикам: специфичность (specificity); предел обнаружения (detection limit) (LOD); предел количественного определения (quantitation limit) (LOQ); аналитической области (range); линейности (linearity); правильности (trueness) и прецизионности (precision) согласно ГОСТ ИСО/МЭК 17025-2009².

Основным руководством по валидации методики является драфт-руководство Европейского медицинского агентства (EMA) 2009 г.³.

Таблица 6. Зависимость полноты извлечения фурана и метилфурана из крови от pH среды ($n = 2, p = 0,95$)
Table 6. The relationship between the pH of the solution and the degree of furan and methylfuran extraction from blood ($n = 2, p = 0.95$)

pH среды / pH of the solution	Фуран, мкг/мл / Furan, µg/ml		Степень экстракции, % / Recovery, %	Метилфуран, мкг/мл / Methylfuran, µg/ml		Степень экстракции, % / Recovery, %
	Введено / Injected	Найдено / Measured		Введено / Injected	Найдено / Measured	
Кислая среда раствора (10 % р-р H ₂ SO ₄) / Acidic solution (H ₂ SO ₄ , 10 %)	0,18	0,1395 ± 0,045	77,5	0,18	0,155 ± 0,029	86
Щелочная среда раствора (10 % р-р NaOH) / Alkaline solution (NaOH, 10 %)		0,176 ± 0,038	98,0		0,177 ± 0,049	98,5

Для доказательства специфичности аналитической методики определения фурана и метилфурана в крови проводили анализ биологической жидкости, к которой предварительно прибавляли стандартный раствор определяемых веществ в таком количестве, чтобы их содержание в пробе находилось в предполагаемом диапазоне концентраций, и летучие органические соединения: этанол, пентан, гексан, бензол, ксилол. В процессе исследований установлено, что определению фурана и метилфурана в крови не мешают летучие органические соединения: этанол, пентан, гексан, бензол, ксилол и др.

Полученные результаты анализа оценивали по соотношению «сигнал/шум» на хромато-масс-спектрометрической системе.

Для определения пределов (LOD) обнаружения фурана и метилфурана в крови проводили эксперимент, заключающийся в том, что готовили стандартные образцы фурана и метилфурана на уровне нижнего диапазона концентраций и вносили стандарт в пробы крови, приготовленные для анализа.

Пределы обнаружения для фурана и метилфурана определяли по хроматограмме, используя величины стандартных отклонений сигнала, и по угловому коэффициенту калибровочного графика. Предел обнаружения (ПО) находили по уравнению:

$$ПО = 3,3 \cdot S/b,$$

где S – стандартное отклонение аналитического сигнала;

b – коэффициент чувствительности, представляющий собой отношение аналитического сигнала к определяемой величине (тангенс угла наклона калибровочной кривой).

Для фурана предел обнаружения (LOD) составил $0,00011$ мкг/см³, для метилфурана = $0,000021$ мкг/см³.

Предел количественного определения (LOQ) рассчитывали по уравнению: $ПКО = 10 \times S/b$, где S – стандартное отклонение аналитического сигнала; b – коэффициент чувствительности, представляющий отношение аналитического сигнала к определяемой величине [21–24].

По рекомендациям СИТАС за предел определения принимали величину $10 S_0$.

Предел количественного определения LOQ для фурана в крови составил $C_{lim} = 0,0011$ мкг/см³. Для метилфурана LOQ в крови составил $C_{lim} = 0,00021$ мкг/см³.

Аналитическая область методики. Определение содержания фурана и метилфурана в образцах крови выполняли методом градуировочного графика. Для этого готовили 3 серии шкал стандартов и с помощью программного обеспечения строили градуировку, которая имела линейную зависимость при среднем квадратическом отклонении повторяемости (СКО) не более 10.

Диапазон экспериментальных данных, удовлетворяющих линейной модели, составил $0,0019$ – $0,09$ мг/дм³.

Линейность методики. Линейность разработанной методики в диапазоне измеряемых концентраций проверяли экспериментально измерением аналитических сигналов для 3 серий шкал с различными концентрациями определяемых соединений. Экспериментальные данные обрабатывали методом наименьших квадратов с использованием линейной модели:

$$y = b \times x + a,$$

где x – количество или концентрация определяемого вещества;

y – величина отклика (сигнал компонента на хроматограмме);

b – угловой коэффициент;

a – свободный член (ОФС «Статистическая обработка результатов химического эксперимента»).

Рассчитаны и представлены величины: угловой коэффициент (b) и коэффициент корреляции (r). Использовали линейные зависимости, отвечающие условию $|r| \geq 0,99$ с доверительной вероятностью $P = 99,9$ %.

Установленные значения погрешности (и ее составляющих) измерений по разработанной методике представлены в табл. 7.

Установленные показатели, характеризующие составляющие бюджета неопределенности или погрешности измерений (табл. 7), составили: показатель точности для фурана – 12,76 %, для метилфурана – 12,88 %, показатель повторяемости для фурана – 17,89 %, для метилфурана – 16,98 %, для метилфурана – 16,98 %.

² ГОСТ ИСО/МЭК 17025-2009. Межгосударственный стандарт. Общие требования к компетенции испытательных калибровочных лабораторий.

³ Guideline on validation of bioanalytical methods (draft). European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use: London, 2009.

https://doi.org/10.35627/2219-5238/2023-31-9-7-15
Original Research Article

показатель внутрिलाбораторной прецизионности для фурана – 5,98 %, для метилфурана – 6,04 %.

Изолирование фурана и метилфурана из крови методом жидкость-жидкостной экстракции

Кровь объемом 2,5 см³ помещали в пробирку объемом 10 см³, пробу подщелачивали 10 % раствором NaOH. Затем добавляли 1 см³ полярный растворитель гептан и экстрагировали в течение 5 минут. Пробу центрифугировали при 5000 об./мин в течение 10 минут и экстракт анализировали методом хромато-масс-спектрометрии.

Обсуждение. Авторская методика включала два этапа исследований:

1 – разработка высокочувствительной и селективной хромато-масс-спектрометрической методики определения токсичных фурана и метилфурана в крови;

2 – валидация разработанной методики в условиях лаборатории.

На основании выполненных исследований разработана и валидирована в условиях лаборатории высокочувствительная и специфичная методика газохроматографического определения фурана и метилфурана в крови с масс-спектрометрическим детектированием. Диапазон измеряемых концентраций фурана и метилфурана в крови составил 0,0019–0,09 мг/дм³ при погрешности 22 %.

Нормы метрологических характеристик (относительной погрешности и относительного стандартного отклонения) для разработанной аналитической методики составляют не более 15 и не более 9,5 % для уровня концентраций, соответствующих пределу количественного определения (ПКО), что соответствует требованиям драфт-руководства ЕМА⁴.

Выводы

1. Для эффективного извлечения фурана и метилфурана из образцов крови (99 %) применяли полярный растворитель гептан.

2. Полученные результаты позволили заключить, что фуран и метилфуран с высокой степенью извлечения 98 и 98,5 % изолируются из щелочной среды при объеме крови 2,5 см³ и при использовании полярного растворителя гептана объемом 1 см³.

3. Изолирование фурана и метилфурана из крови выполняли методом жидкостной экстракции. Для этого кровь объемом 2,5 см³ помещали в пробирку объемом 10 см³, пробу подщелачивали 10 % рас-

твором NaOH. Затем добавляли 1 см³ полярного растворителя (гептан) и экстрагировали в течение 5 минут до установления межфазного равновесия. Пробу крови центрифугировали при 5000 об./мин в течение 10 минут и фуран и метилфуран определяли в извлечениях методом газовой хроматографии масс-спектрометрии.

4. В процессе валидации методики установлены пределы обнаружения (LOD) изучаемых соединений в крови, которые составили: для фурана – до 0,00011 мкг/см³ и для метилфурана – до 0,000021 мкг/см³.

5. Низкие пределы обнаружения (LOD) фурана и метилфурана в крови достигнуты за счет использования в исследованиях по разработке методики определения:

– современного хромато-масс-спектрометра с квадрупольным масс-спектрометрическим (масс-селективный) детектором («Хроматэк-Кристалл»), технические характеристики которого позволяют измерять концентрации фурана и метилфурана на уровне предела количественного обнаружения;

– высокочувствительного масс-селективного детектора (МСД);

– кварцевой капиллярной колонки серии DB-5MS 60 m × 0,250 mm × 0,250 μm, что обеспечило снижение пределов количественного определения (LOQ) до 0,0011 мкг/см³ для фурана и до 0,00021 мкг/см³ для метилфурана.

Разработанная методика определения потенциально опасных фурана и метилфурана в крови является оригинальной авторской разработкой и вносит практический вклад в решение проблемы профилактики и управления здоровьем с оценкой конкретных химических факторов и определением экспозиции населения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kudryavtseva AD, Shelepchikov AA, Brodsky ES. Free-range chicken eggs as a bioindicator of dioxin contamination in Vietnam, including long-term Agent Orange impact. *Emerg Contam.* 2020;6:114-123. doi: 10.1016/j.emcon.2020.02.003
2. Famiyeh L, Chen K, Xu J, *et al.* A review on analysis methods, source identification, and cancer risk evaluation of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons. *Sci Total Environ.* 2021;789:147741. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.147741

Таблица 7. Значения показателей качества количественного химического анализа фурана и метилфурана в крови, установленных экспериментально

Table 7. Experimentally established quality indicators of the quantitative chemical analysis of furan and methylfuran in blood

Диапазон измерений, мг/дм ³ / Measuring range, mg/dm ³	Показатель воспроизводимости результатов анализа в виде СКО σ _{RL} , % / Reproducibility of test results expressed as COEX σ _{RL} , %	Показатель правильности результатов анализа / Trueness of test results ±Δ _с , %	Прецизионность в условиях повторяемости / Precision under repeatability conditions σ _с , %	Показатель погрешности результатов анализа / Accuracy of test results ±Δ, %
Фуран / Furan				
0,0019–0,18	5,98	4,43	17,89	12,76
Метилфуран / Methylfuran				
0,0019–0,18	6,04	4,46	16,98	12,88

⁴ Guideline on validation of bioanalytical methods (draft). European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use: London, 2009.

3. Xu JS, Xu HH, Xiao H, *et al.* Aerosol composition and sources during high and low pollution periods in Ningbo, China. *Atmos Res.* 2016;178-179:559-569. doi: 10.1016/j.atmosres.2016.05.006
4. Lee CS, Venkatesan AK, Walker HW, Gobler CJ. Impact of groundwater quality and associated byproduct formation during UV/hydrogen peroxide treatment of 1,4-dioxane. *Water Res.* 2020;173:115534. doi: 10.1016/j.watres.2020.115534
5. Мешков Н.А., Рахманин Ю.А. Методологические аспекты гигиенической оценки адаптивной реакции организма на влияние факторов профессиональной деятельности в системе оценки риска // Гигиена и санитария. 2021. Т. 100. № 4. С. 387–395. doi: 10.47470/0016-9900-2021-100-4-387-395. EDN QCKYQG.
6. Yang M, Jiang J, Hua L, *et al.* Rapid detection of volatile organic metabolites in urine by high-pressure photoionization mass spectrometry for breast cancer screening: A pilot study. *Metabolites.* 2023;13(7):870 doi: 10.3390/metabo13070870
7. Doherty AC, Lee CS, Meng Q, *et al.* Contribution of household and personal care products to 1,4-dioxane contamination of drinking water. *Curr Opin Environ Sci Health.* 2023;31:100414. doi: 10.1016/j.coesh.2022.100414
8. Adamson DT, Piña EA, Cartwright AE, *et al.* 1,4-Dioxane drinking water occurrence data from the third unregulated contaminant monitoring rule. *Sci Total Environ.* 2017;596-597:236-245. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.04.085
9. Huffman MP, Høie AH, Svendsen C, *et al.* An in vitro study on the genotoxic effect of substituted furans in cells transfected with human metabolizing enzymes: 2,5-dimethylfuran and furfuryl alcohol. *Mutagenesis.* 2016;31(5):597-602. doi: 10.1093/mutage/gew025
10. Xing Y, Xing H, Ma Y, Liu Q, Xu S. In vitro and in vivo studies of metabolic activation of marrubiin, a bioactive constituent from *Marrubium vulgare*. *Chem Res Toxicol.* 2021;34(9):2157-2165. doi: 10.1021/acs.chemrestox.1c00250
11. Зайцева Н.В., Уланова Т.С., Нурисламова Т.В., Попова Н.А., Мальцева О.А. Количественные показатели нитратов в моче и N-нитрозодиметилamina в крови как маркеры пероральной экспозиции нитратов, поступающих с питьевой водой // Гигиена и санитария. 2018. Т. 97. № 11. С. 1087–1092. doi: 10.47470/0016-9900-2018-97-11-1087-92. EDN: YPXHXN
12. Russo MT, De Luca G, Palma N, *et al.* Oxidative stress, mutations and chromosomal aberrations induced by in vitro and in vivo exposure to furan. *Int J Mol Sci.* 2021;22(18):9687. doi: 10.3390/ijms22189687
13. McClure RA, Goering AW, Ju KS, *et al.* Elucidating the rimosamide-detoxin natural product families and their biosynthesis using metabolite/gene cluster correlations. *ACS Chem Biol.* 2016;11(12):3452-3460. doi: 10.1021/acscmbio.6b00779
14. Nunes J, Martins IL, Charneira C, *et al.* New insights into the molecular mechanisms of chemical carcinogenesis: In vivo adduction of histone H2B by a reactive metabolite of the chemical carcinogen furan. *Toxicol Lett.* 2016;264:106-113. doi: 10.1016/j.toxlet.2016.10.018
15. Navada KK, Kulal A. Kinetic characterization of purified laccase from *Trametes hirsuta*: A study on laccase catalyzed biotransformation of 1,4-dioxane. *Biotechnol Lett.* 2021;43(3):613-626. doi: 10.1007/s10529-020-03038-1
16. Зайцева Н.В., Май И.В., Кирьянов Д.А., Горяев Д.В. Научное обоснование приоритетных веществ, объектов квотирования и направлений действий по снижению аэрогенных рисков здоровью населения при реализации полномочий санитарной службы Российской Федерации // Анализ риска здоровью. 2022. № 4. С. 4–17. doi: 10.21668/health.risk/2022.4.01
17. Шабунин С.В., Беляев В.И., Бузлама С.В. Экоотоксиканты, распространение, профилактика и лечение // Ветеринария. 2014. № 7. С. 3–8. EDN SKOKXJ.
18. Эделев И.С., Обухова Л.М., Андриянова Н.А., Эделев Н.С. Перспективы использования параметров окислительной модификации белков сыворотки крови для установления длительности агонального периода // Судебная медицина. 2019. Т. 3. С. 28–32. doi: 10.19048/2411-8729-2019-5-3-28-32
19. Коренман Я.И., Шорманов В.К., Мокшина Н.Я., Кривошеева О.А., Голубицкий Г.Б. Выделение, экстракционное концентрирование и определение кофеина при исследовании плазмы крови // Судебно-медицинская экспертиза. 2012. Т. 2. С. 32–35.
20. Gates LA, Lu D, Peterson LA. Trapping of cis-2-butene-1,4-dial to measure furan metabolism in human liver microsomes by cytochrome P450 enzymes. *Drug Metab Dispos.* 2012;40(3):596-601. doi: 10.1124/dmd.111.043679
21. Zhang Y, Zhang Y. A comprehensive review of furan in foods: From dietary exposures and in vivo metabolism to mitigation measures. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2023;22(2):809-841. doi: 10.1111/1541-4337.13092
22. Золотов Ю.А. Перспективы развития аналитической химии // Журнал аналитической химии. 2019. Т. 74. № 9S. С. S3-S4. doi: 10.1134/S0044450219090251. EDN XWMQNU.
23. Мелехин А.О., Толмачева В.В., Шубина Е.Г. и др. Новый дериватирующий агент для определения метаболитов нитрофуранов в куриных яйцах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии–тандемной масс-спектрометрии // Журнал аналитической химии. 2021. Т. 76. № 11. С. 1012–1021. doi: 10.31857/S0044450221110086. EDN RHKZJB.
24. Zuma NH, Aucamp J, N'Da DD. An update on derivatisation and repurposing of clinical nitrofurans. *Eur J Pharm Sci.* 2019;140:105092. doi: 10.1016/j.ejps.2019.105092

REFERENCES

1. Kudryavtseva AD, Shelepchikov AA, Brodsky ES. Free-range chicken eggs as a bioindicator of dioxin contamination in Vietnam, including long-term Agent Orange impact. *Emerg Contam.* 2020;6:114-123. doi: 10.1016/j.emcon.2020.02.003
2. Famiyeh L, Chen K, Xu J, *et al.* A review on analysis methods, source identification, and cancer risk evaluation of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons. *Sci Total Environ.* 2021;789:147741. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.147741
3. Xu JS, Xu HH, Xiao H, *et al.* Aerosol composition and sources during high and low pollution periods in Ningbo, China. *Atmos Res.* 2016;178-179:559-569. doi: 10.1016/j.atmosres.2016.05.006
4. Lee CS, Venkatesan AK, Walker HW, Gobler CJ. Impact of groundwater quality and associated byproduct formation during UV/hydrogen peroxide treatment of 1,4-dioxane. *Water Res.* 2020;173:115534. doi: 10.1016/j.watres.2020.115534
5. Meshkov NA, Rakhmanin YuA. Methodology for environmental health assessment of adaptive response to professional activity factors as part of health risk assessment. *Gygiena i Sanitariya.* 2021;100(4):387-395. (In Russ.) doi: 10.47470/0016-9900-2021-100-4-387-395
6. Yang M, Jiang J, Hua L, *et al.* Rapid detection of volatile organic metabolites in urine by high-pressure photoionization mass spectrometry for breast cancer screening: A pilot study. *Metabolites.* 2023;13(7):870 doi: 10.3390/metabo13070870
7. Doherty AC, Lee CS, Meng Q, *et al.* Contribution of household and personal care products to 1,4-dioxane contamination of drinking water. *Curr Opin Environ Sci Health.* 2023;31:100414. doi: 10.1016/j.coesh.2022.100414
8. Adamson DT, Piña EA, Cartwright AE, *et al.* 1,4-Dioxane drinking water occurrence data from the third unregulated contaminant monitoring rule. *Sci Total Environ.* 2017;596-597:236-245. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.04.085
9. Huffman MP, Høie AH, Svendsen C, *et al.* An in vitro study on the genotoxic effect of substituted furans in cells transfected with human metabolizing enzymes: 2,5-dimethylfuran and furfuryl alcohol. *Mutagenesis.* 2016;31(5):597-602. doi: 10.1093/mutage/gew025

<https://doi.org/10.35627/2219-5238/2023-31-9-7-15>

Original Research Article

10. Xing Y, Xing H, Ma Y, Liu Q, Xu S. In vitro and in vivo studies of metabolic activation of marrubiin, a bioactive constituent from *Marrubium vulgare*. *Chem Res Toxicol*. 2021;34(9):2157–2165. doi: 10.1021/acs.chemrestox.1c00250
11. Zaitseva NV, Ulanova TS, Nurislamova TV, Popova NA, Maltseva OA. Quantitative parameters of nitrates in urine and N-nitrosodimethylamine in blood as markers of the oral exposure to nitrates introduced with drinking water. *Gygiena i Sanitariya*. 2018;97(11):1087–1092. (In Russ.) doi: 10.47470/0016-9900-2018-97-11-1087-92
12. Russo MT, De Luca G, Palma N, et al. Oxidative stress, mutations and chromosomal aberrations induced by in vitro and in vivo exposure to furan. *Int J Mol Sci*. 2021;22(18):9687. doi: 10.3390/ijms22189687
13. McClure RA, Goering AW, Ju KS, et al. Elucidating the rimosamide-detoxin natural product families and their biosynthesis using metabolite/gene cluster correlations. *ACS Chem Biol*. 2016;11(12):3452–3460. doi: 10.1021/acscmbio.6b00779
14. Nunes J, Martins IL, Charneira C, et al. New insights into the molecular mechanisms of chemical carcinogenesis: In vivo adduction of histone H2B by a reactive metabolite of the chemical carcinogen furan. *Toxicol Lett*. 2016;264:106–113. doi: 10.1016/j.toxlet.2016.10.018
15. Navada KK, Kulal A. Kinetic characterization of purified laccase from *Trametes hirsuta*: A study on laccase catalyzed biotransformation of 1,4-dioxane. *Biotechnol Lett*. 2021;43(3):613–626. doi: 10.1007/s10529-020-03038-1
16. Zaitseva NV, May IV, Kiryanov DA, Goryaev DV. Scientific substantiation of priority chemicals, objects for setting quotas and trends in mitigating airborne public health risks within activities performed by the Sanitary Service of the Russian Federation. *Health Risk Analysis*. 2022;(4):4–17. doi: 10.21668/health.risk/2022.4.01.eng
17. Shabunin SV, Belyaev VI, Buzlama SV. Ecotoxicants, distribution, prevention and treatment. *Veterinariya*. 2014;(7):3–8. (In Russ.)
18. Edelev IS, Obukhova LM, Andrianova NA, Edelev NS. Prospects for the use of the parameters of oxidative modification of serum proteins for assessment of the agonal period duration. *Sudebnaya Meditsina*. 2019;5(3):28–32. (In Russ.) doi: 10.19048/2411-8729-2019-5-3-28-32
19. Korenman Ial, Shormanov VK, Mokshina Ila, Krivosheeva OA, Golubitskii GB. Isolation, extractive concentration, and determination of caffeine in the studies of blood plasma. *Sudebno-Meditsinskaya Ekspertiza*. 2012;55(2):32–35. (In Russ.)
20. Gates LA, Lu D, Peterson LA. Trapping of cis-2-butene-1,4-dial to measure furan metabolism in human liver microsomes by cytochrome P450 enzymes. *Drug Metab Dispos*. 2012;40(3):596–601. doi: 10.1124/dmd.111.043679
21. Zhang Y, Zhang Y. A comprehensive review of furan in foods: From dietary exposures and in vivo metabolism to mitigation measures. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2023;22(2):809–841. doi: 10.1111/1541-4337.13092
22. Zolotov YuA. [Prospects for the development of analytical chemistry.] *Zhurnal Analiticheskoy Khimii*. 2019;74(9S):S3–S4. (In Russ.) doi: 10.1134/S0044450219090251
23. Melekhin AO, Tolmacheva VV, Dmitrienko SG, et al. A new derivatizing agent for determining nitrofurans metabolites in chicken eggs by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Zhurnal Analiticheskoy Khimii*. 2021;76(11):1312–1320. doi: 10.31857/S0044450221110086
24. Zuma NH, Aucamp J, N'Da DD. An update on derivatization and repurposing of clinical nitrofurans drugs. *Eur J Pharm Sci*. 2019;140:105092. doi: 10.1016/j.ejps.2019.105092

Сведения об авторах:

✉ **Нурисламова** Татьяна Валентиновна – д.б.н., заведующий отделом химико-аналитических методов исследования; e-mail: nurtat@fcrisk.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2344-3037>.

Мальцева Ольга Андреевна – к.б.н., научный сотрудник лаборатории методов газовой хроматографии; e-mail: malceva@fcrisk.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7664-3270>.

Попова Нина Анатольевна – старший научный сотрудник лаборатории методов газовой хроматографии; e-mail: popovana@fcrisk.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9730-9092>.

Чинько Татьяна Викторовна – младший научный сотрудник лаборатории методов газовой хроматографии; e-mail: chinko@fcrisk.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5669-1689>.

Информация о вкладе авторов: концепция, научная консультация исследования: *Нурисламова Т.В.*; актуальность, результаты, подготовка рукописи: *Мальцева О.А.*; аналитическая и экспериментальная часть: *Попова Н.А.*; материалы, методы, экспериментальная часть: *Чинько Т.В.* Все авторы ознакомились с результатами работы и одобрили окончательный вариант рукописи.

Соблюдение этических стандартов: Исследование выполнено с соблюдением этических требований Хельсинкской декларации ВМА 2000 г. и протокола Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 г. Исследование одобрено ЛЭК ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Протокол № 23 от 20.12.2021). Для участников исследования было получено информированное согласие.

Финансирование: исследование проведено без спонсорской поддержки.

Конфликт интересов: авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов в связи с публикацией данной статьи.

Статья получена: 11.07.23 / Принята к публикации: 10.09.23 / Опубликована: 29.09.23

Author information:

✉ **Tatyana V. Nurislamova**, Dr. Sci. (Biol.), Head of the Department of Analytical Chemistry Analysis; e-mail: nurtat@fcrisk.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2344-3037>.

Olga A. Mal'tseva, Cand. Sci. (Biol.), Researcher, Gas Chromatography Laboratory; e-mail: malceva@fcrisk.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7664-3270>.

Nina A. Popova, Senior Researcher, Gas Chromatography Laboratory; e-mail: popovana@fcrisk.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9730-9092>.

Tatyana V. Chinko, Junior Researcher, Gas Chromatography Laboratory; e-mail: chinko@fcrisk.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5669-1689>.

Author contributions: study conception, scientific advice: *Nurislamova T.V.*; relevance, results, draft manuscript preparation: *Mal'tseva O.A.*; analysis and experiments: *Popova N.A.*; materials, methods, and experiments: *Chinko T.V.* All authors reviewed the results and approved the final version of the manuscript.

Compliance with ethical standards: Compliance with ethical standards. The study was carried out in compliance with the ethical requirements of the Helsinki Declaration of the WMA 2000 and the Protocol of the Council of Europe Convention on Human Rights and Biomedicine 1999. The study was approved by the LEC of the Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Well-Being (Protocol No. 23 of 12/20/2021). Informed consent was obtained for all participants.

Funding: This research received no external funding.

Conflict of interest: The authors have no conflicts of interest to declare.

Received: July 11, 2023 / Accepted: September 10, 2023 / Published: September 29, 2023