

# Analitički postupci temeljeni na primjeni rendgenske fluorescencijske spektrometrije s totalnom refleksijom za multielementnu analizu bioloških uzoraka

---

Lacić, Ena

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:281042>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-01**



Repository / Repozitorij:

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



**Ena Lacić**

Analitički postupci temeljeni na primjeni rendgenske  
fluorescencijske  
spektrometrije s totalnom refleksijom za  
multielementnu analizu bioloških uzoraka

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Analitička kemija 2 Sveučilišta u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za analitičku kemiju pod stručnim  
vodstvom izv. prof. dr. sc. Jasne Jablan

*Zahvaljujem se svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Jasni Jablan na velikoj pomoći i korisnim  
savjetima tijekom izrade diplomskog rada.*

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. BIOLOŠKI UZORCI.....	1
1.2. RENDGENSKA FLUORESCENCIJSKA SPEKTROMETRIJA S TOTALNOM REFLEKSIJOM (TXRF) .....	3
1.2.1. Kratka povijest rendgenske fluorescencijske spektrometrije s totalnom refleksijom (TXRF) 6	
1.2.2. Priprema uzorka za TXRF analizu .....	7
1.2.3. Princip TXRF analize .....	9
1.3. PREDNOSTI i NEDOSTACI TXRF TEHNIKE .....	10
1.3.1. Prednosti TXRF tehnike .....	10
1.3.2. Nedostaci TXRF tehnike .....	10
1.4. USPOREDBA TXRF-a S DRUGIM ANALITIČKIM METODAMA ODREĐIVANJA METALA U BIOLOŠKIM UZORCIMA .....	11
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	15
3. MATERIJALI I METODE.....	16
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	17
4.1. BIOANALITIČKA PRIMJENA.....	17
4.1.1. MIKROTOMSKE SEKCIJE .....	18
4.1.2. STANICE .....	18
4.1.3. TKIVA.....	19
4.1.4. PUNA KRV, PLAZMA, SERUM .....	22
4.1.5. URIN .....	27
4.1.6. CEREBROSPINALNA TEKUĆINA .....	30
4.1.7. POSTELJICA (PLACENTA).....	30
4.1.8. AMNIONSKA TEKUĆINA.....	32
4.1.9. SLINA .....	32
4.1.10. SJEMENA TEKUĆINA .....	33
4.1.11. BILJNI MATERIJALI.....	35
5. ZAKLJUČAK .....	39

6. LITERATURA.....	40
7. SAŽETAK .....	45
8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTATION CARD	

## 1. UVOD

### 1.1. BIOLOŠKI UZORCI

Analitička mjerenja važna su u mnogim različitim područjima našeg svakodnevnog života, uključujući primjerice multielementnu analizu potrošačkih proizvoda u procesima kontrole kvalitete te za sigurnost ljudskog zdravlja.

Poznavanje te praćenje elementarnog sastava bioloških uzoraka kao što su primjerice uzorci ljudskih tekućina (npr. puna krv, serum, plazma, sjemena plazma i dr.) od velikog je interesa s obzirom na važnost pojedinih elemenata u različitim (pato)fiziološkim procesima kao i njihovoj ulozi u dijagnostici i prevenciji različitih poremećaja (Kasperczyk i sur., 2015; Seiler i sur., 1994). Poznato je da je razvoj nekih kroničnih bolesti kao što su ateroskleroza, razni neurološki poremećaji, autoimune bolesti, starenje i rak obično uzrokovane različitim sastavom metala (Valko i sur., 2016; Jomova i Valko, 2011; Krachler i Irgolic, 1999; Seiler i sur., 1994).

Nadalje, poznato je da ljudsko zdravlje i kvaliteta života uvelike ovise o kvalitetu hrane koja se dnevno konzumira. Hrana predstavlja glavni izvor esencijalnih, glavnih i elemenata u tragovima. Neki potencijalno otrovni elementi, opasni za ljudsko zdravlje, mogu kontaminirati hranu ulaskom u prehrambeni lanac iz okoline odnosno tijekom obrade ili skladištenja.

Različite biljne vrste imaju veliku primjenu u prehrani, napitcima, ljekovitim pripravcima i sl. Biljke putem korijena i lišća mogu primiti elemente iz okoliša (tlo, voda, zrak). Prisutna koncentracija određenih elemenata čini jedan od kriterija koje biljne vrste čine prihvatljivim za ljudsku potrošnju (Queralt i sur., 2005; Stephens i Calder, 2004). Povrće čini važan dio ljudske prehrane i konzumira se bilo kuhano i/ili sirovo. Sa zdravstvenog stajališta neki od metala prisutnih u povrću mogu biti biokemijski važni za ljudski organizam. Primjerice, metali poput Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Se i Zn pomažu u regulaciji metabolizma kod ljudi (Jolly i sur., 2013). Esencijalni elementi potrebni su za normalan razvoj biljaka, životinja i ljudi, dok unos visoke koncentracije ovih elemenata može biti i potencijalno toksičan (Fahad i sur., 2015; Vincevica-Gaile i Klavins, 2013). Elementi se mogu unijeti u ljudski organizam izravno putem konzumacije voća i povrća, te posredno putem mlijeka i mesa. Uslijed toga, poznavanje elementarnog sastava biljnog i

životinjskog tkiva od iznimne je važnosti prvenstveno u svrhu procjene sigurnosti prehrambenih namirnica (Fraga, 2005).

S obzirom na sve navedeno, možemo reći da poznavanje sadržaja elemenata u biološkim uzorcima mogu dati važne informacije u području medicine, farmacije, prehrane te kontrole okoliša (Salomone i sur., 2017).

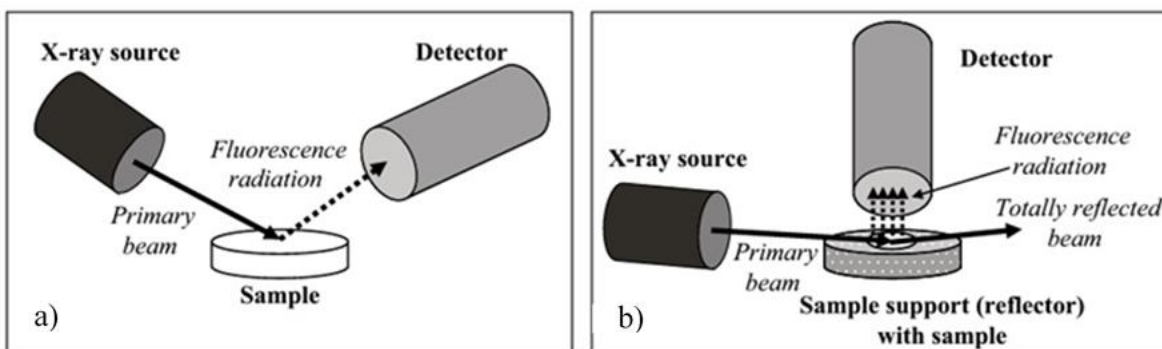
U svim slučajevima, glavni cilj analize je prikupiti potrebnu razinu informacija s dobrom razinom povjerenja kako bi se krajnjim korisnicima omogućila informiranost te po potrebi i rješavanje potencijalnih problema. Kao posljedica razumijevanja važnosti poznavanja sadržaja elemenata u biološkim uzorcima doveli su zadnjih godina do povećane potrebe za brzim i točnim analitičkim tehnikama i metodama analize. Posljednjih godina uloženi su napor da se razviju novi, kvantitativni, jeftini analitički alati u skladu s načelima zelene analitičke kemije.

S analitičke točke gledišta, kvantifikacija elemenata u biološkim uzorcima je zahtjevna i predstavlja često izazov za samog analitičara prvenstveno zbog složenosti samog uzorka, velike varijacije u koncentracijama elemenata kao i ograničene količine uzorka dostupnog za analizu naročito kad se radi o analizi ljudskih tekućina. Najčešće primjenjivane tehnike za određivanje elemenata u biološkim uzorcima su atomske spektroskopske tehnike, uključujući plamenu atomsku apsorpcijsku spektrometriju (FAAS), elektrotermalnu atomsku apsorpcijsku spektrometriju (ETAAS), emisijsku spektrometriju induktivno spregnute plazme (ICP-AES) i induktivno spregnutu plazma s masenom spektrometrijom (ICP-MS) (Heitland i Koster, 2021; Sohrabi i sur., 2019; Dudek-Adamska i sur., 2015). Danas se ICP-MS smatra najboljom tzv. „zlatnim standardom“ među ostalima tehnikama zbog svoje multielementarne sposobnosti, niske granice detekcije za većinu elemenata i visoke propusnosti uzorka. ICP-MS je tehnika u osnovi namijenjena za analizu tekućih uzoraka s niskim udjelom soli te uslijed toga biološke uzorke je potrebno na prikladan način tretirati prije same analize. U slučaju ljudskih tekućina, uzorak je potrebno razrijediti i to uz visok faktor razrjeđenja ili primijeniti neki drugi način za razaranje organske matrice (Lu i sur., 2015). Isto tako, čvrsti biološki uzorci moraju se prevesti u oblik otopine prije analize, obično putem postupka digestije što je vrlo često dugotrajan postupak, skup i često kritičan korak zbog kompleksnosti same matrice (Baroudi i sur., 2020).

Unatoč svojim analitičkim sposobnostima, niti jedna od ovih tehnika ne zadovoljava sve kriterije potrebne da bi se okarakterizirala kao multielementna, jednostavna, osjetljiva, brza i jeftina tehnika za rutinsku analizu.

## 1.2. RENDGENSKA FLUORESCENCIJSKA SPEKTROMETRIJA S TOTALNOM REFLEKSIJOM (TXRF)

Princip rendgenske fluorescencijske spektrometrijske tehnike (XRF, eng. X-ray fluorescence spectrometry) temelji se na svojstvu uzorka koji je obasjan rendgenskim zračenjem da emitira fluorescenciju koja je karakteristična za svaki element. Rendgenska fluorescencijska spektrometrija s totalnom refleksijom (eng. Total Reflection X-Ray Fluorescence Spectrometry, TXRF) je instrumentalna analitička tehnika izvedena iz klasične energetske disperzivne rendgenske fluorescencijske spektrometrije (eng. Energy Dispersive X-ray Fluorescence Spectrometry, EDXRF) (Slika 1).

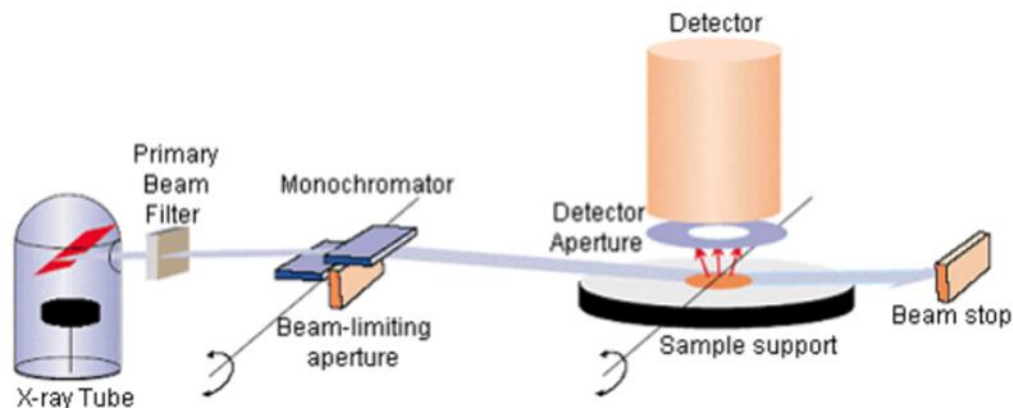


**Slika 1.** Osnovni prikaz EDXRF i TXRF analitičke tehnike (preuzeto sa [https://dugi-doc.udg.edu/bitstream/handle/10256/12905/TFG\\_Ortiz\\_Mateu\\_Arnau.pdf?sequence=1](https://dugi-doc.udg.edu/bitstream/handle/10256/12905/TFG_Ortiz_Mateu_Arnau.pdf?sequence=1), pristupljeno 18.7.2022)



TXRF je tehnika koja posljednjih godina ima sve veću primjenu za analizu različitih tipova uzoraka (Borgese i sur., 2013; Bilo i sur., 2015; Dalipi i sur., 2017). Kod TXRF mjerenje se temelji na fizikalnom fenomenu totalne refleksije X-zraka kojeg je Compton otkrio 1923. godine. Ovaj fizikalni fenomen je pokazao da se reflektivnost X-zraka s ravnog materijala izrazito povećava ispod kritičnog kuta od  $0,1^\circ$  (Klockenkämper i von Bohlen, 2015). U odnosu na EDXRF pokazuje veću osjetljivost te poboljšane granice detekcije na razini ppb ( $\mu\text{g}/\text{kg}$  i  $\mu\text{g}/\text{L}$ ).

TXRF se prvenstveno koristi za kemijske analize elemenata u vrlo malim količinama uzoraka. Uslijed toga, Međunarodna unija za čistu i primijenjenu kemiju (IUPAC) klasificirala je TXRF kao metodu mikroanalize. U tu svrhu, male količine, uglavnom otopine i suspenzije, stavljaju se na nosače uzoraka (tzv. reflektori) i osuše. Nakon toga uzorak se pobuđuje, a karakteristično zračenje elemenata bilježi detektorom kao energetske disperzivni spektar koji predstavlja broj fotona ovisno o njihovoj energiji. Emitirani fotoni stvaraju karakteristični spektar koji predstavlja identifikaciju elemenata u odgovarajućem uzorku. Sastav elemenata može se procijeniti iz relativnih intenziteta pojedinačnih karakterističnih pikova ili linija. To je osnova rendgenske fluorescentne analize (Slika 2).



**Slika 2.** Dijelovi TXRF spektrometra (preuzeto i prilagođeno s

<https://chem.wsu.edu/fittschen/total-reflection-x-ray-fluorescence/>, pristupljeno 7.3.2022.)

Pobuđivanje fluorescencije se uglavnom izvodi primarnim snopom rendgenskih zraka širokim jedan centimetar kojeg čini val koji se širi. Pretpostavlja se da je intenzitet valnog polja lokalno konstantan u vakuumu i da se eksponencijalno smanjuje u čvrstim tvarima od mikrometara milimetarske debljine. Međutim, u TXRF tehnici primarni snop pojavljuje se kao polje stajaćih valova s lokalno ovisnim oscilacijama ili kao nestalno valno polje. Atomi u tim poljima su pobuđeni do fluorescencije s vjerojatnošću koja je izravno proporcionalna intenzitetu valnog polja. Posljedično, fluorescentni signal odražava intenzitet stajaćeg ili eminentnog valnog polja u uzorku i dodatno ukazuje na elementarni sastav (Klockenkämper i sur., 2015).

Većina zračenja pobudne zrake se reflektira i, kao posljedica, smanjuje se spektralni šum. Nadalje, vrlo mali upadni kut omogućava postavljanje detektora vrlo blizu uzorka (~ 0,5 mm) za mjerenje fluorescentnog signala. Na taj način prinos fluorescencije je vrlo visok, a apsorpcija zrakom vrlo mala zbog male udaljenosti između uzorka i detektora. Iz tih razloga, moguće je postići niže granice detekcije ( $10^{-7}$  do  $10^{-12}$  g) u usporedbi s granicama detekcije koje se postižu primjenom EDXRF (Klockenkämper i von Bohlen, 2015). Kod totalne refleksije X-zraka, efekti matrice, poput apsorpcije i sekundarnog pobuđenja, mogu se zanemariti, a kvantifikacija se najčešće postiže dodatkom unutarnjeg standardnog analita, tzv. unutarnji standard (IS) (Bilo i sur., 2015). Kao IS mogu se koristiti različiti elementi. Osnovni uvjet za primjenu nekog elementa kao IS je da nije prisutan u uzorku koji se analizira (Salomone i sur., 2017). Pomoću TXRF tehnike svi elementi s atomskim brojem  $Z \geq 11$  mogu se istovremeno i detektirati i odrediti.

### **1.2.1. Kratka povijest rendgenske fluorescencijske spektrometrije s totalnom refleksijom (TXRF)**

Istovremeno s izumom poluvodičkih uređaja u silicijskoj dolini nakon 1970. godine razvijena je nova vrsta detektora rendgenskih zraka. Taj novi detektor ne samo da je mogao brojati pojedinačne fotone rendgenskih zraka, već je mogao odrediti i njihovu energiju. Takav Si (Li) detektor nazvan je “energetski disperzivnim” umjesto dosad korištenih spektrometara s “valnom duljinom”. Novi detektori bili su mali i kompaktni, nisu trebali goniometar s kristalom za analizu i mogli su prikupiti cijeli spektar odjednom u vrlo kratkom vremenu (Klockenkämper i sur., 2015).

1971. godine Yoneda i Horiuchi razvili su ingenioznu ideju korištenja totalne refleksije za pobuđivanje rendgenske fluorescencije. Predložili su analizu male količine materijala apliciranog na ravnoj, glatkoj i potpuno reflektirajućoj podlozi. Energetski disperzivni Si (Li) detektor, razvijen nedugo prije, postavljen je neposredno iznad nosača za analizu uzorka. Prvo su utvrdili uranij u morskoj vodi, željezo u krvi i rijetke zemljane materijale u geotermalnoj vodi. Teorijska osnova i eksperimentalni uvjeti naknadno su istraženi (Klockenkämper i sur., 2015; Yoneda i Horiuchi, 1971).

Broj korištenih uređaja povećao se na dvjestotinjak u cijelome svijetu te se ispostavilo da nova varijanta XRF tehnike ima mnoge prednosti u spektrokemijskoj analizi raznih materijala. Na prvoj „radionici“ u gradu Geesthachtu 1986. godine sudionici su odlučili novu metodu nazvati „rendgenska fluorescencijska spektrometrija s totalnom refleksijom“ te su predstavili njen akronim TXRF (Klockenkämper i sur., 2015).

Inkorporacija TXRF tehnike bila je spora te je i dan danas malo poznata i nedovoljno raširena u biološkim, biomedicinskim i mnogim drugim znanstvenim područjima. U slučaju TXRF tehnike glavna prepreka bila je visoka cijena prve generacije laboratorijskih instrumenata. U današnje vrijeme cijena se smanjuje zbog pojave nove generacije tehnologija kao što su rendgenski mikroizvori s visokim fluksom, polikapilarna rendgenska optika ili detektor silikonskog drifta (Silicon Drift Detektori, SSD) s velikom brzinom brojanja i visokom razlučivosti. Ti napretci omogućili su progresivno smanjenje troškova TXRF opreme (Fernandez-Ruiz, 2021; Tsuji i sur., 2004).

Danas su troškovi TXRF opreme u usporedbi s konvencionalnim instrumentima za elementne analize kao što su npr. AAS ili ICP značajno niži. Ova činjenica otvara vrata TXRF tehnici u svim

znanstvenim i industrijskim područjima gdje bi analiza tragova metala bila neophodna (Fernandez-Ruiz, 2021).

Do danas TXRF tehnologija je uspješno primijenjena za rješavanje mnogih problema u inherentno teškim materijalima i mnogim znanstvenim poljima kao što su medicina, znanost o okolišu, arheologija, elektronika, umjetnost, nanotehnologija, biologija i mnoge druge (Dalipi i sur., 2017; Shaw i sur., 2012; Fernandez-Ruiz i sur., 2009; Fernandez-Ruiz i Garcia-Heras, 2008; Fernandez-Ruiz i Bermudez, 2005; Fernandez-Ruiz i sur., 2002; Klockenkämper i Von Bohlen, 2000; Neumann i Eichinger, 1991).

Broj znanstvenih članaka vezanih uz TXRF ili njenu primjenu praktički je nepostojeći od prvog članka na tu temu Yonede i Horiuchija iz 1971. godine pa sve do 1985. godine kada su Rich i Seifert komercijalizirali prve TXRF uređaje u Njemačkoj. Od tada je nova TXRF analitička tehnologija dobivala sve više značaja u svjetskoj znanstvenoj zajednici (Fernandez-Ruiz, 2021).

### **1.2.2. Priprema uzorka za TXRF analizu**

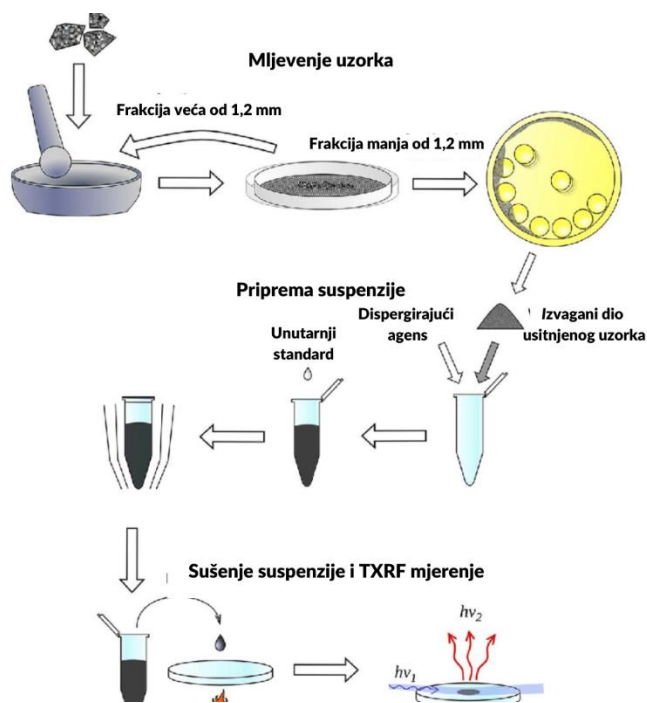
TXRF je analitička tehnika koja se može primijeniti za različite vrste uzoraka. Sama analiza zahtijeva vrlo malu količinu uzorka, malu količinu otapala te može biti i nedestruktivna metoda. Koristi se za istovremenu multielementnu analizu (do 30 elemenata), ima niske granice detekcije (ppb) kao i jednostavnu kvantifikaciju pomoću unutarnjeg standarda. Ponekad je potrebno koristiti vanjsku kalibraciju, najčešće kad postoji utjecaj matrice (Marguí i sur., 2020).

Kao i u svim analitičkim tehnikama za analizu elemenata u tragovima, priprema uzorka je od iznimne važnosti za kvantitativnu analizu te ovisi prvenstveno o vrsti uzorka i njegovom agregatnom stanju ([www.iso.org](http://www.iso.org)). Analiza se može provesti direktnom analizom uzorka kao i s minimalnom obradom (razrjeđenje, suspenzija, ekstrakcija). Tijekom pripreme uzorka, važno je izbjeći gubitke i onečišćenja koja mogu dovesti do sustavnih pogrešaka. Za samu analizu potrebna je prethodna obrada uzoraka da bi se ostvarili sljedeći ciljevi: i) stvaranje tankog filma ili sloja; ii) homogena raspodjela analita i IS; i iii) uklanjanje smetajućih elemenata.

Kod TXRF analize, mala količina ili volumen pripremljenog uzorka stavlja se na površinu nosača uzorka, potom se osuši kako bi se dobio tanki film ili sloj, a zatim se ozrači visokoenergetskim

rendgenskim zrakama kako bi se proizveli fluorescentni spektri koji obuhvaćaju veliki dinamički raspon elemenata (Savage i Haswell, 1998; Prange, 1989).

Za razliku od tekućih uzoraka koji se mogu ispitivati direktno (bez predtretmana) ili s minimalnom obradom, čvrsti uzorci se najčešće pripremaju ili u obliku suspenzije ili prethodnom digestijom s kiselinom (mokra digestija) (Salomone i sur., 2017; De La Calle i sur., 2013). Čvrsti uzorak se prvo usitni kako bi se dobio fini prah. Dobiveni praškasti uzorak (5–100 mg) suspendira se u vodi, u razrijeđenoj dušičnoj kiselini ili nekom drugom odgovarajućem otapalu te se doda unutarnji standard. Miješanjem pomoću vortex mješalice ili ultrazvučne kupelji osigurava se homogena i stabilna suspenzija.



**Slika 3.** Priprema uzorka u obliku suspenzije za TXRF analizu (preuzeto i prilagođeno s [https://www.researchgate.net/figure/Sample-pretreatment-and-TXRF-measurement-procedures\\_fig1\\_320820248](https://www.researchgate.net/figure/Sample-pretreatment-and-TXRF-measurement-procedures_fig1_320820248), pristupljeno 21.4.2022.)

Nakon prethodne obrade, mala količina uzorka (5 - 50  $\mu$ L) treba se staviti na očišćeni nosač uzorka, osušiti na zraku, grijaćoj ploči, pomoću infracrvene lampe (IR) ili pod vakumom te nakon toga analizirati (Slika 2).

Uzorak mora biti nanešen kao vrlo tanki film inače može doći do oštećenja detektora i pogrešaka u samoj analizi. Nosači uzoraka su diskovi najčešće promjera 30 mm i debljine 3 mm. Mogu biti od kvarcnog stakla, staklenog ugljika, safirnog i akrilnog stakla, a sam odabir nosača ovisi o ispitanom uzorku. Nosači uzoraka ne smiju sadržavati nečistoće, te se njihova čistoća ispituje uvijek neposredno prije samog stavljanja uzorka i mjerenja. Nadalje, materijal nosača ne smije fluorescirati i treba biti velike reflektivnosti (Klockenkämper i sur., 2015; Schwenke i sur., 1993; Schwenke i sur., 1989).

U analizi bioloških uzoraka, budući da su ti tipovi uzoraka obično dostupni u vrlo malim količinama, mikroanalitička sposobnost TXRF daje ovoj tehnici prednost u odnosu na ostale (Fernández Ruiz, 2021).

### **1.2.3. Princip TXRF analize**

TXRF tehnika koristi se uglavnom za mikroanalize i analize elemenata u tragovima. U tu svrhu, male količine uzoraka, uglavnom otopina ili suspenzija, stavljaju se na optičke plohe (npr. kvarcno staklo) koje služe kao nosač uzorka. Nakon isparavanja, ostatak se pobuđuje do fluorescencije pod fiksnim malim upadnim kutom, a karakteristično zračenje se bilježi pomoću Si (Li), ili odnedavno detektorom Si- drift, kao energetske disperzivni spektar. Visoka reflektivnost nosača uzorka gotovo eliminira spektralnu pozadinu nosača te snižava granice detekcije sa  $10^{-7}$  na  $10^{-12}$  g.

Kvantifikacija se može provesti nakon dodavanja elementa koji služi kao unutarnji standard. Za analizu jednog elementa, kao standard može se koristiti sami analit. Za višeelementne analize, bilo koji element koji nije prisutan u uzorku može se odabrati kao standard prema kojem će se odrediti svi ostali elementi (Klockenkämper i sur., 2015).

### **1.3. PREDNOSTI i NEDOSTACI TXRF TEHNIKE**

#### **1.3.1. Prednosti TXRF tehnike**

U usporedbi s ostalim tehnikama koje se koriste za određivanje elemenata TXRF tehnika nudi nekoliko prednosti kao što su: i) učinkovito pobuđivanje uzorka kako primarnim tako i reflektiranim snopom; ii) multielementna analiza omogućuje istovremeno otkrivanje gotovo svih elemenata prisutnih u uzorku; iii) direktna analiza ili jednostavna priprema uzorka; iv) koristi vrlo male količine uzorka za analizu (nekoliko  $\mu\text{L}$  ili ng) (Salomone i sur., 2017; Zarkadas i sur., 2001). Nadalje, glavne prednosti ove metodologije su potrošnja malih količina reagensa i niski operativni troškovi budući da korišteni TXRF sustav za rad ne zahtijeva rashladni medij ni plin što je uveliko povećalo popularnost TXRF-a.

Brojni radovi su pokazali da je TXRF tehnika itekako prikladna za rutinsku analizu ljudskog biološkog materijala (npr. seruma, urina, sline i kose) budući da dopušta istovremenu analizu mnogih elemenata u jednom mjerenju na vrlo malom uzorku, a u nekim slučajevima moguće je i direktno mjerenje (Salomone i sur., 2017; Cleto i sur., 2016; Majewska i sur., 2016; Yadav i sur., 2014).

#### **1.3.2. Nedostaci TXRF tehnike**

TXRF kao i druge analitičke tehnike ima svoja ograničenja. Glavni nedostatak je mala osjetljivost za elemente s niskim atomskim brojem kao i prijelazne elemente. U tom slučaju, korištenje sinkrotronskog svjetla kao izvora zračenja može se značajno poboljšati granica detekcije, čineći mogućim detektiranje količina u redoslijedu fentograma (Salomone i sur., 2017). Ovisno o primijenjenom detektoru može se javiti povremeno loša razlučivost kao i preklapanje pikova u nekim slučajevima.

#### **1.4. USPOREDBA TXRF-a S DRUGIM ANALITIČKIM METODAMA ODREĐIVANJA METALA U BIOLOŠKIM UZORCIMA**

Odabir analitičke tehnike za elementnu analizu ovisi o željenim značajkama kao što su niske granice detekcije, mogućnost analize više elemenata, širok dinamički raspon, dobra preciznost i točnost, jednostavna priprema uzoraka kao i niska cijena analize.

Iako TXRF ispunjava sve navedene značajke međunarodna organizacija za normizaciju još ju nije standardizirala (ISO), pa se analitički rezultati dobiveni ovom tehnikom još uvijek moraju uspoređivati s onima dobivenim referentnim tehnikama primjerice s GFAAS, FAAS, ICP-AES, ICP-MS i dr.

Atomske spektrometrijske tehnike vrlo su osjetljive i mogu biti korištene za mjerenje ukupnog sadržaja elemenata u uzorku, no često na točnost tih tehnika može utjecati matrica uzorka.

Određivanje metala u tragovima obično se provodi s ICP-AES, ICP-MS, ET-AAS i FAAS tehnikama. Međutim, matrica mnogih uzoraka (bioloških, kliničkih, ekoloških, itd.) je složena i sastoji se od velikih količina topljivih čvrstih tvari i velikih količina anorganskih spojeva kao što su soli Ca, K, Na, Mg, Cl, P, S i dr. Izravna analiza ovakvih uzoraka stvara mnoge poteškoće u unosu uzorka, nespektralne i spektralne interferencije, stoga se uzorci prije analize moraju mineralizirati kako bi se uništila organska tvar ili barem razrijediti kako bi se smanjio sadržaj popratnih tvari (Bulska i Ruszczyńska, 2017).

FAAS je jedna od najraširenijih tehnika određivanja iona metala u tragovima zbog svoje relativne jednostavnosti i jeftine opreme. Kod ove tehnike uzorak se unosi u plamen te pomoću njega atomizira. Elektromagnetsko zračenje u UV/Vis dijelu spektra usmjereno je kroz plamen i tada ga atom djelomično apsorbira. Metodologija je za većinu elemenata dobro poznata i omogućuje korištenje FAAS tehnike za određivanje elemenata u tragovima izravno u različitim tipovima uzoraka (Bulska i Ruszczyńska, 2017; Waheed i sur., 2014; Sidique i sur., 2012; Rahman i Waheed, 2011).

FAAS se uglavnom koristi za određivanje niskih koncentracija elemenata (npr. Al, Ca, Co, Cr, As, Cd, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Zn) te može biti primijenjena bez potrebe za ranijom predkoncentracijom analita (Bulska i Ruszczyńska, 2017; Qadir i sur., 2015; Zhuravlev i sur., 2015; Zacharia i sur.,



2015; Katskov i sur., 2015; Junior i sur., 2014; Parengam i sur., 2010). Mjerenja se mogu primjeniti samo na jedan pojedinačni element (Bulska i Ruszczyńska, 2017; Burylin i sur., 2015; Suzuki i sur., 1998).

ICP-AES, također poznata kao optička emisijska spektrometrija induktivno spregnute plazme (eng. Inductively coupled plasma optical emission spectrometry, ICP-OES), pruža izvrstan spektar za određivanje elemenata u tragovima s velikom osjetljivošću zbog vrlo visokih temperatura plazme (do 8000 K) koja se koristi za atomizaciju analita prisutnog u uzorku. ICP se stvara pomoću plina Ar koji je ioniziran u elektromagnetskom polju i teče u određenom rotacijsko-simetričnom uzorku prema magnetskom polju radiofrekventne zavojnice. Stabilna plazma nastaje kao rezultat kolizije između neutralnih atoma Ar i nabijenih čestica. Kad se uzorak uvodi u plazmu, on se sudari s elektronima i nabijenim ionima te se razgrađuje na električno nabijene ione. Različite molekule se raspadaju na atome koji zatim gube elektrone i ponovno se rekombiniraju u plazmi. Pobuđeni atomi emitiraju elektromagnetsko zračenje na valnim duljinama karakterističnim za pojedini element. Intenzitet ove emisije ukazuje na koncentraciju elementa unutar uzorka i detektiran je fotomultiplikatorom ili poluvodičkim detektorom. ICP-AES ima slične granice detekcije kao FAAS tehnika, može detektirati više elemenata istovremeno i ima mnogo veći dinamički raspon. S druge strane, kod mjerenja s ICP-AES može doći do utjecaja više različitih interferencija i puno je skuplja tehnika od AAS.

ICP-MS se koristi za višeelementno određivanje na razini tragova i ultratragova u tekućim uzorcima s različitim sastavom matrice. Korištenjem ICP-MS tehnike uzorak se ionizira u istoj vrsti argonske plazme kao i u ICP-AES tehnici. U prvoj fazi procesa, tekući uzorak se raspršuje učinkovitim raspršivačem te ga pretvara u fini aerosol koji se zatim s argonom transportira do ICP baklje. Raspršena vodena matrica i kemijski spojevi u plazmi isparavaju, molekule se disociraju na atome, a zatim ioniziraju u pozitivno jednostruko nabijene ione. Ioni se ekstrahiraju iz Ar plazme u analizator mase. U analizatoru mase, ioni se odvajaju prema njihovom omjeru mase i naboja ili omjeru energije i naboja u masenim spektrometrima s dvostrukim fokusiranjem. Odvojene ionske zrake detektiraju se fotomnoživačem.

Za ICP-MS analizu postoji potreba za prethodnom digestijom krutih uzoraka, što je vrlo važna faza cijelog analitičkog postupka (Bulska i Ruszczyńska, 2017).

Bez obzira na vrlo visoke cijene, ICP-MS tehnika ima i mnoge prednosti: osjetljivost, niska granica detekcije, propusnost, višeelementna analiza i izotopske informacije. No ipak, kao nedostatak ove tehnike navode se i atomske i molekularne izobarične i višeelementne interferencije (Bulska i Ruszczyńska, 2017; Wojciechowski i sur., 2008; May i Wiedmeyer, 1998).

TXRF uz već navedene prednosti pred ostalim tehnikama nudi još i mogućnost analize složenih bioloških tekućih uzoraka korištenjem jednostavnijeg načina predobrade uzorka koji su više u skladu s načelima principa Zelene kemije (eng. Green Chemistry) ( Jablan i sur., 2021).

Osim navedenih važnih karakteristika TXRF sustava (istovremene višeelementne informacije, mogućnost mikroanalize i niski operativni troškovi) ova tehnika također omogućuje provođenje analize biljnih uzoraka suspenzijom od nekoliko miligrama uzorka u odgovarajućem dispergirajućem agensu. To je važno svojstvo ove metode budući da se može izbjeći korak digestije koji zahtijevaju tehnike poput FAAS i ICP-OES analize te se na taj način može znatno smanjiti potrošnja reagensa i sveukupno trajanje analize. Još jedna prednost je jednostavna kvantifikacija pomoću unutarnje standardizacije te mogućnost dobivanja brzih informacija o važnim elementima u biljnim uzorcima. Preciznost rezultata dobivenih pripremom suspenzije i TXRF analizom često je niža u usporedbi s FAAS/ ICP-OES analizom. Ipak, ovisno o konačnoj svrsi analize, TXRF može biti održiva i brza analitička alternativa najčešće korištenim metodama koje uključuju prethodnu digestiju uzorka (Marguí i sur., 2021).

**Tablica 1.** Usporedba karakteristika TXRF, AAS i ICP tehnika koje određuju optimalnost analitičke metode (preuzeto i prilagođeno prema Marguí i sur., 2021 )

<b>Svojstvo</b>	<b>TXRF</b>	<b>AAS</b>	<b>ICP</b>
<b>količina uzorka</b>	5-50 $\mu$ L	2-5 mL	2-5 mL
<b>Kalibracija</b>	unutarnji standard za sve elemente	vanjski standard za svaki element	vanjski i unutarnji standard za svaki element
<b>Priprema uzorka</b>	otopina, suspenzija, tanki film	potpuno otopljen	potpuno otopljen
<b>Multielementna analiza</b>	Da	samo sekvencijalno	Da
<b>Vrijeme mjerenja</b>	300 - 1000 s	< 10 s za svaki element	< 3 min za svaki element
<b>Utjecaj matriksa</b>	Ne	Da	Da
<b>Ograničenja</b>	Z<13 i 41<Z<45	H, C, N, O, F, P, S	H, C, N, O, F, P, S
<b>Cijena</b>	niska do srednja	srednja do visoka	visoka

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Poznavanje te praćenje elementarnog sastava bioloških uzoraka od velikog je interesa s obzirom na važnost pojedinih elemenata u različitim (pato) fiziološkim procesima u ljudskom organizmu kao i njihovoj ulozi u dijagnostici i prevenciji različitih poremećaja. Budući da se svijest i zabrinutost zbog elementarnog sastava bioloških uzoraka kao što su primjerice ljudske tekućine (krv, serum, plazma, urin i dr.), tkiva, biljke i sl. povećava iz godine u godinu elementarna analiza ovog tipa uzoraka je od velikog značaja i postoji potreba za brzim i osjetljivim analitičkim tehnikama koje se mogu primijeniti i u rutinskim analizama. Nadalje, posebna pažnja se posvećuje primjeni analitičkih tehnika i metoda koje vode brigu o načelu „zelene kemije“ prvenstveno upotreba malih količina uzorka, male količine reagensa, brz i siguran postupak. U tom smislu, TXRF postaje važan alat za kvalitativnu i kvantitativnu elementarnu analizu.

Cilj ovog diplomskog rada bio je proučiti i sistematizirati znanstvenu literaturu o mogućnosti primjene TXRF spektrometrije za određivanju metala u različitim tipovima bioloških uzoraka u svrhu procjene potencijalne rutinske primjene TXRF u kliničkim laboratorijima te u nutricionističke svrhe.

### **3. MATERIJALI I METODE**

Diplomski rad je teorijskog karaktera i u njegovoj izradi korištena je stručna literatura kao što su knjige, članci i znanstveni radovi. Članci i znanstveni radovi nađeni su na internetskim znanstvenim bazama podataka. Pretraživane su znanstvene baze podataka kao što su ScienceDirect, PubMed, Scopus, a za pretraživanje su upotrijebljene ključne riječi kao što su: TXRF, multielemental, biological samples, trace metals, biological applications, analysis, fast technique, green chemistry. Knjige su pregledane iz Knjižnice “Marko Marulić” grada Splita.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. BIOANALITIČKA PRIMJENA

Razumijevanje važnosti elemenata u tragovima za funkcioniranje ljudskog organizma, u proteklih nekoliko godina dovelo je do povećane potrebe za brzim i točnim analitičkim metodama za analizu bioloških tekućina. Analitički podaci dobiveni takvim proučavanjem pružaju vrijedne informacije u području medicine, farmacije kao i kontrole okoliša (Zarkadas i sur., 2001).

Elementi u tragovima imaju vrlo važnu biološku funkciju i utjecaj na sva živa bića. Nedostatak esencijalnih elemenata kao što su Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Se ili I može dovesti do razvoja različitih poremećaja u ljudskom organizmu. Sukladno tome, u medicinskom i kliničkom području postoji velika potreba za analitičkim informacijama o sadržaju elemenata u tragovima. Analize elemenata u tragovima provode se na različitim uzorcima koji se koriste kao monitori za cijeli organizam ili pojedine organe. Prikladni uzorci za monitoring su tjelesne tekućine kao što su krv, plazma, serum i urin te uzorci tkiva dobiveni biopsijom vitalnih organa, te kosti, kosa i nokti (Klockenkämper i sur., 2015). S druge strane, nakupljanje teških metala, prvenstveno se odnosi na zagađivače okoliša kao što su Cd, Hg ili Pb, može dovesti do simptoma toksičnosti odnosno u konačnici i do trovanja.

Biološki uzorci često se analiziraju nakon postupka digestije kako bi se uklonile interferencije i omogućio prijenos analita do mjesta ionizacije. TXRF tehnika se može u nekim slučajevima primjeniti za izravnu analizu bioloških uzoraka zbog slabih interferencija matrice i istovremene višeelementne prirode. Izravno određivanje analita zahtijeva kraće vrijeme analize, nisku reaktivnu potrošnju koja omogućuje veće uštedu energije te pojednostavljuje cijeli proces analize. S druge strane, biološki/klinički uzorci su često dostupni u minimalnim količinama. TXRF tehnika zahtjeva vrlo malu količinu uzorka za analizu što ovoj tehnici daje prednost u odnosu na druge za analizu ovog tipa uzoraka (Marco i Hernandez-Caraballo, 2004).

TXFR tehnika omogućuje višeelementnu analizu te su određene granice detekcije do 20 *ng/mL* za tjelesne tekućine i do 100 *ng/g* za uzorke tkiva. Točnost metode određena je korištenjem certificiranih referentnih materijala i utvrđena je kao zadovoljavajuća. Osim prednosti višeelementnog određivanja, istraživači su kao prednosti izdvojili i jednostavnost kvantifikacije te

potrebu male količine uzorka. Posljednja značajka posebno je važna za biopsiju te općenito u pedijatriji (Klockenkämper i sur., 2015).

U knjizi autora Klockenkämpera i Von Bohlena (1937) navedena je važnost debljine uzorka i masa suhe tvari za TXRF analizu. Kod bioloških uzoraka maksimalna debljina uzorka može biti 4  $\mu\text{m}$  dok maksimalna masa suhe tvari može biti 40  $\mu\text{g}$  (Fernandez-Ruiz, 2021; Klockenkämper i Von Bohlen, 1989).

#### **4.1.1. MIKROTOMSKE SEKCIJE**

Jedna od prvih primjena TXRF tehnike u području biomedicine bila je mogućnost izravne analize mikrotomskog presjeka biomedicinskog i biljnog tkiva kojeg su razvili Klockenkämper i sur. (1937) (Fernandez-Ruiz, 2021; Klockenkämper i Von Bohlen, 1989). Uzorci debljine oko 10  $\mu\text{m}$  i vlažne mase od oko 200  $\mu\text{g}$  pripremljeni su koristeći mikrotom za zamrzavanje. Uzorci su zatim postavljeni izravno na kvarcni reflektor te je dodano 10  $\text{ng}$  Ga kao IS. Metoda je primijenjena za namirnice biljnog i životinjskog porijekla (orašaste plodove, gljive, škampe) te za razna tkiva (jetra, ljudska pluća). Određeni sadržaj Zn, Mn, Fe, Cu, Br, As, Sr, Rb, Se i Ni, bio je u rasponu od 200 ppb do 700 ppm (Fernandez-Ruiz, 2021).

U novije vrijeme, Magalhães i sur. (2010) primijenili su ovu metodologiju za istraživanje raspodjele elemenata P, S, Cl, K, Ca, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Se, Br, Rb, Sr i Pb u normalnim i kanceroznim tkivima, konkretnije u debelom crijevu, dojci i želucu (Fernandez-Ruiz, 2021; Magalhaes i sur., 2010).

#### **4.1.2. STANICE**

Ispitivanja na stanicama uglavnom uključuje ispitivanja kulture kanceroznih stanica koje čine vrlo važan i široko korišten sustavni model u biomedicini. Za razliku od normalnih stanica, kancerozne stanice lako su održive i mogu se jednostavno kultivirati uvođenjem proučavanog kemijskog elementa u kultivirani medij. Na taj način lako se mogu pratiti životne funkcije i promjene u biokemijskom ili genetičkom profilu stanica (Szoboszlai i sur., 2008).

Kancerozne stanice prvi su TXRF tehnikom analizirali Gonzales i sur. (1999) tako što su odredili koncentracije S, Ca, Fe, Cu i Zn u pet različitih staničnih linija. Nakon odgovarajućeg koraka ispiranja, stanice su frakcionirane centrifugiranjem i potom digestirane s HNO<sub>3</sub> tijekom 24 h bez zagrijavanja. Rezultati elementarne analize odnosili su se na ukupni sadržaj proteina u stanicama, koji je određen prethodno iz zasebnog alikvota. Potrebno je naglasiti da različite analize bioloških proteina mogu dovesti do različitih rezultata ovisno o korištenom protokolu pripreme uzorka, stoga su usporedbe smislene samo unutar određene studije. Gonzalesova metoda ima prednost što za pripremu uzorka koristi postupak centrifugiranja koji vodi do frakcioniranja glavnih staničnih sastojaka, čime se olakšava lokalizacija analiziranih elemenata u unutrašnjosti stanice (Szoboszlai i sur., 2008; González i sur., 1999).

#### 4.1.3. TKIVA

Elementi u tragovima u ljudskim tkivima mogu biti esencijalni ili toksični za biokemijske procese u organizmu, što uglavnom ovisi o koncentraciji tih elemenata. Pretpostavlja se da mnogi elementi u tragovima utječu na pojedine bolesti. Pojedini se mehanizmi elemenata u tragovima, na primjer, smatraju uzročnicima karcinogeneze. Slobodni radikali, potiču stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta (reactive oxygen species, ROS) te mogu potaknuti biološki štetne procese kao što je oštećenje staničnih membrana, mutacije i oštećenje DNA. Neki elementi poput Cu i Zn mogu reagirati kao kofaktori i utjecati na aktivnost antioksidativnih enzima. Rastući tumor može akumulirati nekoliko elemenata koji djeluju kao elektroliti. Potreba rastućeg tumora za povećanom opskrbom krvlju može dovesti do nakupljanja raznih elemenata u tragovima poput Fe i K (Klockenkämper i sur., 2015). Nedostatak Se ispostavio se u nekoliko navrata kod pacijenata oboljelih od karcinoma, no ovo zapažanje nije jedino što nije nedvojbeno dokazano i može se smatrati i simptomom, ali ne i uzrokom bolesti (Klockenkämper i sur., 2015; Magalhaes i sur., 2010).

Životinjska ili ljudska tkiva mogu biti analizirana pomoću TXRF tehnike na dva načina: tkiva organa mogu se analizirati nakon pepeljenja (suha digestija) i/ili mokre digestije ili izravno rezanjem u tanke slojeve te nanošenjem uzorka direktno na TXRF nosač uzorka. Prednost prvog načina je sveobuhvatnost za gotovo sve vrste tkiva. Nedostaci bilo kojeg oblika digestije uključuju njezinu dugotrajnost, mogućnost unakrsne kontaminacije i probleme koji proizlaze iz značajnog razrjeđivanja uzoraka (Szoboszlai i sur., 2008). Uzorak se priprema na način da se uzme 100 mg



suhog uzorka koji se homogenizira pa digestira pomoću  $\text{HNO}_3$  ili smjese  $\text{HNO}_3$  i  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Szoboszlai i sur., 2008). Za male uzorke (oko 1 mg) uvedene su posebne posude za digestiju malog volumena (Szoboszlai i sur., 2008; Varga i sur., 2005). Bilo koja vrsta ljudskog tkiva mase 100-300 mg uglavnom se može uspješno digestirati u zatvorenoj mikrovalnoj opremi koristeći 2,5-5,0 mL dušične kiseline. Obično se u digestiranu otopinu dodaje unutarnji standard i maksimalno 50-struko razrjeđivanje što daje konačni volumen od 5,0 mL. Posebna priroda ispitivanog tkiva može zahtijevati izmjene ovog postupka. Drugi, izravni pristup, temelji se na presjecima tkiva izrezanim mikrotomom. Ova metoda predstavljena je u ranom radu von Bohlena i sur. (1987, 1988). Proučavano tkivo izreže se na male komade te zamrzne, a zatim se tanki dijelovi režu pomoću mikrotoma. Debljina izreznih dijelova tkiva predstavlja ključni problem analitičke preciznosti jer se problemi mogu javiti iznad debljine od 10  $\mu\text{m}$ , dok se dijelovi tanji od 5  $\mu\text{m}$  teško mjere. Prednosti ove metode su sljedeće: nema razrjeđivanja uzorka, lako se može odrediti suha masa, što omogućuje jednostavniju procjenu podataka i moguća je selektivna analiza dijela tkiva. Nedostatci metode uključuju nužnost preciznog rezanja, TXRF oprema trebala bi biti opremljena širokokutnim (100  $\text{mm}^2$ ) detektorom i monokromatorom, a homogenost uzorka kod svakog ispitivanja treba se provjeravati rotacijom držača uzorka te ponovnim mjerenjem (Szoboszlai i sur., 2008; Von Czarnowski i sur., 1997; Von Bohlen i sur., 1988; Von Bohlen i sur., 1987).. Magalhaes i sur. (2006.) koristili su ovu metodu za proučavanje distribucije elemenata u uzorcima normalnog i kanceroznog tkiva (Magalhaes i sur., 2006).

Osim jednostavnosti, ova metoda također ima prednost jer smanjuje mogućnost kontaminacije i gubitaka uzrokovanih kemijskom pripremom samog uzorka (Klockenkämper i sur., 2015; Klockenkämper i sur., 1989; Von Bohlen i sur., 1988; Von Bohlen i sur., 1987).

Do sada TXRF tehnika korištena je u analizi tkiva kao što su zubi, kosti, kosa, mozak, tkivo štitnjače, posteljica, jetra, debelo crijevo, grudi i pluća (Szoboszlai i sur., 2008; Khuder i sur., 2007; Serpa i sur., 2006; Carvalho i sur., 2004; Varga i sur., 2005; Gierat-Kucharzewska i sur., 2003; Kucharzewski i sur., 2003; Kubala-Kukus i sur., 2003; Majewska i sur., 2001; Kubala-Kukus i sur., 1999; Majewska i sur., 1997; Benninghoff i sur., 1997).

Metoda je jednostavna i brza te dopušta istovremeno otkrivanje 10-15 elemenata unutar nekoliko minuta. Carvalho i sur. (1996) primijenili su ovu tehniku za analizu tkiva grudi, debelog crijeva, rektuma, želuca, pluća, maternice i prostate kod različitih pacijenata tijekom operacija. Zdravo i

kancerozno tumorsko tkivo uzeto je od istog pojedinca tijekom operacije. Nakon reprezentativnog izrezivanja od oko  $0,1 \text{ cm}^3$  svakog tkiva, uzorci su držani odvojeni u čistom formalinu na sobnoj temperaturi nekoliko tjedana do zamrzavanja. Više uzoraka tkiva promjera oko 4-6 mm i debljine oko 5-10  $\mu\text{m}$  izrezano je mikrotomom za rezanje smrznutih uzoraka. Uzimani su susjedni, ali neuzastopni presjeci, odnosno odabran je samo svaki šesti dio, a TXRF tehnikom analizirano je otprilike pet dijelova svakog tkiva.

Svaki dio tkiva postavljen je na čisti nosač od kvarcnog stakla i sušen na sobnoj temperaturi. Nakon snimanja prvog spektra, izabran je najbolji unutarnji standard između Ga, Y i Se i dodan analiziranom dijelu. Nakon mirovanja u vremenu od 1 h, masa svakog odjeljka određena je mikrovagom s tipičnim masama od oko 100  $\mu\text{g}$ . Konačni rendgenski spektar snimljen je unutar 180 sekunda nakon sušenja na 50 °C tijekom otprilike 15 minuta. Za pobuđivanje je korištena Mo cijev podešena na 50 kV i 38 mA, a za detekciju korišten je Si (Li) detektor.

Dobivene vrijednosti koncentracije TXRF tehnikom bile su između 0,1  $\mu\text{g/g}$  i 3000  $\mu\text{g/g}$ . Pokazalo se da koncentracija određenih elemenata i njihovo ponašanje ovise o vrsti tkiva. Koncentracije P i K su bile povećane u većini kanceroznih tkiva, dok koncentracije Cu i Zn su bile povećane u kanceroznom tkivu grudi, pluća i prostate. Koncentracija Se je bila smanjena u kanceroznom tkivu debelog crijeva, ali povećana u kanceroznom tkivu grudi i pluća, dok je koncentracija Br bila značajno povećan u kanceroznom tkivu grudi, a smanjena u svim ostalim uzorcima kanceroznih tkiva. Cu i Zn pokazuju povećane razine koncentracije ne samo za tkiva već i za serum pacijenata s karcinomom (Klockenkämper i sur., 2015; Magalhaes i sur., 2008; Carvalho i sur., 1996). Posljedično, koncentracija Cu, odnosno omjer Zn/Cu s boljom preciznošću i većim značajem mogu biti koristan alat za probir za preliminarnu i brzu dijagnozu karcinoma (Marco-Parra i sur., 2001).

U drugoj studiji ispitivani su uzorci tkiva 15 pacijentica s karcinomom grudi i detektirano je osam elemenata u tragovima (P, S, K, Ca, Fe, Ni, Cu, Zn i Br). Pokazalo se da se preciznost i točnost mjerenja značajno poboljšavaju s prisutnim višim koncentracijama elemenata, međutim, relativna pouzdanost je gotovo konstantna za sve elemente prisutne u koncentracijama znatno iznad granice detekcije ( Klockenkämper i sur., 2015; Magalhaes i sur., 2008; Carvalho i sur., 1996).

#### 4.1.4. PUNA KRV, PLAZMA, SERUM

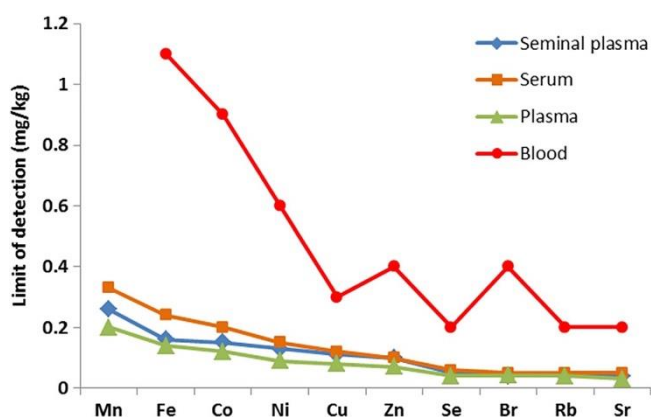
Ljudska krv sastoji se od staničnih komponenti (40%), a ostatak od oko 60% čini plazma. Stanične komponente su eritrociti, leukociti i trombociti, dok plazma sadrži 90% vode te proteine, glukozu, ureu i faktore koagulacije. Krv i plazma mogu se razdvojiti centrifugiranjem. Krvni serum nastaje ne samo ako se stanične komponente odvoje od pune krvi nego ako se odvoje i faktori koagulacije (Klockenkämper i sur., 2015).

U svrhu dijagnostike, prevencije i terapije različitih bolesti važno je imati informaciju o razinama koncentracije elemenata u tragovima primjerice Fe, Zn, Cu i Se u biološkim ljudskim tekućinama kao što su puna krv, serum ili plazma pa je to jedan od čestih ciljeva različitih medicinskih studija. Jedna od najčešće korištenih tehnika za multielementarnu analizu ovog tipa uzoraka je ICP-MS. Prije same analize s ICP-MS potrebno je provesti prethodnu obradu uzorka kao što je digestija ili razrjeđivanje (koristeći mješavinu različitih komponenata: surfaktanata, sredstava za stvaranje kompleksa, kiselina i dr.) kako bi se smanjile interferencije matrice i minimizirale rizik od začepjenja nebulizatora, injektora ili sustava za uzorkovanje samog instrumenta. Nadalje, za kvantifikaciju se mora koristiti eksterna kalibracija za dobivanje pouzdanih rezultata. U tom smislu, zanimljivo je primijetiti prednosti koje korištenje TXRF-a može doprinijeti u području analize bioloških ljudskih tekućina.

S jedne strane, TXRF analiza može se izvesti bez obrade uzorka ili pomoću jednostavnog koraka razrjeđivanja (upotrebom ultračiste vode ili razrjeđivanja s otopinom surfaktanta), ovisno o složenosti i sadržaja proteina biološke matrice. U slučaju lakih elemenata, razrjeđivanje uzorka je u većini slučajeva obavezno za dobivanje kvantitativnih rezultata što su pokazali u svojoj studiji Zarkadas i sur. koji su otkrili da je direktna TXRF analiza bioloških tekućina održiva samo za elemente s atomskim brojem većim od 23. Ovdje također treba istaknuti mogućnost jednostavnog određivanja Br pomoću TXRF, koji je inače teško izmjeriti drugim spektrometrijskim tehnikama, a mogao bi biti od interesa za neke kliničke studije.

Istraživanja su pokazala da kod pune krvi, direktna TXRF analiza nije bila moguća jer je ostatak na samom reflektoru bio predebeo te je bio i odvojen od površine kvarcnog reflektora. Uslijed toga bio je potreban korak razrjeđivanja pomoću otopine 1% w/v Triton X-100. Kao što je objavljeno u prethodnim studijama, bolje taloženje se postiže uporabom otopine od 1% w/v Triton X-100 u usporedbi s ultračistom vodom zbog neionske prirode ovog surfaktanta i postizanja homogenijeg

razrijeđenog uzorka (Margui i sur, 2019). Nadalje, pokazalo se da faktor razrjeđenja ima veliki utjecaj u području lakih elemenata (2–6 keV). Iako su analitički signali u ovom području smanjeni zbog faktora razrjeđenja, pozadina je također smanjena i omjer signala i šuma nije toliko različit za razrijeđene i nerazrijeđene biološke tekućine. Unatoč tome, faktor razrjeđenja uvelike utječe na određivanje elemenata u tragovima kao što se može vidjeti iz izračunatih granica detekcije za elemente u tragovima u ljudskim tekućinama (Slika 4).



**Slika 4.** Granice detekcije pojedinih elemenata u uzorcima sjemene tekućine, seruma, plazme i krvi određenih pomoću TXRF (preuzeto iz Margui i sur.(2021) uz dopuštenje izdavača).

Kao što je prikazano, granice detekcije za analizu uzorka krvi znatno su više u usporedbi s drugim proučavanim tekućinama uglavnom zbog većeg faktora razrjeđenja potrebnog za izvođenje TXRF analize. Ipak, u svim slučajevima, granice detekcije za neke biološki relevantne elemente u tragovima kao što su Fe, Cu i Zn bile su odgovarajuće. Također se pokazalo da se granice detekcije mogu značajno smanjiti korištenjem TXRF sustava opremljenih Mo rendgenskim cijevima umjesto W rendgenskih cijevi (Dalipi i sur, 2016).

Ovo opažanje je iznimno značajno za određivanje elemenata u tragovima koji mogu biti prisutni u vrlo niskim koncentracijama kao što je Se, a koji ima ključnu ulogu kao enzim antioksidativnog obrambenog sustava (selenoproteini).

Određene granice detekcije za potencijalno toksične metale, bile su u rasponu od 0,05-0,3 *mg/kg* (Cd) odnosno 0,07-0,2 *mg/kg* (Pb). Ove vrijednosti nisu prikladne za praćenje ovih potencijalno toksičnih metala u biološkim tekućinama i značajno su veće u usporedbi s vrijednostima dobivenim u sličnim matricama uzoraka korištenjem ICP-MS (Mattisson i sur, 2020). Stoga, unatoč činjenici da priprema uzoraka razrjeđivanjem i TXRF analiza može biti jednostavan, brz i ekonomičan pristup praćenju sadržaja elemenata u tragovima u biološkim tekućinama, sofisticiranije obrade uzoraka odnosno digestija nakon koje slijedi korak predkoncentriranja ili osjetljivije tehnike kao što je ICP-MS potrebne su za određivanje drugih potencijalno toksičnih metala koji su prisutni u nižim koncentracijama (Vrijens i sur, 2011). Mikrovalna digestija s dušičnom kiselinom je najčešći način preobrade uzoraka krvi (puna krv, krvna plazma i krvni serum) prije same elementne analize (Prange i sur., 1989; Reus i Prange, 1993). U studiji koju su proveli Prange i sur. uzorak je pripremljen na način da se 1 mL uzorka doda 8-10 g već prethodno obrađene dušične kiseline kako bi se uklonile nečistoće. Digestija je provedena u mikrovalnoj pećnici u dva koraka. Prvi korak se sastoji od zagrijavanja 15 min i 90 posto snage mikrovalne pećnice, a drugi zagrijavanja 20 min na 70 posto snage. Nakon hlađenja doda se Ga ili Co kao unutarnji standard kako bi se postigla koncentracija od 10  $\mu\text{g/mL}$  u ukupnom volumenu uzorka. Alikvot od 10  $\mu\text{L}$  tako pripremljene otopine odpipetira se na čistu podlogu od kvarcnog stakla, osuši na zraku te se koristi za određivanje koncentracije P, S, K, Ca, Fe, Cu, Zn, Se, Rb, Sr i Pb u krvi. TXRF analiza provodi se nakon pobuđivanja s Mo anodom i vremenom mjerenja od 1000 sekundi Prange i sur., 1989; Reus i Prange, 1993).

**Tablica 2.** Rezultati dobiveni za certificirani referentni materijal NIST 909 “Ljudski serum“ za različite elemente određene TXRF-om (preuzeto i prilagođeno iz Klockenkämper i sur., 2015).

Element	Certificirana vrijednost		TXRF		Devijacija <sup>α</sup> (%)	Značajna razlika
	(μ/ml)		Rezultat (μg/ml; n=3)			
<b>P</b>	-	-	153	±7	-	-
<b>S</b>	-	-	1111	±49	-	-
<b>K</b>	137,6	±4,3	133.4	±2,8	-3,1	Ne
<b>Ca</b>	120,8	±3,5	109.1	±1,8	-9,7	Da
<b>Cr</b>	0,091	±0,006	0.095	±0,014	+4,4	Ne
<b>Mn</b>	-	-	0.099	±0,017	-	-
<b>Fe</b>	1,98	±0,27	2.14	±0,021	+8,1	Ne
<b>Ni</b>	-	-	0.085	±0,021	-	-
<b>Cu</b>	1,10	±0,10	1.08	±0,02	-1,8	Ne
<b>Zn</b>	-	-	1.21	±0,04	-	-
<b>Se</b>	-	-	0.101	±0,006	-	-
<b>Sr</b>	-	-	0.051	±0,006	-	-
<b>Pb</b>	0,020	±0,003	0.025	±0,012	+25,0	Ne

α- relativna devijacija prikazana je u skladu sa certificiranim vrijednostima. Proveden je kratki test kako bi se ustanovilo postoji li statistički značajna razlika između dvije srednje vrijednosti.

Dobiveni rezultati pokazali su dobro slaganje sa standardnim referentnim vrijednostima. Jedino u slučaju Ca (relativna devijacija 10%) dobiveni rezultat s TXRF analizom je značajno odstupao od certificirane vrijednosti. Granice detekcije za teške metale su određene i iznosile su između 20-60 ng/mL.

Jedna od prvih aproksimacija analize krvi pomoću TXRF tehnike bila je analiza Pb u krvi za dvije vrste donatora: jedan zaposlenik je bio izložen kontaminaciji olovom u tvornici akumulatora, a drugi nije bio izložen kontaminaciji. Analiza je provedena dodatkom 5 mg/L Sr kao unutarnjeg standarda. Elementi identificirani u krvi bili su K, Ca, Ti, Cr, Fe, Ni, Cu, Zn, Pb, Rb i Sr. Limit detekcije postignut za Pb iznosio je 30 μg/L. Profesionalno izloženi darivatelji jasno pokazuju

veće koncentracije Pb, između 230 i 680  $\mu\text{g}/\text{L}$ , nego neizloženi pojedinci s koncentracijama nižim od 100  $\mu\text{g}/\text{L}$  (Fernandez-Ruiz, 2021; Ayala i sur., 1991). Savage i sur. (1998) također su istražili učinak kemijskih modifikatora u analizi krvne plazme pomoću TXRF tehnike. Analizirali su elemente As, Br, Cd, Ca, Cl, Co, Cu, I, Fe, Pb, Mn, Mo, Ni, Se, Sn i Zn u rasponu koncentracija od 1  $\mu\text{g}/\text{L}$  do 270  $\text{mg}/\text{L}$  (Fernandez-Ruiz, 2021; Savage i Haswell, 1998).

Jedan od najčešćih analitičkih zadataka vezanih za istraživanje anorganskih tvari u bolničkim laboratorijima je određivanje nutritivno relevantnih elemenata Fe, Cu, Zn i Se. Stonach i Mages (2009) pokazali su da bi TXRF mogao biti primijenjen u ljudskoj krvi i serumu samo razrjeđivanjem i unutarnjom standardizacijom uzoraka za rutinsku analizu nutritivno važnih elemenata (Fernandez-Ruiz, 2021; Stosnach i Mages, 2009).

Majewska i sur.(2016) nedavno su razvili zanimljivo istraživanje povezano s određivanjem razine elemenata u ljudskom serumu. Cilj istraživanja bio je odrediti koncentracijske razine nekoliko elemenata (P, S, Cl, K, Ca, Cr, Fe, Cu, Zn, Se, Br, Rb i Pb) u ljudskom serumu te definirati njihove referentne vrijednosti (Fernandez-Ruiz, 2021; Majewska i sur., 2016). U novije vrijeme, Pierzak i sur. (2020) koristili su TXRF za određivanje koncentracije Cr, Se i Br u uzorcima krvnog seruma 50 pacijenata koji su primali parenteralnu prehranu. Za potrebe usporedbe analizirani su uzorci seruma 50 pacijenata bez nutritivnih poremećaja te su oni tretirani kao kontrolna skupina. Glavni zaključak bio je da se TXRF tehnika može uspješno koristiti za praćenje koncentracije relevantnih elemenata u tragovima u ljudskom serumu kod tretmana parenteralne prehrane (Fernandez-Ruiz, 2021; Pierzak i sur., 2020).

Bounakhla (2003) je analizirao uzorke krvi Marokanske djece te je potvrđena anemija za koju se zna da je sveprisutna u tom okrugu. Ovom studijom dokazano je da više od 40% djece pati od teškog nedostatka Fe. Fe, Cu, Zn određeni su korištenjem Sr kao unutarnjeg standarda (Szoboszlai i sur., 2008).

Studija Greavesa i sur. pokazala je da krvna plazma može biti analizirana bez prethodne digestije. Krvna plazma je pomiješana sa otopinama standarda koji su sadržavali platinu kako bi se otkrio limit detekcije od 100  $\text{ng}/\text{mL}$  što je znatno više od koncentracije koja se nalazi u krvnoj plazmi zdravih osoba. Shodno navedenom uzeti su uzorci krvi nekoliko pacijenata koji su bili podvrgnuti kemoterapiji lijekovima koji sadrže platinu. Uzorci su uzeti neposredno prije primjene lijeka i 1 h nakon toga. Bio je dovoljan mali volumen od samo 0,1–1  $\text{mL}$ . Tijek koncentracije Pt ovisan o

vremenu mjeren je do 4 dana nakon prve doze i kasnije tokom višekratnih infuzija. Primijenjene su različite doze (50-300 mg) različitih lijekova koji sadrže platinu, na primjer cisplatin, oksaliplatin i karboplatin. Vremenski ovisni profili pokrivali su raspon od 0,1-4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Takva brza, laka i pouzdana analitička metoda korisna je za farmakokinetičke studije, primjerice za određivanje odgovarajućih terapijskih i subtoksičnih razina. Neophodna je za onkologe koji liječe oboljele od karcinoma kemoterapijom platinom pod rutinskom kontrolom. Uvriježene metode poput AAS sa grafitnom peći, ICP-MS i voltometrije su osjetljivije, ali zahtijevaju više vremena i skuplje su (Klockenkämper i sur., 2015; Greaves i sur., 2006).

Studija koju su proveli Jablan i sur. (2021) pokazala je da u slučaju analize seruma i plazme direktna analiza seruma i plazme bez koraka razrjeđenja daje bolje rezultate.

#### 4.1.5. URIN

Zarkadas i sur. (2001) prvi su primijenili TXRF tehniku za elementnu analizu urina. Cilj istraživanja bio je odrediti sadržaj U u uzorcima urina kod pacijenata. Metoda koristi digestiju u otvorenim posudama s predkoncentracijom (povećanje koncentracije tvari od interesa kako bi se povećala osjetljivost određivanja) dušične kiseline i urana korištenjem natrijevog dibencilditiokarbamata (NaDBDTC) kao kompleksirajućeg agensa. Primjenom razvijene metode određen je limit detekcije od 1  $\mu\text{g}/\text{L}$  s 100% iskorištenjem i odstupanjima manjim od 10% (Fernandez-Ruiz, 2021; Zarkadas i sur., 2001).

Pokazalo se da TXRF tehnika nije idealna za određivanje iona prijelaznih metala u uzorku ljudskog urina zbog visokog udjela soli u urinu ( koji se sastoji uglavnom od Na, K, Ca i Cl) koji uzrokuje smetnje i posljedično više granice detekcije od tipičnih raspona koncentracije esencijalnih elemenata poput Fe, Cu ili Zn (Szoboszlai i sur., 2008).

Nadalje, Greaves i sur. (2000) uspješno su odredili Pt u rasponu od 2-5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  iz urina pacijenata koji su primali terapiju za karcinom (lijekovi koji sadrže Pt), koristeći Co kao unutarnji standard (Szoboszlai i sur., 2008; Greaves i sur., 2000).

Uzorci urina i krvne plazme pacijenata koji su bili podvrgnuti magnetskoj rezonanciji (eng. magnetic resonance imaging, MRI) nakon primjene kontrastnog sredstva mogu se također pratiti



TXRF tehnikom. Sredstva kao što je MagneGite sadrže kompleks na bazi gadolinija s ionima  $Gd^{3+}$ , koji su paramagnetski. Unatoč toksičnosti  $Gd^{3+}$ , kompleks se prvo smatrao vrlo sigurnim i stabilnim. Telgmann i sur. (2011) stoga su razvili brzu i jednostavnu metodu za praćenje kontrastnog sredstva na bazi Gd u urinu i krvnoj plazmi. Uzeta je krv 10 bolesnika bez bubrežne bolesti ubrzo nakon primjene MagneGite (0,1 mL na 1 kg tjelesne mase) i pregleda magnetskom rezonancom. Uzorci su centrifugirani kako bi se odvojila plazma. Uzet je urin od dva druga bolesnika A i B bez bolesti bubrega u razdoblju od 15 do 20 sati nakon pregleda magnetskom rezonancom. Alikvoti od 500  $\mu L$  krvne plazme i 500  $\mu L$  urina s dodatkom Ga kao unutarnjeg standarda (10  $\mu g/mL$ ) su promiješani, 10  $\mu L$  je pipetirano na nosače od kvarcnog stakla, a uzorci su pažljivo osušeni. Naposljetku je svaka TXRF analiza provedena s Mo ekscitacijom unutar 1000 sekunda (Klockenkämper i sur., 2015; Telgmann i sur., 2011). Postignute granice detekcije bile su 100  $\mu g/L$  u urinu i 80  $\mu g/L$  u krvnoj plazmi, a granice kvantifikacije 330  $\mu g/L$  u urinu i 270  $\mu g/L$  u krvnoj plazmi. TXRF metodologija omogućuje analizu uzoraka urina uzetih od pacijenata s MRI tijekom razdoblja do 20 sati nakon primjene kontrastnih sredstava za MRI na bazi Gd. Dakle, analiza urina u kombinaciji s procjenom Gd u krvi omogućuje praćenje kinetike izlučivanja Gd iz tijela pacijenta (Fernandez-Ruiz, 2021; Telgmann i sur., 2011).

Svi uzorci urina dodatno su analizirani ICP-MS tehnikom kako bi se potvrdili podaci dobiveni TXRF mjerenjima. Izvršna korelacija ovih dviju metoda dokazuje da je primijenjena TXRF metoda pogodna za određivanje koncentracije Gd u urinu (Tablica 3). Za razliku od ICP-MS metode, kod mjerenja TXRF tehnikom nije potreban korak razrjeđivanja te je jednostavna priprema uzorka čini metodom izbora. Zbog jednostavnosti primjene, ova metoda čini se kao obećavajuća alternativa u kliničkoj primjeni. Uzorci pacijenata koji su izloženi visokom riziku zbog primjene MRI kontrastnih sredstava na bazi gadolinija primjenom TXRF tehnike mogu se analizirati u manje od pola sata nakon uzorkovanja (Telgmann i sur., 2011).

**Tablica 3.** Koncentracije Gd u krvnoj plazmi deset MRI pacijenata određene su TXRF-om, rezultati su zatim uspoređeni s ICP-MS podacima (preuzeto i prilagođeno iz Telgmann i sur., 2011).

<b>Uzorak</b>	<b><math>c_{Gd}/mg/L</math>, TXRF</b>	<b><math>c_{Gd}/mg/L</math>, ICP-MS</b>
<b>Pacijent 1</b>	89,5±0,6	96,1±3,2
<b>Pacijent 2</b>	107,8±1,1	112,2±0,8
<b>Pacijent 3</b>	77,7±0,6	76,4±0,9
<b>Pacijent 4</b>	87,4±1,8	93,4±0,7
<b>Pacijent 5</b>	144,3±1,3	155,1±1,9
<b>Pacijent 6</b>	80,4±2,6	84,5±0,5
<b>Pacijent 7</b>	93,9±1,6	93,2±0,4
<b>Pacijent 8</b>	106,5±4,7	110,5±1,2
<b>Pacijent 9</b>	120,0±1,1	125,0±1,9
<b>Pacijent 10</b>	130,5±0,9	135,5±2,1

Nadalje, Majewska i sur. (2018) primijenili su TXRF za definiranje referentnih vrijednosti koncentracija elemenata u ljudskom urinu. Za tu svrhu korišten je set standardnog referentnog materijala ljudskog urina i pravih uzoraka. Pomno su procijenjeni svi parametri koji utječu na pripremu uzorka i uvjete mjerenja, te je naposljetku definiran postupak za optimalnu pripremu urina i optimalne uvjete mjerenja. Određena količina urina (4 mL) stavi se u kivetu s HNO<sub>3</sub> i vodenu otopinu Ga(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, uzorak se mineralizira u mikrovalnoj pećnici, ohladi na sobnu temperaturu i prenese na nosač uzorka. Kao rezultat, na temelju analize 100 uzoraka urina definirane su referentne vrijednosti koncentracija nekoliko elemenata (K, Ca, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Br, Rb i Sr). Uočeno je da su više vrijednosti za Ca, Cr, Zn, Rb i Sr u urinu muškaraca u odnosu na njihove vrijednosti u urinu žena, niže vrijednosti Mn u urinu muškaraca nego u urinu žena i niže vrijednosti Zn, Rb i Sr kod starijih muškaraca i žena u odnosu na medijan (Fernandez-Ruiz, 2021; Majewska i sur., 2018).

#### 4.1.6. CEREBROSPINALNA TEKUĆINA

Cerebrospinalna tekućina je prozirna, bezbojna tekućina koja se nalazi u klijetkama mozga i leđne moždine s kapacitetom od 1600-1700 *mL*. Većina cerebrospinalne tekućine proizvodi se u koroidnom pleksusu mozga i pruža osnovnu zaštitu te neutralnu plovnost mozga (Hall, 2021).

Amiotrofična lateralna skleroza (ALS) je neurodegenerativna bolest motornih neurona uglavnom karakterizirana mišićnom atrofijom. Općenito se ova bolest javlja globalno, ali vrlo rijetko (5 : 100 000), za sada je neizlječiva, a uzrok joj je nepoznat. Ostachowicz i sur. (2004) objavili su rezultate direktnih mjerenja pomoću TXRF tehnike iz cerebrospinalne tekućine pacijenata s ALS-om. Cerebrospinalna tekućina uzeta je tijekom rutinske dijagnoze kod pacijenata koji boluju od ALS-a te je uzeta kontrolna skupina. 3  $\mu$ L uzorka nanoseno je na nosače od kvarcnog stakla, a uzorcima je dodana koncentrirana dušična kiselina kako bi se razgradila organska matrica. Pozadinska smetnja koju je uzrokovao NaCl također je uklonjena dodavanjem HNO<sub>3</sub> uzorku koji se nalazio na nosaču uzorka. Sc i Rb korišteni su kao unutarnji standardi i određeno je osam elemenata. Elementi s niskim protonskim brojem (Z) kao što su Na, Mg, Cl, K ili Ca također su kvantificirani, koristeći Sc kao unutarnji standard. Sc je bio prikladan za više Z elemente, no oni su mogli biti još preciznije izmjereni koristeći Rb (Szoboszlai i sur., 2008; Ostachowicz i sur., 2004). Ova dva spomenuta unutarnja standarda korištena su naizmjenično kako bi se povećala točnost i preciznost mjerenja (Szoboszlai i sur., 2008; Ostachowicz i sur., 2006).

Niže vrijednosti za Na, Mg i Zn te veće vrijednosti za Ca pronađene su u skupini pacijenata sa ALS-om u odnosu na kontrolnu skupinu (Klockenkämper i sur., 2015; Ostachowicz i sur., 2006).

#### 4.1.7. POSTELJICA (PLACENTA)

Svrha posteljice je poduprijeti razmjenu elemenata i ostalih tvari između majke i fetusa. Neadekvatan ili pretjeran unos nekih nutrijenata ili toksičnih elemenata tijekom trudnoće može utjecati na razvoj fetusa (Saleh i sur., 2017; Margui i sur., 2017). Stoga je razvoj analitičkih metodologija za višeelementnu analizu u uzorcima posteljice od velike važnosti. Visoke koncentracije K u trudnoći (hipotenzija majke) povezane su s niskom porođajnom težinom (Margui i sur., 2017; Steer i sur., 2004). Drugi esencijalni elementi poput Ca, Br, Fe i Zn također su važni u uzorcima ljudske posteljice. Zn se, primjerice, smatra jednim od ključnih elemenata za zdravlje novorođenčeta (Margui i sur., 2017; Custodio i sur., 2003). Br je povezan s malim ali statistički

važnim povećanjem rizika za urođene mane (Margui i sur., 2017; Chisholm i sur., 2008). Nadalje, u ovom tipu bioloških uzoraka praćen je sadržaj toksičnih elemenata poput Pb, Cd i Hg (Margui i sur., 2017; Chisholm i sur., 2008).

U studiji Margui i sur. sveukupno dvadeset uzoraka posteljica zdravih žena u dobi od 18 do 42 godine sakupljeno je iz dviju različitih regija na Jamajci, u Manchesteru i St. Andrews. Cijela posteljica temeljito je pregledana kako bi se isključila mogućnost bilo kakve abnormalnosti. Oprana je kako bi se uklonila majčina krv. Zabilježena je težina posteljice te je kirurškim priborom odsječena otprilike četvrtina ravnog dijela posteljice iz područja pupkovine. Zatim je stavljena u zatvorenu plastičnu vrećicu i pohranjena u zamrzivač na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Prije same analize uzorci su izvađeni iz zamrzivača i stavljeni u pećnicu za sušenje na  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Peć je postavljena da održava konstantnu temperaturu otprilike 96 h dok se ne dobije konstantna suha masa svake posteljice. Ovako osušeni uzorci samljeveni su u fini prah za kasniju analizu. Ispitana su dva različita postupka obrade uzorka (digestija i suspenzija) kako bi se uzorci ljudske posteljice analizirali TXRF tehnikom. Za provedbu analize u uvjetima totalne refleksije, uzorci moraju biti pripremljeni kao tanki slojevi na reflektirajućem nosaču. Zbog toga se debljina nanesenog uzorka smatra kritičnim parametrom u pogledu učinka matrice i može uvelike utjecati na određivanje elemenata (Margui i sur., 2017).

Što se tiče mikroelemenata, nisu dobivene značajne razlike između sadržaja K i Fe na proučavanim lokacijama Jamajke (RSD vrijednosti  $\sim 14\%$ ). Naprotiv, sadržaj Ca predstavlja značajnu varijabilnost između dvije proučavane regije, ali i unutar iste regije s vrijednostima RSD između 85 i 100%. Sličan je trend i za sadržaj Br u uzorcima posteljice prikupljenim u regiji Manchester gdje je njegova koncentracija varirala u rasponu od 7 do  $54\text{ mg/kg}$  i nešto je veća u usporedbi s uzorcima iz St. Andrewa. Ova činjenica vjerojatno odražava povišene razine ovog elementa u lateritskom tlu bogatom boksitom. Ostali proučavani elementi u tragovima (Zn, Rb, Cu, As, Se i Sr) raspoređeni su prilično homogeno među uzorcima ljudske posteljice i nisu nađene značajne razlike između proučavanih regija (Margui i sur., 2017). Koncentracije elemenata dobivene za studijsku grupu na Jamajci dobro se slažu sa sličnim studijama provedenim u drugim zemljama (Margui i sur., 2017; Carvalho i sur., 2001).

Korištenje izravne analize uzoraka posteljice u obliku suspenzija moglo bi biti zanimljivo kao brza i relativno jednostavna metodologija za dobivanje kvantitativnih informacija o sadržaju

mikroelemenata i elemenata u tragovima u ovim vrstama uzoraka. Ipak, za određivanje toksičnih elemenata kao što su Pb i Cd, prisutnih na razini ultratragova, potrebni su sofisticiraniji tretmani uzoraka kao i osjetljivije tehnike. Rezultati dobiveni proučavanjem ciljane skupine uzoraka ljudskih posteljica otkrili su da je većina mikroelemenata i elemenata u tragovima homogeno prisutna te nisu pronađene značajne razlike između proučavanih regija. Jedina iznimka su Ca i Br koji predstavljaju veliku varijabilnost između dvije proučavane regije, ali i unutar uzoraka iz iste regije. Potrebne su dodatne studije kako bi se otkrilo može li ova varijabilnost biti povezana s izloženošću majke i fetusa okolišu (Margui i sur., 2017).

#### **4.1.8. AMNIONSKA TEKUĆINA**

Carvalho i sur. (2001) primijenili su TXRF tehniku za proučavanje ljudske amnionske tekućine i posteljice kako bi povezali sadržaj metala s težinom novorođenčeta i starošću majke. U uzorcima amnionske tekućine pronađene su vrlo niske razine Ni i Sr i one nisu bile povezane sa starošću majke ni djetetovom težinom. Zn se nije uvelike razlikovao u analiziranim uzorcima, no bio je malo povezan s težinom djeteta. Ca i Fa bili su uvelike povezani sa starošću majke i težinom novorođenčeta (Fernandez-Ruiz, 2021; Carvalho i sur., 2001).

Razrađena su dva postupka predtretmana za amnionsku tekućinu (Szoboszlai i sur., 2008). U prvom pristupu stanični sadržaj ili suspendirane čestice odvojene su centrifugiranjem. Ovaj pristup bio je sličan predtretmanu seruma i omogućio je izravno određivanje Cl, K, Ca, Fe, Cu, Zn i Br (Szoboszlai i sur., 2008; Liendo i sur., 1999). Druga metoda uključivala je homogenizaciju uzorka i digestiju. Ispitivana je djelomična digestija: uzorci na ploči tretirani su s HNO<sub>3</sub>, a zatim kisikovom plazmom u različitim vremenskim razdobljima. Granice detekcije na ovaj su se način značajno poboljšale. Ovaj pristup korišten je za kvantificiranje metalnog sastava amnionske tekućine s obzirom na težinu djeteta i dob majke (Szoboszlai i sur., 2008; Carvalho i sur., 2001).

#### **4.1.9. SLINA**

Ljudska slina također je ispitivana TXRF tehnikom, a jedno od prvih istraživanja proveli su Abraham i sur. (2010). Cilj istraživanja bio je proučavanje elementarnog sastava ljudskih tekućina kao što su slina i gingivalna krevikularna tekućina te njihova povezanost s pušenjem. Na temelju određenih kriterija za analizu sline i gingivalne krevikularne tekućine izabrane su dvije skupine

pacijenata, pušači i nepušači. Najznačajnije razlike između pušača i nepušača otkrivene u uzorcima sline bile su za koncentracije S, K i Ca (Fernandez-Ruiz, 2021; Abraham i sur., 2010). U novije vrijeme isti tim, Abraham i sur.(2014), primijenili su TXRF spektrometriju u neizravnoj studiji korozije dentalnih implantata analizom promjena u koncentraciji elemenata u slini. Degradacija površine implantata oslobađa materijal u medij, koji, ovisno o koncentracijama, može predstavljati toksični rizik, organska oštećenja, bol, odbacivanje implantata i dr. Koncentracije metala koji se mogu otpuštati tim procesom razgradnje, kao što su Ti, Al i V u slini i gingivalnoj krevikularnoj tekućini, analizirane su TXRF-om korištenjem sinkrotronskog zračenja za procjenu procesa razgradnje (Fernandez-Ruiz, 2021; Abraham i sur., 2014).

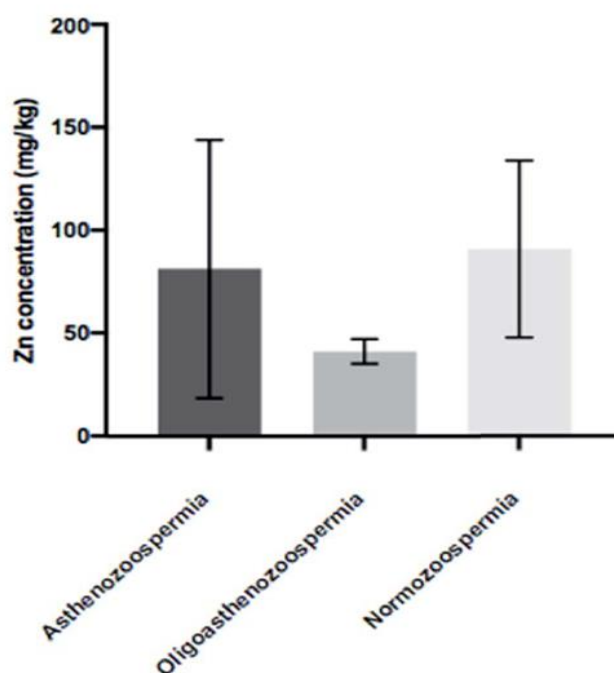
#### **4.1.10. SJEMENA TEKUĆINA**

Elementi u tragovima kao što su Zn, Cu i Se esencijalni su za normalnu spermatogenezu sisavaca i igraju ključnu ulogu u antioksidativnom obrambenom sustavu te su povezani s kvalitetom sperme i upalama (Margui i sur., 2020; Alahmar i Hum, 2019; Hashemi i sur., 2018; Dada i Bisht, 2017; Bisht i sur., 2017).

Nadalje, nedavna istraživanja otkrila su štetne učinke određenih elemenata, npr. Cu, Zn, Ca i Mg na reprodukciju kod muškaraca (Margui i sur., 2020; Kasperczyk i sur., 2015; Wong i sur., 2001; Chia i sur., 2000). Neki drugi elementi, kao što su Pb, Cd, Cr i Ni, čak i u vrlo niskim koncentracijama mogu negativno utjecati na reproduktivno zdravlje muškaraca (Margui i sur., 2020; Sun i sur., 2017; Pizent i sur., 2003; Telišman, 1995). Stoga bi određivanje sadržaja različitih elemenata u sjemenoj tekućini mogla pružiti značajne informacije o (pato)fiziološkim procesima koji se događaju u muškom reproduktivnom traktu, kao i u planovima prevencije izloženosti što ima važnu ulogu u procjeni reproduktivnog zdravlja muškaraca (Margui i sur., 2020; Kasperczyk i sur., 2015; Drabovich i sur., 2014).

Camejo i sur. (2011) prvi su upotrijebili TXRF tehniku za istraživanje ljudske sperme, točnije za određivanje koncentracije Se, Cu i Zn u sjemenoj tekućini pacijenata s vodenim kozicama (varičele) te odnos sa sjemenim parametrima. Provedeno istraživanje pokazalo je da smanjenje koncentracije Se je povezano s narušavanjem kvalitete sjemene tekućine: koncentracije spermatozoida, pokretljivosti i morfologije (Fernandez-Ruiz, 2021; Camejo i sur., 2011).

U novije vrijeme, Margui i sur. (2020) predstavili su jednostavnu i pouzdanu metodu za određivanje nekoliko elemenata u uzorcima sjemene tekućine pomoću TXRF tehnike. Primjenom najboljih analitičkih uvjeta, granica detekcije za elemente u tragovima bila je u rasponu od 0,04–0,3 mg/kg. Točnost i preciznost rezultata u većini slučajeva bila je prihvatljiva s vrijednostima iskorištenja u rasponu od 87% – 109% i relativnom standardnom devijacijom od 3% –12% (n= 5). Među ispitivanim elementima u tragovima samo se Zn mogao kvantificirati, a uočene su i neke razlike u koncentracijama Zn među ispitivanim skupinama (Fernandez-Ruiz, 2021; Margui i sur., 2020). Čini se da je sadržaj Zn u uzorcima sjemene tekućine bolesnika s dijagnozom oligoastenozoospermije niži nego u uzorcima sjemene tekućine s drugim dijagnozama (normozoospermija i astenozoospermija) (Slika 5). Međutim, potrebna su daljnja istraživanja na velikom broju uzoraka kako bi se utvrdio odnos između prisutnosti elemenata u tragovima u sjemenoj tekućini i kvalitete sjemena (broj i pokretljivost spermija) (Margui i sur., 2020).



**Slika 5.** Usporedba koncentracija Zn u uzorcima sjemene plazme s tri različite dijagnoze (astenozoospermija, oligoastenozoospermija i normozoospermija) primjenom razvijene TXRF metode, (preuzeto i prilagođeno iz Margui i sur., 2020).

#### 4.1.11. BILJNI MATERIJALI

Biljni materijali koji su proučavani TXRF tehnikom uključuju alge, različite biljne vrste, kukuruz, sijeno, lišajeve, mahovine, borove, peršin, kopar, topolu, grah, raž, pšenicu i dr. Analizirani uzorci potekli su iz sječiva, gomolja, sitnog korijenja, listova, iglica, korijenja, rozeta, sadnica, sjemenki, trnja, stabljika, lukovica, ksilemskog soka i sl. Uobičajena tehnika pripreme biljnih materijala je digestija liofiliziranih i usitnjenih komponenti s  $\text{HNO}_3$ . Ako se moraju odrediti lako hlapljivi elementi, koristi se digestija pod tlakom, u suprotnom se može provesti otvorena digestija ili čak pepeljenje hladnom plazmom (Klockenkämper i sur., 2015). Primjerice, biljni ekstrakti poput biljnog ulja analizirani su nakon jednostavnog razrjeđivanja (Klockenkämper i sur., 2015; Schmeling i sur., 1997) dok su vodeni ekstrakti poput čajnih napitaka analizirani izravno (Klockenkämper i sur., 2015; Xie i sur., 1998).

Pojedinačne komponente biljaka temeljito se čiste, usitnjavaju, suše zamrzavanjem i na kraju u očišćenom porculanskom tarioniku s tučkom usitnjavaju (Klockenkämper i sur., 2015; Günther i von Bohlen, 1991; Günther i von Bohlen, 1990). Zatim se 100 mg praškastog i eventualno prosijanog biljnog materijala prelije s 3 mL  $\text{HNO}_3$  (65%). Kašasta smjesa se digestira 3h u maloj laboratorijskoj čaši na 110 °C ili u PTFE (politetrafluoroetilen) digestijskoj posudi na oko 200 °C i 10 Mpa. Nakon dodavanja unutarnjeg standarda, razrjeđivanja na 5-20 mL i hlađenja, dobije se bistra ili blago neprozirne otopina. Posljednji dio ukazuje da razgradnja nije bila potpuna i da bi moglo biti potrebno dodatno pepeljenje. Također, digestija s  $\text{H}_2\text{SO}_4$  nije prikladna za TXRF jer bi kapljice pipetirane na nosačima teško isparile dok primjena HF može oštetiti detektor.

Navedena metoda primijenjena je na standardnom referentnom materijalu NIST 1573 “Tomato Leaves”. Nakon otvorene digestije, 20  $\mu\text{L}$  konačne otopine pipetirano je na očišćene nosače od kvarcnog stakla i osušeno na vrućoj ploči. Mjerenja su provedena komercijalnim instrumentom pri



standardnim postavkama te s vremenom mjerenja od 1000 sekundi. Rezultati za 18 elemenata pokazuju zadovoljavajuću preciznost (2-15%) i dovoljnu točnost (2-30%). Odstupanje referentnih i izmjerenih masenih udjela značajno je samo za elemente Ni, Zn, Mo i Pb. Te su vrijednosti, međutim, određene na granici detekcije od nekih  $\mu\text{g/g}$  (Klockenkämper i sur., 2015; Schmeling i sur., 1997; Reus i sur., 1993; Reus i Prange, 1993).

**Tablica 4.** TXRF rezultati određeni za referentni materijal NIST 1573 “Tomato Leaves” nakon otvorene digestije (preuzeto i prilagođeno iz Klockenkämper i sur., 2015).

Element	Jedinica	Referentna		TXRF		Devijacija (%)	Značajna razlika
		vrijednost		Rezultat <sup>α</sup> (n=3)			
<b>P</b>	mg/g	3,37	±0,22	3,44	±0,28	+2,1	Ne
<b>S</b>	mg/g	6,20	±0,40	5,99	±0,39	-3,4	Ne
<b>K</b>	mg/g	44,4	±2,4	43,8	±2,6	-1,4	Ne
<b>Ca</b>	mg/g	28,3	±2,3	23,5	±3,0	-17,0	Ne
<b>Sc</b>	mg/g	0,00017	±	=2,00 int.standard		-	-
<b>Ti</b>	μg	56,0	±39,0	79,0	±2,0	+41,0	Ne
<b>V</b>	μg	1,20	±0,20	<4,0		-	-
<b>Cr</b>	μg	4,00	±0,50	3,10	±0,40	-23,0	Ne
<b>Mn</b>	μg	224	±13	231	±10	+3,1	Ne
<b>Fe</b>	μg	580	±110	600	±80	+3,4	Ne
<b>Ni</b>	μg	1,30	±0,20	3,20	±0,40	+146,0	Da
<b>Cu</b>	μg	11,0	±2,0	12,8	±0,60	+16,4	Ne
<b>Zn</b>	μg	61,0	±4,0	70,1	±3,2	+14,9	Da
<b>As</b>	μg	0,25	±0,04	<2,0		-	-
<b>Se</b>	μg	0,054	±0,006	<1,0		-	-
<b>Rb</b>	μg	17,3	±2,5	18,0	±0,9	+4,0	Ne
<b>Sr</b>	μg	42,0	±5,0	43,6	±3,3	+3,8	Ne
<b>Zr</b>	μg	-		3,10	±0,90	-	-
<b>Mo</b>	μg	0,53	±0,09	1,10	±0,40	+108,0	Da
<b>Cd</b>	μg	2,50	±0,20	3,30	±0,90	+32,0	Ne

<b>Sb</b>	µg	0,036	±0,007	<7,0		-	-
<b>Ba</b>	µg	57,0	±9,0	43,0	±11,0	-25,0	Ne
<b>Ce</b>	µg	1,30	±0,20	<10,0		-	-
<b>Pb</b>	µg	5,90	±0,80	8,6	±1,60	+46,0	Da
<b>U</b>	µg	0,059	±0,006	<2,0		-	-

Bioakumulacija teških metala u jestivim biljkama proučavana je kao potencijalan rizik za ljudsko zdravlje. Odabrane su dvije vrste graha kao jestive mahunarke i stavljene u različite otopine olovog nitrata za klijanje u laboratoriju. TXRF tehnika primijenjena je za pregled graha nakon 12 dana. Korijen, stabljika, lišće i usjevi su sakupljeni, sušeni i usitnjeni u prah. Kao unutarnji standard dodan je Ga. Uzorci u prahu suspendirani su u vodi ili digestirani s kiselinama pomoću mikrovalova te su suspenzije ili otopine analizirane pomoću TXRF tehnike. Od toksičnih metala određeni su Cd, Pb i As. Pb je pronađeno u svim dijelovima biljke i negativno je utjecalo na sam rast biljke (Klockenkämper i sur., 2015; Bilo i sur., 2017).

TXRF tehniku također su primijenili Xie i sur. (1998) na listovima čaja. Istraživali su 39 podvrsta čaja iz raznih provincija i okruga u Kini koja je jedna od glavnih proizvođača čaja. 100 mg svakog uzorka mljeveno je u ahatnom tarioniku, napunjeno u kvarcnu cijev, tretirano smjesom od 1 mL pročišćene HNO<sub>3</sub> i 0,25 mL pročišćene HCl i digestirano pepelom plazme u tri koraka (<260 °C, <45 min, <13 mPa). Digestirane otopine ohlađene su oko 100 min, dodan je Ga kao unutarnji standard (4 µg/mL) te destilirana voda za razrjeđivanje (1 : 4). Zatim je za TXRF analizu korišteno 5 µL digestirane otopine. Najmanja koncentracija u listovima čaja utvrđena je za Se (oko 0,1 µg/g), a maksimalna koncentracija za K (20 mg/g). Topljivost Fe u pripremljenoj otopini bila je samo 2%, za Se je bila oko 15%, ali je za K, Ni i Rb dosegla srednju vrijednost veću od 60%, dok se neotopljeni dio istaložio (Klockenkämper i sur., 2015; Xie i sur., 1998).

Osim navedenih važnih karakteristika TXRF sustava (istovremene višeelementne informacije, mogućnost mikroanalize i niski operativni troškovi) ova tehnika također omogućuje provođenje analize biljnih uzoraka pripremljenih kao suspenzija. Priprema se sastoji od odvage nekoliko miligrama uzorka koji se suspendiraju u odgovarajućem disperzirajućem sredstvu. To je važno svojstvo ove metode budući da se može izbjeći korak digestije koji zahtijevaju tehnike poput FAAS, ICP-OES i ICP-MS te se na taj način može znatno smanjiti potrošnja reagensa i sveukupno

trajanje analize. Još jedna prednost je jednostavna kvantifikacija pomoću unutarnje standardizacije te mogućnost dobivanja brzih informacija i prikaz informacija o važnim elementima u biljnim uzorcima (Margui i sur, 2021).

Kao primjer prednosti i nedostataka TXRF tehnike, u studiji Margui i sur. utvrđeno je da su granica detekcije (LOD) i kvantifikacija za Mn, Fe, Cu i Zn nakon primjene Mo-TXRF metode bili za red veličine niži od vrijednosti dobivenih korištenjem TXRF metode ali sa sustavom W rendgenskih cijevi. Ovo nije veliki nedostatak za elemente prisutne pri koncentracijama višim od 30 *mg/kg* u biljnim uzorcima (tj. Mn, Fe i Zn), no on predstavlja ograničenje za pouzdano kvantificiranje elemenata prisutnih u nižim koncentracijama (10 *mg/kg* ili niže) kao što je Cu. Konačno, zanimljivo je napomenuti da su slični rezultati u smislu točnosti dobiveni proučavanjem analitičkim pristupima, no preciznost rezultata dobivenih pripremom suspenzije i TXRF analizom bila je lošija u usporedbi s FAAS/ICP-OES analizom. Ipak, ovisno o konačnoj svrsi analize, TXRF može biti održiva i brza alternativa korištenim tehnikama analize koje uključuju prethodnu digestiju uzorka (Marguí i sur., 2021).

## 5. ZAKLJUČAK

U ovom diplomskom radu obrađene su različite studije koje daju uvid o mogućnostim i nedostacima primjene analitičkih metoda temeljenih na uporabi TXRF tehnike za analizu bioloških uzoraka. Brojnim znanstvenim istraživanjima dokazane su prednostima TXRF sustava kao što su simultane, multielementne informacije, mikroanalitička sposobnost (mala količina uzoraka potrebna za analizu), mala potrošnja reagensa, ne zahtijeva rashladni medij i plin za rad te niski operativni troškovi. TXRF tehnika također omogućuje provođenje analize bioloških uzoraka koristeći jednostavnije načine pripreme uzoraka u usporedbi s drugim spektroskopskim tehnikama. Na primjer, biološke ljudske tekućine mogu se pripremiti jednostavnim razrjeđivanjem koristeći mali volumen bezopasnog otapala (tj. ultračista voda ili razrijeđena otopina surfaktanta) što je u skladu s principima zelene kemije. Pokazano je da se životinjska ili biljna tkiva mogu analizirati suspendiranjem nekoliko miligrama praškastog materijala u odgovarajuće sredstvo za raspršivanje bez potrebe za dugotrajnim postupkom digestije. Dobiveni rezultati su pokazali da koristeći ove analitičke pristupe u kombinaciji s TXRF analizom mogu se dobiti prihvatljivi rezultati za određivanje velikog broja različitih elemenata kao i elemenata u tragovima relevantnih u područje medicinske dijagnostike. Međutim, za točnije određivanje elemenata prisutnih u vrlo niskim koncentracijama, i dalje postupak digestije je neophodan kako i primjena osjetljivije analitičke tehnike kao što je ICP-MS. Također je zanimljivo spomenuti da korištenjem TXRF tehnike, u većini slučajeva, kvantifikacija se može provesti dodavanjem odgovarajućeg internog standarda čime je izbjegnuta eksterna kvantifikacija uz primjenu odgovarajućih standarda što nije slučaj kada se koriste druge atomske spektroskopske tehnike.

Provedene studije su pokazale zadovoljavajuće rezultate dobivene TXRF tehnikom, u pogledu točnosti i preciznost, u usporedbi s drugim spektroskopskim tehnikama ali na jednostavniji i više održiv način. Kao konačni zaključak može se reći da sve dokazane prednosti čine TXRF tehniku vrlo atraktivnu za analizu sadržaja elemenata u biološkim uzorcima te mogu biti dobra osnova za daljnju primjenu TXRF u kliničkim studijama, a i u rutinskim analizama u kliničkim laboratorijima.

## 6. LITERATURA

Abraham JA, Sanchez HJ, Valentinuzzi MC, Grenon MS. Influence of smoking on the elemental composition of oral fluids: a TXRF approach. *X-Ray Spectrometry*, 2010, 39, 372.

Abraham JA, Sanchez HJ, Grenon MS, Pérez CA. TXRF analysis of metals in oral fluids of patients with dental implants. *X-Ray Spectrometry*, 2014, 43, 193.

Ayala RE, Alvarez EM, Wobrauschek P. Direct determination of lead in whole human blood by total reflection X-ray fluorescence spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 1991, 46, 1429- 1432.

Baroudi F, Al Alam J, Fajloun Z, Millet M. Snail as sentinel organism for monitoring the environmental pollution; a review. *Ecological Indicators*, Elsevier, 2020, 113, 106240.

Bruker S2 PICOFOX, <https://www.portaspecs.com/s2-picofox/>, pristupljeno 5.3.2022.

Bulska E, Ruszczyńska A. Analytical Techniques for Trace Element Determination. *Physical Sciences Reviews*, 2017, 2(5), 2017-8002.

Camejo MI, Abdala L, Vivas-Acevedo G, Lozano-Hernández R, Angeli-Greaves M, Greaves ED. Selenium, copper and zinc in seminal plasma of men with varicocele, relationship with seminal parameters. *Biological trace element research*, 2011, 143(3), 1247-54.

Carvalho ML, Custodio PJ, Reus U, Prange A. Elemental analysis of human amniotic fluid and placenta by total-reflection X-ray fluorescence and energy-dispersive X-ray fluorescence: child weight and maternal age dependence. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, , 2001, 56(11), 2175-80.

Dudek-Adamska D, Lech T, Koscielniak P. Optimization and validation of an ETAAS method for the determination of nickel in postmortem material. *The Journal of Analytical Toxicology*, 2015, 39, 460.

ENFORCE-TXRF COST Action CA18130, <http://www.enforcetxrf.eu>., pristupljeno 5.3.2022.

Fahad SM, Islam AF, Ahmed M, Uddin N, Alam M, Khalik M, Hossain M, Abedin M. Determination of elemental composition of Malabar spinach, lettuce, spinach, hyacinth bean, and

cauliflower vegetables using proton induced X-ray emission technique at Savar subdistrict in Bangladesh. *BioMed Research International*, 2015, 3, 1-10.

Fernandez-Ruiz R. TXRF spectrometry in the bioanalytical sciences: A brief review. *X-Ray Spectrometry*, 2022, 51 (3), 279.

Fraga CG. Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health. *Molecular Aspects of Medicine*, 2005, 26, 235.

Greaves ED, Marcó Parra LM, Rojas A, Sajo-Bohus L. Determination of platinum levels in serum and urine samples from pediatric cancer patients by TXRF. *X-Ray Spectrometry*, 2000, 29, 349.

Hall JE, Hall ME. Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology. 14<sup>th</sup> edition. Canada, 2021, str. 780-81.

Heitland P, Koster HD. Human biomonitoring of 73 elements in blood, serum, erythrocytes and urine. *The journal of trace elements in medicine and biology*, 2021, 64.

Jablan J, Besalú E, Žarak M, Dumić J, Marguí E. Analytical potential of total reflection X-ray fluorescence spectrometry for simultaneous determination of iron, copper and zinc in human blood serum and plasma. *Talanta*, 2021, 233.

Jolly YN, Islam A, Akbar S. Transfer of metals from soil to vegetables and possible health risk assessment. *SpringerPlus*, 2013, 2, 1–8.

Jomova K, Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*, 2011, 282(2–3), 65–87.

Klockenkämper R, Von Bohlen A. Total-reflection X-ray fluorescence analysis and related methods. - Second edition. *John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey*, 2015, 100-06.

Klockenkämper R, Von Boheln A. Total-reflection X-ray fluorescence analysis and related methods. - Second edition. *John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey*, 2015, 8-17.

Klockenkämper R, Von Boheln A. Total-reflection X-ray fluorescence analysis and related methods. - Second edition. *John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey*, 2015, 317-18.

Krachler M, Irgolic KJ. The potential of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) for the simultaneous determination of trace elements in whole blood, plasma and serum. *The journal of trace elements in medicine and biology*, 1999, 13, 157–69.

Liendo JA, González AC, Castelli C, Gómez J, Jiménez J, Marcó L, Sajo-Bohus L, Greaves ED, Fletcher NR, Bauman S. Comparison between proton-induced x-ray emission (PIXE) and total reflection x-ray fluorescence (TXRF) spectrometry for the elemental analysis of human amniotic fluid. *X-Ray Spectrometry*, 1999, 28(1), 3-8.

Lu Y, Kippler M, Harari F, Grandér M, Palm B, Nordqvist H, Vahter M. Alkali dilution of blood samples for high throughput ICP-MS analysis-comparison with acid digestion. *Clinical Biochemistry*, 2015, 48, 140.

Majewska U, Łyżwa P, Łyżwa K, Banaś D, Kubala-Kukuś A, Wudarczyk-Moćko J, Stabrawa I, Braziewicz J, Pajek M, Antczak G, Borkowska B. Determination of element levels in human serum: Total reflection X-ray fluorescence applications. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 2016, 122, 56-61.

Majewska U, Łyżwa P, Kubala-Kukuś A, Banaś D, Wudarczyk-Moćko J, Stabrawa I, Gózdź S. Total reflection X-ray fluorescence medical applications: Elemental analysis of human urine. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 2018, 147, 121.

Marguá E, Dalipi R, Sangiorgi E, Bival Štefan M, Sladonja K, Rogga V, Jablan J. Determination of essential elements (Mn, Fe, Cu and Zn) in herbal teas by TXRF, FAAS and ICP-OES, *X-Ray Spectrometry*, 2022, 51(3), 204-2013.

Pierzak M, Kubala-Kukus A, Banas D, Stabrawa I, Wudarczyk-Mocko J, Gluszek S. Study of chromium, selenium and bromine concentrations in blood serum of patients with parenteral nutrition treatment using total reflection X-ray fluorescence analysis. *PLOS ONE*, 2020, 15(12); e0243492.

Prange, A, Bøddeker, H, Michaelis W. Multi-element determination of trace elements in whole blood and blood serum by TXRF. *Journal of analytical chemistry*. 1989, 335, 914–918.

Ostachowicz B, Lankosz M, Tomik B, Adamek D, Wobrauschek P, Strelci C, Kregsamer P. Analysis of some chosen elements of cerebrospinal fluid and serum in amyotrophic lateral sclerosis patients by total reflection X-ray fluorescence. *Spectrochimica Acta Part B*, 61, 2006, 1210.

Ostachowicz B, Boruchowska M, Lankosz M, Tomik B, Szczudlik A, Adamek D. Application of the TXRF method to the elemental analysis of cerebrospinal fluid in amyotrophic lateral sclerosis. *X-Ray Spectrometry*, 2004, 33, 46.

Saleh AI, Shinwari N, Mashhour A, Mohamed D, Rabah A. Heavy metals (lead, cadmium and mercury) in maternal, cord blood and placenta of women. *The International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 214, 2011, 79–101.

Salomone VN, Riera M, Muniain C. Total Reflection X-Ray Fluorescence: A Valuable Analytic Tool for Environmental and Biological Studies. *The International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 2017, 2(1).

Sample pretreatment and TXRF measurement procedures,

[https://www.researchgate.net/figure/Sample-pretreatment-and-TXRF-measurement-procedures\\_fig1\\_320820248](https://www.researchgate.net/figure/Sample-pretreatment-and-TXRF-measurement-procedures_fig1_320820248), pristupljeno 21.4.2022.

Savage I, Haswell SJ. The development of analytical methodology for simultaneous trace elemental. *The Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 1998, 12, 1119-22.

Seiler HG, Sigel A, Sigel H, editors. Handbook of metals in clinical and analytical chemistry. Dekker, New York, 1994, 753.

Sohrabi M, Kheiri Z, Gholami A, Haghighi M, Temeshkel FS, Khoonsari M, Adelani MR, Mirhosseini AH, Sohrabi M, Farimani AR, Zamani F. The Comparison of the Plasma Levels of the Lead Element in Patients with Gastrointestinal Cancers and Healthy Individuals. *The Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2019, 20(9), 2639.

Steer PJ, Little MP, Kold-Jensen T, Chapple J, Elliott P. Maternal blood pressure in pregnancy, birthweight, and perinatal mortality in first births: prospective study. *Pub Med*, 2004, 1312–1314.

Stephens WE, Calder A. Analysis of non-organic elements in plant foliage using polarised X-Ray fluorescence spectrometry. *Analytica chimica acta.*, 2004, 527, 89-96.



Stosnach H, Mages M. Analysis of nutrition-relevant trace elements in human blood and serum by means of total reflection X-ray fluorescence (TXRF) spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part B: At Spectroscopy*, 2009, 64(4), 354–356.

Total Reflection X-ray Fluorescence, <https://chem.wsu.edu/fittschen/total-reflection-x-ray-fluorescence/>, pristupljeno 7.3.2022.

Tsuji K, Matsui H, Hino M, Hideki W, Kohno H, Aranami K, Shimizu Y, Yamada T. Sample preparation for Total-Reflection X-RAY fluorescence analysis of blood sample. *Bunseki Kagaku*, 2005, 54, 749-53.

Valko M, Jomova K, Rhodes CJ, Kuča K, Musilek K. Redox-and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease. *Archives of Toxicology*, 2016, 90(1), 1–37.

Vincevica-Gaile Z, Klavins M. Concentration of elements in food: How can it reflect impact of environmental and other influencing factors? *Scientific Journal of Riga Technical University. Environmental and Climate Technologies*, 2013, 12 (1).

Zarkadas C, Karydas AG, Paradellis T. Applicability of direct total reflection X-ray fluorescence analysis in the case of human blood serum samples. *Spectrochimica Acta Part B: At Spectroscopy*, 2001, 56, 2219-28.

Queralt I, Ovejero M, Carvalho ML, Marques AF, Llabre´s JM. Quantitative Determination of Essential and Trace Element Content of Medicinal Plants and Their Infusions by XRF and ICP Techniques. *X-Ray Spectrometry*, 2005, 34, 213.

## 7. SAŽETAK

Poznavanje te praćenje elementarnog sastava bioloških uzoraka od velikog je interesa s obzirom na važnost pojedinih elemenata u različitim (pato) fiziološkim procesima u ljudskom organizmu kao i njihovoj ulozi u dijagnostici i prevenciji različitih poremećaja. Danas su dostupne različite analitičke tehnike za elementnu analizu bioloških uzoraka što je vrlo važno u kliničkoj primjeni i ranijem otkrivanju bolesti poput ateroskleroze, autoimunih bolesti, neuroloških poremećaja, starenja i raka. Posebna pažnja se posvećuje primjeni analitičkih tehnika i metoda koje vode brigu o načelu „zelene kemije“ prvenstveno upotreba malih količina uzorka, male količine reagensa, brz i siguran postupak. U tom smislu, TXRF postaje važan alat za kvalitativnu i kvantitativnu elementarnu analizu. TXRF tehnika temelji se na fizikalnom fenomenu totalne refleksije X-zraka koji pokazuje da se reflektivnost X-zraka s ravnog materijala izrazito povećava ispod kritičnog kuta od  $0,1^\circ$ . Cilj ovog diplomskog rada bio je proučiti i sistematizirati znanstvenu literaturu o mogućnosti primjene TXRF spektrometrije za određivanje metala u različitim tipovima bioloških uzoraka u svrhu procjene potencijalne rutinske primjene TXRF u kliničkim laboratorijima te u nutricionističke svrhe.

Knowing and monitoring the elemental composition of biological samples is of great interest considering the importance of individual elements in various (patho)physiological processes in the human body as well as their role in the diagnosis and prevention of various disorders. Today, available analytical techniques enable the analysis of elements in biological samples, which is very important in clinical application and early detection of diseases such as atherosclerosis, autoimmune diseases, neurological disorders, aging and cancer. Special attention is paid to the application of analytical techniques and methods that take care of the principle of "green chemistry", primarily the use of small amounts of sample, small amounts of reagents, fast and safe procedure. In this sense, TXRF becomes an important tool for qualitative and quantitative elemental analysis. The TXRF technique is based on the physical phenomenon of total reflection of X-rays, which shows that the reflectivity of X-rays from a flat material increases markedly below the critical angle of  $0.1^\circ$ . The aim of this thesis was to study and systematize the scientific literature on the possibility of applying TXRF spectrometry for the determination of metals in different types of biological samples in order to assess the potential routine application of TXRF in clinical laboratories and for nutritional purposes.

## **8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA**

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za analitičku kemiju  
Samostalni kolegij Analitička kemija 2  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### **Analitički postupci temeljeni na primjeni rendgenske fluorescencijske spektrometrije s totalnom refleksijom za multielementnu analizu bioloških uzoraka**

**Ena Lacić**

#### **SAŽETAK**

Poznavanje te praćenje elementarnog sastava bioloških uzoraka od velikog je interesa s obzirom na važnost pojedinih elemenata u različitim (pato) fiziološkim procesima u ljudskom organizmu kao i njihovoj ulozi u dijagnostici i prevenciji različitih poremećaja. Danas su dostupne različite analitičke tehnike za elementnu analizu bioloških uzoraka što je vrlo važno u kliničkoj primjeni i ranijem otkrivanju bolesti poput ateroskleroze, autoimunih bolesti, neuroloških poremećaja, starenja i raka. Posebna pažnja se posvećuje primjeni analitičkih tehnika i metoda koje vode brigu o načelu „zelene kemije“ prvenstveno upotreba malih količina uzorka, male količine reagensa, brz i siguran postupak. U tom smislu, TXRF postaje važan alat za kvalitativnu i kvantitativnu elementarnu analizu. TXRF tehnika temelji se na fizikalnom fenomenu totalne refleksije X-zraka koji pokazuje da se reflektivnost X-zraka s ravnog materijala izrazito povećava ispod kritičnog kuta od  $0,1^\circ$ . Cilj ovog diplomskog rada bio je proučiti i sistematizirati znanstvenu literaturu o mogućnosti primjene TXRF spektrometrije za određivanju metala u različitim tipovima bioloških uzoraka u svrhu procjene potencijalne rutinske primjene TXRF u kliničkim laboratorijima te u nutricionističke svrhe.

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

Rad sadrži: 46 stranice, 5 grafička prikaza, 4 tablice i 47 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: TXRF, biološki uzorci, multielementna analiza

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

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

**Dr. sc. Suzana Inić**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

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

Rad prihvaćen: Srpanj, 2022.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of Analytical Chemistry  
Independent course Analytical Chemistry 2  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### **Analytical procedures based on the application of X-ray fluorescence total reflection spectrometry for multielement analysis of biological samples**

**Ena Lacić**  
**SUMMARY**

Knowledge and monitoring of the elemental composition of biological samples is of great interest considering the importance of individual elements in various (patho)physiological processes in the human body and the role they play in the diagnosis and prevention of various disorders. Today, available analytical techniques enable the analysis of elements in biological samples, which is very important in clinical application and early detection of diseases such as atherosclerosis, autoimmune diseases, neurological disorders, aging and cancer. Particular emphasis will be placed on the use of analytical techniques and methods that are consistent with the principle of "green chemistry", i.e., primarily the use of small sample volumes, small amounts of reagents, and rapid and safe procedure. In this sense, TXRF becomes an important tool for qualitative and quantitative elemental analysis. The TXRF technique is based on the physical phenomenon of total reflection of X-rays, which shows that the X-rays reflectivity of the apartment material increases significantly below a critical angle of  $0.1^\circ$ . The aim of this work was to study and systematize the scientific literature on the possibility of using TXRF spectrometry for the determination of metals in different types of biological samples, in order to evaluate the potential routine application of TXRF in clinical laboratories and for food purposes.

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

This thesis includes: 46 pages, 5 figures, 4 tables and 47 references. Original is in Croatian language.

Keywords: TXRF, biological samples, multielement analysis

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

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

The thesis was accepted: July 2022.