

# Određivanje toksičnih i esencijalnih elemenata u kosi roditelja iz kontinentalne i priobalne Hrvatske

---

**Bošnjaković, Anja**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2019**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:183492>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-09-15**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Anja Bošnjaković

**ODREĐIVANJE TOKSIČNIH I  
ESENCIJALNIH ELEMENATA U KOSI  
RODILJA IZ KONTINENTALNE I  
PRIOBALNE HRVATSKE**

**Diplomski rad**

predložen Kemijskom odsjeku  
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu  
radi stjecanja akademskog zvanja  
magistre kemije

Zagreb, 2019.



Ovaj diplomski rad izrađen je u Jedinici za analitičku toksikologiju i mineralni metabolizam Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu pod mentorstvom dr. sc. Jasne Jurasović, dipl. ing. kem., znan. savj. u trajnom zvanju i neposrednim voditeljstvom dr. sc. Ankice Sekovanić, dipl. kem. ing. Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka je izv. prof. dr. sc. Sanda Rončević.

Diplomski rad izrađen je u okviru znanstvenoistraživačkih projekata „Izloženost metalima i njihovi učinci u graviditetu i postnatalnom razdoblju“ (MZOŠ br. 022-0222148-2135, voditelj: dr. sc. Martina Piasek, dr. med., znan. savj. u trajnom zvanju) i „Procjena svakodnevne izloženosti metalima i osobne osjetljivosti majke kao čimbenika razvojnoga podrijetla zdravlja i bolesti“ (METALORIGINS) (HRZZ IP-06-2016-1998, voditelj: dr.sc. M. Piasek, dr. med., znan. savj. u trajnom zvanju).



## Zahvale

*Srdačno se zahvaljujem Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada (IMI), u prvom redu, Jedinici za analitičku toksikologiju i mineralni metabolizam, koji mi je omogućio potrebnu opremu i materijale za izradu ovog Diplomskog rada te svim njegovim članovima na nesebičnoj pomoći u svakom trenutku.*

*Veliku zahvalnost prvenstveno dugujem svojoj mentorici dr. sc. Jasni Jurasović, dipl. ing. kemije, znan. savj. u tr. zvanju na danoj prilici da razvijam svoje vještine i sposobnosti kroz kvalitetan laboratorijski rad. Hvala Vam na korisnim i stručnim savjetima te na ukazanoj ljubaznosti i strpljenju.*

*Veliko hvala neposrednoj voditeljici dr. sc. Ankici Sekovanić, dipl. kem. ing., na pruženoj pomoći tijekom eksperimentalnog dijela rada, ugodnoj radnoj atmosferi, korisnim uputama, susretljivosti, uloženom trudu, izdvojenom vremenu, pristupačnosti, ohrabrivanju, strpljenju i ustupljenim materijalima prilikom izrade ovog Diplomskog rada. Hvala Vam na svakom stručnom savjetu i na svakom odgovoru koji su mi uvelike pomogli da napišem ovaj rad.*

*Također, posebno se zahvaljujem i svojoj mentorici s fakulteta, izv. prof. dr. sc. Sandi Rončević na prenesenom znanju, iskustvu, savjetima i prijedlozima prilikom izrade ovog Diplomskog rada. Hvala Vam što ste u svakom trenutku bili dostupni za konzultacije, pomoć i iskreni savjet.*

*Hvala i svim mojim prijateljima i prijateljicama na ohrabrivanju i podršci tijekom cijelog studija te kolegama i kolegicama s faksa što su obogatili ovaj dio moga života nezaboravnim uspomnama i učinili studiranje jednostavnijim i zabavnijim.*

*Na kraju, najveću zahvalnost i zaslugu upućujem svojim roditeljima, **HVALA VAM** na svemu što ste mi omogućili i pružili, **HVALA VAM** na neizmjernoj podršci i ljubavi, vjeri i razumijevanju. Veliko hvala i mojim sestrama i mojoj Kaći na svakoj upućenoj riječi ohrabrenja i podrške tokom cijelog studija.*

*Hvala svima od srca!*

*Anja Bošnjaković*







# Sadržaj

<b>SAŽETAK.....</b>	<b>XI</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XIII</b>
<b>§ 1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>§ 2. LITERATURNI PREGLED.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Toksični i esencijalni elementi u ljudskom zdravlju .....</b>	<b>3</b>
2.1.1. Toksični elementi i utjecaj na zdravlje .....	3
2.1.2. Esencijalni elementi u organizmu .....	5
<b>2.2. Kosa kao biološki pokazatelj izloženosti metalima .....</b>	<b>8</b>
2.2.1. Ugrađivanje elemenata u kosu .....	8
2.2.2. Uzorkovanje i priprema uzoraka kose za analizu elemenata .....	9
2.2.3. Prednosti i nedostaci kose kao biološkog pokazatelja .....	11
<b>2.3. Tehnike određivanja elemenata u kosi.....</b>	<b>12</b>
2.3.1. Spektrometrija masa uz induktivno spregnutu plazmu (ICP–MS).....	12
2.3.2. Ostale instrumentalne tehnike za elementnu analizu kose .....	16
<b>§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>17</b>
<b>3.1. Popis kemikalija .....</b>	<b>17</b>
<b>3.2. Mjerni instrumenti i oprema.....</b>	<b>19</b>
<b>3.3. Pranje laboratorijskog posuđa za analizu elemenata .....</b>	<b>20</b>
<b>3.4. Uzorkovanje uzoraka kose .....</b>	<b>20</b>
3.4.1. Uzorkovanje i priprema homogenata uzoraka kose za ispitivanje učinkovitosti pranja .....	20
3.4.2. Uzorkovanje kose roditelja.....	20
<b>3.5. Priprema uzoraka kose za analizu elemenata .....</b>	<b>22</b>
3.5.1. Razgradnja uzoraka kose za analizu elemenata.....	23
3.5.2. Priprema uzoraka kose ispitanica - roditelja.....	25
<b>3.6. Analiza elemenata u kosi .....</b>	<b>26</b>
3.6.1. Priprema standardnih otopina.....	26
3.6.1.1. Standardna otopina za ugađanje uvjeta mjerenja na ICP–MS-u.....	26
3.6.1.2. Otopina unutarnjeg standarda .....	26
3.6.1.3. Standardne otopine elemenata .....	26
3.6.2. Ugađanje uvjeta mjerenja na ICP–MS-u .....	27
<b>3.7. Statistička obrada rezultata .....</b>	<b>29</b>
<b>§ 4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>30</b>

---

<b>4.1. Validacija ICP–MS metode.....</b>	<b>30</b>
<i>4.1.1. Određivanje granica detekcije i kvantifikacije.....</i>	<i>30</i>
<i>4.1.2. Određivanje točnosti i preciznosti.....</i>	<i>31</i>
<b>4.2. Ispitivanje učinkovitosti pranja kose .....</b>	<b>34</b>
<i>4.2.1. Odabir otopina za pranje kose .....</i>	<i>34</i>
<i>4.2.2. Ispitivanje učinkovitosti otopine za pranje kose i ultrazvučnih valova .....</i>	<i>34</i>
<b>4.3. Maseni udio toksičnih i esencijalnih elemenata u kosi roditelja .....</b>	<b>43</b>
<i>4.3.1. Opće karakteristike ispitanica.....</i>	<i>43</i>
<i>4.3.2. Toksični i esencijalni elementi u kosi roditelja iz kontinentalne i priobalne Hrvatske.....</i>	<i>45</i>
<i>4.3.3. Razine toksičnih i esencijalnih elemenata u kosi: usporedba istraživanja.....</i>	<i>49</i>
<b>§ 5. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>51</b>
<b>§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....</b>	<b>53</b>
<b>§ 7. LITERATURNI IZVORI.....</b>	<b>54</b>
<b>§ 8. DODATAK.....</b>	<b>XV</b>
<b>§ 9. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>XXIII</b>





Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
**Kemijski odsjek**

Diplomski rad

## SAŽETAK

### ODREĐIVANJE TOKSIČNIH I ESENCIJALNIH ELEMENATA U KOSI RODILJA IZ KONTINENTALNE I PRIOBALNE HRVATSKE

Anja Bošnjaković

U sklopu ovog diplomskog rada razvijena je i validirana metoda određivanja esencijalnih i toksičnih elemenata As, Ca, Cd, Cu, Mg, Mn, Mo, Fe, Hg, Pb, Se i Zn u uzorcima ljudske kose metodom spektrometrije masa uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-MS). Ispitana je učinkovitost različitih načina pranja uzoraka kose (uporaba etil-acetata, metanola, etanola, acetona, dušične i klorovodične kiseline te detergenta - uz ili bez korištenja ultrazvučne kupelji) radi uklanjanja vanjske kontaminacije kose metalima za što nema prihvaćene standardne procedure. Dobiveni rezultati pokazali su da su svi postupci pranja kose za analizu elemenata zadovoljavajući, osim upotrebe dušične i klorovodične kiseline. Ispitani validacijski parametri metode (granica detekcije, granica kvantifikacije, točnost, ponovljivost unutar dana i između dana) zadovoljili su unaprijed postavljene kriterije prihvatljivosti. Primjenom razvijene metode određeni su maseni udjeli elemenata u uzorcima kose rodilja iz kontinentalne i priobalne Hrvatske (N = 167). Rezultati su pokazali značajno više masene udjele Hg, Fe, Mn, Se i Zn te niže masene udjele Ca i Mg u kosi ispitanica iz priobalne u odnosu na kontinentalnu Hrvatsku što se može povezati s većim unosom hrane morskoga podrijetla, razlikama u konzumaciji mliječnih proizvoda i unosa mineralno-vitaminskih dodataka između ispitanica te mineralnim sadržajem tla u tim područjima.

(64 stranice, 11 slika, 11 tablica, 117 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: ICP-MS, toksični i esencijalni elementi, postupci pranja kose za elementnu analizu

Mentor: dr. sc. Jasna Jurasović, znan. savj. u trajnom zvanju

Neposredni voditelj: dr. sc. Ankica Sekovanić

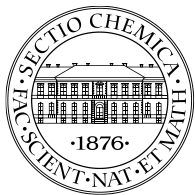
Nastavnik (imenovan od strane Kemijskog odsjeka): izv. prof. dr. sc. Sanda Rončević

Ocjenitelji:

1. izv. prof. dr. sc. Sanda Rončević
  2. prof. dr. sc. Biserka Prugovečki
  3. doc. dr. sc. Morana Dulić
- Zamjena: prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić

Datum diplomskog ispita: 18. prosinca 2019.





University of Zagreb  
Faculty of Science  
**Department of Chemistry**

Diploma Thesis

## ABSTRACT

### DETERMINATION OF TOXIC AND ESSENTIAL ELEMENTS IN HAIR OF POSTPARTUM WOMEN FROM CONTINENTAL AND COASTAL CROATIA

Anja Bošnjaković

As part of this thesis, an inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP–MS) method for determination of essential and toxic elements As, Ca, Cd, Cu, Mg, Mn, Mo, Fe, Hg, Pb, Se and Zn in human hair were developed and validated. Since there is no accepted standard procedure, the efficiency of different solutions for washing hair to remove the external contamination was tested (use of ethyl acetate, methanol, ethanol, acetone, nitric and hydrochloric acid and detergent - with or without the use of an ultrasonic bath). The results shows that all used hair washing procedures are satisfactory, except with nitric and hydrochloric acid as washing solution. The validation parameters tested in this study (limit of detection, limit of quantification, accuracy, repeatability within days and between days) were fit into the previously eligibility criteria. Mass fraction of elements in hair of postpartum women in continental and coastal Croatia (N = 167) were determinate by development method. Results showed that subjects from coastal Croatia had significant higher mass fractions of Hg, Fe, Mn, Se and Zn and lower mass fractions of Ca and Mg in hair, which may be related with higher fish intake, differences in dairy consumption and mineral-vitamin supplements intake between the subjects and the different soil mineral content in the coastal area vs. continental area.

(64 pages, 11 figures, 11 tables, 117 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: ICP-MS, toxic and essential elements, hair washing for elemental analysis

Mentor: Jasna Jurasović, Ph.D., Scientific Advisor

Assistant mentor: dr. sc. Ankica Sekovanić, Ph.D.

Supervisor (appointed by the Department of Chemistry): Dr. Sanda Rončević, Associate Professor

Reviewers:

1. Dr. Sanda Rončević, Associate Professor
  2. Dr. Biserka Prugovečki, Professor
  3. Dr. Morana Dulić, Assistant Professor
- Substitute: Dr. Iva Juranović Cindrić, Professor

Date of exam: 18<sup>th</sup> December 2019



## § 1. UVOD

Esencijalne elemente važne za fiziološke funkcije i građu tijela ljudi unose putem raznovrsne hrane, međutim istim putem dolazi i do unosa toksičnih elemenata koji se nakupljaju u organizmu i mogu imati štetne učinke za ljudsko zdravlje. Koncentracije elemenata u tjelesnim tekućinama odnosno tkivima, nezaobilazan je podatak u procjeni izloženosti toksičnim elementima, ali i za procjenu stanja esencijalnih elemenata. Periferna venska krv „tradicionalan” je biološki uzorak čija je neupitna vrijednost u tome što je u stalnom dodiru s tjelesnim tkivima. Međutim, invazivno skupljanje uzoraka krvi može biti limitirajući faktor u populacijskim studijama, osobito u osjetljivim skupinama stanovništva kao što su djeca i trudnice/rodilje. S razvojem sve osjetljivijih spektrometrijskih metoda i uređaja ljudska kosa kao etički prikladan i neinvazivan biološki uzorak postaje sve interesantnija u istraživanjima procjene moguće izloženosti metalima. U odnosu na koncentracije elemenata u krvi, serumu i urinu koje u pravilu pokazuju nedavnu izloženost, koncentracije u kosi mogu biti pokazatelji dugotrajne izloženosti pojedinca.<sup>1,2</sup> Analiza elemenata u kosi predstavlja izazov s obzirom na potrebnu prethodnu obradu i pripremu uzoraka. Drugim riječima, potrebno je uzorke kose oprati na prikladan način da bi se uklonili egzogeno vezani elementi, tj. vanjska kontaminacija (masnoća, prašina) nastala tijekom uzorkovanja i skladištenja uzoraka te kontakta sa znojem i kozmetikom, pazeći pritom da endogeni elementi koji su ugrađeni u strukturu kose i rezultat su dugotrajne izloženosti tvarima, ostanu netaknuti.

Cilj ovog diplomskog rada bio je razviti i validirati metodu određivanja elemenata u uzorcima kose tehnikom spektrometrije masa uz induktivno spregnutu plazmu (ICP–MS). U tu je svrhu odabrano ukupno 12 esencijalnih i toksičnih elemenata koji prema dosadašnjim literaturnim podacima imaju dokazan dijagnostički značaj (Hg i As) ili se prema dosadašnjim saznanjima mogu povezati s povećanom izloženosti te prehranbenim ili fiziološkim stanjem organizma (Ca, Cd, Cu, Mg, Mn, Mo, Fe, Pb, Se, Zn). Ispitana je učinkovitost različitih načina pranja uzoraka kose, za što nema prihvaćene standardne procedure, u svrhu uklanjanja vanjske kontaminacije kose metalima primjenom detergenta (Triton X-100), različitih organskih otapala (acetona, etanola, metanola), smjese otapala (etil-acetat:acetona=3:1) te kiselina (dušične i klorovodične kiseline). Također je ispitana primjena ultrazvučne obrade uzoraka kose u ultrazvučnoj kupelji na učinkovitost pranja kose za analizu elemenata. Primjenom razvijene



metode određen je maseni udio toksičnih i esencijalnih elemenata u kosi ispitanica – roditelja iz kontinentalne i priobalne Hrvatske.

Rezultati su pokazali da je ispitivana analitička metoda prikladna za namijenjenu svrhu jer svi ispitivani validacijski parametri zadovoljavaju unaprijed postavljene kriterije prihvatljivosti. Svi ispitivani postupci pranja kose, osim u slučaju primjene dušične i klorovodične kiseline kada je vidno oštećenje kose primijećeno već pri prvom koraku pranja (promjena boje, ispucana kosa), podjednako su zadovoljavajući. Određivani toksični i esencijalni elementi u kosi roditelja iz priobalne i kontinentalne Hrvatske pokazuju regionalne razlike, s većim masenim udjelima Hg, Fe, Mn, Se i Zn te nižim Ca i Mg u kosi roditelja iz priobalne u odnosu na kontinentalnu Hrvatsku.

Rezultati ovoga rada mogu poslužiti za postavljanje standardne procedure pranja kose za analizu elemenata u procjeni svakodnevne izloženosti. Po prvi puta su određivani maseni udjeli više toksičnih i esencijalnih elemenata u kosi roditelja iz različitih geografskih područja i dobiveni rezultati mogu biti korisni u postavljanju referentnih vrijednosti određivanih elemenata u kosi u hrvatskoj populaciji, kojih u literaturi nedostaje.

## § 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Toksični i esencijalni elementi u ljudskom zdravlju

#### 2.1.1. Toksični elementi i utjecaj na zdravlje

Pod pojmom toksični elementi podrazumijevamo sve one elemente koji ne zadovoljavaju uvjete esencijalnosti, odnosno nisu neophodni za ključne uloge i funkcije u tijelu, a isto tako pod određenim uvjetima mogu imati razne štetne učinke na ljudsko zdravlje.<sup>3</sup> U urbanom svijetu izloženost metalima je neizostavna budući da sve više različitih štetnih tvari dopijeva u čovjekovu okolinu bilo prirodnim ili antropogenim putem. Zagađenje zraka, voda i tla uslijed deponiranja teških metala jedan je od ozbiljnih problema današnjice. Brzim razvojem industrije, posebice u zemljama u razvoju, dolazi do ispuštanja sve većih količina metala u okoliš. Na taj način je i sam čovjek u svakodnevnom doticaju s toksičnim metalima koji dopijevaju u čovjekov organizam putem hrane, vode, udisanjem zraka i štetnog duhanskog dima, a malim udjelom i apsorpcijom kroz kožu. Agencija za toksične tvari i registar bolesti tri glavna toksična metala Cd, Pb i Hg te polumetal As klasificira u deset najtoksičnijih tvari.<sup>4</sup> Živa i Pb spadaju u neurotoksične tvari, a Cd i As osim što su neurotoksični su ujedno i karcinogeni. Kadmij dodatno pokazuje svojstva endokrine disrupcije.<sup>5,6</sup>

Arsen je toksični element rasprostranjen u okolišu u dvije alotropske modifikacije: žuti i postojaniji sivi As.<sup>7</sup> Premda može biti i esencijalan budući da ga neki mikroorganizmi koriste za proizvodnju energije, nema sigurnih dokaza o važnosti za biološki organizam. U prirodi se može naći u različitim anorganskim i organskim oblicima. Za razliku od organskih oblika As koji su zastupljeni u hrani (ribe, plodovi mora), anorganski oblici As (arsenati i arseniti) su puno toksičniji. Opća populacija je najčešće izložena As unosom hrane ga koja sadrži u obliku arsenobetaina te vodom s visokim sadržajem anorganskih oblika As iz prirodnih izvora.<sup>8-10</sup> Nakon izloženosti vrijeme poluživota As u krvotoku je nekoliko dana, dok se As deponira u tkivima s visokim sadržajem cisteina kao što su kosa i nokti. S obzirom da As ima veliki afinitet vezanja na -SH skupine na proteinima, izloženost As može dovesti do inaktivacije enzima, oštećenja funkcija jetre, karcinoma kože, pluća i unutrašnjih organa (mokraćnog mjehura, bubrega, jetre).<sup>11</sup>

Kadmij je toksični metal koji je u prirodi prisutan u malim količinama u rudama, najčešće uz Zn, Pb i Cu. Upotrebljava se u industriji i poljoprivredi, a u okoliš dospijeva upotrebom mineralnih fosfatnih gnojiva, industrijskim otpadom, spaljivanjem komunalnog otpada, kanalizacijskim muljem te kao ostatak nakon rudarenja cinkovih i olovnih ruda.<sup>12-14</sup> Tri su puta unosa Cd u organizam: apsorpcijom u želučanocrijevnom sustavu, apsorpcijom u dišnom sustavu i apsorpcijom kroz kožu. Vrijeme poluživota Cd u krvi je 1-2 mjeseca, dok u bubregu zaostaje i po 10-40 godina. Glavni izvor izloženosti Cd u nepušača je hrana, a u pušača duhanski dim. Duhanski dim je najznačajniji izvor izloženosti u općoj populaciji jer je unos Cd 2 do 3 puta veći u pušača u odnosu na nepušače. Jedna cigareta sadrži 1 do 2  $\mu\text{g}$  Cd, a koncentracija Cd u glavnoj struji cigaretnog dima može iznositi i do 6,7  $\mu\text{g}$  Cd po cigareti.<sup>13,15-</sup><sup>17</sup> Akutno otrovanje Cd javlja se nakon udisanja čestica i dimnih plinova koji sadrže Cd ili nakon unošenja Cd *per os*. Simptomi akutnog trovanja Cd su mučnina, glavobolja, pojačano izlučivanje sline, bolovi i grčevi u trbuhu te proljev. Do kroničnog otrovanja Cd uglavnom dolazi zbog neodgovarajuće zaštite radnika u industrijama ili zbog dugotrajnog peroralnog unosa Cd iz okoliša, a očituje se u oštećenjima dišnog sustava ili funkcije i strukture bubrega te prijelomima kostiju.<sup>11</sup>

Olovo je plavkasto bijeli metal koji je relativno nereaktivan, a zbog svojih dobrih mehaničkih svojstava, uključujući visoku gustoću, nisko talište i otpornost na koroziju česta je njegova primjena u industriji. Opća populacija može Pb biti izložena preko vode iz olovnih vodovodnih cijevi, boja, otpadnih akumulatora i baterija, a u prošlosti također zbog globalne uporabe olovnog benzina i primjene insekticida na bazi spojeva Pb. Nakon izloženosti Pb se brzo apsorbira u krvotok i dospijeva do mekih tkiva kao što je bubreg, koštana srž, jetra i mozak gdje mu je vrijeme poluživota 1-2 mjeseca, a deponira se u kostima i zubima gdje je postojan i više od 20 godina.<sup>18</sup> Dosadašnja istraživanja izloženosti Pb povezuju se s menstrualnim i hormonalnim promjenama, mentalnom retardacijom, smanjenim IQ, poremećajima motorike i teškoćama u učenju.<sup>18,19</sup>

Živa je sjajni, srebrno bijeli metal koji je široko rasprostranjen, a u okoliš dospijeva iz prirodnih i antropogenih izvora. U prirodne izvore ubrajamo erupcije vulkana, erozije tla i bakterijske razgradnje organskih živinih spojeva, a u antropogene dobivanje Hg iz živinih ruda, izgaranje fosilnih goriva, termoelektre, rafinerije i rudnike.<sup>20</sup> Prisutna je u elementarnom ( $\text{Hg}^0$ ), anorganskom i organskom obliku. Anorganski spojevi Hg se pojavljuju u dva oksidacijska stanja ( $\text{Hg}_2^{2+}$  i  $\text{Hg}^{2+}$ ), a od organskih spojeva Hg toksikološki najznačajniji su

metil-Hg zbog prisutnosti u hranidbenom lancu i etil-Hg koja je razgradni produkt tiomersala, konzervansa u cjepivima. Metil-Hg ulazi u hranidbeni lanac na način da nastaje metilacijom anorganske  $Hg^{2+}$  pod utjecajem mikroorganizama u vodnom okolišu. Stoga su koncentracije metil-Hg nađene u morskih sisavaca i školjkaša visoke, a zbog dobre apsorpcije tog spoja iz probavnog sustava (gotovo 100%) je opća populacija koja konzumira hranu morskog podrijetla najviše izložena metil-Hg.<sup>21</sup> Štetni učinci otrovanja Hg osobito su izraženi i teški za djecu čije su majke bile izložene Hg tijekom trudnoće. Dosadašnja istraživanja pokazuju da perinatalna izloženost djece metil-Hg može uzrokovati mentalnu retardaciju, poteškoće u govoru i pamćenju te druge ozbiljne neurološke poremećaje.<sup>22,23</sup> Stoga se trudnicama i maloj djeci ne preporučuje konzumirati one vrste riba koje sadrže najviše količine Hg.<sup>24-26</sup>

### 2.1.2. Esencijalni elementi u organizmu

Esencijalni elementi su oni elementi koji su nužni za normalno odvijanje svih fizioloških funkcija i bioloških procesa i nazivamo ih nutritivni elementi. U esencijalne elemente ubrajamo oko 20 elemenata koji sudjeluju u redukcijsko – oksidacijskim reakcijama u organizmu i/ili su sastavni dijelovi enzima i proteina.<sup>11</sup> S obzirom na njihove razine u organizmu, esencijalne elemente dijelimo na makronutrijente i mikronutrijente. U makronutrijente ubrajamo Ca, P, Mg, K, Na i Cl (kao klorid), dok mikronutrijente dijelimo na elemente u tragovima (Fe, Zn, Cu, Mn, Co, F (kao florid)) i elemente u ultratragovima (I, Se, Mo, Cr (III)).<sup>3</sup> Deficijencija ovih elemenata u organizmu može nepovoljno utjecati na ljudsko zdravlje, međutim nepovoljni učinci vidljivi su i kod previsokih koncentracija esencijalnih elemenata u organizmu zbog povećane izloženosti iz okoliša ili metaboličkih poremećaja.<sup>11,27</sup>

Kalcij je esencijalni makronutrijent koji je prijeko potreban za zdravlje ljudskog organizma i važno ga je unositi tijekom cijelog života. Omogućuje normalan rast i razvoj kostiju. Također ima značajnu funkciju u zgrušavanju krvi te prenošenju unutarstaničnih informacija. Najznačajniji je mineralni element u organizmu i čini od 1,5 – 2 % tjelesne mase. Praktički 99 % Ca je zastupljeno u kostima i zubima, a preostalih 1 % se pojavljuje u mišićima, tkivima, krvi i staničnoj i izvanstaničnoj tekućini.<sup>28</sup> Nedostatak Ca u organizmu povezuje se ponajprije s osteoporozom odnosno smanjenom koštanom masom, zatim povišenim krvnim tlakom te mišićnom distrofijom, a nedostatak Ca u trudnoći i laktaciji može utjecati na razvoj fetusa i dojenčeta.<sup>29,30</sup>

Magnezij je četvrti najzastupljeniji mineralni esencijalni element u ljudskom tijelu i važan je kofaktor u preko 300 biokemijskih reakcija u organizmu, uključujući sintezu proteina, rad mišića i živaca, kontrolu glukoze u krvi i regulaciju krvnog tlaka. Također je potreban za proizvodnju energije, sintezu DNA i RNA i antioksidansa glutationa te zajedno s Ca doprinosi pravilnom razvoju kosti. Istraživanja su pokazala da ima ulogu i u aktivnom transportu iona Ca i K kroz stanične membrane, proces koji je važan za provođenje živčanih impulsa, kontrakciju mišića i normalan srčani ritam. Unatoč tome što je manjak Mg neuobičajen, može se javiti ponajprije zbog niskog unosa Mg prehranom.<sup>19</sup> Nedostatak Mg povezuje se s nepravilnim radom srca, dijabetičnom acidozom, akutnim i kroničnim alkoholizmom, delirium tremensom, cirozom i pankreatitisom.<sup>31</sup>

Željezo je također jedan od najzastupljenijih i najznačajnijih metala u ljudskom organizmu. Uglavnom se nalazi vezan za hemoglobin, protein koji prenosi kisik iz pluća u tkiva te za mioglobin, protein koji opskrbljuje mišiće kisikom. Nužan je za rast i razvoj fetusa i male djece, zdravu kožu i zacjeljivanje rana te u stvaranju hormona inzulina, adrenalina i vezivnog tkiva.<sup>19</sup> Deficijencija Fe najčešći je oblik deficijencije esencijalnog elementa. Javlja se u svim dobnim skupinama, a kod male djece najčešće je posljedica neodgovarajućeg unosa Fe hranom. Deficijencija Fe u žena može biti rezultat gubitka krvi menstruacijom i krvarenjem tijekom porođaja. Nedostatak Fe tijekom trudnoće može rezultirati preranim porođajem, smanjenom porođajnom masom te anemijom novorođenčeta.<sup>32</sup>

Bakar je esencijalni mikroelement koji je nužan za ljudsko zdravlje i pravilno funkcioniranje različitih metaboličkih procesa. Sastavna je komponenta nekoliko enzima, kao što su citokrom-oksidaza, katalaza, peroksidaza, superoksid-dismutaza i drugi. Neophodan je za rast i stvaranje kostiju, stvaranje mijelinskih omotača u živčanom sustavu te pomaže u vezanju Fe na hemoglobin.<sup>19</sup> Deficijencija Cu kod zdravih ljudi je rijetka, ali može se pojaviti kod novorođenčadi. U ljudi su poznata dva poremećaja metabolizma Cu: Menkesova bolest koja se očituje sa sniženim vrijednostima Cu i ceruloplazmina u krvi te Wilsonova bolest pri čemu su povišene razine Cu u organizmu i dolazi do štetnih prooksidacijskih i toksičnih učinaka. Eksperimentalna istraživanja pokazala su da nedostatak Cu tijekom trudnoće može dovesti do abnormalnosti embrija i fetusa te usporavanje fetalnog rasta.<sup>33,34</sup>

Cink je vrlo bitan element u tragovima, sastavni je kofaktor u oko 300 specifičnih enzima koji sudjeluju u metabolizmu proteina, ugljikohidrata, lipida i energije. Osobito je važan za zdravu kožu i neophodan je za zdrav imunološki sustav te otpornost na infekcije. Ključna

uloga mu je u rastu i diobi stanica gdje je potreban za sintezu proteina i DNA, u inzulinskoj aktivnosti, metabolizmu jajnika i testisa te radu jetre. Manjak Zn najčešće se javlja zbog nedovoljnog unosa putem prehrane. Zabilježeno je da gotovo dvije milijarde ljudi u svijetu u razvoju ima nedostatak Zn. Deficijencija Zn rangirana je kao peti vodeći faktor rizika u uzrokovanju bolesti, posebno upale pluća kod djece, što može dovesti do visoke stope smrtnosti u nerazvijenim regijama.<sup>19</sup> Nedostatak Zn u žena može dovesti do poremećaja sinteze i lučenja folikulstimulirajućeg hormona (FSH) i luteinizirajućeg hormona (LH), poremećaja menstrualnog ciklusa, preeklampsije te pobačaja.<sup>35</sup>

Selen je esencijalni element vrlo bitan za zdravlje ljudi, sastavni je dio selenoproteina. Važan je za pravilno funkcioniranje imunološkog sustava, gdje pojačava imunološki odgovor T-limfocita. Nedostatak Se u organizmu povezuje se s bolestima srca i krvnih žila, zloćudnim bolestima i drugim poremećajima koji su posljedica povećanog stvaranja slobodnih radikala. Nedostatak Se povezuje se sa smanjenom plodnošću, povećanom učestalošću pobačaja i pojave preeklampsije, a u novorođenčadi sa smanjenim mišićnim tonusom.<sup>36,37</sup>

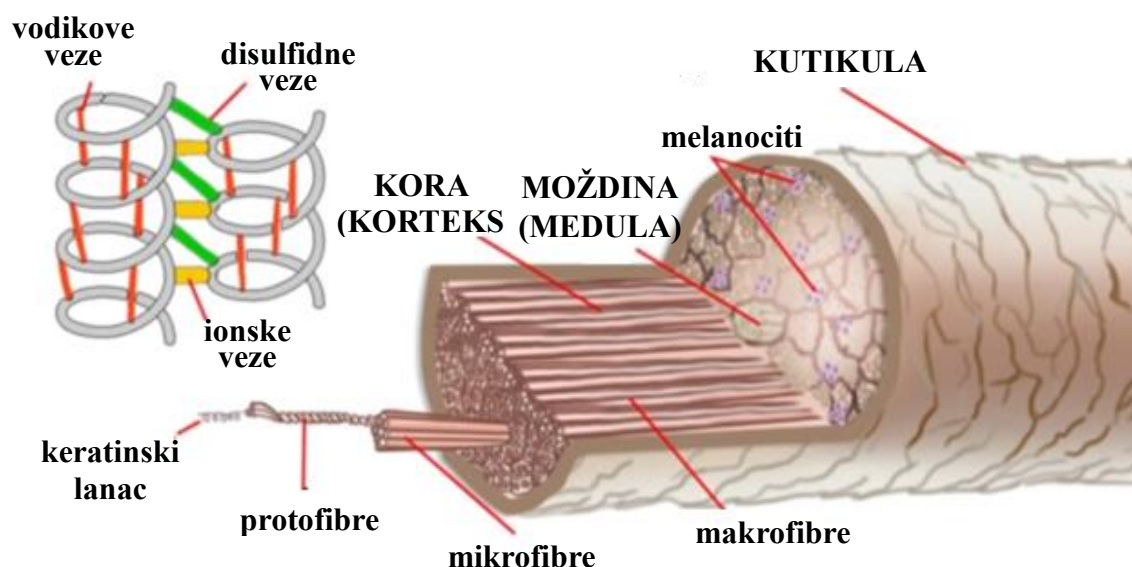
Mangan je u ljudskom tijelu prisutan u malim količinama: tijelo prosječne mase sadrži oko 12 mg mangana. Oko 43 % Mn se nalazi u koštanom sustavu, a ostatak u mekim tkivima, uključujući jetru, gušteraču, bubrege, mozak i središnji živčani sustav. Uloga Mn u organizmu je sudjelovanje u metabolizmu masti i ugljikohidrata, apsorpciji Ca i regulaciji šećera u krvi.<sup>19</sup> Izloženost visokim razinama Mn može imati dugoročne posljedice na živčani sustav, međutim toksikokinetika Mn još uvijek nije dovoljno istražena uglavnom zbog nedostatka pouzdanog biomarkera.<sup>11</sup>

Iako su našem tijelu potrebne samo malene količine Mo, on je ključna komponenta mnogih vitalnih funkcija. Kofaktor je u više enzima i važan za metabolizam purina, pirimidina, kinolina, sulfita. U krvotok ulazi apsorpcijom iz želuca i crijeva i prenosi se u jetru, bubrege i druge organe. Deficijencija molibdena je vrlo rijetka jer se hranom unose dovoljne količine ovog metala, a eventualni manjak Mo se može javiti u osoba na dugotrajnoj parenteralnoj prehrani, poremećaja apsorpcije u tankom crijevu ili neodgovarajuće prehrane.<sup>11</sup>

## 2.2. Kosa kao biološki pokazatelj izloženosti metalima

### 2.2.1. Ugrađivanje elemenata u kosu

Ljudska kosa (slika 1) je oko 80 % građena od proteina (i to uglavnom keratina), 15 % vode te malim udjelom od lipida i anorganskog materijala (minerala). Udio lipida u kosi je u rasponu 1-9 % i čine ga slobodne masne kiseline; mono-, di- i trigliceridi; esteri, ugljikovodici i alkoholi. Kosa raste otprilike 1 cm na mjesec i njen se ciklus rasta može podijeliti u tri faze: anagena faza – faza rasta, katagena faza – kraj rasta i telogena faza odnosno faza mirovanja. Kosa je dinamično strukturno tkivo i oko 90 % folikula dlake je u aktivnoj (anagena faza), a 10 % u neaktivnoj fazi (telogena faza).<sup>2</sup>



Slika 1. Prikaz presjeka vlasi kose: struktura vlasi i veze između keratinskih lanaca. Slika je preuzeta i prilagođena s <http://meteoab.ru/stroenie-volos.html>.<sup>38</sup>

Elemente u kosi možemo podijeliti na endogeno i egzogeno vezane elemente. Endogeni elementi u kosi su oni elementi koji se ugrađuju u vlasi kose prilikom njezinog rasta i odraz su izloženosti elementima putem hrane i načina života. Većina metala ima visok afinitet vezanja na sulfhidrilne skupine folikularnih proteina što rezultira ugradnjom metala u strukturu kose.<sup>2,39</sup> Prvi nalazi povećanih razina Hg u kosi nađeni su kod osoba u Iraku koji su konzumirali žitarice

tretirane s živinim fungicidom i u Nizozemskoj uslijed konzumacije ribe s visokim sadržajem Hg. U djece koja su bila kronično otrovana Pb pored visokih koncentracija u krvi nađene su i visoke razine Pb u kosi. U ljudi koji su pili vodu s visokim sadržajem As nađene su visoke koncentracije tog elementa u kosi, ali nije bilo potpuno jasno je li tome razlog endogeno vezani As (iz vode za piće) ili egzogeni As zbog pranja kose kontaminiranom vodom jer nisu istovremeno rađene analize As u krvi i urinu za siguran zaključak.<sup>2</sup>

Za razliku od endogenih elemenata, egzogeni elementi su vezani za površinu vlasi kose i odraz su vanjske kontaminacije zbog utjecaja okoliša (čestica prašine u zraku i elemenata vezanih na njih), kakvoće vode za redovito pranje kose te uporabe različitih tretmana za kosu u kozmetičke, medicinske ili higijenske svrhe. Egzogeni elementi mogu utjecati na rezultat analize kose i time također na interpretaciju rezultata kod otrovanja, procjene nutritivnog statusa te dijagnozi bolesti. Većina egzogeno vezanih elemenata uspješno se uklanja pranjem kose no pri izboru otopina za pranje potrebno je voditi računa da se postupkom pranja uklone samo egzogeno vezani elementi, odnosno da ne dođe do razaranja strukture kose i uklanjanja endogeno vezanih elemenata.<sup>1</sup>

### *2.2.2. Uzorkovanje i priprema uzoraka kose za analizu elemenata*

Za određivanje elemenata u kosi potrebno je prikupiti što veći broj folikula u fazi rasta kose (anagenoj fazi). Mjesto uzorkovanja kose u ljudi je sa stražnjeg dijela vlasišta, na sredini glave u visini ušiju, a uzorkovanje se provodi pomoću škara od polietilena, titana ili tantala rezanjem pramena što bliže tjemenu (slika 2). Međutim, u više radova navedeno je da su za uzorkovanje kose korištene škarice od nehrđajućeg čelika i kada su sastavni elementi nehrđajućeg čelika (Fe, Mn, Ni i Cr) određivani u kosi iako takav način uzorkovanja može dovesti do kontaminacije i netočnih rezultata. S obzirom da je kosa stabilan materijal, pohranjivanje uzoraka kose je jednostavno, papirnata koverta ili bijeli papir sasvim je odličan izbor za pohranu i transport uzoraka.<sup>1</sup>





Slika 2. Prikaz uzorkovanja kose u ljudi. Uzima se pramen kose po sredini glave u visini ušiju pomoću škara od polietilena, titana ili tantala.

Prije samog postupka određivanja masenih udjela elemenata u kosi, uzorke uzetih pramenova kose potrebno je oprati kako bi se uklonila vanjska kontaminacija nastala pri uzorkovanju, skladištenju te zbog drugih opisanih vanjskih utjecaja. Većina elemenata je u kosi vezana na keratin preko  $-SH$  skupina (keratin je osobito bogat cisteinom) i sastavni su dio kose tijekom njezinog rasta ili se zadržavaju između različitih slojeva kutikule elektrostatičkim interakcijama. Pronalaženje univerzalnog postupka pranja kose za istodobno određivanje više elemenata stoga je dosta delikatno jer postupak pranja mora ukloniti samo elemente s površine kose ne razarajući strukturu kose. Također, prilikom pranja kose potrebno je voditi računa o čistoći vode, detergenta i otapala koji se koriste za pranje jer i to može dovesti do kontaminacije uzorka i utjecati na masene udjele elemenata u tragovima. Iako je Međunarodna agencija za atomsku energiju (IAEA) preporučila postupak pranja kose koji uključuje 5-10 min pranje kose u acetonu, tri puta u vodi te ponovno u acetonu (sa i bez korištenja ultrazvučne kupelji) uz uvođenje detergenta umjesto jednog pranja s vodom mnoga istraživanja ne primjenjuju taj postupak pranja kose.<sup>1</sup> U tablici D1 u dodatku prikazani su načini pranja kose prikazani u literaturi iz čega se vidi primjena različitih otopina za pranje od neutralnih šampona do smjese organskih otapala i kiselina.

### 2.2.3. Prednosti i nedostaci kose kao biološkog pokazatelja

Za razliku od periferne venske krvi koja je rutinski i najčešće upotrebljavani biološki uzorak u procjeni trenutne izloženosti metalima jer je u stalnom dodiru i ravnoteži sa svim tjelesnim tekućinama i organima, maseni udio elemenata u kosi može nam dodatno dati informaciju o dugotrajnoj ili prošloj izloženosti. Ovisno o dužini ili udaljenosti od vlasništva segmenta kose za analizu, možemo procijeniti razdoblje izloženosti budući da je poznato da je prosječna brzina rasta ljudske kose oko 1 cm na mjesec. Također treba spomenuti da je uzorak venske krvi invazivno skupljeni uzorak podložan etičkim ograničenjima, osobito ako se radi o osjetljivim skupinama stanovništva kao što su mala djeca i trudnice, dok je uzorak kose neinvazivno skupljeni uzorak koji je etički prikladniji i isplativiji. Dodatna prednost primjene kose u procjeni izloženosti metalima je činjenica da maseni udio metala, osobito toksičnih, u krvi i urinu je relativno mali dok su oni u kosi zastupljeni u većim masenim udjelima. Sve gore navedeno dovodi do sve češće primjene kose u analizi elemenata uz druge prednosti kao što su jednostavnost uzorkovanja (bez boli i trauma), lako skladištenje (hlađenje i konzervansi nisu potrebni) te prijenos i rukovanje.<sup>1</sup>

Usprkos navedenim prednostima kosa kao biološki uzorak nije u potpunosti prihvaćena kao relevantan uzorak u biološkom monitoringu ljudi za većinu toksičnih metala, stoga se u istraživanja uključuje i krv kao standardizirani uzorak u biološkom monitoringu. Nedovoljno istraženi mehanizmi ugradnje elemenata u kosu te nedostatak spoznaja o povezanosti između masenih udjela u kosi i unutrašnjim organima još uvijek su razlozi za opovrgavanje rezultata analize kose. Osim toga, nedostatak standardiziranih metoda za određivanje elemenata, uglavnom povezanih s pranjem, mogu utjecati na točnost određivanja. Stoga su potrebna daljnja istraživanja za postavljanje standardnih metoda pranja pri određivanju elemenata u kosi.<sup>1</sup>

### 2.3. Tehnike određivanja elemenata u kosi

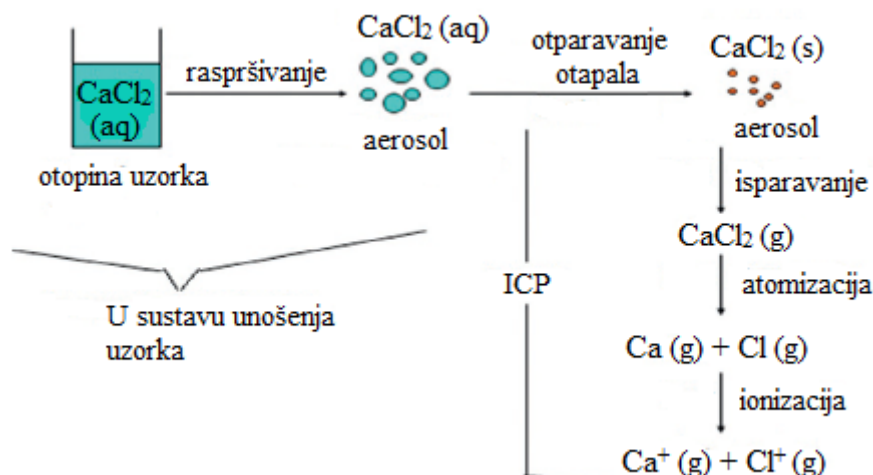
Prvu analizu nekog elementa u kosi napravio je Hoppe 1858. godine određivši As u kosi ekshumiranih tijela. Tek 1945. godine Flesch predlaže kosu kao tkivo u kojem se pohranjuje As, ali i drugi elementi. Međutim, određivanje elemenata u kosi u nadolazećim desetljećima zanemareno je u odnosu na krv i urin. Šezdesetih godina dvadesetog stoljeća analiza elemenata u kosi počinje se primjenjivati u nutricionističkim istraživanjima, a razvoj novih analitičkih tehnika dao je nove perspektive o upotrebi kose za procjenu stanja elemenata u kosi. Danas se određivanje elemenata u kosi primjenjuje u mnogim toksikološkim, nutricionističkim, kliničkim, arheološkim i forenzičkim istraživanjima.<sup>1,2</sup>

#### 2.3.1. Spektrometrija masa uz induktivno spregnutu plazmu (ICP–MS)

Spektrometrija masa uz induktivno spregnutu plazmu (ICP–MS) je najbrže razvijajuća analitička tehnika za analizu elemenata u tragovima. Sastoji se od induktivno spregnute plazme (ICP) kao izvora visoke temperature i spektrometra masa (MS) kao detektora. Induktivno spregnuta plazma transformira atome elemenata u uzorku u ione koji se zatim dalje razdvajaju i detektiraju spektrometrom masa. Još od svoje komercijalizacije (1983. godine) primjenjuje se u različitim područjima poput biomedicine, ekologije i geologije. Houk i suradnici<sup>40</sup> su 1980. godine opisali brojne pogodnosti koje nudi MS za detekciju iona nastalih u izvoru ICP. Prvi modeli ICP–MS uređaja bili su relativno kompleksni i skupi, međutim radi prednosti koje pruža multielementna analiza našli su primjenu najprije u istraživačke svrhe. Kasnija automatizacija i pojednostavljenje rada na novijim modelima omogućila je sve širu primjenu i u ispitnim laboratorijima u različitim područjima. U odnosu na ostale atomske spektroskopske tehnike poput plamene i elektrotermalne atomske apsorpcijske spektrometrije (FAAS i ETAAS) te optičke emisijske spektrometrije s induktivno spregnutom plazmom (ICP–OES), ICP–MS ima prednost u brzini analize, niskim granicama detekcije, boljoj kontroli interferencija i mogućnosti mjerenja različitih izotopa.

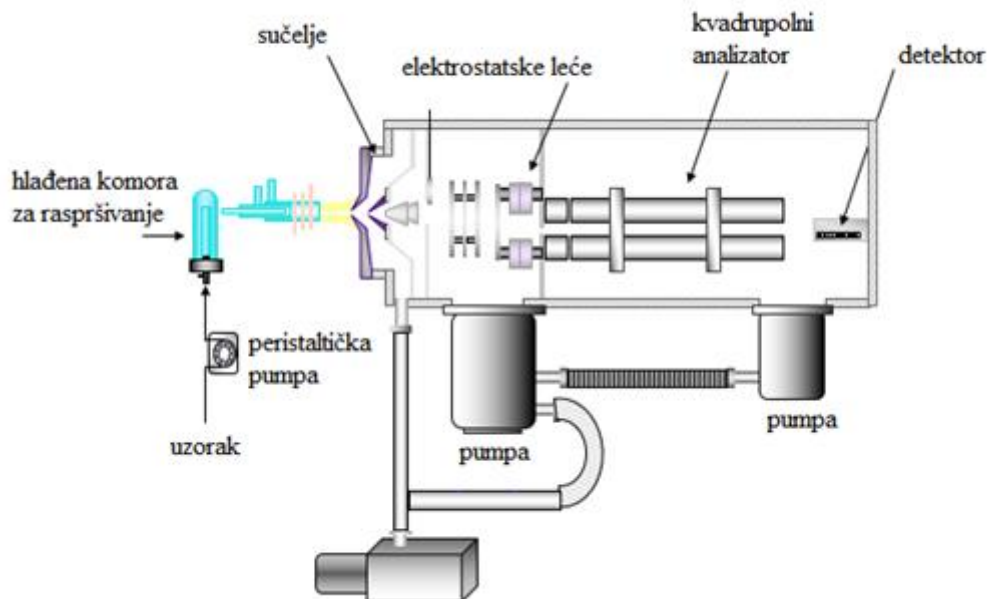
Sustav za unošenje uzorka jedan je od glavnih komponenti instrumenta ICP–MS. Glavna zadaća sustava unosa uzorka je pretvaranje tekućeg uzorka u aerosol i prijenos malih kapljica u središte plazme. Uzorak se u induktivno spregnutu plazmu unosi kroz raspršivač u obliku otopine te se pretvara u aerosol. Pomoću komore za raspršenje velike kapljice aerosola se uklanjaju u struji plina, a zaostale fine kapljice se uvode u središnji dio plazme. Visoka

temperatura plazme (oko 7500 K) osigurava brzo sušenje kapljica aerosola, isparavanje i atomizaciju te ionizaciju izbijanjem elektrona iz atoma, kao što je prikazano na slici 3.



Slika 3. Glavni procesi koji su uključeni u stvaranje iona u ICP–MS. Slika je preuzeta i prilagođena od D. Beauchemin, 2017.<sup>41</sup>

Uzorak zatim prolazi kroz središnju cijev plamenika i ulazi u plazmu. Kroz koncentrične kanale ICP plamenika struji plin argon. Plamenik se nalazi u prostoru šuplje bakrene zavojnice koja je hlađena vodom ili zrakom, a kroz koju prolazi električna struja visoke frekvencije. Električnu struju visoke frekvencije proizvodi radiofrekvencijski (RF) generator. Kada se dovede struja na zavojnicu RF generatora, uspostavlja se oscilirajuće magnetsko i električno polje na kraju plamenika.<sup>42</sup> Na slici 4. prikazan je shematski dijagram ICP–MS instrumenta.

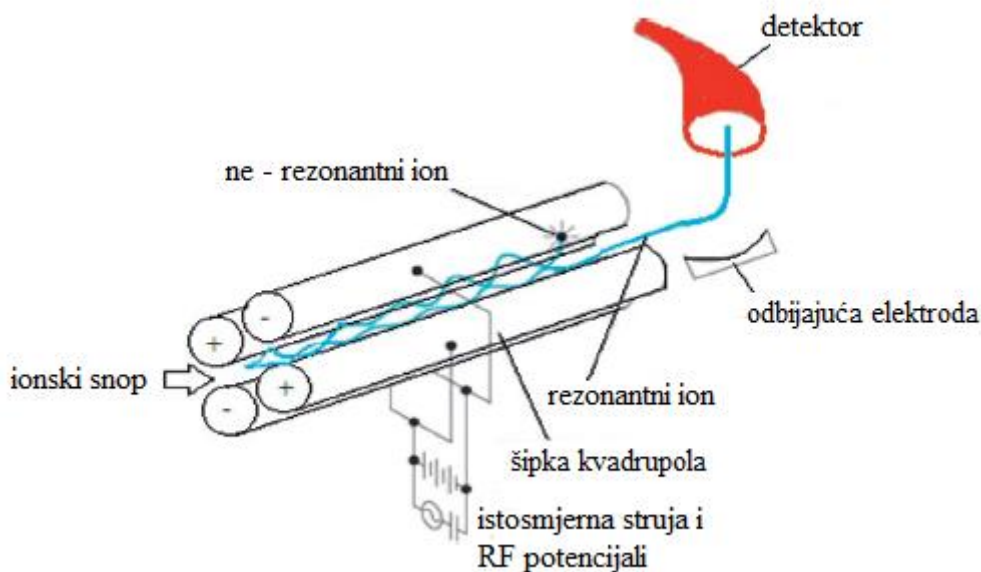


Slika 4. Shematski dijagram ICP-MS instrumenta. Slika je preuzeta i prilagođena od R.

Thomas, A Beginner's Guide to ICP – MS, part I.<sup>43</sup>

Pozitivno nabijeni ioni koji su nastali u plazmi putuju u struji argona od područja gdje je atmosferski tlak od 1-2 torr do područja niskog tlaka u spektrometru masa ( $< 10^{-5}$  torr). Taj snažni vakuumski prostor uspostavlja se između dva para konusa (eng. *sampler and skimmer cone*). *Sampler* i *skimmer* konusi su diskovi izrađeni od metala (najčešće nikla ili platine) s malim otvorom ( $\sim 1$  mm) u sredini. Svrha konusa je da propusti središnji dio ionske zrake koja dolazi iz ICP plamenika. Zbog malog promjera otvora u središtu konusa ICP-MS ima ograničenja s obzirom na ukupno otopljene krute tvari u uzorku. Preporuka je da uzorci ne sadrže više od 0,2 % ukupno otopljenih krutih tvari. Pri analizi uzoraka s velikim sadržajem otopljenih krutih tvari postoji mogućnost začepjenja otvora u središtu konusa što može rezultirati padom osjetljivosti i detekcijskog kapaciteta. Ioni se zatim dalje usmjeravaju pomoću elektrostatskih leća. S obzirom da su elektrostatske leće pozitivno nabijene kao i ioni, one usmjeravaju i fokusiraju ionsku zraku u otvor spektrometra masa. Jednom kada ioni uđu u spektrometar masa dolazi do razdvajanja na temelju odnosa mase i naboja ( $m/z$ ). S obzirom da plazma proizvodi isključivo jednostruko nabijene ione, odnos  $m/z$  je jednak masi iona što rezultira spektrom kojega je jednostavno interpretirati. U tehnici ICP-MS upotrebljavaju se tri vrste analizatora masa: to su kvadrupolni analizator, analizator s magnetskim poljem i

analizator s mjerenjem vremena leta. Najčešći analizator u upotrebi je kvadrupolni (slika 5). Kvadrupolni analizator upotrebljava kombinaciju istosmjerne i izmjenične struje. Odnos istosmjerne i izmjenične struje je fiksiran, no mogu se mijenjati njihovi naponi. Naponi se mogu mijenjati vrlo brzo što rezultira s mogućnosti razdvajanja i do 2400 atomskih jedinica mase (AMU) u sekundi.<sup>40</sup>



Slika 5. Načela rada kvadrupolnog analizatora masa. Slika je preuzeta i prilagođena od D. Beauchemin, 2017.<sup>41</sup>

Iako je ICP–MS vrlo impresivna tehnika zbog mogućnosti multielementne analize ipak ima svoje nedostatke. Glavni problem kod ove tehnike predstavljaju spektralne i nespektralne interferencije. Spektralne interferencije nastaju zbog direktnog preklapanja drugih elemenata s izotopom na nominalnoj masi. Te interferencije su poznate kao izobarne, a primjer tih interferencija je preklapanje signala  $^{114}\text{Sn}$  sa signalom  $^{114}\text{Cd}$ . Izobarni elementi su oni elementi koji imaju različit atomski broj, ali atomska težina im je gotovo ista te imaju različita kemijska, a slična fizikalna svojstva. Postoje mnogi načini da se izbjegnu interferencije u ICP–MS analizi. Najjednostavniji način je da se koristi, ukoliko je moguće, drugi izotop koji nema interferencije tijekom analize.<sup>44</sup>

Prednosti ICP–MS tehnike je niska granica detekcije te brzina i učinkovitost jer analiza elemenata traje nekoliko minuta. Njegova široka primjena leži u činjenici da je osjetljiv i pogodan za mjerenje koncentracija svih razina, od ultratragova do ppm veličina. Nemogućnost detektiranja neutralnih čestica i visoka cijena uređaja nedostaci su ICP–MS tehnike.<sup>45</sup>

### 2.3.2. Ostale instrumentalne tehnike za elementnu analizu kose

Uz ICP–MS za određivanje esencijalnih i toksičnih elemenata u kosi koriste se analitičke tehnike poput protonom inducirana emisija rentgenskog zračenja (PIXE), neutronska aktivacijska analiza (NAA), FAAS i ETAAS te ICP–OES.<sup>1</sup>

U nekoliko istraživanja ICP–OES primijenjen je za određivanje elemenata koji su prisutni u većim masenim udjelima u kosi, dok je ICP–MS isključivo primijenjivan za određivanje elemenata u tragovima i ultratragovima.<sup>46</sup> Neutronska aktivacijska analiza vrlo je prikladna metoda za multielementno određivanje elemenata u kosi, ali visoka cijena instrumentacije i sama dostupnost instrumenta ne čini ju privlačnom za rutinsku primjenu. Proton inducirana emisija rentgenskog zračenja pruža informacije o uzdužnoj i radijalnoj koncentraciji elemenata u pramenovima kose, ali poput NAA, ova tehnika nije lako dostupna za rutinska opsežna testiranja ili rutinske analize uzoraka.<sup>1,2</sup>

Uz ICP–MS česta je primjena i atomske apsorpcijske spektrometrije (AAS) za određivanje toksičnih i esencijalnih elemenata u kliničkim, ekološkim, industrijskim, poljoprivrednim i prehrambenim istraživanjima. Prednosti ICP–MS u odnosu na AAS su: izvrsne detekcijske granice, multielementna analiza, ekonomičnost za puno uzoraka i/ili elemenata, mogućnost izotopnih mjerenja i široko dinamičko područje. Iako je ICP–MS tehnika skuplja u odnosu na AAS navedene je prednosti, osobito brzina analize, osjetljivost i mogućnost istovremene analize više elemenata, čine boljim izborom za elementnu analizu.<sup>47</sup>

## § 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Popis kemikalija

#### *Kiseline i otapala*

- pročišćena koncentrirana dušična kiselina, HNO<sub>3</sub> konc., dobivena iz HNO<sub>3</sub> konc.,  $w = 65\%$  (p.a.), Merck, Njemačka
- koncentrirana klorovodična kiselina, HCl konc.,  $w = 30\%$  (s.p.), Merck, Njemačka
- metanol (CH<sub>3</sub>OH),  $w = 99,9\%$ , Merck, Njemačka
- etanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH),  $w = 96\%$ , Kemika, Hrvatska
- aceton (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O),  $w = 99,8\%$ , Merck, Njemačka
- etil-acetat (C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>),  $w = 99,9\%$ , Merck, Njemačka
- Triton X-100 (polietilenglikol oktil fenol eter, TX-100), BDH Chemicals Ltd., Engleska
- Kemex A, Kemika, Hrvatska
- ultračista voda specifične vodljivosti: 0,055  $\mu\text{S/cm}$  (pri 25 °C; 18,2 M $\Omega\text{cm}$ )

#### *Standardi elemenata za ugađanje uvjeta mjerenja na ICP-MS-u*

- otopina litija (Li):  $\rho = 1001\text{ mg/L}$ , PlasmaCAL, SCP Science, Kanada
- otopina magnezija (Mg):  $\rho = 1001\text{ mg/L}$ , PlasmaCAL, SCP Science, Kanada
- otopina kobalta (Co):  $\rho = 1004\text{ mg/L}$ , PlasmaCAL, SCP Science, Kanada
- otopina itrija (Y):  $\rho = 1004\text{ mg/L}$ , PlasmaCAL, SCP Science, Kanada
- otopina cerija (Ce):  $\rho = 1002\text{ mg/L}$ , PlasmaCAL, SCP Science, Kanada
- otopina talija (Tl):  $\rho = 1004\text{ mg/L}$ , PlasmaCAL, SCP Science, Kanada
- otopina selena (Se):  $\rho = 1026\text{ mg/L}$ , Merck, Njemačka



*Standardi pojedinačnih elemenata za pripremu otopine unutarnjeg standarda*

- otopina skandija (Sc):  $\rho = 100,5$  mg/L, PlasmaCAL, SCP Science, Kanada
- otopina germanija (Ge):  $\rho = 999$  mg/L, PlasmaCAL, SCP Science, Kanada
- otopina rodija (Rh):  $\rho = 1005$  mg/L, PlasmaCAL, SCP Science, Kanada
- otopina lutecija (Lu):  $\rho = 995$  mg/L, PlasmaCAL, SCP Science, Kanada
- otopina iridija (Ir):  $\rho = 999$  mg/L, PlasmaCAL, SCP Science, Kanada
- otopina terbija (Tb):  $\rho = 100,7$  mg/L, PlasmaCAL, SCP Science, Kanada

*Standardi pojedinačnih elemenata za pripremu otopina radnih standarda*

- otopina arsena (As):  $\rho = 1000$  mg/L, CertiPUR, ICP Standard, Merck, Njemačka
- otopina kalcija (Ca):  $\rho = 1002$  mg/L, PlasmaCAL, SCP Science, Kanada
- otopina kadmija (Cd):  $\rho = 1004$  mg/L, PlasmaCAL, SCP Science, Kanada
- otopina bakra (Cu):  $\rho = 1007$  mg/L, PlasmaCAL, SCP Science, Kanada
- otopina željeza (Fe):  $\rho = 1005$  mg/L, PlasmaCAL, SCP Science, Kanada
- otopina žive (Hg):  $\rho = 9,963$  mg/L, CaPurAn, C.P.A. Ltd., Bugarska
- otopina magnezija (Mg):  $\rho = 1001$  mg/L, PlasmaCAL, SCP Science, Kanada
- otopina mangana (Mn):  $\rho = 1001$  mg/L, PlasmaCAL, SCP Science, Kanada
- otopina molibdata (Mo):  $\rho = 1004$  mg/L, PlasmaCAL, SCP Science, Kanada
- otopina olova (Pb):  $\rho = 999$  mg/L, PlasmaCAL, SCP Science, Kanada
- otopina selena (Se):  $\rho = 1026$  mg/L, CertiPUR, ICP Standard, Merck, Njemačka
- otopina cinka (Zn):  $\rho = 1003$  mg/L, PlasmaCAL, SCP Science, Kanada

*Certificirani referentni materijali*

- IAEA-086 Human Hair, IAEA, Austrija
- NIES CRM No.13 Human Hair, NIES, Japan
- SRM1577a Bovine Liver, NIST, SAD

## 3.2. Mjerni instrumenti i oprema

### *Korišteni uređaji*

- spektrometar masa uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-MS), Agilent 7500cx, Agilent Technologies, Njemačka
- visokotlačni uređaj za mikrovalno razaranje UltraCLAVE IV, Milestone, Italija
- ultrazvučna kupelj, Branson B-220, 50/60 Hz, 125 W, Branson a SmithKline Company, SAD
- kvarcni sustav za pročišćavanje HNO<sub>3</sub>, SubPUR, Milestone, Italija
- uređaj za pročišćavanje vode GenPure, TKA Wasseraufbereitungssysteme GmbH, Njemačka
- analitička vaga, NewClassic MF, model MS303S, Mettler Toledo, Švicarska
- Vortex miješalica, CRV-45X, Capp Rondo Vortexer 4500 rpm (podesive brzine) CAPP, Njemačka

### *Plinovi*

- Ar, plazma plin, čistoće > 99,999 %, UTP d.o.o., Zagreb, Hrvatska - SOL Group, Italija
- He, kolizijski plin, čistoće > 99,9999 %, UTP d.o.o., Zagreb, Hrvatska - SOL Group, Italija
- H<sub>2</sub>, reakcijski plin, čistoće > 99,999 %, UTP d.o.o., Zagreb, Hrvatska - SOL Group, Italija

### *Laboratorijsko posuđe*

- teflonske bočice (FEP) za čuvanje konc. HNO<sub>3</sub>, Nalgene, SAD
- kvarcne epruvete s čepovima (za razaranje uzoraka), volumena 12 mL, Milestone, Italija
- polipropilenske epruvete, 15 mL, Kartell, SAD
- polipropilenske epruvete, 5 mL, Sarstedt, Njemačka
- laboratorijske škare

### 3.3. Pranje laboratorijskog posuđa za analizu elemenata

Laboratorijsko posuđe korišteno u analizi elemenata prije same upotrebe namakano je nekoliko sati u detergentu u cilju sprječavanja vanjske kontaminacije uzoraka metalima te isprano vodovodnom vodom, a potom destiliranom vodom. Zatim je tako oprano posuđe uronjeno u  $\text{HNO}_3$  ( $\varphi = 10\%$ ) na 24 sata i na kraju višestruko isprano ultračistom vodom.

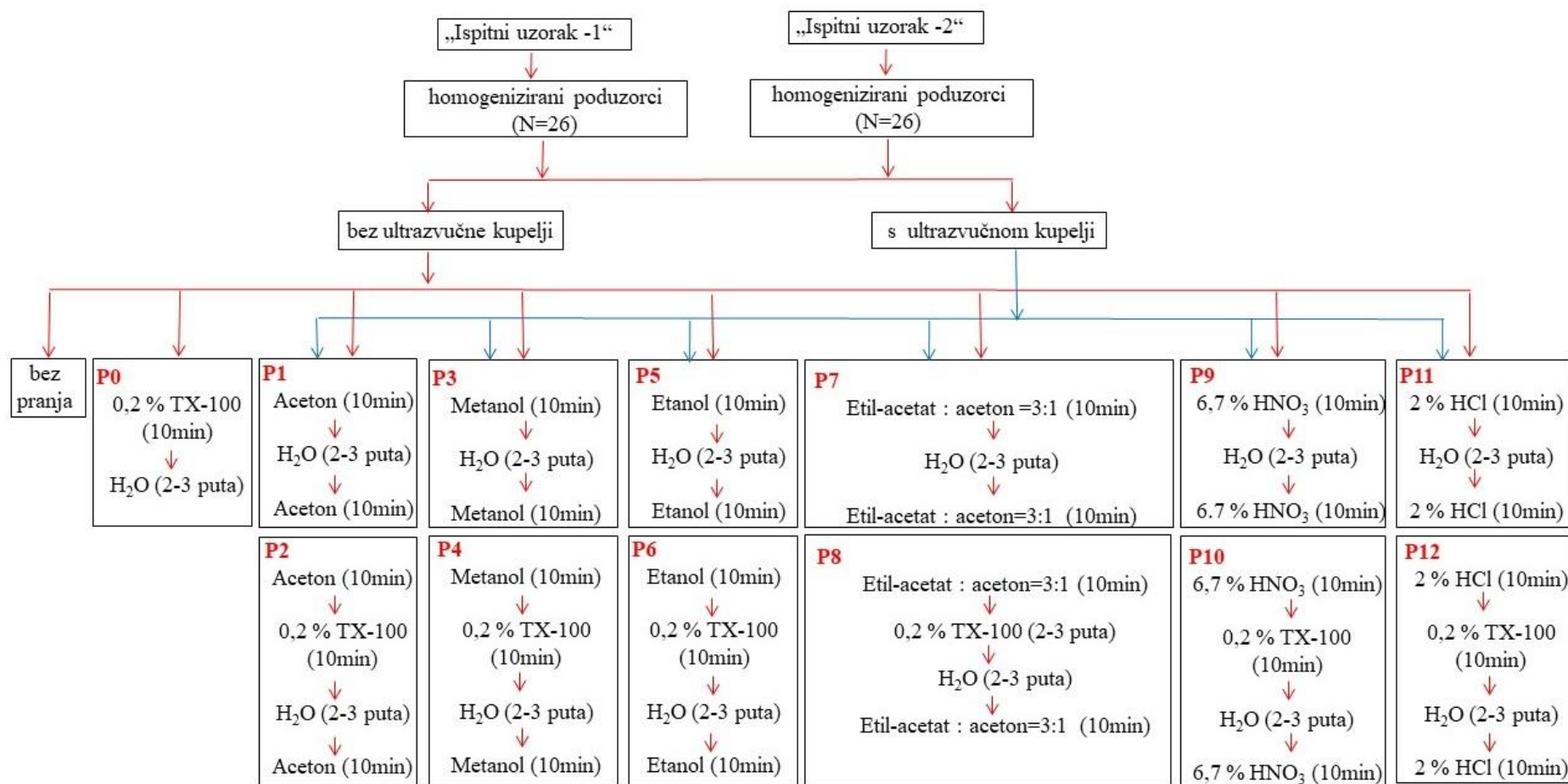
### 3.4. Uzorkovanje uzoraka kose

#### 3.4.1. Uzorkovanje i priprava homogenata uzoraka kose za ispitivanje učinkovitosti pranja

Nepoznati uzorci ( $N = 2$ ) kose dužine 20-30 cm i debljine oko 2 cm koji su korišteni za ispitivanje učinkovitosti različitih načina pranja kose (dalje u tekstu označeni kao „ispitni uzorak – 1“ i „ispitni uzorak – 2“) prikupljeni su u frizerskom salonu. U laboratoriju je svaki uzorak izrezan na kratke segmente dužine do 1 cm i dobro izmiješani kako bi se dobio što homogeniji uzorak. Iz ta dva homogena uzorka odvojeno je ukupno po 26 „poduzoraka“ za ispitivanje učinkovitosti različitih načina pranja za uklanjanje vanjske kontaminacije iz kose. Na slici 6 shematski je prikazan tijek pokusa s detaljima o ispitivanim načinima pranja kose za analizu elemenata.

#### 3.4.2. Uzorkovanje kose roditelja

Uzorkovanje kose roditelja ( $N = 167$ ) iz kontinentalne i priobalne Hrvatske provodilo je unutar projekta „Izloženost metalima i njihovi učinci u graviditetu i postnatalnom razdoblju“ (MZOŠ br. 022-0222148-2135, voditelj: dr. sc. Martina Piasek) medicinsko osoblje u rodilištima uzimajući kosu u predjelu gdje ona najviše raste tj. u sredini stražnjeg dijela vlasišta u visini ušiju. Svakoj roditelji nakon poroda (u periodu od dva dana) uz pomoć škarica uzorkovan je pramen kose debljine oko 0,5 cm (nalik „debljini olovke“) te su uzorci pohranjeni u označene papirnate koverta i dostavljeni u Jedinicu za analitičku toksikologiju i mineralni metabolizam Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu.



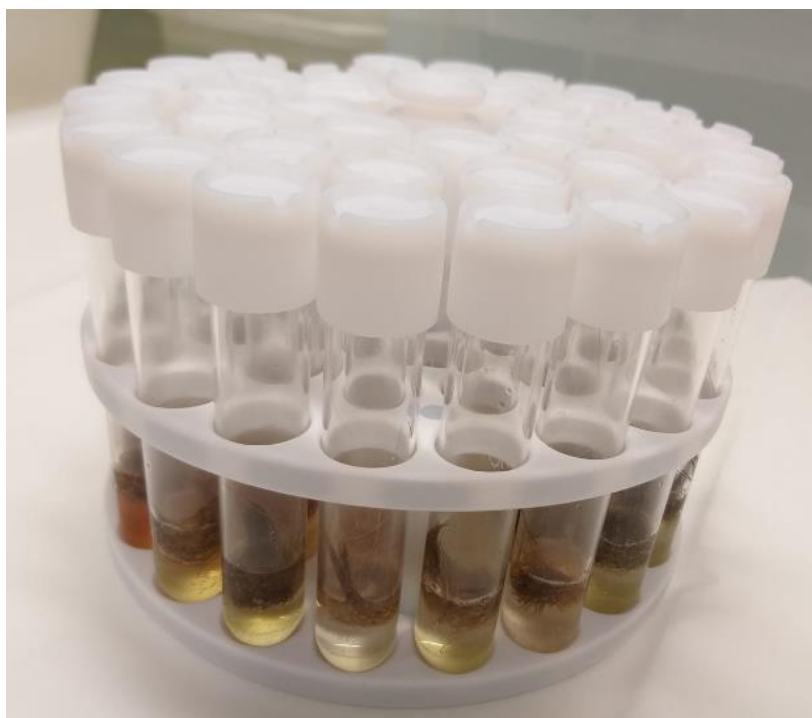
Slika 6. Shematski prikaz ispitivanih načina pranja kose za analizu elemenata. Postotci kod TX-100, HCl i HNO<sub>3</sub> odnose se na volumne udjele ( $\varphi$ ).

### 3.5. Priprema uzoraka kose za analizu elemenata

U svrhu ovog istraživanja nepoznati uzorci kose prikupljeni u frizerskom salonu i homogenizirani na prethodno opisan način oprani su primjenom tri ili četiri koraka u nizu na 12 različitih načina kako je prikazano na slici 6. Uzorci kosa (~ 0,1 g) stavljeni su u prethodno izvagane čiste kvarcne epruvete te je slijedio postupak pranja. U prvom koraku korišteno je organsko otapalo (aceton, metanol, etanol, smjesa etil-acetata i acetona (3:1)) ili kiselina (dušična ( $\varphi = 6,7 \%$ ) i klorovodična ( $\varphi = 2 \%$ )), zatim slijedi ispiranje 2-3 puta s ultračistom vodom (po potrebi i više) te ponovno otapalo ili kiselina. Pri pranju kose u četiri koraka neionski detergent TX-100 upotrijebljen je prije ispiranja s vodom. Sve otopine (osim vode) stajale su u kontaktu s kosom oko 10 min uz povremeno miješanje na Vortex miješalici. Također je ispitivana učinkovitost pranja kose uz primjenu ultrazvučne kupelji tijekom prvog koraka. Tako oprani uzorci kose sušeni su na temperaturi od 75 °C tijekom 2-3 h. Analizom dobivenih podataka o učinkovitosti pranja odabran je najpogodniji način pranja kose koji je primijenjen za analizu elemenata u prikupljenim uzorcima kosa ispitanica - roditelja.

### 3.5.1. Razgradnja uzoraka kose za analizu elemenata

Osušenim, ohlađenim i izvaganim uzorcima kose dodano je 2 mL koncentrirane dušične kiseline i 2 mL ultračiste vode te su kvarcne epruvete zatvorene s teflonskim čepom i stavljene na stalak (slika 7), koji je potom postavljen u uređaj za visokotlačno mikrovalno razaranje UltraCLAVE IV (slika 8) gdje su uzorci razoreni prema programu prikazanom u tablici 1. Nakon razaranja i hlađenja uzorci su nadopunjeni s ultračistom vodom na ukupni volumen od 6 mL i pohranjeni na sobnoj temperaturi do ICP–MS analize elemenata. Neposredno prije ICP–MS analize razoreni uzorci razrijeđeni su dušičnom kiselinom,  $\varphi = 1\%$  (700  $\mu\text{L}$  uzorka i 2,3 mL  $\text{HNO}_3$ ,  $\varphi = 1\%$ ). U svakom uzorku maseni udio unutarnjeg standarda bio je 2,3  $\mu\text{g/L}$ .



Slika 7. Uzorci kose u kvarcnim epruvetama zatvorenim teflonskim čepovima.



Slika 8. Uređaj za visokotlačno mikrovalno razaranje UltraCLAVE IV (Milestone, Italija).

Tablica 1. Temperaturni program za razaranje uzoraka kose u uređaju za visokotlačno mikrovalno razaranje UltraCLAVE IV.

	t / min:s	E / W	T / °C	P / bar
1.	5	1000	80	100
2.	10	500	130	100
3.	5	1000	180	120
4.	7:30	1000	220	130
5.	20	1000	220	130
6.	40	0	20	10

### 3.5.2. Priprema uzoraka kose ispitanica - roditelja

Analiza elemenata u svim prikupljenim uzorcima kose ispitanica – roditelja provedena je u segmentu dužine 3 cm od vlasišta. Pripremljeni segmenti kose (~ 0,1 g) stavljeni su u čiste kvarcne epruvete i zabilježena im je masa. Na uzorke je potom dodan aceton, epruveta stavljena u ultrazvučnu kupelj 10 minuta, nakon čega je slijedilo dekantiranje acetona i nadopuna s TX-100 ( $\varphi = 0,2\%$ ) uz povremeno vorteksiranje tijekom 10 min. Nakon dekantiranja otopine TX-100 uzorak kose je ispiran 2-3 puta s ultračistom vodom (po potrebi i više) te je u zadnjem koraku ponovno dodan aceton u 10 minutnom kontaktu s kosom uz povremeno vorteksiranje. Aceton je potom dekantiran i uzorci su stavljeni na sušenje 2-3 h na temperaturu od 75 °C. Po završetku sušenja i hlađenja uzorci su ponovo izvagani i razoreni u uređaju za visokotlačno mikrovalno razaranje na prethodno opisan način.



### 3.6. Analiza elemenata u kosi

#### 3.6.1. Priprema standardnih otopina

##### 3.6.1.1. Standardna otopina za ugađanje uvjeta mjerenja na ICP–MS-u

Standardna otopina za ugađanje i optimiranje uvjeta rada ICP–MS-a u koncentraciji od 1 µg/L pripravljena je iz monoelementnih standardnih otopina spektralne čistoće za ICP izvore Li, Mg, Co, Y, Ce, Tl i Se u HNO<sub>3</sub> ( $\varphi = 5\%$ ) i u smjesi HNO<sub>3</sub> ( $\varphi = 5\%$ ) i HCl-a ( $\varphi = 0,1\%$ ).

##### 3.6.1.2. Otopina unutarnjeg standarda

Iz monoelementnih standardnih otopina Ge, Rh, Lu, Ir i Tb pripravljena je otopina unutarnjeg standarda u koncentraciji od 100 µg/L. Prije određivanja elemenata u kosi otopina unutarnjeg standarda dodana je u svaki uzorak i kalibracijske standarde u koncentraciji od 3 µg/L u mjernoj otopini.

##### 3.6.1.3. Standardne otopine elemenata

Osam standardnih otopina elemenata pripremljeni su iz monoelementnih standardnih otopina As, Ca, Cd, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Pb, Se i Zn, u HNO<sub>3</sub> ( $\varphi = 5\%$ ). Iz pripremljenih standardnih otopina elemenata napravljene su radni standardi u HNO<sub>3</sub> ( $\varphi = 1\%$ ) u svrhu izrade kalibracijskih krivulja. Standardna otopina Hg pripravljena je u koncentraciji od 20 µg/L u smjesi HNO<sub>3</sub> ( $\varphi = 5\%$ ) i HCl ( $\varphi = 1\%$ ). Radni standardi Hg također su pripremljeni u HNO<sub>3</sub> ( $\varphi = 1\%$ ). Kalibracijsko koncentracijsko područje radnih standarda za određivanje elemenata prikazano je u tablici 2.

Tablica 2. Kalibracijsko koncentracijsko područje radnih standarda za određivane elemente.

Element	Koncentracijsko područje	r <sup>2</sup>
<b>As</b>	0,2 – 20 (µg/L)	0,9999
<b>Ca</b>	0,5 – 11 (mg/L)	0,9998
<b>Cd</b>	0,02 – 2 (µg/L)	0,9998
<b>Cu</b>	10 – 520 (µg/L)	0,9999
<b>Fe</b>	0,8 – 11,5 (mg/L)	0,9999
<b>Hg</b>	0,3 – 4 (µg/L)	1
<b>Mg</b>	0,5 – 11 (mg/L)	0,9996
<b>Mn</b>	0,2 – 8 (µg/L)	0,9999
<b>Mo</b>	0,07 – 7 (µg/L)	0,9999
<b>Pb</b>	0,3 – 30 (µg/L)	0,9996
<b>Se</b>	0,2 – 20 (µg/L)	0,9999
<b>Zn</b>	10 – 510 (µg/L)	0,9995

### 3.6.2. Ugađanje uvjeta mjerenja na ICP-MS-u

Prije svakog mjerenja na ICP–MS uređaju (slika 9) potrebno je ugoditi osjetljivost i mjerne parametre samog mjernog instrumenta. Za ugađanje osjetljivosti instrumenta koristi se otopina Li, Mg, Co, Y, Ce, Tl i Se u koncentraciji od 1 µg/L te se prati odziv detektora na masama 7 (Li), 89 (Y) i 205 (Tl) te omjeri dvostruko nabijenih iona ( $^{140}\text{Ce}^{2+}/^{140}\text{Ce}^{+}$ ) i oksida elemenata ( $^{140}\text{Ce}^{16}\text{O}^{+}/^{140}\text{Ce}^{+}$ ) u odnosu na jednostruko nabijene ione. Navedene mase pokrivaju mjerno područje detektora u području različitih masa (niskih, srednjih te visokih). Za postizanje zadovoljavajuće osjetljivosti varirani su naponi na lećama, dubina unosa uzorka te protok plina nosioca. Optimalni uvjeti postignuti su kada je osjetljivost na navedenim masama najveća uz istovremeno minimalno nastajanje dvostruko nabijenih iona (< 2,2 %) i iona oksida (< 1,4 %). Postignuti uvjeti određivanja elemenata ICP–MS metodom prikazani su u tablici 3. Nakon postizanja zadovoljavajuće osjetljivosti pomoću standardnih otopina elemenata sa širokim rasponom maseni udio ugođen je i tzv. P/A faktor. Vrijednosti P/A faktora programski paket zatim koristi za korekciju maseni udio mjerenih u analognom (manja osjetljivost) i pulsnom modu (veća osjetljivost) kako bi se dobile linearne kalibracijske krivulje u širokom koncentracijskom području.

Tablica 3. Uvjeti mjerenja na uređaju ICP–MS (Agilent 7500cx).

parametar			
RF Snaga	1550 W		
RF faktor	1,72 V		
udaljenost plamenika i konusa	7,5 mm		
horizontalna os plamenika	0,3 mm		
vertikalna os plamenika	-0,4 mm		
brzina peristaltičke pumpe	0,08 rps		
protok plazma plina	15 L/min		
protok plina za razrjeđenje	0,17 L/min		
protok plina nosioca	1,0 L/min		
raspršivač	MicroMist (kvarc)		
komora za raspršenje	Scott (kvarc), hladena na 2°C		
konusi od Ni, promjer otvora	1 mm <i>Sampling cone</i> ; 0,4 mm <i>Skimmer cone</i>		
dvostruko nabijeni ioni i oksidi	$^{140}\text{Ce}^{2+}/^{140}\text{Ce}^{+} < 1,2\%$ ; $^{140}\text{Ce}^{16}\text{O}^{+}/^{140}\text{Ce}^{+} < 1,3\%$		
<b>kolizijski/reakcijski plin</b>	<b>bez plina</b>	<b>He</b>	<b>H<sub>2</sub></b>
protok kolizijskog/reakcijskog plina	/	4,1 mL/min	4,5 mL/min
napon na leći 1	0 V	0,5 V	0 V
napon na leći 2	-140 V	-140 V	-135 V
mjereni izotopi analita	$^{202}\text{Hg}$	$^{24}\text{Mg}$ , $^{43}\text{Ca}$ , $^{55}\text{Mn}$ , $^{56}\text{Fe}$ , $^{63}\text{Cu}$ , $^{68}\text{Zn}$ , $^{75}\text{As}$ , $^{95}\text{Mo}$ , $^{111}\text{Cd}$ , $^{208}\text{Pb}$	$^{78}\text{Se}$



Slika 9. ICP–MS uređaj Agilent 7500cx (Agilent Technologies, Njemačka) za određivanje elemenata.

### 3.7. Statistička obrada rezultata

Za svaki određivani parametar provedeno je testiranje normalnosti distribucije pomoću Kolmogorov-Smirnovljevog testa. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i SD za varijable koje slijede normalnu distribuciju, a za asimetrične varijable kao medijan i interkvartilni raspon (25–75 %). Razlike između masenih udjela elemenata u kosi ispitanica iz kontinentalne i priobalne Hrvatske testirane su Mann-Whitneyovim *U*-testom.

Razina statističke značajnosti postavljena je na 5 % ( $p < 0,05$ ). Za statističku obradu rezultata i grafičke prikaze korišten je program TIBCO Statistica ver. 13.5.0.17 (TIBCO Software Inc., SAD).

## § 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Validacija ICP–MS metode

Metode korištene u laboratoriju za analitičku kemiju moraju se prije same analize realnih uzoraka provjeriti i ispitati je li primijenjena metoda prikladna za namjenjenu svrhu, odnosno, metode se moraju validirati.<sup>48,49</sup> Validacija ispitnih metoda podrazumijeva određivanje granice detekcije i kvantifikacije, točnosti (iskorištenje) i preciznosti (ponovljivosti). U tablici 4 prikazani su validacijski parametri koji su ispitani u ovome radu te njihovi kriteriji prihvatljivosti. Međutim, treba napomenuti da osim same ispitne metode brojni drugi čimbenici kao što su uzorkovanje, priprema i homogenost uzorka, kontaminacije te stručnost osoblja, mogu utjecati na ispitni rezultat.<sup>50,51</sup>

Tablica 4. Određivani validacijski parametri i kriteriji prihvatljivosti.

VALIDACIJSKI PARAMETAR	KRITERIJ PRIHVATLJIVOSTI <sup>52</sup>
Granica detekcije	informacija
Granica kvantifikacije	informacija
Točnost (iskorištenje)	80–110 %
Ponovljivost unutar dana	RSD ≤ 5 %
Ponovljivost između dana	RSD ≤ 10 %

#### 4.1.1. Određivanje granica detekcije i kvantifikacije

Granica detekcije je najmanja količina analita u uzorku koja se može detektirati, tj. točka gdje je mjerena vrijednost veća od mjerne nesigurnosti. Dok se granica kvantifikacije definira kao najniža količina analita u uzorku koja se može kvantitativno odrediti s odgovarajućom preciznošću i točnošću.<sup>52-54</sup> U ovome istraživanju granica detekcije (LoD) izračunata je kao srednja vrijednost slijepe probe uvećana za tri standardne devijacije ( $3\sigma$ ), a za granicu kvantifikacije (LoQ) uzeta je srednja vrijednost slijepe probe uvećana za deset standardnih

devijacija ( $10\sigma$ ). U tablici 5 prikazane su granice detekcije i kvantifikacije primjenjenom ICP–MS metodom za svaki određivani element u kosi.

Tablica 5. Granice detekcije (LoD) i kvantifikacije (LoQ) instrumenta za svaki određivani element u kosi.

Element	LoD / $\mu\text{g kg}^{-1}$	LoQ / $\mu\text{g kg}^{-1}$
As	0,003	0,009
Ca	5	10
Cd	0,002	0,006
Cu	0,3	0,9
Fe	2	4
Hg	0,03	0,09
Mg	0,9	3
Mn	0,02	0,06
Mo	0,004	0,007
Pb	0,005	0,02
Se	0,006	0,02
Zn	1	5

Najniže granice detekcije određene su za Cd, As, Mo, Pb i Se (0,002-0,006  $\mu\text{g/kg}$ ), za Hg i Mn su red veličine više (0,02-0,03  $\mu\text{g/kg}$ ), za Cu i Mg još jedan red veličine više (0,3-0,9  $\mu\text{g/kg}$ ), a Ca, Fe i Zn imaju najviše granice detekcije (1-10  $\mu\text{g/kg}$ ). Međutim, granice detekcije prikazane u ovom radu za sve elemente su niže od granica detekcije datih u Agilentovoj aplikacijskoj uputi<sup>55</sup> i slične ili jedan red veličine niže od granica detekcije do sada objavljenih u literaturi.<sup>56,57</sup>

#### 4.1.2. Određivanje točnosti i preciznosti

Točnost analitičke metode definira se kao stupanj podudaranja između prihvaćene referentne vrijednosti i srednje vrijednosti dobivene mjerenjem određeni broj puta. Može se mjeriti na različite načine, a metoda treba odgovarati analiziranoj matrici. Procjena točnosti analitičke metode može se odrediti na neki od sljedećih načina: usporedbom izmjerenih vrijednosti sa stvarnim vrijednostima danim u certifikatu (primjena certificiranih referentnih materijala),

usporedbom rezultata ispitivane metode s rezultatima dobivenim referencijskom metodom poznate nesigurnosti te dodatkom analita poznate koncentracije u matriks uzorka. Točnost analitičke metode iskazuje se kao analitički prinos, odnosno iskorištenje (eng. *recovery*).<sup>52,58</sup>

U ovome radu za ispitivanje točnosti i preciznosti ICP-MS metode rabljeni su komercijalno dostupni referentni materijali za kosu IAEA-086 *Human Hair* i NIES CRM No.13 *Human Hair*. Osim referentnih materijala za kosu, korišten je i referentni materijal za tkivo SRM1577a *Bovine Liver* jer ima veći broj certificiranih elemenata koji su bili od interesa u ovome istraživanju. Referentni uzorci su pripremljeni, razoreni i analizirani istom analitičkom metodom kao i uzorci kosa ispitanica. Točnost analitičke metode u ovom istraživanju je određena mjerenjem sedam uzoraka svakog referentnog materijala. U tablici 6 prikazane su njihove certificirane i dobivene vrijednosti analiziranih elemenata za svaki korišteni referentni materijal.

Rezultati pokazuju dobro slaganje dobivenih i certificiranih vrijednosti za sve korištene referentne materijale. Točnost odnosno iskorištenje za sve analizirane elemente bila je u rasponu od 91–110 % osim za Fe u IAEA-086 (114 %) te Mn u NIES No. 13 (85 %). Dobiveni rezultati za iskorištenje upućuju na točnost određivanja analiziranih elemenata ICP-MS metodom i eventualne pogreške tijekom izvođenja eksperimenta, stoga možemo zaključiti da točnost metode, odnosno iskorištenje zadovoljava kriterij prihvatljivosti.<sup>52</sup>

Preciznost analitičkog postupka izražava bliskost slaganja (stupanj raspršenosti) između niza mjerenja dobivenih višestrukim mjerenjem istog homogenog uzorka pod propisanim uvjetima. Preciznost se može izraziti kao ponovljivost (preciznost pod istim uvjetima), srednja preciznost (preciznost pod različitim uvjetima unutar istog laboratorija) i obnovljivost (preciznost pod istim uvjetima u različitim laboratorijima). Preciznost analitičkog postupka obično se izražava kao standardna devijacija, relativna standardna devijacija te raspon pouzdanosti srednje vrijednosti.<sup>52,59</sup> U ovom radu preciznost metode određena je upotrebom komercijalno dostupnih certificiranih materijala te je iskazana kao relativno standardno odstupanje (RSD). Preciznost unutar dana određena je mjerenjem sedam uzoraka svakog referentnog materijala, a preciznost između dana mjerenjem istih referentnih materijala tri dana za redom. Ponovljivost unutar dana bila je < 2,5 %, a između dana < 7 %, pri čemu su zadovoljeni kriteriji prihvatljivosti.<sup>52</sup>

Tablica 6. Usporedba certificiranih i dobivenih vrijednosti analiziranih elemenata u korištenim referentnim materijalima.

Element	Human hair IAEA-086			Human hair NIES CRM No.13		
	Certificirana vrijednost (95% interval pouzdanosti)	Dobivena vrijednost (sred. vrij. $\pm$ SD)	Iskorištenje %	Certificirana vrijednost $\pm$ mjerna nesigurnost	Dobivena vrijednost (sred. vrij. $\pm$ SD)	Iskorištenje %
As (mg/kg)	/	0,124 $\pm$ 0,002	/	0,1*	0,1 $\pm$ 0,002	95
Ca (mg/kg)	1120 (1000 - 1240)	1138 $\pm$ 19	102	820*	821 $\pm$ 9	100
Cd (mg/kg)	/	0,161 $\pm$ 0,003	/	0,23 $\pm$ 0,03	0,21 $\pm$ 0,005	92
Cu (mg/kg)	17,6 (16,6 – 18,5)	17,9 $\pm$ 0,1	102	15,3 $\pm$ 1,3	14,1 $\pm$ 0,09	92
Fe (mg/kg)	123 (110 – 136)	141 $\pm$ 1	114	140*	127 $\pm$ 2	91
Hg (mg/kg)	0,573 (0,534 – 0,612)	0,608 $\pm$ 0,012	106	4,42 $\pm$ 0,20	4,4 $\pm$ 0,07	100
Mg (mg/kg)	177 (156- 197)	212 $\pm$ 2	/	160*	146 $\pm$ 1	91
Mn (mg/kg)	9,6 (8,9 – 10,3)	9,5 $\pm$ 0,1	99	3,9*	3,3 $\pm$ 0,03	85
Mo (mg/kg)	/	0,190 $\pm$ 0,002	/	/	0,04 $\pm$ 0,001	/
Pb (mg/kg)	/	12,5 $\pm$ 0,1	/	4,6 $\pm$ 0,4	4,6 $\pm$ 0,02	100
Se (mg/kg)	1 (0,80 – 1,20)	0,912 $\pm$ 0,011	91	1,79 $\pm$ 0,17	1,74 $\pm$ 0,02	97
Zn (mg/kg)	167 (159 – 174)	179 $\pm$ 1	107	172 $\pm$ 11	177 $\pm$ 0,2	103

Element	Bovine liver NIST SRM 1577b		
	Certificirana vrij. $\pm$ mjerna nesigurnost	Dobivena vrijednost (sred. vrij. $\pm$ SD)	Iskorištenje %
As (mg/kg)	0,047 $\pm$ 0,006	0,050 $\pm$ 0,002	108
Ca (mg/kg)	120 $\pm$ 7	110 $\pm$ 3	91
Cd (mg/kg)	0,44 $\pm$ 0,06	0,44 $\pm$ 0,02	100
Cu (mg/kg)	158 $\pm$ 7	157 $\pm$ 3	100
Fe (mg/kg)	194 (194 $\pm$ 20)	193 $\pm$ 9	99
Hg (mg/kg)	/	0,04 $\pm$ 0,01	/
Mg (mg/kg)	600 $\pm$ 15	575 $\pm$ 38	96
Mn (mg/kg)	9,9 $\pm$ 0,8	10,3 $\pm$ 0,4	105
Mo (mg/kg)	3,5 $\pm$ 0,5	3,6 $\pm$ 0,1	103
Pb (mg/kg)	0,135 $\pm$ 0,015	0,138 $\pm$ 0,002	102
Se (mg/kg)	0,71 $\pm$ 0,07	0,67 $\pm$ 0,01	95
Zn (mg/kg)	123 $\pm$ 8	113 $\pm$ 3	92

Certificirane vrijednosti su prikazane s rasponom i mjernom nesigurnosti, dok su dobivene vrijednosti prikazane kao srednja vrijednost  $\pm$  SD.

\*vrijednost nije certificirana, samo informativna.



## 4.2. Ispitivanje učinkovitosti pranja kose

### 4.2.1. Odabir otopina za pranje kose

Pretraživanjem literature uočeno je da još uvijek nema prihvaćene standardne procedure kako postupati s uzorcima kose, odnosno na koji način i s kojim otapalom oprati kosu prije same analize elemenata u kosi radi uklanjanja vanjske kontaminacije kose metalima. Pojedine studije za pranje kose upotrebljavaju samo vodu<sup>60-64</sup> ili detergent,<sup>65,66</sup> dok druge smjesu otapala npr. etanola i acetona.<sup>2,61</sup> Također je opisano i pranje kose u tri i više koraka s različitim otopinama u nizu kao što je: detergent – voda – aceton,<sup>61</sup> voda – detergent – voda – metanol,<sup>67,68</sup> detergent – voda – etanol,<sup>69</sup> aceton – voda – aceton<sup>70,71</sup> te aceton – detergent – voda – aceton što je način pranja preporučen od strane Međunarodne agencije za atomsku energiju.<sup>72</sup> Osim primjene organskih otapala u literaturi su prisutne i studije koje primjenjuju kiseline za uklanjanje vanjskih kontaminacija s kose.<sup>63,73</sup>

### 4.2.2. Ispitivanje učinkovitosti otopine za pranje kose i ultrazvučnih valova

S obzirom da još uvijek nema standardne prihvaćene procedure na koji je način te s kojim otopinama potrebno oprati kosu prije same analize elemenata u kosi, cilj ovoga rada bio je ispitati učinkovitost pranja kose primijenom različitih odabranih otopina i postupaka radi uklanjanja vanjske kontaminacije kose. Određivanjem masenih udjela elemenata u neopranim uzorcima kose dobili smo informaciju o početnom stanju elemenata u uzorku kosi, odnosno ukupnom masenom udjelu elemenata uključujući kontaminaciju. Oduzimanjem udjela elementa preostalog u kosi nakon pranja (omjer masenog udjela nakon pranja u odnosu na neoprano vrijednost) određuje se postotak uklonjenog elementa s kose (% opranosti), odnosno učinkovitost pranja.<sup>61,63,73</sup> U ovome radu učinkovitost pranja određena je za 12 elemenata uz pomoć dva dostupna nepoznata uzorka kose oprana na 13 različitih načina (slika 6). Treba razlikovati endogeno i egzogeno vezane elemente u kosi. Endogeni elementi u kosi su oni elementi koji se ugrađuju u vlasi kose prilikom njezinog rasta i odraz su izloženosti elementima putem hrane ili zbog navika i načina života (navika pušenja cigareta, konzumiranja alkohola i sl.). Egzogeno vezani elementi su vezani za površinu vlasi kose i odraz su vanjske kontaminacije nastale prilikom uzimanja i skladištenja uzorka za analizu, ali i kao rezultat primjene različitih kozmetičkih pripravaka za kosu, znojenja, izloženosti cigaretnom dimu i sl. Eliminiranje egzogeno vezanih elemenata prije njihovog određivanja važan je korak jer oni

moгу dovesti do krive interpretacije rezultata pri procjeni nutritivnog statusa ili dijagnozi bolesti. Egzogeno vezani elementi uspješno se uklanjaju pranjem kose neposredno prije analize međutim, pri izboru otopina za pranje potrebno je voditi računa da se postupkom pranja uklone samo egzogeno vezani elementi, odnosno da ne dođe do razaranja strukture kose pri čemu postoji mogućnost uklanjanja i endogeno vezanih elemenata ugrađenih u kosu.<sup>2</sup>

U tablici 7 i 8 prikazani su maseni udjeli 12 elemenata u dva „ispitna uzorka - 1 i 2“ oprana s 13 različitih postupaka pranja kose prije ICP–MS analize elemenata. Rezultati su prikazani za svaki uzorak pojedinačno jer su dostupna dva uzorka kose bili vidno drugačiji: „uzorak 1“ bio je kosa smeđe boje, a „uzorak 2“ prosijeda crna kosa. Također su i razine elemenata u kosi bile različite između uzoraka. Uzorak smeđe kose ima veće masene udjele esencijalnih elemenata Ca, Mg i Zn te toksičnog polumetala Hg, a niže masene udjele Mn i Pb, dok je sadržaj ostalih elemenata bio podjednak kod oba uzorka. Neka istraživanja pokazuju da su maseni udjeli Ca, Mg i Zn negativno, a Pb pozitivno povezane s dobi ispitanika,<sup>2,74-76</sup> druga pak pokazuju da dob utječe općenito na porast razine elemenata u kosi, a u nekima ta povezanost nije nađena.<sup>77,78</sup> S obzirom na kontradiktorne nalaze u literaturi, istraživanja razina elemenata u kosi potrebno je provoditi u dobro definiranim dobnim skupinama. Također, na razinu elemenata u kosi osim dobi mogu utjecati i drugi brojni čimbenici kao što su spol, rasa, boja kose, prehrambene navike, metabolički procesi te okolišna izloženost.<sup>2<</sup>

S obzirom da različiti elementi imaju različita svojstva i sposobnosti vezanja u kosi, pronalaženje ujednačenog postupka pranja u svrhu multielementne analize predstavlja brojne izazove. Rezultati ovoga istraživanja pokazuju da učinkovitost pranja kose ovisi o otopini (organsko otapalo ili kiselina) kojom se pere, pojedinom elementu te vrsti kose (odnosno boji i duljini, dobi, rasi, spolu te prehrambenim i pušačkim navikama donatora). Najniži postotak uklonjenih elemenata dobiven je za uzorke oprane samo u 0,2 % TX-100 (postupak P0), gdje se postotak uklonjenosti kretao od 1–5 % za Cu, Mo, Pb i Zn, od 12–21 % za Fe i Mn u oba uzorka, dok je postotak uklonjenih elemenata za ostale analizirane elemente (As, Ca, Cd, Hg, Mg, Se) različit između dva uzorka. Iz dobivenih rezultata je vidljivo da postupci koji su u koracima pranja imali zajedno uključeno organsko otapalo i TX-100 imaju isti ili čak 1-1,5 (uzorak 1) odnosno 1,1-2 (uzorak 2) posto veći postotak uklonjenog elementa. Organska otapala kao što su etanol, metanol, aceton ili etil-acetat uklanjaju djelomično masnoću, prašinu i organske nečistoće, dok neionski detergent još dodatno pospješuje pranje kose. Istraživanje provedeno u 75 muškaraca (dobi od 25-35 god.) pokazalo je da destilirana voda ne uklanja vanjsku kontaminaciju s kose, dok se pranjem kose s etanolom i acetonom uklanja organska kontaminacija, a najbolji učinak pranja kose postignut je primijenom postupka pranja koji je

uključivao zajedno neionski detergent i aceton jer detergent uklanja masnoću i prašinu s kose, a organsko otapalo organske komponente.<sup>61</sup> Još davne 1965. godine Bate i Dyer predložili su upotrebu neionskog detergenta za pranje kose u forenzičke svrhe.<sup>2</sup>

Tablica 7. Maseni udjeli ( $w$ ) elemenata i postotak opranosti (%) u homogenatima uzoraka ljudske kose opranim primjenom različitih otopina: „ispitni uzorak - 1“.

		As	Ca	Cd	Cu	Fe	Hg	Mg	Mn	Mo	Pb	Se	Zn
Neoprano	$W, \mu\text{g/g}$	<b>0,02</b>	<b>3860</b>	<b>0,02</b>	<b>17</b>	<b>9,1</b>	<b>2,2</b>	<b>677</b>	<b>0,07</b>	<b>0,03</b>	<b>2,0</b>	<b>0,50</b>	<b>363</b>
	SD	0,002	209	0,004	1,5	0,40	0,09	8	0,01	0,002	0,24	0,08	23
P0	$W, \mu\text{g/g}$	<b>0,01</b>	<b>3564</b>	<b>0,02</b>	<b>17</b>	<b>7,8</b>	<b>2,2</b>	<b>597</b>	<b>0,06</b>	<b>0,03</b>	<b>2,0</b>	<b>0,44</b>	<b>349</b>
	SD	0,003	87	0,0003	1,0	0,44	0,10	45	0,004	0,002	0,12	0,01	2
	% oprano	17	8	23	2	15	2	6	21	5	2	11	4
P1	$W, \mu\text{g/g}$	<b>0,01</b>	<b>3619</b>	<b>0,02</b>	<b>17</b>	<b>7,7</b>	<b>2,2</b>	<b>597</b>	<b>0,06</b>	<b>0,03</b>	<b>2,0</b>	<b>0,44</b>	<b>331</b>
	SD	0,0003	13	0,0001	0,2	0,47	0,04	41	0,005	0,00002	0,28	0,01	2
	% oprano	28	6	23	3	15	2	15	22	5	3	11	9
P2	$W, \mu\text{g/g}$	<b>0,01</b>	<b>3560</b>	<b>0,02</b>	<b>17</b>	<b>7,6</b>	<b>2,2</b>	<b>545</b>	<b>0,06</b>	<b>0,03</b>	<b>1,9</b>	<b>0,44</b>	<b>316</b>
	SD	0,001	45	0,00002	0,2	0,43	0,35	14	0,01	0,000002	0,11	0,02	3
	% oprano	38	8	24	3	17	1	20	21	5	6	11	13
P3	$W, \mu\text{g/g}$	<b>0,01</b>	<b>3542</b>	<b>0,02</b>	<b>16</b>	<b>7,5</b>	<b>2,2</b>	<b>544</b>	<b>0,06</b>	<b>0,03</b>	<b>1,8</b>	<b>0,43</b>	<b>305</b>
	SD	0,002	81	0,002	0,04	0,20	0,05	15	0,001	0,0001	0,03	0,01	1
	% oprano	38	8	26	7	18	-1	18	21	7	10	13	16
P4	$W, \mu\text{g/g}$	<b>0,01</b>	<b>3483</b>	<b>0,02</b>	<b>16</b>	<b>7,3</b>	<b>2,2</b>	<b>530</b>	<b>0,06</b>	<b>0,03</b>	<b>1,9</b>	<b>0,43</b>	<b>304</b>
	SD	0,0005	46	0,001	0,2	0,14	0,004	2	0,002	0,0008	0,02	0,02	1
	% oprano	43	10	27	7	20	1	21	20	8	8	14	16
P5	$W, \mu\text{g/g}$	<b>0,01</b>	<b>3514</b>	<b>0,02</b>	<b>16</b>	<b>7,3</b>	<b>2,2</b>	<b>536</b>	<b>0,06</b>	<b>0,03</b>	<b>1,9</b>	<b>0,43</b>	<b>300</b>
	SD	0,000	84	0,001	0,2	0,10	0,04	4	0,001	0,0004	0,04	0,01	15
	% oprano	50	9	26	7	20	2	20	22	9	7	14	17
P6	$W, \mu\text{g/g}$	<b>0,01</b>	<b>3549</b>	<b>0,02</b>	<b>16</b>	<b>7,2</b>	<b>2,2</b>	<b>536</b>	<b>0,06</b>	<b>0,03</b>	<b>1,8</b>	<b>0,42</b>	<b>294</b>
	SD	0,001	45	0,002	0,6	0,64	0,06	11	0,0002	0,0014	0,09	0,01	7
	% oprano	48	8	28	6	21	1	21	25	10	11	15	19
P7	$W, \mu\text{g/g}$	<b>0,01</b>	<b>3542</b>	<b>0,02</b>	<b>16</b>	<b>7,1</b>	<b>2,2</b>	<b>547</b>	<b>0,06</b>	<b>0,03</b>	<b>1,7</b>	<b>0,43</b>	<b>279</b>
	SD	0,001	35	0,0002	1,1	1,80	0,02	22	0,003	0,001	0,32	0,04	4
	% oprano	50	8	28	7	22	0	16	24	11	15	14	23
P8	$W, \mu\text{g/g}$	<b>0,01</b>	<b>3491</b>	<b>0,02</b>	<b>16</b>	<b>7,1</b>	<b>2,2</b>	<b>531</b>	<b>0,05</b>	<b>0,03</b>	<b>1,8</b>	<b>0,43</b>	<b>286</b>
	SD	0,001	167	0,002	1,1	0,10	0,02	16	0,002	0,0008	0,17	0,002	18
	% oprano	48	10	31	7	23	0	23	28	11	12	13	21
P9	$W, \mu\text{g/g}$	<b>0,01</b>	<b>1587</b>	<b>0,01</b>	<b>9,3</b>	<b>6,4</b>	<b>1,9</b>	<b>375</b>	<b>0,04</b>	<b>0,03</b>	<b>0,66</b>	<b>0,43</b>	<b>131</b>
	SD	0,002	269	0,002	2,2	0,20	0,04	72	0,005	0,0006	0,36	0,02	6
	% oprano	60	59	70	46	30	13	52	52	14	68	14	64
P10	$W, \mu\text{g/g}$	<b>0,01</b>	<b>821</b>	<b>0,01</b>	<b>8,3</b>	<b>5,4</b>	<b>1,5</b>	<b>254</b>	<b>0,02</b>	<b>0,02</b>	<b>0,62</b>	<b>0,41</b>	<b>89</b>
	SD	0,001	88	0,0003	1,3	1,07	0,42	2	0,01	0,005	0,11	0,07	8
	% oprano	63	79	75	51	41	32	62	74	24	70	18	76
P11	$W, \mu\text{g/g}$	<b>0,01</b>	<b>404</b>	<b>0,004</b>	<b>8,0</b>	<b>5,3</b>	<b>0,86</b>	<b>257</b>	<b>0,02</b>	<b>0,02</b>	<b>0,67</b>	<b>0,42</b>	<b>57</b>
	SD	0,0002	65	0,001	0,33	0,52	0,03	2,2	0,006	0,0004	0,11	0,02	7
	% oprano	60	90	83	53	42	61	62	78	27	67	15	84
P12	$W, \mu\text{g/g}$	<b>0,01</b>	<b>392</b>	<b>0,003</b>	<b>7,8</b>	<b>5,2</b>	<b>0,63</b>	<b>210</b>	<b>0,01</b>	<b>0,02</b>	<b>0,66</b>	<b>0,42</b>	<b>73</b>
	SD	0,00003	30	0,001	0,12	0,25	0,007	19	0,001	0,0005	0,07	0,02	2,2
	% oprano	61	90	86	54	43	72	67	83	31	67	15	80

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i standardna devijacija (SD) te postotak uklonjenog elementa s obzirom na neoprani uzorak (% oprano). Postupci P0-P12 opisani u slici 6 na str. 21.

Tablica 8. Maseni udjeli ( $w$ ) elemenata i postotak opranosti (%) u homogenatima uzoraka ljudske kose opranim primjenom različitih otopina: „ispitni uzorak - 2“.

		As	Ca	Cd	Cu	Fe	Hg	Mg	Mn	Mo	Pb	Se	Zn
Neoprano	<b><math>W</math>, <math>\mu\text{g/g}</math></b>	<b>0,03</b>	<b>1209</b>	<b>0,09</b>	<b>14</b>	<b>10</b>	<b>0,09</b>	<b>101</b>	<b>0,51</b>	<b>0,03</b>	<b>6,0</b>	<b>0,54</b>	<b>144</b>
	<i>SD</i>	0,002	40	0,00001	0,2	0,19	0,005	3	0,03	0,0002	0,15	0,03	5
P0	<b><math>W</math>, <math>\mu\text{g/g}</math></b>	<b>0,03</b>	<b>981</b>	<b>0,08</b>	<b>13</b>	<b>8,8</b>	<b>0,07</b>	<b>82</b>	<b>0,43</b>	<b>0,03</b>	<b>5,8</b>	<b>0,53</b>	<b>142</b>
	<i>SD</i>	0,001	10	0,0004	0,1	0,27	0,0002	3	0,001	0,000005	0,13	0,02	2
	% oprano	1	19	6	2	12	14	19	16	1	4	2	1
P1	<b><math>W</math>, <math>\mu\text{g/g}</math></b>	<b>0,03</b>	<b>943</b>	<b>0,08</b>	<b>13</b>	<b>8,7</b>	<b>0,07</b>	<b>80</b>	<b>0,43</b>	<b>0,03</b>	<b>5,5</b>	<b>0,53</b>	<b>142</b>
	<i>SD</i>	0,0001	13	0,005	0,1	0,13	0,001	1	0,01	0,00001	0,43	0,01	2
	% oprano	1	22	9	4	14	14	21	17	1	8	2	1
P2	<b><math>W</math>, <math>\mu\text{g/g}</math></b>	<b>0,03</b>	<b>933</b>	<b>0,08</b>	<b>13</b>	<b>8,7</b>	<b>0,07</b>	<b>65</b>	<b>0,42</b>	<b>0,03</b>	<b>5,3</b>	<b>0,53</b>	<b>142</b>
	<i>SD</i>	0,001	88	0,002	0,1	0,01	0,004	6	0,02	0,0002	0,04	0,01	2
	% oprano	2	23	16	3	14	16	36	18	1	12	2	1
P3	<b><math>W</math>, <math>\mu\text{g/g}</math></b>	<b>0,03</b>	<b>937</b>	<b>0,08</b>	<b>13</b>	<b>8,6</b>	<b>0,07</b>	<b>65</b>	<b>0,42</b>	<b>0,03</b>	<b>5,2</b>	<b>0,53</b>	<b>142</b>
	<i>SD</i>	0,0002	4	0,00004	0,6	0,13	0,001	1	0,03	0,0002	0,07	0,003	0
	% oprano	1	22	16	3	15	15	35	19	1	12	2	1
P4	<b><math>W</math>, <math>\mu\text{g/g}</math></b>	<b>0,03</b>	<b>937</b>	<b>0,08</b>	<b>13</b>	<b>8,6</b>	<b>0,07</b>	<b>66</b>	<b>0,42</b>	<b>0,03</b>	<b>5,3</b>	<b>0,53</b>	<b>142</b>
	<i>SD</i>	0,001	39	0,00002	0,01	0,003	0,002	7	0,02	0,0003	0,05	0,001	1
	% oprano	0	23	16	3	14	16	35	18	2	12	2	1
P5	<b><math>W</math>, <math>\mu\text{g/g}</math></b>	<b>0,03</b>	<b>954</b>	<b>0,08</b>	<b>13</b>	<b>8,7</b>	<b>0,07</b>	<b>65</b>	<b>0,42</b>	<b>0,03</b>	<b>5,2</b>	<b>0,53</b>	<b>143</b>
	<i>SD</i>	0,001	33	0,002	0,28	0,11	0,003	2	0,04	0,0004	0,16	0,02	1
	% oprano	2	21	16	4	14	15	36	18	3	13	2	1
P6	<b><math>W</math>, <math>\mu\text{g/g}</math></b>	<b>0,03</b>	<b>969</b>	<b>0,08</b>	<b>13</b>	<b>8,6</b>	<b>0,07</b>	<b>66</b>	<b>0,42</b>	<b>0,03</b>	<b>5,3</b>	<b>0,53</b>	<b>143</b>
	<i>SD</i>	0,0004	82	0,005	0,45	0,01	0,01	2	0,02	0,00002	0,35	0,01	1
	% oprano	3	20	17	3	15	15	35	18	3	12	2	1
P7	<b><math>W</math>, <math>\mu\text{g/g}</math></b>	<b>0,03</b>	<b>944</b>	<b>0,08</b>	<b>13</b>	<b>8,5</b>	<b>0,07</b>	<b>65</b>	<b>0,43</b>	<b>0,03</b>	<b>5,2</b>	<b>0,53</b>	<b>143</b>
	<i>SD</i>	0,001	105	0,0002	0,16	0,43	0,001	3	0,001	0,0007	0,22	0,01	0
	% oprano	4	22	15	3	16	14	35	17	4	13	2	1
P8	<b><math>W</math>, <math>\mu\text{g/g}</math></b>	<b>0,03</b>	<b>957</b>	<b>0,08</b>	<b>13</b>	<b>8,5</b>	<b>0,07</b>	<b>66</b>	<b>0,43</b>	<b>0,03</b>	<b>5,2</b>	<b>0,53</b>	<b>143</b>
	<i>SD</i>	0,001	4	0,003	0,33	0,25	0,001	1	0,01	0,0004	0,16	0,01	1
	% oprano	4	21	17	3	15	14	35	16	4	13	2	0
P9	<b><math>W</math>, <math>\mu\text{g/g}</math></b>	<b>0,02</b>	<b>686</b>	<b>0,06</b>	<b>11,2</b>	<b>8,0</b>	<b>0,05</b>	<b>58</b>	<b>0,31</b>	<b>0,03</b>	<b>4,1</b>	<b>0,51</b>	<b>103</b>
	<i>SD</i>	0,004	12	0,003	0,14	0,52	0,005	1	0,06	0,0002	0,20	0,01	4
	% oprano	24	43	36	18	21	38	43	40	14	31	5	28
P10	<b><math>W</math>, <math>\mu\text{g/g}</math></b>	<b>0,03</b>	<b>540</b>	<b>0,06</b>	<b>11,2</b>	<b>7,9</b>	<b>0,05</b>	<b>58</b>	<b>0,30</b>	<b>0,03</b>	<b>4,1</b>	<b>0,51</b>	<b>104</b>
	<i>SD</i>	0,004	17	0,006	0,58	0,07	0,01	6	0,02	0,001	0,002	0,002	12
	% oprano	19	55	38	18	22	38	42	42	14	31	6	28
P11	<b><math>W</math>, <math>\mu\text{g/g}</math></b>	<b>0,03</b>	<b>476</b>	<b>0,06</b>	<b>11</b>	<b>7,7</b>	<b>0,05</b>	<b>54</b>	<b>0,30</b>	<b>0,03</b>	<b>4,1</b>	<b>0,51</b>	<b>104</b>
	<i>SD</i>	0,001	2	0,0005	0,28	0,16	0,0004	0,24	0,04	0,0001	0,19	0,01	3
	% oprano	18	61	37	18	24	36	47	43	16	31	6	27
P12	<b><math>W</math>, <math>\mu\text{g/g}</math></b>	<b>0,03</b>	<b>465</b>	<b>0,06</b>	<b>11,2</b>	<b>7,7</b>	<b>0,05</b>	<b>52</b>	<b>0,30</b>	<b>0,03</b>	<b>4,1</b>	<b>0,50</b>	<b>103</b>
	<i>SD</i>	0,002	43	0,002	0,26	0,46	0,002	9,0	0,07	0,0004	0,47	0,003	4
	% oprano	15	62	38	18	24	36	48	43	16	31	7	28

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i standardna devijacija (SD) te postotak uklonjenog elementa s obzirom na neoprani uzorak (% oprano). Postupci P0-P12 opisani u slici 6 na str. 21.

Iako je Međunarodna agencija za atomsku energiju (IAEA) preporučila i propisala način pranja kose prije elementne analize, taj postupak pranja nije općenito prihvaćen i upotrebljavan u objavljenim istraživanjima, a osobito onima u kojima se određuje više elemenata istovremeno (tablica D1). Kao glavni argument neprihvatanja preporučenog postupka pranja navodi se da aceton dobro uklanja nečistoće s kose, ali dovodi do mikroskopskih oštećenja kose.<sup>1</sup> Stoga se u mnogim studijama uvode drugi načini pranja kose koji uključuju primjenu samo ultračiste vode ili detergenta za uklanjanje vanjskih kontaminacija, potom primjenu dva organska otapala ili kombinaciju organskog otapala, vode i detergenta pa čak i primjenu kiselina za uklanjanje vanjskih kontaminacija s kose (tablica D1). Rezultati ovoga rada pokazali su da svi postupci pranja podjednako uklanjaju određeni element s površine kose, a dodatkom detergenta pospešuje se (do 2 %) uklanjanje vanjskih kontaminacija. Izuzetno ovom zaključku su postupci gdje se upotrebljavala kiselina za skidanje masnoće, prašine i drugih kontaminacija s kose (postupci od P9-P12) gdje je vidno primijećeno oštećenje kose već pri prvom koraku (promjena boje, ispuhalost kose). U postupcima gdje je upotrebljena dušična kiselina (P9 i P10) postotak uklonjenog elementa kretao se od 50-80 % za sve određivane elemente, osim za Cu, Fe (30–50 %) te Hg, Mo i Se (13–30 %) u „ispitnom uzorku -1“, odnosno od 30-55 % u „ispitnom uzorku - 2“ za sve elemente osim za As, Cu, Fe, Mo i Zn (14–30 %) te Se gdje je postotak opranosti bio manji od 10 %. Postotak uklonjenog elementa pri primjeni klorovodične kiseline (P11 i P12) bio je za 2-10 % veći ili vrlo sličan rezultatima dobivenim primjenom dušične kiseline. U nedavno objavljenj studiji, Verrey i suradnici<sup>73</sup> predlažu novi postupak pranja kose za analizu elemenata koji uključuje primjenu TX-100 i dušične te klorovodične kiseline pri niskim vrijednostima pH jer to dovodi do bolje učinkovitosti pranja kose. Uvođenje kiselina u postupak pranja kose autori obrazlažu rezultatima istraživanja elemenata u sedimentu gdje se za ekstrakciju elemenata s površine sedimenta koristi kiselina. Međutim iz dobivenih rezultata možemo zaključiti da kiselina kao otapalo nije pogodna za pranje kose jer njezinom primjenom ne možemo sa sigurnošću zaključiti da su s površine kose uklonjeni samo egzogeno vezani elementi ili da je došlo do uklanjanja endogeno vezanih elemenata uslijed razaranja strukture kose.

U ovom istraživanju također je ispitan i utjecaj primjene ultrazvučne kupelji na učinkovitost pranja kose za analizu elemenata. Tako su postupci pranja provedeni na uzorcima jedan i dva ponovljeni uz primjenu ultrazvučne kupelji tijekom prvog koraka pranja (tablica 9 i 10).

Tablica 9. Maseni udjeli (*w*) elemenata i postotak opranosti (%) u homogenatima uzoraka ljudske kose opranim primjenom različitih otopina uz primjenu ultrazvučne kupelji tijekom prvog koraka pranja: „ispitni uzorak - 1“.

		As	Ca	Cd	Cu	Fe	Hg	Mg	Mn	Mo	Pb	Se	Zn
Neoprano	<b>W, µg/g</b>	<b>0,02</b>	<b>3860</b>	<b>0,02</b>	<b>17</b>	<b>9,1</b>	<b>2,2</b>	<b>677</b>	<b>0,07</b>	<b>0,03</b>	<b>2,0</b>	<b>0,50</b>	<b>363</b>
	<i>SD</i>	0,002	209	0,004	1,5	0,40	0,09	8	0,01	0,002	0,24	0,08	23
P0	<b>W, µg/g</b>	<b>0,01</b>	<b>3564</b>	<b>0,02</b>	<b>16,8</b>	<b>7,8</b>	<b>2,2</b>	<b>597</b>	<b>0,06</b>	<b>0,03</b>	<b>2,0</b>	<b>0,44</b>	<b>349</b>
	<i>SD</i>	0,003	87	0,0003	1,0	0,44	0,10	45	0,004	0,002	0,12	0,01	2
	% oprano	17	8	23	2	15	2	6	21	5	2	11	4
P1	<b>W, µg/g</b>	<b>0,01</b>	<b>3577</b>	<b>0,01</b>	<b>16</b>	<b>7,7</b>	<b>2,2</b>	<b>577</b>	<b>0,06</b>	<b>0,03</b>	<b>1,9</b>	<b>0,43</b>	<b>322</b>
	<i>SD</i>	0,001	165	0,004	1,3	0,28	0,03	3	0,010	0,00004	0,06	0,07	21
	% oprano	30	7	34	7	16	3	15	23	4	6	13	11
P2	<b>W, µg/g</b>	<b>0,01</b>	<b>3578</b>	<b>0,01</b>	<b>16</b>	<b>7,8</b>	<b>2,1</b>	<b>547</b>	<b>0,06</b>	<b>0,03</b>	<b>1,9</b>	<b>0,43</b>	<b>309</b>
	<i>SD</i>	0,002	136	0,0002	0,2	0,32	0,004	7	0,0014	0,0004	0,02	0,04	5
	% oprano	39	7	35	9	15	4	19	26	5	7	13	15
P3	<b>W, µg/g</b>	<b>0,01</b>	<b>3566</b>	<b>0,01</b>	<b>15</b>	<b>7,5</b>	<b>2,1</b>	<b>543</b>	<b>0,05</b>	<b>0,03</b>	<b>1,9</b>	<b>0,43</b>	<b>308</b>
	<i>SD</i>	0,0001	79	0,0002	0,7	0,18	0,11	13	0,0001	0,0003	0,01	0,004	6
	% oprano	42	8	35	10	17	5	20	28	6	7	13	15
P4	<b>W, µg/g</b>	<b>0,01</b>	<b>3628</b>	<b>0,01</b>	<b>15</b>	<b>7,6</b>	<b>2,1</b>	<b>531</b>	<b>0,05</b>	<b>0,03</b>	<b>1,9</b>	<b>0,42</b>	<b>312</b>
	<i>SD</i>	0,001	111	0,005	0,3	0,30	0,02	11	0,0003	0,002	0,001	0,01	1
	% oprano	46	6	37	9	17	5	22	29	10	6	14	14
P5	<b>W, µg/g</b>	<b>0,01</b>	<b>3485</b>	<b>0,01</b>	<b>15</b>	<b>7,4</b>	<b>2,1</b>	<b>533</b>	<b>0,05</b>	<b>0,03</b>	<b>1,9</b>	<b>0,43</b>	<b>311</b>
	<i>SD</i>	0,0001	85	0,001	0,1	0,23	0,19	4	0,0008	0,0005	0,05	0,001	1
	% oprano	46	10	38	11	19	5	21	28	10	8	13	14
P6	<b>W, µg/g</b>	<b>0,01</b>	<b>3407</b>	<b>0,01</b>	<b>16</b>	<b>7,3</b>	<b>2,1</b>	<b>529</b>	<b>0,05</b>	<b>0,03</b>	<b>1,9</b>	<b>0,43</b>	<b>312</b>
	<i>SD</i>	0,002	169	0,002	0,1	0,01	0,08	14	0,0004	0,0006	0,11	0,06	10
	% oprano	51	12	36	9	20	5	22	29	10	7	13	14
P7	<b>W, µg/g</b>	<b>0,01</b>	<b>3296</b>	<b>0,01</b>	<b>16</b>	<b>7,2</b>	<b>2,1</b>	<b>533</b>	<b>0,05</b>	<b>0,03</b>	<b>1,8</b>	<b>0,43</b>	<b>313</b>
	<i>SD</i>	0,0001	71	0,001	0,7	0,31	0,09	14	0,0016	0,0013	0,09	0,01	6
	% oprano	51	15	37	9	21	6	21	29	10	10	13	14
P8	<b>W, µg/g</b>	<b>0,01</b>	<b>3315</b>	<b>0,01</b>	<b>16</b>	<b>7,2</b>	<b>2,1</b>	<b>531</b>	<b>0,05</b>	<b>0,03</b>	<b>1,7</b>	<b>0,43</b>	<b>312</b>
	<i>SD</i>	0,0004	219	0,001	0,6	0,01	0,15	11	0,0035	0,0011	0,10	0,01	15
	% oprano	52	14	35	9	21	7	22	28	11	16	14	14
P9	<b>W, µg/g</b>	<b>0,01</b>	<b>1083</b>	<b>0,01</b>	<b>8,9</b>	<b>6,8</b>	<b>1,6</b>	<b>285</b>	<b>0,03</b>	<b>0,03</b>	<b>0,62</b>	<b>0,43</b>	<b>125</b>
	<i>SD</i>	0,002	230	0,002	0,7	0,05	0,86	67	0,002	0,002	0,10	0,01	22
	% oprano	57	72	72	48	25	29	58	65	17	70	14	66
P10	<b>W, µg/g</b>	<b>0,01</b>	<b>634</b>	<b>0,005</b>	<b>8,2</b>	<b>5,9</b>	<b>1,6</b>	<b>227</b>	<b>0,02</b>	<b>0,03</b>	<b>0,51</b>	<b>0,42</b>	<b>114</b>
	<i>SD</i>	0,001	288	0,002	2,0	0,40	0,02	5	0,004	0,0009	0,11	0,01	44
	% oprano	68	84	78	52	35	29	66	77	22	75	14	69
P11	<b>W, µg/g</b>	<b>0,01</b>	<b>460</b>	<b>0,004</b>	<b>8,3</b>	<b>6,0</b>	<b>0,85</b>	<b>194</b>	<b>0,02</b>	<b>0,02</b>	<b>0,59</b>	<b>0,42</b>	<b>85</b>
	<i>SD</i>	0,001	40	0,0002	0,61	0,08	0,04	7,5	0,005	0,00004	0,08	0,029	5,6
	% oprano	58	88	83	52	34	62	71	78	25	71	15	76
P12	<b>W, µg/g</b>	<b>0,01</b>	<b>358</b>	<b>0,003</b>	<b>7,9</b>	<b>5,7</b>	<b>0,66</b>	<b>164</b>	<b>0,01</b>	<b>0,02</b>	<b>0,52</b>	<b>0,40</b>	<b>72</b>
	<i>SD</i>	0,0002	76	0,0002	1,3	1,1	0,02	7,2	0,003	0,002	0,13	0,02	8,4
	% oprano	61	91	87	54	38	70	76	81	26	74	20	80

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i standardna devijacija (SD) te postotak uklonjenog elementa s obzirom na neoprani uzorak (% oprano). Postupci P0-P12 opisani u slici 6 na str. 21.

Tablica 10. Maseni udjeli ( $w$ ) elemenata i postotak opranosti (%) u homogenatima uzoraka ljudske kose opranim primjenom različitih otopina uz primjenu ultrazvučne kupelji tijekom prvog koraka pranja: „ispitni uzorak - 2“.

		As	Ca	Cd	Cu	Fe	Hg	Mg	Mn	Mo	Pb	Se	Zn
Neoprano	<b><math>W, \mu\text{g/g}</math></b>	<b>0,03</b>	<b>1209</b>	<b>0,09</b>	<b>14</b>	<b>10</b>	<b>0,09</b>	<b>101</b>	<b>0,51</b>	<b>0,03</b>	<b>6,0</b>	<b>0,54</b>	<b>144</b>
	<i>SD</i>	0,002	40	0,00001	0,2	0,19	0,005	3	0,03	0,0002	0,15	0,03	5
P0	<b><math>W, \mu\text{g/g}</math></b>	<b>0,03</b>	<b>981</b>	<b>0,08</b>	<b>13</b>	<b>8,8</b>	<b>0,07</b>	<b>82</b>	<b>0,43</b>	<b>0,03</b>	<b>5,8</b>	<b>0,53</b>	<b>142</b>
	<i>SD</i>	0,001	10	0,0004	0,1	0,27	0,0002	3	0,001	0,000005	0,13	0,02	2
	<i>% oprano</i>	1	19	6	2	12	14	19	16	1	4	2	1
P1	<b><math>W, \mu\text{g/g}</math></b>	<b>0,03</b>	<b>943</b>	<b>0,08</b>	<b>13</b>	<b>8,6</b>	<b>0,07</b>	<b>76</b>	<b>0,43</b>	<b>0,03</b>	<b>5,5</b>	<b>0,53</b>	<b>143</b>
	<i>SD</i>	0,001	57	0,001	0,14	0,76	0,0003	3	0,009	0,0006	0,05	0,01	0
	<i>% oprano</i>	1	22	8	3	15	16	25	16	3	8	2	0
P2	<b><math>W, \mu\text{g/g}</math></b>	<b>0,03</b>	<b>927</b>	<b>0,08</b>	<b>13</b>	<b>8,3</b>	<b>0,07</b>	<b>76</b>	<b>0,42</b>	<b>0,03</b>	<b>5,2</b>	<b>0,53</b>	<b>143</b>
	<i>SD</i>	0,001	21	0,001	0,4	0,42	0,002	0,4	0,02	0,0005	0,08	0,00	3
	<i>% oprano</i>	1	23	15	3	18	14	25	18	3	13	2	1
P3	<b><math>W, \mu\text{g/g}</math></b>	<b>0,03</b>	<b>933</b>	<b>0,08</b>	<b>13</b>	<b>8,3</b>	<b>0,07</b>	<b>76</b>	<b>0,42</b>	<b>0,03</b>	<b>5,2</b>	<b>0,53</b>	<b>143</b>
	<i>SD</i>	0,002	26	0,004	0,27	0,17	0,001	1	0,02	0,0006	0,02	0,02	0,3
	<i>% oprano</i>	1	23	16	3	18	13	25	19	4	13	1	1
P4	<b><math>W, \mu\text{g/g}</math></b>	<b>0,03</b>	<b>940</b>	<b>0,08</b>	<b>13</b>	<b>8,2</b>	<b>0,07</b>	<b>75</b>	<b>0,42</b>	<b>0,03</b>	<b>5,2</b>	<b>0,53</b>	<b>143</b>
	<i>SD</i>	0,001	7	0,003	0,2	0,03	0,005	3	0,02	0,0004	0,04	0,004	1
	<i>% oprano</i>	2	22	16	3	19	14	26	18	4	12	2	1
P5	<b><math>W, \mu\text{g/g}</math></b>	<b>0,03</b>	<b>938</b>	<b>0,08</b>	<b>13</b>	<b>8,3</b>	<b>0,07</b>	<b>76</b>	<b>0,42</b>	<b>0,03</b>	<b>5,2</b>	<b>0,53</b>	<b>143</b>
	<i>SD</i>	0,0004	8	0,006	0,2	0,05	0,002	9	0,02	0,002	0,08	0,02	3
	<i>% oprano</i>	1	22	17	3	18	12	25	19	3	12	2	0
P6	<b><math>W, \mu\text{g/g}</math></b>	<b>0,03</b>	<b>933</b>	<b>0,08</b>	<b>13</b>	<b>8,3</b>	<b>0,07</b>	<b>74</b>	<b>0,43</b>	<b>0,03</b>	<b>5,2</b>	<b>0,53</b>	<b>143</b>
	<i>SD</i>	0,003	19	0,006	0,1	1,0	0,003	16	0,0004	0,0008	0,02	0,02	3
	<i>% oprano</i>	2	23	16	3	18	15	27	17	4	12	2	1
P7	<b><math>W, \mu\text{g/g}</math></b>	<b>0,03</b>	<b>944</b>	<b>0,08</b>	<b>13</b>	<b>8,2</b>	<b>0,07</b>	<b>76</b>	<b>0,43</b>	<b>0,03</b>	<b>5,3</b>	<b>0,53</b>	<b>143</b>
	<i>SD</i>	0,005	23	0,001	0,2	0,48	0,001	7	0,02	0,00003	0,10	0,001	3
	<i>% oprano</i>	2	22	14	3	19	14	25	17	2	12	2	0
P8	<b><math>W, \mu\text{g/g}</math></b>	<b>0,03</b>	<b>939</b>	<b>0,08</b>	<b>13</b>	<b>8,2</b>	<b>0,07</b>	<b>74</b>	<b>0,42</b>	<b>0,03</b>	<b>5,2</b>	<b>0,53</b>	<b>143</b>
	<i>SD</i>	0,004	196	0,0002	0,3	0,46	0,002	6	0,02	0,0002	0,13	0,0001	3
	<i>% oprano</i>	2	22	15	3	19	15	27	18	4	13	1	1
P9	<b><math>W, \mu\text{g/g}</math></b>	<b>0,03</b>	<b>621</b>	<b>0,06</b>	<b>11,2</b>	<b>7,4</b>	<b>0,05</b>	<b>56</b>	<b>0,30</b>	<b>0,03</b>	<b>4,1</b>	<b>0,51</b>	<b>96</b>
	<i>SD</i>	0,004	53	0,004	0,8	0,68	0,003	4	0,02	0,0002	0,03	0,01	3
	<i>% oprano</i>	18	49	34	18	26	36	44	41	14	31	5	34
P10	<b><math>W, \mu\text{g/g}</math></b>	<b>0,03</b>	<b>533</b>	<b>0,06</b>	<b>11,2</b>	<b>7,4</b>	<b>0,05</b>	<b>55</b>	<b>0,29</b>	<b>0,03</b>	<b>4,1</b>	<b>0,51</b>	<b>96</b>
	<i>SD</i>	0,0003	24	0,001	0,4	0,20	0,002	9	0,04	0,0009	0,03	0,00	1
	<i>% oprano</i>	17	56	37	18	27	37	46	43	15	31	5	33
P11	<b><math>W, \mu\text{g/g}</math></b>	<b>0,03</b>	<b>471</b>	<b>0,06</b>	<b>11,2</b>	<b>7,1</b>	<b>0,05</b>	<b>49</b>	<b>0,28</b>	<b>0,03</b>	<b>4,1</b>	<b>0,51</b>	<b>96</b>
	<i>SD</i>	0,001	28	0,002	0,30	0,41	0,005	1,3	0,009	0,0002	0,01	0,006	2
	<i>% oprano</i>	19	61	37	18	29	36	52	46	15	31	6	33
P12	<b><math>W, \mu\text{g/g}</math></b>	<b>0,03</b>	<b>432</b>	<b>0,06</b>	<b>11,2</b>	<b>7,2</b>	<b>0,05</b>	<b>49</b>	<b>0,28</b>	<b>0,03</b>	<b>4,0</b>	<b>0,51</b>	<b>96</b>
	<i>SD</i>	0,001	1,9	0,005	0,44	0,13	0,01	4,3	0,008	0,002	0,07	0,02	1,9
	<i>% oprano</i>	17	64	36	18	29	39	52	46	17	33	5	33

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i standardna devijacija (SD) te postotak uklonjenog elementa s obzirom na neoprani uzorak (% oprano). Postupci P0-P12 opisani u slici 6 na str. 21.



Rezultati dobiveni primjenom ultrazvučne kupelji tijekom prvog koraka pranja kose pokazuju da je postotak uklonjenosti elemenata s kose veći za 1-10 % ovisno o elementu i postupku pranja. Primjena ultrazvuka česta je u upotrebi pri čišćenju površina zbog mehaničkih i fizikalnih učinaka ultrazvuka pri čemu se smanjuje kemijska potrošnja otapala i poboljšava brzina i učinkovitost čišćenja.

S obzirom da je cilj ovoga rada odrediti 12 elemenata u kosi zdravih roditelja iz kontinentalne i priobalne Hrvatske, a rezultati su pokazali da su svi postupci pranja kose za analizu elemenata zadovoljavajući, osim upotrebe dušične i klorovodične kiseline, uzorci kosa roditelja oprani su postupkom kako i preporučuje Međunarodna agencija za atomsku energiju<sup>72</sup> upotrebom acetona uz primjenu ultrazvučne kupelji, zatim tritonom, vodom i ponovno acetonom.

### 4.3. Maseni udio toksičnih i esencijalnih elemenata u kosi roditelja

#### 4.3.1. Opće karakteristike ispitanica

Opće karakteristike ispitanica, zdravih roditelja uključenih u ovo istraživanje prikazane su u tablici 11. Skupinu ispitanica iz kontinentalnog područja Hrvatske činila je 71 roditelja srednje dobi 30 (raspon 21-42). Preko pedeset posto ispitanica ima završenu srednju školu (59 %), fakultetsku diplomu ima 34 % ispitanica, a 7 % ispitanica ima završenu samo osnovnu školu. Svaka ispitanica sama se je izjasnila kao nepušačica, pušačica ili bivša pušačica. Prema tome 73 % ispitanica su nepušačice, a 27 % ispitanica su pušačice. Hranu morskoga podrijetla konzumiralo je preko 80 % ispitanica, i to 48 % njih konzumira hranu morskog podrijetla najviše jedan put na tjedan, 28 % više od jednom do dva puta na tjedan, a 8 % ispitanica konzumira hranu morskog podrijetla više od dva puta na tjedan, dok 16 % ispitanica ne konzumira hranu morskog podrijetla.

U skupinu ispitanica iz priobalnog područja Hrvatske bilo je uključeno 96 roditelja srednje dobi 29 (raspon 19-39). Što se obrazovanja tiče, vrlo je sličan postotak kao i u skupini iz kontinentalnog područja, 6 % ispitanica ima završenu osnovnu školu, 67 % ima srednju školu, dok 27 % posjeduje fakultetsku diplomu. Od ukupnog broja ispitanica 51 % su nepušačice, a 49 % pušačice. Hranu morskog podrijetla konzumiralo je više od 90 % ispitanica, od čega njih 42 % konzumira hranu morskog podrijetla najviše jedan put na tjedan, 32 % konzumira više od jednom do dva puta na tjedan, a 22 % ispitanica konzumira više od dva puta na tjedan. Samo mali postotak ispitanica (4 %) ne konzumira hranu morskog podrijetla.

Prirast tjelesne težine, broj poroda i tjedan porođaja bili su podjednaki u obje skupine ispitanica, a mineralno-vitaminske dodatke izjasnilo se da uzimaju 84 % ispitanica iz kontinentalnog područja i 71 % iz priobalnog područja.

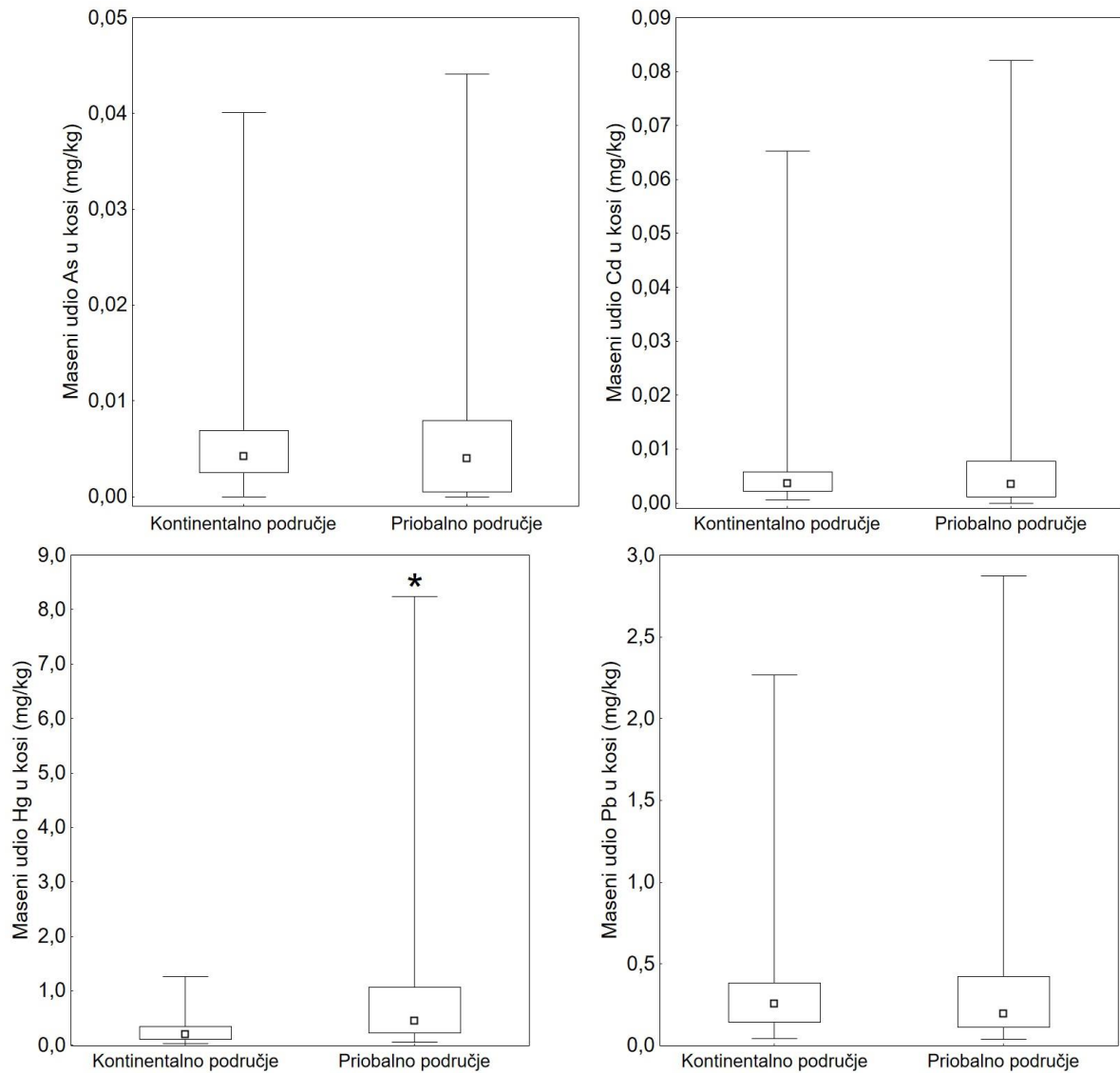
Tablica 11. Opće karakteristike ispitanica, zdravih roditelja, iz kontinentalne i priobalne Hrvatske.

Parametar	Kontinentalno područje (n=71)	Priobalno područje (n=96)
<b>Opće značajke</b>		
Dob / godine ispitanica	30 (21-42)	29 (19-39)
<i>Obrazovanje</i>		
Završena osnovna škola	5 (7 %)	6 (6 %)
Završena srednja škola	42 (59 %)	64 (67 %)
Fakultetska diploma	24 (34 %)	26 (27 %)
Prirast tjelesne težine tijekom trudnoće	15,0 ± 5,6	14,9 ± 4,7
Broj poroda	2 (1-5)	2 (1-5)
Tjedan porođaja	39,3 ± 1,2	39,6 ± 1,3
Mineralno-vitaminski dodaci	60 (84 %)	68 (71 %)
<b>Pušačke navike</b>		
Nepušačice	52 (73 %)	49 (51 %)
Pušačice	19 (27 %)	47 (49 %)
<b>Konsumacija hrane morskoga podrijetla na tjedan</b>		
Bez konzumacije	11 (16 %)	4 (4 %)
konzumira najviše jedan put	34 (48 %)	40 (42 %)
konzumira više od jednom do dva puta	20 (28 %)	31 (32 %)
konzumira više od dva puta	6 (8 %)	21 (22 %)

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SD, medijan (min-max) ili kao broj (postotak %).

*4.3.2. Toksični i esencijalni elementi u kosi roditelja iz kontinentalne i priobalne Hrvatske*

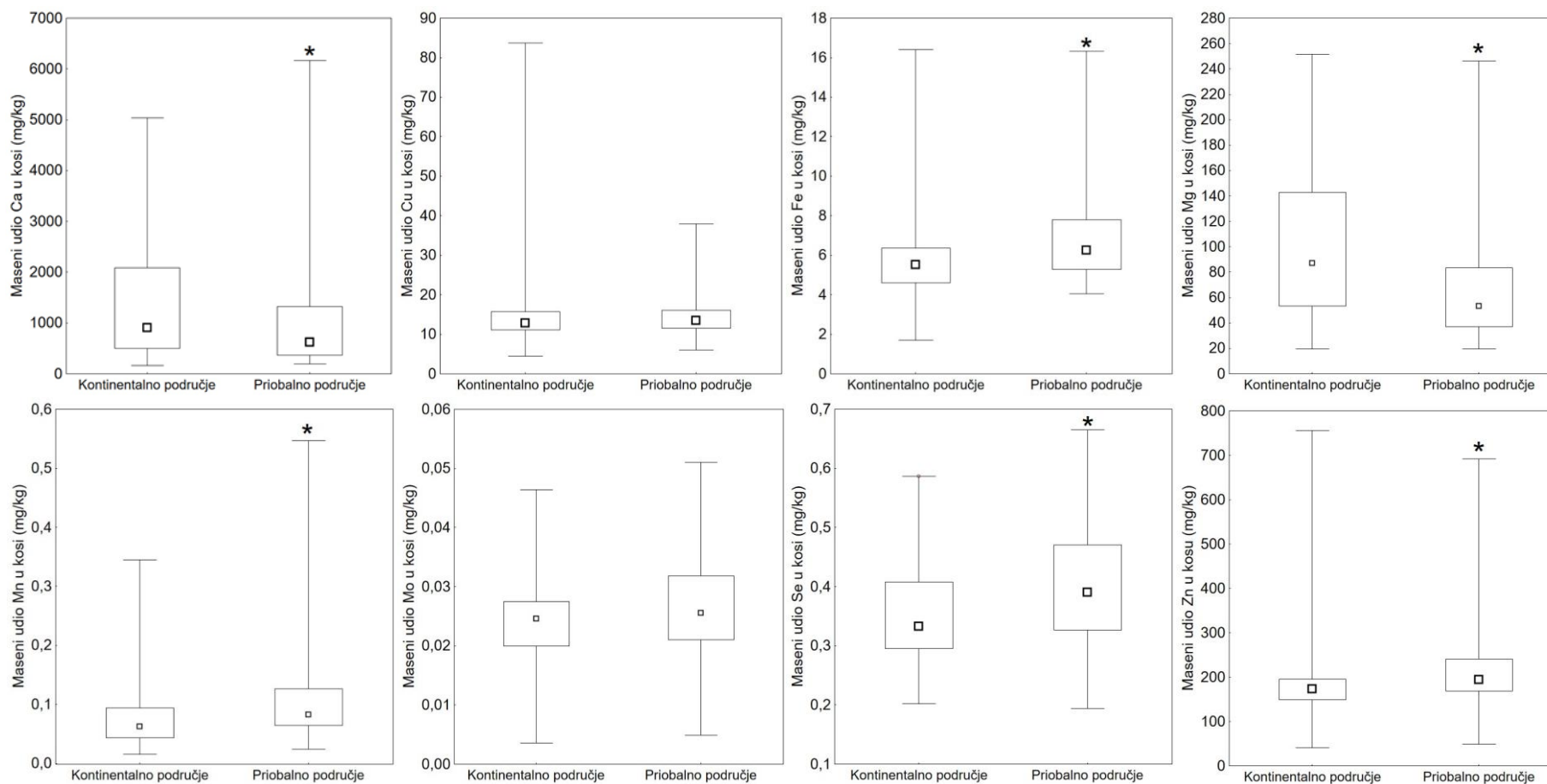
Maseni udio toksičnih elemenata (As, Cd, Hg i Pb) u kosi roditelja iz kontinentalne i priobalne Hrvatske prikazan je na slici 10. Dobiveni rezultati pokazuju da ispitanice iz priobalne Hrvatske imaju statistički značajno veće masene udjele Hg u kosi u odnosu na ispitanice iz kontinentalne Hrvatske (medijan 0,449 mg/kg vs. 0,205 mg/kg). Statistički značajna razlika između kontinentalne i priobalne Hrvatske nije nađena za ostala tri određivana toksična elementa. Opća populacija izložena je Hg najčešće konzumacijom hrane morskog podrijetla, što podrazumijeva izloženost metil-Hg iz hrane.<sup>23,79-81</sup> Ovaj način izloženosti Hg podrazumijeva izloženost malim dozama i ovisi o učestalosti konzumacije te vrsti morske hrane. Dosadašnja istraživanja provedena u žena reproduktivne dobi, trudnica i roditelja pokazuju povezanost učestalosti unosa hrane morskog podrijetla i koncentracije Hg u kosi i krvi.<sup>82-86</sup> S obzirom da više od 90 % ispitanica iz priobalnog područja konzumira hranu morskog podrijetla u odnosu na 80 % ispitanica iz kontinentalnog područja i da veći postotak ispitanica iz priobalnog područja konzumira morsku hranu više od jednom na tjedan (preko 50 %) u odnosu na ispitanice iz kontinentalnog područja gdje 48 % ispitanica konzumira hranu morskog podrijetla najviše jedan put na tjedan, veći maseni udjeli Hg u kosi roditelja iz priobalnog područja mogu se povezati s učestalijim unosom morske hrane. Istraživanje provedeno na uzorku kose duljine 24-36 cm izrežanom u segmente duljine 1 cm pokazalo je povezanost povećane razine Hg i Se u kosi i povremene (sezonske) konzumacije ribe.<sup>87</sup>



Slika 10. Maseni udio toksičnih elemenata (As, Cd, Hg i Pb) u kosi roditelja iz kontinentalne i priobalne Hrvatske (□ medijan; □ 25-75 % inerkvartilni raspon; I min-max vrijednost).

\*Statistička značajna razlika ( $p < 0,05$ ) između priobalnog i kontinentalnog područja testirana je Mann-Whitney U-testom.

Maseni udjeli esencijalnih elemenata (Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Se i Zn) prikazani su na slici 11. Prikazani rezultati pokazuju da ispitanice iz priobalnog u odnosu na kontinentalno područje imaju više masene udjele Fe, Mn, Se i Zn u kosi, a niže masene udjele Ca i Mg. Veći maseni udjeli Fe, Mn, Se i Zn u kosi ispitanica iz priobalnog područja mogu se povezati s različitim prehranom (bogatom lisnatim povrćem i ribom) u tom području te također sa različitim mineralnim sadržajem tla u priobalnom području. Prema geokemijskom atlasu Hrvatske priobalno u odnosu na kontinentalno područje ima veći sadržaj Fe (Medijan 3,99 % vs. 3,01 %), Mn (984,5 mg/kg vs. 596 mg/kg) i Zn (106 mg/kg vs. 74 mg/kg) te drugih elemenata u tlu.<sup>88,89</sup> Niži maseni udjeli Ca i Mg u kosi ispitanica iz priobalnog područja mogu se povezati s manjim unosom tih elemenata, osobito Ca putem konzumacije mlijeka i mliječnih proizvoda u ispitanica iz priobalnog područja. Analiza upitnika o prehrambenim navikama u istraživanju provedenom u žena iz Hrvatske (Istra i Podravina) pokazala je da ispitanice iz Istre imaju značajno niži unos Ca putem mlijeka i mliječnih proizvoda<sup>90</sup> što može utjecati na koncentraciju Pb u krvi i dijastolički krvni tlak.<sup>91,92</sup>



Slika 11. Maseni udio esencijalnih elemenata (Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Se i Zn) u kosi roditelja iz kontinentalne i priobalne Hrvatske (□ medijan; □ 25-75 % inervartilni raspon; ⊥ min-max vrijednost).

\*Statistička značajna razlika ( $p < 0,05$ ) između priobalnog i kontinentalnog područja testirana je Mann-Whitney U-testom.

#### 4.3.3. Razine toksičnih i esencijalnih elemenata u kosi: usporedba istraživanja

Za postavljanje referentnih vrijednosti elemenata u kosi potrebno je provesti daljnja istraživanja jer maseni udio elemenata u kosi ovisi o mnogim čimbenicima, kao što su vrsta kose (duljina, boja), dob, spol, prehrambene i pušačke navike te geografsko područje, što pokazuju i rezultati ovoga rada.<sup>93-95</sup> U tablicama D2 i D3 u dodatku prikazane su literaturne vrijednosti za određivane elemente u kosi u različitim populacijama.

Maseni udjeli As dobiveni u ovom istraživanju slažu se s vrijednostima objavljenim za norvešku populaciju,<sup>87</sup> dok su 20 puta niže u odnosu na švedsku populaciju<sup>96</sup> te 10 puta u odnosu na Poljsku,<sup>65,94</sup> Kanadu<sup>99</sup> i Francusku.<sup>98</sup> Vrijednosti As objavljene za populaciju Pakistana su 100 puta veće u odnosu na vrijednosti dobivene ovim istraživanjem<sup>99</sup> jer maseni udio As u podzemnim vodama Pakistana prelazi granicu od 10 µg/L postavljenu od Svjetske Zdravstvene Organizacije za pitke vode.<sup>100</sup>

Dobivene vrijednosti Cd slažu se s vrijednostima objavljenima u Kanadi, Francuskoj i Rusiji,<sup>97,98,101</sup> a 10-20 puta su manje u odnosu na objavljene rezultate za Švedsku,<sup>96</sup> Norvešku,<sup>87</sup> Poljsku<sup>65,94</sup> i Tursku.<sup>56</sup> Maseni udjeli Cd objavljeni u Pakistanu<sup>99</sup> višestruko su veći (preko 300 puta) u odnosu na vrijednosti dobivene ovim istraživanjem zbog velikog sadržaja Cd u poljoprivrednim poljima uslijed široke primjene raznih gnojiva za uzgoj koja su kontaminirana Cd.<sup>102</sup>

Dobivene vrijednosti Hg u kosi roditelja iz kontinentalne Hrvatske slažu se s objavljenim vrijednostima u Austriji,<sup>103</sup> Sloveniji,<sup>104</sup> Norveškoj<sup>87</sup> i Švedskoj,<sup>96</sup> a dva puta su niže u odnosu na Poljsku.<sup>94</sup> Dok se vrijednosti Hg u kosi ispitanica iz priobalne Hrvatske slažu s prije objavljenim vrijednostima za područje primorske Hrvatske<sup>104</sup> i Francuske.<sup>98</sup>

Maseni udjeli Pb slični su vrijednostima u Francuskoj,<sup>98</sup> Kanadi<sup>97</sup> i Rusiji,<sup>101</sup> a tri do četiri puta su niže u odnosu na vrijednosti objavljene u Švedskoj, Norveškoj, Poljskoj i Austriji.<sup>65,87,94,96,103</sup>

Maseni udjeli Ca dobiveni ovim istraživanjem slažu se s vrijednostima objavljenima u Turskoj, Švedskoj i Poljskoj,<sup>94,96,105</sup> a dva do tri puta su niže od vrijednosti objavljene u trudnica iz Rusije.<sup>101</sup> Dok su maseni udjeli Mg slični vrijednostima u Poljskoj, Švedskoj i Turskoj,<sup>94,95,106</sup> a 1,5-2 puta niže u odnosu na Rusiju.<sup>101</sup> Dobivene vrijednosti u ovom radu za Fe slažu se s vrijednostima objavljenima u trudnica iz Kanade,<sup>97</sup> a 2-3 puta su niže u odnosu na Norvešku, Švedsku i Poljsku.<sup>65,87,94,96</sup>



Vrijednosti Cu usporedive su s vrijednostima u Francuskoj,<sup>98</sup> Poljskoj,<sup>65,94</sup> Turskoj,<sup>56,106</sup> Kanadi<sup>97</sup> i Rusiji,<sup>101</sup> a dva puta su niže u odnosu na Švedsku<sup>96</sup> te 6 puta u odnosu na Norvešku.<sup>87</sup> Dobivene vrijednosti za Zn slične su kao i rezultati objavljeni za Francusku, Švedsku, Norvešku, Poljsku, Kanadu i Rusiju.<sup>65,87,94,96-98,101</sup> Vrijednosti Se slažu se s objavljenim vrijednostima u Francuskoj, Norveškoj, Poljskoj, Kanadi i Rusiji,<sup>65,87,94,97,98,101</sup> a 10 puta su niže u odnosu na Tursku.<sup>106</sup>

Maseni udjeli Mn slični su vrijednostima u Francuskoj,<sup>98</sup> a 10 puta su niže u odnosu na Švedsku, Poljsku, Tursku i Rusiju.<sup>65,94,96,101,106</sup> Dok se maseni udjeli Mo u ovome radu slažu s vrijednostima Mo u Norveškoj, Poljskoj, Francuskoj i Rusiji.<sup>65,87,94,96,98,101</sup>

## § 5. ZAKLJUČAK

U ovom diplomskom radu razvijena je i validirana ICP–MS metoda za određivanje odabranih toksičnih i esencijalnih elemenata (As, Ca, Cd, Cu, Mg, Mn, Mo, Fe, Hg, Pb, Se, Zn) u uzorcima ljudske kose. Na dva uzorka kose ispitana je učinkovitost pranja uzoraka kose za elementnu analizu primjenom različitih otopina (etil-acetat, metanol, etanol, aceton, dušična i klorovodična kiselina i neionski detergent TX-100) i procedura (sa ili bez korištenja ultrazvučnih valova prilikom pranja kose). Optimirana metoda pripreme i validirana analitička ICP–MS metoda primjenjena je za određivanje navedenih toksičnih i esencijalnih elemenata u kosi roditelja iz priobalne i kontinentalne Hrvatske. Ispitana je razlika između ispitanica iz tih različitih područja Hrvatske s obzirom na razine elemenata u kosi.

Na temelju dobivenih rezultata zaključeno je sljedeće:

### Validacija metode

- najniža granica detekcije određena je za Cd, As, Mo, Pb i Se (0,002-0,006 µg/kg), a najviša za Ca, Fe i Zn (1-10 µg/kg);
- točnost, odnosno iskorištenje za sve analizirane elemente bilo je u rasponu od 91 % do 110 %, osim za Fe u IAEA–086 (114 %) te Mn u NIES No.13 (85 %);
- ponovljivost unutar dana bila je < 2,5 %, a između dana < 7 %, pri čemu su zadovoljeni kriteriji prihvatljivosti;
- rezultati ispitivanih validacijskih parametara nalazili su se unutar unaprijed postavljenih kriterija prihvatljivosti pojedinog parametra što pokazuje da je analitička metoda prikladna za namijenjenu svrhu.

### Učinkovitost različitih načina pranja kose prije analize elemenata

- učinkovitost pranja kose ovisi o otopini (organsko otapalo ili kiselina) kojom se kosa pere i određivanom elementu u uzorku kose;
- pranje kose pojedinačnim organskim otapalom ili smjesom otapala podjednako učinkovito uklanja pojedini element s površine kose, a dodatkom detergenta TX-100 u taj postupak pranja pospješuje se (do 2 %) uklanjanje vanjskih kontaminacija;

- primjena dušične ili klorovodične kiseline za pranje kose nije prihvatljiva jer dolazi do oštećenja kose (promjena boje, ispucana kosa) i pri tome do „otpuštanja“ elemenata iz kose;
- primjena ultrazvuka pospješuje učinkovitost pranja kose do 10 % ovisno o elementu i postupku pranja.

#### Određivanje As, Ca, Cd, Cu, Mg, Mn, Mo, Fe, Hg, Pb, Se, Zn u kosi roditelja iz priobalne i kontinentalne Hrvatske

- roditelje iz priobalnog područja Hrvatske imaju veće masene udjele Hg i Se u kosi zbog većeg unosa hrane morskoga podrijetla (ribe) u odnosu na one iz kontinentalnog područja;
- nađeni veći maseni udjeli Fe, Mn i Zn u kosi roditelja iz priobalnog područja u odnosu na one iz kontinentalnog područja mogu se objasniti razlikama mineralnog sastava tla;
- roditelje iz priobalnog područja Hrvatske imaju niže masene udjele Ca i Mg u kosi u odnosu na one iz kontinentalnog područja što je vjerojatno radi manjeg unosa mineralno–vitaminskih dodataka i razlika u konzumiranju mliječnih proizvoda;
- nije nađena značajna razlika As, Cd, Pb, Cu, Mg i Mo u kosi roditelja između kontinentalne i priobalne Hrvatske.

## § 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

AAS	atomska apsorpcijska spektrometrija (eng. <i>Atomic Absorption Spectrometry</i> )
ATSDR	Agencija za toksične supstancije i registar bolesti (eng. <i>Agency for Toxic Substances and Disease Registry</i> )
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (eng. <i>deoxyribonucleic acid</i> )
IAEA	Međunarodna agencija za atomsku energiju (eng. <i>International Atomic Energy Agency</i> )
ICP-MS	spektrometrija masa uz induktivno spregnutu plazmu (eng. <i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i> )
ICP-OES	optička emisijska spektrometrija uz induktivno spregnutu plazmu (eng. <i>inductively coupled plasma optical emission spectrometry</i> )
IQ	koeficijent inteligencije (eng. <i>intelligence quotient</i> )
ETAAS	elektrotermalna atomska apsorpcijska spektrometrija (eng. <i>electrothermal atomic absorption spectrometry</i> )
FAAS	plamena atomska apsorpcijska spektrometrija (eng. <i>flame atomic absorption spectrometry</i> )
LoD	granica detekcije (eng. <i>limit of detection</i> )
LoQ	granica kvantifikacije (eng. <i>limit of quantitation</i> )
NAA	neutronska aktivacijska analiza (eng. <i>neutron activation analysis</i> )
PIXE	protonom inducirana emisija rentgenskog zračenja (eng. <i>particle induced X-ray emission spectrometry</i> )
RNA	ribonukleinska kiselina (eng. <i>ribonucleic acid</i> )
RSD	relativno standardno odstupanje (eng. <i>relative standard deviation</i> )
SD	standardno odstupanje (eng. <i>standard deviation</i> )
-SH	sulfhidrilna skupina (eng. <i>sulfhydryl group</i> )
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija (eng. <i>World Health Organisation</i> )

## § 7. LITERATURNI IZVORI

1. D. Pozebon, G. L. Scheffler, V. L. Dressler, Elemental hair analysis: A review of procedures and applications, *Anal. Chim. Acta* **992** (2017) 1–23.
2. A. Chatt, S. A. Katz, *Hair Analysis: Applications in the Biomedical and Environmental Sciences*, VCH Publishers, New York, 1988.
3. M. Piasek, Mineralni elementi u našem tijelu: putovi unosa i učinci na zdravlje, *Priroda* **107** (2017) 42-47.
4. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), *CERCLA Priority List of Hazardous Substances for 2007*, Centers for Disease Control, SAD, 2010. <http://www.atsdr.cdc.gov/spl/previous/07list.html> (datum pristupa 16. svibnja 2019.)
5. M. C. Henson, M. Piasek, P. J. Chedrese, V. D. Castracane, *Metal toxicity in mammalian reproduction*. U: J.C. Eldridge, J. T. Stevens (ur.), *Endocrine Toxicology*, Third Edition, Informa Healthcare, New York, 2010, str. 256–279.
6. R. B. Hayes, The carcinogenicity of metals in humans, *Cancer Cause. Control* **8** (1997) 371–385.
7. J. Matschullat, Arsenic in the geosphere - a review, *Sci. Total Environ.* **249** (2000) 297–312.
8. M. F. Hughes, Arsenic toxicity and potential mechanisms of action, *Toxicol. Lett.* **133** (2002) 1–16.
9. E. Srebočan, I. Strunjak-Perović, D. Lasić, A. Opačak, D. Knežević, *Znanstveno mišljenje o prisutnosti žive, olova, kadmija i arsena u akvatičnim organizmima na tržištu Republike Hrvatske*, HAH, 2014.
10. T. Kunito, R. Kubota, J. Fujihara, T. Agusa, S. Tanabe, Arsenic in marine mammals, seabirds, and sea turtles, U: D.M. Whitcare (ur.) *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, Vol. 195, Springer, New York, 2008, str. 31–69.
11. G. F. Nordberg, B. A. Fowler, Risk assessment U: G.F. Nordberg, B.A. Fowler, M. Nordberg (ur.) *Handbook on the Toxicology of Metals*, Academic Press, San Diego, 2015, str. 461–486.
12. L. Järup, Hazards of heavy metal contamination, *Br. Med. Bull.* **68** (2003) 167–182.

13. *Exposure to Cadmium: A Major Public Health Concern*, 2010., World Health Organization, <https://www.who.int/ipcs/features/cadmium.pdf> (datum pristupa 15. listopada 2019.)
14. *International Programme on Chemical Safety, Environmental Health Criteria 134, Cadmium*, 1992. World Health Organization (WHO) <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc134.htm> (datum pristupa 15. listopada 2019.)
15. L. Järup, M. Berglund, C. G. Elinder, G. Nordberg, M. Vanter, Health effects of cadmium exposure—a review of the literature and a risk estimate, *Scand. J. Work Env. Health* (1998) 1–51.
16. M. Piasek, M. C. Henson, M. Blanuša, K. Kostial, U: C. B. Fong (ur.), *Assessment of steroid disruption and metal concentrations in human placenta: effects of cigarette smoking*, Smoking and Health Research Frontiers, Nova Science, Hauppague, New York, 2007, str. 119–161.
17. *Final review of scientific information on cadmium*, December 2010. United Nations Environmental Programme (UNEP), [http://wedocs.unep.org/bitstream/handle/20.500.11822/27636/Cadmium\\_Review.pdf](http://wedocs.unep.org/bitstream/handle/20.500.11822/27636/Cadmium_Review.pdf) (datum pristupa 17. studeni 2019.)
18. M. Esteban, A. Castaño, Non-invasive matrices in human biomonitoring: A review, *Environ. Int.* **35** (2009) 438–449.
19. F. S. Al-Fartusie, S. N. Mohssan, Essential trace elements and their vital roles in human body, *Indian J. Adv. Chem. Sci.* **5** (2017) 127–136.
20. J. E. Gray, V. F. Labson, J. N. Weaver, D. P. Krabbenhoft, Mercury and methylmercury contamination related to artisanal gold mining, Suriname, *Geophys. Res. Lett.* **29** (2002) 20–21.
21. H. Satoh, Occupational and environmental toxicology of mercury and its compounds, *Ind. Health* **38** (2000) 153–164.
22. P. Grandjean, P. J. Landrigan, Developmental neurotoxicity of industrial chemicals, *Lancet* **368** (2006) 2167–2178.
23. *International Programme on Chemical Safety, Environmental Health Criteria 101, Methylmercury*, 1990. World Health Organization (WHO) <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc101.htm> (datum pristupa 18. listopada 2019.)

24. European Food Safety Authority (EFSA) Scientific Committee, Statement on the benefits of fish/seafood consumption compared to the risks of methylmercury in fish/seafood, *EFSA J* **13** (2015) 3982.
25. European Food Safety Authority (EFSA) Dietetic Products, Nutrition, and Allergies (NDA), Scientific opinion on health benefits of seafood (fish and shellfish), consumption in relation to health risks associated with exposure to methylmercury, *EFSA J* **12** (2014) 3761.
26. European Food Safety Authority (EFSA) Panel on Contaminants in the Food Chain, Scientific opinion on the risk for public health related to the presence of mercury and methylmercury in food, *EFSA J* **10** (2012) 2985.
27. M. Piasek, A. Mikolić, Minerals and physiology – from essentiality to toxicity: A review of important minerals and their major impact on the human bodys physiology, U: L. Gašperlin, B. Žlender (ur.) *Role of Minerals in Food Technology and Nutrition*, Ljubljana, Slovenija, 2009.
28. Z. Kroner, *Vitamins and Minerals*, ABC-CLIO, LLC, California, 2011.
29. T. Fujita, G. M. Palmieri, Calcium paradox disease: calcium deficiency prompting secondary hyperparathyroidism and cellular calcium overload, *J. Bone Miner. Metab.* **18** (2000) 109–125.
30. C. S. Kovacs, Calcium and Bone Metabolism During Pregnancy and Lactation, *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **10** (2005) 105–118.
31. L. T. Iseri, J. Freed, A. R. Bures, Magnesium deficiency and cardiac disorders, *Am. J. Med.* **58** (1975) 837–846.
32. L. H. Allen, Anemia and iron deficiency: effects on pregnancy outcome, *Am. J. Clin. Nutr.* **71** (2000) 1280–1284.
33. L. Gambling, R. Danzeisen, C. Fosset, H. S. Andersen, S. Dunford, S. K. Srail, H. J. MCArdle, Iron and copper interactions in development and the effect on pregnancy outcome, *J. Nutr.* **133** (2003) 1554–1556.
34. J. Y. Uriu-Adams, R. E. Scherr, L. Lanoue, C. L. Keen, Influence of copper on early development: prenatal and postnatal considerations, *Biofactors* **36** (2010) 136–152.
35. N. Wellinghausen, Immunobiology of gestational zinc deficiency, *Br. J. Nutr.* **85** (2001) S81–S86.

36. M. P. Rayman, H. Wijnen, H. Vader, L. Kooistra, V. Pop, Maternal selenium status during early gestation and risk for preterm birth, *CMAJ* **183** (2011) 549–555.
37. K. M. Brown, J. R. Arthur, Selenium, selenoproteins and human health a review, *Public Health Nutr.* **4** (2001) 593–599.
38. <http://meteoab.ru/stroenie-volos.html> (datum pristupa 9. prosinca 2019.)
39. C. Popescu, H. Höcker, Hair - the most sophisticated biological composite material, *Chem. Soc. Rev.* **36** (2007) 1282–1291.
40. R.S. Houk, V. A. Fassel, G. D. Flesch, H. J. Svec, A. L. Gray, C. E. Taylor, Inductively coupled argon plasma as an ion source for ass spectrometric determination of trace elements, *Anal. Chem.* **52** (1980) 2283–2289.
41. D. Beauchemin, *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Methods*, Queen's University, Kingston, ON, Elsevier Ltd., Kanada, 2017.
42. R. Thomas, *Practical Guide to ICP-MS*, CRC Press, Boca Raton, 2003.
43. R. Thomas, A begginer's guide to ICP – MS, *Spectroscopy* **16** (2001).
44. L. Samuel, K. Nakagawa, T. Kimijima, Optimization of ETV-ICP-MS conditions for the determination of multi-elements in semiconductor grade acids, *Fresen. J. Anal. Chem.* **356** (1996) 31–36.
45. J. S. Hill, *Inductively Coupled Plasma Spectrometry and its Application*, John Wiley and Sons Ltd., Chicester, United Kingdom, 2007.
46. E. J. Drobyshhev, N. D. Solovyev, N. B. Ivanenko, M.Y. Kombarova, A. A. Ganeev, Trace element biomonitoring in hair of school children from a polluted area by sector field inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Trace Elem. Med. Biol.* **39** (2017) 14–20.
47. S. Rončević, *Instrumentna analitika I*, interna skripta, 2017./2018.
48. S. Braggio, R. J. Barnaby, P. Grosi, M. Cugola, A strategy for validation of bioanalytical methods, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **14** (1996) 375–388.
49. *Validation of Test Methods, General Principles and Concepts*, European Federation of National Associations of Measurements, Testing and Analytical Laboratories, EL1545/96, 1996.
50. *Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation*, U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, SAD, 2018.



51. V. Gašljević, *Opća načela i koncepti validacije metoda*, Hrvatsko mjeriteljsko društvo, 2000.
52. K. Lazarić, *Validacija analitičkih metoda*, Hrvatsko mjeriteljsko društvo, 2001.
53. L. Huber, *Validation of Analytical Methods*, Agilent Technologies, Germany, 2011.
54. *Guidance for Industry Analytical Procedures and Methods Validation: Chemistry, Manufacturing, and Controls Documentation*, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, SAD, 2000.
55. T. Yamashita, *Determination of Trace Elements in Hair by ICP-MS*, Application Note Clinical, Agilent Technologies, 2000.
56. E. Varhan Oral, Determination of the Trace Element Levels in Hair of Smokers and Non-Smokers by ICP-MS, *J. Turk. Chem. Soc., Sect. A.* **3** (2016) 367–380.
57. J. Yoshinaga, Y. Shibata, M. Morita, Trace elements determined along single strands of hair by inductively coupled plasma mass spectrometry, *Clin Chem.* **39** (1993) 1650–1655.
58. P. Araujo, Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation, *J. Chromatogr. B* **877** (2009) 2224–2234.
59. *ICH Harmonised Tripartite Guideline, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)*, International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Geneva, Switzerland, 2005.
60. G. Chittleborough, A chemist's view of the analysis of human hair for trace elements, *Sci. Total Environ.* **14** (1980) 53–75.
61. J. Sen, A. B. Das Chaudhuri, Brief communication: Choice of washing method of hair samples for trace element analysis in environmental studies, *Am. J. Phys. Anthropol.* **115** (2001) 289–291.
62. C. Gundacker, K. J. Wittmann, M. Kukuckova, G. Komarnicki, I. Hikkel, M. Gencik, Genetic background of lead and mercury metabolism in a group of medical students in Austria, *Environ. Res.* **109** (2009) 786–796.
63. R. R. Eastman, T. P. Jursa, C. Benedetti, R. G. Lucchini, D. R. Smith, Hair as a biomarker of environmental manganese exposure, *Environ. Sci. Technol.* **47** (2013) 629–637.

64. B. Momčilović, J. Prejac, V. Višnjević, S. Brundić, A. A. Skalny, N. Mimica, High hair selenium mother to fetus transfer after the Brazil nuts consumption, *J. Trace Elem. Med. Biol.* **33** (2016) 110–113.
65. B. Czerny, K. Krupka, M. Ożarowski, A. Seremak-Mrozikiewicz, Screening of trace elements in hair of the female population with different types of cancers in Wielkopolska region of Poland, *Sci. World J.* (2014) 1–15.
66. A. Pena-Fernandez, M. J. Gonzalez-Munoz, M. C. Lobo-Bedmar, Evaluating the effect of age and area of residence in the metal and metalloid contents in human hair and urban topsoils, *Environ. Sci. Pollut. Res.* **23** (2016) 21299–21312.
67. A. Przybyłowicz, P. Chesy, M. Herman, A. Parczewski, S. Walas, W. Piekoszewski, Examination of distribution of trace elements in hair, fingernails and toenails as alternative biological materials, Application of chemometric methods, *Cent. Eur. J. Chem.* **10** (2012) 1590–1599.
68. K. Islam, A. Haque, R. Karim, A. Fajol, E. Hossain, K.A. Salam, N. Ali, Z.A. Saud, M. Rahman, M. Rahman, R. Karim, P. Sultana, M. Hossain, A. A. Akhand, A. Mandal, H. Miyataka, S. Himeno, K. Hossain, Dose-response relationship between arsenic exposure and the serum enzymes for liver function tests in the individuals exposed to arsenic: a cross sectional study in Bangladesh, *Environ. Health* **10** (2011) 1–11.
69. I. Molina-Villalba, M. Lacasaña, M. Rodríguez-Barranco, A.F. Hernández, B. Gonzalez-Alzaga, C. Aguilar-Garduño, F. Gil, Biomonitoring of arsenic, cadmium, lead, manganese and mercury in urine and hair of children living near mining and industrial areas, *Chemosphere* **124** (2015) 83–91.
70. F.-C. Liu, J. Qin, H.-S. Wu, Y.-L. Wu, Y.-L. Zhu, Co and Cr accumulation in hair after metal-on-metal hip resurfacing arthroplasty: Co and Cr accumulation after arthroplasty, *Aust. N. Z. J. Surg.* **81** (2011) 436–439.
71. H. A. Yassa, Autism: a form of lead and mercury toxicity, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **38** (2014) 1016–1024.
72. *Health-Related Monitoring of Trace Element Pollutants Using Nuclear Techniques, Results of Co-Ordinated Research Programmes on Nuclear Methods for Health-Related Monitoring of Trace Element Pollutants and Health-Related Environmental Research Using Nuclear Techniques*, International Atomic Energy Agency (IAEA), IAEA-TECDOC-330, Beč, Austija, 1985.

73. D. Verrey, S. Durand, O. Thomas, V. Lelévrier, P. Quénel, B. Le Bot, A new washing procedure for inorganic element analysis of hair, *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* **29** (2019) 706–717.
74. V. Zakrgynska-Fontaine, J. C. Doré, T. Ojasoo, F. Poirier-Duchêne, C. Viel, Study of the age and sex dependence of trace elements in hair by correspondence analysis, *Biol. Trace Elem. Res.* **61** (1998) 151–168.
75. P. Trojanowski, J. Trojanowski, J. Antonowicz, M. Bokiniec, Lead and cadmium content in human hair in Central Pomerania (Northern Poland), *J. Elementol.* **15** (2010) 363–384.
76. H. Nasser, Trace element levels in nape of neck hair from local population Latakia - Syria: link to sex and age factors, *Int. J. Chem. Stud.* **1** (2014) 27–35.
77. A. Khalique, S. Ahmad, T. Anjum, M. Jaffar, M. H. Shah, N. Shaheen, S. R. Tariq, S. Manzoor, Comparative Study Based on Gender and Age Dependence of Selected Metals in Scalp Hair, *Environ. Monit. Assess.* **104** (2005) 45–57.
78. G. Liang, L. Pan, X. Liu, Assessment of Typical Heavy Metals in Human Hair of Different Age Groups and Foodstuffs in Beijing, China, *Int. J. Environ. Res. Public Health* **14** (2017) 914.
79. E. Ha, N. Basu, S. Bose-O'Reilly, J. G. Dórea, E. McSorley, M. Sakamoto, H. M. Chan, Current progress on understanding the impact of mercury on human health, *Environ. Res.* **52** (2017) 419–433.
80. G. Bjørklund, M. Dadar, J. Mutter, J. Aaseth, The toxicology of mercury: Current research and emerging trends, *Environ. Res.* **159** (2017) 545–554.
81. T. W. Clarkson, L. Magos, G. J. Myers, The toxicology of mercury - current exposures and clinical manifestations, *N. Engl. J. Med.* **349** (2003) 1731–1737.
82. J. G. Dorea, C. M. Donangelo, Early (in uterus and infant) exposure to mercury and lead, *Clin. Nutr.* **25** (2006) 369–376.
83. K. A. Björnberg, M. Vahter, K. P. Grawé, M. Berglund, Methyl mercury exposure in Swedish women with high fish consumption, *Sci. Total. Environ.* **341** (2005) 45–52.
84. K. A. Björnberg, M. Vahter, K. Petersson-Grawé, A. Glynn, S. Cnattingius, P. O. Darnerud, S. Atuma, M. Aune, W. Becker, M. Berglund, Methyl mercury and inorganic mercury in Swedish pregnant women and in cord blood: influence of fish consumption, *Environ. Health Perspect* **111** (2003) 637–641.

85. A. Sekovanić, *Utjecaj polimorfizma metalotioneina 2A i izloženosti cigaretnomu dimu na razinu toksičnih i esencijalnih metala u rodilja te na koncentraciju steroidnih hormona u posteljici*, Doktorski rad, Farmaceutsko – biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2018.
86. A. Sekovanić, T. Orct, J. Jurasović, M. Piasek, A. Sulimanec Grgec, A. Bošnjaković, M. Matek Saric, *Koncentracije žive u uzorcima majčine krvi i kose, posteljici i krvi iz pupčane vrpce u povezanosti s konzumacijom hrane morskoga podrijetla*, 26. hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera s međunarodnim sudjelovanjem: 4. simpozij „Vladimir Prelog“, Šibenik, 2019.
87. K. Gellein, S. Lierhagen, P. S. Brevik, M. Teigen, P. Kaur, T. Singh, T. P. Flaten, T. Syversen, Trace element profiles in single strands of human hair determined by HR-ICP-MS, *Biol. Trace Elem. Res.* **123** (2008) 250–260.
88. J. Halamić, Z. Peh, S. Miko, L. Galović, A. Šorša, Geochemical Atlas of Croatia: Environmental implications and geodynamical thread, *J. Geochem. Explor.* **115** (2012) 36–46.
89. J. Halamić, S. Miko, *Geokemijski atlas Republike Hrvatske*, Hrvatski geološki institut, Zagreb, 2009.
90. V. Matković, K. Kostial, I. Šimonović, R. Buzina, A. Brodarec A, B. C. Nordin, Bone status and fracture rates in two regions of Yugoslavia, *Am. J. Clin. Nutr.* **32** (1979) 540–549.
91. K. Kostial, D. Dekanić, S. Telišman, M. Blanuša, S. Duvančić, D. Prpić-Majić, J. Pongračić, Dietary calcium and blood lead levels in women, *Biol. Trace Elem. Res.* **28** (1991) 181–185.
92. A. Pizent, J. Jurasović, S. Telišman, Blood pressure in relation to dietary calcium intake, alcohol consumption, blood lead, and blood cadmium in female nonsmokers, *J. Trace Elem. Med. Biol.* **15** (2011) 23–30.
93. A. Sukumar, Factors influencing levels of trace elements in human hair, *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **175** (2002) 47–78.
94. K. Chojnacka, H. Górecka, H. Górecki, The effect of age, sex, smoking habits and hair colour on the composition of hair, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **22** (2006) 52–57.
95. V. Bencko, *Hair and Exposure to Environmental Pollutants, Hair in Toxicology: an Important Bio-Monitor*, RSC, Cambridge, 2005.

96. I. Rodushkin, M. D. Axelsson, Application of double focusing sector field ICP-MS for multielemental characterization of human hair and nails, Part II. A study of the inhabitants of northern Sweden, *Sci. Total Environ.* **262** (2000) 21–36.
97. É. Caron-Beaudoin, M. Bouchard, G. Wendling, A. Barroso, M. F. Bouchard, P. Ayotte, M. – A. Verner, Urinary and hair concentrations of trace metals in pregnant women from Northeastern British Columbia, Canada: a pilot study, *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* **29** (2019) 613–623.
98. J. P. Goullé, L. Mahieu, J. Castermant, N. Neveu, L. Bonneau, G. Lainé, D. Bouige, C. Lacroix, Metal and metalloid multi-elementary ICP-MS validation in whole blood, plasma, urine and hair, reference values, *Forensic Sci. Int.* **153** (2005) 39–44.
99. S. K. Wadhwa, T. G. Kazi, H. I. Afridi, F. N. Talpur, Interaction between carcinogenic and anti-carcinogenic trace elements in the scalp hair samples of different types of Pakistani female cancer patients, *Clin. Chim. Acta.* **439** (2015) 178–184.
100. *Exposure to Arsenic: A Major Public Health Concern*, 2010, World Health Organization (WHO), <https://www.who.int/ipcs/features/arsenic.pdf> (datum pristupa 17. listopada 2019.).
101. A. V. Skalny, A. A. Tinkov, T. G. Bohan, M. B. Shabalovskaya, O. Terekhina, S. B. Leshchinskaia, Y. Kovas, Toxicological and nutritional status of trace elements in hair of women with in vitro fertilization (IVF) pregnancy and their 9-month-old children, *Reprod. Toxicol.* **82** (2018) 50–56.
102. Sabiha-Javied, T. Mehmood, M. M. Chaudhry, M. Tufail, N. Irfan, Heavy metal pollution from phosphate rock used for the production of fertilizer in Pakistan, *Microchem. J.* **91** (2009) 94–99.
103. C. Gundacker, S. Fröhlich, K. Graf-Rohrmeister, B. Eibenberger, V. Jessenig, D. Gicic, S. Prinz, K. J. Wittmann, H. Zeisler, B. Vallant, A. Pollak, P. Husslein, Perinatal lead and mercury exposure in Austria, *Sci. Total Environ.* **408** (2010) 5744–5749.
104. J. Snoj Tratnik, I. Falnoga, A. Trdin, D. Mazej, V. Fajon, A. Miklavčič, A. B. Kobal, J. Osredkar, A. Sešek Briški, M. Krsnik, D. Neubauer, J. Kodrič, S. Stropnik, D. Gosar, P. Lešnik Musek, J. Marc, S. Jurkovič Mlakar, O. Petrović, I. Vlašić-Cicvarić, I. Prpić, A. Milardović, J. Radić Nišević, D. Vuković, E. Fišić, Z. Špirić, M. Horvat, Prenatal mercury exposure, neurodevelopment and apolipoprotein E genetic polymorphism, *Environ. Res.* **152** (2017) 375–385.

105. E. Koseoglu, R. Koseoglu, M. Kendirci, R. Saraymen, B. Saraymen, Trace metal concentrations in hair and nails from Alzheimer's disease patients: relations with clinical severity, *J. Trace Elem. Med. Biol.* **39** (2017) 124–128.
106. Y. B. Cihan, S. Sözen, S. Ö. Yıldırım, Trace elements and heavy metals in hair of stage III breast cancer patients, *Biol. Trace Elem. Res.* **144** (2011) 360–379.
107. M. Alqhazoa, A. Bani Rashaid, The concentrations of bioelements in the hair samples of Jordanian children who stutter, *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* **112** (2018) 158–162.
108. F. Domanico, G. Forte, C. Majorani, O. Senofonte, F. Petrucci, V. Pezzi, A. Alimonti, Determination of mercury in hair: comparison between gold amalgamation-atomic absorption spectrometry and mass spectrometry, *J. Trace Elem. Med. Biol.* **43** (2017).
109. R. Luo, S. Zhang, P. Xiang, B. Shen, X. Zhuo, D. Ma, Elements concentrations in the scalp hair of methamphetamine abusers, *Forensic Sci. Int.* **249** (2015) 112–115.
110. J. Prejac, V. Višnjević, S. Drmić, A. A. Skalny, N. Mimica, B. Momčilović, A novel concept to derive iodine status of human populations from frequency distribution properties of a hair iodine concentration, *J. Trace Elem. Med. Biol.* **28** (2014) 205–211.
111. N. Z. M. Saat, S. Y. Chow, A. R. Ghazali, Z. A. Hamid, S. H. Lubis, N. Mohamed, I. Ishak, H. Othman, Study of heavy metal levels in nails and hairs among vegetable farmers in Malaysia, *Res. J. Appl. Sci.* **8** (2013) 449–455.
112. P. Intarasunanont, P. Navasumrit, S. Waraprasit, K. Chaisatra, W.A. Suk, C. Mahidol, M. Ruchirawat, Effects of arsenic exposure on DNA methylation in cord blood samples from newborn babies and in a human lymphoblast cell line, *Environ. Health* **11** (2012) 1–13.
113. I. Michalak, K. Chojnacka, A. Saeid, Relation between mineral composition of human hair and common illnesses, *Chin. Sci. Bull.* **57** (2012) 3460–3465.
114. N. Ali, M. A. Hoque, A. Haque, K. A. Salam, M. R. Karim, A. Rahman, K. Islam, Z. A. Saud, M. A. Khalek, A. A. Akhand, M. Hossain, A. Mandal, M. R. Karim, H. Miyataka, S. Himeno, K. Hossain, Association between arsenic exposure and plasma cholinesterase activity: a population based study in Bangladesh, *Environ. Health* **9** (2010) 1–9.
115. H. Yasuda, K. Yoshida, M. Segawa, R. Tokuda, T. Tsutsui, Y. Yasuda, S. Magara, Metallomics study using hair mineral analysis and multiple logistic regression analysis:

- relationship between cancer and minerals, *Environ. Health Prev. Med.* **14** (2009) 261–266.
116. S. D'Ilio, N. Violante, O. Senofonte, S. Caroli, Occupational exposure of goldsmith workers of the area of Rome to potentially toxic metals as monitored through hair analysis, *Microchem. J.* **67** (2000) 343–349.
117. B. Neupane, S. Kang, C. Li, P. Chen, Trace elements analysis in hair strand of cooks chronically exposed to indoor air pollution in restaurants of Lhasa, Tibet: preliminary results, *SN Appl. Sci.* **1** (2019) 1039.

## § 8. DODATAK

Tablica D1. Literaturni pregled (2000-2019) načina pranja kose i određivanih elemenata ICP-MS (1/2 nastavka).

Načini pranja kose	Određivani elementi	Referenca
Voda → aceton → voda → aceton → voda 0,5 % Triton X-100 → 6,7 % HNO <sub>3</sub> 0,5 % Triton X-100 → 6,7 % HNO <sub>3</sub> → 2 % HCl	Li, Be, Na, Mg, Al, P, K, Ca, V, Cr, Fe, Mn, Co, N, Cu, Zn, As, Se, Sr, Mo, Ru, Ag, Cd, Sn, Sb, Cs, Ba, La, Ce, Nd, Gd, Lu, Tl, Pb, Bi, Th, U	Verrey i sur., 2019 (73)
0,1 % Triton X-100 → voda → aceton	Ca, Cu, Cr, Na, Fe, Mg, Mn, Zn, Co, Se, Mo, V, K, B, Li	Alqhazoa i Rashaid, 2018 (107)
Etil-eter:aceton=3:1 (v/v) → 5 % EDTA → voda	Hg	Domanico i sur., 2016 (108)
Etil-eter:aceton=3:1 → voda → 5 % EDTA → voda	Al, As, B, Be, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, I, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, P, Pb, Se, Si, Sn, V, Zn	Momčilović i sur., 2016 (64)
0,5 % Triton X-100 → voda → aceton	As, Au, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mg, Mn, Mo, Ni, Se, Sr, Zn	Luo i sur., 2015 (109)
Etil-eter:aceton=3:1 → voda → 5 % EDTA → voda	I	Prejac i sur., 2014 (110)
Aceton → voda → aceton	Hg, Pb	Yassa, 2014 (71)
0,5 % Triton X-100 → voda → aceton	As, Cd, Co, Pb, Ni	Saat i sur., 2013 (111)
0,5 % Triton X – 100 → 1 M HNO <sub>3</sub>	Cu, Cr, Mn, Pb	Eastman i sur., 2013 (63)
Aceton → 1 % Triton X-100 → voda	As	Intarasunanont i sur., 2012 (112)
Neutralni šampon	As, Co, Cd, Cr, Mn, Ni, Pb, V	Michalak i sur., 2012 (113)



Tablica D1. Literaturni pregled (2000-2019) načina pranja kose i određivanih elemenata ICP–MS (2/2 nastavka).

Načini pranja kose	Određivani elementi	Referenca
Voda → 1 % Triton X – 100 → voda → metanol	Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mg, Ni, Pb, Zn	Przybylowicz i sur., 2012 (67)
1 % Triton X-100 → voda	As	Islam i sur., 2011 (68)
Aceton → voda → aceton	Co, Cr	Liu i sur., 2011 (70)
1 % Triton X-100 → voda	As	Ali i sur., 2010 (114)
Aceton → aceton → 0,01 % Triton X-100	I, As, Zn, Na, Br, Fe, Al, Cr, Co, Ca, Cu, Ge, Pb, Cd, Hg, Se, Mn, V, K, Mg, Ni, B, Mo, P	Yasuda i sur., 2009 (115)
Destilirana voda	Hg, Pb	Gundacker i sur., 2009 (103)
Etil-eter:aceton=3:1 → 5 % EDTA → ultračista deionizirana voda	Ag, Au, Cd, Co, Cr, In, Ni, Pb, Pt	D'Ilio i sur., 2000 (116)

Tablica D2. Literaturni pregled (2000-2019) masenih udjela toksičnih elemenata u kosi (*1/2 nastavka*).

Država	n	Populacija	Maseni udio u kosi (mg/kg)	Referenca
<b>As</b>				
Kina	10	muškarci i žene	0,30 ± 0,15	Neupane i sur., 2019 (117)
Kanada	29	trudnice	0,011 (0,006 – 0,037)	Caron-Beaudoin i sur., 2019 (97)
Rusija	50	trudnice s umjetnom oplodnjom	0,015 (0,009 – 0,022)	Skalny i sur., 2018 (101)
	158	trudnice	0,010 (0,006 – 0,016)	
Pakistan	94	zdrave žene	0,58 ± 0,14	Wadhwa i sur., 2015 (99)
Poljska	100	zdrave žene	0,02 ± 0,03	Czerny i sur., 2014 (65)
Turska	52	zdrave žene	0,239 ± 0,220	Cihan i sur., 2011 (106)
Norveška	5	muškarci i žene	0,007 ± 0,003	Gellein i sur., 2008 (87)
Poljska	83	muškarci i žene	0,044 ± 0,11	Chojnacka i sur., 2006 (94)
Francuska	45	muškarci i žene	0,05 (0,03–0,08)	Goullé i sur., 2005 (98)
Švedska	114	muškarci i žene	0,085 ± 0,054	Rodushkin i Axelsson, 2000 (96)
<b>Cd</b>				
Kina	10	muškarci i žene	0,02 ± 0,01	Neupane i sur., 2019 (117)
Kanada	29	trudnice	0,005 (0,003 – 0,014)	Caron-Beaudoin i sur., 2019 (97)
Rusija	50	trudnice s umjetnom oplodnjom	0,010 (0,006 – 0,016)	Skalny i sur., 2018 (101)
	158	trudnice	0,009 (0,004 – 0,016)	
Turska	60	muškarci i žene	0,31 ± 0,32	Koseoglu i sur., 2017 (105)
Turska	10	pušači	0,140 ± 0,04	Varhan Oral, 2016 (56)
	10	nepušači	0,037 ± 0,001	
Pakistan	94	zdrave žene	1,4 ± 0,56	Wadhwa i sur., 2015 (99)
Poljska	100	zdrave žene	0,031 ± 0,02	Czerny i sur., 2014 (65)
Turska	52	zdrave žene	0,175 ± 0,206	Cihan i sur., 2011 (106)
Norveška	5	muškarci i žene	0,041 ± 0,012	Gellein i sur., 2008 (87)
Poljska	83	muškarci i žene	0,114 ± 0,14	Chojnacka i sur., 2006 (94)
Francuska	45	muškarci i žene	0,011 (0,004–0,17)	Goullé i sur., 2005 (98)
Švedska	114	muškarci i žene	0,058 ± 0,056	Rodushkin i Axelsson, 2000 (96)

Tablica D2. Literaturni pregled (2000-2019) masenih udjela toksičnih elemenata u kosi (2/2 nastavka).

Država	n	Populacija	Maseni udio u kosi (mg/kg)	Referenca
<b>Hg</b>				
Rusija	50	trudnice s umjetnom oplodnjom	0,468 (0,239 – 0,707)	Skalny i sur., 2018 (101)
	158	trudnice	0,306 (0,177 – 0,487)	
Turska	0	muškarci i žene	0,19 ± 0,29	Koseoglu i sur., 2017 (105)
Slovenija/ Hrvatska	361	rodilje	0,361 (0,326 – 0,401)	Snoj Tratnik i sur., 2017 (104)
Turska	52	zdrave žene	0,652 ± 0,596	Cihan i sur., 2011 (106)
Austrija	306	muškarci i žene	0,202 (0,003 – 3,691)	Gundacker i sur., 2010 (103)
Norveška	5	muškarci i žene	0,235 ± 0,038	Gellein i sur., 2008 (87)
Poljska	83	muškarci i žene	0,500 ± 0,39	Chojnacka i sur., 2006 (94)
Francuska	45	muškarci i žene	0,66 (0,31 – 1,66)	Goullé i sur., 2005 (98)
Švedska	114	muškarci i žene	0,261 ± 0,145	Rodushkin i Axelsson, 2000 (96)
Jordan	25	djeca koja mucaju	0,31 ± 0,08	Alqhazo i Rashaid, 2018 (107)
<b>Pb</b>				
Kina	10	muškarci i žene	0,59 ± 0,28	Neupane i sur., 2019 (117)
Kanada	29	trudnice	0,18 (0,12 – 0,54)	Caron-Beaudoin i sur., 2019 (97)
Rusija	50	trudnice s umjetnom oplodnjom	0,344 (0,190 – 0,707)	Skalny i sur., 2018 (101)
	158	trudnice	0,344 (0,205 – 0,600)	
Turska	60	muškarci i žene	0,74 ± 0,47	Koseoglu i sur., 2017 (105)
Turska	10	pušači	1,85 ± 0,05	Varhan Oral, 2016 (56)
	10	nepušači	0,79 ± 0,01	
Poljska	100	zdrave žene	0,85 ± 0,54	Czerny i sur., 2014 (65)
Turska	52	zdrave žene	6,196 ± 7,491	Cihan i sur., 2011 (106)
Austrija	306	muškarci i žene	0,665 (0,08 – 22,126)	Gundacker i sur., 2010 (103)
Norveška	5	muškarci i žene	1,00 ± 0,36	Gellein i sur., 2008 (87)
Poljska	83	muškarci i žene	1,046 ± 1,39	Chojnacka i sur., 2006 (94)
Francuska	45	muškarci i žene	0,41 (0,13 – 4,57)	Goullé i sur., 2005 (98)
Švedska	114	muškarci i žene	0,960 ± 0,850	Rodushkin i Axelsson, 2000 (96)

Tablica D3. Literaturni pregled (2000-2019) masenih udjela esencijalnih elemenata u kosi (1/4 nastavka).

Država	n	Populacija	Maseni udio u kosi (mg/kg)	Referenca
<b>Ca</b>				
Rusija	50	trudnice s umjetnom oplodnjom	1393 (930 – 2523)	Skalny i sur., 2018 (101)
	158	trudnice	1941 (1144 – 2992)	
Turska	60	muškarci i žene	622 ± 876	Koseoglu i sur., 2017 (105)
Poljska	100	zdrave žene	425 ± 81	Czerny i sur., 2014 (65)
Turska	52	zdrave žene	34,4 ± 19,6	Cihan i sur., 2011 (106)
Poljska	83	muškarci i žene	1088 ± 970	Chojnacka i sur., 2006 (94)
Švedska	114	muškarci i žene	750 ± 660	Rodushkin i Axelsson, 2000 (96)
<b>Cu</b>				
Kina	10	muškarci i žene	9,73 ± 2,46	Neupane i sur., 2019 (117)
Kanada	29	trudnice	19,3 (9,74 – 58,1)	Caron-Beaudoin i sur., 2019 (97)
Rusija	50	trudnice s umjetnom oplodnjom	13,3 (10,3 – 17,8)	Skalny i sur., 2018 (101)
	158	trudnice	15,6 (10,9 – 26,5)	
Turska	60	muškarci i žene	22,8 ± 22,4	Koseoglu i sur., 2017 (105)
Turska	10	pušači	16,6 ± 0,49	Varhan Oral, 2016 (56)
	10	nepušači	13,6 ± 0,41	
Poljska	100	zdrave žene	13,2 ± 3,12	Czerny i sur., 2014 (65)
Turska	52	zdrave žene	11,9 ± 10,4	Cihan i sur., 2011 (106)
Norveška	5	muškarci i žene	76,5 ± 10,3	Gellein i sur., 2008 (87)
Poljska	83	muškarci i žene	12,4 ± 12,0	Chojnacka i sur., 2006 (94)
Francuska	45	muškarci i žene	20,3 (9,0 – 61,3)	Goullé i sur., 2005 (98)
Švedska	114	muškarci i žene	25 ± 21	Rodushkin i Axelsson, 2000 (96)

Tablica D3. Literaturni pregled (2000-2019) masenih udjela esencijalnih elemenata u kosi (2/4 nastavka).

Država	n	Populacija	Maseni udio u kosi (mg/kg)	Referenca
<b>Fe</b>				
Kanada	29	trudnice	6,50 (4,46 – 13,2)	Caron-Beaudoin i sur., 2019 (97)
Rusija	50	trudnice s umjetnom oplodnjom	10,7 (7,97 – 21,3)	Skalny i sur., 2018 (101)
	158	trudnice	18,5 (11,3 – 30,2)	
Turska	10	pušači	42,6 ± 1,28	Varhan Oral, 2016 (56)
	10	nepušači	15,1 ± 0,45	
Poljska	100	zdrave žene	14,8 ± 3,06	Czerny i sur., 2014 (65)
Turska	52	zdrave žene	28,2 ± 23,9	Cihan i sur., 2011 (106)
Norveška	5	muškarci i žene	13,3 ± 6,7	Gellein i sur., 2008 (87)
Poljska	83	muškarci i žene	15,0 ± 16,1	Chojnacka i sur., 2006 (94)
Švedska	114	muškarci i žene	9,6 ± 4,4	Rodushkin i Axelsson, 2000 (96)
<b>Mg</b>				
Rusija	50	trudnice s umjetnom oplodnjom	101 (66,7 – 176)	Skalny i sur., 2018 (101)
	158	trudnice	128 (77,8 – 203)	
Turska	60	muškarci i žene	573 ± 699	Koseoglu i sur., 2017 (105)
Poljska	100	zdrave žene	27,2 ± 8,14	Czerny i sur., 2014 (65)
Turska	52	zdrave žene	41,0 ± 20,7	Cihan i sur., 2011 (106)
Poljska	83	muškarci i žene	67,0 ± 65,1	Chojnacka i sur., 2006 (94)
Švedska	114	muškarci i žene	46 ± 38	Rodushkin i Axelsson, 2000 (96)

Tablica D3. Literaturni pregled (2000-2019) masenih udjela esencijalnih elemenata u kosi (3/4 nastavka).

Država	n	Populacija	Maseni udio u kosi (mg/kg)	Referenca
<b>Mn</b>				
Kanada	29	trudnice	0,17 (0,06 – 1,31)	Caron-Beaudoin i sur., 2019 (97)
Rusija	50	trudnice s umjetnom oplodnjom	0,727 (0,524 – 1,58)	Skalny i sur., 2018 (101)
	158	trudnice	0,984 (0,579 – 1,84)	
Turska	60	muškarci i žene	1,15 ± 4,16	Koseoglu i sur., 2017 (105)
Poljska	100	zdrave žene	0,86 ± 0,31	Czerny i sur., 2014 (65)
Turska	52	zdrave žene	0,863 ± 0,675	Cihan i sur., 2011 (106)
Norveška	5	muškarci i žene	0,36 ± 0,26	Gellein i sur., 2008 (87)
Poljska	83	muškarci i žene	0,601 ± 0,59	Chojnacka i sur., 2006 (94)
Francuska	45	muškarci i žene	0,067 (0,016 – 0,57)	Goullé i sur., 2005 (98)
Švedska	114	muškarci i žene	0,560 ± 0,550	Rodushkin i Axelsson, 2000 (96)
<b>Mo</b>				
Rusija	50	trudnice s umjetnom oplodnjom	0,022 (0,016 – 0,027)	Skalny i sur., 2018 (101)
	158	trudnice		
Poljska	100	zdrave žene	0,03 ± 0,02	Czerny i sur., 2014 (65)
Norveška	5	muškarci i žene	0,028 ± 0,008	Gellein i sur., 2008 (87)
Poljska	83	muškarci i žene	0,017 ± 0,02	Chojnacka i sur., 2006 (94)
Francuska	45	muškarci i žene	0,021 (0,01 – 0,028)	Goullé i sur., 2005 (98)
Švedska	114	muškarci i žene	0,042 ± 0,020	Rodushkin i Axelsson, 2000 (96)

Tablica D3. Literaturni pregled (2000-2019) masenih udjela esencijalnih elemenata u kosi (4/4 nastavka).

Država	n	Populacija	Maseni udio u kosi (mg/kg)	Referenca
<b>Se</b>				
Kanada	29	trudnice	0,53 (0,38 – 0,75)	Caron-Beaudoin i sur., 2019 (97)
Rusija	50	trudnice s umjetnom oplodnjom	0,411 (0,355 – 0,465)	Skalny i sur., 2018 (101)
	158	trudnice	0,404 (0,313 – 0,499)	
Pakistan	94	zdrave žene	1,25 ± 0,18	Wadhwa i sur., 2015 (99)
Poljska	100	zdrave žene	0,42 ± 0,12	Czerny i sur., 2014 (65)
Turska	52	zdrave žene	5,06 ± 7,60	Cihan i sur., 2011 (106)
Norveška	5	muškarci i žene	0,39 ± 0,09	Gellein i sur., 2008 (87)
Poljska	83	muškarci i žene	0,679 ± 0,94	Chojnacka i sur., 2006 (94)
Francuska	45	muškarci i žene	0,54 (0,37 – 1,37)	Goullé i sur., 2005 (98)
Švedska	114	muškarci i žene	0,830 ± 0,280	Rodushkin i Axelsson, 2000 (96)
<b>Zn</b>				
Kina	10	muškarci i žene	164 ± 42,4	Neupane i sur., 2019 (117)
Kanada	29	trudnice	160 (127,84 – 303,52)	Caron-Beaudoin i sur., 2019 (97)
Rusija	50	trudnice s umjetnom oplodnjom	209,1 ( 174,8 – 253,1)	Skalny i sur., 2018 (101)
	158	trudnice	229,3 (192,3 – 303,6)	
Turska	60	muškarci i žene	100,38 ± 64,40	Koseoglu i sur., 2017 (105)
Pakistan	94	zdrave žene	247 ± 17,4	Wadhwa i sur., 2015 (99)
Poljska	100	zdrave žene	141,23 ± 32,11	Czerny i sur., 2014 (65)
Turska	52	zdrave žene	63,700 ± 62,183	Cihan i sur., 2011 (106)
Norveška	5	muškarci i žene	190 ± 22	Gellein i sur., 2008 (87)
Poljska	83	muškarci i žene	156,48 ± 74,5	Chojnacka i sur., 2006 (94)
Francuska	45	muškarci i žene	162 (129 – 209)	Goullé i sur., 2005 (98)
Švedska	114	muškarci i žene	142 ± 29	Rodushkin i Axelsson, 2000 (96)

## § 9. ŽIVOTOPIS

### Osobni podatci

Ime i prezime: Anja Bošnjaković

Datum rođenja: 30. svibanj 1995. god.

Mjesto rođenja: Našice

### Obrazovanje

2002.–2010. Osnovna škola Drenje, Drenje

2010.–2014. Gimnazija A. G. Matoša (opći smjer), Đakovo

2014.–2017. Preddiplomski studij kemije, Odjel za kemiju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

### Sudjelovanje u popularizaciji znanosti

2016. Smotra sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku

### Publikacije

1. A. Sekovanić, T. Orct, J. Jurasović, M. Piasek, A. Sulimanec Grgec, **A. Bošnjaković**, M. Matek Sarić, Koncentracije žive u uzorcima majčine krvi i kose, posteljici i krvi iz pupčane vrpce u povezanosti s konzumacijom hrane morskoga podrijetla, 26. hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera s međunarodnim sudjelovanjem: 4. simpozij „Vladimir Prelog“, Šibenik, 2019.