

BIOLOŠKI MONITORING IZLOŽENOSTI LJUDI TRIAZINSKIM HERBICIDIMA ANALIZOM METABOLITA U URINU

Gordana MENDAŠ

Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb, Hrvatska

Primljeno u travnju 2011.
CrossCheck u svibnju 2011.
Prihvaćeno u svibnju 2011.

Triazinski herbicidi jedni su od najčešće rabljenih herbicida. Sudbina triazinskih herbicida nakon dospijevanja u okoliš ovisi o njihovu kretanju u zraku, vodi i tlu, kao i o brzini kojom se razgrađuju ili transformiraju. Triazinski spojevi mogu se transformirati reakcijom s vodom, djelovanjem mikroorganizama i utjecajem Sunčeva svjetla. Široka i često nekontrolirana primjena triazinskih herbicida tijekom nekoliko proteklih desetljeća rezultirala je kontaminacijom pitke vode i hrane postajući rizik za opću populaciju. Metabolizam i djelovanje triazinskih herbicida proučavani su na pokusnim životinjama i u uvjetima *in vitro*, dok je o njihovu metabolizmu i izlučivanju kod ljudi malo objavljenih radova. Djelovanju triazinskih herbicida osobito su izloženi radnici zaposleni u njihovoj proizvodnji i primjeni. Izloženost ljudi prati se i dokazuje određivanjem izvornih spojeva i njihovih metabolita u urinu. Kako se triazinski spojevi u urinu profesionalno izloženih ljudi pojavljuju u niskim koncentracijama, za njihovo dokazivanje i praćenje profesionalne izloženosti potrebno je primijeniti analitičke metode visoke djelotvornosti, osjetljivosti i selektivnosti. U ovom radu opisani su struktura i svojstva simetričnih triazinskih herbicida, njihov metabolizam i djelovanje u organizmu čovjeka i životinja te razine metabolita tih spojeva određene u urinu ispitanika iz profesionalno izložene populacije.

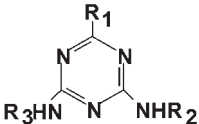
KLJUČNE RIJEČI: *atrazin, metabolizam, pesticidi, profesionalna izloženost, triazinski spojevi*

Triazinski herbicidi velika su skupina pesticida i počeli su se intenzivno primjenjivati prije više od 50 godina za uništavanje korova kod različitih usjeva i za kontrolu rasta korova na nepoljoprivrednom zemljištu (1). S obzirom na kemijsku strukturu, dijele se na simetrične (1,3,5-triazini ili *s*-triazini) i nesimetrične (triazinoni poput metribuzina i triazidinoni poput heksazinona). Simetrični triazini mogu se podijeliti u tri skupine: klortriazine poput atrazina i simazina, metoksitriazine poput atratona i prometona i metiltiotriazine poput ametrina i prometrina. Primjenjuju se na lišće ili direktno na tlo s kojeg se mogu isprati u površinske i podzemne vode i hlapjeti u zrak. Lako se prenose u okolišu pa su tako atrazin, jedan od diljem svijeta najčešće upotrebljivanih

triazinskih herbicida, i njegovi razgradni produkti detektirani u površinskim i podzemnim vodama, pitkoj vodi, kišnici, tlu i sedimentu (2-6).

STRUKTURA I SVOJSTVA 1,3,5-TRIAZINSKIH HERBICIDA

U tablici 1 prikazane su strukture *s*-triazinskih herbicida atrazina, simazina, prometrina, ametrina i atratona i razgradnih produkata atrazina deetilatrazina, deizopropilatrazina, deetildeizopropilatrazina te hidroksiatrazina, a u tablici 2 njihova fizička i kemijska svojstva.

Tablica 1 Imena i struktura simetričnih triazinskih herbicida atrazina, simazina, ametrina, prometrina i atratona te razgradnih produkata atrazina: deetilatrizona, deizopropilatrizona, deetideizopropilatrizona i hidroksiatrazina


SPOJ	R ₁	R ₂	R ₃
6-klor- <i>N</i> -etil- <i>N'</i> -izopropil-[1,3,5]triazin-2,4-diamin (Atrazin)	Cl	CH ₂ CH ₃	CH(CH ₃) ₂
6-klor- <i>N,N'</i> -dietil-[1,3,5]triazin-2,4-diamin (Simazin)	Cl	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃
6-metiltio- <i>N,N'</i> -diizopropil-[1,3,5]triazin-2,4-diamin (Prometrin)	SCH ₃	CH(CH ₃) ₂	CH(CH ₃) ₂
6-metiltio- <i>N</i> -etil- <i>N'</i> -izopropil-[1,3,5]triazin-2,4-diamin (Ametrin)	SCH ₃	CH ₂ CH ₃	CH(CH ₃) ₂
6-metoksi- <i>N</i> -etil- <i>N'</i> -izopropil-[1,3,5]triazin-2,4-diamin (Atraton)	OCH ₃	CH ₂ CH ₃	CH(CH ₃) ₂
6-klor- <i>N</i> -izopropil-[1,3,5]triazin-2,4-diamin (Deetilatrizon, DEA)	Cl	H	CH(CH ₃) ₂
6-klor- <i>N</i> -etil-[1,3,5]triazin-2,4-diamin (Deizopropilatrizon, DIA)	Cl	CH ₂ CH ₃	H
6-klor-[1,3,5]triazin-2,4-diamin (Deetildeizopropilatrizon, DDA)	Cl	H	H
6-hidroksi- <i>N</i> -etil- <i>N'</i> -izopropil-[1,3,5]triazin-2,4-diamin (Hidroksiatrazin)	OH	CH ₂ CH ₃	CH(CH ₃) ₂

Tablica 2 Fizičko-kemijska svojstva triazinskih herbicida atrazina, simazina, ametrina, prometrina i atratona i razgradnih produkata atrazina: deetilatrizona, deizopropilatrizona, deetideizopropilatrizona i hidroksiatrazina

SPOJ	S(H ₂ O) ^a / mg L ⁻¹	p ^b / Pa	t.t. ^c / °C	t _{1/2} ^d / d	log K _{ow} ^e	pK _a ^f
Deetilatrizon	---	---	---	26	0,18	1,5
Deizopropilatrizon	3200	---	---	17	1,13	1,3
Didealkilirani atrazin	670	---	---	---	1,52	1,3
Hidroksiatrazin	5,9	---	---	---	1,03	5,2
Atrazin	33	3,9 · 10 ⁻⁵	176	60-100	2,48	1,7
Simazin	6	2,9 · 10 ⁻⁶	226	60	1,88	1,7
Prometrin	33	1,7 · 10 ⁻⁴	119	30-90	3,41	4,1
Ametrin	200	3,7 · 10 ⁻⁴	85	70-250	3,07	4,0
Atraton	1800	---	95	>200	2,69	4,2

^a topljivost u vodi pri 20 °C do 25 °C (7)^b tlak para pri 20 °C do 25 °C (8)^c temperatura taljenja (8)^d vrijeme poluraspada u tlu (8)^e koeficijent razdjeljenja u sustavu *n*-oktanol / voda (9, 10)^f konstanta ionizacije konjugirane kiseline triazina (11, 12)

--- podatak nije pronađen

Triazinski herbicidi inhibiraju fotosintezu sprečavajući tok elektrona s fotosustava II na fotosustav I u kloroplastima (13). Selektivno djelovanje *s*-triazinskih herbicida zasniva se na činjenici da se *s*-triazini u otpornim biljkama brzo razgrađuju, a u osjetljivim sporo. Mnoge kultivirane biljke, primjerice kukuruz, lako deaktiviraju klortriazine zamjenom klora hidroksilnom skupinom.

Simetrične triazinske herbicide, među kojima je i atrazin, karakterizira relativno velika topljivost u vodi i veliki rizik od ispiranja u površinske i podzemne vode. Kao posljedica zagađenosti vodenog okoliša

atrazinom i njegovim razgradnim produktima u europskim je zemljama, uključujući i Hrvatsku, upotreba atrazina u posljednjih 20 godina postupno ograničavana i konačno zabranjena.

Fizičko-kemijska svojstva triazinskih spojeva u znatnoj mjeri ovise o supstituentima na položajima 2, 4 i 6 triazinskog prstena (13). Kao što pokazuju ionizacijske konstante, pK_a, vrsta supstituenata na položaju 6 ima najveći utjecaj na bazičnost i topljivost tih spojeva u vodenim otopinama. Na položaju šest mogu biti -Cl te skupine -OCH₃ ili -SCH₃, a kod metabolita i skupina -OH. 6-metiltio- i 6-metoksitriazini

topljiviji su u vodi od 6-klortriazina. Najbazičniji su 6-hidroksi-supstituirani spojevi, a bazičnost opada u nizu metoksitriazini > metiltiotriazini > klortriazini. U istom nizu opada i njihova topljivost u vodi (14). Porastom pH otopine smanjuje se stupanj ionizacije, kao i topljivost *s*-triazina u vodi. Na položajima 2 i 4 triazinskog prstena su preko dušika vezane alkilne skupine koje također utječu na bazičnost spojeva. Naime, što su te alkilne skupine dulje, to je spoj bazičniji i slabije topljiv u vodi. Metiltiotriazini su hlapljiviji spojevi te podložniji biorazgradnji od klortriazina kojima za biorazgradnju više pogoduje kiseli i lužnati medij od neutralnoga. Upravo te razlike u fizičko-kemijskim svojstvima, koje kao posljedicu imaju razlike u herbicidnoj aktivnosti, trajanju te aktivnosti, selektivnosti i stabilnosti u tlu omogućuju široku primjenu triazinskih herbicida u poljoprivredi i na nepoljoprivrednim zemljištima.

TOKSIČNOST I METABOLIZAM TRIAZINSKIH HERBICIDA

Iako se triazinski herbicidi smatraju relativno netoksičnima za sisavce, provedena istraživanja upućuju na rizik za pojedine vrste (15).

Djelovanje toksičnih spojeva, pa tako i atrazina, često se istražuje na štakorima, a rezultati tih istraživanja služe i za razradu modela njegova ponašanja i raspodjele u organizmu sisavaca (16-20). Kod štakora tretiranih atrazinom putem hrane (12 mg na 100 g tjelesne mase (t.m.), tijekom 7 dana) izvorni je spoj detektiran u svim analiziranim organima (jetri, bubrezima, mozgu), deetilatrazin u bubrezima i mozgu, a deizopropilatrazin samo u bubrezima (16). Rezultati provedenih istraživanja pokazuju da atrazin kod sisavaca djeluje kao inhibitor u nekoliko reakcija ovisnih o hormonima. Istraživanjima provedenim u uvjetima *in vivo* i *in vitro* dokazano je da dodatak atrazina uzrokuje smanjenje aktivnosti 5α -reduktaze, enzima odgovornog za metabolizam testosterona (17, 18). Inhibicija enzima odgovornih za pretvorbu testosterona i nastajanje kompleksa s receptorima steroidnih hormona nekompetitivna je i reverzibilna, a *s*-triazinski spojevi djeluju kao antiandrogeni (19). Nesumnjiva je interakcija atrazina i deetilatrazina s biokemijskim procesima odgovornima za normalnu reproduktivnu aktivnost. Atrazin i deetilatrazin značajno utječu na enzimске aktivnosti u neuroendokrinim tkivima mužjaka štakora i na formiranje specifičnog kompleksa s androgen-

receptorom u prostati štakora (17). Osim toga, utvrđeno je da atrazin izaziva morfološke promjene i toksično djeluje na spermije i njihovu pokretljivost. Tako je kod štakora tretiranih atrazinom opaženo smanjenje broja spermija i njihove pokretljivosti (20).

Kod laboratorijskih štakora soja Sprague-Dawley izloženih putem hrane atrazinu ili simazinu u masenom udjelu od 400 mg kg⁻¹ t.m. primijećeno je ranije nastajanje i veća učestalost različitih vrsta tumora (15, 21). Stoker i sur. (22) pokazali su da kod ženki štakora soja Wistar atrazin inhibira izlučivanje prolaktina tijekom laktacije. Atrazin je u masenom udjelu od 12,5 mg kg⁻¹ t.m. i 25 mg kg⁻¹ t.m. inhibirao otpuštanje prolaktina samo kod nekih ženki, dok je 50 mg kg⁻¹ t.m. atrazina inhibiralo otpuštanje prolaktina kod svih ženki. Studija je pokazala da kratka izloženost atrazinu u prva četiri dana laktacije smanjuje razinu prolaktina kod majki i uzrokuje povećanu incidenciju upale prostate kod potomaka. Također je uočen utjecaj atrazina na razine luteinizirajućeg hormona (LH) i prolaktina u serumu (23). Već je jedna doza atrazina od 300 mg kg⁻¹ t.m. kod štakora soja Sprague-Dawley suprimirala proizvodnju LH i prolaktina. Dokazano je da atrazin utječe na razine ovih hormona djelujući na središnji živčani sustav, točnije hipotalamus (23).

Objavljeni su rezultati više toksikoloških istraživanja provedenih *in vivo* radi procjene utjecaja atrazina na endokrini i reproduktivni sustav, dok se manje zna o imunotoksičnom potencijalu atrazina (24, 25).

Pruett i sur. (24) na laboratorijskim su miševima pokazali da je jednokratna primjena atrazina u dozama od 100 mg kg⁻¹ t.m. do 500 mg kg⁻¹ t.m. imunotoksična: smanjuje staničnost timusa i slezene i utječe na populaciju limfocita u slezeni i timusu, kao i na odgovor antitijela. Kod miševa oralno izloženih jednokratnoj dozi atrazina od 250 mg kg⁻¹ t.m. i žrtvovanih nakon jednog dana, sedam dana i sedam tjedana nakon primitka zadnje doze primijećeno je smanjenje težine timusa i slezene nakon sedam dana, ali ne i nakon sedam tjedana. Staničnost organa ostala je smanjena i sedam tjedana nakon izloženosti. Izloženost atrazinu nije utjecala na broj leukocita u perifernoj krvi, no štetno je utjecala na imunostni sustav miševa smanjujući staničnost i utječući na raspodjelu limfocita. Negativni učinci zaostali su dugo nakon izloženosti (25). Učinci subletalnih doza atrazina istraživani su i na lososima *Salmo salar* L. (26). Opaženo je brzo akumuliranje atrazina u žuči, utjecaj na sintezu steroida u testisima te inhibicija

feromonski posredovanih endokrinih funkcija kod mužjaka, što upućuje na značajan utjecaj atrazina na endokrini sustav lososa.

Kako posljednjih desetljeća raste zagađenost podzemnih i površinskih voda te pitke vode, postavlja se pitanje kako izloženost niskim dozama različitih pesticida među kojima i triazinskih spojeva utječe na zdravlje ljudi i životinja. Da bi se dobio odgovor na to pitanje, istraživani je klastogeni potencijal klortriazinskih herbicida atrazina, simazina i cijanazina na stanicama jajnika hrčka (27). Pri izloženosti stanica maksimalno dopuštenoj ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$) kao i najvišoj nađenoj masenoj koncentraciji ($1,8 \text{ mg L}^{-1}$ do 4 mg L^{-1} za pojedini herbicid) tih herbicida u pitkoj vodi atrazin je uzrokovao oštećenja kromosoma, simazin pokazao klastogeni učinak, dok izlaganje cijanazinu nije uzrokovalo mjerljiva oštećenja kromosoma. Na stanicama tretiranim kombinacijom herbicida atrazina i simazina ili atrazina i cijanazina opažena su oštećenja kromosoma jednaka ili manja od onih uzrokovanih djelovanjem pojedinačnih triazina, tj. nije opaženo sinergističko djelovanje.

Genotoksičnost atrazina istraživana je i na mikrobiološkoj razini (28). Testiranje mutagenosti u uvjetima *in vitro* primjenom Amesova testa na različitim sojevima bakterije *Salmonella typhimurium* nije pokazalo genotoksičnost atrazina ni njegovih metabolita hidroksiatrazina te monodealkiliranog i didealkiliranog atrazina.

Negativni su bili i rezultati testova genotoksičnosti atrazina provedeni na humanim limfocitima u uvjetima *in vitro* (29).

Međutim, rezultati istraživanja u kojima su procjenjivane razine citogenetičkih biljega u limfocitima periferne krvi ispitanika profesionalno izloženih smjesi različitih klasa pesticida, pa tako i atrazina i njemu srodnih spojeva, upućuju na povećanu učestalost svih tipova strukturnih kromosomskih aberacija, mikronukleusa i primarnih oštećenja DNA (30, 31).

Rezultati 36 epidemioloških studija o kancerogenom potencijalu triazinskih herbicida kod ljudi kritički su evaluirani u nedavno objavljenom opsežnom preglednom članku (32). Nedostatak većine istraživanja bio je u premalom broju ispitanika izloženih visokim dozama ili dugotrajno izloženih triazinima, pa tako dobiveni rezultati nažalost nisu pouzdani. Zaključeno je da rezultati dosadašnjih epidemioloških studija nisu dovoljni za utvrđivanje da li izloženost triazinskim herbicidima uzrokuje bilo koju vrstu raka kod ljudi.

Metabolička razgradnja triazinskih herbicida te vrste i količine nastalih metabolita specifične su za određenu vrstu organizma. Studije koje se bave proučavanjem metabolizma atrazina malobrojne su, a rezultati su često kontradiktorni. Na temelju istraživanja provedenih u uvjetima *in vivo* (33, 34) i *in vitro* (16, 34-36) može se zaključiti da se kod sisavaca metabolička razgradnja atrazina odvija uglavnom *N*-dealkiliranjem za koje je odgovoran citokrom P450, nakon kojeg slijedi hidroksiliranje triazinskog prstena na položaju 6. Neka su istraživanja pokazala da nastaje konjugat izvornog spoja s glutationom (GSH) reakcijom koju metabolizira glutation transferaza (GST) (34, 37). Metabolička razgradnja atrazina prikazana je na slici 1.

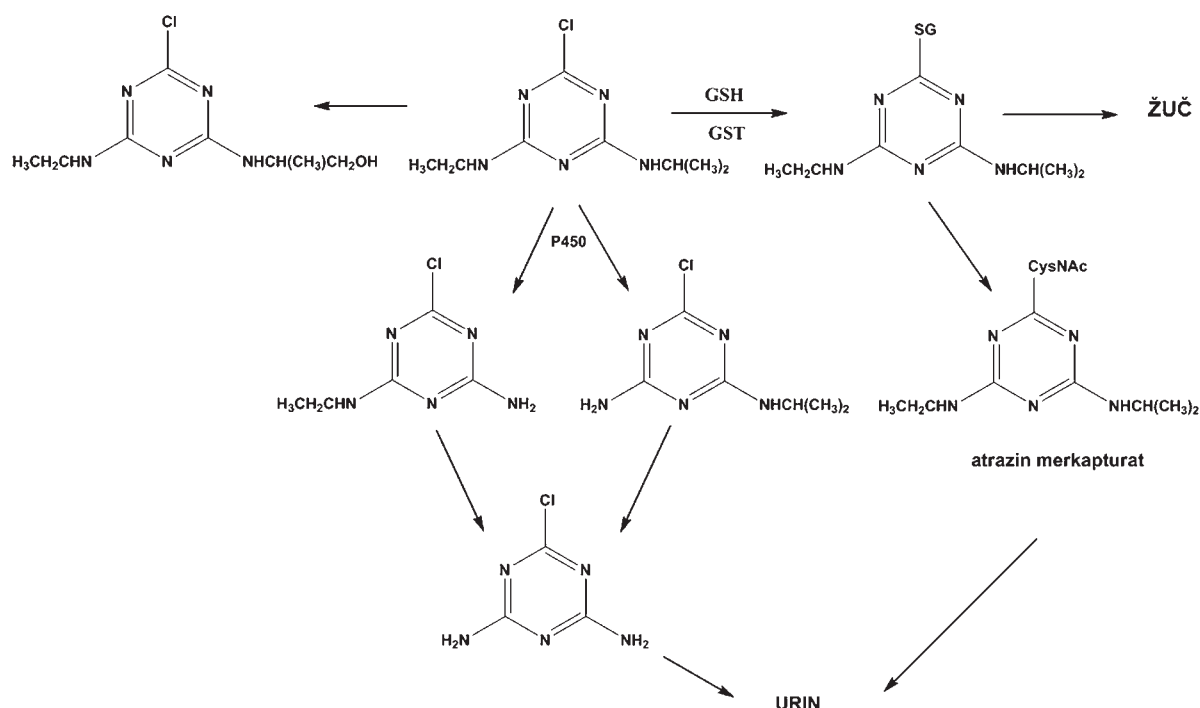
Metabolizam atrazina obilježenog izotopom ^{14}C na položajima C_2 , C_4 i C_6 triazinskog prstena proučavan je u mikrosomima iz jetre miševa (38). Mikrosomi u jetri miševa metaboliziraju 53 % do 57 % primijenjene doze atrazina uz nastajanje 10 % do 14 % deetilatrizona, 13 % do 15 % deizopropilatrizona i 25 % nepoznatih metabolita koji su međuprodukti u nastajanju deetilatrizona i didealkiliranog atrazina.

Hanioka i sur. (39) također su proučavali metabolizam atrazina u mikrosomima iz jetre miševa. Deizopropilatrizon je bio prevladavajući metabolit, dok su u manjim udjelima nađeni još i deetilatrizon i hidroksiizopropilatrizon. Omjer udjela deizopropilatrizona, deetilatrizona i hidroksiizopropilatrizona bio je 81:8:11. Slične su rezultate objavili Lang i sur. (34), koji su proučavali metabolizam atrazina u uvjetima *in vitro* te metabolizam terbutilatrizona, ametrina i terbutrina u mikrosomima jetre štakora, svinja i ljudi. Kao metabolički produkti atrazina određeni su deizopropilatrizon, deetilatrizon i hidroksiizopropilatrizon, a omjer njihovih udjela bio je 53:39:8 kod štakora i 69:28:3 kod svinja pri koncentraciji atrazina u supstratu od $200 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Rezultati tih istraživanja (34-39) upućuju na *N*-monodealkiliranje, hidroksiliranje izopropilne ili terbutilne skupine i sulfoksidaciju 6-metiltioatrizona kao metabolički put razgradnje, dok didealkilirani atrazin ili 6-hidroksiatrizon nisu detektirani.

Zbog sličnosti metabolizma čovjeka i svinja izlučivanje i metabolizam atrazina proučavani su na svinjama kojima je izravno u želudac apliciran $0,1 \text{ g}$ atrazina otopljenog u etanolu. Atrazin se izlučio urinom unutar 24 sata, a uz izvorni spoj detektiran je i njegov metabolit deetilatrizon (40).

U urinu štakora izloženih atrazinu putem kontaminirane vode nađen je jedino deizopropilatrizon



Slika 1 Prikaz metaboličke razgradnje atrazina kod glodavaca i ljudi

(35). Nasuprot tim rezultatima, Bradway i sur. (36) identificirali su u urinu štakora oralno izloženih atrazinu, kao glavni metabolit deetilatratin, uz manje količine deizopropilatratin. Potvrđeno je i nastajanje didealkiliranog atrazina. Upravo je didealkilirani atrazin bio najzastupljeniji metabolit u urinu miševa oralno izloženih jednokratnoj dozi atrazina od 5 mg kg⁻¹ t.m. do 250 mg kg⁻¹ t.m. (39). Izvorni spoj i njegovi metaboliti analizirani su u 24-satnom uzorku urina i plazmi miševa. Osim najzastupljenijeg didealkiliranog atrazina, u manjoj su masenoj koncentraciji određeni i monodealkilirani metaboliti. Samo u urinu miševa oralno izloženih najvišim dozama atrazina, 125 mg kg⁻¹ t.m. i 250 mg kg⁻¹ t.m. detektiran je i atrazin merkapturat (41).

Timchalk i sur. (37) detektirali su međutim uz prevladavajući didealkilirani atrazin u urinu štakora oralno izloženih atrazinu u dozi od 30 mg kg⁻¹ t.m. i konjugat atrazina i merkapturne kiseline. Suprotno njima, Meli i sur. (33) nisu detektirali konjugat atrazina i merkapturne kiseline u urinu štakora oralno izloženih atrazinu u dozi od 50 mg kg⁻¹ t.m. Didealkilirani atrazin bio je glavni metabolit izlučen urinom kod štakora oralno izloženih atrazinu, a detektirana su i oba monodealkilirana metabolita atrazina.

VRSTE I RAZINE METABOLITA U URINU KAO BIOLOŠKI POKAZATELJ IZLOŽENOSTI LJUDI TRIAZINSKIM HERBICIDIMA

Pozitivni rezultati dobiveni u citogenetičkim istraživanjima na populacijama ispitanika profesionalno izloženih smjesi različitih klasa pesticida opravdavaju monitoring profesionalne izloženosti primjenom osjetljivih citogenetičkih biomarkera (30, 31). Međutim, njime se ne dobiva nedvojbeno informacija o spoju kojem su ljudi bili izloženi.

Nedvojbeni dokaz profesionalne izloženosti triazinskim herbicidima, kao i izloženosti opće populacije putem hrane i vode, izvorni su spojevi i produkti njihove metaboličke razgradnje izlučeni iz organizma urinom (33-36, 42, 43). Bitan preduvjet takvog pristupa praćenju izloženosti ljudi su pouzdani analitički postupci. Analiza tragova triazinskih herbicida u biološkom materijalu poput krvi i urina zahtijeva primjenu analitičkih postupaka koji se sastoje od ekstrakcije spojeva prikladnim otapalom ili akumuliranja na odgovarajućem sorbentu, čišćenja ekstrakta od interferirajućih spojeva te kvalitativne i kvantitativne analize. Zbog niskih razina ovih spojeva u uzorcima i velikog broja interferirajućih spojeva,

analitički postupak mora omogućiti djelotvorno i selektivno određivanje što većeg broja ispitivanih spojeva i njihovih metabolita, a dobiveni rezultati moraju biti ponovljivi i usporedivi.

Zbog lipofilnih svojstava izvornih triazinskih herbicida i njihova relativno brzog metabolizma veća je vjerojatnost da u urinu izloženih osoba prevladavaju polarniji metaboliti pa je važno razviti takve analitičke metode koje omogućuju određivanje ne samo izvornog spoja već i što većeg broja razgradnih produkata.

Postupak pripreme uzoraka u analizi pesticida nastoji se što više pojednostavniti. Ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *Solid-Phase Extraction*, SPE) postala je metodom izbora za istodobnu ekstrakciju i akumuliranje različitih pesticida iz različitih tipova uzoraka uključujući i biološke uzorke. SPE se može rabiti tako da je priprava uzorka potpuno odvojena od kromatografskog sustava završne analize (*off-line*) (43, 44) ili tako da je priprava uzorka integrirana u analitički sustav (*on-line*) (45, 46).

Vrlo osjetljiva i djelotvorna mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *Solid-Phase Microextraction*, SPME), tehnika ekstrakcije različitih uzoraka bez uporabe otapala, uspješno ispunjava zahtjeve za što jednostavniju pripremu uzoraka. Do danas je SPME našao svoju primjenu u obradi plinovitih, tekućih i čvrstih uzoraka (47, 48). Iako se još ne primjenjuje široko u analizi pesticida u biološkim uzorcima, SPME se uspješno rabila za akumuliranje izvornih klor-, metiltio- i metoksitriazina iz krvi i urina ljudi (47).

Za određivanje izvornih triazinskih spojeva i njihovih mono- i didealkiliranih metabolita u urinu ljudi najčešće se rabi plinskrokromatografska analiza uz detektor selektivan za spojeve dušika i fosfora (engl. *Gas Chromatography-Nitrogen Phosphorus Detector*, GC-NPD) (34, 49, 50) ili uz detekciju spektrometrom masa (engl. *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*, GC-MS) (50-52). Za određivanje polarnijih metabolita, primjerice konjugata s merkaptornom kiselinom, prikladnija je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti uz UV-detektor (engl. *High Performance Liquid Chromatography-UV*, HPLC-UV) (53). Određivanje i nedvojbena identifikacija polarnih metabolita postali su jednostavniji s razvojem međuspojeva koji su omogućili povezivanje tekućinskog kromatografa visoke djelotvornosti sa spektrometrom masa (engl. *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, LC-MS) (51-57). Beeson i sur. (58) razvili su metodu tekućinske kromatografije povezane s tandemnom spektrometrijom masa (LC-MS/MS) uz kemijsku ionizaciju analita pri

atmosferskom tlaku za određivanje atrazin merkapturata u urinu. Modifikacija te metode primijenjena je za određivanje razina atrazin merkapturata u urinu ispitanika iz opće populacije (54). LC-MS/MS uz kemijsku ionizaciju pri atmosferskom tlaku primijenjena je za određivanje 18 specifičnih biomarkera najčešće upotrebljivanih pesticida (56) i za određivanje razina izvornih spojeva i njihovih metabolita u urinu poljoprivrednih radnika (57). Koivunen i sur. (45) razvili su metodu LC-MS/MS uz ionizaciju elektroraspršenjem koju su Barr i sur. (59) primijenili za određivanje razina metabolita atrazina u urinu izloženih ljudi.

Osim toga, pojedine triazinske herbicide moguće je brzo i relativno jednostavno detektirati enzimskom imunoanalizom, ali kod ove tehnike postoje ograničenja pri određivanju jednog spoja u smjesi sličnih spojeva ili određivanju razgradnih produkata zbog međusobnih interferencija ili nedovoljne osjetljivosti (33, 50). Enzimska imunoanaliza pogodna je tehnika za dokazivanje klase spojeva.

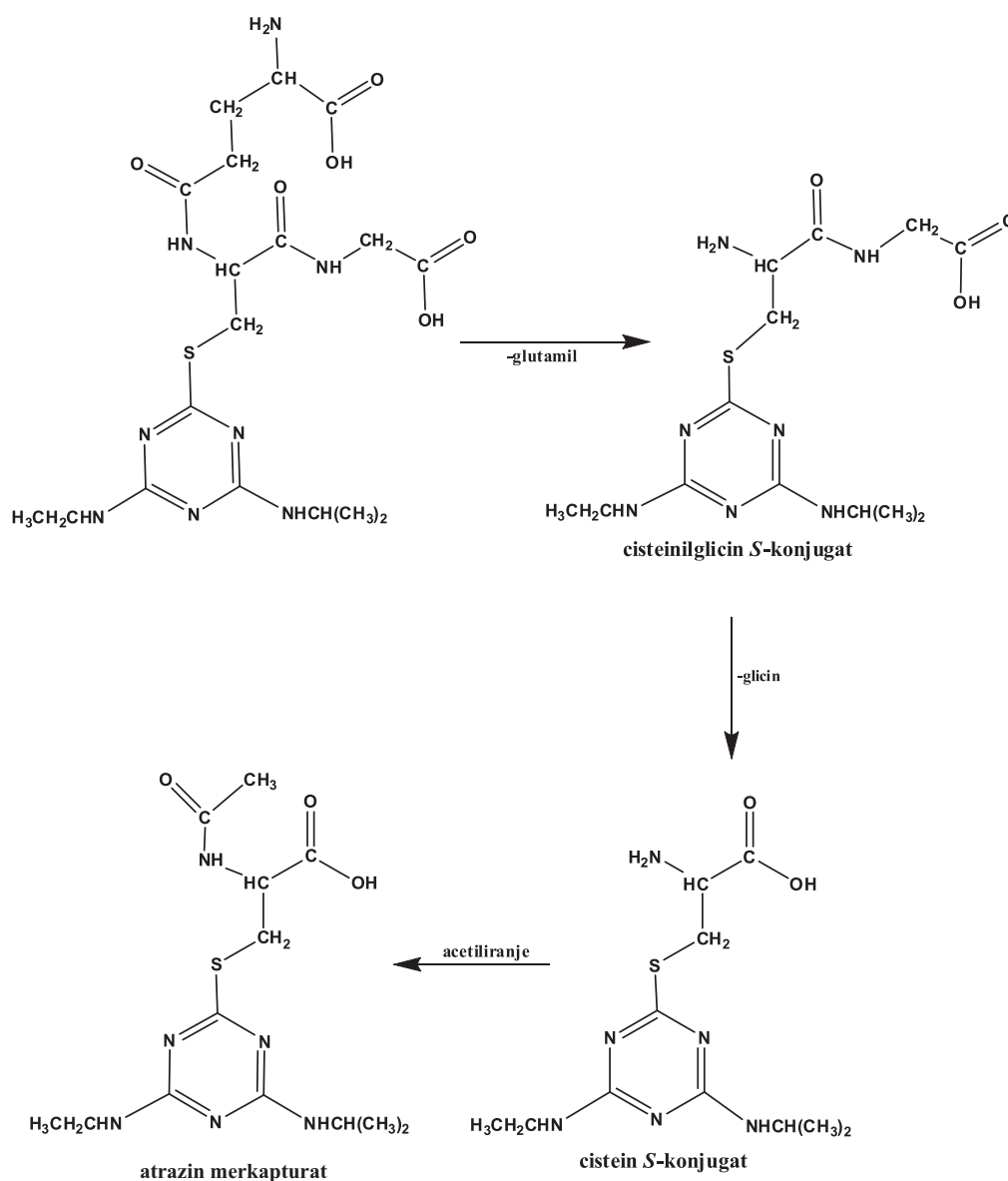
Gilman i sur. (60) obilježili su za istraživanje izloženosti ljudi apsorpcijom kroz kožu atrazin izotopom ^{14}C te su izvorni spoj i njegove metabolite određivali u urinu. Usporedili su rezultate analize akceleracijskom spektrometrijom masa s rezultatima mjerenja scintilacijskim brojačem kako bi istražili prikladnost ovih dviju tehnika za određivanje ukupnih metabolita atrazina, ali i mogućnost detekcije pojedinih spojeva odijeljenih tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti. Masene koncentracije atrazina obilježenog izotopom ^{14}C određene u urinu tim vrlo osjetljivim i ponovljivim metodama bile su razine fmol mL^{-1} (60).

Metabolizam atrazina kod ljudi proučavan je pokusima u uvjetima *in vitro* s mikrosomima iz jetre (34), kao i praćenjem koncentracija metabolita i izvornog spoja u urinu profesionalno izloženih osoba (42, 49, 50). Kod ljudi su i u urinu i pokusima provedenim u uvjetima *in vitro* na mikrosomima iz jetre detektirani uglavnom dealkilirani metaboliti atrazina (34). Na temelju tih rezultata zaključeno je da pri metaboličkoj razgradnji atrazina kod ljudi prevladava *N*-dealkiliranje, uz nastajanje monodealkiliranih i didealkiliranih metabolita. Osim tih metabolita, u urinu su detektirane i niske koncentracije nepromijenjenog atrazina. Ikonen i sur. (35) pratili su izloženost atrazinu kod radnika koji su mu bili izloženi tijekom rada na uništavanju korova uz željezničku prugu. Jedinu dealkilirani metaboliti atrazina detektirani u 24-satnim uzorcima urina tih

radnika bili su deetildeizopropilatrazin i deizopropilatrazin, prisutni u podjednakim koncentracijama ($30 \mu\text{mol L}^{-1}$ do $110 \mu\text{mol L}^{-1}$). Zapažena je korelacija koncentracije tih metabolita u urinu s koncentracijom atrazina izmjerenom u zraku u zoni udisanja. U uzorku urina radnika skupljenom 17 sati nakon prestanka izloženosti nije nađen nijedan metabolit atrazina.

Catenacci i sur. (42, 43) pratili su izloženost atrazinu radnika zaposlenih u sintezi tog herbicida, određivanjem izvornog spoja i njegovih monodealkiliranih i didealkiliranih metabolita u 24-satnom uzorku urina podijeljenom u tri 8-satne frakcije. Približno 50 % od ukupno izlučenih metabolita izlučilo se u prvih 8 sati nakon izloženosti,

a izlučivanje je bilo završeno unutar 24 sata iz čega se može zaključiti da se atrazin ne akumulira u organizmu. Ukupno se urinom izlučilo od 1 % do 2 % atrazina određenog u zraku radne okoline u zoni udisanja, a koja je bila u rasponu od 12 mmola do 657 mmola u jednoj radnoj smjeni. Atrazin se najvećim dijelom izlučio kao didealkilirani atrazin, čiji je udjel u ukupno izlučenim metabolitima bio približno 80 % (1,614 mmola po 24-satnom uzorku urina). Deizopropilatrazin činio je 10 % ukupnih metabolita (0,206 mmola po 24-satnom uzorku), deetilatrazin 8 % (0,112 mmola po 24-satnom uzorku), a nepromijenjeni atrazin samo 1 % do 2 % (0,021 mmola po 24-satnom uzorku urina). Izloženost pojedinaca razlikovala se ovisno o radnome mjestu, ali je bez



Slika 2 Glavni put nastajanja atrazin merkapturata (62, 63)

obzira na to izloženost putem kože bila 2 do 10 puta veća od one putem udisanja (43). Rezultati usporedivi s podacima Catenaccia i sur. (43) dobiveni su i istraživanjem izloženosti radnika zaposlenih u sintezi i formuliranju triazinskih herbicida, koji su osim atrazinu u manjoj mjeri bili izloženi i simazinu (49). Za istraživanje i dokazivanje profesionalne izloženosti triazinskim herbicidima skupljeni su trenutačni uzorci urina radnika zaposlenih u proizvodnji pesticida. Uzorci urina skupljeni su u sredini radnog dana, i to prije početka novoga proizvodnog ciklusa i nakon sedam mjeseci kontinuirane proizvodnje. Ukupno su skupljena 34 uzorka u kojima su određivani mono- i didealkilirani metaboliti atrazina te izvorni herbicidi atrazin i simazin. Radnici uključeni u istraživanje radili su s različitim herbicidima koji se često pripremaju istodobno pa na razine metabolita u urinu mogu utjecati različiti spojevi. Deizopropilatrazin i deetildeizopropilatrazin zajednički su metaboliti atrazina i simazina. Unatoč petomjesečnom prekidu proizvodnje herbicida, u 14 uzoraka urina skupljenih prije početka novoga proizvodnog ciklusa nađeni su tragovi dealkiliranih metabolita od 20 ng mL^{-1} do 199 ng mL^{-1} . Medijani masenih koncentracija deizopropilatrazina i deetildeizopropilatrazina bili su približno jednaki, ali je najviša masena koncentracija od 199 ng mL^{-1} izmjerena za deetildeizopropilatrazin. Nakon sedam mjeseci kontinuirane proizvodnje atrazina i simazina, izvorni spojevi i/ili njihovi metaboliti nađeni su u svim uzorcima urina. Većina uzoraka (njih 12) sadržavala je četiri ili pet triazinskih spojeva. Više od polovice uzoraka sadržavalo je simazin, dok atrazin nije detektiran samo u jednom uzorku.

Dominantni metabolit izlučen urinom bio je deetildeizopropilatrazin u masenim koncentracijama od 30 ng mL^{-1} do 667 ng mL^{-1} , odnosno s udjelom od 45 % do 64 % u ukupnim metabolitima izlučenim urinom. Udio monodealkiliranih klorotriazinskih metabolita u ukupnim metabolitima izlučenim urinom bio je od 15 % do 29 % u koncentracijama od 20 ng mL^{-1} do 78 ng mL^{-1} , a nepromijenjenog atrazina od 7 % do 13 %. Iako je udio izvornog spoja gotovo zanemariv, njegovo je određivanje važno radi potvrde izloženosti upravo tom spoju (49).

Neka su istraživanja pokazala da metabolička razgradnja atrazina u ljudi uključuje nastajanje konjugata s glutationom (50), što upućuje na važnu ulogu glutation *S*-transferaze u metabolizmu atrazina (51). U novijim istraživanjima pokazano je da je atrazin merkapturat prevladavajući metabolit atrazina

izlučen urinom te da je konjugacija s glutationom (GSH) važan put biotransformacije (50, 53, 61). Prilikom biotransformacije u kojoj sudjeluje glutation (slika 2), atom klora na triazinskom prstenu enzimski se kataliziranom reakcijom supstituira slobodnom –SH-skupinom na cisteinskom ostatku tripeptida glutationa. Terminalni peptidi enzimski se cijepaju i to najprije glutaminski, a zatim i glicinski kraj peptida koji obično služe za ponovnu sintezu glutationa. Cistein se najčešće *N*-acetilira u merkapturnu kiselinu. Urinom se izlučuje atrazin merkapturat (62, 63).

Rezultati istraživanja koje su proveli Lucas i sur. (50) analizirajući uzorke urina radnika koji su primjenjivali atrazin u poljoprivredi upozorili su na atrazin merkapturat kao glavni metabolit atrazina u urinu. Koncentracije atrazin merkapturata određene enzimskom imunoanalizom u urinu radnika koji su primjenjivali atrazin bile su 10 puta više od onih didealkiliranog i monodealkiliranih metabolita atrazina. Skupljeni su dnevni uzorci urina izloženih radnika, i to prije početka primjene i tijekom deset dana primjene atrazina. Izloženost putem kože i udisanja uspoređena je s razinama atrazina i njegovih metabolita izlučenih urinom. Za procjenu izloženosti putem kože radnici su ispod radne odjeće nosili pamučnu majicu dugih rukava i pamučne rukavice. Zrak u zoni udisanja prosisavan je kroz filtre te je na temelju toga procijenjena izloženost putem udisanja. Zbrajanjem mase atrazina određenog na odjeći i u zoni udisanja približno je procijenjena ukupna izloženost. Procijenjeno je da su tijekom deset dana radnici bili izloženi od 1 mg do 21 mg atrazina po radnom danu od čega je na izloženost putem udisanja otpalo samo 0,075 %. Atrazin ili njegovi metaboliti nisu detektirani ni u jednom uzorku urina radnika skupljenom prije početka izloženosti kao ni u istodobno skupljenim uzorcima urina neizloženih osoba. U većini uzoraka urina skupljenih tijekom izloženosti i u najvišoj masenoj koncentraciji detektiran je atrazin merkapturat od $0,5 \text{ ng mL}^{-1}$ do 276 ng mL^{-1} , dok su monodealkilirani metaboliti atrazina detektirani u manjem broju uzoraka. U ukupno izlučenim metabolitima, udjel atrazin merkapturata bio je 80 %, dok je udjel izvornog spoja bio manji od 1 %. Takav rezultat upućuje na prikladnost određivanja atrazin merkapturata kao osjetljivog biološkog pokazatelja pri praćenju izloženosti ljudi atrazinu.

Buchholz i sur. (53) pratili su metabolizam atrazina kod dobrovoljaca koji su putem kože bili izloženi atrazinu obilježenom s ^{14}C . Dominantni put izlučivanja nakon apsorpcije preko kože bio je urin u kojem su i

Tablica 3 Razine triazinskih spojeva u urinu profesionalno izloženih osoba

Spoj	Primjena	N ^a / n ^b	Raspon	Literatura
Atrazin	radnici u proizvodnji	4 / 4	(0,01 do 0,30) µg h ⁻¹	(42)
Atrazin DIA DEA DDA	radnici u proizvodnji atrazina	6 / 6 6 / 6 6 / 6 6 / 6	(0,017 do 0,021) µmol / 24 h (0,0134 do 0,206) µmol / 24 h (0,112 do 0,200) µmol / 24 h (1,137 do 1,614) µmol / 24 h	(43)
Atrazin DEA DIA DDA	poljoprivredni radnici	6 / 6 6 / 6 6 / 6 6 / 6	< 1 nmol mL ⁻¹ < 5 nmol mL ⁻¹ (30 do 110) µmol L ⁻¹	(35)
AM ^c DEA DIA DDA	poljoprivredni radnici	19 19 / 6 19 / 6 19 / 0	(0,5 do 1756) ng mL ⁻¹ (10 do 49) ng mL ⁻¹ (10 do 49) ng mL ⁻¹ ND	(50)
Atrazin DEA DIA DDA	radnici u proizvodnji atrazina	16 / 17 14 / 17 15 / 17 14 / 17	(5 do 29) ng mL ⁻¹ (20 do 98) ng mL ⁻¹ (25 do 35) ng mL ⁻¹ (30 do 667) ng mL ⁻¹	(49)
AM DEA	poljoprivredni radnici	62 / 46 120 / 37	(1,4 do 40) ng mL ⁻¹ (1,4 do 5) ng mL ⁻¹	(51)
Atrazin AM DEA DIA	poljoprivredni radnici	408 / 306 405 / 166 405 / 32 405 / 2	(2,0 do 1100) nmol L ⁻¹ (2,0 do 230) nmol L ⁻¹ (49 do 430) nmol L ⁻¹ (29 i 53) nmol L ⁻¹	(52)

^a ukupan broj uzoraka

^b broj pozitivnih uzoraka

^c atrazin merkapturat

određivani metaboliti atrazina. Izlučivanje metabolita bilo je završeno unutar 48 sati. U ranoj fazi, od 4 sata do 8 sati nakon izloženosti u urinu su od metabolita prevladavali atrazin merkapturat i deetilatrazin, a u kasnijim fazama od 24 sata do 48 sati prevladavali su polarniji metaboliti - konjugati monodealkiliranih metabolita i merkapturane kiseline. Za razliku od prethodnih istraživanja (42, 43, 49), u ovome istraživanju u urinu nije detektiran izvorni spoj. Rezultati istraživanja koje su proveli Perry i sur. (51) također upućuju na atrazin merkapturat kao glavni metabolit atrazina koji se izlučuje urinom. Analiza 99 trenutačnih uzoraka urina skupljenih od poljoprivrednih radnika 8 sati nakon primjene atrazina u jednoj radnoj smjeni pokazala je u 37 % uzoraka prisutnost deetilatrizona, dok je u 80 % od 50 testiranih uzoraka dokazan atrazin merkapturat. Masene koncentracije nađenih metabolita bile su u rasponu od 1,4 ng mL⁻¹ do 50 ng mL⁻¹. Analizirani su i uzorci urina poljoprivrednih radnika koji nisu primjenjivali atrazin te su odabrani kao kontrolna skupina. Ni u jednom od

21 uzorka urina nisu detektirani atrazin i deetilatrazin. Pozitivni rezultati dobiveni su za atrazin merkapturat koji je detektiran u 2 od 11 testiranih uzoraka u koncentracijama od 2 ng mL⁻¹ do 4 ng mL⁻¹ (51).

Da je atrazin merkapturat prevladavajući metabolit atrazina u urinu, potvrđuju i analize koje su proveli Hines i sur. (52). Izvorni herbicidi i njihovi metaboliti određivani su i u 408 uzoraka urina skupljenih od 15 poljoprivrednih radnika koji su primjenjivali herbicide tijekom uzastopnih 6 tjedana. Svaki od radnika skupio je tijekom tog razdoblja pet do sedam 24-satnih uzoraka urina. Trenutačni uzorci urina skupljeni su od radnika prije početka izloženosti, a također je analizirano i 46 uzoraka prvog jutarnjeg urina kontrolne skupine osoba iz opće populacije. U najviše uzoraka, 75 %, detektiran je atrazin merkapturat u koncentracijama od 2 nmol L⁻¹ do 1100 nmol L⁻¹. Deetilatrazin detektiran je u 41 % uzoraka u koncentracijama od 27 nmol L⁻¹ do 230 nmol L⁻¹, a deizopropilatrazin u samo 8 % uzoraka u koncentracijama od 49 nmol L⁻¹ do 430 nmol L⁻¹.

Atrazin je nađen u samo dva uzorka, i to u koncentracijama 29 nmol L⁻¹ i 53 nmol L⁻¹. U uzorcima urina skupljenim od radnika prije početka izloženosti nisu detektirani ni deetilatrizin ni deizopropilatrizin, dok je atrazin merkapturat detektiran u 2 od 15 uzoraka (13 %) u koncentracijama 12 nmol L⁻¹ i 19 nmol L⁻¹. Od 46 uzoraka urina uzetih od ispitanika iz opće populacije samo je jedan uzorak sadržavao atrazin merkapturat i deetilatrizin u koncentracijama 5 nmol L⁻¹ i 32 nmol L⁻¹, dok deizopropilatrizin nije detektiran ni u jednom uzorku (52). U tablici 3. uspoređene su razine triazinskih spojeva određenih u urinu profesionalno izloženih osoba.

ZAKLJUČAK

Metabolizam atrazina kod ljudi nije još potpuno razjašnjen. Pretpostavlja se da su glavni putovi razgradnje atrazina u ljudskom organizmu *N*-dealkiliranje i biotransformacija putem glutationa. Razgradni produkti izlučuju se urinom u 24 do 48 h, a njihovim određivanjem u urinu može se pratiti izloženost ljudi atrazinu. Kao dokaz izloženosti, u urinu se, uz monodealkilirane i didealkilirane metabolite atrazina, određuje i izvorni spoj.

Novija istraživanja sve više upućuju na važnu ulogu merkapturane kiseline, tj. *N*-acetil-*L*-cistein *S*-konjugata u biološkome monitoringu izloženosti ljudi raznim kemikalijama. Takvi spojevi, adukti s biološki važnim makromolekulama, služe kao biomarkeri u procjeni profesionalne izloženosti. Merkapturna kiselina obično se određuje u urinu, a budući da se izlučuje u relativno kratkom vremenu, omogućuje izravnu i brzu procjenu profesionalne izloženosti. Razvoj sve osjetljivijih analitičkih metoda temeljenih na tekućinskoj kromatografiji uz detekciju spektrometrom masa omogućio je i određivanje atrazin merkapturata u urinu izloženih osoba. Ta su istraživanja pokazala prikladnost određivanja atrazin merkapturata u urinu kao osjetljivog pokazatelja izloženosti ljudi atrazinu. Međutim, kao potvrdu izloženosti, svakako je potrebno određivati i izvorni spoj.

LITERATURA

1. LeBaron HM, McFarland JE, Burnside OC, urednici. The Triazine Herbicides. Amsterdam: Elsevier; 2008.
2. Berg M, Müller SR, Schwarzenbach RP. Simultaneous determination of triazines including atrazine and their major metabolites hydroxyatrazine, desethylatrazine and deisopropylatrazine in natural waters. *Anal Chem* 1995;67:1860-5.
3. Willson MP, Savage EP, Adrian DD, Aaronson MJ, Keefe TJ, Hamar DH, Tessari JT. Groundwater transport of the herbicide, atrazine, Weld County, Colorado. *Bull Environ Contam Toxicol* 1987;39:807-14.
4. Dörfler U, Scheunert I. s-Triazine herbicides in rainwater with special reference to the situation in Germany. *Chemosphere* 1997;35:77-85.
5. Ferrer I, Barceló D, Thurman EM. Double-disk solid-phase extraction: simultaneous cleanup and trace enrichment of herbicides and metabolites from environmental samples. *Anal Chem* 1999;71:1009-15.
6. Loos R, Locoro G, Comero S, Contini S, Schwesig D, Werres F, Balsaa P, Gans O, Weiss S, Blaha L, Bolchi M, Gawlik BM. Pan-European survey on the occurrence of selected polar organic persistent pollutants in ground water. *Water Res* 2010;44:4115-26.
7. Shiu WY, Ma KC, MaCkay D, Seiber JN, Wauchope RD. Solubilities of pesticides chemicals in water. Part II: Data compilation. *Rev Environ Contam Toxicol* 1990;16:15-187.
8. Tomlin C, urednik. The Pesticide Manual. Incorporating the Agrochemicals Handbook. 10. izd. London: British Crop Protection Council; 1994.
9. Noble A. Partition coefficients (*n*-octanol-water) for pesticides. *J Chromatogr* 1993;642:3-14.
10. Fröbe Z, Štengl B, Lovrec I, Drevenkar V. *n*-Octanol/water partition coefficients and sorption behaviour of triazine herbicides and some of their degradation products. U: Proceedings of the COST 66 Workshop "Pesticides in soil and the environment"; Stradford-upon-Avon, V. Britanija 1996. Sažeci str. 49-50.
11. Prosen H, Zupančič-Kralj L. The interaction of triazine herbicides with humic acids. *Chromatographia* 2000;51: S155-64.
12. Weber JB. Mechanisms of adsorption of s-triazines by clay colloids and factors affecting plant availability. U: Gunther FA, Gunther JD, urednici. Residue reviews: the triazine herbicides. Vol 32. New York: Springer-Verlag; 1970. str. 93-130.
13. Büchel KH. Chemistry of Pesticides. New York (NY): John Wiley & Sons, Inc.; 1983.
14. Sabik H, Jeannot R, Rondeau B. Multiresidue methods using solid-phase extraction techniques for monitoring priority pesticides, including triazines and degradation products, in ground and surface waters. *J Chromatogr A* 2000;885:217-36.
15. Stevens JT, Breckenridge CB, Wetzel LT, Gillis JH, Leumpert LG, Eldridge JC. Hypothesis for mammary tumorigenesis in Sprague-Dawley rats exposed to certain triazine herbicides. *J Toxicol Environ Health* 1994;43:139-53.
16. Gojmerac T, Kniewald J. Atrazine biodegradation in rats – a model for mammalian metabolism. *Bull Environ Contam Toxicol* 1989;43:199-206.
17. Kniewald J, Gojmerac T, Šimić B, Kniewald Z. The biodegradation of atrazine and the impact on reproductive system in mammals and avians-comparative study. U: Løkke H, Tyle H, Bro-Rasmussen F, urednici. 1st European Conference on Ecotoxicology: a SECOTOX Regional Conference on testing, Prediction and Validation Pathways,

- Fate and Effects of Chemicals in Environment; 17-19 October 1988. Copenhagen, Danska. Lyngby: The Technical University of Denmark; 1988. str. 93-102.
18. Babić-Gojmerac T, Kniewald Z, Kniewald J. Testosterone metabolism in neuroendocrine organs in male rats under atrazine and deethylatrazine influence. *J Steroid Biochem* 1989;33:141-6.
 19. Kniewald J, Peruzović M, Gojmerac T, Milković K, Kniewald Z. Indirect influence of s-triazines on rat gonadotropic mechanism at early postnatal period. *J Steroid Biochem* 1987;27:1095-100.
 20. Kniewald J, Jankominić M, Tomljenović A, Šimić B, Romac P, Vranešić Đ, Kniewald Z. Disorders of male rat reproductive tract under the influence of atrazine. *J Appl Toxicol* 2000;20:61-8.
 21. Wetzel LT, Leumpert LG, Breckenridge CB, Tisdell MO, Stevens JT, Thakur AK, Extrom PJ, Eldridge JC. Chronic effects of atrazine on estrus and mammary tumor formation in female Sprague-Dawley and Fischer 344 rats. *J Toxicol Environ Health* 1994;43:169-82.
 22. Stoker TE, Robinette CL, Cooper R. Maternal exposure to atrazine during lactation suppresses suckling-induced prolactin release and results in prostatitis in the adult offspring. *Toxicol Sci* 1999;52:68-79.
 23. Cooper RL, Stoker TE, Tyrey L, Goldman JM, McElroy WK. Atrazine disrupts the hypothalamic control of pituitary-ovarian function. *Toxicol Sci* 2000;53:297-307.
 24. Pruett SB, Fan R, Zheng Q, Myers LP, Hebert P. Modeling and predicting immunological effects of chemical stressors: characterization of quantitative biomarker for immunological changes caused by atrazine and ethanol. *Toxicol Sci* 2003;75:343-54.
 25. Filipov NM, Pinchuk LM, Boyd BL, Crittenden PL. Immunotoxic effects of short-term atrazine exposure in young male C57BL/6 mice. *Toxicol Sci* 2005;86:324-32.
 26. Moore A, Waring CP. Mechanistic effects of a triazine pesticide on reproductive endocrine function in mature male Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr. *Pestic Biochem Physiol* 1998;62:41-50.
 27. Taets C, Aref S, Rayburn AL. The clastogenic potential of triazine herbicide combinations found in potable water supplies. *Environ Health Perspect* 1998;106:197-201.
 28. Butler MA, Hoagland RE. Genotoxicity assessment of atrazine and some major metabolites in the Ames test. *Bull Environ Contam Toxicol* 1989;43:797-804.
 29. Dunkelberg H, Fuchs J, Hengstler JG, Klein E, Oesch F, Strüder K. Genotoxic effects of the herbicides alachlor, atrazine, pendimethaline and simazine in mammalian cells. *Bull Environ Contam Toxicol* 1994;52:498-504.
 30. Želježić D, Garaj-Vrhovac V. Sister chromatid exchange and proliferative rate index in the longitudinal risk assessment of occupational exposure to pesticides. *Chemosphere* 2002;46:295-303.
 31. Želježić D, Garaj-Vrhovac V. Chromosomal aberration and single-cell electrophoresis (comet) assay in the longitudinal risk assessment of occupational exposure to pesticides. *Mutagenesis* 2001;16:359-63.
 32. Sathiakumar N, MacLennan PA, Mandel J, Delzell E. A review of epidemiologic studies of triazines herbicides and cancer. *Crit Rev Toxicol* 2011;41(Suppl 1):1-34.
 33. Meli G, Bagnati R, Fanelli R, Benfenati E, Airoldi L. Metabolic profile of atrazine and N-nitrosoatrazine in rat urine. *Bull Environ Contam Toxicol* 1992;48:701-8.
 34. Lang D, Criegee D, Grothusen A, Saalfrank RW, Böcker RH. *In vitro* metabolism of atrazine, terbuthylazine, ametryne, and terbutryne in rats, pigs, and humans. *Drug Metab Dispos* 1996;24:859-65.
 35. Ikonen R, Kangas J, Savolainen H. Urinary atrazine metabolites as indicators for rat and human exposure to atrazine. *Toxicol Lett* 1988;44:109-12.
 36. Bradway DE, Moseman RF. Determination of urinary residue levels of the N-dealkyl metabolites of triazine herbicides. *J Agric Food Chem* 1982;30:244-7.
 37. Timchalk C, Dryzga MD, Langvardt PW, Kastl PE, Osborne DW. Determination of the effect of tridiphane on the pharmacokinetics of [¹⁴C]-atrazine following oral administration to male fisher 344 rats. *Toxicology* 1990;61:27-40.
 38. Rodríguez J, Harkin JM. New intermediates of dealkylation of [¹⁴C]-atrazine by mouse liver microsomes. *Pestic Biochem Physiol* 1995;53:23-33.
 39. Hanioka N, Jinno H, Kitazawa K, Tanaka-Kagawa T, Nishimura T, Ando M, Ogawa K. *In vitro* biotransformation of atrazine by rat liver microsomal cytochrome P450 enzymes. *Chem Biol Interact* 1998;116:181-98.
 40. Erickson MD, Frank CW, Morgan DP. Determination of s-triazine herbicide residues in urine studies of excretion and metabolism in swine as a model to human metabolism. *J Agric Food Chem* 1979;27:743-5.
 41. Ross MK, Filipov NM. Determination of atrazine and its metabolites in mouse urine and plasma by LC-MS analysis. *Anal Biochem* 2006;351:161-73.
 42. Catenacci G, Maroni M, Cottica D, Pozzoli L. Assessment of human exposure to atrazine through the determination of free atrazine in urine. *Bull Environ Contam Toxicol* 1990;44:1-7.
 43. Catenacci G, Barbieri F, Bersani M, Ferioli A, Cottica D, Maroni M. Biological monitoring of human exposure to atrazine. *Toxicol Lett* 1993;69:217-22.
 44. Panuwet P, Restrepo PA, Magsumbol M, Jung YK, Montesano MA, Needham LL, Barr BD. An improved high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric method to measure atrazine and its metabolites in human urine. *J Chromatogr B* 2010;878:957-62.
 45. Koivunen ME, Dettmer K, Vermeulen R, Bakke B, Gee SJ, Hammock BD. Improved methods for urinary atrazine mercapturate analysis-Assessment of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and a novel liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) method utilizing online solid phase extraction (SPE). *Anal Chim Acta* 2006;572:180-9.
 46. Panuwet P, Nguyen JV, Kuklenyik P, Udunka S, Needham LL, Barr BD. Quantification of atrazine and its metabolites in urine by on-line solid-phase extraction-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2008;391:1931-9.
 47. Kumazawa T, Lee X-P, Kondo K, Sato K, Seno H, Watanabe-Suzuki K, Ishii A, Suzuki O. Determination of triazine herbicides in human body fluids by solid-phase microextraction and capillary gas chromatography. *Chromatographia* 2000;52:195-9.
 48. Beltran J, López FJ, Hernández F. Solid-phase microextraction in pesticide residue analysis. *J Chromatogr A* 2000;885:389-404.

49. Mendaš G, Tkalčević B, Drevenkar V. Determination of chloro- and methylthiotriazine compounds in human urine: extraction with diethyl ether and C₁₈ solid-phase extraction for gas chromatographic analysis with nitrogen-selective and electron capture detection. *Anal Chim Acta* 2000;424:7-18.
50. Lucas AD, Jones AD, Goodrow MH, Saiz SG, Blewett C, Seiber JN, Hammock BD. Determination of atrazine metabolites in human urine development of a biomarker of exposure. *Chem Res Toxicol* 1993;6:107-16.
51. Perry MJ, Christiani DC, Degenhardt D, Tortorelli J, Strauss J, Sonzogni WC. Urinalysis of atrazine exposure in farm pesticide applicators. *Toxicol Ind Health* 2000;16:285-90.
52. Hines CJ, Deddens JA, Striley CAF, Biagini RE, Shoemaker DA, Brown KK, Mackenzie BA, Delon Hull R. Biological monitoring for selected herbicide biomarkers in the urine of exposed custom applicators: Application of mixed-effect models. *Ann Occup Hyg* 2003;47:503-17.
53. Buchholz BA, Fultz E, Haack KW, Vogel JS, Gilman SD, Gee SJ, Hammock BD, Hui X, Wester RC, Maibach HI. HPLC-accelerator MS measurement of atrazine metabolites in human urine after dermal exposure. *Anal Chem* 1999;71:3519-25.
54. Baker SE, Barr DB, Driskell WJ, Beson MD, Needham LL. Quantification of selected pesticide metabolites in human urine using isotope dilution high-performance liquid chromatography / tandem mass spectrometry. *J Expo Anal Environ Epidemiol* 2000;10:789-98.
55. Pozzebon JM, Querioz SCN, Melo LFC, Kapor MA, Jardim ICSF. Application of new high-performance liquid chromatography and solid phase extraction materials to the analysis of pesticides in human urine. *J Chromatogr A* 2003;987:381-7.
56. Olsson AO, Baker SE, Nguyen JV, Romanoff LC, Unduka SO, Walker RD, Flemmen KL, Barr DB. A liquid chromatography-tandem mass spectrometry multiresidue method for quantification of specific metabolites of organophosphorus pesticides, synthetic pyrethroids, selected herbicides, and DEET in human urine. *Anal Chem* 2004;76:2453-61.
57. Curwin BD, Hein MJ, Sanderson WT, Barr DB, Heederik D, Reynolds SJ, Ward EM, Alavanja MC. Urinary and hand wipe pesticides levels among farmers and nonfarmers in Iowa. *J Expo Anal Environ Epidemiol* 2005;15:500-8.
58. Beeson MD, Driskell WJ, Barr DB. Isotope dilution high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for quantifying urinary metabolites of atrazine, malathion and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Anal Chem* 1999;71:3526-30.
59. Barr BD, Panuwet P, Nguyen JV, Udunka S, Needham LL. Assessing exposure to atrazine and its metabolites using biomonitoring. *Environ Health Perspect* 2007;115:1474-8.
60. Gilman SD, Gee SJ, Hammock BD, Vogel JS, Haack K, Buchholz BA, Freeman SPHT, Wester RC, Hui X, Maibach HI. Analytical performance of accelerator mass spectrometry and liquid scintillation counting for detection of ¹⁴C-labeled atrazine metabolites in human urine. *Anal Chem* 1998;70:3463-9.
61. Jaeger LL, Jones AD, Hammock BD. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for atrazine mercapturic acid in human urine. *Chem Res Toxicol* 1998;11:342-52.
62. De Rooij BM, Commandeur JNM, Vermeulen NPE. Mercapturic acid as biomarkers of exposure to electrophilic chemicals: application to environmental and industrial chemicals. *Biomarkers* 1998;3:239-303.
63. Perbellini L, Veronese N, Princivalle A. Mercapturic acids in the biological monitoring of occupational exposure to chemicals. *J Chromatogr B* 2002;781:269-90.

Summary

BIOMONITORING OF HUMAN EXPOSURE TO TRIAZINE HERBICIDES

Triazine herbicides are very common and only 0.1 % reach the target pests, while the rest moves into other environmental compartments. Their fate in the environment depends on their movement through the air, water, and soil and on the rate of their degradation or transformation. Triazine compounds may be transformed by water, microorganisms, and sunlight. Widespread use and persistence of triazine herbicides in soil has resulted in contamination of surface, drinking, and even rain water with parent compounds and degradation products, posing a risk to the general population.

The metabolism and effects of triazine herbicides have been studied in experimental animals and in experiments *in vitro*. There are only a few studies of their metabolism and excretion in humans. Agricultural and manufacturing workers are exposed to triazines during application and production. Human exposure is monitored by determining parent compounds and their metabolites in urine. Due to the low concentrations of urinary metabolites in occupationally exposed persons, very sensitive analytical methods are required. This paper describes the structure and properties of symmetric triazine herbicides, their metabolism, and effects in humans and animals and the levels of these compounds in the urine of occupationally exposed persons.

KEY WORDS: *atrazine, metabolism, occupational exposure*

CORRESPONDING AUTHOR:

Dr. sc. Gordana Mendaš, dipl. ing. kemije
Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada
Ksaverska cesta 2, p.p. 291, 10001 Zagreb, Hrvatska
E-mail: gmendas@imi.hr