

Primjena rendgenske fluorescencijske spektrometrije s totalnom refleksijom za identifikaciju i kvantifikaciju toksičnih metala i metaloida u urinu sportaša amatera

Leventić, Antonio

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:616956>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom](#).

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-10**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Antonio Leventić

**Primjena rendgenske fluorescencijske spektrometrije
s totalnom refleksijom za identifikaciju i kvantifikaciju
toksičnih metala i metaloida u urinu sportaša amatera**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Analitička kemija Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za analitičku kemiju pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Jasne Jablan.

Zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Jasni Jablan na stručnim savjetima, podršci i pristupačnosti kod izrade ovoga diplomskog rada.

Sadržaj

1	UVOD	1
1.1	TEŠKI METALI	1
1.1.1	ARSEN	2
1.1.2	OLOVO	3
1.1.3	NIKAL	4
1.1.4	ALUMINIJ	5
1.1.5	BARIJ	5
1.1.6	TALIJ	6
1.1.7	VANADIJ	6
1.2	URIN	7
1.3	TXRF	8
1.3.1	Princip rada TXRF	9
1.3.2	Priprema uzorka za TXRF analizu	10
1.3.3	Prednosti i nedostaci	11
2	OBRAZLOŽENJE TEME	12
3	MATERIJALI I METODE	13
3.1	Materijali	14
3.1.1	Korištene kemikalije	14
3.1.2	Radni instrument i pribor	14
3.1.3	Uzorci urina	14
3.2	Metode	14
3.2.1	Rendgenska fluorescencijska spektrometrija s totalnom refleksijom (TXRF)	14
3.2.2	Statistička obrada podataka	15
4	REZULTATI I RASPRAVA	16
4.1	Rezultati i rasprava	16

5	ZAKLJUČCI.....	22
6	LITERATURA.....	23
7	SAŽETAK.....	29
7	SUMMARY	30
8	TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA	
8	BASIC DOCUMENTATION CARD	

1 UVOD

Teški metali čine zajednički naziv za sve metale s gustoćom većom od 4 g/cm^3 (Aprile i De Bellis, 2020). Jedna od poznatih klasifikacija elemenata je na esencijalne elemente u koje se ubrajaju bakar (Cu), željezo (Fe), mangan (Mn), cink (Zn), molibden (Mo), nikal (Ni) i potencijalno toksične ili neesencijalne elemente u koje se ubrajaju oni metali koji nisu biogeni i djeluju isključivo toksično kao što su kadmij (Cd), krom (Cr), olovo (Pb), živa (Hg), arsen (As) (Hu i sur., 2019).

Ljudi mogu biti izloženi teškim metalima putem različitih izvora primjerice preko industrijskog onečišćenja (rafinerije koje prerađuju metal, izgaranje nafte i dr.) te uporabom različitog pribora ili kemikalija u domaćinstvu i poljoprivredi koje sadrže metale. Smatra se da je glavni unos teških metala u organizam putem kontaminirane hrane i pića, a uobičajeni načini izlaganja su gutanjem, udisanjem te dermalnim putem (Tchounwou i sur., 2012).

1.1 TEŠKI METALI

Zbog svoje toksičnosti i kancerogenosti, najviše proučavani toksični metali su As, Hg, Pb i Cd. Američka agencija za registar toksičnih tvari i bolesti (ATSDR) stavila je Ag, Hg, Pb i Cd na vrh liste prioriteta opasnih tvari (ATSDR, 2016).

Prema dostupnim dokazima, Međunarodna agencija za istraživanje raka (IARC) klasificirala je As, Cd i berilij (Be) u skupinu 1 (kancerogeno za ljude), dok su kobalt (Co), Ni i Pb klasificirani kao skupina 2B (moguće kancerogeno za ljude) (IARC, 1993; Mulware, 2013).

Nadalje, metali poput aluminija (Al), barija (Ba), stroncija (Sr), talija (Tl) i vanadija (V) mogu biti toksični kada su prisutni u određenoj koncentraciji. Al može imati neurotoksično djelovanje. Neurodegenerativne bolesti poput Parkinsonove i Alzheimerove bolesti povezane su s nakupljanjem Al u mozgu (Nayak, 2002).

U organizmu Sr ima tendenciju zamjene kalcija (Ca), pa stoga može utjecati na rast kostiju. Nadalje, otkriveno je da može izazvati plućnu emboliju kao i ozbiljne kardiovaskularne

poremećaje. Trovanje s Ba može dovesti do pneumokonioze (baritoze), dok je toksičnost V spojeva povezana s respiratornim traktom (Goyer i Clarkson, 2001).

1.1.1 ARSEN

As je element koji može biti prisutan u različitim oblicima (organskom i anorganskom) u okolišu npr. vodi, tlu, stijinama, zraku i dr. Glavni anorganski oblici As su arsenit (As (III)) i arsenat (As (V)) dok organski As čine metilirani metaboliti As. Do zagađenja okoliša As dolazi prvenstveno uslijed različitih ljudskih aktivnosti, te kao posljedica događaja u prirodi poput erupcije vulkana. As nema utvrđenu biološku funkciju te se smatra neesencijalnim metalom (Tchounwou i sur., 2012).

Ljudi često industrijski proizvode spojeve koji sadrže As te ih koriste u proizvodnji insekticida, fungicida, herbicida, konzervansa za drvo, bojila i dr. U prošlosti As je svoju primjenu pronašao u veterini i medicini, a koristi se i danas (Tchounwou i sur., 2012). Primjerice, As trioksid u kombinaciji sa sve-trans-retinoatnom kiselinom indiciran je za liječenje bolesnika sa akutnom promijelocitnom leukemijom (Zhu i sur., 2019).

Ljudi mogu biti izloženi As putem zraka, vode, tla, na radnom mjestu, ali za većinu ljudi najveći utjecaj ima izloženost putem hrane (Tchounwou i sur., 2012).

80-90% As(III) i As(V) se apsorbira iz gastrointestinalnog trakta (GIT) pri čemu se bolje apsorbira As iz topljivijih spojeva. Također, poznati su slučajevi sistemske toksičnosti nakon kontakta kože s otopinom anorganskog As. Apsorpcija putem dišnih putova i pluća ovisi o veličini čestica i kemijskom obliku. Ekskrecija apsorbiranog As se odvija pretežito urinom ali također i deskvamacijom i znojenjem. As se akumulira u kosi i noktima kod ljudi te se tako može procijeniti prethodna izloženost metalu (Goyer i Clarkson, 2001).

Mnogobrojne studije su pokazale korelaciju između izloženosti As i povećanog rizika za karcinogena oboljenja, kao i za druga sistemska oboljenja (Tchounwou i sur., 2003). Izloženost As utječe na gotovo sve organske sustave, uključujući kardiovaskularni, dermatološki, živčani, hepatobilijarni, bubrežni, gastrointestinalni i dišni sustav. Toksičnost je ovisna o vremenu izloženosti i dozi ali također i o kemijskom obliku As i podložnosti organizma, spolu, godinama, genetskim i nutritivnim faktorima (Tchounwou i sur., 2012).

Epidemiološke studije ukazuju na korelaciju izloženosti središnjeg živčanog sustava As i kognitivnih disfunkcija i neuroloških poremećaja te se smatra čimbenikom rizika za

neurodegenerativne poremećaje. Kao neurotoksin As djeluje na razne načine uzrokujući poremećaje pri kognitivnom razvoju ali i promjenu kognitivnih sposobnosti te mentalne poremećaje kod odraslih. Naime, oštećujući mitohondrijske komplekse I, II i IV, As potiče povećano stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva (ROS), karbonilaciju proteina i lipidnu peroksidaciju. Osim toga, poznato je da izloženost As utječe na epigenetsku kontrolu ekspresije gena, a te promjene u ekspresiji koreliraju sa, primjerice, oštećenjem pamćenja i smanjenom sposobnosti učenja. Neurotoksičnost As također je povezana s promjenama u metabolizmu neurotransmitera što dovodi do promjena u sinaptičkom prijenosu. Izloženost As inducira o kaspazi ovisnu apoptozu neurona putem signalizacije protein kinaze aktivirane mitogenom (MAPK) te staničnu smrt reguliranu aktivacijom autofagije. As izaziva snažne upalne odgovore u mozgu povećavajući razine ekspresije proupalnih citokina interleukina 1 beta (IL-1 β), interleukina 6 (IL-6), interferona gama (IFN γ) i tumor nekrotskog faktora alfa (TNF α). Neki od tih molekularnih mehanizama su: oksidativni stres, i mitohondrijalna disfunkciju, promjene u homeostazi neurotransmitera i sinaptičkom prijenosu, utjecaj na puteve stanične smrti i upalu (Garza-Lombo i sur., 2019).

Poznato je da je jedan način ispoljavanja toksičnog učinka As preko smanjivanja staničnog disanja inhibicijom nekoliko mitohondrijskih enzima. Naime, As ima sposobnost interakcije sa sulfhidrilnim skupinama proteina i enzima, a također može i supstituirati fosfor u raznim biokemijskim reakcijama (Wang i Rossman, 1996). Uglavnom se trovalentni As veže za tiolne skupine enzima uzrokujući njihovu inhibiciju, dok je utjecaj peterovalentnog As na aktivnost enzima mali.

Pokazalo se da anorganski As i njegovi metaboliti mogu inducirati delecijske mutacije i kromosomske aberacije, ali ne i točkaste mutacije. Pripisuju mu se i komutagena svojstva (Goyer i Clarkson, 2001).

1.1.2 OLOVO

Pb je teški metal koji je prirodno prisutan u okolišu. Izloženost ljudske populacije Pb je bila relativno mala do početka industrijske revolucije (Tong i sur., 2000). Ipak, industrijalizacija, sagorijevanje fosilnih goriva, rudarstvo, razni proizvodni procesi i recikliranje doprinjeli su oslobađanju velikih količina olova u okoliš te posljedično povećanoj izloženosti ljudi ovom teškom metalu (WHO, 2021). Olovo se koristi u industriji i poljoprivredi za različite namjene kao

što su: proizvodnja olovnih baterija, streljiva i uređaja za zaštitu rendgenskih zraka, proizvodnja boja i stakla i dr. (Gabby, 2006).

Glavni načini unosa Pb u organizam su udisanjem čestica prašine ili aerosola onečišćenih Pb, te gutanjem hrane, vode i boja kontaminiranih Pb (Tchounwou i sur., 2012). Osim izloženosti Pb, na njegovu koncentraciju u krvi utječe i životni stil, primjerice pušenje i konzumiranje alkohola te godine (Weyermann i Brenner, 1997).

Najveći postotak Pb akumulira se u bubrezima, zatim u jetri te drugim mekim tkiva poput srca i mozga, te u kostima (Tchounwou, 2012). Toksični učinak Pb posebno je opasan za živčani sustav (Goyer i Clarkson, 2001).

Istraživanja su pokazala da kod djece imamo povezanost između povećane razine Pb u krvi i smanjene inteligencije, nižeg kvocijenta inteligencije, usporenog ili oslabljenog neurobiheviornalnog razvoja, smanjene oštine sluha, govornih i jezičnih smetnji, poremećaja rasta, smanjenog raspona pažnje te asocijalnog ponašanja. Kod odraslih osoba je uočena povezanost povećane izloženosti Pb s reproduktivnim sustavom, poput smanjenja broja spermija u muškaraca te spontanih pobačaja kod žena (Tchounwou i sur., 2012).

Pb ima sposobnost da inhibira ili oponaša djelovanje kalcija. Može stupiti u interakciju s proteinima inhibirajući njihovu biološku funkciju (ATSDR, 1999). Vežanjem na sulfhidrilne i amidne skupine enzima, mijenja njihovu konfiguraciju i umanjuje njihovu aktivnost te se natječe s esencijalnim metalnim kationima za mjesta vezanja (Flora i sur., 2007). Svoju toksičnost Pb ispoljava i nekim staničnim i molekularnim procesima kao što su indukcija stanične smrti i oksidativni stres, poticanje transkripcijske aktivacije gena stresa, DNA oštećenja, aktivacija kaspaze-3 (Tchounwou i sur., 2012).

1.1.3 NIKAL

Ni je u prirodi široko rasprostranjeni metal. Najčešće se pojavljuje u obliku sulfida i oksida. Većina ljudi je najviše izložena Ni putem kontaminirane hrane, no prisutna je i profesionalna izloženost u industriji udisanjem prašine koja sadrži spojeve u kojima se nalazi Ni (Goyer i Clarkson, 2001).

Spojevi Ni svrstani su u skupinu 1 karcinogena prema IARC-u. Epidemiološke studije koje su pratile izloženost radnika u rafinerijama Ni ukazale su na mnogo veći rizik za razvoj raka pluća, grkljana, nosa te prostate u odnosu na kontrolnu skupinu (Mulware, 2013). Također kontakt s Ni

može izazvati i neke druge zdravstvene probleme poput alergija, kardiovaskularnih i bubrežnih bolesti, fibroze pluća (Genchi, 2020). U općoj populaciji često imamo prisutan alergijski kontaktni dermatitis na Ni (Goyer i Clarkson, 2001).

Molekularni mehanizmi toksičnosti izazvani niklom nisu do kraja jasni. Smatra se da uzrokovanje mitohondrijske disfunkcije i poticanje stvaranja reaktivnih kisikovih spojeva imaju primarnu i ključnu ulogu u ispoljavanju toksičnosti ovog metala (Genchi, 2020).

Iako je Ni nutritivno esencijalan metal u tragovima za neke biljke, bakterije i beskralježnjake (Nielson, 1996) definirana biološka uloga kod viših životinja i ljudi nije ustanovljena (Genchi, 2020).

Neki radovi upućuju da bi Ni mogao aktivirati određene enzime vezane za razgradnju ili iskorištavanje glukoze, te pomoći proizvodnju prolaktina i na taj način sudjelovati u proizvodnji majčinog mlijeka u ljudi te imati ulogu u stabilizaciji RNA (Kumar i Trivedi, 2016).

1.1.4 ALUMINIJ

Al je najrasprostranjeniji metal u okolišu (Nayak, 2002) i treći najzastupljeniji u zemljinoj kori (Goyer i Clarkson, 2001). Nije poznata fiziološka uloga Al u tijelu, dok s druge strane ovaj metal može proizvesti štetne fiziološke učinke (Nayak, 2002).

Al u prirodi ne postoji u slobodnom stanju nego samo u trovalentnom obliku zbog svoje reaktivnosti. Kontaminirana voda i hrana te lijekovi su glavni izvor izloženosti ljudi Al. Naširoko se koristi u suvremenom svakodnevnom životu, za pakiranje hrane i pića, u građevini, transportu, elektrici, kao pribor za kuhanje i sl. (Goyer i Clarkson, 2001). Al se slabo absorbira, najčešće oralno ili inhalacijski, a udisanje čestica Al može rezultirati izravnim prijenosom u tkivo mozga putem olfaktornog sustava (Roberts, 1986; Perl and Good, 1987). Najviše se akumulira u plućima i kostima te u mozgu. Uočena je pojava plućne fibroze kod profesionalne izloženosti radnika Al spojevima. Nadalje, ustanovljena je i osteomalacija kod pacijenata koji uzimaju pretjerane količine antacida koji sadržavaju Al ili su izloženi Al preko tekućine za dijalizu (Goyer i Clarkson, 2001).

1.1.5 BARIJ

Ba je relativno raširen metal u prirodi. Pronalazimo ga u tkivima biljaka i životinja, a primjerice jako velike koncentracije nalazimo u brazilskim oraščićima. Koristi se za proizvodnju

raznih legura, keramike i stakla, te se nalazi u pesticidima, bojama, sapunu i gumi. Koliko će toksično djelovati ovisi o samoj apsorpciji, a ona ovisi o topljivosti Ba spojeva. Glavna mjesta nakupljanja Ba u organizmu su kosti i zubi. Samo se male količine ekstrahiraju urinom, dok se glavnina Ba izlučuje putem fecesa. Iako nije često, trovanjem na radnom mjestu može doći do benigne baritoze (Goyer i Clarkson, 2001). Jaka hipokalemija i slabost koje napreduju do flacidne paralize obilježja su akutnog trovanja Ba (Johnson i VanTassell, 1991). Pretpostavlja se da je glavni mehanizam djelovanja Ba taj da blokira Ca aktivirane K kanale koji su odgovorni za izbacivanje K izvan stanice dovodeći tako do hipokalijemije (Goyer i Clarkson, 2001).

1.1.6 TALIJ

Tl spada u toksične metale koji nemaju nikakvu biološku funkciju u organizmu. Koristi se u proizvodnji legura, optičkih leća, nakita, poluvodiča, boja, insekticida i kao otrov za štakore koji je jedan od najčešćih izvora ljudskog trovanja Tl (Goyer i Clarkson, 2001). Apsorbira se putem gastrointestinalnog trakta i preko kože koncentrirajući se najviše u bubrezima. Zbog sličnosti Tl iona s K ionom pretpostavlja se da je akutna kardiovaskularna toksičnost kod izloženosti organizma Tl rezultat interferencije Tl iona s biološkom funkcijom K iona. Osim natjecanja s K smatra se da interakcija Tl sa sulfhidrilnim skupinama potencijalno interferira s oksidativnom fosforilacijom (Goyer i Clarkson, 2001). Neke studije upućuju na to da bi mogao biti i teratogen (Wang i sur., 2021).

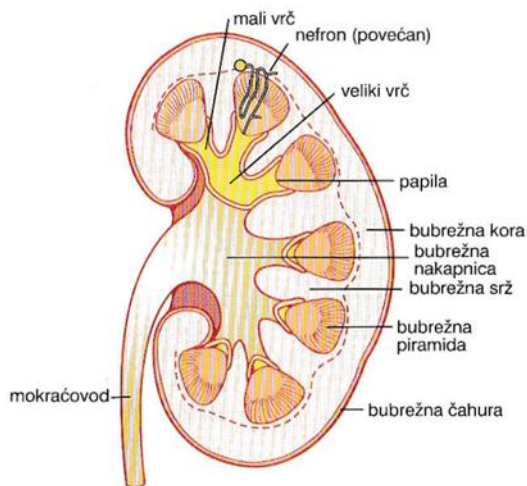
1.1.7 VANADIJ

V je 21. najzastupljeniji element u Zemljinoj kori i drugi najzastupljeniji prijelazni metal u morskoj vodi (Rehder, 2013). Koristi se u kaljenju čelika, u proizvodnji pigmenata, u fotografiji i u formulaciji insekticida. Budući da se u mlijeku, plodovima mora, žitaricama i povrću nalazi u većim količinama hrana je glavni izvor izloženosti ljudi V. Toksično djelovanje V je većinom ograničeno na respiratorni trakt pa tako imamo prisutan bronhitis i bronhopneumoniju češće kod radnika izloženih spojevima V nego kod ostale populacije (Goyer i Clarkson, 2001).

1.2 URIN

Kao jedna od funkcija bubrega ističe se stvaranje urina putem kojeg se organizam čisti od otpadnih tvari unesenih hranom ili proizvedenih metabolizmom. Opće ustrojstvo bubrega vidljivo je na slici 1. Također, stvaranjem i izlučivanjem mokraće vrši se nadzor nad volumenom i sastavom tjelesnih tekućina. Urin nastaje kombinacijom triju bubrežnih procesa koji se odvijaju u nefronima: glomerularne filtracije, reapsorpcije tvari iz bubrežnih kanalića u krv i sekrecije tvari iz krvi u bubrežne kanaliće. Bubrezi uklanjaju većinu toksina i ostalih stranih tvari pa tako i teške metale kao što su As, Pb, Hg i dr. (Guyton i Hall, 2012).

Urin je izrazito prikladan u analizi stanja pacijenata kod kojih je potrebno uzastopno uzorkovanje zbog svog neinvazivnog načina prikupljanja (za razliku od krvi i seruma) te zbog toga što se u sastavu urina odražavaju patološke i fiziološke promjene, odnosno narušena homeostaza organizma, te kao takav služi kao idealan medij za praćenje biomarkera (Jablan i sur., 2017).



Slika 1 Opće ustrojstvo bubrega (Guyton i Hall, 2012)

1.3 TXRF

Za analizu metala u biološkim uzorcima kao što su urin, puna krv ili serum, najčešće korištene tehnike su atomska apsorpcijska spektroskopija (AAS), elektrotermalna atomska apsorpcijska spektroskopija (ETAAS) (Wang i sur., 2005), induktivno spregnuta plazma optička emisijska spektroskopija (ICP- OES) i induktivno spregnuta plazma masena spektroskopija (ICP-MS) (Krachler i sur., 2002; Helaluddin i sur., 2016). Nedostaci ovih tehnika su složena priprema uzorka i prilično skupa analiza. Rendgenska fluorescencijska spektrometrija s totalnom refleksijom (engl. *Total Reflection X-Ray Fluorescence, TXRF*) je tehnika koja se posljednjih godina sve više primjenjuje za analizu bioloških uzoraka. TXRF karakteriziraju brojne prednosti u odnosu na ostale spektroskopske tehnike koje se koriste za analizu metala te se može smatrati pravom analitičkom alternativom. Prednosti TXRF tehnike u odnosu na gore navedene referentne tehnike je mogućnost direktne analize odnosno jednostavne pripreme uzorka; mogućnost korištenja unutarnjeg standarda koji omogućuje vrlo jednostavnu kvantifikaciju elemenata u većini slučajeva bez potrebe za vanjskom kalibracijom; mala količina uzorka za analizu (nekoliko μL ili ng); moguća je multielementna kvalitativna i kvantitativna analiza. Nadalje, uvođenje novih TXRF sustava s niskom potrošnjom energije koji su ekonomični i ne zahtijevaju plin ili rashladne medije za rad povećalo je popularnost TXRF-a učinivši ga jeftinijim i jednostavnijim za rukovanje od ICP i AAS tehnika (Tablica 1). TXRF tehnika se sve više primjenjuje u različitim znanstvenim područjima kao što su primjerice medicina, biologija, arheologija, nanotehnologija, elektronika i dr. (Fernandez Ruiz, 2014).

Tablica 1. Usporedbe karakteristika TXRF-a, AAS-a i ICP-a (Borgese i sur., 2013)

Svojstvo	TXRF	AAS	ICP
Korištena tehnika	Nije destruktivna	Destruktivna	Destruktivna
Kalibracija	Jedan unutarnji standard za sve elemente	Vanjski standard za svaki element	Vanjski standard za svaki element
Priprema uzorka	Direktna analiza, otopina, suspenzija, tanki film	Potpuno otopljen	Potpuno otopljen
Multielementarna analiza	Da	Samo sekvencijalno	Da

Vrijeme mjerenja	300 - 1000 s za sve elemente	< 10 s za svaki element	< 10 s za svaki element
Proces razgradnje	Nije potreban	Da	Da
Utjecaj matrixa	Ne	Da	Da
Cijena	niska do srednja	srednja do visoka	Visoka

1.3.1 Princip rada TXRF

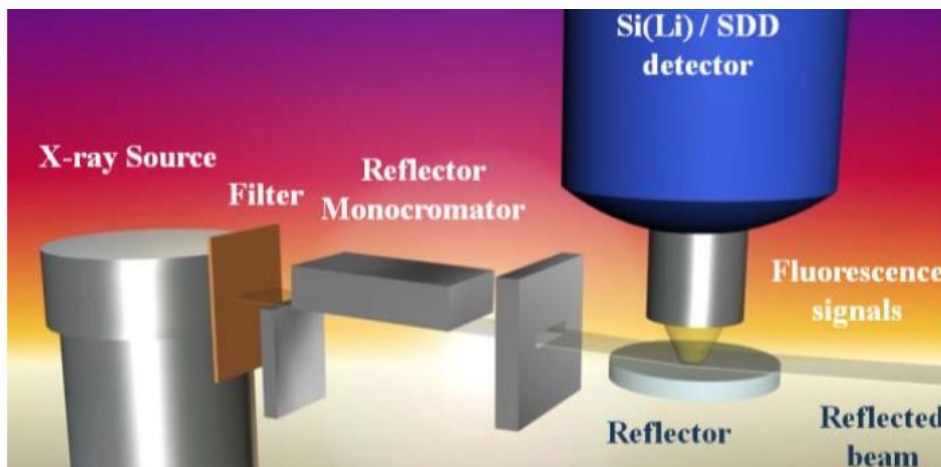
Američki fizičar A. H. Compton je 1923. otkrio da se reflektivnost x-zraka s ravnog materijala izrazito povećava uz upadni kut zrake ispod kritičnog kuta od $0,1^\circ$. Otkriće fizikalnog fenomena totalne refleksije X-zraka postalo je temelj nastanka rendgenske fluorescencijske spektrometrije s totalnom refleksijom kao instrumentalne analitičke tehnike (Fernandez Ruiz, 2014). Ipak, tek 50-ak godina nakon toga, točnije 1971. Yoneda i Horiuchi predstavili su ideju o korištenju potpune refleksije za pobuđivanje fluorescencije x-zrakama (Klockenkämper i von Bohlen, 2015). 14 godina kasnije, 1985. godine TXRF uređaji su komercijalizirani (Fernandez Ruiz, 2014). Ta ideja je omogućila poboljšanje prethodno postojeće rendgenske fluorescencijske spektrometrije (*engl. X-Ray Fluorescence Spectrometry, XRF*) temeljene na tome da uzorak obasjan rendgenskim zračenjem emitira fluorescenciju koja je karakteristična za svaki pojedini element. TXRF je okarakteriziran kao jedna vrsta energetsko diperzivnog XRF-a (EDXRF) Glavna razlika EDXRF i TXRF je kut pod kojim zračenje pada na uzorak; dok EDXRF koristi upadni kut od oko 40° , TXRF koristi manji kut od $0,1^\circ$ (Klockenkämper i von Bohlen, 2015). Za upadne kutove manje od kritične vrijednosti $0,1^\circ$ intenzitet fluorescencije je oko 2 puta veći od fluorescencije kod obične XRF tehnike. Osim toga, u prilog TXRF-u ide i činjenica da je doprinos pozadinskog signala gotovo jednak ničtici za vrijednosti ispod kritičnog kuta iz razloga što se upadno zračenje gotovo u potpunosti reflektira. Sve to omogućuje dosta bolji omjer signal šum kod TXRF tehnike odnosno bolju osjetljivost koja omogućuje analizu malih količina uzoraka.

Pomoću TXRF-a mogu se analizirati elementi kod kojih je $Z > 13$. Razlog tomu je slaba energija fluorescencije kod manjih elemenata, koja se apsorbira na putu do detektora.

Osnovni dijelovi TXRF uređaja su (Slika 2):

- izvor x-zraka koji emitira kontinuirani spektar rendgenskog zračenja (najčešće Mo ili W)

- sustav spektralne selekcije (filtri, monokromatori)
- reflektor koji usmjerava fluorescenciju u detektor
- fotodetekcijski i mjerni sustav (detektor, fotomultiplikator i dr.)



Slika 2. Prikaz geometrije TXRF uređaja (Fernandez Ruiz, 2014.)

1.3.2 Priprema uzorka za TXRF analizu

Zadnjih godina, TXRF je analitička tehnika koja se sve češće koristi za multielementnu kvantitativnu analizu za različite vrste uzoraka. Za samu analizu potrebno je: i) stvaranje tankog filma ili sloja; ii) homogena raspodjela analita i unatarnjeg standarda; i iii) uklanjanje smetajućih elemenata. Analiza se može provesti direktnom analizom uzorka kao i s minimalnom obradom (razrjeđenje, suspenzija, ekstrakcija) samog uzorka.

Uzorci koji se analiziraju TXRF tehnikom najčešće su u obliku otopine ili suspenzije (Klockenkämper i von Bohlen, 2015). Miješanjem pomoću mješalice ili ultrazvučne kupelji osigurava se homogen uzorak i/ili stabilna suspenzija. Nakon prethodne obrade, mala količina uzorka (5 - 50 μL) treba se staviti na očišćeni nosač uzorka, osušiti na zraku, grijaćoj ploči, pomoću infracrvene lampe (IR) ili pod vakuumom te nakon toga analizirati (Margui i sur., 2019; Khuder i sur., 2007).

Ostatak nakon sušenja se pobudi rendgenskim zračenjem pod upadnim kutom manjim od $0,1^\circ$ te detektor zabilježava zračenje koje je karakteristično za svaki pojedini element. Visoka reflektivnost samog nosača uzorka omogućava smanjenje limita detekcije od 10^{-7} do 10^{-12} g što gotovo potpuno uklanja spektralnu pozadinu nosača. Uz visoku osjetljivost ove metode jednostavna je i kvantifikacija korištenjem unutarnjeg standarda (Klockenkämper i von Bohlen, 2015).

1.3.3 Prednosti i nedostaci

TXRF je analitička tehnika koja je zahvaljujući mikroanalitičkoj sposobnosti te niskoj granici detekcije (red veličine pikogrami) prikladna za analizu elemenata u tragovima u biološkim uzorcima. Zahvaljujući niskoj interfernciji matriksa i istodobnoj analizi više elemenata analitička tehnika TXRF je prikladna za direktnu analizu bioloških uzoraka. Posljedično, direktna analiza kraće traje, troši se manje reagensa, jednostavniji je cijeli proces analize uzorka, niža je cijena postupka te je manja mogućnost pogreške (Marco i sur., 2004). Danas se posebna pažnja posvećuje primjeni analitičkih metoda koje vode brigu o načelu „zelene kemije“, prvenstveno upotreba malih količina uzorka, male količine reagensa, kao i brz i siguran postupak. U tom smislu, TXRF postaje važan alat za kvalitativnu i kvantitativnu elementarnu analizu.

Kao glavni nedostatak ističe se slaba osjetljivost za elemente s niskim atomskim brojem. Nadalje, potrebno je voditi računa o homogenosti uzorka te da bude reprezentativan i nanešen u obliku tankog filma na nosač uzorka.

2 OBRAZLOŽENJE TEME

Razvoj nekih kroničnih bolesti poput ateroskleroze, neuroloških poremećaja, raka, starenja, autoimunih bolesti povezan je sa disbalansom metala u tijelu ili sa izloženosti organizma teškim metalima (Margui i sur., 2019).

Budući da se metali pretežno izlučuju urinom, urin se kao uzorak koristi za utvrđivanje intoksikacije, profesionalne izloženosti i izloženosti metalima iz okoliša. Zbog mogućeg toksičnog učinka na ljudski organizam kao i utjecaj na zdravlje važno je pratiti razine toksičnih metala u okolišu te utvrditi moguću izloženost ljudi. Iako postoje studije koje prate razine metala u biološkim uzorcima (plazma, urin, slina ili kosa), samo je nekoliko studija istraživalo prisutnost metala u biološkim uzorcima sportaša ili neprofesionalnih sportaša (Zaitseva i sur., 2015; Chicharro i sur., 1999, Rodriguez Tuya i sur., 1996) koristeći različite spektroskopske tehnike kao što su AAS, ICP-MS ili ICP-OES. Danas se posebna pažnja posvećuje primjeni analitičkih metoda koje vode brigu o načelu „zelene kemije“, prvenstveno upotrebom malih količina uzorka što je od naročitog značaja kod bioloških uzoraka, male količine reagensa, kao i brz i siguran postupak. U tom smislu, TXRF postaje važan alat za kvalitativnu i kvantitativnu elementnu analizu.

Cilj ovog istraživanja je detektirati i odrediti sadržaj toksičnih metala i metaloida u urinu sportaša amatera koji su sudjelovali u planinskoj ultramaratonskoj utrci, pomoću TXRF tehnike u četiri vremenske točke: neposredno prije (osnovna vrijednost), neposredno nakon utrke, 12h nakon utrke te 24h nakon utrke. Osim toga, istražen je utjecaj fizičke aktivnosti na razinu toksičnih metala tijekom utrke (prije utrke, neposredno nakon utrke, 12 sati nakon utrke te 24 sata nakon utrke).

3 MATERIJALI I METODE

U istraživanju su uključeni amateri trkači (n=21), koji su sudjelovali na brdskoj ultramaratonskoj utrci na Medvednici, Zagreb, Hrvatska u proljeće 2015. Sudionici uključeni u studiju su bili stari između 18 i 60 godina i dobrog zdravlja, definirano kao nepostojanje bilo kakve akutne bolesti ili nekontrolirane kronične bolesti. Svi sudionici studije dali su pismeni pristanak kojim potvrđuju svoju informiranost o postupku te su se podvrgli fizikalnom pregledu, i antropometrijskim mjerenjima. Uzorci urina skupljeni su neposredno prije i odmah nakon utrke, 12 h nakon utrke te 24 h nakon utrke. Studija je odobrena od strane Institucionalnog etičkog povjerenstva za eksperimente (etičko povjerenstvo za eksperimentiranje Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, Sveučilište Zagreb).

Utrka duga 53 km počela je u 8 h sati od sportske dvorane Sutinjska vrela (Podsused), a završila kod doma Vugrovec (Vugrovec Gornji) oko 18 h i 30 minuta. Utrka je održana između 123 m i 991 m nadmorske visine. Podloga za trčanje bila je šumska staza. Temperatura tijekom maratona varirala je između 4,0 i 15,0 °C dok je vlažnost zraka bila 38–86 % (podaci Meteorološke i hidrološke službe Republike Hrvatske). Svaki sudionik nosio je tenisice za trčanje, majicu i trenirku. Prihvaćene su individualne preferencije odijevanja sudionika. Dvanaest sati prije utrke, ispitanici su večerali po svom izboru. Nakon noćnog odmora, doručkovali su po svom izboru između 6 h i 30 minuta te 7 h i 30 minuta. Tijekom trčanja, trkači su se krijepili pripremljenom hranom i pićem po vlastitom izboru. Obroci su uključivali vodu s niskim sadržajem minerala, visokoenergetska pića, visokoenergetske pločice, banane i orašaste plodove. Antropometrijska mjerenja težine, visine i opsega struka obavljena su prije početka utrke pomoću standardiziranog protokola. Sudionici su vagani bez tenisica, visina i opseg struka su izmjereni pomoću zidne trake. Indeks tjelesne mase (BMI) računat je kao težina (u g) podijeljena s kvadratom visine pri stajanju (u m²). Svi su sudionici završili utrku, s prosječnim vremenom od $8,40 \pm 1,28$ h. Najbrže vrijeme bilo je 6,32 h, a najsporije 9,88 h.

3.1 Materijali

3.1.1 Korištene kemikalije

- Standardna otopina Y (1 g/L, Sigma Aldrich, Njemačka)
- Standardni referentni materijal: Seronorm urine level 2 (SERO AS, Norveška)

3.1.2 Radni instrument i pribor

- Rendgenski fluorescencijski spektrometar s totalnom refleksijom „S2 Picofox” (Bruker Nano GmbH, Berlin, Njemačka)
- Mješalica vortex (Vortex-Genie[®]-series, LLG, Germany)
- Kvarcni stakleni reflektori (Bruker AXS Microanalysis GmbH, Berlin, Njemačka)
- Grijača ploča Cimarec 2 (Bamstead/Thermolyne, Dubuque, Iowa, USA)
- Mikropipete Rainin pipet-Lite L-10 XLS, L-1000 XLS, L-20 LTS i L-200 LTS (Mettler Toledo, Grefensee, Švicarska)
- Nastavci za mikropipete Rainin (Mettler Toledo, Grefensee, Švicarska)
- Plastične epruvete od 10 mL i 50 mL (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)

3.1.3 Uzorci urina

Uzorci urina prikupljeni su na neposredno prije utrke, odmah nakon utrke te 12 h i 24 h nakon utrke u unaprijed označene sterilne plastične posude. Uzorci su alikvotirani za različite biokemijske analize i pohranjeni na -20 °C za kasnije analize.

3.2 Metode

3.2.1 Rendgenska fluorescencijska spektrometrija s totalnom refleksijom (TXRF)

TXRF analiza svih uzoraka provedena je korištenjem TXRF sustava (S2 PICOFOX, Bruker AXS Microanalysis GmbH, Berlin, Njemačka) opremljenog rendgenskom cijevi od 40 W s molibdenovom (Mo) anodom i višeslojnim monokromatorom (17,5 keV). Karakteristično zračenje elemenata prisutnih u uzorku detektira se silikonskim detektorom s aktivnim područjem

od 10 mm² i razlučivosti <150 eV (Mn K α). Mjerenja su izvršena pri 50 kV i 750 μ A uz vrijeme mjerenja od 1000 s.

Priprema uzoraka za TXRF

Uzorku urina (1000 μ L) doda se 10 μ L standardne otopine Y kao unutarnjeg standarda (1 g/L) te se uzorak homogenizira pomoću mješalice vortex. 10 μ L tako pripremljenog uzorka stavi se na nesilikonizirani nosač od kvarcnog stakla i osuši na grijaćoj ploči (T \approx 50 °C) te analizira pomoću TXRF spektrometra.

Na isti način pripremljen je i standardni referentni materijal (Serorm urin Level 2; SERO AS, Norveška) te mjeren pod istim uvjetima.

3.2.2 Statistička obrada podataka

Dobiveni rezultati prikazani su kao srednje vrijednosti 3 mjerenja \pm standardna devijacija. Analiza se temeljila na neparametrijskim metodama, zbog relativne oskudnosti podataka i neuobičajene distribucije podataka u većini varijabli. Stoga je za grupnu analizu korišten Friedmanov test, dok su usporedbe u paru analizirane pomoću Wilcoxonovog testa. Osim toga, značajnost rezultata ispitana je na prisutnost značajnog trenda, s linearnom, kvadratnom, kubičnom, logaritamskom i eksponencijalnom krivuljom. Na kraju, hi-kvadrat testom su analizirane sve uparene promjene, gdje su jednake teorijske frekvencije bile očekivane (hi-kvadrat test s nula stupnjeva slobode). Sve analize provedene su u R programskom jeziku (www.r-project.org) sa značajnosti P<0,05.

4 REZULTATI I RASPRAVA

4.1 Rezultati i rasprava

Budući da se metali pretežno izlučuju urinom, urin se kao uzorak koristi za utvrđivanje intoksikacije, profesionalne izloženosti i izloženosti metalima iz okoliša. Provedeno je nekoliko studija kako bi se postavile referentne vrijednosti za metale u urinu (Heitland i Kostner, 2006; Gouille i sur., 2005) pri čemu se za multielementnu analizu koristila induktivno spregnuta plazma masena spektroskopija (ICP-MC). U ovom istraživanju TXRF je korišten kao brza metoda za detekciju toksičnih metala u urinu neprofesionalnih sportaša.

U ultramaratonskoj utrci sudjelovalo je 21 amaterskih trkača koji su bili uključeni u istraživanje. Od sudionika utrke sakupljeni su uzorci urina neposredno prije utrke, odmah nakon utrke, 12 h nakon utrke i 24 h nakon utrke te je određen sadržaj prisutnih toksičnih metala pomoću TXRF tehnike. Dobivene koncentracije elemenata prikazane su u Tablici 2.

U uzorcima urina prikupljenim od neprofesionalnih sportaša detektirani su Al, As, Ba, Ni, Pb, Rb, Sr, Tl i V. Od otkrivenih metala u uzorcima urina prije utrke u ovom istraživanju, samo As je IARC klasificirao kao kancerogen za ljude (skupina 1), dok primjerice Cd i Be, metali koje je IARC svrstao isto u skupinu 1 nisu detektirani. Među metalima klasificiranim u skupinu 2B (moguće kancerogeni za ljude) detektirani su Ni i Pb. Iako je Ni klasificiran kao skupina 2B, neki spojevi Ni su klasificirani kao skupina 1 (IARC, 1993; Mulware, 2013).

Ukupni rezultati ukazuju na visok stupanj varijabilnosti između ispitanika; interkvartilni rasponi su u nekim slučajevima četiri puta premašili medijan (Tablica 2). Unatoč ovoj varijabilnosti, dva su rezultata postigla statističku značajnost, As i Rb, koji su imali veliko povećanja nakon utrke, s prosječnim četverostrukim povećanjem za As i gotovo trideseterostrukim povećanjem Rb (Tablica 2). U slučaju As, uzorak je sugerirao srednjoročni vrhunac nakon utrke, s maksimalnom vrijednošću 12 h nakon utrke. Isti obrazac zabilježen je i u Rb, ali je promjena bila još veća (Tablica 2). Sličan obrazac je viđen u Sr, ali nije bio značajan. Nasuprot tome, preostali rezultati su ukazivali ili na vrhunac neposredno nakon utrke (Al i V) ili

generalno povišenje nakon utrke s pozitivnim sugestivnim uzlaznim trendom (Ba), ali nijedan od ovih rezultata nije bio značajan (Tablica 2).

Tablica 2. Usporedba razine metala u četiri uzastopna mjerenja

Metal	Mjerenje: medijan (interkvartilni raspon)				P	P za mjerenja parova*
	početna vrijednost	odmah nakon utrke	12 sati nakon utrke	24 sata nakon utrke		
Al (*1000) ($\mu\text{g/L}$)	21,53 (42,73)	81,54 (217,97)	73,06 (224,85)	60,81 (183,27)	0,241	0,068/0,068/0,225
As ($\mu\text{g/L}$)	13,80 (16,72)	30,40 (111,74)	47,64 (107,31)	39,57 (92,46)	0,022	0,005/0,061/0,047
Ba ($\mu\text{g/L}$)	229,59 (429,18)	317,65 (448,55)	406,155 (-)	558,25 (940,37)	0,297	0,508/0,593/0,093
Ni ($\mu\text{g/L}$)	- (-)	26,51 (-)	19,40 (-)	- (-)	-	-/-/-
Pb ($\mu\text{g/L}$)	14,99 (46,18)	- (-)	14,01 (-)	- (-)	-	-/0,317/-
Rb (*1/1000) ($\mu\text{g/L}$)	0,41 (0,60)	2,27 (5,42)	12,75 (2,09)	0,97 (1,33)	0,002	<0,001/0,017/0,027
Sr ($\mu\text{g/L}$)	64,99 (52,20)	51,85 (334,08)	175,04 (683,03)	139,47 (-)	-	0,317/0,317/0,317
V ($\mu\text{g/L}$)	29,20 (-)	111,37 (284,35)	43,35 (618,60)	67,94 (617,30)	0,112	0,180/-/0,180
Tl ($\mu\text{g/L}$)	- (-)	23,99 (-)	- (-)	- (-)	-	-/-/-

*Usporedbe početne vrijednosti s tri mjerenja nakon utrke (početna vrijednost naspram neposredno nakon utrke/ početna vrijednost naspram 12 sati nakon utrke/ početna vrijednost naspram 24 sata nakon utrke)

Analiza uzastopnih mjerenja ukazala je na ogromnu razinu varijabilnosti, obilježenu ukupnim smanjenjem metala u tragovima u dva ispitanika, dok je kod ostalih uočen veliki porast. Ukupno je bilo 138 usporedbi mjerenja prije utrke s tri mjerenja nakon utrke, od kojih 88 slučajeva povišenih vrijednosti i 46 slučajeva smanjenih vrijednosti. Pod pretpostavkom slučajnosti i jednakog broja očekivanih ishoda, ovaj rezultat je pokazao značajnost ($\chi^2=6,748$, $P=0,009$), pokazujući da su u prosjeku vrijednosti metala porasle nakon utrke. Raščlamba prema

specifičnom metalu pokazala je dva značajna rezultata, povećanje As i Rb, i marginalno beznačajan rezultat za Al (Tablica 3).

Tablica 3. Promjene vrijednosti tragova metala koje ukazuju na povećanje ili smanjenje pri usporedbi parova

Metal	Broj povećanih vrijednosti *(%)	Broj smanjenih vrijednosti *(%)	P**
Al	10 (77,0)	3 (23,0)	0,052
As	29 (67,4)	14 (32,6)	0,022
Ba	10 (50,0)	10 (50,0)	-
Ni	- (-)	- (-)	-
Pb	1 (-)		-
Rb	36 (67,9)	17 (32,1)	0,009
Sr	1 (25,0)	3 (75,0)	0,317
V	2 (50,0)	2 (50,0)	-
Tl	- (-)	- (-)	-

**Usporedba mjerenja prije utrke s pripadajuća tri mjerenja nakon utrke; **Hi kvadrat test, uz pretpostavku ravnomjerne očekivane distribucije*

Nadalje, analiza temeljena na sudionicima pokazala je da su tri ispitanika imala značajno više povećanja u koncentraciji metala (Tablica 4). Ovi sudionici se nisu razlikovali prema svojoj dobi (P=0,634), spolu (P=0,330) ili trajanju utrke (P=0,421) od ostatka uzorka.

Tablica 4. Podaci o pojedinim ispitanicima s brojem zabilježenih povećanih naspram smanjenih koncentracija metala.

Uzorak	Spol	Dob	Broj povećanih koncentracija	Broj smanjenih koncentracija	
1	1	42	6	0	0,091
2	1	41	0	4	0,214
3	2	47	6	2	0,304
4	1	48	7	1	0,141
5	1		3	6	0,319
6	1	42	0	6	0,091

7	1	28	2	7	0,301
8	1	29	10	0	0,016
10	1	43	5	0	0,083
11	1	35	8	2	0,175
13	1	47	6	0	0,091
14	1	50	1	7	0,141
18	1	49	0	0	-
19	1	33	7	0	0,035
22	2	32	7	4	0,335
24	1	43	4	3	0,500
26	2	47	8	0	0,038
28	2		0	0	-
29	1	39	1	0	0,500
30	2	27	5	2	0,296
32	1	53	2	2	-

U uzorcima urina prije utrke As je pronađen u 81% uzoraka u rasponu koncentracija 2,8-356,9 µg/L. U studijama Goullea i sur. i Heitlanda i Koestera referentna vrijednost za As u urinu iznosi 2,3-161 µg/L (utvrđena na 100 zdravih dobrovoljaca) i 1-375 µg/L (utvrđena na 87 zdravih odraslih Nijemaca). S druge strane, u studiji Jergovića i sur. iz 2010. u urinu zdravih odraslih osoba iz istočne Hrvatske razina As bila je u rasponu od 8,32-21,93 µg/L. Budući da je kancerogen za ljude (prema IARC-u klasificiran je kao skupina 1 humanih karcinogena), tako velik broj pozitivnih uzoraka i visoka razina As otkrivena u ovom istraživanju potencijalno predstavlja ozbiljan zdravstveni problem. Nadalje, u dva uzorka razina As bila je iznad 100 µg/L (109 µg/L i 356 µg/L), što je daleko iznad preporučenih normalnih vrijednosti prema US ATSDR ToxGuide.

U uzorcima urina prije utrke iz ovog istraživanja Pb je pronađen samo u jednom uzorku, u koncentraciji od 33,9 µg/L. Ova vrijednost je mnogo viša od referentne vrijednosti Pb u urinu 0,01-2,14 µg/L (Goulle i sur., 2005) i 0,02-4,8 µg/L (Heitland i Kostner, 2006). Dosada su u Hrvatskoj dvije studije ispitivale prisutnost toksičnih metala u biološkim uzorcima (krvi ili urinu) opće populacije (Jergović i sur., 2010; Telišman i sur. 2001). U istraživanju Telišmana i sur. iz 2001. u uzorcima krvi prikupljenim u razdoblju 1998.-1999. od 154 zdrava ispitanika muškog spola koji nikada nisu bili profesionalno izloženi metalima, razine Pb određivane su atomskom

apsorpcijskom spektroskopijom (AAS). Rezultati su otkrili visoku razinu Pb (25-254 µg/L) koju autori pripisuju izloženosti benzinu koji sadrži Pb. U istraživanju provedenom u istočnom dijelu Hrvatske (bivša ratna zona) u razdoblju 2007.-2008. od nasumično odabranih zdravih osoba (n=391) prikupljeni su uzorci krvi, kose i urina koji su analizirani pomoću ICP-MS. U toj studiji koncentracija Pb u serumu sudionika istraživanja iz područja umjerene ratne aktivnosti iznosila je 1,54-15,19 µg/L, a u uzorcima mokraće razina Pb bila je u rasponu od 2,0-7,95 µg/L. Otkrivena razina Pb u ovom je istraživanju viša nego u studiji Jergovića i sur., te bliža vrijednostima navedenim u studiji Telišmana i sur. Pb je mogući kancerogen za ljude, stoga je važno pratiti njegovu razinu. U usporedbi s istraživanjem Telišmana i sur. (provedeno na muškoj populaciji Zagreba), može se primijetiti da u gotovo 17 godina (od 1998. do 2015.) u zdravoj populaciji Zagreba Pb gotovo da nije otkriveno te je samo jedan uzorak u ovom istraživanju sadržavao Pb. Sve to zajedno može ukazivati da su u razdoblju od zadnjih 20-ak godina u Hrvatskoj prisutne niže razine Pb.

Toksični metali detektirani s visokom učestalošću u uzorcima urina prikupljenim prije utrke bili su Al, Ba i Rb, dok je učestalost detekcije Sr i V bila niža. Njihove koncentracije bile su u referentnom rasponu koji su objavili Heitland i Koester i Goulle i sur., s izuzetkom Al i Ba. Ba je otkriven u koncentracijskom rasponu 47,6-1347,2 µg/L, što je više od 0,1-14 µg/L i 0,17-3,85 µg/L koje su objavili Heitland i Koester i Goulle i sur. Koncentracije Al su bile u rasponu koncentracija 8209,9-126075,7 µg/L. Ova vrijednost je mnogo viša od prijavljenih referentnih vrijednosti za Al u urinu koje iznose 0,16-11,2 µg/L (Heitland i Kostner,2006; Goulle i sur., 2005).

Viša razina nekog toksičnog metala, na primjer veća koncentracija Ba u uzorcima prije utrke, mogla bi se objasniti većom konzumacijom hrane sudionika našeg istraživanja. U studiji Zaitseve i sur. iz 2015. uzorci kose učenika s različitom tjelesnom aktivnošću (visoka, srednja aktivnost i niska aktivnost) analizirani su na toksične i elemente u tragovima pomoću ICP-MS. Veća razina Al, Cd, Pb, Li, Ni i Sn otkrivena je u skupini učenika s visokom tjelesnom aktivnošću u odnosu na skupinu s niskom aktivnošću. Autori objašnjavaju veću razinu toksičnih elemenata u kosi većom konzumacijom hrane potrebne za utrošak energije tijekom vježbanja.

Poznato je da fizička aktivnost dovodi do fizioloških promjena, a te su promjene još značajnije tijekom treninga izdržljivosti, kao što je brdska ultramaratonska utrka. Prethodna studija

Rodrigueza Tuya iz 1996. otkrila je nižu razinu Cd i Pb kod sportaša nego u kontrolama, zaključivši da sportaši imaju učinkovitije sustave eliminacije toksičnih metala (Tuya Rodriguez i sur., 1996), a ovo zapažanje je potvrđeno i u ovom istraživanju. Za većinu otkrivenih toksičnih metala uočen je povišen broj vrijednosti metala kao i povećanje koncentracije neposredno nakon utrke u usporedbi s vrijednostima prije utrke. Međutim, broj povećanih vrijednosti bio je statistički značajan samo za As i Rb. Njihova veća prisutnost neposredno nakon utrke može se objasniti bržim protokom krvi, promijenjenom bubrežnom funkcijom i ozljedom tkiva (Jablan i sur., 2017; Buchman i sur., 1998; Tuya Rodriguez, 1996). To omogućuje da se toksični metali eliminiraju iz tijela putem mokraće. Izlučivanje toksičnih metala uslijed tjelesne aktivnosti u ovom istraživanju potvrđuje činjenica da Ni i Tl nisu otkriveni u uzorcima urina prikupljenim prije utrke, ali su otkriveni u uzorcima urina prikupljenim neposredno nakon utrke. U ovom istraživanju većina toksičnih metala pronađena je u većem broju uzoraka i u većoj koncentraciji neposredno nakon utrke, no izuzetak je bio Pb. Broj pozitivnih uzoraka Pb se povećao 12 i 24 sata nakon utrke, što bi moglo ukazivati na njegovo nakupljanje u tijelu i sporu mobilizaciju iz tjelesnih zaliha.

5 ZAKLJUČCI

U ovom radu korištena je TXRF tehnika kao metoda za kvalitativnu i kvantitativnu analizu toksičnih metala u urinu sportaša amatera.. U radu su naglašene prednosti TXRF u odnosu na ostale tehnike analize teških metala; jednostavna priprema uzorka, mala količina uzorka kao i reagensa, multielementna metoda, jednostavna kvantifikacija te brza i jeftina što ju čini pogodnom za primjenu u rutinskim analizama. Primjenjena metoda kao i postupak pripreme uzoraka temelji se na načelima zelene kemije.

TXRF tehnika primjenjena je za određivanje koncentracije Al, As, Ba, Ni, Pb, Rb, Sr, V, Tl u uzorcima urina 21 sportaša amatera, prikupljenih u 4 uzastopne vremenske točke. Dobiveni rezultati pokazali su da se sadržaj elemenata može mijenjati s vremenom uslijed utjecaja fizičke aktivnosti. Također, rezultati su pokazali da TXRF može biti alternativa ili barem komplementaran analitički alat najčešće korištenim atomskim spektroskopskim tehnikama za elementnu analizu.

Ukupni rezultati ovog istraživanja ukazuju na visok stupanj varijabilnosti između ispitanika; interkvartilni rasponi su u nekim slučajevima četiri puta premašili medijan. Unatoč ovoj varijabilnosti, dva su rezultata bila statistički značajna: sadržaj As i Rb pokazao je snažan obrazac povećanja nakon utrke, s prosječnim četverostrukim povećanjem za As i gotovo trideseterostrukim povećanjem Rb. U slučaju As, uzorci su sugerirali srednjoročni vrhunac nakon utrke, s maksimalnom vrijednošću 12 h nakon utrke. Isti obrazac promjene zabilježen je i u Rb, ali je promjena bila još veća. Sličan obrazac viđen je i kod Sr, ali rezultat nije bio statistički značajan. Nasuprot tome, preostali rezultati su ukazivali ili na vrhunac neposredno nakon utrke (Al i V) ili generalno povišenje koncentracija nakon utrke s pozitivnim sugestivnim uzlaznim trendom (Br), ali niti jedan od ovih rezultata nije bio statistički značajan. Ovi rezultati mogli bi ukazivati da intenzivna fizička aktivnost pospješuje eliminaciju toksičnih metala.

Analiza temeljena na sudionicima pokazala je da su tri ispitanika imala statistički značajno više povećanja u koncentraciji metala.

Praćenje sadržaja toksičnih metala u urinu od iznimne je važnosti naročito zbog njihovog utjecaja na zdravlje ljudi.

6 LITERATURA

Agency for toxic substances and disease registry (ATSDR). Priority list of hazardous substances. US Department of Health and Human Service, Public Health Humans Service, Center for Disease Control, 2016, Atlanta

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological Profile for Lead. Public Health Service. U.S. Department of Health and Human Services; 1999, Atlanta.

Aprile A, De Bellis L. Editorial for Special Issue "Heavy Metals Accumulation, Toxicity, and Detoxification in Plants". *Int J Mol Sci.* 2020, 21(11), 4103.

Borgese L, Bilo F, Bontempi E, Seralessandri L, Cinosi A, Siviero G and Depero LE . Total Reflection X-Ray Fluorescence (TXRF) spectroscopy for environmental and biological analysis. International Congress of Metrology, Paris, 2013, 10010, 1-5.

Buchman AL, Keen C, Commisso J, Killip D, Ou CN, Rognerud CL, Dennis K, Dunn JK. The effect of a marathon run on plasma and urine mineral and metal concentrations. *J Am Coll Nutr*, 1998, 17(2), 124-127.

Chicharro JL, Serrano V, Urena R, Gutierrez AM, Carvajal A, Fernandez-Hetnando P, Lucia A. Trace elements and electrolytes in human resting mixed saliva after exercise. *Br. J. Sports Med*, 1999, 33, 204-207.

De La Calle I, Cabaleiro N, Romero V, Lavilla I, Bendicho C. Sample pretreatment strategies for total reflection X-ray fluorescence analysis: A tutorial review. *Spectrochim. Acta, Part B*, 2013, 90, 23–54.

Fernández Ruiz R. TXRF Spectrometry as a Powerful Tool for the Study of Metallic Traces in Biological Systems. *SEP*, 2014.

Flora SJ, Saxena G, Gautam P, Kaur P, Gill KD. Response of lead-induced oxidative stress and alterations in biogenic amines in different rat brain regions to combined administration of DMSA and MiADMSA. *Chem Biol Interact.* 2007, 170(3), 209-220.

Gabby PN. Lead. U: Mineral Commodity Summaries, U.S. Geological Survey, Reston VA, 2006, str. 96-97.

Garza-Lombó C, Pappa A, Panayiotidis MI, Gonsebatt ME, Franco R. Arsenic-induced neurotoxicity: a mechanistic appraisal. *J Biol Inorg Chem*, 2019, 24(8), 1305-1316.

Genchi G, Carocci A, Lauria G. Nickel: Human Health and Environmental Toxicology. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2020, 17(3), 679.

Goullé JP, Mahieu L, Castermant J, Neveu N, Bonneau L, Lainé G, Bouige D, Lacroix C. Metal and metalloid multi-elementary ICP-MS validation in whole blood, plasma, urine and hair. Reference values. *Forensic Sci Int.* 2005, 153(1), 39-44.

Goyer RA, Clarkson TW, Toxic effects of metals. U: Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, Klaasen CD, New York, The McGraw-Hill, 2001, str. 811-858.

Guyton AC, Hall JE. Medicinska fiziologija, Zagreb, Medicinska naklada, 2012, str. 303-305.

Heitland P, Kostner HD, Biomonitoring of 30 trace elements in urine of children and adults by ICP-MS. *Clin. Chim. Acta*, 2006, 365 (1-2), 310-318.

Helaluddin ABM, Khalid RS, Alaama M, Abbas SA, Main analytical techniques used for elemental analysis in various matrices, *Trop. J. Pharm. Res.* 2016, 15(2), 427-434.

Hu Y, Zhou J, Du B. Health risks to local residents from the exposure of heavy metals around the largest copper smelter in China.. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 2019, 171, 329-336.

IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. 1993, Lyon, IARC, Vol. 1-58.

Jablan J, Inić S, Stosnach H, Hadžiabdić MO, Vujić L, Domijan AM. Level of minerals and trace elements in the urine of the participants of mountain ultra-marathon race. *J Trace Elem Med Biol.* 2017, 41, 54-59.

Jergovic M, Miskulin M, Puntaric D, Gmajnic R, Milas J, Sipos L. Cross-sectional biomonitoring of metals in adult populations in post-war eastern Croatia: differences between areas of moderate and heavy combat. *Croat Med J.* 2010, 51(5), 451-60.

Johnson CH, Van Tassell VJ: Acute barium poisoning with respiratory failure and rhabdomyolysis. *Ann Emerg Med,* 1991,20 (10), 1138–1142.

Khuder A, Bakir MA, Karjou J, Sawan MK. XRF and TXRF techniques for multi-element determination of trace elements in whole blood and human hair samples. *J. Radioanal. Nucl. Chem.,* 2007, 273(2), 435-442.

Klockenkämper R, von Bohlen A. Fundamentals of X-ray fluorescence. In: Total-Reflection X-Ray Fluorescence Analysis and Related Methods, Vitha FM, New Jersey, John Wiley and Sons Inc., 2015, str. 1-74.

Krachler M, Mohl C, Emons H, Shotyk W. Influence of digestion procedures on the determination of rare earth elements in peat and plant samples by USN-ICP-MS. *J. Anal. At. Spectrom.,* 2002, 17, 844-851.

Kumar S, Trivedi AV. A Review on Role of Nickel in the Biological System. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.,* 2016, 5(3), 719-727.

Lead poisoning, 2021., <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/lead-poisoning-and-health>, accessed 6.3.2022.

Margui E, Jablan J, Queralt I, Bilo F, Borgese L. Potential of total-reflection X-ray spectrometry for multielement analysis of biological samples using dilution or suspension sample preparation techniques. *Anal. Sci.*, 2021.

Marcó P., Lué M., Hernández-Caraballo, Edwin A. Direct analysis of biological samples by total reflection X-ray fluorescence. *Spectrochim. Acta, Part B*, 2004, 59, 1077-1090.

Mulware SJ. Trace elements and carcinogenicity: a subject in review. *3 Biotech*. 2013, 3(2), 85-96.

Nayak P. Aluminum: impacts and disease. *Environ Res.*, 2002, 89(2), 101-115.

Nielsen FH. Other trace elements. U: Present knowledge in nutrition. Ziegler EE, Filler LJ, Washington D.C., International Life Science Institute, 1996, str. 353-377.

Perl DP, Good PF. Uptake of aluminum into central nervous system along nasal olfactory pathways. *Lancet*, 1987, 1(8540), 1028–1029.

Rehder D. Vanadium. Its role for humans. *Met Ions Life Sci*. 2013, 13, 139-169.

Rodríguez Tuya I, Pinilla Gil E, Maynar Mariño M, García-Moncó Carra RM, Sánchez Misiego A. Evaluation of the influence of physical activity on the plasma concentrations of several trace metals. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1996, 73(3-4), 299-303.

Roberts E: Alzheimer's disease may begin in the nose and may be caused by aluminosilicates. *Neurobiol Aging*, 1986, 7(6), 561–567.

Tchounwou PB, Patlolla AK, Centeno JA. Carcinogenic and systemic health effects associated with arsenic exposure--a critical review. *Toxicol Pathol*. 2003, 31(6), 575-588.

Tchounwou PB, Yedjou CG, Patlolla AK, Sutton DJ. Heavy metal toxicity and the environment. *Exp Suppl.* 2012, 101, 133-164.

Telgmann L, Holtkamp M, Künnemeyer J, Gelhard C, Hartmann M, Klose A, Sperling M, Karst U. Simple and rapid quantification of gadolinium in urine and blood plasma samples by means of total reflection X-ray fluorescence (TXRF). *Metallomics.* 2011, 3(10), 1035-1040.

Telisman S, Cvitković P, Jurasović J, Pizent A, Gavella M, Rocić B. Semen quality and reproductive endocrine function in relation to biomarkers of lead, cadmium, zinc, and copper in men. *Environ Health Perspect.* 2000, 108(1), 45-53.

Tong S, von Schirnding YE, Prapamontol T. Environmental lead exposure: a public health problem of global dimensions. *Bull World Health Organ.* 2000, 78(9), 1068-1077.

Wang C, Pi X, Chen Y, Wang D, Yin S, Jin L, Li Z, Ren A, Wang L, Yin C. Prenatal exposure to barium and the occurrence of neural tube defects in offspring. *Sci Total Environ.* 2021, 764, 144245.

Wang J., Hansen EH, Trends and perspectives of flow injection/sequential injection on-line sample-pretreatment schemes coupled to ETAAS, *Trends in Anal. Chem.* 2005, 24(1), 1-8.

Wang Z, Rossman TG. *The Toxicology of Metals.* Boca Raton, CRC Press, 1996, str. 221-243.

Weyermann M, Brenner H: Alcohol consumption and smoking habits as determinants of blood lead levels in a national population sample from Germany. *Arch Environ Health,* 1997, 52, 233–240.

Zaitseva IP, Skalny AA, Tinkov AA, Berezkina ES, Grabeklis AR, Skalny AV. The influence of physical activity on hair toxic and essential trace element content in male and female students. *Biol Trace Elem Res,* 2015, 163(1-2), 58-66.

Zarkadas C , Karydas AG, Paradellis T., Determination of uranium in human urine by total reflection X-ray fluorescence. *Spectrochim. Acta Part B*, 2001, 56, 2505–2511.

Zhu HH, Hu J, Lo-Coco F, Jin J. The simpler, the better: oral arsenic for acute promyelocytic leukemia. *Blood*. 2019, 134(7), 597-605.

7 SAŽETAK

Budući da su toksični metali i metaloidi prisutni u ljudskom okolišu, od velike je važnosti pratiti njihovu razinu i procijeniti izloženost ljudi tim metalima. U ovoj studiji analizirani su uzorci urina sportaša amatera sa područja Zagreba tijekom planinske ultramaratonske utrke duge 53 km i određen je sadržaj detektiranih toksičnih metala i metaloida primjenom TXRF tehnike, u četiri vremenske točke: neposredno prije (osnovna vrijednost) utrke, neposredno nakon utrke, 12 h nakon utrke te 24 h nakon utrke. U analiziranim uzorcima urina detektirani i određivani su Al, As, Ba, Ni, Pb, Rb, Sr, V i Tl. Svi otkriveni metali pokazali su promjene koncentracija s vremenom, pri čemu je većina pokazala povećanje koncentracije nakon utrke, fenomen koji se može objasniti pojačanom eliminacijom uslijed fizičke aktivnosti. Nadalje, TXRF tehnika se pokazala kao brza i pouzdana metoda koja prati načela zelene kemije za određivanje toksičnih metala u biološkom uzorku kao što je urin.

7 SUMMARY

Since toxic metals and metalloids are ubiquitous in the human environment, it is of great importance to monitor their levels and assess human exposure to them. In this study, urine samples from amateur athletes from the Zagreb region were analyzed during a 53 km ultramarathon race and the levels of detected toxic metals and metalloids were determined using the TXRF technique at four time points: immediately before (baseline), immediately after the race, 12 hours after the race, and 24 hours after the race.

The presence of Al, As, Ba, Ni, Pb, Rb, Sr, V, and Tl was detected and quantified. All detected metals and metalloids showed alterations in time, with most of them showing an increase in concentration after the race, a phenomenon that can be explained by increased excretion due to endurance activity. In addition, the TXRF technique has been shown to be a rapid and reliable method that follows the principles of green chemistry for the determination of toxic metals in a biological sample such as urine.

8 Temeljna dokumentacijska kartica

Primjena rendgenske fluorescencijske spektrometrije s totalnom refleksijom za identifikaciju i kvantifikaciju toksičnih metala i metaloida u urinu sportaša amatera

Antonio Leventić

SAŽETAK

Budući da su toksični metali i metaloidi prisutni u ljudskom okolišu, od velike je važnosti pratiti njihovu razinu i procijeniti izloženost ljudi tim metalima. U ovoj studiji analizirani su uzorci urina sportaša amatera sa područja Zagreba tijekom planinske ultramaratonske utrke duge 53 km i određen je sadržaj detektiranih toksičnih metala i metaloida primjenom TXRF tehnike, u četiri vremenske točke: neposredno prije (osnovna vrijednost) utrke, neposredno nakon utrke, 12 h nakon utrke te 24 h nakon utrke. U analiziranim uzorcima urina detektirani i određivani su Al, As, Ba, Ni, Pb, Rb, Sr, V i Tl. Svi otkriveni metali pokazali su promjene koncentracija s vremenom, pri čemu je većina pokazala povećanje koncentracije nakon utrke, fenomen koji se može objasniti pojačanom eliminacijom uslijed fizičke aktivnosti. Nadalje, TXRF tehnika se pokazala kao brza i pouzdana metoda koja prati načela zelene kemije za određivanje toksičnih metala u biološkom uzorku kao što je urin.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 30 stranica, 2 grafička prikaza, 4 tablice i 48 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: toksični metali, rendgenska fluorescencijska spektrometrija s totalnom refleksijom, uzorci urina

Mentor: **Dr. sc. Jasna Jablan**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Jasna Jablan**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Maja Bival Štefan, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Davor Šakić, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: travanj, 2022.

8 Basic documentation card

Screening for toxic metals and metalloids in urine of non-professional sportsmen by total reflection X-ray fluorescence

Antonio Leventić

SUMMARY

Since toxic metals and metalloids are ubiquitous in the human environment, it is of great importance to monitor their levels and assess human exposure to them. In this study, urine samples from amateur athletes from the Zagreb region were analyzed during a 53 km ultramarathon race and the levels of detected toxic metals and metalloids were determined using the TXRF technique at four time points: immediately before (baseline), immediately after the race, 12 hours after the race, and 24 hours after the race.

The presence of Al, As, Ba, Ni, Pb, Rb, Sr, V, and Tl was detected and quantified. All detected metals and metalloids showed alterations in time, with most of them showing an increase in concentration after the race, a phenomenon that can be explained by increased excretion due to endurance activity. In addition, the TXRF technique has been shown to be a rapid and reliable method that follows the principles of green chemistry for the determination of toxic metals in a biological sample such as urine.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 30 pages, 2 figures, 4 tables and 48 references. Original is in Croatian language.

Keywords: toxic metals, total reflection X-ray fluorescence, urine samples

Mentor: **Jasna Jablan, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Jasna Jablan, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Maja Bival Štefan, Ph.D. *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Davor Šakić, Ph.D. *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: april, 2022.