

UNIVERZITET U BEOGRADU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

Ivana V. Matić Bujagić

**ODREĐIVANJE TRAGOVA
STEROIDNIH HORMONA I STEROLA
KAO INDIKATORA IZVORA
ZAGAĐENJA REČNIH SEDIMENATA
METODOM TEČNE HROMATOGRFIJE
SA TANDEM MASENOM
SPEKTROMETRIJOM**

doktorska disertacija

Beograd, 2016

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Ivana V. Matic Bujagic

**DETERMINATION OF TRACES OF
STEROID HORMONES AND STEROLS
AS INDICATORS OF POLLUTION
SOURCES OF RIVER SEDIMENTS BY
LIQUID CHROMATOGRAPHY TANDEM
MASS SPECTROMETRY**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016

Mentor:

Dr Svetlana Grujić, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Članovi komisije:

Dr Mila Laušević, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Dr Slavica Ražić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

Datum odbrane: _____

Zahvalnica

Ova doktorska disertacija je urađena na Katedri za analitičku hemiju i kontrolu kvaliteta Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu, u Laboratoriji za masenu spektrometriju.

Želela bih da izrazim veliku zahvalnost i poštovanje svom mentoru, dr Svetlani Grujić, vanrednom profesoru Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na sveobuhvatnom angažovanju i podršci, stručnoj pomoći i korisnim savetima tokom izrade ove doktorske disertacije.

Takođe se zahvaljujem dr Mili Laušević, redovnom profesoru Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu, za svestranu pomoć i savete, kako pri izradi disertacije tako i u mom naučnoistraživačkom radu.

Dr Slavici Ražić, redovnom profesoru Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, najiskrenije se zahvaljujem na stručnoj pomoći i korisnim sugestijama u konačnom oblikovanju ovog rada.

Koleginicama sa Katedre za analitičku hemiju i kontrolu kvaliteta, zahvaljujem se na stručnoj i kolegijalnoj pomoći i podršci.

Najveću i najiskreniju zahvalnost dugujem mojoj porodici i prijateljima na pruženoj iskrenoj i neizmernoj podršci i razumevanju tokom celokupnog školovanja i izrade ove disertacije.

ODREĐIVANJE TRAGOVA STEROIDNIH HORMONA I STEROLA KAO
INDIKATORA IZVORA ZAGAĐENJA REČNIH SEDIMENATA METODOM
TEČNE HROMATOGRAFIJE SA TANDEM MASENOM SPEKTROMETRIJOM

Rezime

Zbog rasprostranjenosti steroidnih jedinjenja u životnoj sredini i potencijalnih neželjenih efekata, interesovanje javnosti za prisustvo steroida u svim segmentima životne sredine je u stalnom porastu. Naime, steroidni hormoni i steroli, iako prisutni u niskim koncentracijama, mogu izazvati niz funkcionalnih poremećaja kod čoveka i životinja. Pored toga, danas je trend u svetu primena hemijskih markera, poput humanih/životinjskih i biljnih sterola, za utvrđivanje izvora zagađenja životne sredine.

Većina razvijenih analitičkih metoda za određivanje tragova steroidnih jedinjenja je usmerena na specifičnu klasu steroida. U literaturi je zabeležen veoma mali broj metoda za istovremeno određivanje steroidnih hormona i sterola, a sve postojeće metode zasnovane su na primeni gasne hromatografije u sprezi sa masenom spektrometrijom. Zbog izvesnih ograničenja metode gasne hromatografije-masene spektrometrije, postoji potreba za razvojem metode tečne hromatografije u sprezi sa masenom spektrometrijom koja bi omogućila određivanje tragova steroidnih jedinjenja u uzorcima iz životne sredine.

U ovom radu su opisani razvoj, optimizacija i validacija analitičke metode za analizu tragova dvadeset odabranih steroidnih hormona i humanih/životinjskih i biljnih sterola u rečnim sedimentima. Za odabrana steroidna jedinjenja je razvijena i optimizovana instrumentalna metoda tečne hromatografije sa tandem masenom spektrometrijom, uz korišćenje hemijske jonizacije na atmosferskom pritisku. Steroidni hormoni (estron i estriol, 17α - i 17β -estradiol) i steroli (epikoprostanol, epiholestanol, koprostanol i holestanol) sa identičnim MS^n reakcijama fragmentacije u masenom detektoru su uspešno hromatografski razdvojeni. U radu je izvršena optimizacija metode ekstrakcije odabranih analita iz rečnih sedimentata, kao i metode prečišćavanja dobijenih ekstrakata sedimentata. Ispitana je efikasnost ultrazvučne ekstrakcije rastvaračima različite polarnosti, kao i njihovim smešama. Optimizovana je i masa sedimenta za ekstrakciju, kao i vreme ultrazvučne ekstrakcije. Takođe je izvršen odabir najboljeg adsorbensa za prečišćavanje dobijenih ekstrakata, kao i izbor rastvarača za eluiranje

analita sa pakovanja kolone.

Razvijena metoda je primenjena u analizi sedimenata iz nekoliko reka u Srbiji. Rezultati su pokazali široku rasprostranjenost humanih/životinjskih i biljnih sterola, dok su od steroidnih hormona u uzorcima sedimenata detektovani samo mestranol i 17α -estradiol. Na osnovu koncentracija sterola detektovanih u uzorcima izračunati su odnosi sterola za utvrđivanje porekla zagađenja životne sredine. Od jedanaest ispitivanih odnosa, koprostanol/(koprostanol+holestanol), koprostanol/holesterol, epikoprostanol/koprostanol i sitostanol/koprostanol odnosi su identifikovani kao ključni u razlikovanju izvora zagađenja rečnih sedimenata. Na osnovu izračunatih odnosa sterola, većina ispitivanih sedimenata je prepoznata kao zagađena humanim fekalnim materijalom. Za dva uzorka je utvrđen kombinovan uticaj zagađenja komunalnim otpadnim vodama i prirodnih izvora sterola poreklom od biljojeda.

Ključne reči: steroidi, hormoni, steroli, rečni sedimenti, tečna hromatografija-tandem masena spektrometrija, odnosi sterola, fekalna kontaminacija.

Naučna oblast: Hemijske nauke

UDK: 543.645.2:504.5:556.53:543.544.5:543.51

DETERMINATION OF TRACES OF STEROID HORMONES AND STEROLS AS INDICATORS OF POLLUTION SOURCES OF RIVER SEDIMENTS BY LIQUID CHROMATOGRAPHY TANDEM MASS SPECTROMETRY

Abstract

Public concern over presence of steroid compounds in all environmental compartments has been constantly growing due to their widespread occurrence and potential adverse effects. Namely, steroid hormones and sterols can cause a number of functional disorders in humans and animals, even at trace levels. In addition, current worldwide trend is the application of chemical markers, as human/animal and plant sterols, for identification of sources of environmental contamination.

Majority of the developed analytical methods for trace determination of steroid compounds are focused on a specific class of steroids. A limited number of methods for simultaneous determination of steroid hormones and sterols are reported in the literature, and all of them are based on the use of gas chromatography coupled to mass spectrometry. Due to some limitations of gas chromatography-mass spectrometry method, there is a need for development of liquid chromatography-mass spectrometry method for trace determination of steroid compounds in environmental samples.

In this work, development, optimization and validation of the analytical method for trace analysis of twenty selected steroid hormones and human/animal and plant sterols in river sediments were described. For selected steroid compounds, liquid chromatography-tandem mass spectrometry instrumental method, using atmospheric pressure chemical ionization, was developed and optimized. Steroid hormones (estrone and estriol, 17 α - and 17 β -estradiol) and sterols (epicoprostanol, epicholestanol, coprostanol and cholestanol) with identical MSⁿ fragmentation reactions in mass detector were successfully chromatographically separated. In the study, optimization of the selected analytes extraction from the river sediments, as well as the optimization of the extract clean up procedure, was carried out. The extraction efficiency of different solvents, as well as their mixtures, was tested. Also, the weight of sediment and time of ultrasonic extraction were optimized. Optimal packing type of the clean up cartridge and elution solvent were selected.

The developed method was applied in the analysis of sediments from several

rivers in Serbia. The results showed a widespread occurrence of human/animal and plant sterols, whereas mestranol and 17 α -estradiol were only steroid hormones detected in sediment samples. Sterol ratios for determination of pollution sources in the environment were calculated using concentrations of sterols detected in the samples. Out of eleven tested sterol ratios, coprostanol/(coprostanol+cholestanol), coprostanol/cholesterol, epicoprostanol/coprostanol and sitostanol/coprostanol ratios were identified as key sterol ratios for source pollution tracing of river sediments. According to the calculated ratios, the majority of the investigated sediments were recognized as human-sourced polluted. Two samples were found to be affected by a combination of sewage and herbivore sources.

Key words: steroids, hormones, sterols, river sediments, liquid chromatography-tandem mass spectrometry, sterol ratios, fecal contamination.

Scientific Field: Chemical sciences

UDC: 543.645.2:504.5:556.53:543.544.5:543.51

Sadržaj:

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DEO	3
2.1. Steroidi	3
2.2. Poreklo steroidnih hormona i sterola u životnoj sredini	5
2.3. Uklanjanje steroidnih hormona i sterola u postrojenjima za prečišćavanje otpadnih voda	8
2.4. Transformacije steroidnih hormona i sterola u životnoj sredini	11
2.5. Problem prisustva steroidnih jedinjenja u životnoj sredini	13
2.6. Zakonska regulativa u oblasti zaštite životne sredine usmerena na steroidna jedinjenja	14
2.7. Steroidni hormoni i steroli detektovani u sedimentima	17
2.8. Primena odnosa sterola za identifikaciju izvora zagađenja.....	32
2.9. Steroidni hormoni i steroli odabrani za analizu	39
2.10. Analitičko određivanje steroidnih hormona i sterola	41
2.11. Priprema uzoraka sedimenata.....	43
2.11.1. Ultrazvučna ekstrakcija.....	45
2.12. Prečišćavanje ekstrakta pripremljenih uzoraka sedimenata	47
2.13. Tečna hromatografija visokih performansi	49
2.14. Masena spektrometrija	53
2.14.1. Tehnike jonizacije.....	55
2.14.2. Jonski trap.....	57
2.14.3. Tandem masena spektrometrija	60
2.15. Tečna hromatografija u sprezi sa masenom spektrometrijom.....	61
2.16. LC-MS/MS analiza odabranih steroidnih jedinjenja.....	62
2.17. Uticaj matrice	64
3. EKSPERIMENTALNI DEO	65
3.1. Rastvori odabranih steroidnih jedinjenja i reagensi	65
3.2. Snimanje masenih spektara analita	67
3.3. Optimizacija hromatografskog razdvajanja analita.....	68
3.4. Optimizacija LC-MS/MS parametara	69
3.5. Priprema uzoraka sedimenata.....	69

3.5.1. Predtretman uzoraka sedimenata	69
3.5.2. Ultrazvučna ekstrakcija odabranih steroidnih jedinjenja	70
3.5.2.1. Izbor optimalnog rastvarača za ultrazvučnu ekstrakciju	71
3.5.2.2. Izbor optimalne mase uzorka sedimenta	72
3.5.2.3. Izbor optimalnog vremena ultrazvučne ekstrakcije	72
3.5.3. Prečišćavanje dobijenih ekstrakata sedimenata	73
3.5.3.1. Izbor pakovanja kolone za prečišćavanje	73
3.5.3.2. Izbor optimalnog rastvarača za eluiranje	75
3.6. Validacija metode	75
3.7. Metoda kalibracije	76
3.8. Uzimanje uzoraka rečnih sedimenata	77
4. REZULTATI I DISKUSIJA	80
4.1. Maseni spektri odabranih analita	80
4.2. Optimizacija hromatografskog razdvajanja analita	97
4.3. Optimizacija LC-MS/MS parametara	99
4.4. Ultrazvučna ekstrakcija odabranih steroidnih jedinjenja	102
4.4.1. Izbor optimalnog rastvarača za ultrazvučnu ekstrakciju	102
4.4.2. Izbor optimalne mase uzorka sedimenta	105
4.4.3. Izbor optimalnog vremena ultrazvučne ekstrakcije	106
4.5. Prečišćavanje dobijenih ekstrakata sedimenta	108
4.5.1. Prečišćavanje ekstrakta realnog uzorka rečnog sedimenta	110
4.6. Validacija metode	111
4.7. Analiza realnih uzoraka rečnih sedimenata	113
4.8. Potvrda prisustva analita	118
4.9. Utvrđivanje porekla zagađenja rečnih sedimenata primenom odnosa sterola ...	129
5. ZAKLJUČAK	136
LITERATURA	139
PRILOG	160
OBJAVLJENI NAUČNI RADOVI IZ DOKTORSKE DISERTACIJE	185
BIOGRAFIJA AUTORA	186

1. UVOD

Razvojem novih i osjetljivih metoda za detekciju hemijskih supstanci, savremena istraživanja u oblasti analitike zagađujućih materija životne sredine su proširena sa tradicionalnih zagađujućih supstanci, poput pesticida, polihlorovanih bifenila i sl., na „nove“, tzv. „emergentne“ zagađujuće supstance (eng. *emerging pollutants*). Upravo je napredak u razvoju osjetljivih metoda detekcije omogućio praćenje niskih koncentracija ovih zagađujućih materija (reda veličine ng L^{-1} i niže), koje ranije nije bilo moguće detektovati. „Emergentne“ zagađujuće materije još uvek nisu uključene u redovne monitoring programe, a njihovo ponašanje i vreme zadržavanja u životnoj sredini, kao i (eko)toksikološki efekti, još uvek nisu u potpunosti poznati. Klasi ovih zagađujućih supstanci pripadaju proizvodi koji se koriste u svakodnevnom životu, kao što su lekovi, uključujući i hormone, površinski aktivne materije, sredstva za održavanje lične higijene itd.

Iako su u životnoj sredini brojni steroli prirodno prisutni, primarni izvor steroidnih hormona i sterola su netretirane otpadne vode i efluenti iz postrojenja za prečišćavanje otpadnih voda. Studije su pokazale da se u postrojenjima za tretman otpadnih voda steroidni hormoni i steroli nepotpuno uklanjaju, zbog čega se značajna količina ispušta u prirodne vodotoke. Dodatni problem je taj što u Srbiji samo mali broj gradova raspolaže postrojenjima za prečišćavanje otpadnih voda. Takođe, efluenti i mulj iz postrojenja se često upotrebljavaju za navodnjavanje poljoprivrednog zemljišta i kao đubrivo, što predstavlja dodatni put dospevanja steroida u životnu sredinu. Zbog afiniteta prema organskoj frakciji sedimenata, steroidna jedinjenja se mogu u značajnim količinama akumulirati u rečnim sedimentima, koji zatim mogu postati sekundarni izvor zagađenja.

Brojna istraživanja su pokazala da prirodni i sintetski steroidni hormoni, kao i steroli, mogu prouzrokovati niz funkcionalnih poremećaja kod čoveka i životinja, kao što su poremećaji u radu endokrinog sistema, smanjenje reproduktivnih sposobnosti i usporavanje razvoja organizma, povećanje mogućnosti pojave raka, a mogu izazvati i hermafroditizam kod vodenih organizama. Pored toga, humani/životinjski i biljni steroli se mogu koristiti kao indikatori antropogenog fekalnog zagađenja životne sredine. Steroli predstavljaju alternativu bakteriološkim indikatorima (npr. koliformnim i

Enterococcus bakterijama) koji su tradicionalno korišćeni za procenu fekalnog zagađenja. Na osnovu karakterističnih odnosa sterola može se utvrditi i poreklo zagađenja u životnoj sredini. Informacije o poreklu kontaminacije su neophodne za osmišljavanje mera za efikasnu kontrolu i smanjenje zagađenja rečnih slivova, kao i za procenu rizika po zdravlje ljudi i životinja.

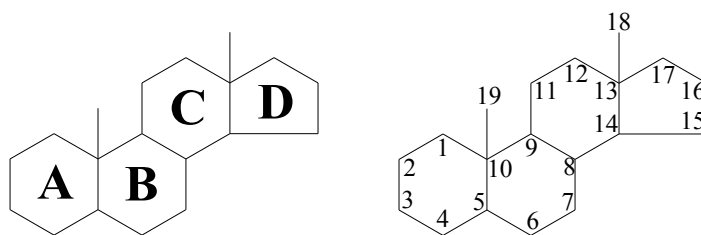
Većina radova koji se bave analizom tragova steroidnih jedinjenja u životnoj sredini usmerena je na specifičnu klasu steroida. S obzirom na to da steroidni hormoni i steroli pripadaju grupi steroidnih jedinjenja, kao i da imaju zajedničke puteve dospevanja u životnu sredinu, neophodno je razviti analitičku metodu za njihovo istovremeno određivanje. U literaturi je zabeležen mali broj metoda za istovremeno određivanje ovih jedinjenja, a sve postojeće metode zasnovane su na primeni gasne hromatografije u sprezi sa masenom spektrometrijom. Međutim, metoda gasne hromatografije-masene spektrometrije ima određena ograničenja za termički nestabilne i slabo isparljive analite, poput sterola. Za ova jedinjenja je neophodna derivatizacija koja značajno produžava vreme analize, a često nastaju i neželjeni proizvodi. Iz tog razloga, metoda tačne hromatografije u sprezi sa masenom spektrometrijom predstavlja tehniku izbora za analizu tragova steroidnih hormona i sterola u uzorcima iz životne sredine.

Cilj istraživanja ove doktorske disertacije je razvoj nove, brze i osetljive multirezidualne metode tačne hromatografije spregnute sa tandem masenom spektrometrijom za istovremenu analizu tragova steroidnih hormona i sterola u rečnim sedimentima, a zatim primena metode u analizi većeg broja uzoraka sedimenata iz nekoliko reka u Srbiji. Za analizu su odabrani steroidni hormoni, kao i humani/životinjski i biljni steroli, čije prisustvo predstavlja problem u životnoj sredini, a koji spadaju u najčešće detektovana steroidna jedinjenja u rečnim sedimentima. Rad obuhvata razvoj i optimizaciju procedure pripreme uzorka rečnog sedimenta, kao i instrumentalne metode tačne hromatografije sa tandem masenom spektrometrijom. Posebna pažnja je posvećena hromatografskom razdvajanju steroidnih hormona i sterola sa identičnim reakcijama fragmentacije u masenom detektoru. Razvijena i validirana metoda je primenjena u analizi većeg broja uzoraka rečnih sedimenata, pri čemu su dobijeni podaci o stepenu zagađenosti sedimenata steroidnim jedinjenjima u Srbiji. Korišćenjem koncentracija detektovanih sterola, izračunati su odnosi sterola na osnovu kojih je utvrđeno poreklo zagađenja rečnih sedimenata.

2. TEORIJSKI DEO

2.1. Steroidi

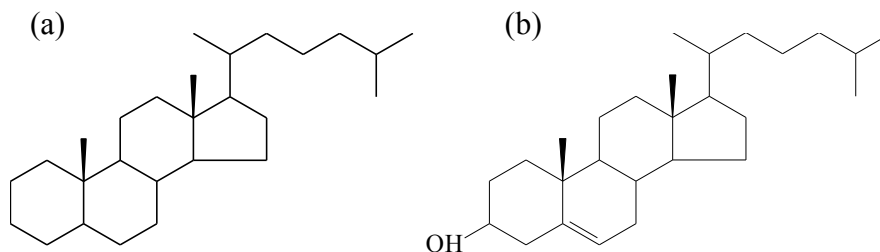
Steroidi su jedinjenja sa osnovnom strukturom ciklopentanoperhidrofenantrena koji se sastoji od četiri kondenzovana prstena, od čega su tri cikloheksanska i jedan ciklopentanski prsten (slika 2.1). Metil grupe mogu biti prisutne na C-10 i C-13 atomu, a bočni alkilni lanac na C-17 atomu. Na osnovnu strukturu se mogu vezati različite funkcionalne grupe, a čak i male promene u strukturi daju jedinjenja sa različitim fiziološkim i farmakološkim dejstvom (Vollhardt i Schore, 1999; Niessen, 2006). U zavisnosti od orijentacije vodonikovog atoma vezanog za C-5 atom razlikuju se 5α - i 5β -izomeri.



Slika 2.1. Osnovna struktura steroida i način numeracije C-atoma u molekulu.

Klasi steroidnih jedinjenja pripadaju brojne fiziološki i farmakološki aktivne supstance. Kao najzastupljenija grupa steroidnih jedinjenja izdvajaju se steroli, prisutni kod čoveka, biljaka i životinja. Steroli su podgrupa steroida čija je osnovna struktura izvedena iz holestana (slika 2.2a), a koji sadrže hidroksilnu grupu na C-3 atomu (slika 2.2b, holesterol). Humani/životinjski steroli predstavljaju produkte ljudskog i životinjskog metabolizma. Najpoznatiji predstavnik ove grupe je holesterol. Holesterol predstavlja osnovnu gradivnu jedinicu ćelijske membrane, posebno nervnog sistema, mozga i kičmene moždine. Ljudski organizam sadrži oko 2 g holesterola po kilogramu telesne težine. Kod čoveka, holesterol predstavlja polaznu supstancu za sintezu polnih hormona i žučnih kiselina (Myant, 1973). Pored holesterola, u humane/životinjske sterole se još ubrajaju i koprostanol (najzastupljeniji sterol u humanoj ekskreciji, 40–60%), epikoprostanol, holestanol, koprostanon, holestanon, 7-dehidroholesterol i dr. Biološki značaj sterola se može videti na primeru 7-dehidroholesterola koji se pod

deјstvom sunčevog zračenja u koži sisara pretvara u holekalciferol (vitamin D₃), zadužen za kalcifikaciju kostiju putem regulacije apsorpcije kalcijuma (Bikle, 2014).



Slika 2.2. Hemijska struktura holestana (a) i holesterola (b).

Biljni steroli (fitosteroli) su prirodni sastojci biljaka, biljnih masnoća i ulja (Careri *et al.*, 2001). Poslednjih godina, biljni steroli su postali značajni zbog izuzetne mogućnosti da snize nivo holesterola u krvi, što značajno smanjuje rizik od oboljevanja od kardiovaskularnih bolesti. Takođe, neki fitosteroli ispoljavaju antiinflamatorno, antibakterijsko, antimikotično i antikancerogeno dejstvo (Zarrouk *et al.*, 2009). Dominantan biljni sterol u prirodi je β -sitosterol, a značajno su zastupljeni kampesterol, stigmasterol, sitostanol, dezmosterol, ergosterol, cikloartenol i dr.

U klasu steroidnih jedinjenja ubrajaju se i steroidni hormoni. Steroidni hormoni se prema svojoj biološkoj aktivnosti i farmakološkim efektima mogu podeliti u dve grupe: polne hormone i hormone kore nadbubrežne žlezde (kortikosteroide). Postoje tri grupe polnih hormona: estrogeni, gestageni i androgeni hormoni (Young i Borch, 2009). Estron, estradiol i estriol se smatraju najvažnijim prirodnim estrogenim hormonima (Bhat *et al.*, 2005). Mnoge biljke sadrže ove estrogene supstance, poput različitih vrsta cveća, palmi i vrba. Estrogeni hormoni stimulišu razvoj ženskog reproduktivnog sistema i sekundarnih polnih karakteristika. Takođe imaju značajnu ulogu u metabolizmu masti, šećera i proteina, a utiču i na druge procese u ljudskom organizmu, kao što su koagulacija krvi i normalan rad bubrega (Sosa-Ferrera *et al.*, 2012). U hormonskoj terapiji najčešće se koristi smeša prirodnih estrogena izolovana iz konjskog urina koja sadrži oko 50% estrona, 25% ekvilina i druge estrogene. Estradiol se može naći u obliku dva stereoizomera, 17 α - i 17 β -izomera, koji se veoma razlikuju po svojoj biološkoj aktivnosti. 17 β -Estradiol ispoljava oko 40 puta jači terapijski efekat od 17 α -estradiola i oko 10 puta jači od estrona (Bhat *et al.*, 2005). U sintetske estrogene se ubrajaju

17 α -etinilestradiol i mestranol koji potiču od 17 β -estradiola. 17 α -Etinilestradiol predstavlja aktivnu supstancu većine kontraceptivnih pilula, najčešće u kombinaciji sa nekim gestagenim hormonom, dok se mestranol ređe koristi. Pored kontracepcije, sintetski estrogene se dosta koriste i u terapiji hormonskih poremećaja, kao i za pospešivanje rasta domaćih životinja (Sosa-Ferrera *et al.*, 2012).

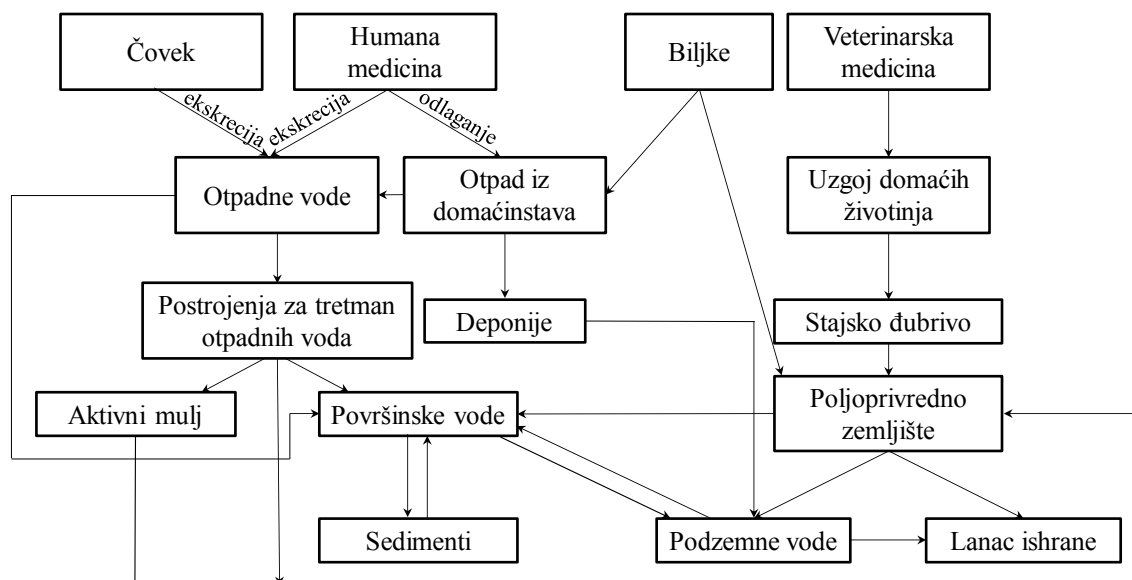
Gestageni hormoni su kod kičmenjaka zaduženi za regulaciju metabolizma elektrolita i vode, kao i održavanje trudnoće (Young i Borch, 2009). Najpoznatiji gestagen je progesteron, a ovoj grupi pripadaju još i noretindron (poznat i kao etinilnortestosteron, 19-nortestosteron, noretisteron), levonorgestrel i dr. Noretindron je karakterističan po tome što sprečava produkciju testosterona, a povećava čvrstinu mišića, kao i obnovu hrskavičavog tkiva. Predstavlja sintetski hormon koji je među prvima korišćen u kontraceptivnim pilulama, još 1957. godine (Varagić i Milošević, 1995). Levonorgestrel pripada drugoj generaciji sintetskih gestagena koji se koristi kao aktivna supstanca u mnogim kontraceptivnim pilulama i hormonskoj terapiji (Bhat *et al.*, 2005). Androgeni hormoni su zaduženi za razvoj muških polnih karakteristika. Najzastupljeniji androgeni kod kičmenjaka su testosteron i 5 α -dihidrotestosteron (Young i Borch, 2009). Androgeni hormoni se, zbog svog anaboličkog efekta, primenjuju za povećanje telesne mase i poboljšanje fizičkih performansi sportista, kao i u uzgoju domaćih životinja. U hormone kore nadbubrežne žlezde, tj. kortikosteroide se ubrajaju glukokortikoidi i mineralokortikoidi. Glukokortikoidi, kortizol i kortikosteron, su zaduženi za regulisanje metabolizma i normalno funkcionisanje imunog sistema, dok mineralokortikoidi, od kojih je najpoznatiji aldosteron, regulišu krvni pritisak i balans elektrolita.

U steroidna jedinjenja se, pored dve velike grupe sterola i steroidnih hormona, ubrajaju i žučne kiseline, ekdizoni, kardiotonični glikozidi, steroidni sapogenini i saponini, pa čak i otrovi steroidne strukture poreklom od nekih žaba (npr. *Bufo vulgaris*).

2.2. Poreklo steroidnih hormona i sterola u životnoj sredini

Steroidna jedinjenja u životnu sredinu dospevaju iz prirodnih, biogenih izvora, kao i raznim antropogenim aktivnostima. Vodotoci u Srbiji su izloženi uticaju raznih

tačkastih i netačkastih izvora zagađenja, poput izliva tretiranih ili netretiranih otpadnih voda, kao i spiranja sa urbanih i poljoprivrednih površina, koji doprinose pogoršanju kvaliteta vode i sedimenata. Dodatni problem je taj što u Srbiji samo mali broj gradova raspolaže postrojenjima za prečišćavanje otpadnih voda (PPOV).



Slika 2.3. Putevi kojima steroidna jedinjenja dospevaju u životnu sredinu.

Primarni antropogeni izvor zagađenja čovekove okoline steroidima je kontinualni unos netretiranih komunalnih otpadnih voda, kao i efluenta iz postrojenja za prečišćavanje otpadnih voda (slika 2.3). Prisustvo steroidnih hormona u otpadnim vodama se prvenstveno objašnjava primenom u humanoј terapiji. Humani steroli, kao produkti metabolizma i ekskrecije, u najvećoj meri u životnoj sredini potiču iz otpadnih voda. Zbog svoje lipofilne prirode, adsorbuju se na čestičnu materiju u prirodnim vodama i veoma brzo inkorporiraju u sedimente (Writer *et al.*, 1995). Prirodni, biogeni put dospevanja fitosterola u okolinu jeste unos biljne organske materije terestrijalnog porekla. Međutim, kao prirodni sastojci biljnih masnoća i ulja, fitosteroli su zastupljeni u svakodnevnoj ishrani, a poslednjih godina se primenjuju i u prevenciji kardiovaskularnih bolesti. Upravo zbog rasprostranjene primene u humanoј terapiji i ishrani, biljni steroli se nalaze i u otpadnim vodama. Studije usmerene na određivanje stepena uklanjanja steroidnih hormona i sterola u postrojenjima za prečišćavanje otpadnih voda su pokazale da stepen uklanjanja ovih jedinjenja značajno zavisi od tipa

tretmana otpadnih voda (Combalbert i Hernandez-Raquet, 2010; Chang *et al.*, 2011; Furtula *et al.*, 2012a). Prečišćene vode iz PPOV se potom ispuštaju u prirodne vodotoke. Takođe, prečišćena voda i mulj iz PPOV se često upotrebljavaju za navodnjavanje i đubrenje poljoprivrednog zemljišta što predstavlja dodatni put dospevanja hormona i sterola u životnu sredinu (Gottschall *et al.*, 2013). Utvrđeno je da su, na primer, estrogini hormoni prisutni u efluentima iz PPOV u koncentracijama reda veličine ng L^{-1} (Baronti *et al.*, 2000; Braga *et al.*, 2005; Servos *et al.*, 2005; Fernandez *et al.*, 2007), dok se u aktivnom mulju koji zaostaje nakon tretmana otpadnih voda nalaze u koncentracijama od nekoliko stotina ng g^{-1} (Ternes *et al.*, 2002; Gomes *et al.*, 2004; Nieto *et al.*, 2008). I koprostanol je detektovan u visokim koncentracijama u efluentima iz PPOV ($> 1000 \text{ ng L}^{-1}$, Fernandez *et al.*, 2007) i aktivnom mulju (Ibañez *et al.*, 2000). Putem spiranja sa poljoprivrednog zemljišta steroidni hormoni i steroli mogu ugroziti podzemne vode, a time i vodu za piće. Na taj način je moguće i uključivanje steroidnih jedinjenja u lanac ishrane.

Istraživanja su pokazala da procedne vode sa deponija takođe mogu predstavljati izvor steroida u životnoj sredini. Prisustvo koprostanola i drugih sterola u visokim koncentracijama u procednim vodama sa deponije može se objasniti odlaganjem komunalnog otpada i aktivnog mulja iz tretmana otpadnih voda. Kao rezultat odlaganja industrijskog otpada i lekova kojima je istekao rok upotrebe, tragovi steroidnih hormona se takođe mogu detektovati u procednim vodama sa deponija (Zhang *et al.*, 2008; Masoner *et al.*, 2014).

Poljoprivredne farme takođe predstavljaju značajan izvor steroida u životnoj sredini. Steroidni hormoni se koriste za stimulisanje rasta životinja (Stolker i Brinkman, 2005), dok su steroli, kao rezultat metaboličkih procesa, u velikim količinama prisutni u ekskreciji životinja (slika 2.3). Stajsko đubrivo se često koristi umesto mineralnih đubriva za poboljšanje kvaliteta poljoprivrednog zemljišta, a spiranjem sa zemljišta dolazi do migracije steroida u dublje slojeve zemljišta i podzemne vode (Jardé *et al.*, 2007).

Zbog slabe rastvorljivosti steroidnih jedinjenja u vodi, kao i afiniteta prema organskoj frakciji sedimenata, rečni sedimenti mogu postati rezervoari steroida, zaduženi za kontrolu njihove biološku dostupnosti (Ying *et al.*, 2002; Gomes *et al.*, 2004; Tadeo *et al.*, 2012). S obzirom na to da se pod određenim uslovima značajne

količine steroidnih hormona i sterola mogu osloboditi iz sedimenata, oni predstavljaju još jedan izvor kontaminacije životne sredine ovim jedinjenjima (Labadie *et al.*, 2007; Fetter *et al.*, 2014). Upravo kao rezultat intenzivnog zagađenja životne sredine, prisustvo steroidnih jedinjenja zabeleženo je u površinskim i podzemnim vodama (Al-Odaini *et al.*, 2010; Gottschall *et al.*, 2013; Gorga *et al.*, 2015), sedimentima (Isobe *et al.*, 2002; López de Alda *et al.*, 2002; Froehner *et al.*, 2009), pa čak i u vodi za piće (Magi *et al.*, 2010; Huerta-Fontela *et al.*, 2011; Vulliet *et al.*, 2011).

2.3. Uklanjanje steroidnih hormona i sterola u postrojenjima za prečišćavanje otpadnih voda

S obzirom na to da komunalne otpadne vode predstavljaju primarni izvor zagađenja okoline steroidnim jedinjenjima, neophodno je poznavati proces prečišćavanja otpadnih voda i reakcije kojima ova jedinjenja podležu tokom tretmana. Efikasnost uklanjanja steroida u procesu prečišćavanja otpadnih voda zavisi od fizičko-hemijskih svojstava jedinjenja, vrste primenjenog procesa prečišćavanja, karakteristika samog postrojenja, kao i aktivnosti mikroflore primenjene u procesu mikrobiološkog prečišćavanja otpadnih voda (Combalbert i Hernandez-Raquet, 2010).

U konvencionalnim PPOV otpadne vode podležu preliminarnom, primarnom i sekundarnom tretmanu. Preliminarni tretman podrazumeva uklanjanje krupnih, čvrstih materija koje mogu uništiti opremu postrojenja. U primarnom tretmanu se zatim vrši odvajanje čvrste i tečne faze pod dejstvom sile gravitacije. Promena ukupne količine steroida tokom preliminarnog tretmana je zanemarljiva, ali se u ovoj fazi konjugovani estrogenski hormoni mogu prevesti u slobodne forme, čime se povećava količina slobodnih steroidnih hormona i estrogena aktivnost otpadne vode (Braga *et al.*, 2005). Za estrogene hormone u slobodnom obliku, sa visokim vrednostima koeficijenta raspodele između organske i vodene faze (eng. *octanol-water partition coefficient*, $\log K_{ow}$), je očekivano da se tokom primarnog tretmana iz tečne faze uklone putem adsorpcije na čvrstoj organskoj fazi mulja koji se formira. Međutim, studije su pokazale da ne dolazi do značajnog uklanjanja estrogena u ovoj fazi (Andersen *et al.*, 2003; Braga *et al.*, 2005). Nakon primarnog tretmana, otpadna voda podleže biološkim i hemijskim procesima u sekundarnom tretmanu koji obezbeđuje uklanjanje većine

organskih materija i makronutrijenata (azota i fosfora). U ovom stupnju se delimično smanjuje koncentracija steroidnih hormona putem adsorpcije na čvrstom organskom materijalu i/ili biološke transformacije i degradacije.

Istraživanjima je pokazano da biodegradacija predstavlja primarni način uklanjanja androgenih i gestagenih hormona u PPOV (Chang *et al.*, 2011). Mnogo manja efikasnost uklanjanja estrogenih hormona, u odnosu na androgene i gestagene, objašnjena je činjenicom da je hemijska struktura estrogenih hormona sa benzenovim prstenom otpornija na degradaciju (Labadie i Budzinski, 2005). Brojne studije su pokazale da su estrogeni prisutni u efluentima iz PPOV, pri čemu se estron nalazi u veoma visokim koncentracijama (Baronti *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2004; Nakada *et al.*, 2006), 17β -estradiol i estriol u nešto nižim koncentracijama ($< 20 \text{ ng L}^{-1}$, Baronti *et al.*, 2000; D'Ascenzo *et al.*, 2003; Cargouët *et al.*, 2004), dok se 17β -etinilestradiol detektuje povremeno, u koncentracijama generalno nižim od 10 ng L^{-1} (Belfroid *et al.*, 1999; Baronti *et al.*, 2000; Cargouët *et al.*, 2004).

Postrojenja za prečišćavanje otpadnih voda sa primarnim tretmanom ili naprednim primarnim tretmanom (npr. uz dodatak FeCl_3) pokazuju stepen uklanjanja steroidnih hormona manji od 14% (Braga *et al.*, 2005). U studiji Džonsona i saradnika (Johnson *et al.*, 2007) utvrđeno je da efikasnost uklanjanja 17β -estradiola u PPOV sa sekundarnim tretmanom (uz primenu kapajućeg biofiltera) iznosi 70%, a estrona 30%. Kada se primenjuju procesi biološkog prečišćavanja sa aktivnim muljem, stepen uklanjanja 17β -estradiola i estriola kreću se do 85%, a efikasnost uklanjanja 17β -etinilestradiola i estrona prelazi 60% (D'Ascenzo *et al.*, 2003). Međutim, pokazano je i da tretman sa aktivnim muljem ne obezbeđuje uvek visoku efikasnost uklanjanja estrogena. Tako je u postrojenjima u Francuskoj stepen uklanjanja ispitivanih estrogenih hormona iznosio 40–70% (Cargouët *et al.*, 2004). Razlike ukazuju na to da veliki uticaj na stepen eliminacije hormona u sekundarnom tretmanu aktivnim muljem imaju parametri samog procesa, kao što su vreme zadržavanja mulja, hidraulično opterećenje, temperatura, redoks uslovi u sistemu itd.

S obzirom na to da koprostanol čini oko 60% ukupnih sterola prisutnih u ljudskom fecesu (Leeming *et al.*, 1996), očekivano je da predstavlja najveću frakciju sterola identifikovanih u netretiranim komunalnim otpadnim vodama (oko 40%, Quéméneur i Marty, 1994). Primena konvencionalnih tehnika prečišćavanja vode, kao

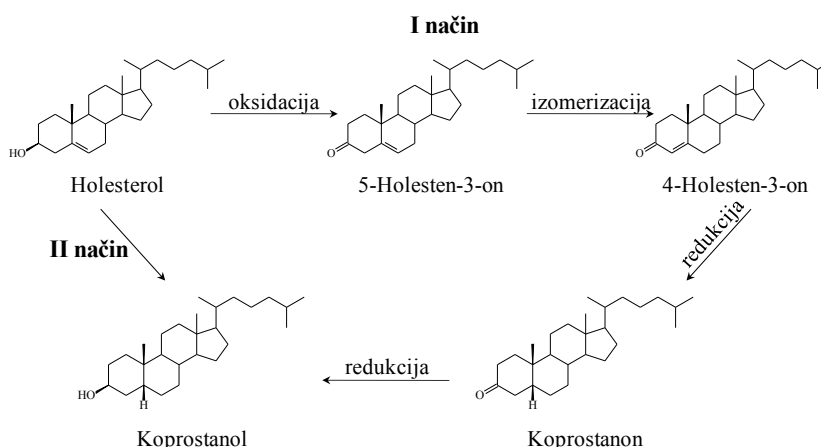
što su hlorisanje ili aeracija, ne dovodi do smanjenja koncentracije koprostanola. Međutim, iako su steroli poput koprostanola, holesterola i holestanola postojani u anoksičnim uslovima u sedimentima (Nishimura i Koyama, 1977; Hatcher i McGillivary, 1979; Bartlett, 1987), oni se mogu degradovati pod aerobnim uslovima u PPOV (Snyder *et al.*, 2003). Na primer, poluvreme biodegradacije koprostanola se smanjuje sa oko 400 dana pod anaerobnim uslovima na manje od jednog dana pod aerobnim uslovima (Barber i Writer, 1998). Studijom u kojoj su analizirani različiti tipovi otpadnih voda pokazano je da efikasnost uklanjanja sterola zavisi od tipa primenjenog tretmana (Fernandez *et al.*, 2007). Ispitivane su otpadne vode iz industrijskog postrojenja za preradu celuloze prečišćene u tretmanu sa aktivnim ugljem, komunalne otpadne vode prečišćene primenom kapajućeg biofiltera i naknadno dezinfikovane hlorom, komunalne otpadne vode iz PPOV sa aktivnim ugljem i biološkim uklanjanjem nutrijenata, kao i otpadne vode prečišćene u aerisanim lagunama. Utvrđeno je da se najmanje sterola uklanja u aerisanim lagunama (od 0% za dezmosterol do 76% za holesterol). Visoke efikasnosti uklanjanja dezmosterola (93–97%), holesterola (85–94%), β -sitosterola (81–94%) i koprostanola (84–85%) su postignute u PPOV sa aktivnim ugljem i biološkim uklanjanjem nutrijenata, dok je za kampesterol stopa uklanjanja bila nešto niža (49–81%). Slični rezultati su dobijeni analizom influenata i efluenata iz šest PPOV u Kanadi sa sekundarnim i tercijernim tretmanom (Furtula *et al.*, 2012a). Generalno, najveći procenat uklanjanja pokazali su holesterol, koprostanol, kampesterol i sitostanol (> 95%). Efikasnost uklanjanja epikoprostanola, epiholestanola i β -sitosterola je iznosila 90–95%, dok je za holestanol, dezmosterol i stigmasterol procenat uklanjanja iznosio oko 80%.

Konačno, može se zaključiti da postojeća tehnologija u PPOV ne uklanja hormone i sterole sa visokim stepenom efikasnosti. Studije pokazuju da su novije tehnologije, poput direktne i reverzne osmoze, efikasnije u uklanjanju ovih jedinjenja (Snyder *et al.*, 2007). Pošto ove tehnologije zahtevaju velika ulaganja i imaju visoke energetske troškove, ipak nisu zastupljene u konvencionalnim PPOV. Takođe, određeni postupci oksidacije koji se primenjuju u tretmanu otpadnih voda pokazuju visok stepen eliminacije steroidnih jedinjenja (Silva *et al.*, 2012). Međutim, u ovim procesima se mogu formirati štetni sporedni produkti sa biološkom aktivnošću većom od polazne supstance.

2.4. Transformacije steroidnih hormona i sterola u životnoj sredini

Ponašanje i sudbina steroidnih hormona i sterola u životnoj sredini određeni su njihovim fizičko-hemijskim svojstvima, kao i specifičnim uslovima koji vladaju u životnoj sredini. Steroidni hormoni se procesima oksidacije, hidroksilacije i metilovanja u organizmu prevode u neaktivne oblike (Ying *et al.*, 2002). Pod dejstvom mikroorganizama prisutnih u netretiranim otpadnim vodama i postrojenjima za prečišćavanje otpadnih voda ovi neaktivni oblici se mogu transformisati u biološki aktivne steroide, i kao takvi osloboditi u životnu sredinu (Belfroid *et al.*, 1999; Ternes *et al.*, 1999b; Baronti *et al.*, 2000; Reddy *et al.*, 2005).

U gastrointestinalnom traktu ljudi i životinja, pod dejstvom bakterija, dolazi do redukcije sterola. U procesu mikrobiološke redukcije dolazi do biohemijskog hidrogenovanja dvostruke veze i formiranja 5β -izomera. Za razliku od 5β -izomera, formiranje 5α -izomera se odvija reakcijom biohidrogenovanja pod aerobnim uslovima u životnoj sredini (Murtaugh i Bunch, 1967; Hatcher i McGillivary, 1979). Studije su pokazale da se konverzija holesterola u koprostanol može odvijati na dva načina (slika 2.4): preko intermedijera, putem oksidacije hidroksilne grupe na C-3 atomu i dalje izomerizacije i redukcije (I način) ili putem direktne konverzije holesterola u koprostanol (II način) (Eyssen *et al.*, 1973; Ren *et al.*, 1996). Prvi zapisi o direktnoj konverziji holesterola u koprostanol objavljeni su još 1934. godine (Dam, 1934).



Slika 2.4. Predloženi putevi konverzije holesterola u koprostanol (Ren *et al.*, 1996).

Kada dospeju u životnu sredinu, steroidna jedinjenja najčešće podležu procesima adsorpcije i degradacije. Na primer, pod dejstvom mikroorganizama, 17β -estradiol se prvo oksiduje do estrona, koji se dalje konvertuje u estriol (Ternes *et al.*, 1999a). Za sintetski hormon mestranol u eksperimentu sa aktivnim muljem je utvrđeno da se za 24 h degradira oko 80%, dok se ostatak putem demetilovanja prevodi u 17α -etinilestradiol (Ternes *et al.*, 1999a). Za razliku od mestranola, 17α -etinilestradiol ne podleže procesu mikrobiološke razgradnje i veoma je postojan u vodenoj sredini, sa vremenom poluraspada od 46 dana (Jürgens *et al.*, 1999). Međutim, studije su pokazale da se može razgraditi procesom fotohemijske degradacije, pri čemu vreme poluraspada iznosi manje od 1,5 dana (Liu *et al.*, 2003; Zuo *et al.*, 2006). Istraživanja ponašanja estrogenih hormona u vodenoj sredini su pokazala da se između 13% i 92% estrogena adsorbuje na sedimentu tokom prvih 24 h nakon dospevanja u rečni sistem (Jürgens *et al.*, 1999). Takođe je pokazano da sintetski estrogeni pokazuju veći afinitet adsorpcije od prirodnih, kao i da se adsorpcija povećava sa povećanjem koeficijenta raspodele hormona između organske i vodene faze, i sadržaja organskog ugljenika sedimenta (Lai *et al.*, 2000). Na stepen degradacije steroidnih estrogena veliki uticaj ima i prisustvo kiseonika u vodi. Pod aerobnim uslovima u vodenoj sredini degradacija 17β -estradiola se odvija putem konverzije u estron, dok je u anaerobnim uslovima 17β -estradiol postojan (Jürgens *et al.*, 1999).

Stepen degradacije sterola zavisi od parametara okoline kao što su temperatura, ukupan sadržaj organske materije, veličina čestica, kao i prisustvo specifične mikrobiološke populacije (Canuel i Martens, 1996; Leeming *et al.*, 1996). Studije su pokazale da se u životnoj sredini degradacija sterola odvija pod dejstvom aerobnih bakterija prisutnih u zemljištu i površinskom sloju sedimenata (Bartlett, 1987; Elhmmali *et al.*, 1997; Pratt *et al.*, 2008). Proces degradacije se može nastaviti i u dubljim slojevima sedimenata, pod anaerobnim uslovima, ali je brzina odvijanja ovog procesa veoma mala (Canuel i Martens, 1996). Prisustvo epikoprostanola, izomera koprostanola, u površinskim sedimentima je prepoznato kao rezultat mikrobiološke *in situ* konverzije koprostanola (Wardroper i Maxwell, 1978). Ova konverzija je potvrđena istraživanjem u kome je pokazano da se koncentracija epikoprostanola povećava u aktivnom mulju koji zaostaje u PPOV (McCalley *et al.*, 1981). Međutim, eksperimenti su pokazali da su steroli, poput koprostanola, holesterola i holestanola, stabilni pod anaerobnim uslovima

u sedimentima (Bartlett, 1987). Zahvaljujući stabilnosti koprostanola, praćenjem njegove koncentracije po dubini u sedimentima može se utvrditi kontaminacija životne sredine i do 160 godina unazad (Hatcher i McGillivary, 1979; LeBlanc *et al.*, 1992). Upravo ova postojanost steroidnih jedinjenja u anaerobnim uslovima u sedimentima i ista brzina degradacije u životnoj sredini predstavljaju osnovu njihove primene kao indikatora fekalnog zagađenja rečnih sedimenata.

2.5. Problem prisustva steroidnih jedinjenja u životnoj sredini

Prisustvo steroidnih hormona u životnoj sredini, kao i nekih humanih/životinjskih sterola i fitosterola, predstavlja veliki problem jer dovodi do poremećaja fizioloških procesa i reproduktivnih funkcija organizama. Steroidni hormoni mogu izazvati niz funkcionalnih poremećaja kod čoveka i životinja, kao što su smanjenje reproduktivnih sposobnosti, usporavanje razvoja organizma i povećavanje mogućnosti pojave raka (Barreiros *et al.*, 2016). Takođe je ustanovljeno da pored negativnog uticaja na endokrini i reproduktivni sistem, prisustvo polnih hormona u životnoj sredini može negativno uticati i na imuni sistem ljudi (Bouman *et al.*, 2005). Veliki problem predstavlja i mogućnost bioakumulacije i biomagnifikacije hormona, i, dalje kretanje kroz lanac ishrane (Hibberd *et al.*, 2009; Magi *et al.*, 2010). Preko 99% estrogene aktivnosti u otpadnim i površinskim vodama potiče od prisustva 17β -estradiola i 17α -etinilestradiola u koncentracijama reda veličine ng L^{-1} (Snyder *et al.*, 2001). Iako su steroidni hormoni prisutni u vodi u veoma niskim koncentracijama, one su dovoljne da izazovu brojne neželjene efekte. Tragovi ovih jedinjenja i uticaj na polni razvoj riba dokumentovani su u Engleskoj još pre 20 godina (Purdom *et al.*, 1994). Kod vodenih organizama koji su bili izloženi određenim steroidnim hormonima zabeležene su promene u reproduktivnom sistemu, pa čak i pojava hermafroditizma (Thorpe *et al.*, 2003; Nash *et al.*, 2004; Jobling *et al.*, 2006). Pokazano je da povišene koncentracije 17α -etinilestradiola u prirodnim vodama dovode do sinteze vitelogenina, supstance koja je prirodno prisutna samo kod odraslih ženki riba (Purdom *et al.*, 1994). Sintaza ove supstance kod mužjaka i mladunaca riba predstavlja ozbiljan stres za (Jürgens *et al.*, 1999). Vitelogenin se može koristiti i kao biomarker estrogene kontaminacije akvatične sredine (Larsson *et al.*, 1999). Prisustvo steroidnih hormona u životnoj sredini može

imati i negativan uticaj na biljke (Shore *et al.*, 1995; Snow *et al.*, 2009). Tako su u detelini koja je navodnjavana efluentima iz PPOV zabeleženi povišeni nivoi fitoestrogena (Shore *et al.*, 1995). Efluenti su sadržali steroidne hormone 17β -estradiol i estron u koncentraciji od 10 do 300 ng L⁻¹.

Pokazano je da u akvatičnoj sredini i biljni steroli mogu delovati kao endokrini i metabolički ometači. Kod riba izloženih fitosterolima zabeležene su promene u polnom razvoju i disbalansu hormona, kao i smanjenje frekvencije mrešćenja (MacLatchy i Van Der Kraak, 1995; Miskelly *et al.*, 2003; Orrego *et al.*, 2009). β -Sitosterol, sastojak otpadnih voda iz industrije papira, može pospešiti sintezu vitelogenina i dovesti do sniženja nivoa prekursora nekih hormona kod kalifornijske pastrmke (Tremblay i Van der Kraak, 1999). Negativan uticaj fitosterola je takođe dokumentovan i kod nekih životinja, npr. tvora (Nieminen *et al.*, 2002) i kanadske kune (Ryökkynen *et al.*, 2005). Utvrđeno je da biotransformacijom fitosterola mogu nastati proizvodi koji štetno deluju na endokrini sistem (Dykstra *et al.*, 2014).

Biološki efekti humanog/životinjskog sterola holestanola povezani su sa formiranjem katarakte kod ljudi (McKenna *et al.*, 1990) i ćelijske smrti neurona kod pacova (Inoue *et al.*, 1999). Ispitivanja na školjkama su pokazala da koprostanol ispoljava estrogena svojstva i štetno utiče na reproduktivni sistem, kao i da biološkom transformacijom dovodi do formiranja metabolita sa većim estrogenim potencijalom od polazne supstance (Gagné *et al.*, 2001).

2.6. Zakonska regulativa u oblasti zaštite životne sredine usmerena na steroidna jedinjenja

Mnogobrojna istraživanja su pokazala da hormoni, čak i u veoma niskim koncentracijama, mogu prouzrokovati niz poremećaja u endokrinom i reproduktivnom sistemu kod organizama koji su im izloženi. Ovi poremećaji se mogu ispoljiti kasnije u životnom ciklusu, pa čak i kod budućih generacija. Zbog toga je Evropska Unija (EU), kroz nekoliko direktiva od 1981. god., zabranila upotrebu supstanci sa hormonskih svojstvima koje su se koristile za pospešivanje rasta ili tov domaćih životinja na farmama. Slično tome, EU kontroliše i upotrebu veterinarskih lekova (uključujući prirodne i sintetske hormone) propisivanjem maksimalno dozvoljenih koncentracija u

hrani i namirnicama životinjskog porekla (Council Regulation 2377/90). Direktiva 96/22/EC (Council Directive 96/22/EC) zabranjuje primenu supstanci sa estrogenim, androgenim i gestagenim svojstvima u poljoprivredi, kao i uvoz mesa životinja koje su tretirane ovim preparatima. Kontrola tragova steroidnih hormona kod domaćih životinja i u proizvodima životinjskog porekla (meso, jaja i med) je regulisana putem direktive 96/23/EC (Council Directive 96/23/EC).

Direktiva Evropskog parlamenta i Saveta Evrope o uspostavljanju okvira za delovanje zajednice u oblasti politike voda (eng. *Water Framework Directive*, WFD) predstavlja osnovni dokument na području zaštite voda. Glavni cilj ove direktive je uspostavljanje okvira za zaštitu površinskih i podzemnih voda raznim merama, među kojima su i mere za postepeno smanjenje ispuštanja opasnih supstanci sa prioritete liste. Ovu listu prioriternih zagađujućih materija čini spisak od 33 opasne supstance. EU je u 2015. godini formirala novu listu zagađujućih materija u koju su uključene supstance koje mogu predstavljati značajan rizik po akvatičnu sredinu, a za koje ne postoji dovoljno podataka o monitoringu (Decision 2015/495). Na ovoj listi supstanci koje je potrebno „posmatrati“ (eng. *watch list*) nalaze se steroidni hormoni 17 β -estradiol i 17 α -etinilestradiol, kao i estron kao proizvod raspadanja 17 β -estradiola. U listu su pored hormona uključeni i lek diklofenak, makrolidni antibiotici (eritromicin, klaritromicin i azitromicin), kao i pesticidi iz grupe neonikotinoida.

Evropska Unija kontroliše i implementaciju analitičkih metoda i tumačenje dobijenih rezultata propisivanjem kriterijuma za validaciju metoda (Commission Decision 2002/657/EC). Putem ove odluke EU ustanovljeni su kriterijumi za interpretaciju rezultata i uveden je sistem identifikacionih tačaka za tumačenje podataka dobijenih metodom masene spektrometrije. Za potvrdu prisustva supstanci neophodno je odrediti minimalno četiri identifikacione tačke. Ukoliko se koristi maseni spektrometar niske rezolucije, kao što je jonski trap, prekursor jon ima vrednost jednog identifikacionog poena, dok svaki fragmentni jon ima vrednost 1,5 identifikacionih poena. Zbog toga je potrebno da se prilikom potvrde prisustva analita posmatraju najmanje dve reakcije fragmentacije prekursor jona, što ima ukupnu vrednost od četiri identifikaciona poena.

Agencija za zaštitu životne sredine (eng. *Environmental Protection Agency*, EPA) u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) je u septembru 2009. god. objavila finalnu

listu kandidata za svrstavanje u zagađujuće materije (eng. *Contaminant Candidate List*, CCL-3) koja predstavlja listu prioriternih zagađujućih supstanci u vodi za piće. Za navedene zagađujuće materije je utvrđeno da su prisutne ili se očekuje da budu prisutne u vodi za piće. Ova lista sadrži 104 supstance i 12 mikrobioloških pokazatelja kvaliteta vode. Hormoni koji su svrstani na CCL-3 listu su: 17 α -estradiol, ekvilin, ekvilin, 17 β -estradiol, estriol, estron, 17 α -etinilestradiol, mestranol i noretindron. Za navedene supstance je planirano dalje uključivanje u redovne monitoring programe.

U cilju smanjenja zagađenja vodenih tela, Odsek za kvalitet životne sredine u Oregonu, SAD, je objavio listu prioriternih perzistentnih zagađujućih materija, tzv. P3 listu (eng. *Priority Persistent Pollutant List*) (DEQ, 2009). Na listi se nalazi 118 zagađujućih materija sa štetnim uticajem na zdravlje ljudi, životinja ili akvatičnu sredinu. Zbog prepoznatog štetnog efekta, u listu su uključeni koprostanol, holesterol, sitostanol i β -sitosterol. Na osnovu ove liste prepoznati su izvori ovih zagađujućih materija i date su mere za smanjenje ispuštanja ovih supstanci u vodu.

Usled izražene akumulacije velikog broja različitih organskih polutanata u mulju koji zaostaje nakon tretmana otpadnih voda, trenutno se radi revizija postojeće Direktive o aktivnom mulju (Council Directive 86/278/EEC) kako bi se uključile prioritne supstance. Naime, važeća zakonska regulativa za primenu mulja kao đubriva u poljoprivredi kontroliše samo koncentracije teških metala i hranljivih materija.

U zakonskoj regulativi Republike Srbije u oblasti zaštite životne sredine steroidna jedinjenja još uvek nisu prepoznata kao zagađujuće materije. Međutim, prema Pravilniku o utvrđivanju programa sistematskog praćenja rezidua farmakoloških, hormonskih i drugih štetnih materija kod životinja, proizvoda životinjskog porekla, hrane životinjskog porekla i hrane za životinje (Sl. gl. RS br. 91/2005) steroidi su svrstani u grupu supstanci čiji tragovi nisu dozvoljeni kod domaćih životinja, životinja iz akvakulture i u mesu divljači.

2.7. Steroidni hormoni i steroli detektovani u sedimentima

Istraživanja su pokazala da stepen izlučivanja hormona i sterola iz ljudskog organizma zavisi od pola i stupnja fiziološkog razvoja, a kod životinja i od vrste. Ljudi dnevno izlučuju značajne količine prirodnih steroidnih hormona kao što su estron (oko 4–12 µg/dan), 17β-estradiol (oko 1,5–7 µg/dan) i estriol (1,5–6 µg/dan), uglavnom putem urina (oko 95%). 17α-Etinilestradiol, koji se primenjuje u količinama od oko 20–60 µg/dan u kontracepciji i oko 10 µg/dan u terapiji hormonskih poremećaja, izlučuje se oko 30–90% putem fecesa i urina. Na osnovu prethodnog je izračunato da ukupna godišnja količina estrogenih hormona koja dospeva u životnu sredinu putem ekskrecije ljudi iznosi oko 29,5 t na svetskom nivou (Combalbert i Hernandez-Raquet, 2010). Na sličan način je određeno da ukupna količina estrogenih hormona koje su izlučile domaće životinje (svinje, ovce, krave i kokoške) u 2000. godini u Sjedinjenim Američkim Državama iznosi 49 t, a u Evropskoj Uniji 33 t (Lange *et al.*, 2002). U preglednom radu iz 2012. god. (Daughton, 2012) zaključeno je da se kod ljudi stepen ekskrecije koprostanola kreće u opsegu 200–700 mg/dan. Na godišnjem nivou, u životnu sredinu se ukupno u svetu oslobodi od 490 000 t do 1 700 000 t koprostanola. S obzirom na to da hormoni i steroli prisutni u otpadnim, a zatim i prirodnim vodama pokazuju veliki afinitet za adsorpciju na sedimentima (sa vrednostima $\log K_{ow}$ između 2,45 i 9,74), zagađenje sedimenata ovim jedinjenjima je očekivano.

U tabelama koje slede dat je pregled najčešće analiziranih i detektovanih steroidnih hormona (tabela 2.1) i humanih/životinjskih (tabela 2.2) i biljnih sterola (tabela 2.3) u uzorcima rečnih, jezerskih i morskih sedimenata. Navedene su metode pripreme uzoraka, koncentracije detektovanih hormona i sterola, kao i metode instrumentalne analize.

Tabela 2.1. Pregled metoda analize i detektovanih koncentracija steroidnih hormona u uzorcima sedimenata.

Steroidni hormon	Sediment	Metoda ekstrakcije	Koncentracija, ng g ⁻¹	Metoda analize	Literatura
Estron	Rečni	USE	1,0–11,9	LC-DAD-MS	López de Alda <i>et al.</i> , 2002
	Rečni	USE	do 11,8	LC-DAD	Petrovic <i>et al.</i> , 2002b
	Rečni	USE	ND–2	GC-MS/MS	Ternes <i>et al.</i> , 2002
	Rečni	MAE	ND–7	GC-MS	Liu <i>et al.</i> , 2004
	Morski	Imunoafinitetna ekstrakcija	0,07–2,52	HPLC-TOF-MS	Reddy i Brownawell, 2005
	Morski	USE	0,05–3,6	LC-ESI-MS/MS	Isobe <i>et al.</i> , 2006
	Rečni	Soxhlet, MAE	1,01–2,37	HPLC-MS/MS	Matějček <i>et al.</i> , 2007
	Rečni	MAE	ND–5,8	GC-MS	Hibberd <i>et al.</i> , 2009
	Jezerski	LDTD	6–16	LDTD-APCI-MS/MS	Viglino <i>et al.</i> , 2011
Močvarni	USE	ND–49,27	HPLC-UV	Froehner <i>et al.</i> , 2012	
17β-Estradiol	Rečni	USE	ND–1,5	GC-MS/MS	Ternes <i>et al.</i> , 2002
	Rečni	MAE	ND–4	GC-MS	Liu <i>et al.</i> , 2004
	Morski	Imunoafinitetna ekstrakcija	0,05–0,53	HPLC-TOF-MS	Reddy i Brownawell, 2005
	Morski	USE	ND–0,58	LC-ESI-MS/MS	Isobe <i>et al.</i> , 2006
	Rečni	Soxhlet, MAE	ND–1,84	HPLC-MS/MS	Matějček <i>et al.</i> , 2007
	Rečni	MAE	ND–11,2	GC-MS	Hibberd <i>et al.</i> , 2009
	Jezerski	LDTD	22–70	LDTD-APCI-MS/MS	Viglino <i>et al.</i> , 2011
	Močvarni	USE	ND–39,77	HPLC-UV	Froehner <i>et al.</i> , 2012

Tabela 2.1. (nastavak)

Steroidni hormon	Sediment	Metoda ekstrakcije	Koncentracija, ng g⁻¹	Metoda analize	Literatura
17 α -Estradiol	Morski	USE	ND–0,34	LC-ESI-MS/MS	Isobe <i>et al.</i> , 2006
	Rečni	Soxhlet, MAE	ND–1,35	HPLC-MS/MS	Matějček <i>et al.</i> , 2007
Estriol	Rečni	USE	ND–3,37	LC-DAD-MS	López de Alda <i>et al.</i> , 2002
	Jezerski	LDTD	6–18	LDTD-APCI-MS/MS	Viglino <i>et al.</i> , 2011
17 α -Ethinilestradiol	Rečni	USE	ND–22,8	LC-DAD-MS	López de Alda <i>et al.</i> , 2002
	Rečni	USE	do 22,8	LC-DAD	Petrovic <i>et al.</i> , 2002b
	Rečni	USE	ND–0,9	GC-MS/MS	Ternes <i>et al.</i> , 2002
	Rečni	MAE	ND–12	GC-MS	Liu <i>et al.</i> , 2004
	Rečni	Soxhlet, MAE	ND–1,63	HPLC-MS/MS	Matějček <i>et al.</i> , 2007
	Rečni	USE	48,1	HPLC-DAD i FL	Martín <i>et al.</i> , 2010
	Jezerski	LDTD	ND–30	LDTD-APCI-MS/MS	Viglino <i>et al.</i> , 2011
	Močvarni	USE	ND–129,78	HPLC-UV	Froehner <i>et al.</i> , 2012
Noretindron	Rečni	USE	ND–1,08	LC-DAD-MS	López de Alda <i>et al.</i> , 2002
	Jezerski	LDTD	ND–90	LDTD-APCI-MS/MS	Viglino <i>et al.</i> , 2011
Levonorgestrel	Rečni	USE	ND–2,18	LC-DAD-MS	López de Alda <i>et al.</i> , 2002
	Jezerski	LDTD	ND–19	APCI-MS/MS	Viglino <i>et al.</i> , 2011

USE – ultrazvučna ekstrakcija; MAE – mikrotalasna ekstrakcija; Soxhlet – Soksletova ekstrakcija; LDTD – termalna desorpcija laser diodom; ND – nije detektovan; LC – tečna hromatografija; HPLC – tečna hromatografija visokih performansi; DAD – detektor sa nizom dioda; UV – ultraljubičasti detektor; MS – masena spektometrija; GC – gasna hromatografija; TOF – analizator vremena preleta jona; APCI – hemijska jonizacija na atmosferskom pritisku; ESI – elektrosprej jonizacija.

Veliki broj objavljenih radova o steroidnim hormonima fokusiran je na njihovo određivanje u uzorcima površinskih i otpadnih voda, dok je manji broj studija objavljen o njihovom određivanju u čvrstim matricama, kao što sedimenti ili mulj koji zaostaje u PPOV (Sosa-Ferrera *et al.*, 2012). Prve studije o prisustvu steroidnih hormona u uzorcima rečnih sedimenata su urađene u Španiji (López de Alda *et al.*, 2002; Petrovic *et al.*, 2002b) i Nemačkoj (Ternes *et al.*, 2002). Analiza rečnih sedimenata iz reka u oblasti Saseks, Velika Britanija, je pokazala da najveća estrogena aktivnost u ispitivanim sedimentima potiče od estrona i 17β -estradiola (Liu *et al.*, 2004; Peck *et al.*, 2004). Pored rečnih sedimenata, razvijene su i metode određivanja steroidnih jedinjenja u morskim (Reddy i Brownawell, 2005; Isobe *et al.*, 2006; Arditoglou i Voutsas, 2012) i jezerskim sedimentima (Viglino *et al.*, 2011).

Kao što se može zaključiti iz tabele 2.1, najčešće analizirani i detektovani steroidni hormoni u uzorcima sedimenata su prirodni estrogeni estron i 17β -estradiol, dok se od sintetskih estrogena najčešće detektuje 17α -etinilestradiol. Analiza uzoraka sedimenata iz oblasti Katalonije u Španiji je pokazala da se steroidni hormoni u rečnim sedimentima nalaze u niskim koncentracijama, reda veličine ng g^{-1} . U ispitivanim uzorcima sedimenata, najčešće detektovani hormoni su estriol i noretindron, dok su u najvećim koncentracijama pronađeni 17α -etinilestradiol ($22,8 \text{ ng g}^{-1}$) i estron ($11,9 \text{ ng g}^{-1}$) (López de Alda *et al.*, 2002). Ispitivanja mulja iz PPOV i uzoraka sedimenata iz osam reka u Nemačkoj su pokazala da su estron, 17β -estradiol i 17α -etinilestradiol veoma postojani tokom digestije mulja (procesa inaktivacije mikroorganizama i smanjenja količine organske materije). Pošto ova jedinjenja zaostaju u mulju i nakon obrade, daljom primenom mulja kao đubriva, hormoni putem spiranja sa poljoprivrednog zemljišta dolaze do rečnih sedimenata (Ternes *et al.*, 2002). Iako je u ovoj studiji određivano i prisustvo sintetskog estrogena mestranola, tragovi ovog jedinjenje nisu pronađeni ni u uzorcima digestiranog mulja, ni u rečnim sedimentima.

Za razliku od ljudi kod kojih se estradiol izlučuje u obliku 17β -izomera, kod životinja estradiol može biti prisutan u oba oblika, 17α - i 17β -izomera (Combalbert i Hernandez-Raquet, 2010). Ispitivanja raspodele estrogenih hormona i njihovih konjugovanih formi u uzorcima rečnih i morskih sedimenata su pokazala da je 17α -estradiol prisutan u 10% uzoraka sedimenata iz reke Svatka u Češkoj (Matějček *et al.*, 2007), kao i u 35% uzoraka iz Tokijskog zaliva u Japanu (Isobe *et al.*, 2006),

ukazujući na moguće zagađenje fekalnim otpadom životinja. Sintetski gestageni hormoni noretindron i levonorgestrel, koji se intenzivno primenjuju u hormonskoj terapiji, detektovani su u rečnim sedimentima u Španiji (López de Alda *et al.*, 2002) i u jezerskom sedimentu u blizini Montreala u Kanadi (Viglino *et al.*, 2011). Noretindron je bio najzastupljeniji hormon u jezerskom sedimentu u Kanadi, sa maksimalnom koncentracijom od 90 ng g^{-1} .

Za razliku od steroidnih hormona, prve studije o prisustvu sterola u uzorcima sedimenata su objavljene još sedamdesetih godina XX veka (Goodfellow *et al.*, 1977; Hatcher i McGillivary, 1979). Ove studije su bile usmerene na određivanje koncentracije koprostanola, kao humanog fekalnog biomarkera. U literaturi je zabeležen širok opseg koncentracija koprostanola, od veoma zagađenih lokacija u Španiji (Grimalt *et al.*, 1990; González-Oreja i Saiz-Salinas, 1998) i Brazilu (Froehner *et al.*, 2009), gde se koncentracija koprostanola kretala i do $390 \mu\text{g g}^{-1}$ (tabela 2.2), do manje zagađenih sedimenata iz Venecijanskog zaliva (Fattore *et al.*, 1996), Jadranskog mora (Benfenati *et al.*, 1994), Brazila (Bataglioni *et al.*, 2015) i SAD-a (Writer *et al.*, 1995).

S obzirom na to da je holesterol jedan od najzastupljenijih sterola, kako u ljudskom organizmu, tako i u životnoj sredini (Volkman, 1986), nije iznenađujuće što ima dominantan udeo u ukupnoj količini sterola detektovanih u većini ispitivanih uzoraka sedimenata (tabela 2.2, Benfenati *et al.*, 1994; Writer *et al.*, 1995; Fattore *et al.*, 1996; González-Oreja i Saiz-Salinas, 1998; Mudge *et al.*, 1999; Martins *et al.*, 2002, 2011, 2014b; Hughes i Thompson, 2004; Biache i Philp, 2013; Richard *et al.*, 2014; Saeed *et al.*, 2015). U uzorcima sedimenata iz oblasti Ria Formosa u Portugaliji, holesterol je detektovan kao dominantan sterol u čak 89,5% uzoraka, u koncentraciji od $0,03$ do $1236 \mu\text{g g}^{-1}$ (Mudge i Duce, 2005). Pored prirodnih izvora holesterola, prisustvo ovog jedinjenja u visokoj koncentraciji se može objasniti i zagađenjem otpadnim vodama iz domaćinstava koje sadrže ostatke hrane bogate holesterolom (Leeming *et al.*, 2015).

Epikoprostanol (3α -izomer koprostanola) se obično detektuje u koncentracijama nižim od koprostanola (tabela 2.2). Najviše koncentracije epikoprostanola su detektovane u anoksičnim sedimentima u zalivu Tan-Šui (do $67,4 \mu\text{g g}^{-1}$), na Tajvanu, u koji se direktno izlivaju netretirane otpadne vode (Jeng i Han, 1994). Utvrđeno je da se sinteza epikoprostanola, kao rezultat mikrobiološke redukcije koprostanola, može

odvijati i *in situ*, u anoksičnim sredinama kao što je mulj iz PPOV (McCalley *et al.*, 1981). Takođe, pokazano je da na Antarktiku značajan izvor epikoprostanola može biti i feces morskih životinja, kao što su kitovi (Martins *et al.*, 2005, 2014a).

Holestanol predstavlja termodinamički najstabilniji izomer koprostanola, koji se formira u životnoj sredini putem redukcije holesterola (Devane *et al.*, 2006). Zato može biti prisutan i u sredinama koje nisu zagađene fekalnim materijalom. Holestanol je u uzorcima sedimenata uglavnom prisutan u sličnom opsegu koncentracija kao i holesterol (tabela 2.2) (Jeng i Han, 1994; Writer *et al.*, 1995; Cordeiro *et al.*, 2008; Froehner *et al.*, 2009; Martins *et al.*, 2014a; Bataglione *et al.*, 2015; Saeed *et al.*, 2015). Međutim, u zagađenim tropskim regionima Brazila (Carreira *et al.*, 2004; Martins *et al.*, 2007; Campos *et al.*, 2012), Kube (Tolosa *et al.*, 2014), Malezije i Vijetnama (Isobe *et al.*, 2002) su zabeležene više koncentracije holestanola u odnosu na holesterol. Ova činjenica se može objasniti time da se stepen mikrobiološke redukcije holesterola u izomer holestanol povećava u uslovima povišene temperature i veće količine nutrijenata iz otpadnih voda (Pratt *et al.*, 2008).

Epiholestanol predstavlja produkt bakterijskog biohidrogenovanja holesterola u veoma anoksičnim uslovima (Holtvoeth *et al.*, 2010). Studija o zagađenosti rečnih sedimenata u Brazilu je pokazala da je epiholestanol, kao rezultat intenzivne bakterijske konverzije holesterola, u visokim koncentracijama prisutan u analiziranim sedimentima (do $31,4 \mu\text{g g}^{-1}$, Cordeiro *et al.*, 2008). Tragovi ovog jedinjenja pronađeni su i u morskim sedimentima na Antarktiku (Leeming *et al.*, 2015). Holestanon je u visokim koncentracijama detektovan u morskom sedimentu u Španiji (tabela 2.2) (do $20 \mu\text{g g}^{-1}$, Grimalt *et al.*, 1990) i u rečnom sedimentu u Brazilu (do $11,5 \mu\text{g g}^{-1}$, Cordeiro *et al.*, 2008).

Tabela 2.2. Pregled metoda analize i detektovanih koncentracija humanih/životinjskih sterola u uzorcima sedimenata.

Humani/ životinjski sterol	Sediment	Metoda ekstrakcije	Koncentracija, ng g ⁻¹	Metoda analize	Literatura
Koprostanol	Estuarski	USE	3–13580	GC-MS	Goodfellow <i>et al.</i> , 1977
	Morski	Soxhlet	82–5200	GC-FID	Hatcher i McGillivary, 1979
	Morski	Soxhlet	410–390000	GC-FID	Grimalt <i>et al.</i> , 1990
	Morski	Soxhlet	40	GC-MS	Benfenati <i>et al.</i> , 1994
	Estuarski	Soxhlet	420–163000	GC-FID	Jeng i Han, 1994
	Rečni	Ekstrakcija rastvaračem	100–7530	GC-MS	Writer <i>et al.</i> , 1995
	Morski	Soxhlet	40–4406	GC-MS	Fattore <i>et al.</i> , 1996
	Estuarski	Soxhlet	2200–293000	GC-FID	González-Oreja i Saiz-Salinas, 1998
	Morski	Ekstrakcija rastvaračem uz refluks	ND–7300	GC-MS	Mudge <i>et al.</i> , 1999
	Morski	Ekstrakcija rastvaračem uz refluks	496–1534	GC-FID	Patton i Reeves, 1999
	Jezerski	ASE	ND–20000	GC-MS	Marvin <i>et al.</i> , 2001
	Morski	Ekstrakcija rastvaračem uz refluks	do 680	GC-MS	Seguel <i>et al.</i> , 2001
	Rečni	USE	5–15497	GC-MS	Isobe <i>et al.</i> , 2002
	Morski	Soxhlet	30–6140	GC-FID i GC-MS	Martins <i>et al.</i> , 2002
	Morski	Soxhlet	270–35000	GC-MS	Hughes i Thompson, 2004
	Morski	Ekstrakcija rastvaračem	10–47000	GC-MS	Carreira <i>et al.</i> , 2004
	Morski	Soxhlet	ND–14000	GC-MS	Martins <i>et al.</i> , 2005
	Morski	Ekstrakcija rastvaračem uz refluks	740–1530	GC-MS	Reeves i Patton, 2005
	Morski	Soxhlet	ND–91,8	GC-MS	Martins <i>et al.</i> , 2007
	Rečni	Soxhlet	210–40800	GC-MS	Cordeiro <i>et al.</i> , 2008

Tabela 2.2. (nastavak)

Humani/ životinjski sterol	Sediment	Metoda ekstrakcije	Koncentracija, ng g ⁻¹	Metoda analize	Literatura
Koprostanol	Rečni	Soxhlet	250–196000	GC-MS	Froehner <i>et al.</i> , 2009
	Morski	Soxhlet	ND–2220	GC-MS	Martins <i>et al.</i> , 2011
	Estuarski	Ekstrakcija rastvaračem	410–8320	GC-MS	Campos <i>et al.</i> , 2012
	Morski	USE	174–41228	GC-MS	Saeed <i>et al.</i> , 2012
	Rečni	USE	ND–80	GC-MS	Biache i Philp, 2013
	Rečni	ASE	13,6–447	GC-MS	Machado <i>et al.</i> , 2014
	Morski	Soxhlet	ND–150	GC-FID	Martins <i>et al.</i> , 2014a
	Morski	Soxhlet	30–6080	GC-FID	Martins <i>et al.</i> , 2014b
	Morski	Soxhlet	ND–87	GC-MS	Richard <i>et al.</i> , 2014
	Morski	MAE	10–5400	GC-FID i GC-MS	Tolosa <i>et al.</i> , 2014
	Jezerski	USE	do 252300	GC-MS	Tse <i>et al.</i> , 2014
	Morski	MAE	ND–48,2	UHPLC-MS/MS-APCI	Bataglione <i>et al.</i> , 2015
	Morski	Ekstrakcija rastvaračem	1236–2400	GC-FID	Leeming <i>et al.</i> , 2015
Holesterol	Morski	Soxhlet	500–80000	GC-FID	Grimalt <i>et al.</i> , 1990
	Morski	Soxhlet	894	GC-MS	Benfenati <i>et al.</i> , 1994
	Estuarski	Soxhlet	1040–79100	GC-FID	Jeng i Han, 1994
	Rečni	Ekstrakcija rastvaračem	490–10470	GC-MS	Writer <i>et al.</i> , 1995
	Morski	Soxhlet	813–9872	GC-MS	Fattore <i>et al.</i> , 1996
	Estuarski	Soxhlet	2900–1625000	GC-FID	González-Oreja i Saiz-Salinas, 1998
	Morski	Ekstrakcija rastvaračem uz refluks	0,05–15700	GC-MS	Mudge <i>et al.</i> , 1999
	Morski	Ekstrakcija rastvaračem uz refluks	400–896	GC-FID	Patton i Reeves, 1999
	Rečni	USE	63–9397	GC-MS	Isobe <i>et al.</i> , 2002

Tabela 2.2. (nastavak)

Humani/ životinjski sterol	Sediment	Metoda ekstrakcije	Koncentracija, ng g⁻¹	Metoda analize	Literatura
Holesterol	Morski	Soxhlet	130–5740	GC-FID i GC-MS	Martins <i>et al.</i> , 2002
	Estuarski	Ekstrakcija rastvaračem	100–7800	GC-MS	Carreira <i>et al.</i> , 2004
	Morski	Soxhlet	1400–44700	GC-MS	Hughes i Thompson, 2004
	Morski	Soxhlet	80–3930	GC-MS	Martins <i>et al.</i> , 2005
	Morski	Ekstrakcija rastvaračem uz refluks	30–1236000	GC-MS	Mudge i Duce, 2005
	Morski	Ekstrakcija rastvaračem uz refluks	400–700	GC-MS	Reeves i Patton, 2005
	Morski	Soxhlet	4,4–369,2	GC-MS	Martins <i>et al.</i> , 2007
	Jezerski	Soxhlet	440	GC-MS	Shah <i>et al.</i> , 2007
	Rečni	Soxhlet	80–9600	GC-MS	Cordeiro <i>et al.</i> , 2008
	Rečni	Soxhlet	360–25900	GC-MS	Froehner <i>et al.</i> , 2009
	Morski	Soxhlet	20–3500	GC-MS	Martins <i>et al.</i> , 2011
	Estuarski	Ekstrakcija rastvaračem	330–6120	GC-MS	Campos <i>et al.</i> , 2012
	Morski	USE	911–13787	GC-MS	Saeed <i>et al.</i> , 2012
	Rečni	USE	260–8290	GC-MS	Biache i Philp, 2013
	Rečni	ASE	50–710	GC-MS	Machado <i>et al.</i> , 2014
	Morski	Soxhlet	470–15800	GC-FID	Martins <i>et al.</i> , 2014b
	Morski	Soxhlet	ND–4158	GC-MS	Richard <i>et al.</i> , 2014
	Morski	MAE	630–5400	GC-FID i GC-MS	Tolosa <i>et al.</i> , 2014
	Jezerski	USE	do 87000	GC-MS	Tse <i>et al.</i> , 2014
	Morski	MAE	ND–167,2	UHPLC-MS/MS-APCI	Bataglion <i>et al.</i> , 2015
Morski	Ekstrakcija rastvaračem	4377–71300	GC-FID	Leeming <i>et al.</i> , 2015	

Tabela 2.2. (nastavak)

Humani/ životinjski sterol	Sediment	Metoda ekstrakcije	Koncentracija, ng g⁻¹	Metoda analize	Literatura
Epikoprostanol	Morski	Soxhlet	40–5000	GC-FID	Grimalt <i>et al.</i> , 1990
	Morski	Soxhlet	20	GC-MS	Benfenati <i>et al.</i> , 1994
	Estuarski	Soxhlet	150–67400	GC-FID	Jeng i Han, 1994
	Morski	Soxhlet	20–335	GC-MS	Fattore <i>et al.</i> , 1996
	Morski	Ekstrakcija rastvaračem uz refluks	ND–3900	GC-MS	Mudge <i>et al.</i> , 1999
	Morski	Ekstrakcija rastvaračem uz refluks	221–328	GC-FID	Patton i Reeves, 1999
	Rečni	USE	2–2028	GC-MS	Isobe <i>et al.</i> , 2002
	Morski	Soxhlet	ND–280	GC-FID i GC-MS	Martins <i>et al.</i> , 2002
	Estuarski	Ekstrakcija rastvaračem	1230–4770	GC-MS	Carreira <i>et al.</i> , 2004
	Morski	Soxhlet	ND–1000	GC-MS	Hughes i Thompson, 2004
	Morski	Soxhlet	ND–620	GC-MS	Martins <i>et al.</i> , 2005
	Morski	Ekstrakcija rastvaračem uz refluks	150–350	GC-MS	Reeves i Patton, 2005
	Morski	Soxhlet	ND–132	GC-MS	Martins <i>et al.</i> , 2007
	Rečni	Soxhlet	10–4400	GC-MS	Cordeiro <i>et al.</i> , 2008
	Rečni	Soxhlet	20–9710	GC-MS	Froehner <i>et al.</i> , 2009
	Morski	Soxhlet	ND–130	GC-MS	Martins <i>et al.</i> , 2011
	Estuarski	Ekstrakcija rastvaračem	110–1930	GC-MS	Campos <i>et al.</i> , 2012
	Rečni	USE	ND–290	GC-MS	Biache i Philp, 2013
	Rečni	ASE	2,6–203	GC-MS	Machado <i>et al.</i> , 2014
	Morski	Soxhlet	10–100	GC-FID	Martins <i>et al.</i> , 2014a
Morski	Soxhlet	ND–610	GC-FID	Martins <i>et al.</i> , 2014b	

Tabela 2.2. (nastavak)

Humani/ životinjski sterol	Matrica	Metoda ekstrakcije	Koncentracija, ng g ⁻¹	Metoda analize	Literatura
Epikoprostanol	Morski	MAE	ND–8,1	UHPLC-MS/MS-APCI	Bataglion <i>et al.</i> , 2015
	Morski	Ekstrakcija rastvaračem	ND–1200	GC-FID	Leeming <i>et al.</i> , 2015
Holestanol	Morski	Soxhlet	250–16000	GC-FID	Grimalt <i>et al.</i> , 1990
	Morski	Soxhlet	118	GC-MS	Benfenati <i>et al.</i> , 1994
	Estuarski	Soxhlet	810–68800	GC-FID	Jeng i Han, 1994
	Rečni	Ekstrakcija rastvaračem	260–9570	GC-MS	Writer <i>et al.</i> , 1995
	Morski	Soxhlet	118–1907	GC-MS	Fattore <i>et al.</i> , 1996
	Estuarski	Soxhlet	900–115000	GC-FID	González-Oreja i Saiz-Salinas, 1998
	Morski	Ekstrakcija rastvaračem uz refluks	0,02–2000	GC-MS	Mudge <i>et al.</i> , 1999
	Rečni	USE	21–11108	GC-MS	Isobe <i>et al.</i> , 2002
	Morski	Soxhlet	ND–480	GC-FID i GC-MS	Martins <i>et al.</i> , 2002
	Rečni	Ekstrakcija rastvaračem	110–10900	GC-MS	Carreira <i>et al.</i> , 2004
	Morski	Soxhlet	ND–1400	GC-MS	Martins <i>et al.</i> , 2005
	Morski	Ekstrakcija rastvaračem uz refluks	260–410	GC-MS	Reeves i Patton, 2005
	Morski	Soxhlet	ND–998,3	GC-MS	Martins <i>et al.</i> , 2007
	Jezerski	Soxhlet	50	GC-MS	Shah <i>et al.</i> , 2007
	Rečni	Soxhlet	120–9600	GC-MS	Cordeiro <i>et al.</i> , 2008
	Rečni	Soxhlet	120–24100	GC-MS	Froehner <i>et al.</i> , 2009
	Morski	Soxhlet	ND–2780	GC-MS	Martins <i>et al.</i> , 2011
	Estuarski	Ekstrakcija rastvaračem	730–9770	GC-MS	Campos <i>et al.</i> , 2012
Morski	USE	43–5348	GC-MS	Saeed <i>et al.</i> , 2012	
Rečni	USE	60–1940	GC-MS	Biache i Philp, 2013	

Tabela 2.2. (nastavak)

Humani/ životinjski sterol	Sediment	Metoda ekstrakcije	Koncentracija, ng g ⁻¹	Metoda analize	Literatura
Holestanol	Rečni	ASE	11,7–333	GC-MS	Machado <i>et al.</i> , 2014
	Morski	Soxhlet	60–1320	GC-FID	Martins <i>et al.</i> , 2014a
	Morski	Soxhlet	100–7440	GC-FID	Martins <i>et al.</i> , 2014b
	Morski	Soxhlet	ND–294	GC-MS	Richard <i>et al.</i> , 2014
	Morski	MAE	570–7300	GC-FID i GC-MS	Tolosa <i>et al.</i> , 2014
	Morski	MAE	ND–96,6	UHPLC-MS/MS-APCI	Bataglione <i>et al.</i> , 2015
	Morski	Ekstrakcija rastvaračem	75–26300	GC-FID	Leeming <i>et al.</i> , 2015
Epiholestanol	Rečni	Soxhlet	2740–31400	GC-MS	Cordeiro <i>et al.</i> , 2008
	Morski	Ekstrakcija rastvaračem	15,9–1500	GC-FID	Leeming <i>et al.</i> , 2015
Holestanon	Morski	Soxhlet	ND–20000	GC-FID	Grimalt <i>et al.</i> , 1990
	Morski	Soxhlet	18	GC-MS	Benfenati <i>et al.</i> , 1994
	Morski	Soxhlet	18–380	GC-MS	Fattore <i>et al.</i> , 1996
	Morski	Ekstrakcija rastvaračem uz refluks	242–401	GC-FID	Patton i Reeves, 1999
	Estuarski	Ekstrakcija rastvaračem	50–7950	GC-MS	Carreira <i>et al.</i> , 2004
	Morski	Soxhlet	ND–172,2	GC-MS	Martins <i>et al.</i> , 2007
	Rečni	Soxhlet	260–11500	GC-MS	Cordeiro <i>et al.</i> , 2008
	Rečni	Soxhlet	ND–5470	GC-MS	Froehner <i>et al.</i> , 2009
	Estuarski	Ekstrakcija rastvaračem	440–3650	GC-MS	Campos <i>et al.</i> , 2012

USE – ultrazvučna ekstrakcija; MAE – mikrotalasna ekstrakcija; Soxhlet – Soksletova ekstrakcija; ASE – tečna ekstrakcija pod pritiskom; ND – nije detektovan; GC – gasna hromatografija; MS – masena spektometrija; FID – plameno jonizujućii detektor; UHPLC – tečna hromatografija ultra visokih performansi; APCI – hemijska jonizacija na atmosferskom pritisku.

Tabela 2.3. Pregled metoda analize i detektovanih koncentracija biljnih hormona u uzorcima sedimenata.

Biljni sterol	Sediment	Metoda ekstrakcije	Koncentracije, ng g ⁻¹	Metoda analize	Literatura
β-Sitosterol	Morski	Soxhlet	150–30000	GC-FID	Grimalt <i>et al.</i> , 1990
	Morski	Soxhlet	194	GC-MS	Benfenati <i>et al.</i> , 1994
	Morski	Soxhlet	194–3156	GC-MS	Fattore <i>et al.</i> , 1996
	Estuarski	Soxhlet	12900–58700	GC-FID	González-Oreja i Saiz-Salinas, 1998
	Morski	Ekstrakcija rastvaračem uz refluks	ND–8200	GC-MS	Mudge <i>et al.</i> , 1999
	Morski	Ekstrakcija rastvaračem uz refluks	169–1702	GC-FID	Patton i Reeves, 1999
	Rečni	USE	256–10290	GC-MS	Isobe <i>et al.</i> , 2002
	Morski	Soxhlet	ND–758,7	GC-MS	Martins <i>et al.</i> , 2007
	Jezerski	Soxhlet	3000	GC-MS	Shah <i>et al.</i> , 2007
	Rečni	Soxhlet	770–17300	GC-MS	Froehner <i>et al.</i> , 2009
	Morski	Soxhlet	50–1820	GC-MS	Martins <i>et al.</i> , 2011
	Rečni	USE	640–13330	GC-MS	Biache i Philp, 2013
	Rečni	ASE	125–1417	GC-MS	Machado <i>et al.</i> , 2014
	Morski	Soxhlet	200–9550	GC-FID	Martins <i>et al.</i> , 2014b
	Morski	Soxhlet	ND–941	GC-MS	Richard <i>et al.</i> , 2014
	Morski	MAE	850–6200	GC-FID i GC-MS	Tolosa <i>et al.</i> , 2014
	Jezerski	USE	do 188600	GC-MS	Tse <i>et al.</i> , 2014
	Morski	MAE	ND–510,9	UHPLC-MS/MS-APCI	Bataglion <i>et al.</i> , 2015
Stigmasterol	Morski	Soxhlet	82	GC-MS	Benfenati <i>et al.</i> , 1994
	Morski	Soxhlet	82–682	GC-MS	Fattore <i>et al.</i> , 1996
	Morski	Ekstrakcija rastvaračem uz refluks	179–410	GC-FID	Patton i Reeves, 1999
	Rečni	USE	85–5641	GC-MS	Isobe <i>et al.</i> , 2002

Tabela 2.3. (nastavak)

Biljni sterol	Sediment	Metoda ekstrakcije	Koncentracija, ng g ⁻¹	Metoda analize	Literatura
Stigmasterol	Morski	Soxhlet	ND–321,4	GC-MS	Martins <i>et al.</i> , 2007
	Jezerski	Soxhlet	300	GC-MS	Shah <i>et al.</i> , 2007
	Rečni	Soxhlet	120–5900	GC-MS	Froehner <i>et al.</i> , 2009
	Morski	Soxhlet	10–1350	GC-MS	Martins <i>et al.</i> , 2011
	Rečni	USE	130–3190	GC-MS	Biache i Philp, 2013
	Rečni	ASE	17–653	GC-MS	Machado <i>et al.</i> , 2014
	Morski	Soxhlet	310–5600	GC-FID	Martins <i>et al.</i> , 2014b
	Morski	Soxhlet	ND–772	GC-MS	Richard <i>et al.</i> , 2014
	Morski	MAE	420–3400	GC-FID i GC-MS	Tolosa <i>et al.</i> , 2014
	Morski	MAE	ND–182,8	UHPLC-MS/MS-APCI	Bataglion <i>et al.</i> , 2015
Morski	Ekstrakcija rastvaračem	196–34400	GC-FID	Leeming <i>et al.</i> , 2015	
Kampesterol	Morski	Soxhlet	106	GC-MS	Benfenati <i>et al.</i> , 1994
	Morski	Soxhlet	106–583	GC-MS	Fattore <i>et al.</i> , 1996
	Estuarski	Soxhlet	ND–111000	GC-FID	González-Oreja i Saiz-Salinas, 1998
	Morski	Ekstrakcija rastvaračem uz refluks	157–352	GC-FID	Patton i Reeves, 1999
	Rečni	USE	61–4868	GC-MS	Isobe <i>et al.</i> , 2002
	Morski	Soxhlet	ND–122,4	GC-MS	Martins <i>et al.</i> , 2007
	Jezerski	Soxhlet	110	GC-MS	Shah <i>et al.</i> , 2007
	Morski	Soxhlet	10–2770	GC-MS	Martins <i>et al.</i> , 2011
	Rečni	USE	200–7970	GC-MS	Biache i Philp, 2013
	Rečni	ASE	9,0–151	GC-MS	Machado <i>et al.</i> , 2014
	Morski	Soxhlet	150–5440	GC-FID	Martins <i>et al.</i> , 2014b
	Morski	Soxhlet	ND–714	GC-MS	Richard <i>et al.</i> , 2014
Morski	MAE	470–3200	GC-FID i GC-MS	Tolosa <i>et al.</i> , 2014	

Tabela 2.3. (nastavak)

Biljni sterol	Sediment	Metoda ekstrakcije	Koncentracija, ng g ⁻¹	Metoda analize	Literatura
Kampesterol	Jezerski	USE	do 107500	GC-MS	Tse <i>et al.</i> , 2014
	Morski	MAE	ND–45,3	UHPLC-MS/MS-APCI	Bataglioni <i>et al.</i> , 2015
	Morski	Ekstrakcija rastvaračem	685–61100	GC-FID	Leeming <i>et al.</i> , 2015
Sitostanol	Morski	Soxhlet	300–25000	GC-FID	Grimalt <i>et al.</i> , 1990
	Morski	Soxhlet	65	GC-MS	Benfenati <i>et al.</i> , 1994
	Morski	Soxhlet	65–865	GC-MS	Fattore <i>et al.</i> , 1996
	Estuarski	Soxhlet	1030–50800	GC-FID	González-Oreja i Saiz-Salinas, 1998
	Morski	Ekstrakcija rastvaračem uz refluks	240–399	GC-FID	Patton i Reeves, 1999
	Rečni	USE	126–6873	GC-MS	Isobe <i>et al.</i> , 2002
	Morski	Soxhlet	ND–612,3	GC-MS	Martins <i>et al.</i> , 2007
	Rečni	USE	50–1220	GC-MS	Biache i Philp, 2013
Dezmosterol	Rečni	ASE	59,7–373	GC-MS	Machado <i>et al.</i> , 2014
	Morski	Soxhlet	ND–370	GC-MS	Richard <i>et al.</i> , 2014
	Morski	MAE	ND–255,1	UHPLC-MS/MS-APCI	Bataglioni <i>et al.</i> , 2015
	Morski	Ekstrakcija rastvaračem	ND–24100	GC-FID	Leeming <i>et al.</i> , 2015
	Morski	Ekstrakcija rastvaračem	1732–15600	GC-FID	Leeming <i>et al.</i> , 2015

USE – ultrazvučna ekstrakcija; MAE – mikrotalasna ekstrakcija; Soxhlet – Soksletova ekstrakcija; ASE – tečna ekstrakcija pod pritiskom; ND – nije detektovan; GC – gasna hromatografija; MS – masena spektometrija; FID – plameno jonizujući detektor; UHPLC – tečna hromatografija ultra visokih performansi; APCI – hemijska jonizacija na atmosferskom pritisku.

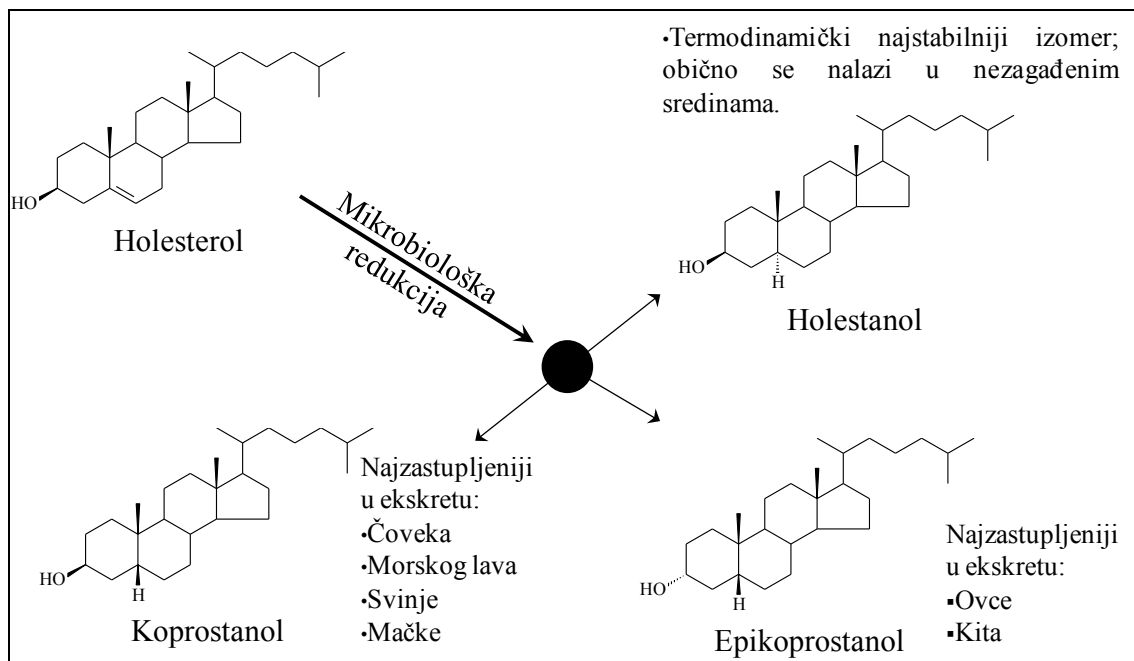
Biljni steroli β -sitosterol, stigmasterol i kampesterol predstavljaju biomarkere karakteristične za više biljke (Volkman, 1986). Kao što se može videti iz tabele 2.3, koncentracije β -sitosterola u uzorcima sedimenata veoma variraju, od toga da β -sitosterol nije detektovan (Mudge *et al.*, 1999; Martins *et al.*, 2007; Richard *et al.*, 2014; Bataglion *et al.*, 2015), do veoma visokih koncentracija od $30 \mu\text{g g}^{-1}$ (Grimalt *et al.*, 1990) i $58,7 \mu\text{g g}^{-1}$ (González-Oreja i Saiz-Salinas, 1998). Stigmasterol se detektuje u generalno nižim koncentracijama od β -sitosterola. Slične vrednosti koncentracija stigmasterola zabeležene su u tropskim područjima Vijetnama i Malezije (Isobe *et al.*, 2002) i Brazila (Froehner *et al.*, 2009; Martins *et al.*, 2014b). Povišene koncentracije kampesterola su detektovane u estuarskim sedimentima u Španiji ($111 \mu\text{g g}^{-1}$, González-Oreja i Saiz-Salinas, 1998), u sedimentima na Antarktiku (Leeming *et al.*, 2015) i u Kanadi (do $107,5 \mu\text{g g}^{-1}$, Tse *et al.*, 2014), kao i u rečnim sedimentima u SAD-u (Biache i Philp, 2013). Znatno niže koncentracije kampesterola su zabeležene u sedimentu iz Jadranskog mora (Benfenati *et al.*, 1994), jezerskom sedimentu iz Australije (Shah *et al.*, 2007), kao i u sedimentima iz Brazila (Martins *et al.*, 2007; Machado *et al.*, 2014). Prisustvo biljnih sterola u sedimentima se može povezati sa unosom organske materije terestrijalnog porekla, ali i sa zagađenjem biljnim uljima iz domaćinstava (Froehner *et al.*, 2009). Visoka koncentracija sitostanola, redukcionog proizvoda β -sitosterola, je zabeležena u estuarskim sedimentima u Španiji (do $50,8 \mu\text{g g}^{-1}$, González-Oreja i Saiz-Salinas, 1998), dok su niske koncentracije sitostanola karakteristične za područje Brazila (Machado *et al.*, 2014; Bataglion *et al.*, 2015). Biljni sterol dezmosterol se veoma retko određuje u uzorcima sedimenata, a tragovi ovog jedinjenja su zabeleženi samo u nekoliko studija (Sherwin *et al.*, 1993; Leeming *et al.*, 2015).

2.8. Primena odnosa sterola za identifikaciju izvora zagađenja

Za identifikaciju fekalnog zagađenja životne sredine tradicionalno su korišćene koliformne i *Enterococcus* bakterije (Savichtcheva i Okabe, 2006; Field i Samadpour, 2007). Međutim, pored bakteriološkog zagađenja, u ovu svrhu se mogu koristiti i fekalni steroli, koji uključuju humane/životinjske i biljne sterole. Utvrđivanje izvora zagađenja primenom odnosa sterola se zasniva na činjenici da sastav sterola u ekskretu

ljudi i životinja zavisi od ishrane, biosinteze sterola i procesa bakterijskog prevođenja holesterola u stanole u digestivnom traktu (slika 2.5). Kombinacija ova tri faktora stvara specifičan profil sterola kod ljudi i životinja, koji je karakterističan za svaku vrstu kao otisak prsta (eng. *sterol fingerprint*) (Leeming *et al.*, 1996). Danas se humani/životinjski i biljni steroli sve više koriste kao biomarkeri antropogenog zagađenja u različitim sferama životne sredine iz nekoliko razloga (Benfenati *et al.*, 1994):

- Zbog postojanosti i spore degradacije sterola u životnoj sredini, kao i akumulacije u sedimentima, njihova analiza omogućava detekciju dugogodišnjeg zagađenja, dok prisustvo bakterija ukazuje na trenutno zagađenje.
- Bakteriološka analiza je nepouzdana u hlorisanoj, kao i termalno i hemijski zagađenoj vodi.
- Bakteriološka analiza se ne može uraditi ukoliko su uzorci konzervirani.
- Na osnovu karakterističnih odnosa sterola može se utvrditi poreklo tj. izvor zagađenja sredine, dok bakteriološki indikatori samo pružaju informaciju o tome da li je zagađenje humanog porekla.



Slika 2.5. Putevi biotransformacije holesterola u najzastupljenije sterole u ljudskom i životinjskom ekskretu (Leeming *et al.*, 1996).

Primenljivost sterola kao markera zagađenja životne sredine potvrđena je studijom sprovedenom u jugoistočnoj Aziji (Isobe *et al.*, 2002). U uzorcima rečne vode i sedimentata, analizom hemijskih markera (koprostanola i drugih sterola) i mikrobioloških markera (koliformnih i sterptokoka bakterija), ustanovljena je linearna zavisnost između koncentracije koprostanola i bakterije *Escherichia coli* ukazujući na pouzdanu primenu sterola kao indikatora zagađenja.

Još 1967. godine je predloženo da se koprostanol koristi kao indikator fekalne kontaminacije (Murtaugh i Bunch, 1967). S obzirom na to da se u anoksičnim sedimentima odvija *in situ* sinteza koprostanola (Grimalt *et al.*, 1990), samo prisustvo ovog jedinjenja ne može biti indikacija fekalne kontaminacije. Zbog toga je predloženo da se koncentracije koprostanola veće od 10 ng g⁻¹ smatraju indikacijom antropogenog zagađenja (Writer *et al.*, 1995). Kasnije je ova granična vrednost povećana na 500 ng g⁻¹ u cilju sigurne identifikacije humane fekalne kontaminacije (González-Oreja i Saiz-Salinas, 1998). Dodatni problem korišćenja koncentracije koprostanola kao indikatora je taj što nivoi koprostanola mogu varirati u zavisnosti od veličine čestica sedimenta i količine ukupne organske materije u sedimentu (Bull *et al.*, 2002). Kako bi se povećala pouzdanost procene fekalnog zagađenja, veliki broj autora je predložio da se umesto koncentracija pojedinačnih sterola, koriste odnosi koncentracija različitih sterola (Shah *et al.*, 2007; Martins *et al.*, 2014a; Tolosa *et al.*, 2014; Saeed *et al.*, 2015). Uzimajući u obzir odnos koprostanola prema drugim sterolima u istom uzorku moguće je utvrditi izvore fekalnog zagađenja, pa čak i kvantitativno odrediti relativni udeo različitih izvora fekalne materije (Bull *et al.*, 2002).

U poslednjih 20 godina, veliki broj različitih odnosa sterola je primenjen za utvrđivanje izvora fekalnog zagađenja. Najjednostavniji odnos je procenat koprostanola u odnosu na ukupnu količinu sterola (Venkatesan i Kaplan, 1990; Sherwin *et al.*, 1993; Fattore *et al.*, 1996; Isobe *et al.*, 2002; Carreira *et al.*, 2004; Campos *et al.*, 2012; Tolosa *et al.*, 2014). Primena ovog odnosa se zasniva na činjenici da je koprostanol u humanom fecesu prisutan u 10 puta većoj koncentraciji nego u fecesu domaćih životinja i drugih kičmenjaka (Leeming *et al.*, 1996). Stoga, visoke koncentracije koprostanola, i time visok procenat u odnosu na ukupne sterole, ukazuju na zagađenje humanog porekla, dok niski nivoi potiču od prirodnih, biogenih izvora ovog sterola. Pregledom postojeće literature mogu se izdvojiti dve grupe odnosa sterola koji se najčešće primenjuju: odnosi

sterola za identifikaciju humane fekalne kontaminacije (tabela 2.4) i odnosi sterola za razlikovanje izvora fekalne materije (tabela 2.5).

Najčešće korišćen odnos za identifikaciju humanog fekalnog zagađenja je odnos koprostanola prema zbiru koprostanola i holestanola (odnos br. 1, tabela 2.4). Naime, eksperimenti su pokazali da je koprostanol (5β -izomer) u velikim koncentracijama prisutan u uzorcima sedimenata i suspendovanih čestica koji su kontaminirani humanim fekalnim materijalom, dok je holestanol (5α -izomer) karakterističan za nezagađena područja (Grimalt *et al.*, 1990). Vrednosti ovog odnosa veće od 0,7 ukazuju na zagađenje humanog porekla, dok su vrednosti ispod 0,3 karakteristične za nekontaminirane uzorke. Međutim, u dostupnoj literaturi postavlja se pitanje da li je ustanovljena granična vrednost od 0,7 odgovarajuća za identifikaciju humane fekalne kontaminacije, pošto je u uzorcima za koje se zna da su kontaminirani vrednost ovog odnosa bila ispod 0,7 (Isobe *et al.*, 2002; Carreira *et al.*, 2004; Cordeiro *et al.*, 2008). Takođe, Liming sa saradnicima (Leeming *et al.*, 1998) je zaključio da vrednost odnosa br. 1 iznad 0,5 ukazuje na sigurnu humanu kontaminaciju. Ovaj odnos je dalje modifikovan tako što je i koncentracija epikoprostanola uvršćena u izraz, kako bi se uzela u obzir konverzija koprostanola u epimer epikoprostanol (odnos br. 2, tabela 2.4, Bull *et al.*, 2002). Granične vrednosti predložene za odnos br. 2 su iste kao za odnos br. 1, tj. za pouzdanu potvrdu humane fekalne kontaminacije koristi se vrednost odnosa veća od 0,7.

Pojednostavljen oblik odnosa br. 1 je odnos koprostanola prema holestanolu (odnos br. 3, tabela 2.4). Vrednosti ovog odnosa veće od 0,5 se koriste za identifikovanje humanog fekalnog zagađenja, dok vrednosti manje od 0,3 ukazuju na to da je u ispitivanom uzorku dominantan prirodni proces redukcije holesterola u holestanol (Devane *et al.*, 2006).

Odnos koprostanola prema holesterolu (odnos br. 4, tabela 2.4) omogućava razlikovanje antropogenih (vrednost odnosa veća od 1,0) i prirodnih izvora sterola (vrednost manja od 1,0). Ovaj odnos se veoma često primenjuje u identifikaciji humane fekalne kontaminacije i pokazuje dobro slaganje sa drugim markerima humanog fekalnog zagađenja (Takada *et al.*, 1994; Carreira *et al.*, 2004; Alsalahi *et al.*, 2015). Međutim, treba ga primenjivati sa rezervom zbog moguće degradacije holesterola pod aerobnim uslovima i/ili redukcije pod anaerobnim uslovima (Bull *et al.*, 2000).

Tabela 2.4. Odnosi sterola za određivanje humanog fekalnog zagađenja.

Odnos br.	Odnos sterola	Vrednost koja ukazuje na humano fekalno zagađenje			Literatura
		Da	Nesigurno	Ne	
1.	$\frac{\text{Koprostand}}{\text{Koprostand} + \text{Holestanol}}$	> 0,7	0,3–0,7	< 0,3	Grimalt <i>et al.</i> , 1990; Fattore <i>et al.</i> , 1996; Patton i Reeves, 1999; Marvin <i>et al.</i> , 2001; Bull <i>et al.</i> , 2002; Carreira <i>et al.</i> , 2004; Reeves i Patton, 2005; Devane <i>et al.</i> , 2006; Martins <i>et al.</i> , 2007; Zhang <i>et al.</i> , 2008, Froehner <i>et al.</i> , 2009; Froehner <i>et al.</i> , 2009; Vane <i>et al.</i> , 2010
2.	$\frac{\text{Koprostand} + \text{Epikoprostanol}}{\text{Koprostand} + \text{Epikoprostanol} + \text{Holestanol}}$	> 0,7	0,3–0,7	< 0,3	Bull <i>et al.</i> , 2002; Reeves i Patton 2005
3.	$\frac{\text{Koprostand}}{\text{Holestanol}}$	> 0,5	0,3–0,5	< 0,3	Devane <i>et al.</i> , 2006; Roser <i>et al.</i> , 2006
4.	$\frac{\text{Koprostand}}{\text{Holesterol}}$	> 1,0	–	< 1,0	Quéméneur i Marty, 1994; Fattore <i>et al.</i> , 1996; Patton i Reeves, 1999; Mudge <i>et al.</i> , 1999; Carreira <i>et al.</i> , 2004; Reeves i Patton, 2005; Zhang <i>et al.</i> , 2008; Alsalahi <i>et al.</i> , 2015
5.	$\frac{\text{Koprostand}}{\text{Holesterol} + \text{Holestanol}}$	> 0,06	–	–	Writer <i>et al.</i> , 1995; Jeanneau <i>et al.</i> , 2011; Gottschall <i>et al.</i> , 2013
6.	$\frac{\text{Koprostand}}{\text{Epikoprostanol}}$	> 1,5	–	< 1,5	Fattore <i>et al.</i> , 1996; Patton i Reeves, 1999; Marvin <i>et al.</i> , 2001; Reeves i Patton, 2005; Zhang <i>et al.</i> , 2008
7.	$\frac{\text{Epikoprostanol}}{\text{Koprostand}}$	< 0,2	0,2–0,8	> 0,8	Mudge <i>et al.</i> , 1999; Martins <i>et al.</i> , 2007; Froehner <i>et al.</i> , 2009

Iz studije koja se bavila analizom sedimenata reke Misisipi (Writer *et al.*, 1995) proistekao je odnos koprostanola prema sumi holesterola i holestanola (odnos br. 5, tabela 2.4). Za ispitivane uzorke sedimenata, uzete u blizini izliva prečišćenih otpadnih voda, vrednost odnosa bila je iznad 0,06. Zbog toga je vrednost odnosa veća od 0,06 usvojena kao vrednost koja ukazuje na antropogeno zagađenje.

Odnosi br. 6 i 7 (tabela 2.4) se mogu uporedo posmatrati s obzirom na to da jedan odnos predstavlja recipročni izraz drugog. Međutim, važno je napomenuti da granične vrednosti odnosa nisu recipročne. Vrednosti odnosa veće od 1,5 (za koprostanol/epikoprostanol odnos) i manje od 0,2 (za epikoprostanol/koprostanol odnos) ukazuju na antropogeno zagađenje poreklom od netretiranih otpadnih voda. Odnos koprostanola prema epikoprostanolu se obično koristi za razlikovanje humanog otpadnog materijala od prirodnih izvora koprostanola (Fattore *et al.*, 1996; Marvin *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2008). Ovaj odnos je prvi put predložen u studiji sprovedenoj na Antarktiku za razlikovanje otpada koji potiče od morskih životinja (foke, kitovi) od humanog otpada (Venkatesan i Santiago, 1989). Epikoprostanol/koprostanol odnos ukazuje na stepen tretmana otpadnih voda (McCalley *et al.*, 1981). Vrednosti odnosa br. 7 veće od 0,8 se koriste za prepoznavanje uticaja prečišćenih otpadnih voda. Vrednost odnosa može biti veća od 0,8 i u slučaju ispuštanja netretiranih otpadnih voda, ali pre dužeg vremenskog perioda, pošto stajanjem i starenjem fekalne materije dolazi do konverzije koprostanola u epikoprostanol (McCalley *et al.*, 1981).

Pored odnosa koji se koriste za identifikaciju humanog fekalnog zagađenja, u literaturi su objavljeni odnosi za utvrđivanje porekla fekalne materije u životnoj sredini. Analizom životinjskog otpada (od svinja, krava i kokošaka) postavljene su granične vrednosti za odnose br. 8 ((kampesterol+ β -sitosterol)/holesterol) i br. 9 ((koprostanol+epikoprostanol)/holesterol), predstavljene u tabeli 2.5 (Jardé *et al.*, 2007). Utvrđeno je da vrednosti odnosa veće od 1,5 (odnos br. 8) i veće od 3,7 (odnos br. 9) ukazuju na jasnu kontaminaciju otpadom poreklom od svinja. Kako bi se potvrdilo humano fekalno zagađenje, za odnos br. 8 predložena je vrednost manja od 1,0, dok je za odnos br. 9 humana kontaminacija prepoznata sa vrednostima mnogo većim od 3,7. Ipak, prilikom korišćenja (kampesterol+ β -sitosterol)/holesterol odnosa treba imati u vidu da su kampesterol i β -sitosterol najzastupljeniji steroli u biljkama (Volkman, 1986; Martins *et al.*, 2011), zbog čega visoke vrednosti odnosa mogu ukazati i na prirodne

izvore i terestrijalni unos sterola. Navedeni odnos pokazao se nepouzdanim u samoj studiji u kojoj je predložen (Jardé *et al.*, 2007), prilikom analize zemljišta nađubrenog otpadnim materijalom od svinja.

Analizom efluenta iz postrojenja za prečišćavanje otpadnih voda, kao i otpadne materije poreklom od biljojeda (stoke, konja i jelena) utvrđeno je da se primenom odnosa epikoprostanol/(koprostanol+holestanol) jasno mogu razlikovati izvori zagađenja (odnos br. 10, tabela 2.5, Standley *et al.*, 2000). Za potvrdu humanog fekalnog zagađenja koriste se vrednosti odnosa manje od 0,01, dok vrednosti veće od 0,1 ukazuju na sterole poreklom od biljojeda.

Odnos sitostanola prema koprostanolu zapravo predstavlja odnos stanola koji potiču od fitosterola i stanola koji nastaju degradacijom holesterola (odnos br. 11, tabela 2.5, Gourmelon *et al.*, 2010). Ovaj odnos omogućava razlikovanje prirodnih izvora fekalne materije od humanog fekalnog zagađenja. Vrednosti odnosa veće od 1,0 su karakteristične za prirodne izvore sterola, poreklom od biljojeda, dok su vrednosti manje od 1,0 indikacija humane fekalne kontaminacije.

Tabela 2.5. Odnosi sterola za razlikovanje izvora zagađenja.

Odnos br.	Odnos sterola	Vrednost	Izvor	Literatura
8.	<u>Kampesterol + β - Sitosterol</u>	< 1,0	Čovek	Jardé <i>et al.</i> , 2007
	Holesterol	> 1,5	Svinja	
9.	<u>Koprostand + Epikoprostanol</u>	>> 3,7	Čovek	Jardé <i>et al.</i> , 2007
	Holesterol	> 3,7	Svinja	
		< 0,7	Krava/Živina	
10.	<u>Epikoprostanol</u>	< 0,01	Čovek	Standley <i>et al.</i> , 2000
	<u>Koprostand + Holestanol</u>	> 0,1	Biljojed	
11.	<u>Sitostanol</u>	> 1,0	Biljojed	Gourmelon <i>et al.</i> , 2010
	<u>Koprostand</u>	< 1,0	Čovek	

Važno je naglasiti da se pored fekalnih sterola još jedna klasa steroidnih jedinjenja koristi za utvrđivanje izvora kontaminacije, a to su žučne kiseline. Kombinacijom više biomarkera (sterola i žučnih kiselina) obezbeđuje se dodatna pouzdanost prilikom utvrđivanja antropogenog zagađenja (Bull *et al.*, 2002). Pored steroidnih jedinjenja, farmaceutski aktivne supstance (npr. karbamazepin), kafein, linearni alkil benzeni, kao i

veštački zaslađivači, mogu se koristiti kao indikatori zagađenja okoline otpadnim vodama zbog postojanosti u životnoj sredini (Stempvoort *et al.*, 2013; Harwood, 2014).

2.9. Steroidni hormoni i steroli odabrani za analizu

Prilikom izbora steroidnih jedinjenja za analizu vodilo se računa o tome da u istraživanje budu uključene supstance koje predstavljaju problem u životnoj sredini, a koje još uvek nisu uključene u redovne monitoring programe. Kriterijum za izbor je bila i stabilnost odabranih jedinjenja u rečnim sedimentima, kao i afinitet vezivanja za odabranu matricu. Za analizu je odabrano dvadeset steroidnih jedinjenja (devet steroidnih hormona, šest humanih/životinjskih sterola i pet biljnih sterola) koji spadaju u najčešće detektovane steroide u uzorcima iz životne sredine. Trivijalni i hemijski (IUPAC-ovi) nazivi odabranih supstanci prikazani su u tabeli 2.6.

Steroidni hormoni odabrani za analizu u ovom radu ubrajaju se u estrogene i gestagene hormone. Od prirodnih estrogenih hormona odabrani su estriol, estron, ekvilin, 17α - i 17β -estradiol, dok su od sintetskih analizirani mestranol i 17α -etinilestradiol. Noretindron i levonorgestrel pripadaju grupi sintetskih gestagenih hormona. Odabrana jedinjenja predstavljaju važnu grupu steroidnih hormona koja imaju rasprostranjenu primenu u humanoj i veterinarskoj terapiji. S obzirom na to da posledice prisustva ovih jedinjenja u akvatičnoj sredini još uvek nisu u potpunosti poznate, ali da su primećeni negativni uticaji na živi svet (npr. feminizacija riba i toksični efekat kod divljih životinja, Miège *et al.*, 2009), tragove izabranih hormona u rečnim sedimentima je neophodno pratiti.

Humani/životinjski steroli odabrani za analizu predstavljaju produkte ljudskog i životinjskog metabolizma. Holesterol predstavlja esencijalnu komponentu ćelijske membrane, a male količine se mogu naći u jajima, mleku itd. (Dutka *et al.*, 1974). Zbog široke rasprostranjenosti holesterol se ne smatra specifičnim biomarkerom. Od 512 mogućih stereoisomera koji mogu nastati redukcijom holesterola, u prirodi su najrasprostranjenija dva – koprostanol i holestanol (Walker *et al.*, 1982). Koprostanol nastaje u digestivnom traktu ljudi i viših kičmenjaka putem hidrogenovanja holesterola.

Tabela 2.6. Trivijalni i hemijski nazivi steroidnih hormona i sterola odabranih za analizu.

Steroid	Trivijalni naziv	Hemijski (IUPAC-ov) naziv
HORMON (grupa)	Estriol (estrogen)	1,3,5(10)-Estratrien-3,16 α ,17 β -triol
	Estron (estrogen)	1,3,5(10)-Estratrien-3-ol-17-on
	Ekvilin (estrogen)	1,3,5(10),7-Estratetraen-3-ol-17-on
	Noretindron (gestagen)	4-Estren-17 α -etinil-17 β -ol-3-on
	17 α -Etinilestradiol (estrogen)	1,3,5(10)-Estratrien-17 α -etinil-3,17 β -diol
	17 β -Estradiol (estrogen)	1,3,5(10)-Estratrien-3,17 β -diol
	17 α -Estradiol (estrogen)	1,3,5(10)-Estratrien-3,17 α -diol
	Levonorgestrel (gestagen)	4-Estren-17 α -etinil-18-homo-17 β -ol-3-on(+/-)
	Mestranol (estrogen)	1,3,5(10)-Estratrien-17 α -etinil-3,17 β -diol-3-metil etar
HUMANI/ ŽIVOTINJSKI STEROL	Epikoprostanol	5 β -Holestan-3 α -ol
	Koprostanol	5 β -Holestan-3 β -ol
	Epiholestanol	5 α -Holestan-3 α -ol
	Holestanol	5 α -Holestan-3 β -ol
	Holesterol	Holest-5-en-3 β -ol
	Holestanon	5 α -Holestan-3-on
BILJNI STEROL	Dezmosterol	Holesta-5,24-dien-3 β -ol
	Stigmasterol	24-Etilholest-5,22-dien-3 β -ol
	Kampesterol	24-Metilholest-5-en-3 β -ol
	β -Sitosterol	24-Etilholest-5-en-3 β -ol
	Sitostanol	24-Etil-5 α -holestan-3 β -ol

Predstavlja najzastupljeniji sterol u humanoj ekskreciji, što ga čini najkorisnijim biomarkerom za identifikaciju fekalnog zagađenja (Leeming *et al.*, 1996; Daughton, 2012). Može biti prisutan u malim količinama u anoksičnim sedimentima, usled anaerobnog procesa *in situ* produkcije (Tse *et al.*, 2014). Veoma je važno naglasiti da se u ljudskom organizmu redukcija holesterola odvija do koprostanola, dok se u životnoj sredini holesterol redukuje u holestanol (Jeng i Han, 1994; Martins *et al.*, 2007). Izomer koprostanola, epikoprostanol, se nalazi u veoma malim koncentracijama u ljudskom metaboličkom otpadu, ali se značajne količine mogu formirati tokom procesa anaerobnog tretmana otpadne vode, kao i starenjem fekalne materije pri čemu se koprostanol konvertuje u epikoprostanol (McCalley *et al.*, 1981). Zbog toga se epikoprostanol može koristiti kao indikator stepena tretmana otpadne vode (Mudge *et al.*, 1999) ili starosti fekalne materije (Froehner *et al.*, 2009). Prisustvo izomera holestanola, epiholestanola, u anoksičnoj sredini ukazuje na biohidrogenovanje

holesterola (Leeming *et al.*, 2015). Holestanon predstavlja produkt oksidacije holesterola, koji u kombinaciji sa drugim ketonima može ukazati na humano fekalno zagađenje životne sredine (Grimalt *et al.*, 1990).

Iako biljni steroli imaju brojne pozitivne efekte na ljudski organizam, istraživanja su pokazala da neki od njih mogu delovati i kao endokrini i metabolički ometači u akvatičnoj sredini (MacLachy i Van Der Kraak, 1995). Zbog zastupljenosti β -sitosterola, stigmasterola, kampesterola i dezmosterola u višim biljkama, prisustvo ovih fitosterola u rečnim sedimentima se može povezati sa unosom organske materije terestrijalnog porekla, ali i sa zagađenjem biljnim uljima iz domaćinstava (Froehner *et al.*, 2009). S obzirom na to da su kampesterol i β -sitosterol veoma zastupljeni u ishrani biljojeda, produkti njihove redukcije, poput sitostanola, se mogu koristiti za identifikaciju fekalnog materijala poreklom od biljojeda (Gourmelon *et al.*, 2010).

2.10. Analitičko određivanje steroidnih hormona i sterola

Analiza steroidnih hormona i sterola u životnoj sredini predstavlja težak zadatak, kako zbog veoma kompleksnih matrica, tako i zbog niskih koncentracija ispitivanih jedinjenja. Izbor odgovarajuće analitičke metode zavisi od očekivanih koncentracija u životnoj sredini, kao i od fizičko-hemijskih svojstava ispitivanih supstanci. Analitičko određivanje steroidnih hormona i sterola zasnovano je prvenstveno na primeni hromatografskih tehnika, poput tečne hromatografije (eng. *liquid chromatography*, LC) i gasne hromatografije (eng. *gas chromatography*, GC), u sprezi sa veoma osetljivim metodama detekcije, kao što su masena spektrometrija (eng. *mass spectrometry*, MS), tandem masena spektrometrija (MS/MS) i masena spektrometrija visoke rezolucije (eng. *high resolution mass spectrometry*, HRMS). Pre instrumentalne analize, uzorak je potrebno pripremiti, a optimizacija postupka pripreme ima važnu ulogu u poboljšanju osetljivosti i smanjenju nečistoća iz kompleksnih matrica kao što su npr. otpadne vode, mulj, sedimenti i biološki uzorci.

U literaturi je objavljen značajan broj analitičkih metoda za određivanje specifičnih grupa steroida, poput estrogenih hormona (López de Alda *et al.*, 2002; Peck *et al.*, 2004; Reddy i Brownawell, 2005; Isobe *et al.*, 2006; Nieto *et al.*, 2008) i fekalnih sterola (Marvin *et al.*, 2001; Campos *et al.*, 2012; Leeming *et al.*, 2015). S obzirom na

to da steroidni hormoni i steroli pripadaju klasi steroidnih jedinjenja, kao i da imaju zajedničke puteve dospevanja u životnu sredinu, postoji potreba za razvojem multirezidualne metode analize različitih grupa steroida. Međutim, zabeležen je mali broj metoda za simultano određivanje steroidnih hormona i sterola, a sve postojeće metode zasnovane su na primeni gasne hromatografije u sprezi sa masenom spektrometrijom (Furtula *et al.*, 2012a, 2012b; Gottschall *et al.*, 2013). GC-MS metoda ima određena ograničenja za termički nestabilne i slabo isparljive analite, poput sterola. Za ova jedinjenja je neophodna derivatizacija koja značajno produžava vreme analize, a često nastaju i neželjeni proizvodi. Nekoliko studija je pokazalo da je derivatizacija pre gasno-hromatografske analize potrebna i za neke od steroidnih hormona (Ternes *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2004; Hibberd *et al.*, 2009). Međutim, derivatizacijom različitih steroida mogu nastati isti proizvodi, kao u slučaju 17α -etinilestradiola i nekih sintetskih gestagena, što otežava pouzdanu identifikaciju jedinjenja (Shareef *et al.*, 2006). Takođe, u nekim studijama zasnovanim na primeni GC-MS metode pojavile su se poteškoće u hromatografskom razdvajanju dva važna sterola, koprostanola i epikoprostanola (Sherwin *et al.*, 1993; Jeng *et al.*, 1996). S obzirom na to da je epikoprostanol prisutan u životnoj sredini u značajnim koncentracijama, nemogućnost razdvajanja ova dva biomarkera može predstavljati veliki problem prilikom izračunavanja odnosa sterola i identifikacije izvora zagađenja. Zbog toga je tečna hromatografija u sprezi sa masenom spektrometrijom (LC-MS) metoda izbora za analizu tragova steroidnih hormona i sterola u uzorcima iz životne sredine.

Pregledom literature može se uočiti da je LC-MS metoda veoma zastupljena u analizi hormona u različitim matricama. Tako su tragovi hormona ispitivani u biološkim uzorcima (Harwood i Handelsman, 2009; Quignot *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012; Keski-Rahkonen *et al.*, 2013; Ronan i McHugh, 2013; Zhao *et al.*, 2014; Zheng *et al.*, 2014), kao i u uzorcima iz životne sredine, poput voda (Vulliet *et al.*, 2008; Al-Odaini *et al.*, 2010) i sedimenata (López de Alda *et al.*, 2002; Petrovic *et al.*, 2002b; Gomes *et al.*, 2004; Labadie *et al.*, 2007; Matějček *et al.*, 2007, 2013; Koyama *et al.*, 2013; López-Jiménez *et al.*, 2013; Gorga *et al.*, 2014). Primena LC-MS metode zabeležena je i u određivanju sterola u biološkim matricama (McDonald *et al.*, 2007, 2012; Honda *et al.*, 2008; Mendiara *et al.*, 2012; Meljon *et al.*, 2013). Takođe, korišćenjem LC-MS metode, analizirani su fitosteroli u biljkama (Rozenberg *et al.*,

2003; Jäpelt *et al.*, 2011) i biljnim uljima (Cañabate-Díaz *et al.*, 2007; Martínez-Vidal *et al.*, 2007; Segura Carretero *et al.*, 2008; Zarrouk *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009; Mo *et al.*, 2013). Međutim, kada je u pitanju LC-MS analiza humanih/životinjskih sterola u uzorcima iz životne sredine literaturni podaci su veoma oskudni. Samo u jednom radu analizirani su humani/životinjski steroli u uzorcima vode pomoću LC-MS tehnike (Wang i Gardinali, 2012), dok je pregledom literature pronađen ponovo samo jedan rad o LC-MS analizi humanih/životinjskih i biljnih sterola u rečnim sedimentima (Bataglion *et al.*, 2015).

2.11. Priprema uzoraka sedimenata

Priprema uzoraka za analizu predstavlja proces izolovanja i koncentrovanja analita iz određene matrice, kako bi se olakšalo njihovo hromatografsko razdvajanje i detekcija. Prilikom određivanja steroidnih jedinjenja u čvrstim matricama neophodno je izvršiti pripremu uzorka sa visokim faktorom predkoncentrisanja kako bi se postigle niske granice detekcije, reda veličine ng g^{-1} . Procedura pripreme uzorka se sastoji od sledećih stupnjeva: homogenizacije uzorka, ekstrakcije odabranih analita iz uzorka pomoću odgovarajućeg rastvarača, koncentrovanja analita (najčešće uparavanjem rastvarača) i prečišćavanja dobijenog ekstrakta (Mitra, 2003). Najvažniji stupnjevi u procesu pripreme čvrstih uzoraka za određivanje tragova steroidnih jedinjenja su ekstrakcija analita iz matrice i prečišćavanje dobijenog ekstrakta. Prečišćavanje dobijenog ekstrakta je veoma važno prilikom pripreme kompleksnih matrica za analizu, jer je analit prisutan u znatno nižim koncentracijama od nečistoća.

Pre ekstrakcije potrebno je izvršiti odgovarajući predtretman uzorka koji uključuje sušenje i smanjenje veličine čestica. Uklanjanje vlage se može vršiti sušenjem na sobnoj temperaturi tokom određenog vremenskog perioda (Seguel *et al.*, 2001; Matějček *et al.*, 2007), sušenjem u sušnici (Martins *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2004; Cordeiro *et al.*, 2008; Froehner *et al.*, 2009) ili procesom liofilizacije (Isobe *et al.*, 2002; López de Alda *et al.*, 2002; Ternes *et al.*, 2002; Carreira *et al.*, 2004; Arditsoglou i Voutsas, 2012; Campos *et al.*, 2012; Froehner *et al.*, 2012). Smanjenje veličine čestica se obavlja usitnjavanjem i prosejavanjem kroz odgovarajuća sита. Pregledom literature može se zaključiti da se za

ekstrakciju steroidnih hormona i sterola iz uzoraka sedimenata najčešće koriste sledeće metode:

- Soksletova ekstrakcija (eng. *Soxhlet extraction*)
- mikrotalasna ekstrakcija (eng. *microwave-assisted extraction*, MAE)
- ekstrakcija rastvaračem pod pritiskom (eng. *pressurized liquid extraction*, PLE ili eng. *accelerated solvent extraction*, ASE);
- ultrazvučna ekstrakcija (eng. *ultrasonic extraction*, USE)

Soksletova ekstrakcija je najčešće korišćena metoda ekstrakcije organskih jedinjenja iz čvrstih matrica (tabele 2.1–2.3). Prednosti metode su jednostavnost, ekonomičnost, kao i visoki prinosi analita. U poređenju sa drugim metodama, nedostaci Soksletove ekstrakcije su trajanje (6–24 h) i upotreba velike količine rastvarača (150–500 mL). Ekstrakcija se izvodi na temperaturi ključanja rastvarača, zbog čega nije pogodna za termički nestabilna jedinjenja. Zbog korišćenja velikih zapremina rastvarača neophodno je uparavanje nakon ekstrakcije, a upotrebljen organski rastvarač često predstavlja problem po životnu sredinu.

Kod mikrotalasne ekstrakcije, izolovanje organskih supstanci iz čvrstih matrica se postiže zagrevanjem organskog rastvarača pomoću mikrotalasa (elektromagnetnog zračenje frekvencije 0,3–300 GHz). Prednosti metode su kraće vreme ekstrakcije (10–30 min) i mala zapremina rastvarača (10–70 mL) u poređenju sa tradicionalnim metodama ekstrakcije. Efikasnost ekstrakcije zavisi od izbora organskog rastvarača, kao i temperature, vremena trajanja ekstrakcije i energije primenjenih mikrotalasa (Sosa-Ferrera *et al.*, 2012). Uticaj parametara mikrotalasne ekstrakcije je ispitan prilikom određivanja steroidnih hormona u rečnim sedimentima (Liu *et al.*, 2004). Utvrđeno je da se najviši prinosi postižu primenom metanola kao rastvarača, na temperaturi ekstrakcije od 110 °C. Za razliku od hormona, najefikasnija mikrotalasna ekstrakcija sterola se postiže korišćenjem smeše heksana i dihlormetana (u odnosu 1:1, v/v) na temperaturama do 115 °C (Tolosa *et al.*, 2014; Bataglione *et al.*, 2015).

Ekstrakcija rastvaračem pod pritiskom se odvija na visokim pritiscima (7–21 MPa) i temperaturama od 100 °C do 200 °C. Na povišenim pritiscima i temperaturama ekstrakcija rastvaračem je efikasnija zbog veće rastvorljivosti i bolje interakcije rastvarača sa čvrstom matricom. Naime, pri povišenom pritisku rastvarač

ostaje tečan iznad temperature ključanja, što omogućava bolje prodiranje u matricu uzorka. Metoda je brza (15–20 min) i efikasna, sa malim utroškom rastvarača (15–40 mL). Prednost ekstrakcije rastvaračem pod pritiskom nad novijim tehnikama, poput mikrotalasne ekstrakcije, je veliki izbor rastvarača za ekstrakciju (Sosa-Ferrera *et al.*, 2012). Metoda se pokazala kao veoma efikasna u ekstrakciji estrogenih hormona iz zemljišta (Beck *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2011) i mulja koji zaostaje u biološkom tretmanu otpadnih voda (Nieto *et al.*, 2008).

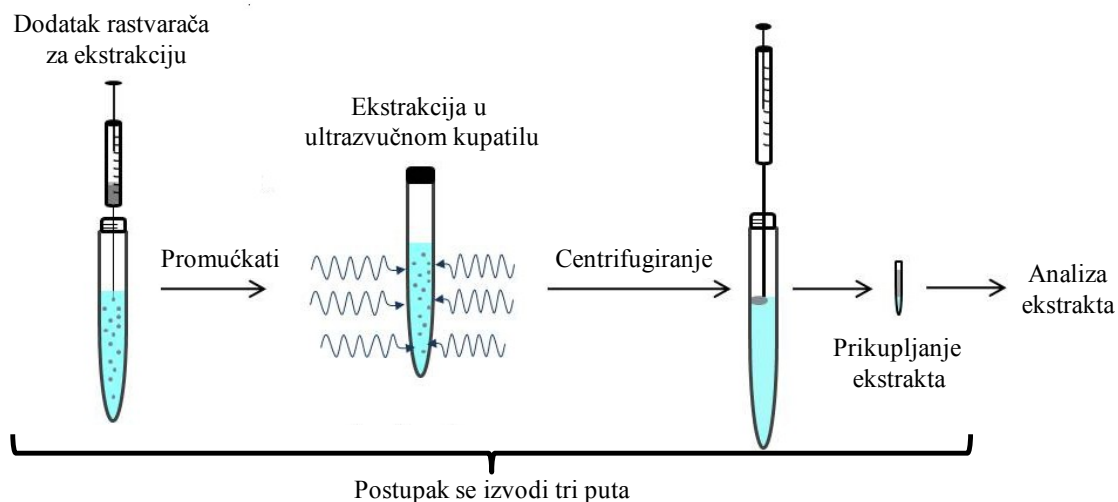
Kod ultrazvučne ekstrakcije, ili sonikacije za ekstrakciju analita iz čvrstih uzoraka koriste se ultrazvučni talasi. Prednosti metode su trajanje (10–60 min) i upotreba malih zapremina organskih rastvarača. Ova metoda ekstrakcije se odvija na sobnoj temperaturi i atmosferskom pritisku (Dean, 2003). Neželjeni efekat primene ultrazvučne ekstrakcije je da može dovesti do degradacije nekih organskih jedinjenja u uzorku (Sosa-Ferrera *et al.*, 2012).

2.11.1. Ultrazvučna ekstrakcija

Ultrazvuk ima frekvenciju iznad gornje granice sluha čoveka koja iznosi 20 kHz. Obuhvata frekvencije do oko 1 GHz, odakle počinje hipersonični režim. Ultrazvuk se primenjuje u mnogim naučnim disciplinama, uključujući medicinu, biologiju, hemiju, fiziku, inženjerstvo i druge.

Ultrazvučna ekstrakcija se može koristiti za ekstrakciju čvrstih i tečnih uzoraka, kao i organskih i neorganskih supstanci. Najčešće se izvodi u ultrazvučnom kupatilu napunjenom vodom koja služi za prenos energije ultrazvučnih talasa. Ultrazvučna ekstrakcija se može izvoditi i korišćenjem ultrazvučnih sondi koje obezbeđuju prenos ultrazvučnih talasa. Ultrazvučni talasi dovode do erozije matrice uzorka i pospešuju kontakt matrice sa rastvaračem. Zbog jednostavnosti, brzine, efikasnosti i bezbednijih uslova izvođenja u poređenju sa drugim tehnikama pripreme čvrstih uzoraka, smatra se da će upotreba ultrazvučne ekstrakcije biti sve zastupljenija. Kako bi se povećala efikasnost ekstrakcije, neophodno je prilikom razvoja metode optimizovati parametre koji najviše utiču na prinos analita, kao što su vrsta rastvarača za ekstrakciju, masa uzorka, odnos zapremine rastvarača i mase uzorka, veličina čestica u uzorku, kao i vreme ekstrakcije (Sosa-Ferrera *et al.*, 2012).

Ultrazvučna ekstrakcija se obično izvodi tako što se u ultrazvučno kupatilo postavi sud u kome se nalazi čvrst uzorak sa dovoljno organskog rastvarača i ekstrakcija vrši tokom kratkog vremena. Nakon ekstrakcije, rastvarač sa analitima se odvaja centrifugiranjem i dekantovanjem, ili filtracijom, a dodaje se svež rastvarač na preostali čvrsti ostatak. Ceo postupak se ponavlja još dva puta, a zatim se svi ekstrakti pomešaju (slika 2.6).



Slika 2.6. Prikaz postupka ultrazvučne ekstrakcije.

Ultrazvučna ekstrakcija je veoma zastupljena u ekstrakciji steroidnih hormona i sterola iz uzoraka sedimenata (tabele 2.1–2.3). Prilikom izolovanja hormona iz sedimenata kao ekstrakciona sredstva koriste se smeše metanol/acetona (1:1, v/v) (López de Alda *et al.*, 2002; Petrovic *et al.*, 2002b) ili acetonitril/voda (9:1, v/v) (Isobe *et al.*, 2006). Ultrazvučna ekstrakcija se može izvoditi i tako da se kombinuju različiti rastvarači, tj. da se u narednom stupnju ekstrakcije, kao svež rastvarač, dodaje drugo ekstrakciono sredstvo. Na primer, prilikom pripreme močvarnog sedimenta, optimalni prinosi estrogenih hormona su postignuti ultrazvučnom ekstrakcijom u kojoj je u prvom stupnju korišćena smeša heksan/acetonitril, u drugom smeša dihlormetan/acetonitril, a u trećem koraku čisti etilacetat (Froehner *et al.*, 2012). Na sličan način, ultrazvučna ekstrakcija sterola iz sedimenata je izvršena kombinovanjem metanola (I stupanj), smeše metanol/dihlormetan (1:1, v/v, II stupanj) i dihlormetana (III stupanj) (Isobe *et al.*, 2002; Biache i Philp, 2013). Pored smeše metanol/dihlormetan (1:1, v/v) (Saeed *et al.*, 2012), za ultrazvučnu ekstrakciju sterola iz sedimenata korišćena je i smeša

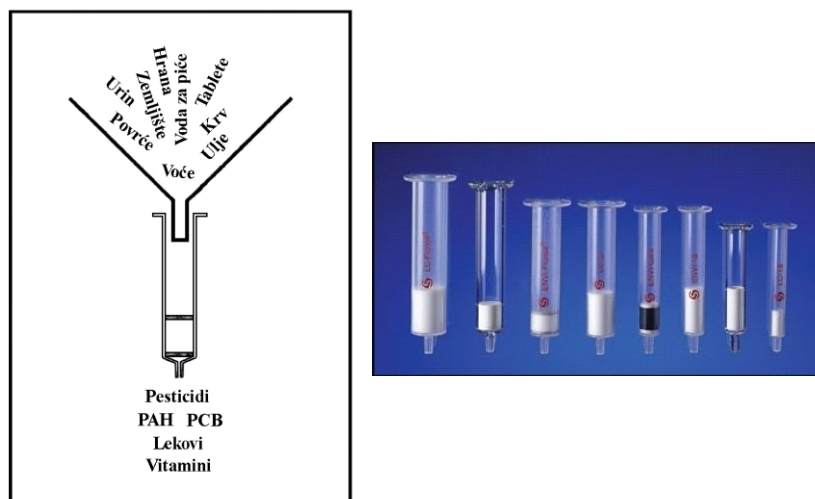
aceton/metanol (85:15, v/v) (Tse *et al.*, 2014).

Veoma važan parametar koji utiče na efikasnost ekstrakcije steroidnih jedinjenja je vreme ultrazvučne ekstrakcije. Skraćenje vremena sonikacije smanjuje i ukupno trajanje pripreme uzorka za analizu, ali često smanjuje i prinos analita. Prilikom određivanja steroidnih hormona i sterola, vreme sonikacije u jednom stupnju ekstrakcije iznosi od 3 min (Tse *et al.*, 2014) do 30 min (Saeed *et al.*, 2012). Zapremine ekstrakcionog sredstva variraju od 3 mL (Ternes *et al.*, 2002) do 30 mL (Isobe *et al.*, 2002; Saeed *et al.*, 2012) u jednom stupnju sonikacije. Pri ultrazvučnoj ekstrakciji steroidnih jedinjenja faktor predkoncentrisanja se može povećati povećanjem mase sedimenta za analizu. Međutim, veća masa uzorka dovodi do ekstrakcije veće količine nečistoća koje mogu uticati na rezultate analize. Masa uzorka sedimenta za ultrazvučnu ekstrakciju prilikom određivanja steroidnih jedinjenja varira od 1 g (Isobe *et al.*, 2006) do 20 g uzorka (Froehner *et al.*, 2009).

2.12. Prečišćavanje ekstrakta pripremljenih uzoraka sedimenata

Da bi se smanjio uticaj matrice, tj. uticaj sastojaka matrice uzorka i nečistoća na rezultate analize, neophodno je prečistiti ekstrakte uzoraka, naročito kompleksnih matrica kao što su sedimenti. Sastojci matrice koji se koekstrahuju sa analitima utiču na smanjenje, a u ređim slučajevima i povećanje jonizacije i intenziteta signala analita, što nepovoljno utiče na reproduktivnost i preciznost analize.

Prečišćavanje dobijenih ekstrakata se obično izvodi na kolonama (kertridžima) određene zapremine (1–60 mL) koje su napunjene adsorbensom (mase 0,1–10 g, veličine čestica oko 50 µm) (slika 2.7). Pakovanje kolone je fiksirano sa donje i gornje strane teflonskim ili polietilenskim fritama. Kao pakovanje kolone obično se koriste silikatni materijali sa polarnim i nepolarnim funkcionalnim grupama (Beck *et al.*, 2008; Hibberd *et al.*, 2009). Potrebno je da odabrani adsorbens efikasno adsorbuje nečistoće, ali ne i analite, dok odabrani eluent treba biti efikasniji u rastvaranju analita od nečistoća.



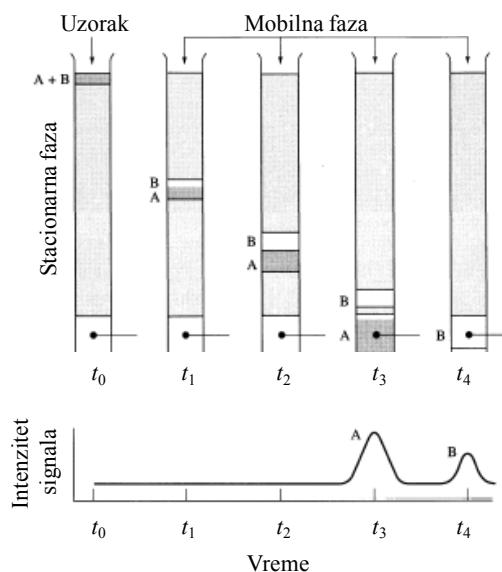
Slika 2.7. Kolone sa adsorbensom za prečišćavanje.

Prečišćavanje ekstrakata uzoraka sedimenata prilikom određivanja steroidnih jedinjenja najčešće se vrši na C_{18} kolonama koje sadrže silikatni materijal sa vezanim oktadecil-grupama (López de Alda *et al.*, 2002; Petrovic *et al.*, 2002a; Hájková *et al.*, 2007). Veoma često se za prečišćavanje koristi i čist silika-gel (Jeng i Han, 1994; Isobe *et al.*, 2002; Ternes *et al.*, 2002) ili njegova kombinacija sa anhidrovanim Na_2SO_4 (Liu *et al.*, 2004; Hibberd *et al.*, 2009; Biache i Philp, 2013). Kao adsorbensi se mogu koristiti i Al_2O_3 (Marvin *et al.*, 2001; Martins *et al.*, 2002, 2005), Florisil (po sastavu magnezijum-silikat, Arditsoglou i Voutsas, 2012), kao i kombinacija silika-gel/ Al_2O_3 /anhidrovani Na_2SO_4 (Grimalt *et al.*, 1990; Martins *et al.*, 2007, 2011; Froehner *et al.*, 2009; Richard *et al.*, 2014). Poslednjih godina, u pripremi uzoraka za analizu se sve više koriste polimerni adsorbensi. Ovi materijali su se pokazali kao izuzetno efikasni u pripremi tečnih uzoraka za analizu (npr. prirodnih i otpadnih voda), najčešće metodom ekstrakcije na čvrstoj fazi (eng. *solid-phase extraction*, SPE) (Al-Odaini *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2011). Pored ekstrakcije odabranih analita iz matrice, polimerni adsorbensi omogućavaju i istovremeno prečišćavanje dobijenog ekstrakta. Danas je primat u svetu preuzeo Oasis HLB kertridž (Waters, Milford, SAD) sa najčešće korišćenim polimernim pakovanjem za prečišćavanje ekstrakata sedimenata (Hájková *et al.*, 2007; Matějček *et al.*, 2007). HLB (eng. *hydrophilic-lipophilic balance*) je hidrofilno-lipofilni kopolimer efikasan kako u ekstrakciji analita različite polarnosti u širokom opsegu pH vrednosti, tako i u zadržavanju nečistoća. Pored HLB

kertridža, Oasis WAX (Waters, SAD) i Strata-X-AW (Phenomenex, Velika Britanija) kertridži, sa slabim anjonskim izmenjivačem i reverzno-faznim adsorbensom, pokazali su se kao veoma efikasni u prečišćavanju ekstrakata sedimenata (Labadie *et al.*, 2007; Matějčíček *et al.*, 2007). Važnu ulogu prilikom prečišćavanja ekstrakta pripremljenog uzorka sedimenta ima i eluent. Odabrani rastvarač treba da bude efikasan u eluiranju steroidnih jedinjenja sa kolone za prečišćavanje, ali ne i nečistoća. Kao eluent najčešće se koristi smeša dihlormetana i metanola (90:10, v/v, Grimalt *et al.*, 1990; Martins *et al.*, 2007, 2011; Froehner *et al.*, 2009; Richard *et al.*, 2014). Pored toga, koriste se i acetonitril, metanol, etil-acetat, aceton i heksan, kao i smeše ovih rastvarača u različitim odnosima (Isobe *et al.*, 2002; López de Alda *et al.*, 2002; Ternes *et al.*, 2002; Hájková *et al.*, 2007; Biache i Philp, 2013).

2.13. Tečna hromatografija visokih performansi

Hromatografija je fizička metoda razdvajanja supstanci zasnovana na njihovoj raspodeli između dve faze, od kojih je jedna pokretna (mobilna), a druga nepokretna (stacionarna). Mobilna faza može biti tečnost, gas ili superkritični fluid, dok stacionarna faza može biti čvrsta, tečna ili gel. Kod tečne hromatografije mobilna faza je tečna, a stacionarna faza je čvrsta ili tečna i predstavlja pakovanje hromatografske kolone. Usled različitih interakcija molekula analita sa mobilnom i stacionarnom fazom, različito je vreme prolaska analita od mesta unošenja uzorka do mesta detekcije. Molekuli koji formiraju jače veze sa stacionarnom nego sa mobilnom fazom sporije se eluiraju sa kolone i samim tim imaju duže vreme zadržavanja na koloni (retenciono vreme) (slika 2.8) (Ardrey, 2003).



Slika 2.8. Osnovni principi tečne hromatografije.

Prema principu zadržavanja analita na stacionarnoj fazi razlikuju se sledeći tipovi hromatografije (Rouessac i Rouessac, 2007):

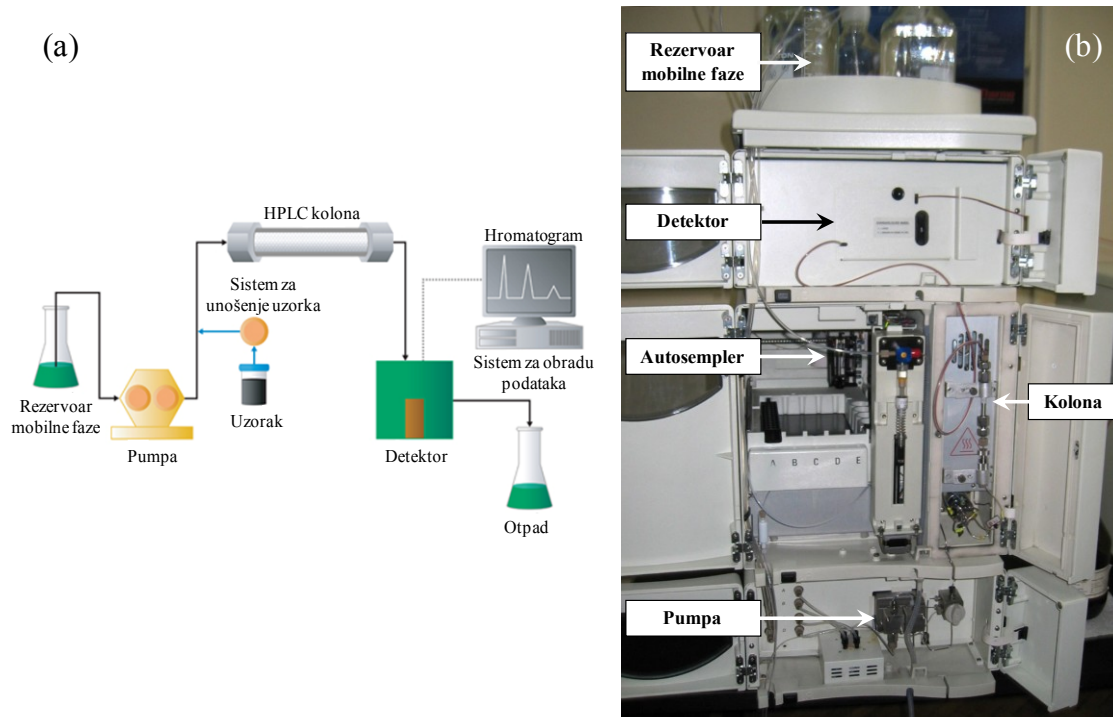
1. Adsorpciona – dolazi do adsorpcije analita na površini stacionarne faze, a razdvajanje se odvija na osnovu razlike u jačini adsorpcije komponenata smeše.
2. Podeona – u zavisnosti od polarnosti analita dolazi do njegove raspodele između stacionarne i mobilne faze različitih polarnosti. Postoje:
 - normalno-fazna hromatografija, kod koje se koristi polarna stacionarna faza i nepolarna mobilna faza, pa se polarne supstance duže zadržavaju na koloni i eluiraju sa većim retencionim vremenom;
 - reverzno-fazna hromatografija, kod koje se koristi nepolarna stacionarna faza i polarna mobilna faza, a retenciono vreme je duže za manje polarne supstance. Retenciono vreme se povećava dodatkom polarnih rastvarača u mobilnu fazu, a smanjuje se dodatkom hidrofobnih rastvarača. Najčešće korišćena stacionarna faza je silikatna, sa alkilnim grupama, kao što su $-C_{18}H_{37}$ ili $-C_8H_{17}$.
3. Jonoizmenjivačka – zasniva se na afinitetu jona analita prema suprotno naelektrisanim funkcionalnim grupama na površini stacionarne faze.

4. Gel propusna (ekskluziona) – zasniava se na razdvajanju komponenta smeše na osnovu razlike u veličini molekula.

Tečna hromatografija visokih performansi koristi se, pre svega, za analizu neisparljivih i termički nestabilnih polarnih analita. Kod ove metode mobilna faza je pod visokim pritiskom (do oko 400 bar ili $4 \cdot 10^7$ Pa), da bi se ostvario neprekidan protok mobilne faze i reproduktivna hromatografija. Hromatografska kolona je izrađena od nerđajućeg čelika i ispunjena finim, hemijski modifikovanim silikatnim česticama. Čestice su veoma malih dimenzija (3–10 μm), obezbeđuju veliku kontaktnu površinu, a samim tim i veliku moć razdvajanja (visoku rezoluciju). Mobilnu fazu čine različite kombinacije rastvarača, a efikasnost hromatografskog razdvajanja zavisi od interakcija analita sa mobilnom i stacionarnom fazom (Rouessac i Rouessac, 2007). Osnovni delovi tečnog hromatografa visokih performansi su (slika 2.9):

- rezervoar mobilne faze – staklene boce sa rastvaračima
- pumpa – obezbeđuje visok pritisak i stabilan protok mobilne faze
- sistem za unošenje uzorka – čine ga injektor i/ili autosempler
- kolona – dužine 3–25 cm, unutrašnjeg prečnika 3–5 mm, veličine čestica 3–10 μm
- detektor – ultraljubičasti, elektrohemijski, fluorescentni, maseni itd.
- sistem za obradu podataka

Hromatogram predstavlja grafički prikaz odgovora detektora u funkciji vremena. Korišćenjem hromatograma može se vršiti kvalitativna analiza (na osnovu retencionog vremena koje zavisi od hemijske prirode analita) i kvantitativna analiza (na osnovu površine hromatografskog pika koja je srazmerna koncentraciji analita) (Rouessac i Rouessac, 2007).



Slika 2.9. Tečni hromatograf visokih performansi: (a) osnovni delovi;
(b) Surveyor HPLC sistem (Thermo Scientific, SAD).

Efikasnost hromatografskog razdvajanja analita zavisi od izbora stacionarne i mobilne faze. Optimalnim hromatografskim razdvajanjem smatra se ono kod kojeg su komponente smeše jasno razdvojene tokom što kraćeg vremena. Stacionarna faza mora da poseduje sledeća svojstva (Ardrey, 2003):

- nerastvorljivost u mobilnoj fazi,
- stabilnost na promene pritiska, temperature i pH vrednosti,
- što uniformnija raspodela čestica (odstupanje do 10% od srednje vrednosti).

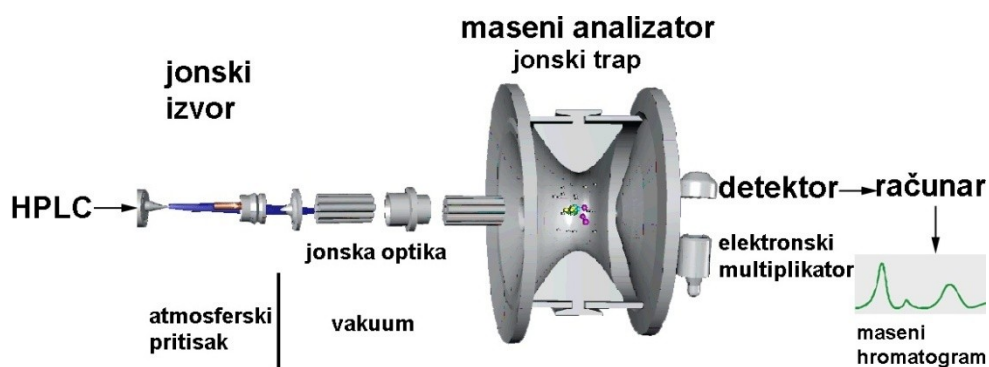
Promena sastava mobilne faze značajno utiče na promenu retencionog vremena analita i efikasnost hromatografskog razdvajanja, a najveći uticaj imaju:

- vrsta organskog rastvarača,
- udeo organskog rastvarača u mobilnoj fazi,
- pH vrednost mobilne faze.

U reverzno-faznoj hromatografiji mobilna faza se najčešće sastoji od vode i organskog rastvarača (npr. metanol, acetonitril). Protok mobilne faze može biti izokratski ili gradijentan. Pri izokratskom protoku, kroz hromatografsku kolonu protiče mobilna faza konstantnog sastava. S obzirom na to da su svojstva analita često veoma različita, teško je izabrati mobilnu fazu koja bi, pri izokratskom protoku, bila optimalna za razdvajanje svih komponenata smeše. Da bi se postiglo optimalno hromatografsko razdvajanje analita najčešće se primenjuje gradijentni protok mobilne faze, gde se sastav mobilne faze postepeno menja tokom analize (Ardrey, 2003).

2.14. Masena spektrometrija

Masena spektrometrija je tehnika koja se zasniva na jonizaciji ispitivanog uzorka i razdvajanju dobijenih jona prema odnosu mase i naelektrisanja (m/z). Kao rezultat se dobija grafik zavisnosti relativne količine jona od m/z vrednosti, odnosno maseni spektar. Maseni spektrometar omogućava identifikaciju jedinjenja na osnovu informacija o strukturi ispitivanog molekula i molekulskoj masi analita (Ardrey, 2003). Prednosti masenog spektrometra u odnosu na druge detektore su izuzetna osetljivost i selektivnost. Osnovi delovi masenog spektrometra su: jonski izvor, jonska optika, maseni analizator, vakuum sistem, detektor i sistem za obradu podataka (slika 2.10).

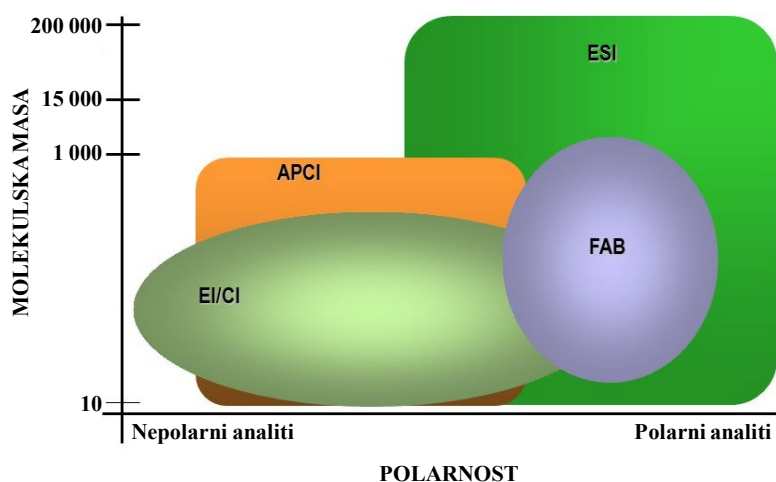


Slika 2.10. Prikaz masenog spektrometra.

U jonskom izvoru, jonizacija molekula analita se može izvesti na više načina (Ardrey, 2003):

- jonizacija elektronskim udarom (eng. *electron impact ionization*, EI)
- termosprej jonizacija (eng. *thermospray ionization*, TSP)
- hemijska jonizacija (eng. *chemical ionization*, CI)
- jonizacija bombardovanjem brzim atomima (eng. *fast-atom bombardment*, FAB)
- hemijska jonizacija na atmosferskom pritisku (eng. *atmospheric pressure chemical ionization*, APCI)
- elektrosprej jonizacija (eng. *electrospray ionization*, ESI)

ESI tehnika se pretežno koristi za analizu polarnih i srednje polarnih jedinjenja, dok se APCI koristi za analizu jedinjenja srednje i male polarnosti (slika 2.11). Joni formirani u jonskom izvoru se putem jonske optike dalje usmeravaju i sprovode do masenog analizatora. Maseni analizator omogućava razdvajanje jona na osnovu m/z vrednosti. Postoje različiti tipovi masenih analizatora, a najčešće se koriste: kvadrupolni analizator, jonski trap, analizator vremena preleta jona (eng. *time of flight*, TOF), orbitrap, kao i njihove kombinacije. Važan deo masenog spektrometra je sistem za održavanje niskog pritiska (10^{-2} – 10^{-5} Pa) tj. vakuum sistem. Maseni analizator i detektor se nalaze pod visokim vakuumom koji obezbeđuje minimalnu interakciju jona tj. sprečava da dođe do sudara, neutralizacije, rasejanja ili fragmentacije jona.

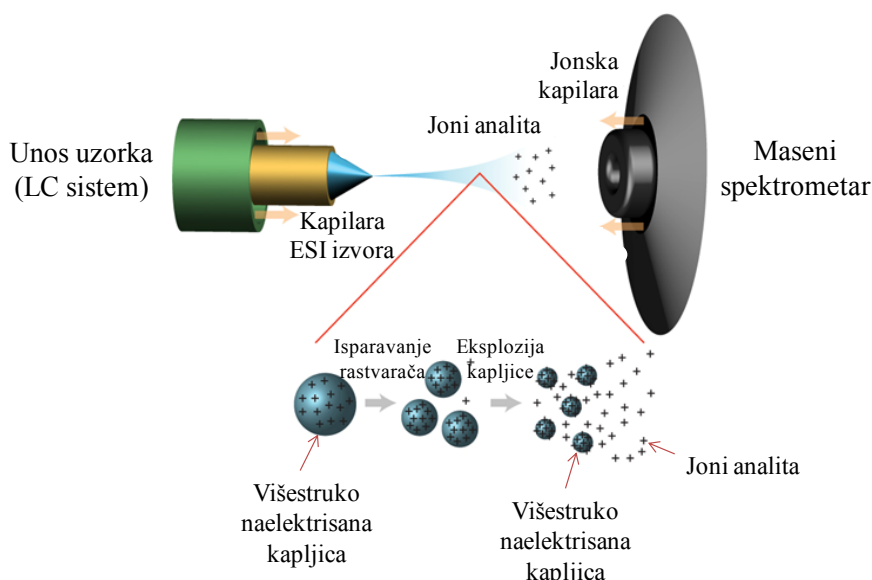


Slika 2.11. Kriterijumi za izbor jonskog izvora u zavisnosti od molekulske mase i polarnosti ispitivane supstance.

2.14.1. Tehnike jonizacije

Prilikom analize uzoraka iz životne sredine za jonizaciju steroidnih hormona koriste se elektrosprej jonizacija (Matějčíček *et al.*, 2007; Al-Odaini *et al.*, 2010; Vega-Morales *et al.*, 2010; Gorga *et al.*, 2014) i hemijska jonizacija na atmosferskom pritisku (Shafir i Avisar, 2012; Wang i Gardinali, 2012). Za razliku od hormona, efikasna jonizacija humanih/životinjskih sterola (Wang i Gardinali, 2012; Bataglion *et al.*, 2015) i biljnih sterola (Rozenberg *et al.*, 2003; Cañabate-Díaz *et al.*, 2007; Segura Carretero *et al.*, 2008; Zarrouk *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009; Mo *et al.*, 2013) se najčešće može postići samo pomoću APCI tehnike.

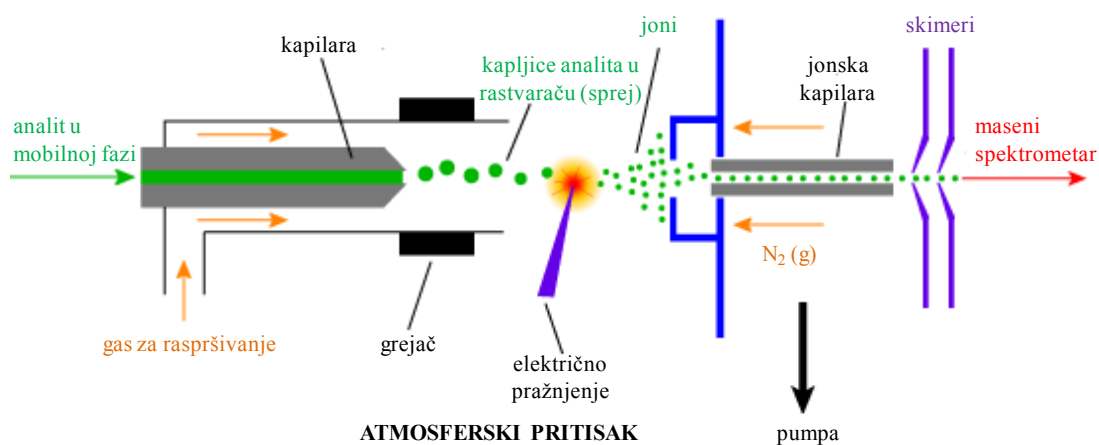
Elektrosprej jonizacija pripada tzv. „mekim“ jonizacionim tehnikama. Analit koji je rastvoren u polarnom, isparljivom rastvaraču se raspršuje u struji azota kroz kapilaru čiji se vrh nalazi pod visokim naponom (3–5 kV) pri čemu nastaje aerosol sastavljen od višestruko naelektrisanih kapljica. Usled isparavanja rastvarača, kapljice se smanjuju i raste njihov površinski napon. Kada površinski napon ne može više da izdrži nagomilano naelektrisanje dolazi do eksplozije kapljica. Ovaj proces se ponavlja i kao rezultat se dobijaju joni analita oslobođeni od rastvarača koji kroz jonsku kapilaru stižu do masenog analizatora (slika 2.12) (Ardrey, 2003; Kostianen i Kauppila, 2009).



Slika 2.12. Šematski prikaz elektrosprej jonizacije.

Proces jonizacije ESI tehnikom je veoma kompleksan, pri čemu efikasnost jonizacije zavisi od svojstava odabranih rastvarača i aditiva, poput isparljivosti, provodljivosti, dielektrične konstante, koncentracije elektrolita, pH vrednosti itd. Na proces jonizacije utiču i fizičko-hemijska svojstva analita, uključujući pK_a vrednost, hidrofobnost i dr., kao i parametri samog procesa (protok mobilne faze, temperatura i napon) (Kostiainen i Kauppila, 2009).

APCI tehnika je prvi put kombinovana sa masenom spektrometrijom još sedamdesetih godina XX veka. Ova metoda je analogna klasičnoj metodi hemijske jonizacije, s tim što se kod APCI proces jonizacije odigrava na atmosferskom pritisku, a kod hemijske jonizacije u vakuumu (Kostiainen i Kauppila, 2009). Razlikuje se od drugih tehnika jonizacije po načinu formiranja kapljica i mehanizmu daljeg nastanka jona. Rastvor analita se uvodi u pneumatski raspršivač gde se pomoću gasa za raspršivanje formiraju kapljice (slika 2.13). Nastali sprej zatim prolazi kroz zagrejanu kvarcnu cev (200–600 °C) gde se desolvatizuje i uzorak prevodi u gasovito stanje. Uz pomoć električnog pražnjenja (eng. *corona discharge*) dolazi do jonizacije molekula rastvarača, a daljim sudarima i nizom hemijskih reakcija sa molekulima analita dolazi do formiranja jona analita. Nastali joni zatim prolaze kroz jonsku kapilaru do masenog analizatora (Ardrey, 2003; Kostiainen i Kauppila, 2009).



Slika 2.13. Prikaz hemijske jonizacije na atmosferskom pritisku.

Kod hemijske jonizacije na atmosferskom pritisku veliki uticaj na proces jonizacije ima sastav mobilne faze. Male promene u sastavu mobilne faze dovode do značajne promene efikasnosti jonizacije (Kostiainen i Kauppila, 2009). Mobilna faza u

reverzno-faznoj LC-APCI-MS analizi se najčešće sastoji od smeše metanola ili acetonitrila sa vodom. Međutim, istraživanja su pokazala da se značajno veći signal analita dobija ukoliko se umesto acetonitrila koristi metanol (Ma i Kim, 1997). Takođe, dodatak aditiva mobilnoj fazi, kao što su organske soli (npr. amonijum-acetat ili amonijum-formijat) i kiseline (mravlja i sirćetna kiselina), može imati značajan uticaj na formiranje jona analita u procesu jonizacije (Kostiainen i Kauppila, 2009).

Osnovne karakteristike i razlike između elektrosprej jonizacije i hemijske jonizacije na atmosferskom pritisku su prikazane u tabeli 2.7 (Ardrey, 2003).

Tabela 2.7. Uporedne karakteristike različitih tehnika jonizacije u masenoj spektrometriji.

Karakteristike	ESI	APCI
Tip jonizacije	Jonizacija pretežno u rastvoru	Jonizacija u gasovitoj fazi
Tip jedinjenja	Termolabilna jedinjenja Polarna i srednje polarna jedinjenja Jedinjenja veće molekulske mase	Isparljiva i termostabilna jedinjenja Slabo polarna i nepolarna jedinjenja Jedinjenja manje molekulske mase
Protok mobilne faze	$3 \mu\text{L min}^{-1}$ – 1 mL min^{-1} Optimalan protok: $200 \mu\text{L min}^{-1}$ Veći protok zahteva veći protok azota i višu temperaturu kapilare; osetljivija na sastojke matrice uzorka i mobilnu fazu od APCI	$200 \mu\text{L min}^{-1}$ – 2 mL min^{-1} Optimalan protok: $500 \mu\text{L min}^{-1}$ Veći protok zahteva veći protok azota i višu temperaturu u isparivaču

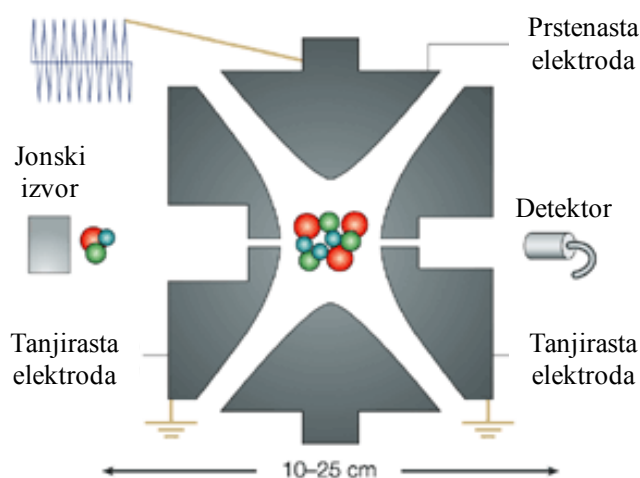
2.14.2. Jonski trap

Za određivanje tragova steroidnih hormona i sterola u uzorcima iz životne sredine najčešće se koriste trostruki kvadrupol (Al-Odaini *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2011; Wang i Gardinali, 2012; Gorga *et al.*, 2014; Bataglione *et al.*, 2015) i jonski trap (Matějčíček *et al.*, 2007; Huerta-Fontela *et al.*, 2011; Shafrir i Avisar, 2012). Jonski trap je uređaj koji koristi oscilujuće električno polje za čuvanje i analiziranje jona. Radiofrekventno polje skladišti jone u dve ili tri dimenzije.

Stoga se jonski trapovi mogu klasifikovati kao (de Hoffmann i Stroobant, 2007):

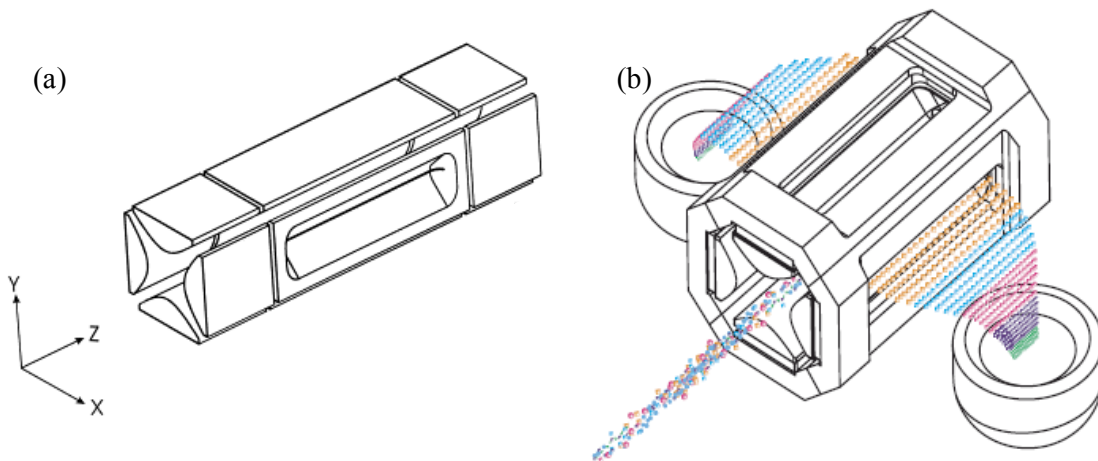
- trodimenzionalni (3D)
- dvodimenzionalni (2D)

Istorijski gledano, prvi korišćeni trapovi su bili 3D, tzv. kvadrupolni jonski trapovi (QITs, eng. *quadrupole ion traps*). Kvadrupolni jonski trap je zapravo Polov jonski trap, nazvan prema fizičaru Volfgangu Polu (de Hoffmann i Stroobant, 2007). **Polov jonski trap** se sastoji od jedne prstenaste i dve tanjiraste elektrode (slika 2.14) koje zatvaraju prsten sa obe strane. Postoje jonski trapovi sa eksternom i internom jonizacijom. Kod eksterne jonizacije, joni nastali u jonskom izvoru se unose u trap, dok se kod interne jonizacije molekuli uzorka ubacuju u unutrašnju šupljinu prstena gde se jonizuju. U LC-MS analizi se koriste jonski trapovi sa eksternom jonizacijom. Unutar trapa, joni se pod uticajem radiofrekventnog polja prstenaste elektrode kreću po stabilnim putanjama i mogu da se čuvaju u njemu od nekoliko milisekundi do nekoliko sati. Da bi se postigla maksimalna efikasnost joni treba da budu fokusirani oko centra trapa, gde je polje najbliže idealnom, što se postiže uvođenjem helijuma koji pri sudaru sa jonima smiruje njihove oscilacije i na taj način ih stabilizuje. Povećanjem radiofrekventnog napona joni analita se iz unutrašnjosti trapa šalju ka detektoru po redosledu koji odgovara odnosu njihove mase i naelektrisanja (m/z), pri čemu se dobija maseni spektar (Ardrey, 2003).



Slika 2.14. MS sistem sa Polovim jonskim trapom.

Linearni jonski trap se sastoji od dva para elektroda na čijim se krajevima nalaze sočiva koja usmeravaju jone ka unutrašnjosti trapa. Četiri paralelne elektrode su podeljene u tri segmenta, a na centralnim delovima dve naspramno postavljene elektrode se nalaze prorezi za izlaz jona iz trapa (slika 2.15a). Joni formirani u jonskom izvoru pod sniženim pritiskom prolaze kroz zagrejanu jonsku kapilaru. Pomoću jonske optike, joni se usmeravaju u linearni jonski trap. Prilikom uvođenja jona u trap, svaki segment elektroda se nalazi na različitom naponu. Joni se zadržavaju u trapu promenom napona prvog i trećeg segmenta, dok napon srednjeg segmenta ostaje nepromenjen. Da bi se dobio maseni spektar jona zadržanih u trapu napon se uvećava i joni se izbacuju iz trapa kroz proreze na elektrodama ka detektoru, prema odnosu mase i naelektrisanja (slika 2.15b). U trap se uvodi inertan gas, kao što je helijum, da bi se smanjila kinetička energija jona i obezbedile stabilne putanje u trapu (de Hoffmann i Stroobant, 2007).



Slika 2.15. Linearni jonski trap: (a) raspored elektroda (de Hoffmann i Stroobant, 2007); (b) prikaz načina rada (unos jona u trap i izbacivanje prema m/z odnosu).

Jedna od bitnih prednosti linearnog jonskog trapa u odnosu na Polov trap je 10 puta veći kapacitet skladištenja jona. Čak se i sa 20 000 uskladištenih jona u linearnom jonskom trapu može dobiti dobar maseni spektar, bez efekta razelektrisanja jona, dok se kod Polovog jonskog trapa ovaj efekat javlja već sa 500 jona. Još jedna prednost 2D linearnog jonskog trapa je veća efikasnost skladištenja jona. Kada se joni iz spoljašnjeg jonskog izvora unose u 2D trap, efikasnost skladištenja iznosi preko 50%, dok za 3D trap iznosi oko 5%. Ove prednosti linearnog jonskog trapa doprinose

povećanju analitičkog opsega i osetljivosti masenog analizatora u odnosu na Polov jonski trap (de Hoffmann i Stroobant, 2007).

2.14.3. Tandem masena spektrometrija

Tandem masena spektrometrija (MS/MS) je metoda koja se zasniva na izolovanju prekursor jona analita (prvi stupanj MS analize) i daljoj fragmentaciji i analizi nastalih fragmentnih jona (drugi stupanj MS analize). Ukoliko se broj koraka u MS analizi poveća, tj. uradi dalja fragmentacija nastalih jona i njihova analiza, onda se takva analiza obeležava sa MSⁿ.

Tandem masena spektrometrija se može izvoditi tandemski u prostoru i tandemski u vremenu. Povezivanjem tri prostorno odvojena masena spektrometra, kod kojih se u prvom vrši izolovanje prekursor jona, u drugom njihova fragmentacija, a u trećem analiza nastalih fragmentnih jona, postiže se tandem masena analiza u prostoru. Najvažniji maseni spektrometar kod kojeg se masena analiza izvodi tandemski u prostoru je trostruki kvadrupol (eng. *triple quadrupole*, QQQ). Sastoji od tri serijski povezana kvadrupolna analizatora u kojima se istovremeno izvodi masena analiza. Kada se masena spektrometrija izvodi tandemski u vremenu, masena analiza se odvija u istom prostoru, ali u različito vreme, kao kod jonskog trapa. Prvo se jon analita izoluje u jonskom trapu podešavanjem radiofrekventnog napona, a zatim se dalje razlaže na manje, fragmentne jone. Na ovaj način je omogućena identifikaciju analita, ne samo prema m/z odnosu, već i na osnovu karakterističnih fragmenata (Ardrey, 2003; Niessen, 2006).

Izvođenje tandem masene analize u trostrukom kvadrupolu se razlikuje od analize u jonskom trapu i po tome što se za fragmentaciju prekursor jona koriste argon ili azot, dok se u jonskom trapu koristi helijum. U jonskom trapu se može izvesti veći broj sudara sa molekulima gasa nego kod trostrukog kvadrupola, zbog dužeg zadržavanja jona u trapu. Takođe, stepen konverzije prekursor jona u produkt jone je mnogo viši kod jonskog trapa u odnosu na QQQ (Niessen, 2006).

2.15. Tečna hromatografija u sprezi sa masenom spektrometrijom

Glavni nedostatak tečno-hromatografske analize višekomponentne smeše je nemogućnost nedvosmislene identifikacije svih komponenata, čak i u slučaju kada su supstance potpuno hromatografski razdvojene. Identifikacija se zasniva na poređenju retencionih karakteristika (najčešće retencionih vremena) nepoznatih sastojaka i standardnih supstanci pod istim eksperimentalnim uslovima. Dodatni problem je taj što veliki broj supstanci pokazuje slično ponašanje u hromatografskom sistemu, pa se i pored optimizacije hromatografskih uslova ne može postići potpuno razdvajanje svih ispitivanih supstanci (Ardrey, 2003).

S druge strane, maseni spektrometar omogućava pouzdanu identifikaciju jedinjenja na osnovu informacija o strukturi i molekulskoj masi ispitivanog analita. Naime, maseni spektar svake supstance je dovoljno specifičan da obezbedi njenu nedvosmislenu identifikaciju. Kombinovanjem tečne hromatografije sa tandem masenom spektrometrijom (LC-MS/MS) dobija se visoko selektivna i osetljiva tehnika za pouzdano razlikovanje analita, čak i kada nisu potpuno hromatografski razdvojeni (Ardrey, 2003).

Istraživanja o mogućnostima povezivanja tečne hromatografije sa masenom spektrometrijom su započeta još u ranim 70-im godinama. Najznačajniji problem bio je nekompatibilnost visokog pritiska mobilne faze u LC sistemu sa vakuumom u masenom spektrometru. Problem je bio i primena neisparljivih aditiva u mobilnoj fazi, kao i potencijalna degradacija prilikom jonizacije termolabilnih i neisparljivih supstanci na povišenoj temperaturi. Svi ovi problemi otklonjeni su uvođenjem tehnika jonizacije koje se odvijaju na atmosferskom pritisku, kao što su ESI i APCI (Niessen, 2006).

Današnje oblasti primene LC-MS metode su raznovrsne i obuhvataju kvalitativno i kvantitativno određivanje supstanci velikog opsega molekulskih masa, uključujući sintetske polimere, biopolimere, zagađujuće materije životne sredine, farmaceutska jedinjenja (lekove i njihove metabolite) i razne prirodne proizvode.

2.16. LC-MS/MS analiza odabranih steroidnih jedinjenja

LC-MS/MS metoda pruža odličnu osetljivost i selektivnost u analizi tragova odabranih steroidnih hormona i sterola u uzorcima iz životne sredine. Hromatografsko razdvajanje steroidnih jedinjenja najčešće se vrši na C₁₈ kolonama (Petrovic *et al.*, 2002a; Mo *et al.*, 2013; Bataglion *et al.*, 2015), a kao mobilna faza obično se koristi smeša vode i metanola ili acetonitrila, sa gradijentom eluiranja od 10% do 100% organskog rastvarača (Matějček *et al.*, 2007; Vega-Morales *et al.*, 2010; Wang i Gardinali, 2012). Kako bi se poboljšala osetljivost MS detekcije, često se u mobilnu fazu dodaje 0,1% sirćetne kiseline (Vega-Morales *et al.*, 2010), 0,1% mravlje kiseline (Wang i Gardinali, 2012), 10 mM amonijum-acetat (Al-Odaini *et al.*, 2010) ili postkolumno amonijak (Baronti *et al.*, 2000).

Da bi se poboljšalo hromatografsko razdvajanje steroidnih hormona, kao aditivi u mobilnoj fazi koriste se reagensi koji pospešuju stvaranje jonskih parova (eng. *ion-pairing agents*). Kada se detektuju pozitivni joni analita, često se kao aditiv koristi heptafluorobuterna kiselina (HFBA) u koncentraciji od 0,1%, za poboljšanje oblika i simetrije pikova analita i povećanje retencionog vremena veoma polarnih supstanci. Prilikom detekcije negativnih jona analita, kao reagensi za stvaranje jonskih parova koriste se bazna jedinjenja, poput amonijaka i tributilamina. Dodaju se mobilnoj fazi i zbog poboljšanja deprotonovanja slabo kiselih analita, kao što je 17 α -etinilestradiol (Al-Odaini *et al.*, 2010).

Kao što je prethodno navedeno, humani/životinjski steroli se veoma retko analiziraju LC-MS/MS metodom. Kao mobilna faza koristi se kombinacija metanola i vode, a udeo metanola u mobilnoj fazi varira od 50% do 100% (Wang i Gardinali, 2012; Bataglion *et al.*, 2015). Da bi se pospešila jonizacija, mobilna faza često sadrži i 0,01% mravlje kiseline (Wang i Gardinali, 2012). Hromatografsko razdvajanje biljnih sterola, u najvećem broju slučajeva, izvodi se sa smešom acetonitrila i vode, uz 0,01% sirćetne kiseline (Cañabate-Díaz *et al.*, 2007; Segura Carretero *et al.*, 2008; Zarrouk *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009). Pored toga, primenjuju se i smeše acetonitrila i metanola (99:1, v/v, Mo *et al.*, 2013), kao i metanola i vode sa 1% acetonitrila (Rozenberg *et al.*, 2003).

Steroidni hormoni se u procesu MS analize mogu jonizovati putem ESI i APCI tehnike. Estrogeni hormoni u procesu elektrosprej jonizacije često formiraju negativne

jone, pri čemu su prekursor joni deprotonovani molekuli analita $[M-H]^-$ (Matějček *et al.*, 2007; Vega-Morales *et al.*, 2010; Wang i Gardinali, 2012). 17α - i 17β -Estradiol jonizacijom daju isti prekursor jon (m/z 271) koji daljom fragmentacijom daje jone m/z 183 i m/z 145 (Matějček *et al.*, 2007). S obzirom na to da ova dva izomera imaju identičan prekursor jon, kao i reakcije kvantifikacije i potvrde, neophodno je njihovo potpuno hromatografsko razdvajanje koje omogućava razlikovanje ova dva jedinjenja. Najintenzivniji joni gestagenih hormona, noretindrona i levonorgestrela, u procesu elektrosprej jonizacije detektuju se kao pozitivni joni, tj. protonovani molekuli $[M+H]^+$ (Al-Odaini *et al.*, 2010). Za razliku od ESI, u procesu APCI jonizacije svi steroidni hormoni se detektuju kao pozitivni joni. Estriol, 17α -etinilestradiol, 17β -estradiol i mestranol kao dominantne prekursor jone formiraju protonovane dehidratisane molekule $[M-H_2O+H]^+$, dok se ekvilin i estron detektuju kao protonovani molekuli $[M+H]^+$ (Wang i Gardinali, 2012).

Zbog izrazite lipofilnosti i nedostatka polarnih funkcionalnih grupa, humani/životinjski i biljni steroli se ne mogu efikasno jonizovati ESI tehnikom (Wang i Gardinali, 2012; Mo *et al.*, 2013). APCI tehnikom formiraju se pozitivni joni analita, pri čemu se kao dominantni u MS spektru javljaju protonovani dehidratisani molekuli $[M-H_2O+H]^+$. Jonizacijom stereoizomera koprostanola, epikoprostanola i holestanola formiraju se identični prekursor i fragmentni joni, što otežava njihovu maseno-spektrometrijsku detekciju. Unapređena tehnika tačne hromatografije, pod nazivom tečna hromatografija ultra visokih performansi (UHPLC), omogućava uže pikove analita (oko 5–10 μ s širine) i time potpuno razdvajanje ovih stereoizomera u veoma kratkom vremenu (Bataglion *et al.*, 2015). U procesu fragmentacije kampesterola, β -sitosterola i stigmasterola formira se isti produkt jon m/z 81 (Bataglion *et al.*, 2015). Međutim, ovaj fragmentni jon se ne može detektovati pomoću jonskog trapa. Naime, najmanja masa fragmentnog jona koja se može detektovati pri radu sa jonskim trapom definisana je kao trećina mase prekursor jona koji se fragmentiše. Grupa fitosterola (stigmasterol, β -sitosterol i sitostanol) se može analizirati i u obliku dehidratisanih molekula analita $[M-H_2O]^+$ (Cañabate-Díaz *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2009).

2.17. Uticaj matrice

Veliki problem u LC-MS analizi steroidnih jedinjenja može predstavljati uticaj matrice uzorka (eng. *matrix effect*). Uticaj matrice predstavlja supresiju ili pojačanje signala analita usled prisustva komponenata iz matrice uzorka i može dovesti do lažno pozitivnih ili negativnih rezultata ili netačne kvantifikacije. Uticaj matrice je posebno izražen kod ESI tehnike jonizacije (Al-Odaini *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2011), dok je APCI tehnika manje osetljiva na prisustvo komponenata matrice u jonskom izvoru. Tačan mehanizam pojačanja/supresije signala analita još uvek nije u potpunosti poznat, ali se pretpostavlja da komponente matrice uzorka utiču na efikasnost procesa jonizacije. U literaturi postoji nekoliko pristupa za smanjenje uticaja matrice, a jedan od najefikasnijih je pažljiv izbor odgovarajuće kalibracione tehnike. Najčešće korišćene metode kalibracije su (Gomes *et al.*, 2004):

- metoda internog standarda
- eksterna kalibracija sa standardima analita koji odgovaraju matrici uzorka (eng. *matrix-matched standards*)
- metoda standardnog dodatka

Metoda internog standarda je često korišćena u analizi steroidnih jedinjenja u različitim matricama (Fattore *et al.*, 1996; Isobe *et al.*, 2002; Matějček *et al.*, 2007; Al-Odaini *et al.*, 2010; Bataglioni *et al.*, 2015). Zasniva se na primeni izotopski obeleženih standarda analita. Ova metoda je veoma pouzdana, ali je prilikom simultanog određivanja većeg broja analita potrebno koristiti i veliki broj odgovarajućih internih standarda, koji nisu uvek dostupni ili su veoma skupi. Metoda kalibracije sa standardima analita u matrici uzorka se takođe koristi u analizi steroida u uzorcima iz životne sredine (Marvin *et al.*, 2001; López de Alda *et al.*, 2002; Vega-Morales *et al.*, 2010). Međutim, često je problem pronaći odgovarajuću matricu uzorka koja ne sadrži odabrane analite. Metoda standardnog dodatka je veoma efikasna u eliminaciji uticaja matrice. Međutim, njeno izvođenje zahteva puno vremena jer se za svaki uzorak priprema posebna kalibraciona kriva. Kako bi se smanjio uticaj matrice, ometajuće komponente se mogu ukloniti prečišćavanjem ekstrakta ili dodatkom aditiva mobilnoj fazi kako bi se pospešio proces jonizacije (Gomes *et al.*, 2004).

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Rastvori odabranih steroidnih jedinjenja i reagensi

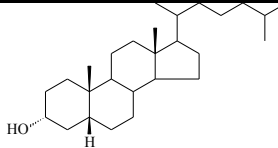
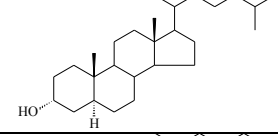
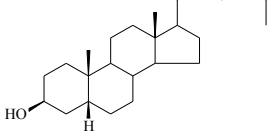
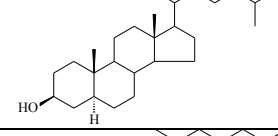
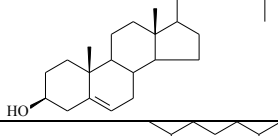
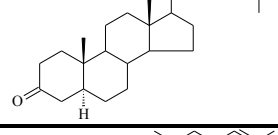
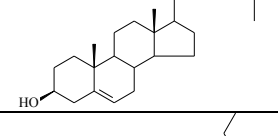
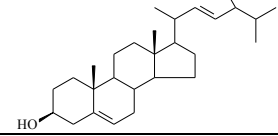
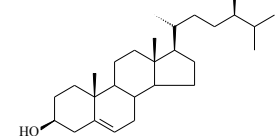
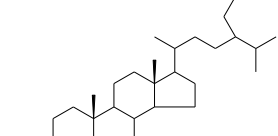
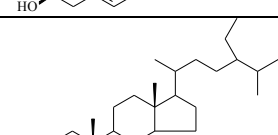
Hemijske strukture, hemijske formule i relativne molekulske mase odabranih steroidnih hormona, humanih/životinjskih i biljnih sterola prikazane su u tabeli 3.1.

Tabela 3.1. Hemijske strukture, hemijske formule i relativne molekulske mase odabranih steroidnih jedinjenja.

Steroid	Hemijska struktura	Hemijska formula	M_r
Estriol		$C_{18}H_{24}O_3$	288
Estron		$C_{18}H_{22}O_2$	270
Ekvilin		$C_{18}H_{20}O_2$	268
Noretindron		$C_{20}H_{26}O_2$	298
17 α -Etinilestradiol		$C_{20}H_{24}O_2$	296
17 β -Estradiol		$C_{18}H_{24}O_2$	272
17 α -Estradiol		$C_{18}H_{24}O_2$	272
Levonorgestrel		$C_{21}H_{28}O_2$	312
Mestranol		$C_{21}H_{26}O_2$	310

HORMONI

Tabela 3.1. (nastavak)

	Steroid	Hemijska struktura	Hemijska formula	M_r
HUMANI/ŽIVOTINJSKI STEROLI	Epikoprostanol		$C_{27}H_{48}O$	388
	Epiholestanol		$C_{27}H_{48}O$	388
	Koprostanol		$C_{27}H_{48}O$	388
	Holestanol		$C_{27}H_{48}O$	388
	Holesterol		$C_{27}H_{46}O$	386
	Holestanon		$C_{27}H_{46}O$	386
BILJNI STEROLI	Dezmosterol		$C_{27}H_{44}O$	384
	Stigmasterol		$C_{29}H_{48}O$	412
	Kampesterol		$C_{28}H_{48}O$	400
	β -Sitosterol		$C_{29}H_{50}O$	414
	Sitostanol		$C_{29}H_{52}O$	416

Za izvođenje eksperimenata korišćeni su analitički standardi steroidnih hormona i sterola visoke čistoće (> 99%, Steraloids Inc., Njuport, SAD). Standardni rastvor svakog analita pripremljen je u metanolu pri koncentraciji $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Mešanjem određenih zapremina pojedinačnih standardnih rastvora i razblaživanjem metanolom, pripremljen je rastvor svih steroida koncentracije $5 \mu\text{g mL}^{-1}$, a zatim 1 i $2 \mu\text{g mL}^{-1}$. Svi rastvori su čuvani na $-4 \text{ }^\circ\text{C}$.

Svi korišćeni rastvarači bili su HPLC čistoće, od proizvođača J.T. Baker (Deventer, Holandija) ili Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemačka). Anhidrovani Na_2SO_4 bio je analitičke čistoće, proizvođača Sigma-Aldrich. Korišćen je silika-gel (Promochem, LGC Standards GmbH, Nemačka) veličine čestica $0,063\text{--}0,2 \text{ mm}$. Aktiviranje silika-gela i Na_2SO_4 je vršeno žarenjem na $450 \text{ }^\circ\text{C}$ u trajanju od 6 h. Dejonizovana voda je dobijena propuštanjem vode kroz GenPure sistem (TKA, Niederelbert, Nemačka) za dobijanje vode HPLC čistoće.

3.2. Snimanje masenih spektara analita

Maseni spektri analita dobijeni su korišćenjem LCQ Advantage i LTQ XL (Thermo Scientific, Waltham, SAD) jonskih trapova, kao masenih spektrometara. Kao jonizacione tehnike testirane su hemijska jonizacija na atmosferskom pritisku (APCI) i elektrosprej jonizacija (ESI). Maseni spektri su snimljeni pri koncentraciji od $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, unošenjem standardnog rastvora svakog analita direktno u maseni spektrometar. Za svaki analit su snimljeni maseni spektri u opsegu m/z $50\text{--}1000$. Utvrđeno je da ESI tehnika nije efikasna u jonizaciji svih steroidnih hormona, kao ni sterola. Zbog toga je odabrana metoda APCI, kao efikasna u jonizaciji svih odabranih analita. Za detektovanje svakog analita optimizovani su parametri jonskog izvora: temperatura kapilare ($200 \text{ }^\circ\text{C}$) i temperatura isparivača ($400 \text{ }^\circ\text{C}$).

U MS spektru svakog analita odabran je najintenzivniji jon kao prekursor, a zatim je izvršena optimizacija kolizione energije, tj. energije sudara sa atomima helijuma u jonskom trapu, za dobijanje najintenzivnijeg i najstabilnijeg fragmentnog jona. Daljim MS^n stupnjevima analize, uz optimizaciju kolizione energije, dobijeni su stabilni i intenzivni fragmentni joni. Obrada rezultata izvršena je pomoću softverskih paketa Xcalibur v. 1.3 i 2.2 (Thermo Scientific, SAD).

3.3. Optimizacija hromatografskog razdvajanja analita

Tečno-hromatografska analiza odabranih analita izvršena je na Surveyor LC sistemu (Thermo Scientific, Waltham, SAD). Za hromatografsko razdvajanje hormona upotrebljena je Zorbax Eclipse[®] XDB-C₁₈ reverzno-fazna kolona (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD), dimenzija: 4,6 mm × 75 mm × 3,5 μm, dok je razdvajanje sterola izvršeno na LiChrospher RP-18 EC koloni (Cronus, SMI-LabHut Ltd., Velika Britanija), dimenzija: 4,6 mm × 250 mm × 5 μm. Ispred kolona postavljena je predkolona, dimenzija: 4,6 mm × 12,5 mm × 5 μm (Agilent Technologies, SAD).

Hromatografska analiza odabranih steroida bila je podeljena u dve instrumentalne metode. U prvoj metodi hromatografski su razdvojeni steroidni hormoni na Zorbax Eclipse[®] XDB-C₁₈ koloni, a u drugoj su razdvojeni steroli na LiChrospher RP-18 EC koloni. U obe metode, mobilna faza se sastojala od dejonizovane vode i metanola. Testiranjem različitih gradijenata mobilne faze ustanovljeno je da se optimalno hromatografsko razdvajanje hormona i sterola u dve instrumentalne metode postiže primenom gradijenata mobilne faze prikazanih u tabeli 3.2. Zapremina od 10 μL konačno dobijenog ekstrakta je injektovana u LC sistem.

Tabela 3.2. Sastav i gradijent mobilne faze za hromatografsko razdvajanje steroidnih hormona (levo) i sterola (desno).

Zorbax Eclipse[®] XDB-C₁₈ kolona				LiChrospher RP-18 EC kolona			
Vreme (min)	Protok (mL min ⁻¹)	H ₂ O (%)	CH ₃ OH (%)	Vreme (min)	Protok (mL min ⁻¹)	H ₂ O (%)	CH ₃ OH (%)
0,00	0,8	45,0	55,0	0,00	1,7	0,0	100,0
13,00	0,8	45,0	55,0	7,00	1,7	0,0	100,0
13,01	0,8	0,0	100,0	7,01	1,5	0,0	100,0
18,00	0,8	0,0	100,0	12,00	1,5	0,0	100,0
18,01	0,8	45,0	55,0	14,00	1,5	10,0	90,0
28,00	0,8	45,0	55,0	15,00	1,5	10,0	90,0
				15,01	1,5	0,0	100,0
				25,00	1,5	0,0	100,0
				25,01	1,7	0,0	100,0
				35,00	1,7	0,0	100,0

3.4. Optimizacija LC-MS/MS parametara

Nakon izbora optimalnih hromatografskih uslova i gradijenata mobilne faze, pristupljeno je optimizaciji instrumentalnih uslova za pouzdanu identifikaciju tragova odabranih steroidnih jedinjenja. Standardni rastvor svakog analita koncentracije $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ je unosen u tok mobilne faze, pri protoku od $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. Prilikom analize steroidnih hormona mobilna faza se sastojala od 55% metanola i 45% vode, dok je u slučaju sterola korišćeno 100% metanola. Na osnovu rezultata MS^n analize, izabrane su karakteristične reakcije fragmentacije za kvantitativno određivanje i potvrdu prisustva svakog analita u konačno razvijenim LC-MS/MS metodama. Pošto je tečno-hromatografsko razdvajanje steroidnih hormona vršeno na Zorbax Eclipse[®] XDB-C₁₈ koloni, a sterola na LiChrospher RP-18 EC koloni, instrumentalna detekcija 20 odabranih steroida je podeljena u dve metode. SRM (eng. *selected reaction monitoring*) detekcija jona u obe instrumentalne metode je podeljena na vremenske segmente, pri čemu se vodilo računa da se u svakom segmentu prikupljaju podaci za maksimalno četiri reakcije fragmentacije.

3.5. Priprema uzoraka sedimenata

3.5.1. Predtretman uzoraka sedimenata

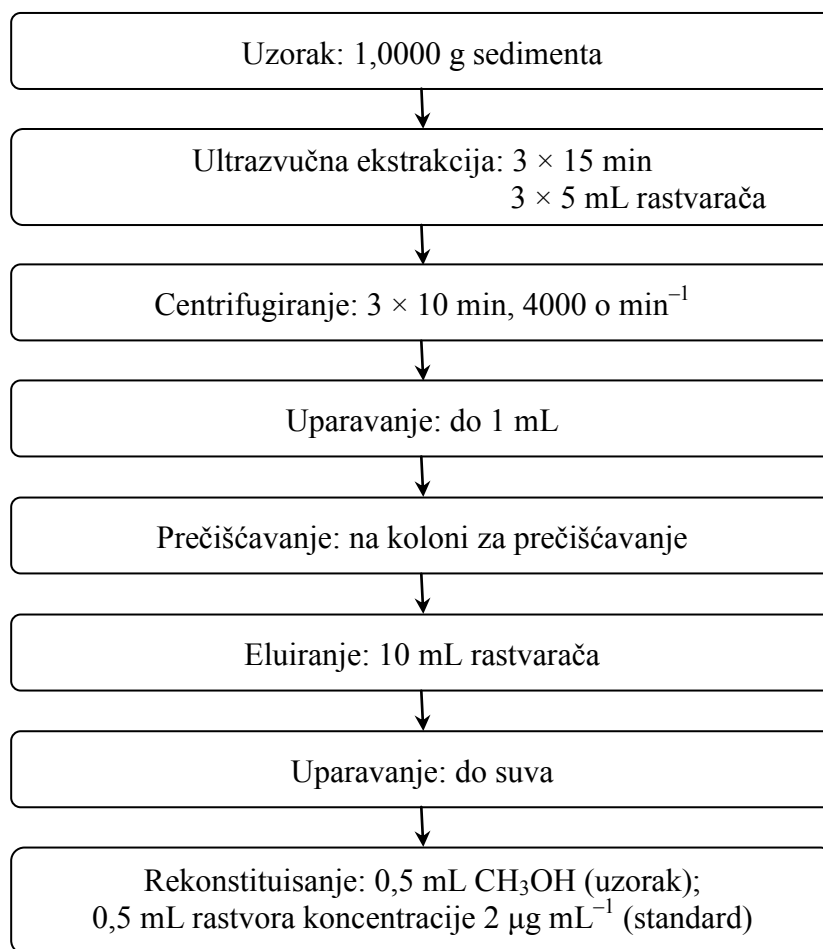
Svaki uzorak rečnog sedimenta je sušen na sobnoj temperaturi u mraku tokom sedam dana. Nakon sušenja, određen je sadržaj vlage u sedimentu. Na sahatnom staklu je odmereno oko 1,0000 g sedimenta koji je zatim sušen u sušnici na $105 \text{ }^\circ\text{C}$. Iz razlike u masi pre i posle sušenja, određen je sadržaj vlage u sedimentu, koji je bio manji od 0,05%. Osušeni uzorci sedimenata su zatim prosejani kroz sito veličine pora $500 \mu\text{m}$, da bi se uklonile mehaničke nečistoće koje bi mogle ometati analizu. Dalja analiza uzoraka rađena je sa frakcijom sedimenta manjom od $500 \mu\text{m}$.

3.5.2. Ultrazvučna ekstrakcija odabranih steroidnih jedinjenja

U optimizaciji metode ultrazvučne ekstrakcije izvršen je izbor optimalnog rastvarača za ekstrakciju, mase sedimenta, kao i vremena ultrazvučne ekstrakcije. Za izvođenje svakog eksperimenta bilo je neophodno prethodno pripremiti uzorak rečnog sedimenta koji sadrži poznatu koncentraciju steroida, a zatim i odgovarajući standard. Za optimizaciju parametara ultrazvučne ekstrakcije i prečišćavanja ekstrakta uzorka korišćen je standard koji odgovara matrici uzorka (eng. *matrix-matched standard*). Na slici 3.1 je šematski prikazana procedura ekstrakcije odabranih steroidnih hormona i sterola iz rečnog sedimenta.

Procedura ekstrakcije tokom eksperimenata optimizacije parametara ultrazvučne ekstrakcije je izvođena na sledeći način: u plastične kivete zapremine 50 mL odmereno je 1,0000 g uzorka sedimenta. Na uzorak sedimenta je dodato 1 mL standardnog rastvora steroidnih hormona i sterola koncentracije $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ i uzorak je ostavljen preko noći da rastvarač ispari. U plastičnu kivetu je zatim dodato 5 mL rastvarača, a potom je izvršena ekstrakcija u ultrazvučnom kupatilu u trajanju od 15 min. Nakon toga je uzorak centrifugiran tokom 15 min pri brzini od 4000 o min^{-1} . Tečna faza (supernatant) je zatim dekantovana u staklene kivete. Na preostalu čvrstu fazu dodato je ponovo 5 mL rastvarača i postupak ekstrakcije je ponovljen još dva puta, tako da je konačno dobijeno 15 mL ekstrakta. Kivete su zatim prenesene u vodeno kupatilo ($t = 30 \text{ }^\circ\text{C}$) gde je ekstrakt uparavan do zapremine od oko 1 mL u struji azota. Ekstrakt je potom kvantitativno prenet na kertridž za prečišćavanje. Kertridž je pre nanošenja ekstrakta kondicioniran sa 10 mL odgovarajućeg rastvarača. Nakon nanošenja ekstrakta, eluiranje je izvršeno sa 10 mL rastvarača u staklene kivete. Kivete su potom prenesene u vodeno kupatilo gde je sadržaj uparavan do suva u struji azota. Zatim je prečišćeni ekstrakt rekonstituisan sa 0,5 mL metanola, homogenizovan, filtriran kroz poli(viniliden fluorid) (PVDF) filter (Roth, Karlsruhe, Nemačka), veličine pora $0,45 \mu\text{m}$, i analiziran.

Odgovarajući standard je pripremljen tako što je prema opisanoj proceduri ekstrahovan uzorak sedimenta u koji nije dodat standardni rastvor steroida, a zatim je u poslednjoj fazi eksperimenta, nakon prečišćavanja, ekstrakt rekonstituisan sa 0,5 mL standardnog rastvora steroida koncentracije $2 \mu\text{g mL}^{-1}$.



Slika 3.1. Procedura ekstrakcije steroidnih hormona i sterola iz rečnog sedimenta.

3.5.2.1. Izbor optimalnog rastvarača za ultrazvučnu ekstrakciju

Izbor rastvarača za ekstrakciju ima veliki uticaj na prinos metode. Za izvođenje eksperimenta odabrani su najčešće korišćeni rastvarači za ekstrakciju odabranih analita iz sedimenata (Froehner *et al.*, 2009; Martín *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2011) i to četiri slabo polarna rastvarača (metanol, etil-acetat, aceton i acetonitril) i dva nepolarna rastvarača (heksan i dihlormetan). Nakon izbora dva najbolja rastvarača, ispitana je efikasnost ekstrakcije njihovim smešama u različitim odnosima. Kao najefikasnija, odabrana je kombinacija rastvarača metanol/acetonitril (%CH₃OH:%CH₃CN, v/v), a ispitane su sledeće njihove kombinacije:

- 60% CH₃OH:40% CH₃CN

- 70% CH₃OH:30% CH₃CN
- 80% CH₃OH:20% CH₃CN
- 90% CH₃OH:10% CH₃CN
- 95% CH₃OH:5% CH₃CN

Eksperimenti su izvođeni prema proceduri prikazanoj na slici 3.1, a dobijeni ekstrakti su analizirani prethodno razvijenim LC-MS/MS metodama.

3.5.2.2. Izbor optimalne mase uzorka sedimenta

Nakon izbora rastvarača za ekstrakciju, optimizovana je i masa uzorka rečnog sedimenta sa ciljem da faktor koncentrovanja analita bude što veći, a količina ekstrahovanih nečistoća što manja. Naime, ekstrahovane nečistoće mogu značajno uticati na rezultate analize, a mogu dovesti i do oštećenja analitičke opreme. Iz tog razloga, pored mase od 1,0 g sedimenta, sa kojom su izvedeni svi prethodni ogledi, testirana je i masa od 2,0 g sedimenta (Martín *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2011; Shafrir i Avisar, 2012). Eksperiment je izveden prema proceduri prikazanoj na slici 3.1, uz korišćenje najefikasnijeg rastvarača odabranog u prethodnom ogledu. Uzorci sedimenta su pripremljeni dodatkom smeše svih steroida, tako da je očekivana koncentracija svakog analita u konačnom ekstraktu, nakon ultrazvučne ekstrakcije, iznosila 2 µg mL⁻¹.

3.5.2.3. Izbor optimalnog vremena ultrazvučne ekstrakcije

Vreme kontakta rastvarača sa uzorkom ima značajan uticaj na efikasnost ekstrakcije. Povećanje vremena ultrazvučne ekstrakcije obično rezultuje u blagom povećanju prinosa, ali dovodi i do produženja procedure pripreme uzorka. Da bi se skratilo vreme pripreme uzoraka, pored 3 × 15 min iz prethodnih ogleda, odabrana su vremena ultrazvučne ekstrakcije od 3 × 5 min i 3 × 10 min. Eksperiment je izveden prema proceduri prikazanoj na slici 3.1, uz upotrebu optimalnog rastvarača za ekstrakciju i odabrane mase sedimenta iz prethodnih ogleda.

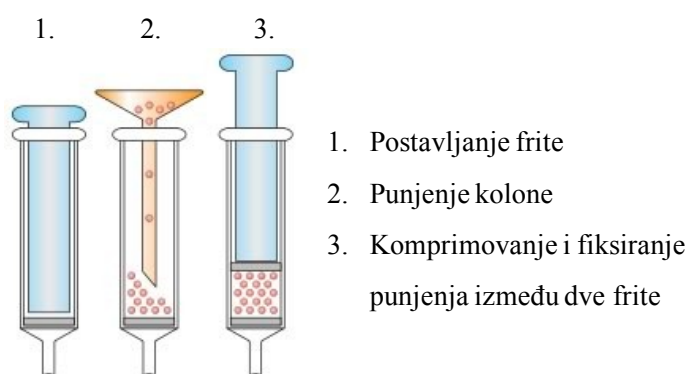
3.5.3. Prečišćavanje dobijenih ekstrakata sedimenata

3.5.3.1. Izbor pakovanja kolone za prečišćavanje

Prilikom optimizacije prečišćavanja ekstrakta sedimenta izabrano je pakovanje kolone za prečišćavanje, kao i najefikasniji rastvarač za eluiranje analita sa punjenja kertridža. Pregledom literature (Lopez de Alda et al., 2002; Liu et al., 2004; Hájková et al., 2007; Hibberd et al., 2009; Biache i Philp, 2013) odabrana su četiri pakovanja koja se obično koriste za prečišćavanje ekstrakata sedimenata:

1. smeša silika-gela i anhidrovanog Na_2SO_4
2. HLB pakovanje (Oasis HLB kertridž, Waters, Milford, SAD)
3. C-18 pakovanje (Superclean ENVI 18 kertridž, Supelco, Bellefonte, SAD)
4. ugljenično pakovanje (Superclean ENVI Carb kertridž, Supelco, SAD)

Smeša silika-gela i anhidrovanog Na_2SO_4 se najčešće koristi za prečišćavanje i uklanjanje vlage iz organskih ekstrakata. Za pripremu kolona, izvršeno je aktiviranje silika-gela i Na_2SO_4 žarenjem na $450\text{ }^\circ\text{C}$ u trajanju od 6 h. Prazni kertridži (zapremine 6 mL) napunjeni su smešom 0,50 g silika-gela i 0,25 g anhidrovanog Na_2SO_4 . Punjenje kolone je zatim komprimovano i fiksirano između dve porozne polietilenske frite, na način prikazan na slici 3.2.



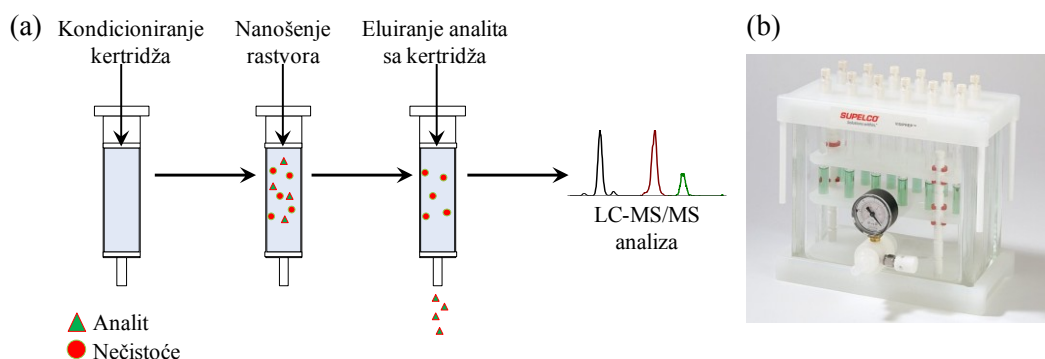
Slika 3.2. Priprema kolona za prečišćavanje.

Oasis HLB (200 mg/6 mL) je komercijalno dostupan kertridž, veoma zastupljen u pripremi uzoraka vode metodom ekstrakcije na čvrstoj fazi (Al-Odaini *et al.*, 2010;

Jeanneau *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2011). Sastoji se od dva monomera, hidrofilnog N-vinilpirolidona i lipofilnog divinilbenzena. Pored efikasne ekstrakcije, HLB pakovanje obezbeđuje i efikasno prečišćavanje ekstrakata uzoraka.

Supelclean ENVI 18 (500 mg/6 mL) i Supelclean ENVI Carb (500 mg/6 mL) su komercijalno dostupni kertriži namenjeni za ekstrakciju i koncentrovanje analita, i prečišćavanje ekstrakata uzoraka iz životne sredine. Supelclean ENVI 18 se sastoji od polimerno vezanih oktadecil-grupa (C18), dok je Supelclean ENVI Carb kertridž pakovan grafitnim neporoznim ugljenikom koji ispoljava veliki afinitet prema polarnim i nepolarnim organskim jedinjenjima koja se mogu ekstrahovati iz polarnih i nepolarnih matrica.

Optimizacija procedure prečišćavanja je izvedena na sledeći način: kertridži su kondicionirani sa 5 mL odgovarajućeg rastvarača za eluiranje. Nakon toga, 1 mL standardnog rastvora steroida koncentracije $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ je nanet na kolonu za prečišćavanje. Analiti su eluirani sa pakovanja kolone sa 10 mL odgovarajućeg rastvarača. Dobijeni eluati su upareni do suva u struji azota u vodenom kupatilu na $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$, rekonstituisani sa 1 mL metanola, filtrirani kroz PVDF filter i analizirani (slika 3.3a). Za eksperiment je korišćena aparatura za ekstrakciju na čvrstoj fazi koja omogućava istovremeno prečišćavanje 12 uzoraka (slika 3.3b). Aparatura se sastoji od staklene kade na kojoj se nalazi izvod sa manometrom za vezivanje vakuumpumpe. Staklena kada se zatvara perforiranim poklopcem na koji se postavljaju kolone za prečišćavanje. Ispod svakog kertridža se postavljaju kivete za sakupljanje prečišćenih ekstrakata.



Slika 3.3. (a) Prikaz procedure prečišćavanja ekstrakata sedimenata; (b) aparatura za izvođenje postupka prečišćavanja.

3.5.3.2. Izbor optimalnog rastvarača za eluiranje

Kao rastvarači za eluiranje odabranih analita sa kolone za prečišćavanje testirani su: metanol, smeša metanol/etil-acetat (1:1, v/v) i smeša metanol/heksan (1:1, v/v). Izabrani rastvarači su testirani na četiri prethodno odabrana kertridža za prečišćavanje ekstrakata sedimenata, prema navedenoj proceduri prečišćavanja.

Nakon odabira optimalnog punjenja kertridža za prečišćavanje i dva rastvarača za eluiranje sa kojima su dobijeni najviši prinosi analita, efikasnost prečišćavanja je testirana na ekstraktu realnog uzorka sedimenta. Eksperiment je izveden na isti način kao i prethodni, uz razliku što je na kondicionirani kertridž za prečišćavanje nanesen ekstrakt sedimenta dobijen ultrazvučnom ekstrakcijom u koji je dodat standardni rastvor steroida tako da koncentracija iznosi $1 \mu\text{g mL}^{-1}$. U ovom slučaju kvantifikacija je rađena korišćenjem standarda koji odgovara matrici uzorka, a koji je pripremljen tako što je nakon prečišćavanja ekstrakt rekonstituisan u standardnom rastvoru steroida koncentracije $1 \mu\text{g mL}^{-1}$.

3.6. Validacija metode

Razvijena i optimizovana metoda je validirana tako što su uzorcima sedimenata dodati standardni rastvori steroidnih jedinjenja tako da koncentracija svakog analita iznosi 50, 100, 250, 500, 1000 i 2000 ng g^{-1} . Zatim su sedimenti ekstrahovani prema optimizovanoj proceduri ultrazvučne ekstrakcije, a dobijeni ekstrakti su prečišćeni korišćenjem optimalnog pakovanja kolone i optimalnog rastvarača za eluiranje. Prinosi analita su određeni pomoću standarda koji odgovaraju matrici uzorka. Eksperimenti su izvedeni analizom tri probe, u tri dana, a na osnovu rezultata je određena ponovljivost metode, izražena preko relativne standardne devijacije (RSD). Na osnovu rezultata je određena i linearnost metode, kao mogućnost da se unutar ispitivanog opsega koncentracija detektuje signal direktno proporcionalan koncentraciji analita u uzorku. Na osnovu krive zavisnosti površine pika svakog analita od koncentracije u ekstraktu izračunati su koeficijenti korelacije, R^2 . Dodatno je linearnost metode procenjena određivanjem rezidualnih vrednosti za svaku tačku kalibracione krive. Rezidualne vrednosti su određene iz razlike površine pika analita u uzorku i površine pika analita

preračunate koristeći kalibracionu krivu, tj. odgovarajuću jednačinu prave (Taverniers *et al.*, 2004).

Granica detekcije (eng. *limit of detection*, LOD) i granica kvantifikacije (eng. *limit of quantification*, LOQ) optimizovane metode za svaki analit su izračunate na osnovu odnosa signala i šuma (eng. *signal to noise*, S/N) očitanih iz SRM hromatograma. Za izračunavanje granica detekcije i kvantifikacije korišćen je uzorak sedimenta kojem je na početku procedure ekstrakcije dodat standardni rastvor steroida koncentracije 50 ng g⁻¹. Granica detekcije metode je određena kao koncentracija pri kojoj je vrednost S/N iznosila 3, dok je granica kvantifikacije izračunata kao koncentracija koja odgovara vrednosti S/N = 10.

Uticao matrice (eng. *matrix effect*, ME) je određen korišćenjem standarda koji odgovara matrici uzorka i standardnog rastvora steroidnih jedinjenja, pri koncentraciji od 100 ng mL⁻¹. Uticaj matrice je izračunat prema sledećoj jednačini:

$$ME(\%) = \frac{P_{\text{matrix}} - P_{\text{blank}}}{P_{\text{solvent}}} \times 100 - 100$$

gde je P_{matrix} – površina pika analita u standardu koji odgovara matrici uzorka, P_{blank} – površina pika analita u uzorku i P_{solvent} – površina pika analita u rastvaraču.

3.7. Metoda kalibracije

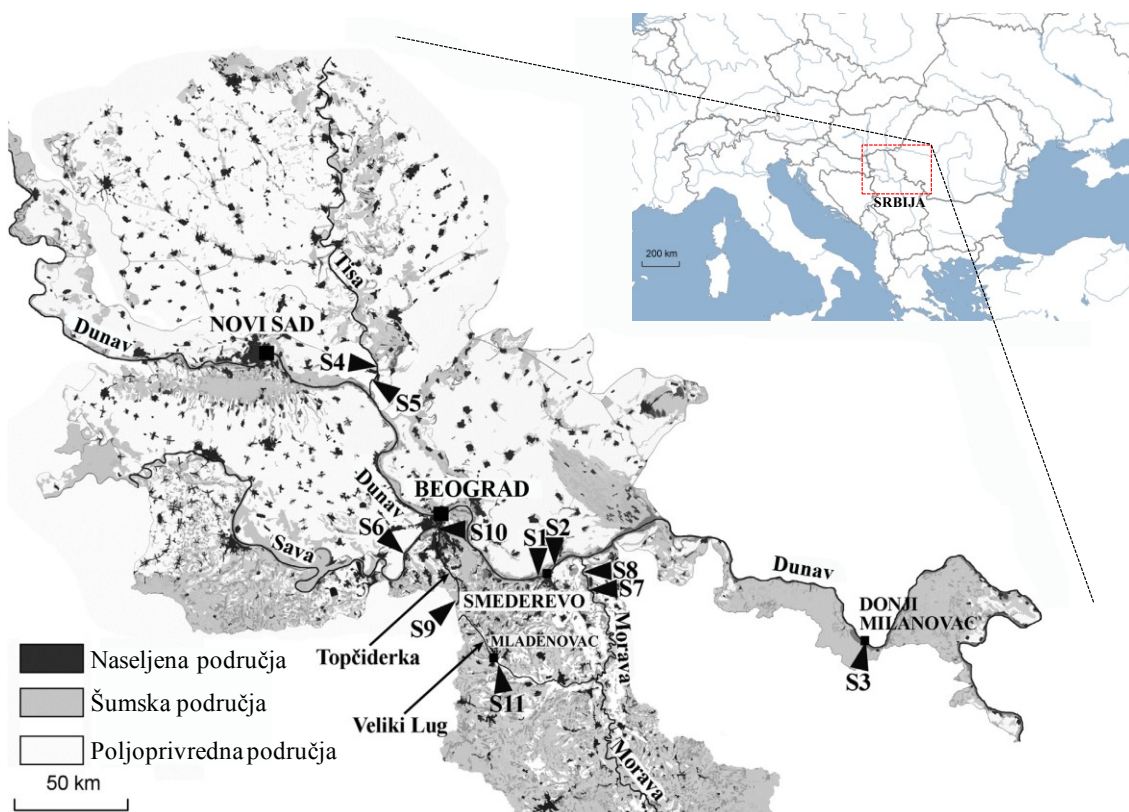
Za eksperimente optimizacije metode pripreme uzoraka sedimenata kao kalibraciona metoda korišćena je metoda eksterne kalibracije sa standardima koji odgovaraju matrici uzorka, tj. „matrix-matched“ standardima. Standardi su pripremljeni tako što je prema opisanoj proceduri ekstrahovan uzorak sedimenta u koji nije dodat standardni rastvor steroida, a zatim je u poslednjoj fazi eksperimenta, nakon prečišćavanja, ekstrakt rekonstituisan u standardnom rastvoru steroida odgovarajuće koncentracije. Prilikom kvantifikacije, površina svakog analita detektovanog u uzorku sedimenta je oduzeta i od površine analita u uzorku kome je na početku dodat standardni rastvor steroida i od površine analita u „matrix-matched“ standardu.

Prilikom analize realnih uzoraka rečnih sedimenata za kalibraciju je korišćena metoda standardnog dodatka. U četiri odmerene probe ispitivanog uzorka sedimenta dodati su redom pripremljeni standardni rastvori tako da su koncentracije iznosile 50,

250, 1000 i 2000 ng g⁻¹. Zatim su sve probe pripremljene prema optimizovanoj proceduri ekstrakcije i analizirane.

3.8. Uzimanje uzoraka rečnih sedimenata

Uzorci rečnih sedimenata su prikupljeni sa 11 mesta uzorkovanja u Srbiji (slika 3.4). Tom prilikom je uzorkovan površinski sloj sedimenata. Pored toga, analiziran je i uzorak sedimenta uzet iz Venecijanskog zaliva (Italija), kao i uzorak aktivnog mulja iz PPOV u Veneciji, kako bi se sagledao uticaj dugogodišnjeg prečišćavanja otpadnih voda na kvalitet sedimenata i uočila razlika u odnosu na sedimente prikupljene u Srbiji na lokacijama gde ne postoje PPOV. Uzorak aktivnog mulja je pripremljen za analizu prema proceduri optimizovanoj za uzorke rečnih sedimenata. U svim ispitivanim uzorcima određeni su tragovi odabranih steroidnih jedinjenja, a na osnovu odnosa koncentracija različitih sterola utvrđeno je poreklo fekalne materije u sedimentima.



Slika 3.4. Prikaz mesta uzorkovanja rečnih sedimenata u Srbiji.

Opis mesta uzorkovanja, kao i karakteristike reka iz kojih su uzorci uzeti, poput, površine sliva, protoka i dužine toka reke u Srbiji, je dat u tabeli 3.3. S obzirom na to da 92% površine Srbije pripada slivu reke Dunav (81 374 km²), većina analiziranih uzoraka je prikupljena iz reke Dunav i njenih najvećih pritoka Tise, Save i Velike Morave.

Tabela 3.3. Opis mesta uzorkovanja i karakteristike reka iz kojih su uzeti uzorci rečnih sedimenata.

Oznaka uzorka	Mesto uzorkovanja	Površina sliva, km²	Protok, m³ s⁻¹	Dužina toka reke u Srbiji, km
S1	Dunav, Smederevo pre izliva otpadne vode			
S2	Dunav, Smederevo posle izliva otpadne vode	801 463	6 460	588
S3	Dunav, Donji Milanovac			
S4	Tisa, pre naseljenog mesta			
S5	Tisa, posle naseljenog mesta, 1 km od ušća u Dunav	157 186	794	164
S6	Sava, Beograd, 5 km od ušća u Dunav	95 719	1 564	206
S7	Velika Morava, pre naseljenog mesta			
S8	Velika Morava, posle naseljenog mesta, 1 km od ušća u Dunav	37 444	232	185
S9	Topčiderka, Beograd u blizini izvorišta	147	< 1	31
S10	Topčiderka, Beograd, u naseljenom području			
S11	Veliki Lug, Mladenovac, u naseljenom području	421	2,2	37

Uzorci rečnih sedimenata iz reke Dunav su uzeti u Smederevu (uzorci S1 i S2), pre i posle izliva komunalne otpadne vode u Dunav, i Donjem Milanovcu (uzorak S3). Iz reke Tise, najduže pritoke Dunava, prikupljena su dva uzorka (uzorci S4 i S5), pre i posle naseljenog mesta. Uzorak S5 je uzet oko 1 km od ušća Tise u Dunav. Uzorak iz reke Save (uzorak S6) je uzet u Beogradu, oko 5 km od ušća Save u Dunav. Uzorci sedimenata iz Velike Morave (uzorci S7 i S8) su uzeti pre i posle naseljenog mesta, pri

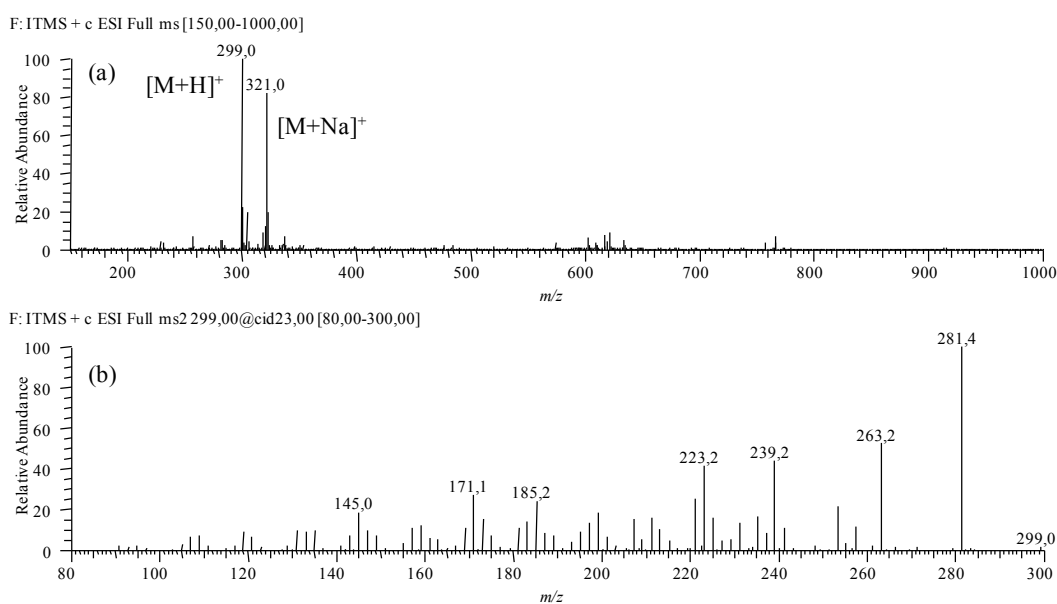
čemu je uzorak S8 uzet oko 1 km pre ulivanja Velike Morave u Dunav.

Uzorci rečnih sedimenata su uzeti i iz dve male reke, Topčiderke i Velikog Luga, za koje se zna da su izložene velikom humanom fekalnom zagađenju. Ovi uzorci rečnih sedimenata su prvenstveno korišćeni kako bi se ispitala efikasnost odabranih odnosa sterola u identifikaciji humane fekalne kontaminacije. Topčiderka je desna pritoka Save, u koju se uliva u Beogradu. U Topčidersku reku se ulivaju netretirane otpadne vode direktno iz naseljenih područja Beograda. Iz Topčiderke su uzeta dva uzorka sedimenata: jedan blizini izvorišta reke (uzorak S9) koji se može smatrati nezagađenim, i drugi uzorak uzet u naseljenom području, nizvodno od brojnih ispusta otpadnih voda (uzorak S10). Veliki Lug je reka koja se smatra veoma zagađenom zbog izlivanja netretiranih komunalnih otpadnih voda grada Mladenovca. Uzorak rečnog sedimenta (S11) je uzet u Velikom Lugu nizvodno od izliva otpadnih voda. Važno je naglasiti da se oko 90% komunalnih otpadnih voda u Srbiji ne prečišćava, kao i to da se u blizini mesta uzorkovanja ne nalaze postrojenja za prečišćavanje otpadnih voda.

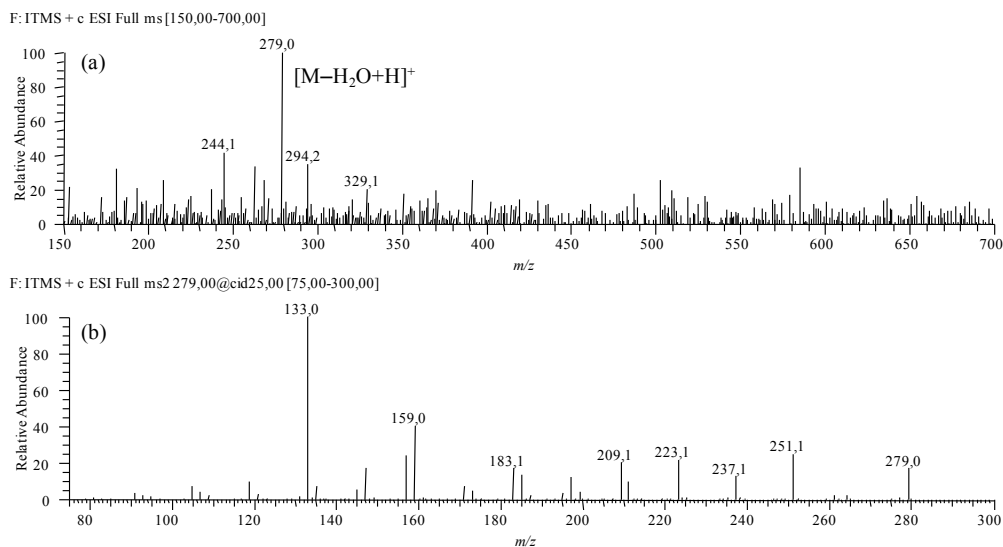
4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Maseni spektri odabranih analita

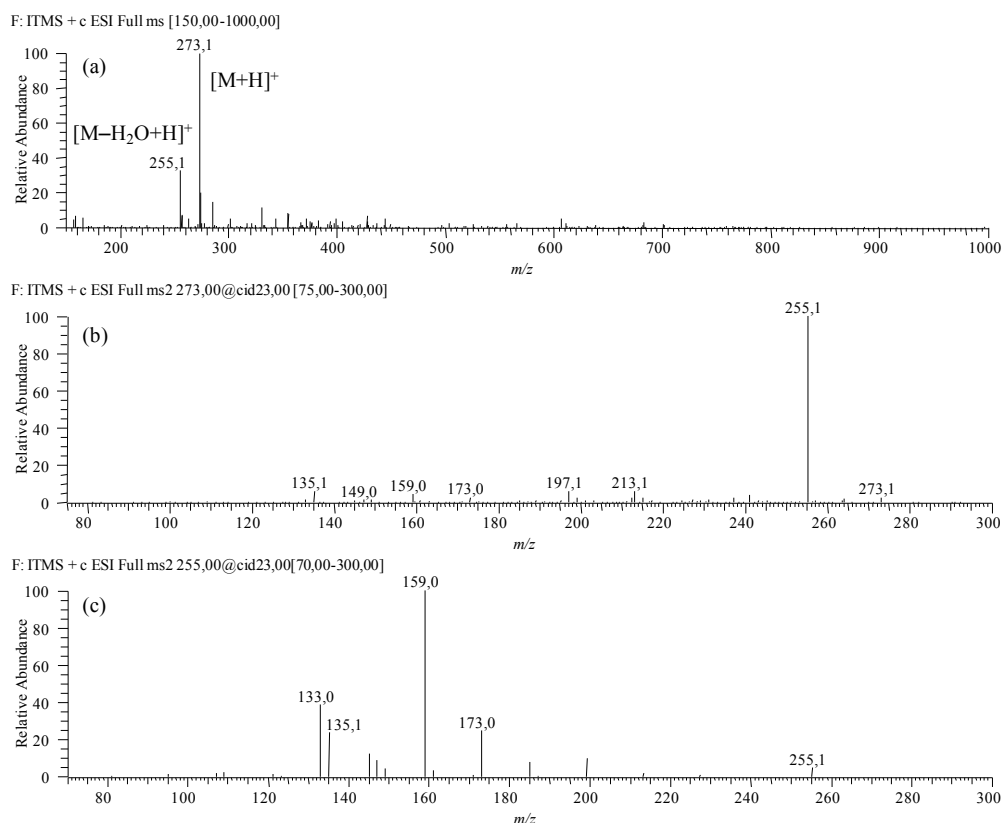
Maseni spektri analita dobijeni su korišćenjem LCQ Advantage i LTQ XL jonskih trapova, kao masenih spektrometara, a kao jonizacione tehnike korišćene su hemijska jonizacija na atmosferskom pritisku i elektrosprej jonizacija. Utvrđeno je da se pri korišćenju oba jonska trapa dobijaju isti maseni spektri analita. Elektrosprej tehnika jonizacije se pokazala kao efikasna prilikom analize svega nekoliko steroidnih hormona (noretindrona, 17α -etinilestradiola, 17α - i 17β -estradiola i levonorgestrela). Prilikom jonizacije humanih/životinjskih i biljnih sterola ovom tehnikom ne dobijaju se stabilni joni analita. Na slikama 4.1–4.5 prikazani su maseni spektri steroidnih hormona dobijeni ESI tehnikom, dok su na slikama 4.6–4.14 dati maseni spektri svih odabranih hormona dobijeni APCI tehnikom. Najintenzivniji joni u ovim spektrima odabrani su za prekursor jone, a zatim je vršena njihova dalja fragmentacija, pri čemu su dobijeni maseni spektri fragmentnih jona (MS^n). Na spektrima su pravougaonikom (□) označeni fragmentni joni odabrani za kvantifikaciju, a elipsom (○) fragmentni joni odabrani za potvrdu prisustva analita.



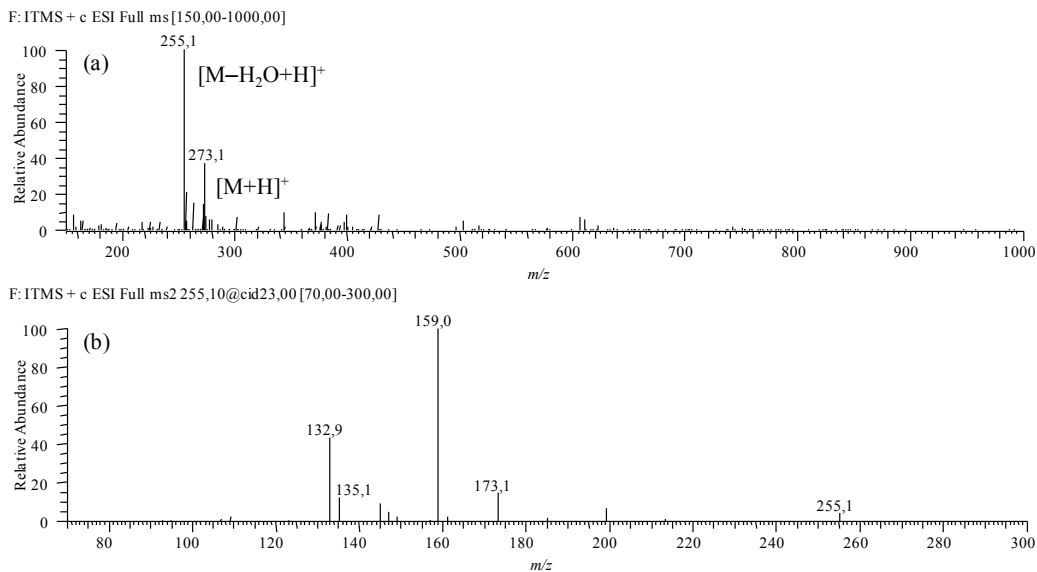
Slika 4.1. Maseni spektri noretindrona: (a) ESI(+)-MS; (b) ESI(+)-MS² $[M+H]^+$.



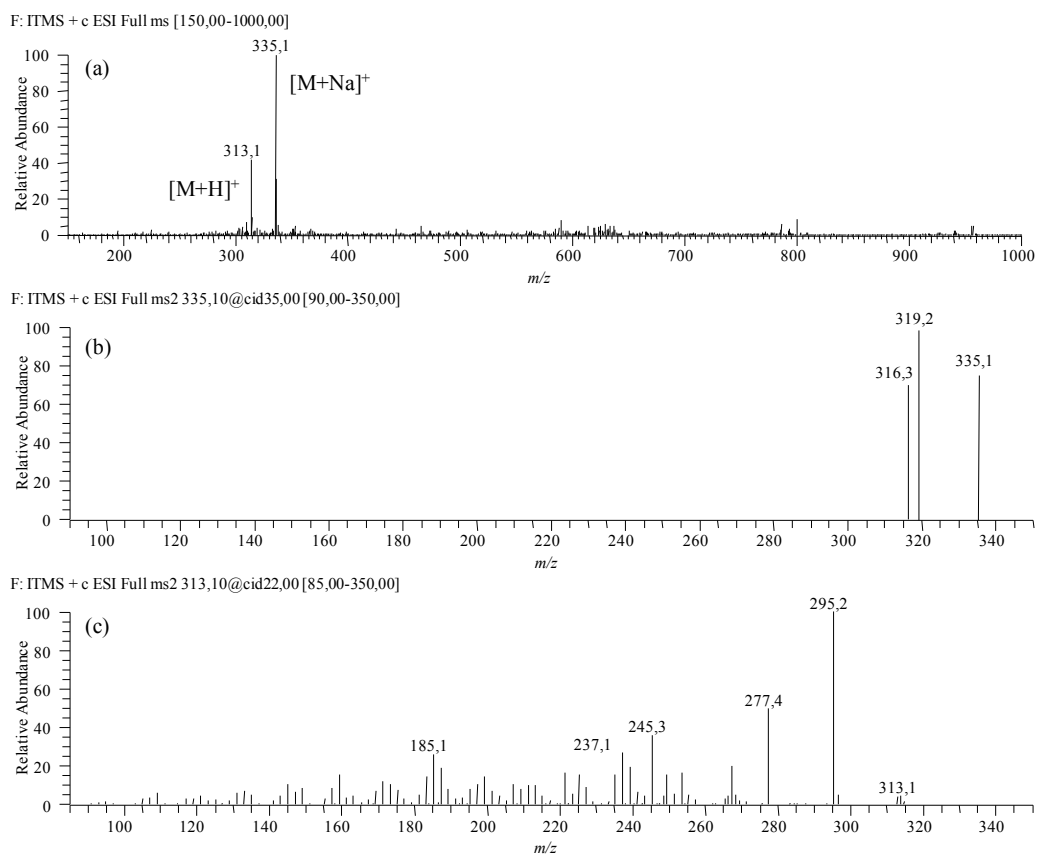
Slika 4.2. Maseni spektri 17 α -etinilestradiola: (a) ESI(+) MS ; (b) ESI(+) MS^2 $[M-H_2O+H]^+$.



Slika 4.3. Maseni spektri 17 β -estradiola: (a) ESI(+) MS ; (b) ESI(+) MS^2 $[M+H]^+$; (c) ESI(+) MS^2 $[M-H_2O+H]^+$.

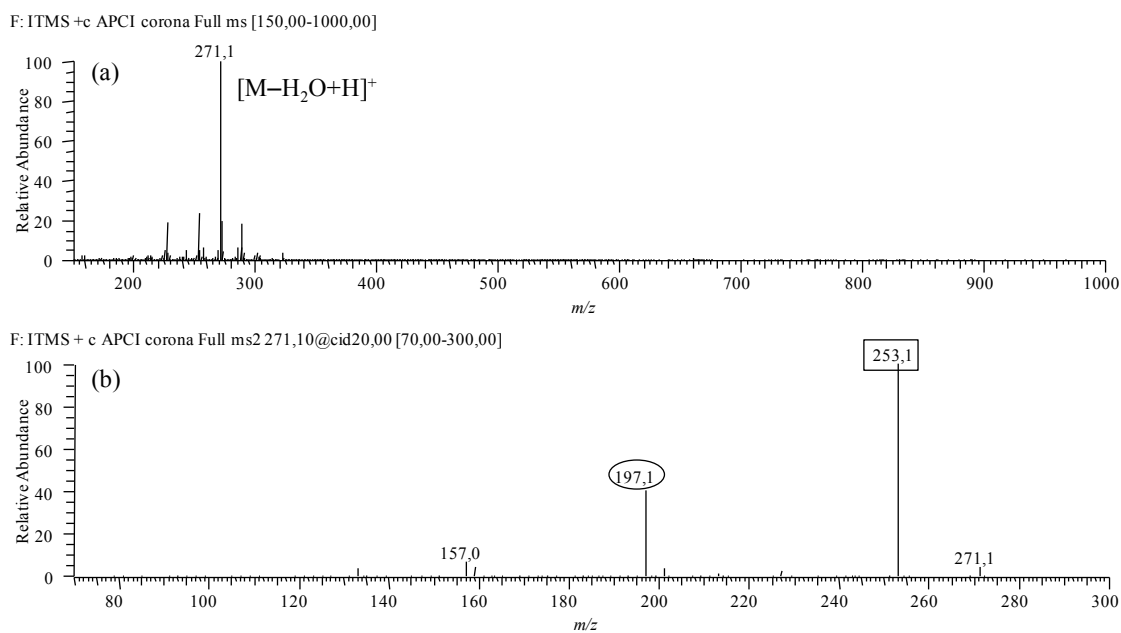


Slika 4.4. Maseni spektri 17 α -estradiola: (a) ESI(+) MS ; (b) ESI(+) MS^2 $[M-H_2O+H]^+$.



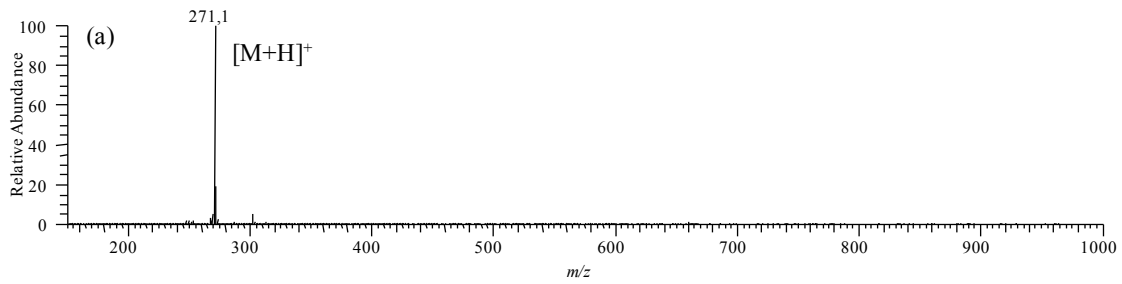
Slika 4.5. Maseni spektri levonorgestrela: (a) ESI(+) MS ; (b) ESI(+) MS^2 $[M+Na]^+$; (c) ESI(+) MS^2 $[M+H]^+$.

Dobijeni rezultati su pokazali da u procesu elektrosprej jonizacije ispitivana steroidna jedinjenja daju samo pozitivne jone. Iako su istraživanja pokazala da estrogini hormoni u procesu elektrosprej jonizacije formiraju negativne jone, pri čemu su prekursor joni deprotonovani molekuli analita $[M-H]^-$ (Matějček *et al.*, 2007; Vega-Morales *et al.*, 2010; Wang i Gardinali, 2012), u ovom radu nisu dobijeni stabilni negativni joni estrogenih hormona ni primenom ESI ni APCI tehnike jonizacije. Bez obzira na primenjenu jonizacionu tehniku, kao rezultat MS analize svih odabranih steroidnih jedinjenja dobijeni su maseni spektri samo pozitivnih jona analita. Razlika u rezultatima dobijenim primenom ESI i APCI tehnike je ta što se u procesu elektrosprej jonizacije noretindrona i levonorgestrela, pored dehidratisanog protonovanog molekula, formiraju i adukti sa natrijumom. Takođe, u ESI masenim spektrima 17α - i 17β -estra-diola se javljaju protonovani molekuli analita, pored dehidratisanih protonovanih molekula.

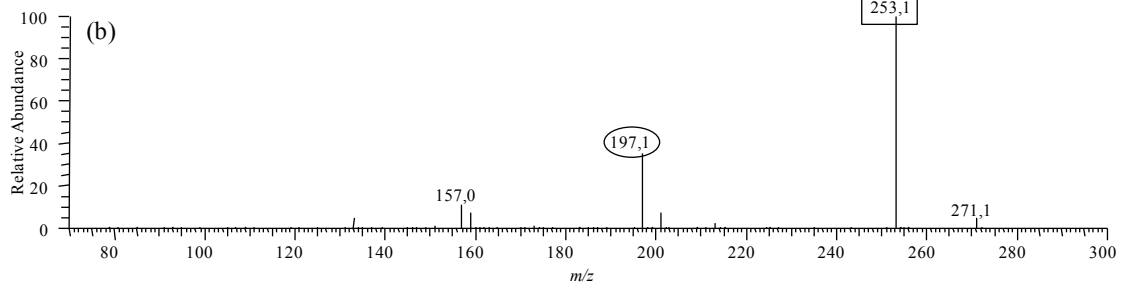


Slika 4.6. Maseni spektri estriola: (a) APCI(+) MS ; (b) APCI(+) MS^2 $[M-H_2O+H]^+$.

F: ITMS + c APCI corona Full ms [150,00-1000,00]

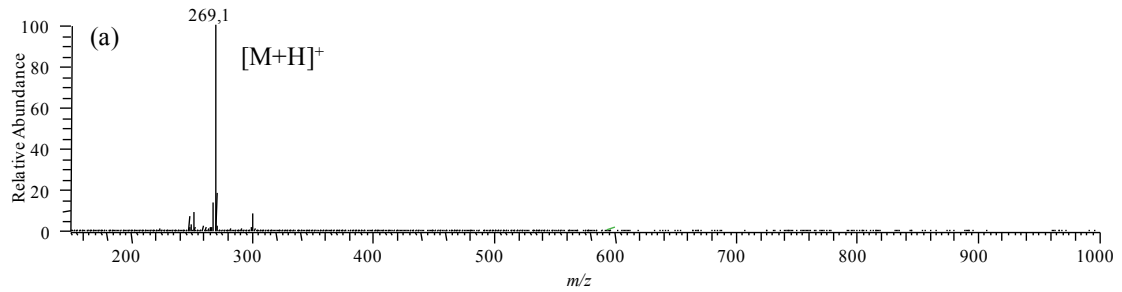


F: ITMS + c APCI corona Full ms2 271,10@cid20,00 [70,00-300,00]

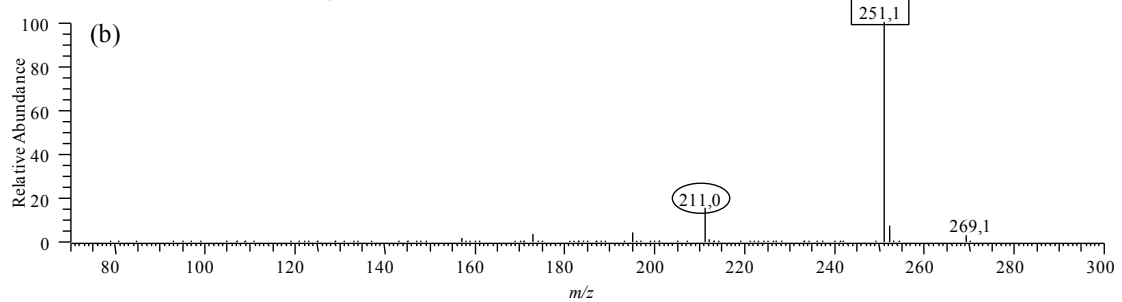


Slika 4.7. Maseni spektri estrona: (a) APCI(+) MS ; (b) APCI(+) MS^2 $[M+H]^+$.

F: ITMS + c APCI corona Full ms [150,00-1000,00]

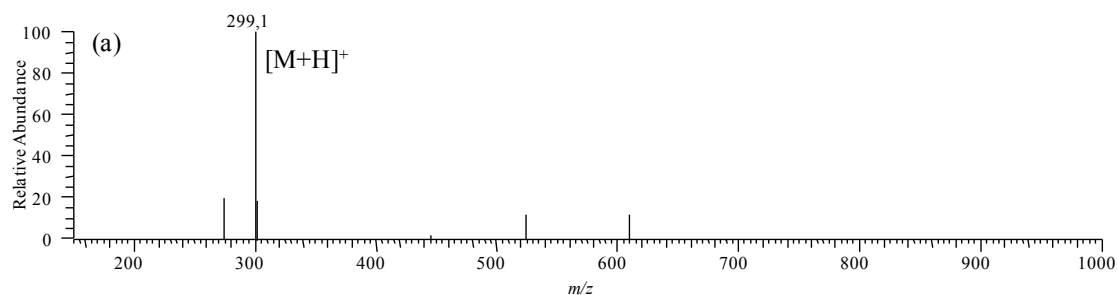


F: ITMS + c APCI corona Full ms2 269,10@cid23,00 [70,00-300,00]

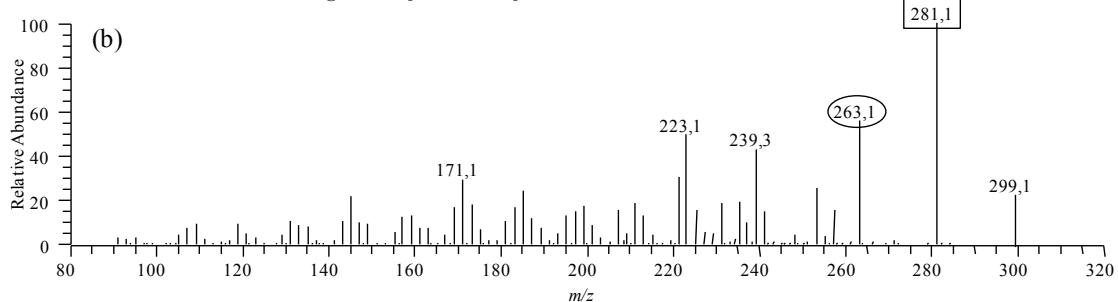


Slika 4.8. Maseni spektri ekvilina: (a) APCI(+) MS ; (b) APCI(+) MS^2 $[M+H]^+$.

F: ITMS + c APCI corona Full ms [150,00-1000,00]

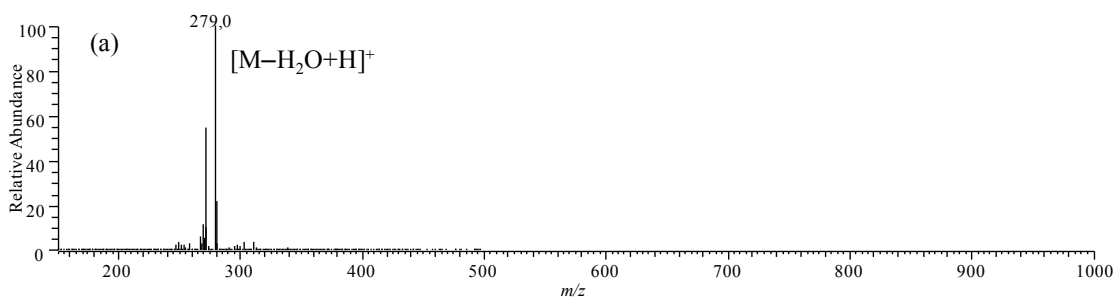


F: ITMS + c APCI corona Full ms2 299,10@cid23,00 [80,00-320,00]

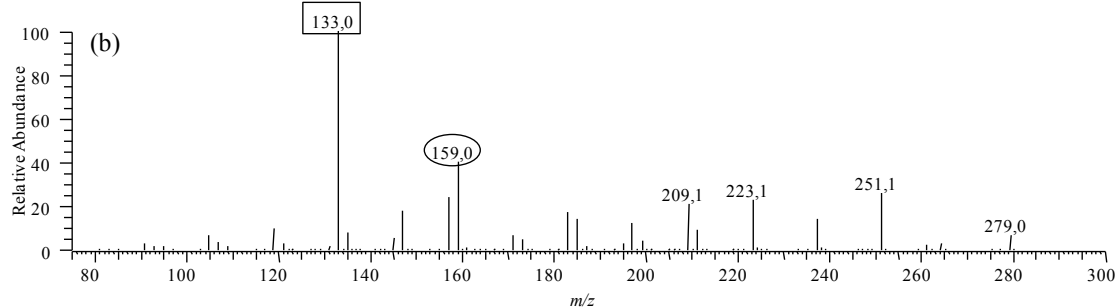


Slika 4.9. Maseni spektri noretindrona: (a) APCI(+) MS ; (b) APCI(+) MS^2 $[M+H]^+$.

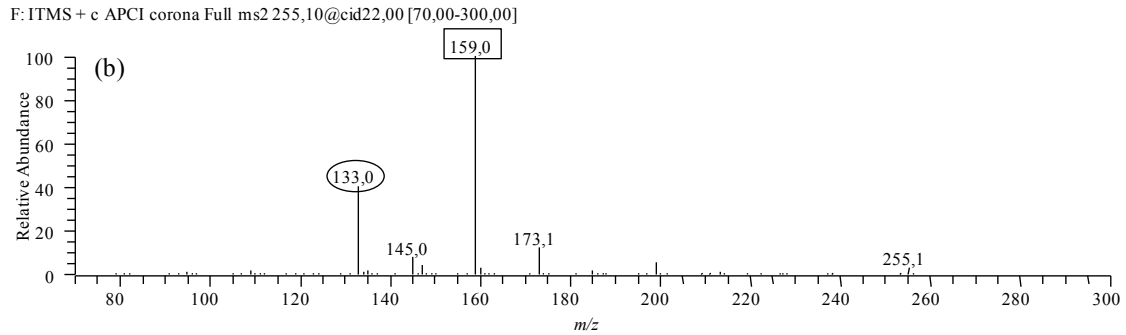
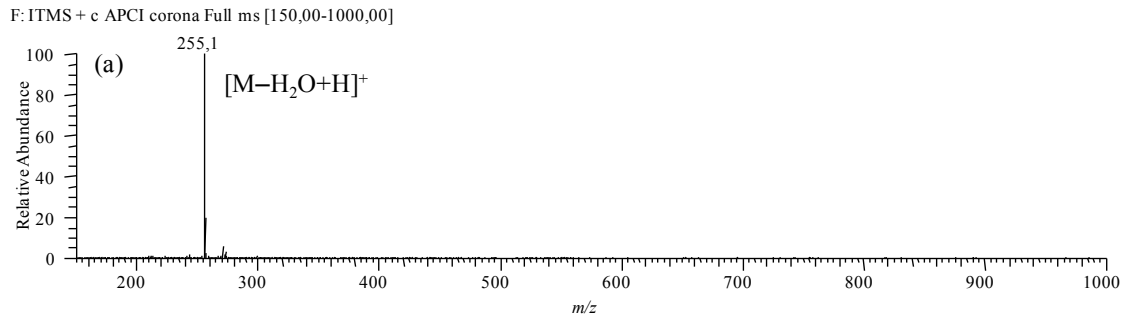
F: ITMS + c APCI corona Full ms [150,00-1000,00]



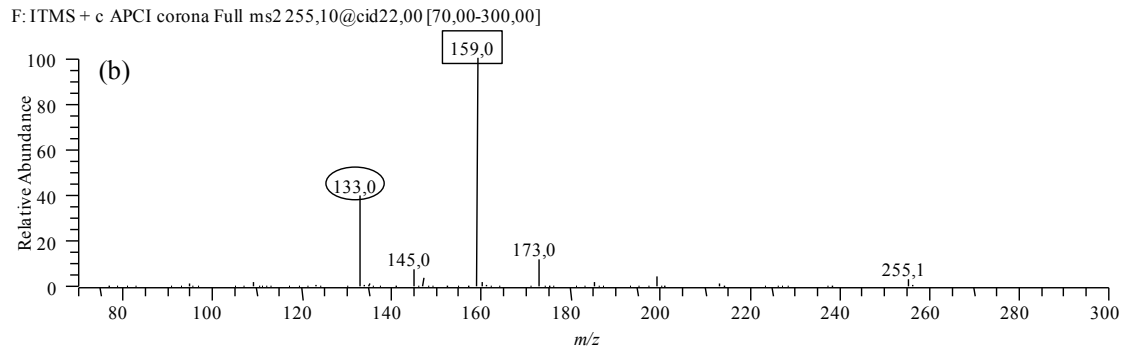
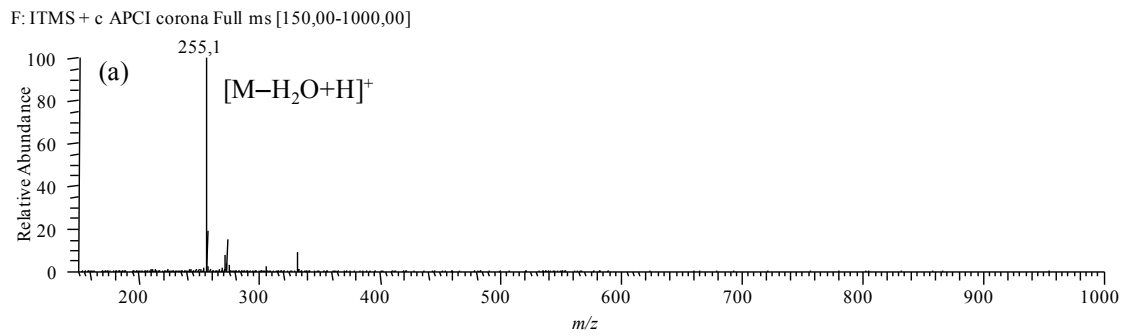
F: ITMS + c APCI corona Full ms2 279,00@cid25,00 [75,00-300,00]



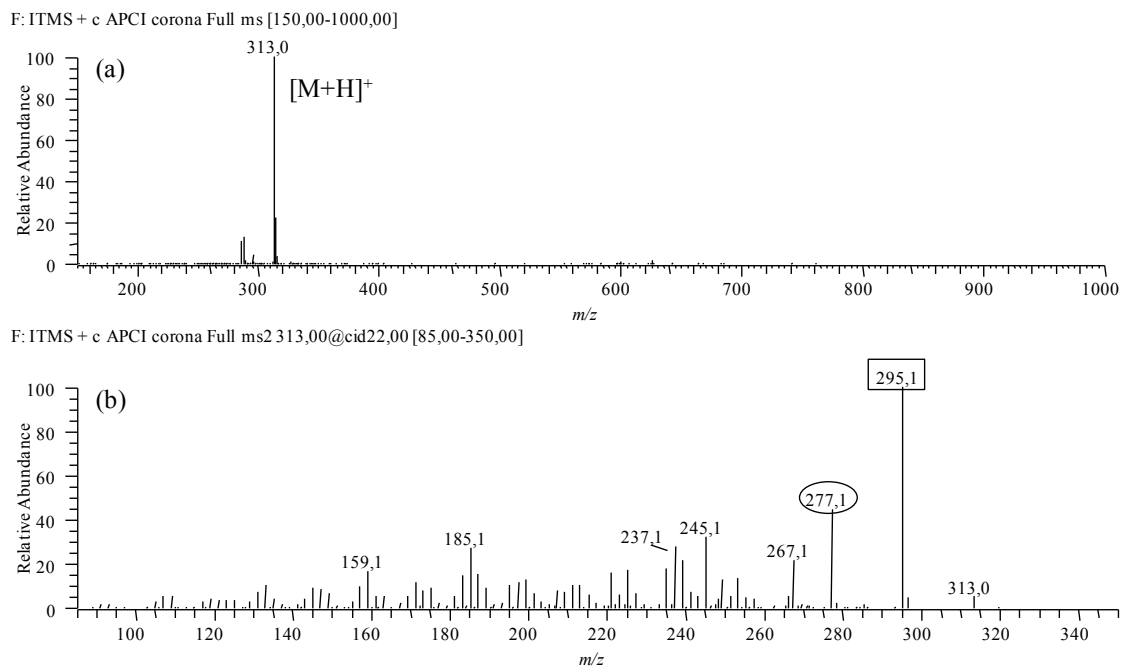
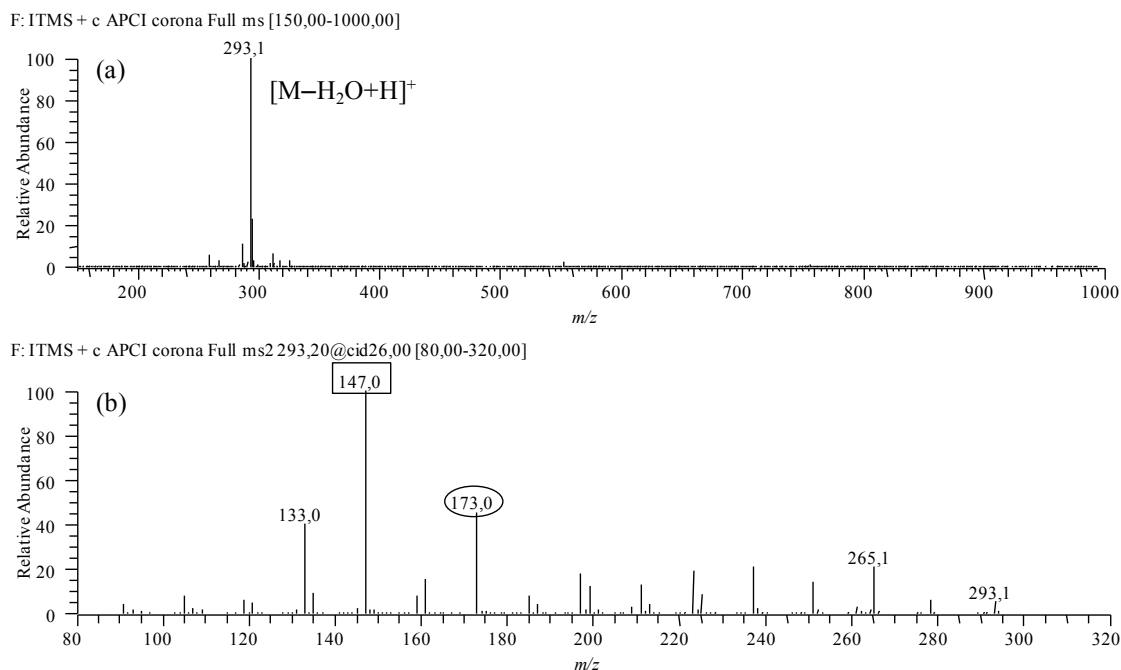
Slika 4.10. Maseni spektri 17α -etinilestradiola: (a) APCI(+) MS ;
(b) APCI(+) MS^2 $[M-H_2O+H]^+$.



Slika 4.11. Maseni spektri 17 β -estradiola: (a) APCI(+) MS^1 ; (b) APCI(+) MS^2 $[M-H_2O+H]^+$.



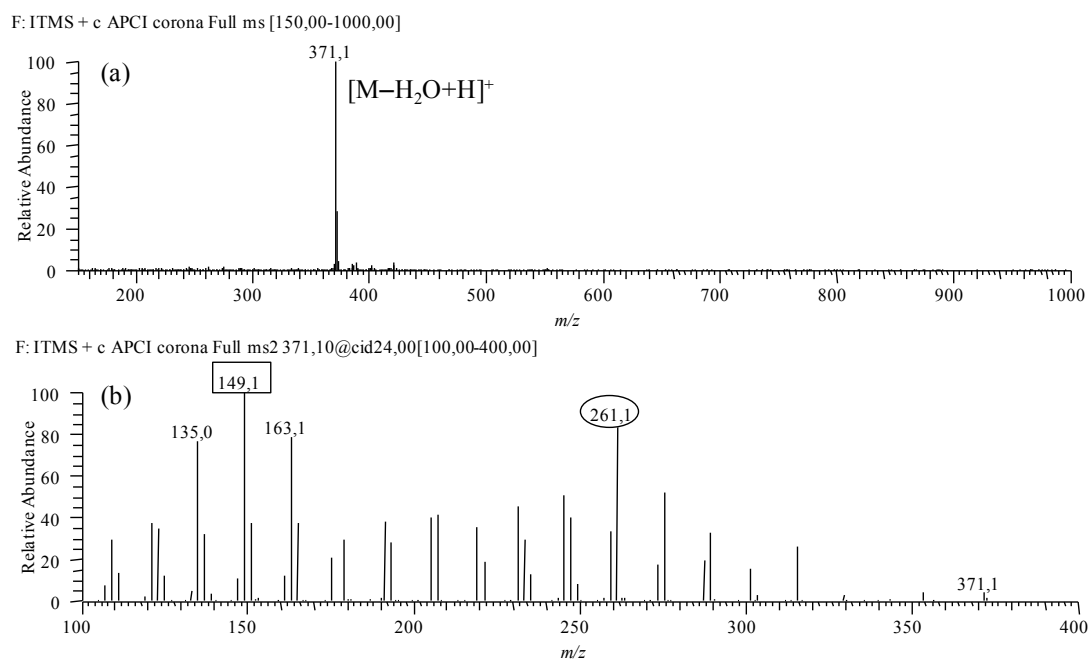
Slika 4.12. Maseni spektri 17 α -estradiola: (a) APCI(+) MS^1 ; (b) APCI(+) MS^2 $[M-H_2O+H]^+$.

Slika 4.13. Maseni spektri levonorgestrela: (a) APCI(+) MS ; (b) APCI(+) $MS^2 [M+H]^+$.Slika 4.14. Maseni spektri mestranola: (a) APCI(+) MS ; (b) APCI(+) $MS^2 [M-H_2O+H]^+$.

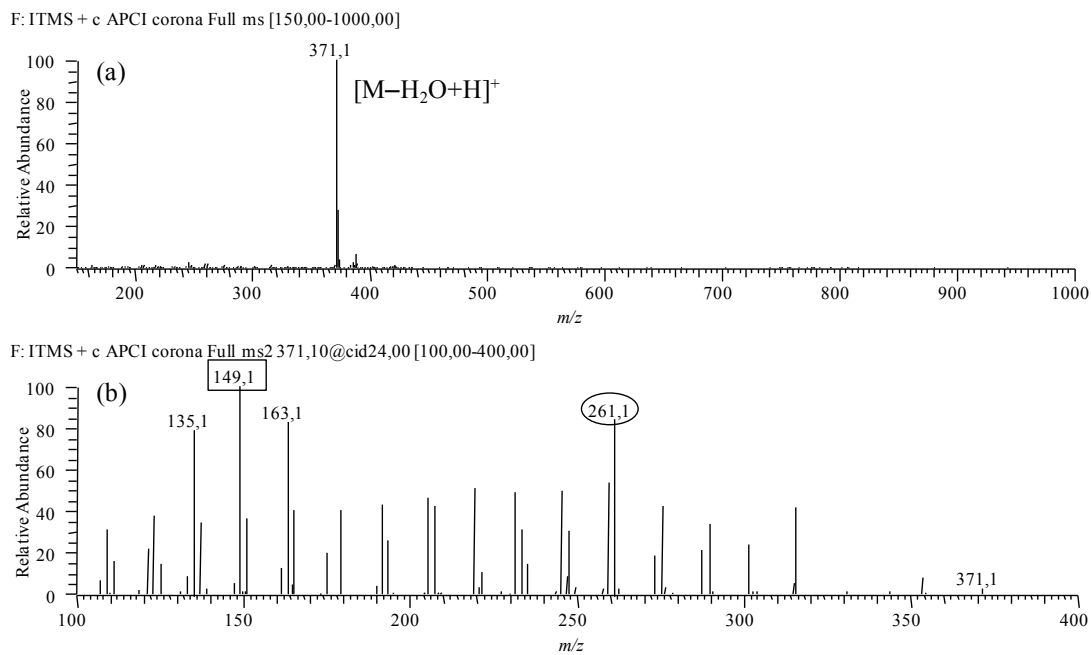
U slučaju steroidnih hormona estriola (slika 4.6), 17α -etinilestradiola (slika 4.10), 17β - i 17α -estradiola (slike 4.11 i 4.12) i mestranola (slika 4.14) za prekursor jone odabrani su protonovani dehidratirani molekuli analita ($[M-H_2O+H]^+$), kao dominantni

joni u MS spektru. Estron (slika 4.7), ekvilin (slika 4.8), noretindron (slika 4.9) i levonorgestel (slika 4.13) u procesu hemijske jonizacije na atmosferskom pritisku kao dominantne jone u MS spektru formiraju protonovane molekule analita ($[M+H]^+$). Kao što se može videti na slikama 4.6 i 4.7, estriol i estron imaju identične MS^n reakcije fragmentacije, tj. u procesu hemijske jonizacije na atmosferskom pritisku formiraju isti prekursor jon (m/z 271) i iste fragmentne jone za kvantifikaciju i potvrdu prisustva analita. Isti slučaj je i sa 17β - i 17α -estradiolom, koji imaju istu relativnu molekulsku masu, a razlikuju se samo u položaju hidroksilne grupe. U procesu jonizacije oba hormona nastaje isti prekursor jon, a daljom fragmentacijom nastaju isti fragmenti joni (slike 4.11 i 4.12). U prethodnom istraživanju (Matějček *et al.*, 2007) je takođe pokazano da 17α - i 17β -estradiol jonizacijom daju identične masene spektre. Razlikovanje analita sa identičnim MS^n reakcijama za kvantifikaciju i potvrdu prisustva može se postići samo potpunim tečno-hromatografskim razdvajanjem.

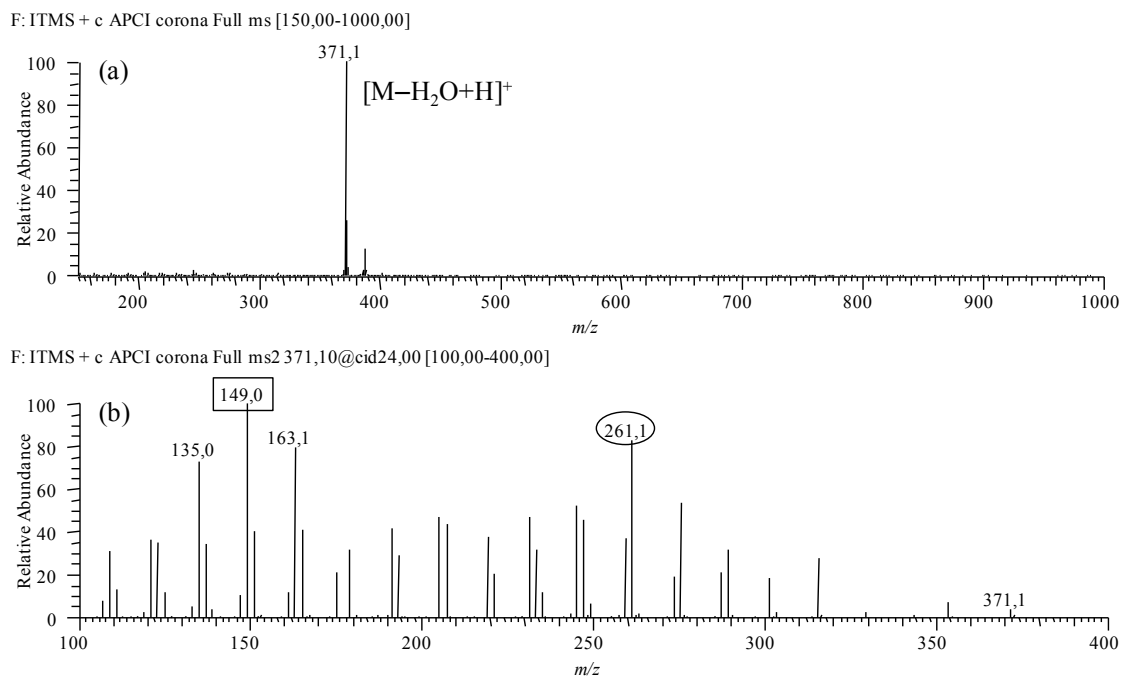
Maseni spektri odabranih humanih/životinjskih sterola su prikazani na slikama 4.15–4.20.



Slika 4.15. Maseni spektri epikoprostanola: (a) APCI(+)-MS;
(b) APCI(+)- MS^2 $[M-H_2O+H]^+$.

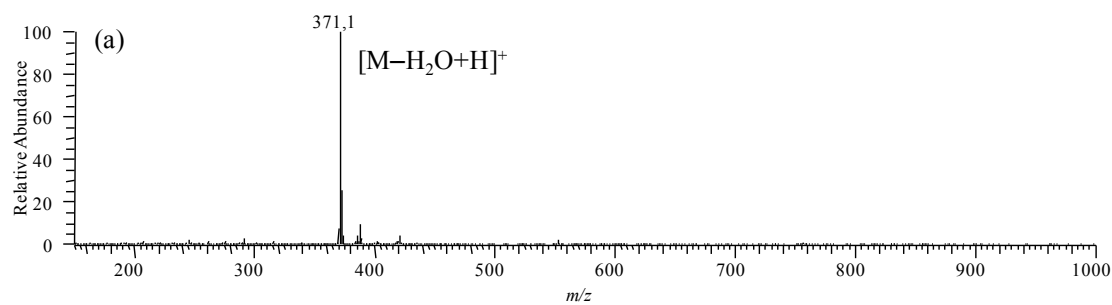


Slika 4.16. Maseni spektri epiholestanola: (a) APCI(+) MS ; (b) APCI(+) $MS^2 [M-H_2O+H]^+$.

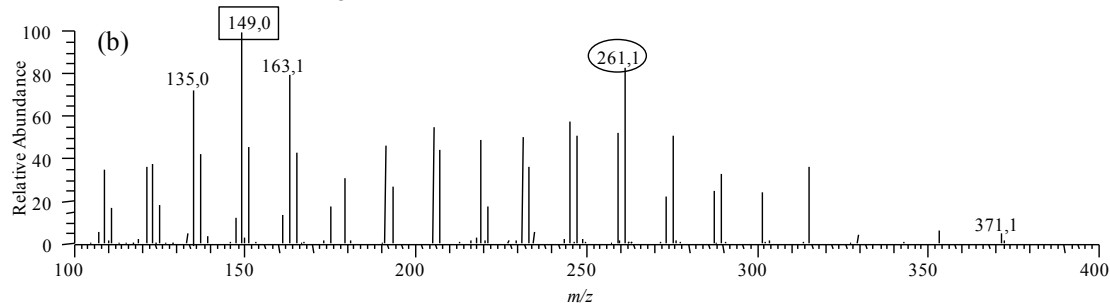


Slika 4.17. Maseni spektri koprostanola: (a) APCI(+) MS ; (b) APCI(+) $MS^2 [M-H_2O+H]^+$.

F: ITMS + c APCI corona Full ms [150,00-1000,00]

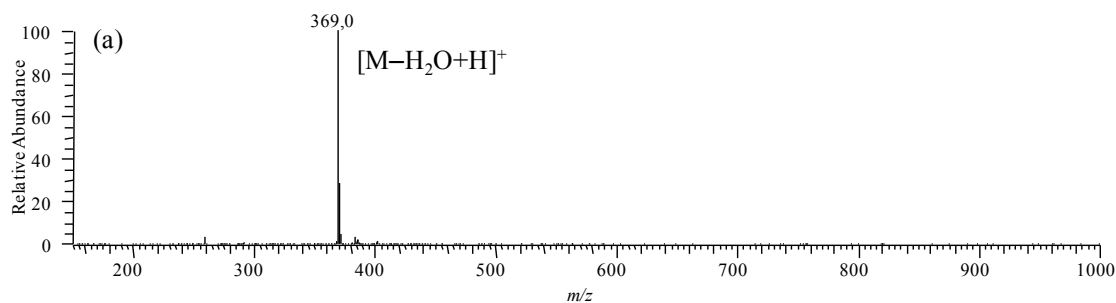


F: ITMS + c APCI corona Full ms2 371,10@cid24,00 [100,00-400,00]

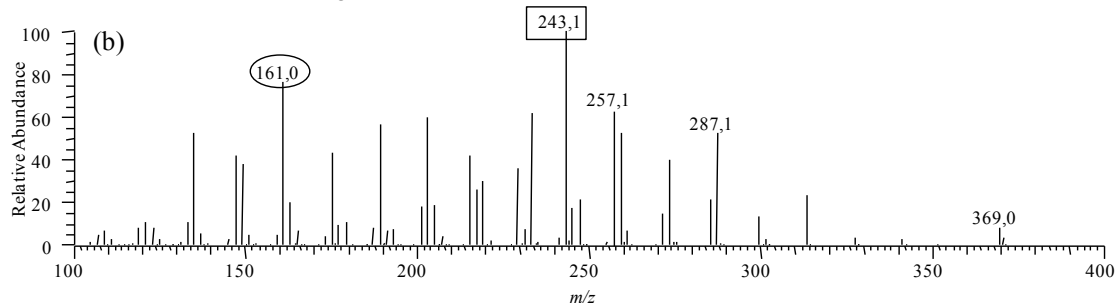


Slika 4.18. Maseni spektri holestanola: (a) APCI(+) MS ; (b) APCI(+) MS^2 $[M-H_2O+H]^+$.

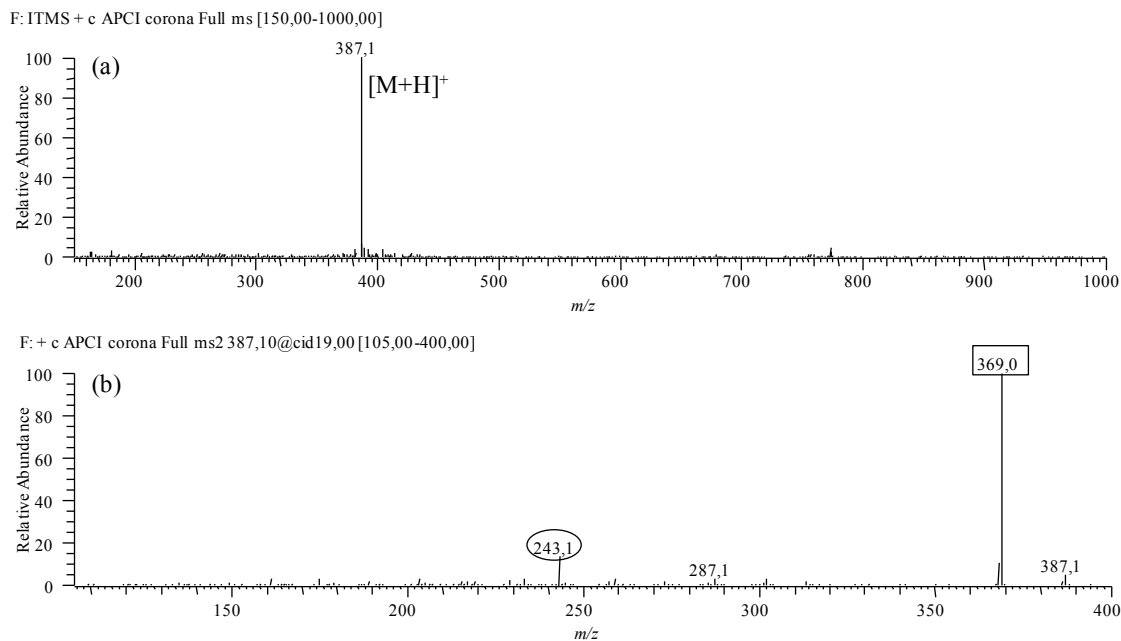
F: ITMS + c APCI corona Full ms [150,00-1000,00]



F: ITMS + c APCI corona Full ms2 369,00@cid24,00 [100,00-400,00]



Slika 4.19. Maseni spektri holesterola: (a) APCI(+) MS ; (b) APCI(+) MS^2 $[M-H_2O+H]^+$.

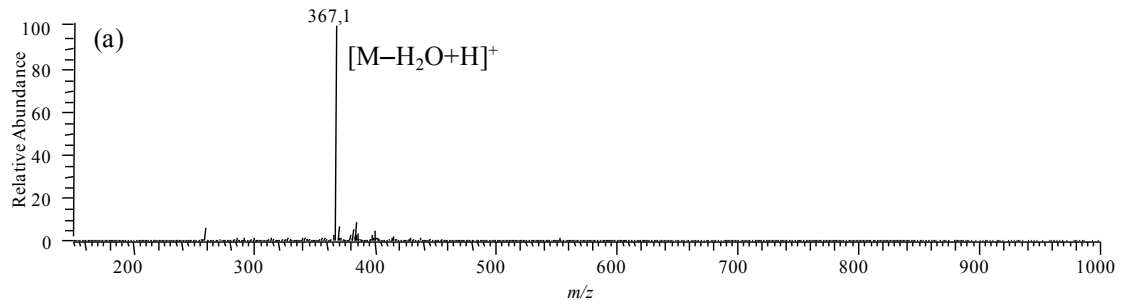


Slika 4.20. Maseni spektri holestanona: (a) APCI(+) MS ; (b) APCI(+) MS^2 $[M+H]^+$.

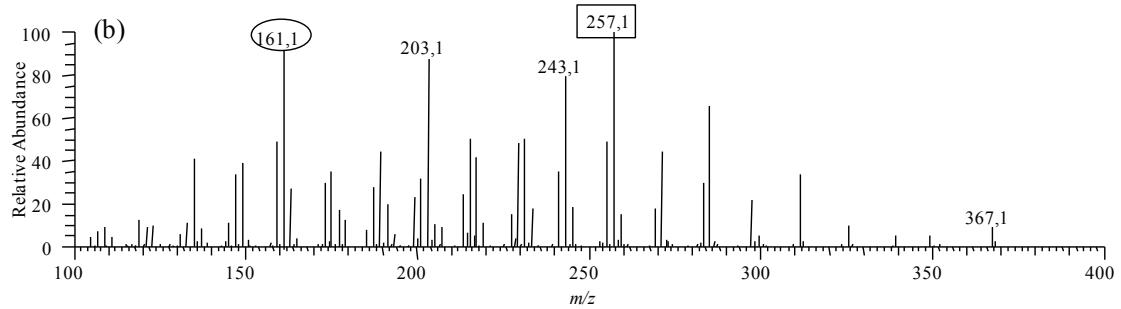
Kao dominantni joni u MS spektrima većine humanih/životinjskih sterola izdvajaju se protonovani dehidratisani molekuli (slike 4.15–4.19). Samo u slučaju holestanona, kao prekursor jon u procesu hemijske jonizacije na atmosferskom pritisku nastaje protonovani molekul (slika 4.20). Maseno-spektrometrijskom analizom četiri izomera: epikoprostanola, epiholestanola, koprostanola i holestanola, dobijene su iste MS^n reakcije fragmentacije. Teškoće u razdvajanju stereoizomera epikoprostanola, koprostanola i holestanola su zabeležene u literaturi (Bataglioni *et al.*, 2015). Međutim, iako ovi analiti imaju identične MS^n reakcije fragmentacije, njihovo razdvajanje se može postići optimizacijom hromatografskih uslova.

Maseni spektri izabranih biljnih sterola prikazani su na slikama 4.21–4.25.

F: ITMS + c APCI corona Full ms [150,00-1000,00]

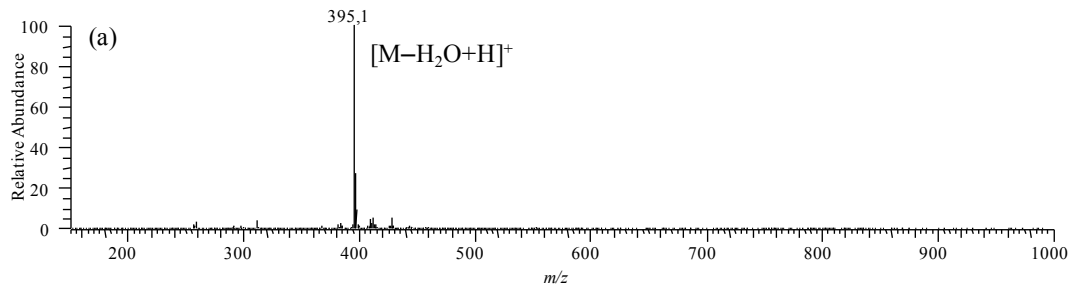


F: ITMS + c APCI corona Full ms2 367,10@cid26,00 [100,00-400,00]

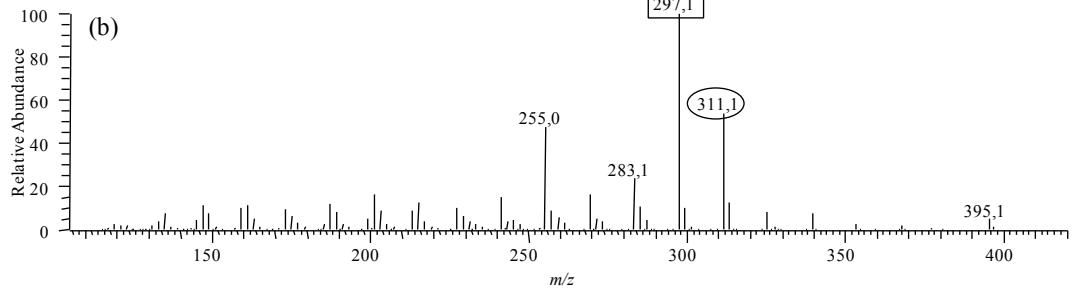


Slika 4.21. Maseni spektri dezmosterola: (a) APCI(+) MS ; (b) APCI(+) MS^2 $[M-H_2O+H]^+$.

F: ITMS + c APCI corona Full ms [150,00-1000,00]

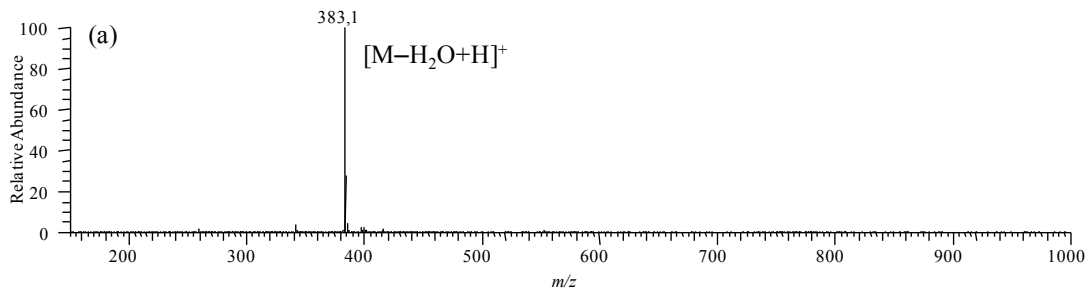


F: ITMS + c APCI corona Full ms2 395,10@cid24,00 [105,00-420,00]

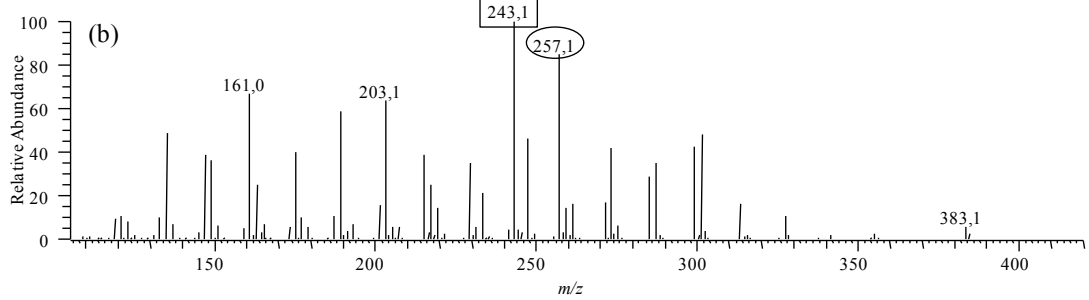


Slika 4.22. Maseni spektri stigmasterola: (a) APCI(+) MS ; (b) APCI(+) MS^2 $[M-H_2O+H]^+$.

F: ITMS + c APCI corona Full ms [150,00-1000,00]

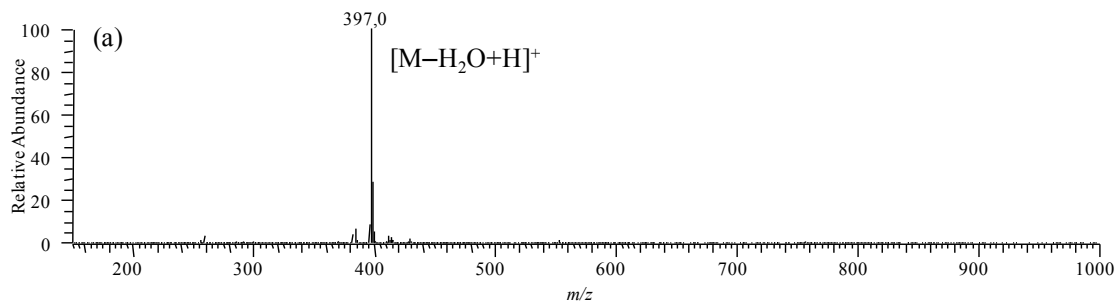


F: ITMS + c APCI corona Full ms2 383,10@cid25,00 [105,00-420,00]

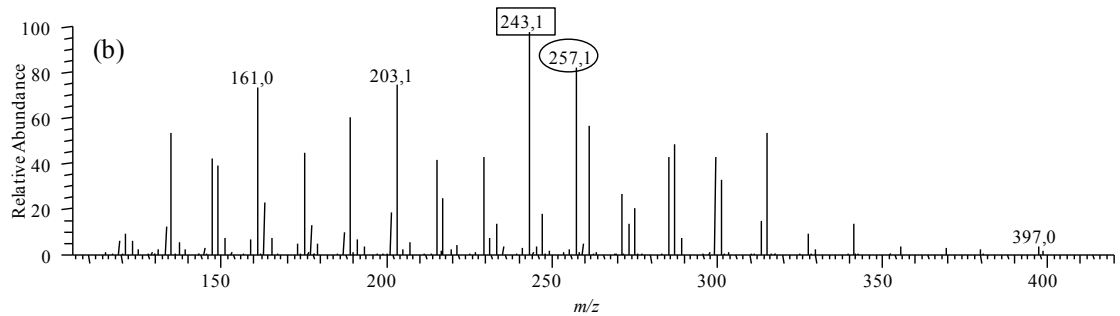


Slika 4.23. Maseni spektri kampesterola: (a) APCI(+) MS ; (b) APCI(+) $MS^2 [M-H_2O+H]^+$.

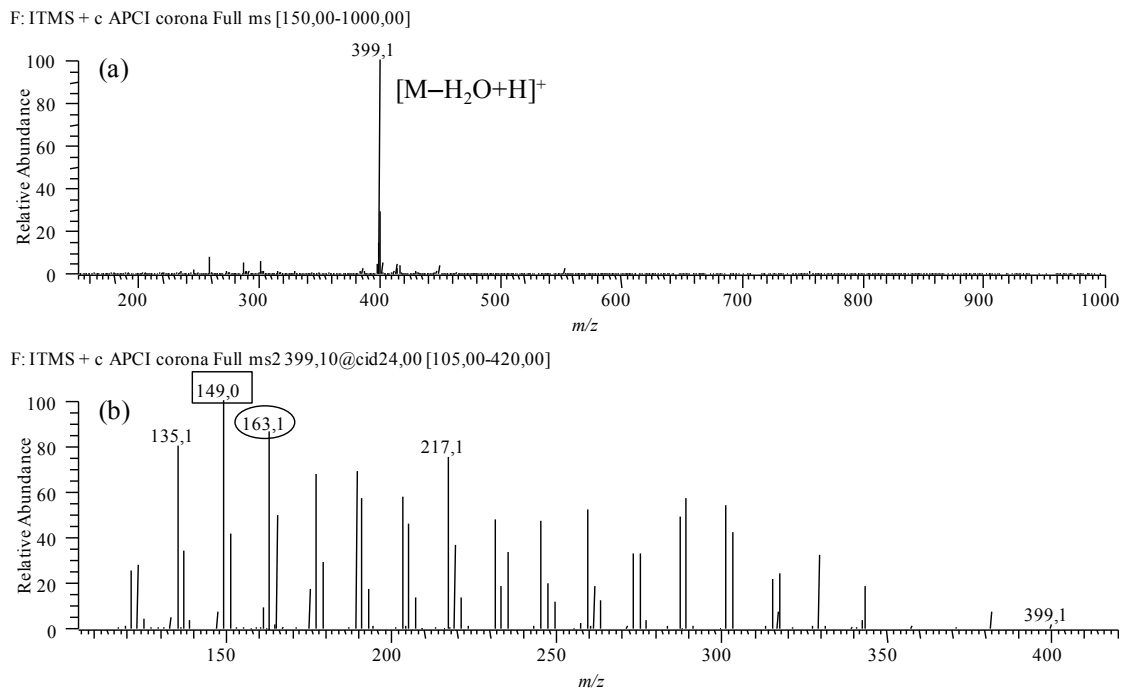
F: ITMS + c APCI corona Full ms [150,00-1000,00]



F: ITMS + c APCI corona Full ms2 397,00@cid25,00 [105,00-420,00]



Slika 4.24. Maseni spektri β -sitosterola: (a) APCI(+) MS ; (b) APCI(+) $MS^2 [M-H_2O+H]^+$.



Slika 4.25. Maseni spektri sitostanola: (a) APCI(+) MS^1 ; (b) APCI(+) MS^2 $[M-H_2O+H]^+$.

U procesu hemijske jonizacije na atmosferskom pritisku biljni steroli formiraju samo dehidratisane protonovane molekule analita (slike 4.21–4.25). Najintenzivniji fragmentni joni odabranih biljnih sterola dobijeni u drugom stupnju MS analize su korišćeni za kvantifikaciju i potvrdu prisustva ispitivanih analita.

Nakon izbora prekursor jona analita, u daljoj maseno-spektrometrijskoj analizi je optimizovana kolizijska energija (eng. *collision energy*, CE), tj. energija sudara sa atomima helijuma, za dobijanje stabilnih i intenzivnih fragmentnih jona. Vrednosti kolizijske energije izražene su u procentima, na skali 0–100% koja je definisana LTQ XL sistemom. Prilikom MS/MS fragmentacije ispitivanih analita nastaje više fragmentnih jona, koji se mogu dalje fragmentisati (MS^3 analiza). Za veliki broj analita dobijen je i stabilan MS^4 spektar. Na osnovu dobijenih rezultata, za svaki analit je odabrana karakteristična reakcija fragmentacije prekursor jona u najintenzivniji i najstabilniji fragmentni jon (reakcija kvantifikacije). Reakcija fragmentacije prekursor jona u fragmentni jon drugi po intenzitetu izabrana je za reakciju potvrde prisustva analita, tj. za potvrdu pozitivnih rezultata u realnim uzorcima. Rezultati APCI- MS^n analize odabranih steroidnih jedinjenja prikazani su sumarno u tabeli 4.1. Dodatni MS^n spektri analiziranih steroidnih hormona i sterola dati su u Prilogu (slike 1–20).

Tabela 4.1. MSⁿ reakcije fragmentacije odabranih steroidnih jedinjenja u jonskom trapu.

Steroid	MS	CE (%)	MS ²	CE (%)	MS ³	CE (%)	MS ⁴
Estriol	271 [M-H ₂ O+H] ⁺	20	253	28	197	31	179
			197	31	179		
			157	37	130		
Estron	271 [M+H] ⁺	20	253	28	197	31	179
			197	31	179		
			157	37	130		
Ekvilin	269 [M+H] ⁺	23	251	31	209	33	181
			211	32	183	31	165
Noretindron	299 [M+H] ⁺	23	281	29	263	30	221
			263	30	221		
			223				
			239				
17 α -Etinilestradiol	279 [M-H ₂ O+H] ⁺	25	133	30	105	36	79
			159	33	131	32	91
			251	28	209	33	181
			223				
17 β -Estradiol	255 [M-H ₂ O+H] ⁺	22	159	34	131	33	91
			133	31	105		
			173				
			145				
17 α -Estradiol	255 [M-H ₂ O+H] ⁺	22	159	34	131	33	91
			133	31	105		
			173				
			145				
Levonorgestrel	313 [M+H] ⁺	22	295	29	277	30	235
			277	30	235		
			245				
			237				
Mestranol	293 [M-H ₂ O+H] ⁺	26	147	32	91	39	65
			173	31	158		
			133				
			265				

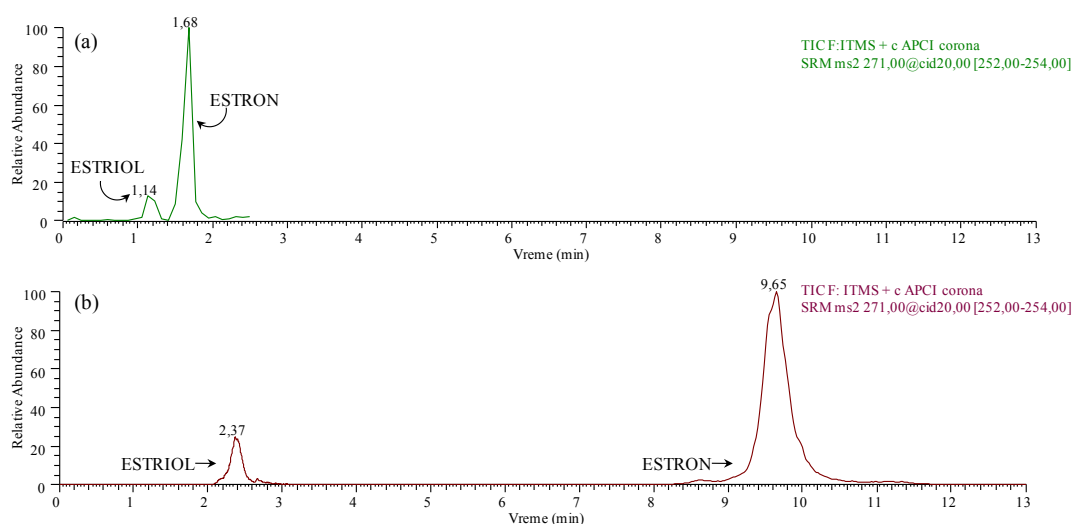
Tabela 4.1. (nastavak)

Steroid	MS	CE (%)	MS ²	CE (%)	MS ³	CE (%)	MS ⁴
Epikoprostanol	371 [M-H ₂ O+H] ⁺	24	149	28	121	28	93
			261	24	163	24	107
			163	24	107		
			135	26	107		
Epiholestanol	371 [M-H ₂ O+H] ⁺	24	149	28	121	28	93
			261	24	163	24	107
			163	24	107		
			135	26	107		
Koprostanol	371 [M-H ₂ O+H] ⁺	24	149	28	121	28	93
			261	24	163	24	107
			163	24	107		
			135	26	107		
Holestanol	371 [M-H ₂ O+H] ⁺	24	149	28	121	28	93
			261	24	163	24	107
			163	24	107		
			135	26	107		
Holesterol	369 [M-H ₂ O+H] ⁺	24	243	24	147	27	105
			161	27	119	30	91
			257				
			287				
Holestanon	387 [M+H] ⁺	19	369	25	243	25	147
			243	25	147		
			287				
Dezmosterol	367 [M-H ₂ O+H] ⁺	26	257	25	161	26	119
			161	26	119		
			203	25	147	28	105
			243				
Stigmasterol	395 [M-H ₂ O+H] ⁺	24	297	25	215	25	159
			311	25	201	27	145
			255				
			283				
Kampesterol	383 [M-H ₂ O+H] ⁺	25	243	24	147	27	105
			257	24	161	28	119
			161				
			203				
β-Sitosterol	397 [M-H ₂ O+H] ⁺	25	243	25	147	28	105
			257	24	161	26	119
			203				
			161				
Sitostanol	399 [M-H ₂ O+H] ⁺	24	149	27	121	28	93
			163	26	107	29	79
			135				
			217				

4.2. Optimizacija hromatografskog razdvajanja analita

Za optimizaciju hromatografskog razdvajanja odabranih steroidnih hormona i sterola ispitivani su različiti sastavi mobilne faze sačinjene od dejonizovane vode i metanola ili acetonitrila. Na samom početku je uočeno da ispitivani hormoni, bez obzira na sastav mobilne faze, ispoljavaju slab afinitet prema Zorbax Eclipse[®] XDB-C₁₈ hromatografskoj koloni i da se eluiraju sa kolone sa kratkim retencionim vremenom. Kako bi se povećalo retenciono vreme i poboljšalo hromatografsko razdvajanje steroidnih hormona testirana je HFBA, kao aditiv koji pospešuje stvaranje jonskih parova, u koncentraciji od 0,1% u mobilnoj fazi. Međutim, primena ovog reagensa nije značajno uticala na zadržavanje analita na koloni.

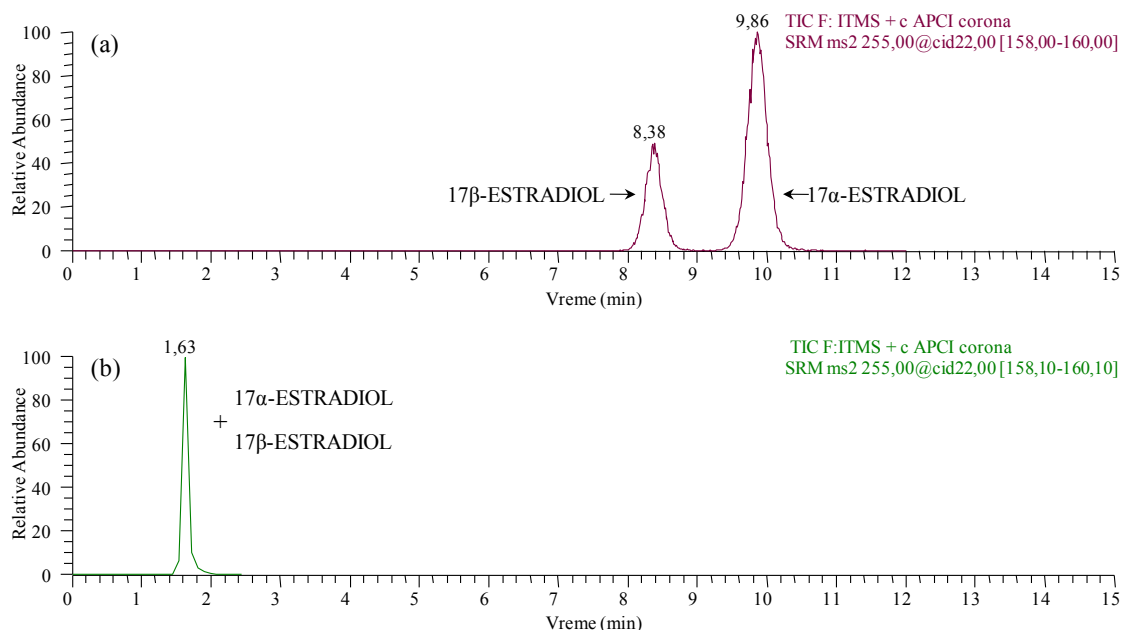
Poseban izazov u optimizaciji hromatografskog razdvajanja odabranih steroida predstavljaju analiti sa identičnim MSⁿ reakcijama za kvantifikaciju i potvrdu prisustva. Njihovo razlikovanje može se postići samo potpunim hromatografskim razdvajanjem. Steroidni hormoni estriol i estron, kao i 17 β - i 17 α -estradiol su primeri takvih analita. Delimično razdvajanje estriola i estrona postignuto je već pri sastavu mobilne faze od 85% metanola i 15% vode, pri čemu je razlika u retencionim vremenima iznosila oko 0,5 min (slika 4.26a). Međutim, optimalno hromatografsko razdvajanje ovih hormona postignuto je korišćenjem mobilne faze sastava 55% metanola i 45% vode (slika 4.26b).



Slika 4.26. Hromatografsko razdvajanje estriola i estrona pri sastavu mobilne faze:

(a) 85% CH₃OH:15% H₂O; (b) 55% CH₃OH:45% H₂O.

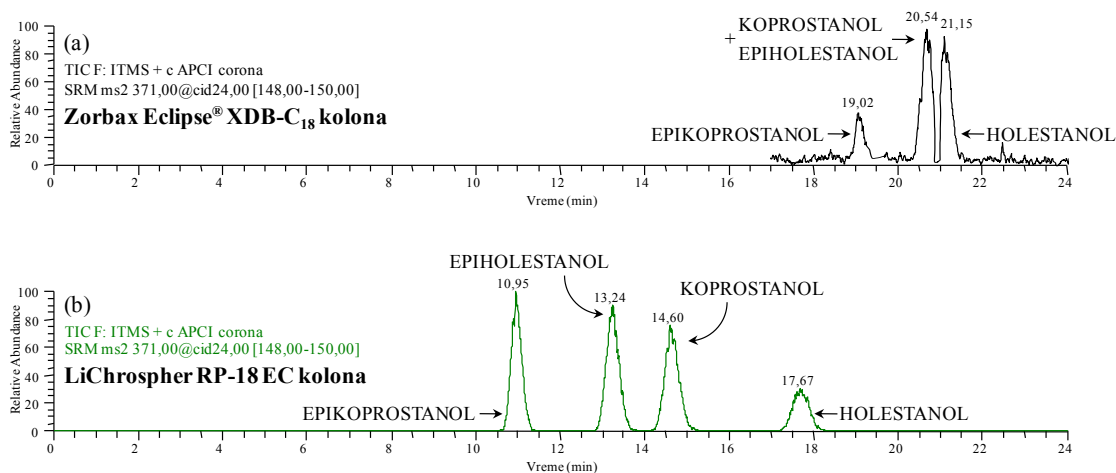
Ustanovljeno je da se potpuno hromatografsko razdvajanje 17β - i 17α -estradiola postiže samo kada je udeo metanola u mobilnoj fazi manji od 55% (slika 4.27a). Sa povećanjem sadržaja metanola u mobilnoj fazi dolazi do preklapanja pikova dva izomera (slika 4.27b).



Slika 4.27. Hromatografsko razdvajanje 17β - i 17α -estradiola pri sastavu mobilne faze: (a) 55% CH_3OH :45% H_2O ; (b) 85% CH_3OH :15% H_2O .

Nasuprot hormonima, steroli pokazuju značajno veći afinitet prema Zorbax Eclipse[®] XDB- C_{18} hromatografskoj koloni i eluiraju se sa dužim retencionim vremenom. Ispitivanjem različitih sastava mobilne faze utvrđeno je da se eluiranje svih sterola sa ove kolone postiže samo pri sastavu mobilne faze od 100% organskog rastvarača. U slučaju četiri humana/životinjska sterola sa identičnim reakcijama fragmentacije u masenom detektoru, prilikom optimizacije hromatografskog razdvajanja na Zorbax Eclipse[®] XDB- C_{18} koloni dobijen je triplet u masenom hromatogramu (slika 4.28a). Naime, na ovoj koloni nije bilo moguće razdvojiti epiholestanol i koprostanol, pa se kvantifikacija ovih analita mogla uraditi sumarno. S obzirom na to da je koprostanol ključni sterol u većini odnosa sterola za identifikaciju humane fekalne kontaminacije (tabela 2.4), kao i za razlikovanje izvora zagađenja (tabela 2.5), njegovo hromatografsko razdvajanje od epiholestanola je bilo neophodno. Iako se tragovi

epiholestanola veoma retko određuju (Cordeiro *et al.*, 2008; Leeming *et al.*, 2015), njegovo prisustvo u sedimentima se ne može zanemariti. Ukoliko nije razdvojen od koprostanola, epiholestanol može značajno da utiče na koncentraciju detektovanog koprostanola i time na izračunate vrednosti odnosa sterola. Kako bi se poboljšalo hromatografsko razdvajanje četiri humana/životinjska sterola sa identičnim MSⁿ reakcijama fragmentacije, pored Zorbax Eclipse[®] XDB-C₁₈ kolone (4,6 mm × 75 mm × 3,5 μm), testirane su još dve: duža LiChrospher RP-18 EC kolona sa većim česticama (4,6 mm × 250 mm × 5 μm) i kraća Hypersil GOLD kolona sa manjim česticama (2,1 mm × 50 mm × 1,9 μm; Thermo Scientific, SAD). Bez obzira na sastav i gradijent mobilne faze, Hypersil GOLD kolona nije bila efikasna u razdvajanju četiri izomera. Potpuno hromatografsko razdvajanje četiri humana/životinjska sterola postignuto je na LiChrospher RP-18 EC koloni (slika 4.28b) pri sastavu mobilne faze prikazanom u tabeli 3.2.



Slika 4.28. Hromatografsko razdvajanje četiri humana/životinjska sterola sa identičnim MSⁿ reakcijama fragmentacije na koloni: (a) Zorbax Eclipse[®] XDB-C₁₈; (b) LiChrospher RP-18 EC.

4.3. Optimizacija LC-MS/MS parametara

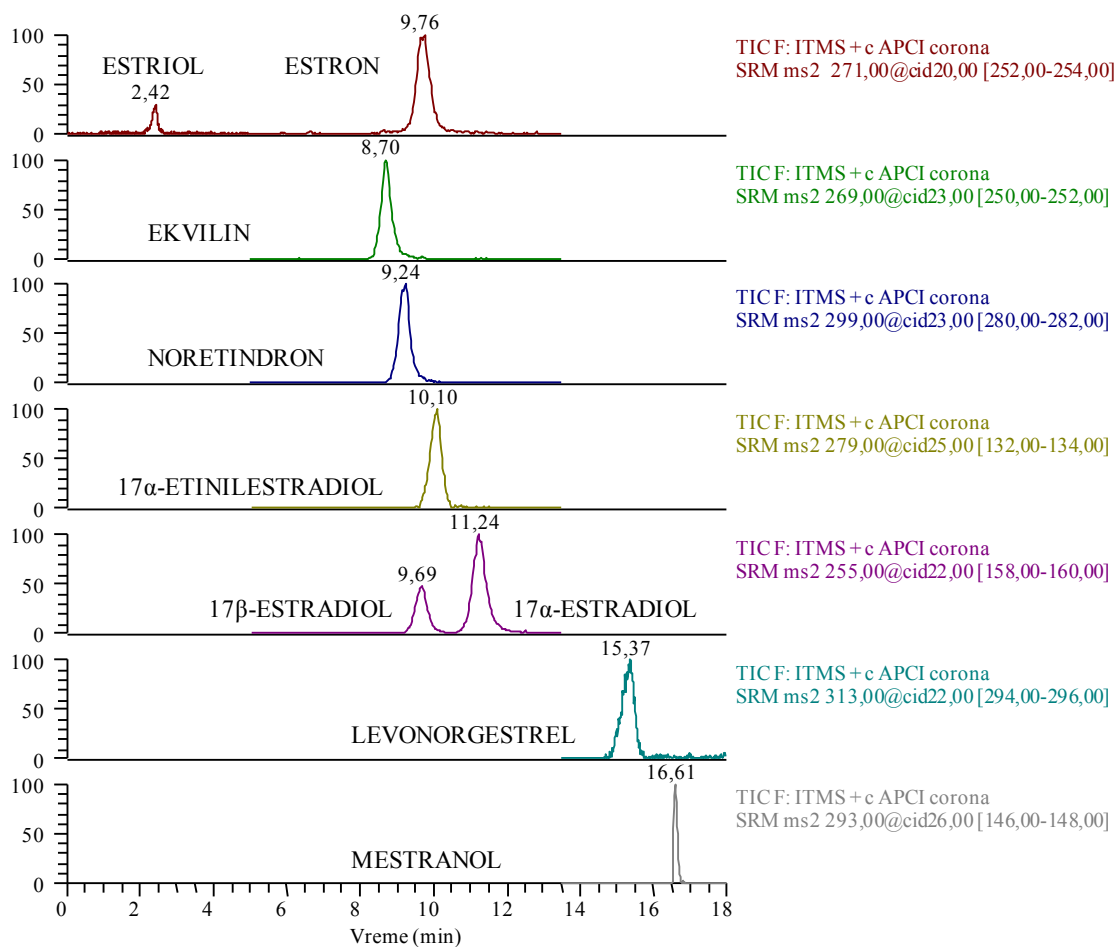
Na osnovu rezultata MSⁿ analize, za kvantifikaciju svakog analita odabrana je karakteristična reakcija fragmentacije prekursor jona u najintenzivniji i najstabilniji fragmentni jon, uz optimizovanu kolizionu energiju. Rezultati su prikazani u tabeli 4.2.

SRM detekcija jona je podjeljena u dve instrumentalne metode, pri čemu je hromatografsko razdvajanje steroidnih hormona vršeno na Zorbax Eclipse[®] XDB-C₁₈ koloni, a sterola na LiChrospher RP-18 EC koloni. Detekcija jona odabranih hormona je podjeljena na tri vremenska segmenta, dok je detekcija jona sterola podjeljena na četiri vremenska segmenta. U svakom segmentu su sakupljeni podaci za maksimalno četiri reakcije fragmentacije.

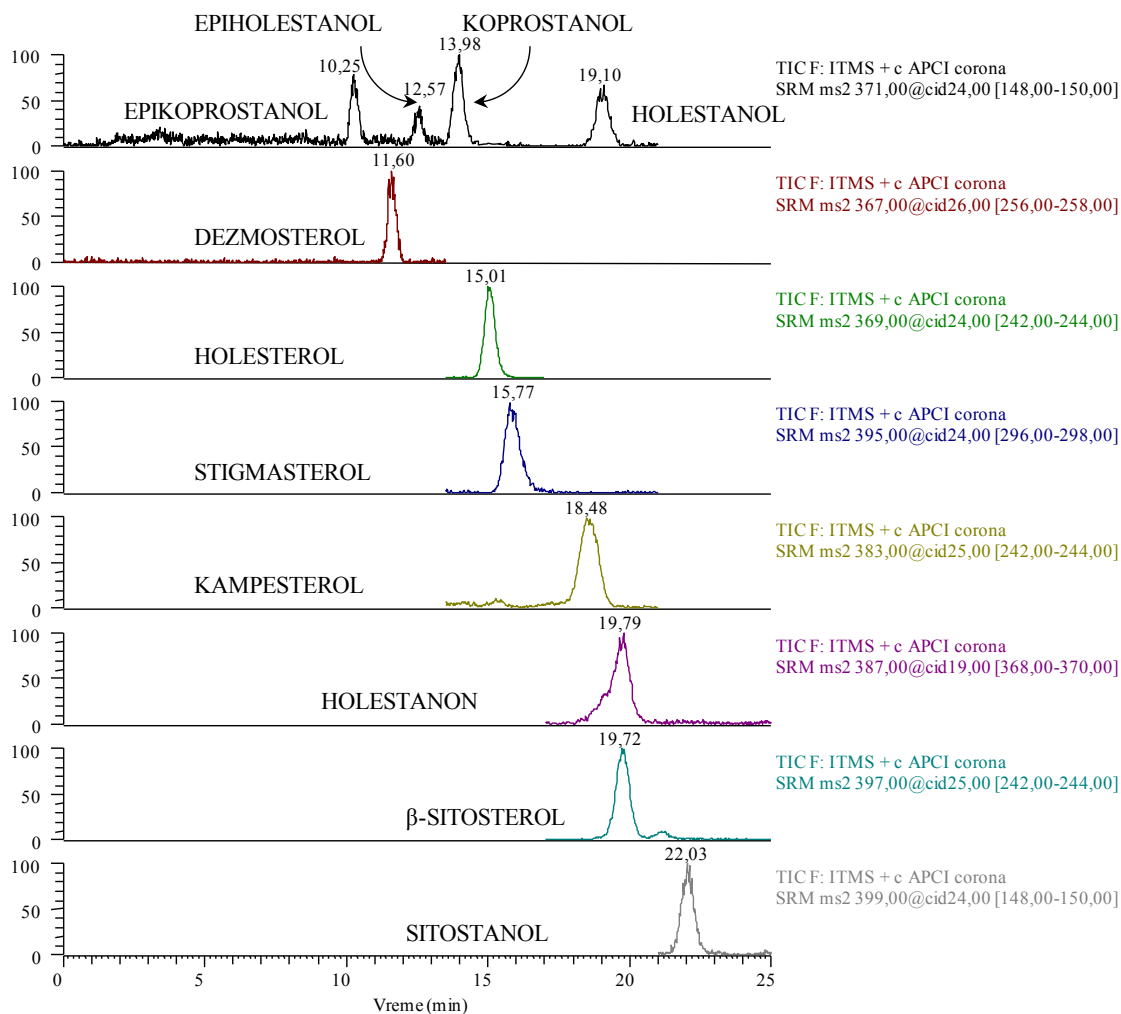
Tabela 4.2. LC-MS/MS parametri za kvantitativno određivanje odabranih steroidnih jedinjenja.

HORMONI	VREMENSKI SEGMENT (min)	PREKURSORSKI JON (m/z)	KOLIZIJSKA ENERGIJA (%)	FRAGMENTNI JON (m/z)
Zorbax Eclipse[®] XDB-C₁₈ kolona				
Estriol	I (0,0–5,0)	271	20	253
Estron	I i II (0,0–13,5)	269	23	251
Ekvilin		299	23	281
Noretindron		279	25	133
17 α - -Ethinilestradiol	II (5,0–13,5)	255	22	159
17 β -Estradiol		313	22	295
17 α -Estradiol		293	26	147
Levonorgestrel	III (13,5–18,0)			
Mestranol				
LiChrospher RP-18 EC kolona				
Epikoprostanol				
Epiholestanol	I–III (0,0–21,0)	371	24	149
Koprostanol				
Holestanol				
Dezmosterol	I (0,0–13,5)	367	26	257
Holesterol	II (13,5–17,0)	369	24	243
Stigmasterol	II i III	395	24	297
Kampesterol	(13,5–21,0)	383	25	243
Holestanon	III i IV	387	19	369
β -Sitosterol	(17,0–25,0)	397	25	243
Sitostanol	IV (21,0–25,0)	399	24	149

LC-MS/MS analizom smeše odabranih steroidnih jedinjenja dobijeni su SRM hromatogrami, tj. maseni hromatogrami odabranih reakcija fragmentacije za svaki analit. Karakteristični maseni hromatogrami dobijeni LC-MS/MS analizom ekstrakta sedimenta pri koncentraciji od 100 ng g^{-1} prikazani su na slikama 4.29 (smeša steroidnih hormona) i 4.30 (smeša humanih/životinjskih i biljnih sterola).



Slika 4.29. Maseni hromatogrami smeše odabranih steroidnih hormona dobijeni LC-MS/MS analizom ekstrakta sedimenta pri koncentraciji od 100 ng g^{-1} .



Slika 4.30. Maseni hromatogrami smeše odabranih sterola dobijeni LC-MS/MS analizom ekstrakta sedimenta pri koncentraciji od 100 ng g⁻¹.

4.4. Ultrazvučna ekstrakcija odabranih steroidnih jedinjenja

4.4.1. Izbor optimalnog rastvarača za ultrazvučnu ekstrakciju

Prilikom izbora optimalnog rastvarača za ekstrakciju odabranih analita iz sedimenata testirana su četiri slabo polarna rastvarača (metanol, etil-acetat, aceton i acetonitril) i dva nepolarna rastvarača (heksan i dihlormetan). Rezultati eksperimenta su predstavljeni u tabeli 4.3.

Tabela 4.3. Prinosi odabranih steroidnih jedinjenja pri ultrazvučnoj ekstrakciji rastvaračima različite polarnosti.

Steroid	Prinos, % (RSD, %)					
	CH ₃ OH	CH ₃ COOC ₂ H ₅	CH ₃ COCH ₃	CH ₃ CN	C ₆ H ₁₄	CH ₂ Cl ₂
Hormoni						
Estriol	82 (6)	96 (17)	94 (16)	57 (16)	0	34 (7)
Estron	80 (9)	88 (17)	69 (28)	99 (14)	0	30 (9)
Ekvilin	85 (19)	78 (29)	87 (19)	83 (19)	0	101 (2)
Noretindron	81 (13)	84 (28)	79 (17)	83 (17)	0	15 (19)
17 α -Etinilestradiol	104 (6)	83 (28)	80 (24)	72 (6)	0	78 (5)
17 β -Estradiol	82 (8)	91 (11)	101 (27)	90 (19)	0	45 (5)
17 α -Estradiol	89 (12)	93 (6)	95 (17)	82 (7)	0	53 (12)
Levonorgestrel	91 (12)	71 (27)	94 (1)	99 (23)	0	53 (21)
Mestranol	92 (9)	127 (11)	113 (13)	69 (26)	0	83 (15)
Humani/životinjski steroli						
Epikoprostanol	97 (10)	126 (1)	88 (28)	90 (20)	43 (10)	114 (1)
Epiholestanol	98 (5)	112 (15)	92 (18)	115 (12)	65 (8)	116 (8)
Koprostanol	119 (2)	101 (28)	88 (20)	127 (8)	69 (19)	121 (13)
Holestanol	87 (13)	60 (27)	120 (27)	70 (26)	48 (27)	137 (1)
Holesterol	98 (9)	110 (10)	113 (16)	97 (22)	52 (24)	117 (8)
Holestanon	102 (13)	101 (1)	57 (24)	71 (2)	0	95 (14)
Biljni steroli						
Dezmosterol	80 (13)	84 (29)	93 (17)	95 (26)	0	90 (12)
Stigmasterol	88 (6)	120 (7)	90 (16)	103 (19)	63 (11)	96 (14)
Kampesterol	100 (12)	82 (20)	104 (5)	97 (29)	29 (7)	99 (17)
β -Sitosterol	103 (10)	102 (26)	106 (11)	91 (23)	27 (21)	101 (8)
Sitostanol	114 (18)	109 (29)	121 (20)	105 (16)	19 (19)	97 (5)

Prilikom snimanja masenih spektara odabranih steroidnih jedinjenja potvrđeno je da su hormoni polarniji od sterola jer ih je bilo moguće jonizovati i pomoću elektrosprej tehnike (slike 4.1–4.5). To se može zaključiti i na osnovu hemijskih struktura sa više polarnih funkcionalnih grupa u odnosu na humane/životinjske i biljne sterole (tabela 3.1). U skladu sa polarnošću steroidnih hormona, visoki prinosi su dobijeni prilikom ekstrakcije sa slabo polarnim rastvaračima, odnosno niski prinosi sa nepolarnim rastvaračima.

Najviši prinosi svih ispitivanih steroida su dobijeni korišćenjem metanola kao rastvarača za ekstrakciju (80–119%, tabela 4.3), sa vrednostima relativnih standardnih devijacija manjim od 19%. Etil-acetat se pokazao kao efikasan u ekstrakciji većine steroidnih jedinjenja (71–127%), dok je nizak prinos dobijen u slučaju holestanola (60%). Međutim, prilikom ekstrakcije etil-acetatom, ponovljivost metode nije bila dobra

za čak devet analita (RSD > 20%). Pri ekstrakciji acetonom zapažen je pad prinosa ispod 70% za estron (69%) i holestanon (57%), kao i povećane vrednosti RSD za šest ispitivanih analita. Prinosi analita korišćenjem acetonitrila kao rastvarača za ekstrakciju su bili zadovoljavajući za većinu ispitivanih steroida (70–127%), uz izuzetak estriola (57%) i mestranola (69%). Za sedam steroida ekstrahovanih acetonitriplom ponovljivost metode nije bila dobra.

Što se tiče nepolarnih rastvarača (tabela 4.3), efikasnost ekstrakcije heksanom je bila izuzetno niska za sve ispitivane analite. Steroidni hormoni nisu ekstrahovani pomoću heksana. Niski prinosi su dobijeni za humane/životinjske sterole (43–69%), kao i biljne sterole (19–63%), a za ekstrakciju holestanona i dezmosterola heksan nije bio efikasan. Prilikom ekstrakcije dihlormetanom, za većinu ispitivanih steroidnih hormona efikasnost ekstrakcije je bila niska (15–53%). Međutim, visoki prinosi su dobijeni za ekvilin (101%), 17 α -etinilestradiol (78%) i mestranol (83%), kao i za sve humane/životinjske (95–137%) i biljne sterole (90–101%). Vrednosti RSD za analite ekstrahovane sa visokim prinosom su bile manje od 17%.

Upoređivanjem prinosa analita dobijenih ekstrakcijom etil-acetatom (60–127%), acetonom (57–121%) i acetonitriplom (57–127%) može se zaključiti da su ova tri rastvarača podjednako efikasna u ekstrakciji odabranih jedinjenja. Međutim, biljni steroli su nešto efikasnije ekstrahovani acetonitriplom (91–105%) nego metanolom (80–114%), za koji je već utvrđeno da je najpovoljniji rastvarač za ekstrakciju svih hormona i sterola. Zbog toga su za dalje eksperimente, kao dva najefikasnija rastvarača, odabrani metanol i acetonitril. Pošto su sa čistim metanolom dobijeni najbolji prinosi, ispitane su smeše sa acetonitriplom u kojima je udeo metanola variran od 60% do 95%, a radi poređenja je ponovljena ekstrakcija sa čistim metanolom. Rezultati eksperimenata prikazani su u tabeli 4.4.

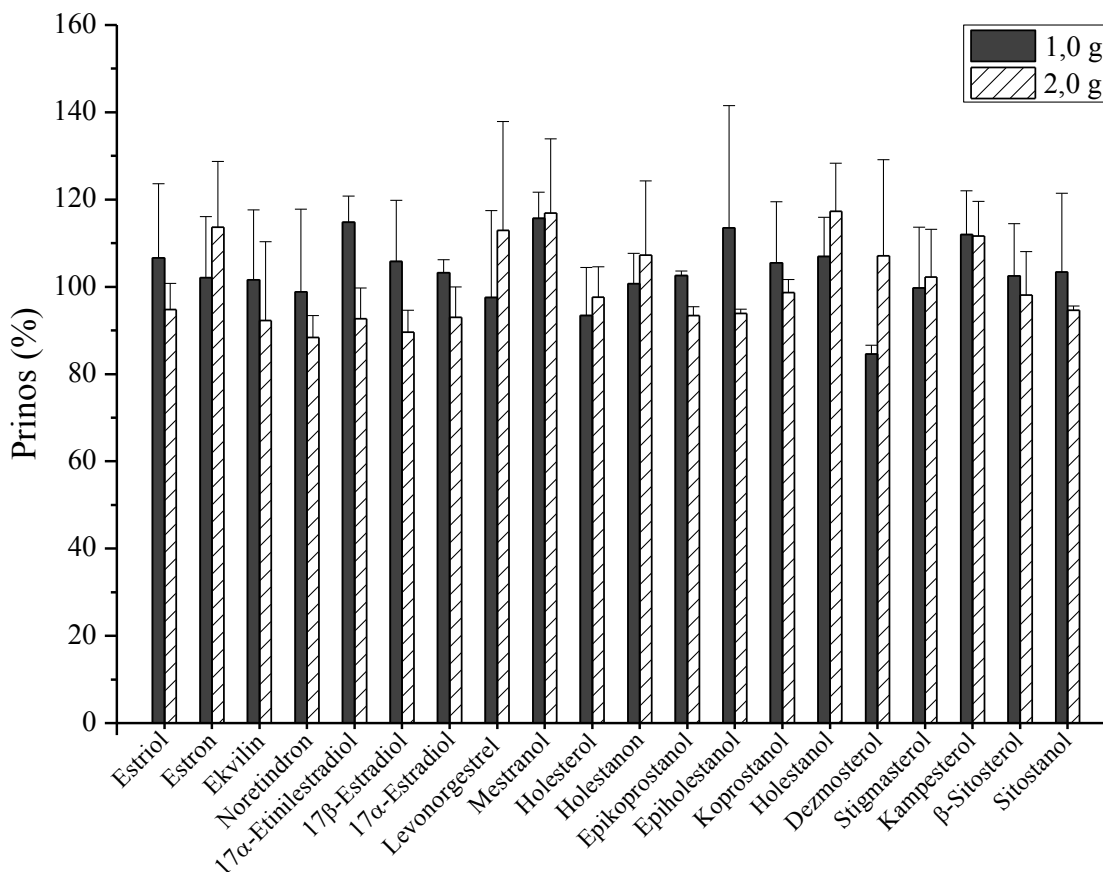
Za većinu analita, sa povećanjem udela metanola u smeši za ekstrakciju dolazi do povećanja prinosa. Ovo se može jasno videti u slučaju hormona 17 α - i 17 β -estradiola kod kojih se prinosi kreću od 81% i 76% za ekstrakciju smešom metanol/acetonitril (60:40, v/v), do 99% i 106% za ekstrakciju sa čistim metanolom. U slučaju biljnih sterola je uočeno da povećanje udela acetonitrila nema značajan uticaj na povećanje efikasnosti ekstrakcije. Konačno je odabrano da se kao optimalan rastvarač za ultrazvučnu ekstrakciju koristi čist metanol.

Tabela 4.4. Prinosi odabranih steroidnih jedinjenja pri ultrazvučnoj ekstrakciji smešama metanola i acetonitrila.

Steroid	Prinos, % (RSD, %)					
	%CH ₃ OH : %CH ₃ CN (v/v)					
	60:40	70:30	80:20	90:10	95:5	100:0
<i>Hormoni</i>						
Estriol	94 (15)	102 (3)	99 (12)	111 (15)	112 (12)	107 (17)
Estron	79 (21)	96 (5)	98 (16)	95 (4)	91 (12)	102 (14)
Ekvilin	85 (5)	93 (10)	94 (12)	93 (7)	87 (22)	102 (16)
Noretindron	95 (8)	87 (2)	114 (6)	116 (23)	97 (1)	99 (19)
17 α -Etinilestradiol	99 (5)	100 (11)	109 (10)	107 (15)	96 (7)	115 (6)
17 β -Estradiol	76 (6)	90 (13)	99 (15)	99 (10)	93 (7)	106 (14)
17 α -Estradiol	81 (5)	89 (3)	95 (10)	94 (14)	96 (9)	99 (11)
Levonorgestrel	95 (8)	83 (12)	92 (16)	92 (2)	85 (1)	98 (20)
Mestranol	110 (24)	92 (5)	107 (12)	117 (13)	112 (18)	116 (6)
<i>Humani/životinjski steroli</i>						
Epikoprostanol	95 (29)	97 (4)	106 (17)	99 (7)	106 (5)	103 (1)
Epiholestanol	91(12)	89 (5)	105 (8)	95 (3)	90 (9)	101 (7)
Koprostanol	89 (27)	84 (1)	114 (1)	112 (1)	85 (1)	114 (28)
Holestanol	137 (1)	112 (8)	120 (1)	91 (9)	121 (19)	107 (9)
Holesterol	104 (16)	107 (4)	102 (13)	108 (4)	111 (10)	93 (11)
Holestanon	96 (9)	114 (10)	100 (9)	104 (8)	110 (3)	101 (7)
<i>Biljni steroli</i>						
Dezmosterol	87 (2)	91 (15)	94 (1)	93 (3)	87 (1)	85 (2)
Stigmasterol	116 (16)	106 (5)	102 (6)	108 (10)	94 (16)	100 (14)
Kampesterol	98 (27)	92 (8)	108 (9)	112 (11)	100 (22)	112 (10)
β -Sitosterol	101 (5)	102 (12)	111 (14)	111 (7)	116 (11)	103 (12)
Sitostanol	93 (16)	106 (3)	98 (15)	110 (20)	115 (5)	103 (10)

4.4.2. Izbor optimalne mase uzorka sedimenta

Nakon odabira optimalnog rastvarača za ekstrakciju, optimizovana je masa uzorka sedimenta u cilju postizanja većeg faktora predkoncentrovanja. Testirane su mase uzorka sedimenta od 1,0 g i 2,0 g. Dobijeni rezultati su prikazani na slici 4.31.

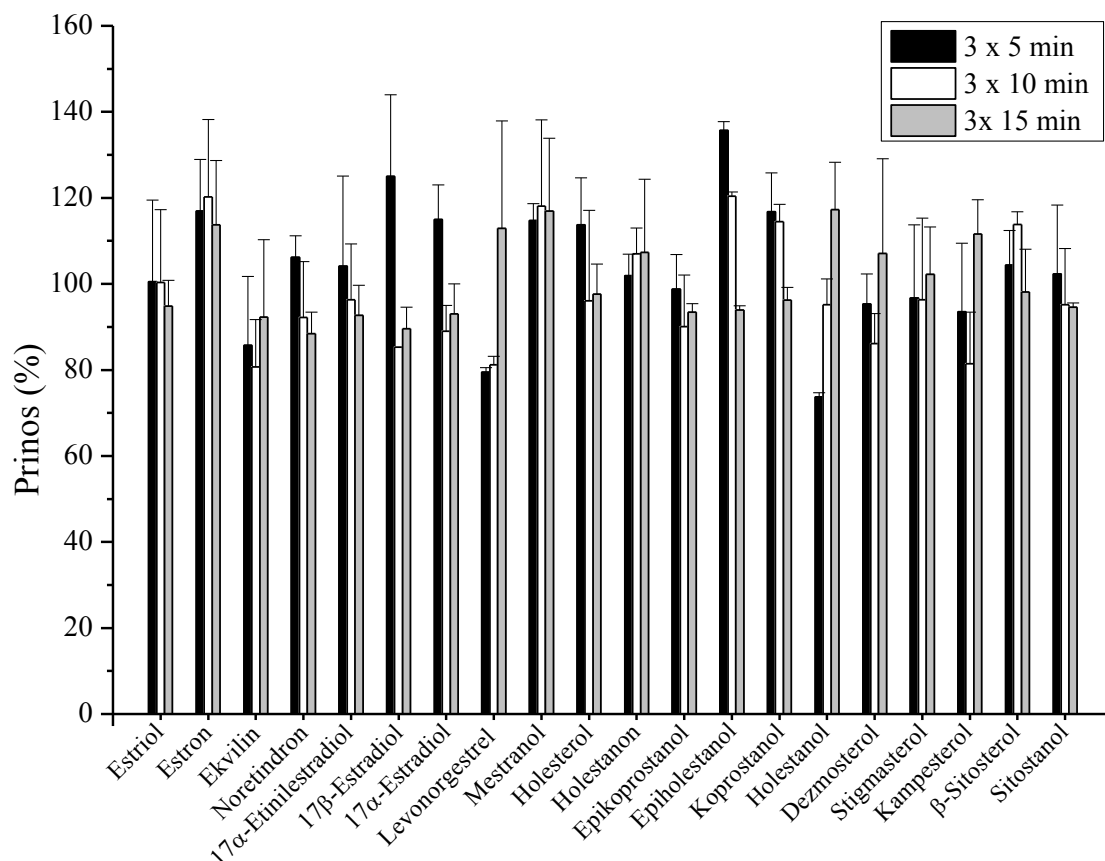


Slika 4.31. Prinosi odabranih steroidnih jedinjenja pri ultrazvučnoj ekstrakciji različitih masa rečnog sedimenta.

Upoređivanjem rezultata dobijenih ekstrakcijom uzorka sedimenta mase 1,0 g (85–116%) i 2,0 g (88–117%) utvrđeno je da nema značajnih razlika u prinosima, koji su za sve analite bili veoma visoki. Ponovljivost metode je generalno bila dobra, uz izuzetak epiholestanola pri ekstrakciji 1,0 g sedimenta (RSD = 28%), i levonorgestrela i dezmosterola pri ekstrakciji 2,0 g sedimenta (25% i 22%). S obzirom na to da su vrednosti prinosa analita bile visoke za obe testirane mase sedimenta, kao optimalna je odabrana masa od 2,0 g jer se time postiže veći faktor predkoncentrovanja.

4.4.3. Izbor optimalnog vremena ultrazvučne ekstrakcije

U cilju izbora kraćeg vremena ekstrakcije uz postizanje što veće efikasnosti, testirana su sledeća vremena: 3 × 5 min, 3 × 10 min i 3 × 15 min. Rezultati ovih eksperimenata su predstavljeni na slici 4.32.

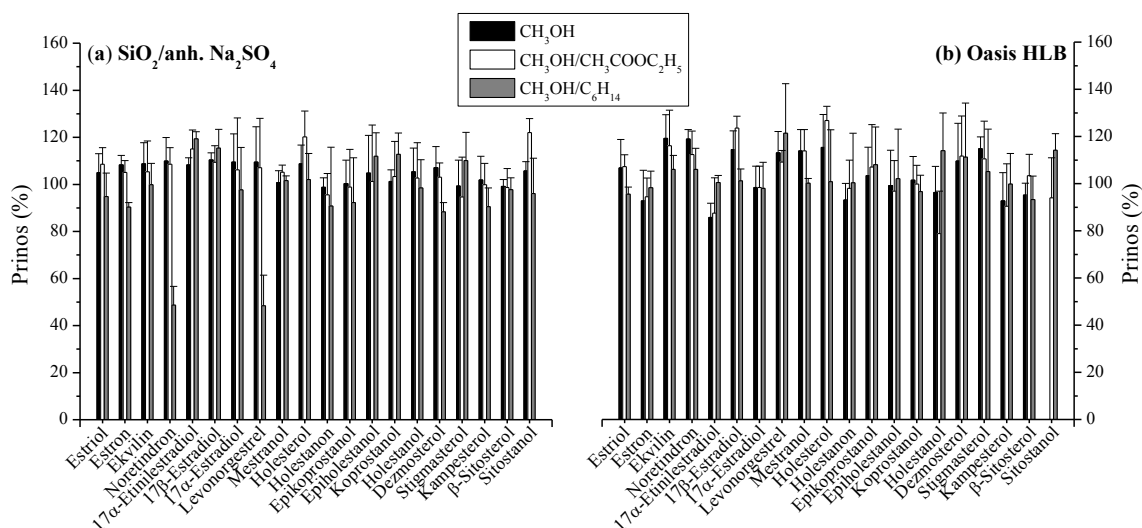


Slika 4.32. Prinosi odabranih steroidnih jedinjenja pri različitom vremenu ultrazvučne ekstrakcije.

Upoređivanjem prinosa steroidnih jedinjenja dobijenih za ekstrakciju tokom 3×5 min (74–136%), 3×10 min (81–120%) i 3×15 min (88–117%) utvrđeno je da se najefikasnija ekstrakcija postiže tokom 3×15 min. Međutim, uočeno je i da se tokom ultrazvučne ekstrakcije u trajanju od 3×10 min postižu visoki prinosi i efikasna ekstrakcija analita. Pri vremenu ekstrakcije od 3×5 min zapažen je blagi pad u prinosisima za levonorgestrel (80%) i holestanol (74%), a veoma visoki prinosi su primećeni u slučaju 17β -estradiola (125%) i epiholestanola (136%). Ponovljivost metode je bila bolja prilikom ultrazvučne ekstrakcije u trajanju od 3×10 min (RSD < 20% za sve analite) u odnosu na ekstrakciju tokom 3×5 min (RSD = 21% za 17α -etinilestradiol). Kao optimalno vreme ultrazvučne ekstrakcije, a u cilju smanjenja vremena pripreme uzorka sedimenta za analizu, odabrano je vreme od 3×10 min.

4.5. Prečišćavanje dobijenih ekstrakata sedimenta

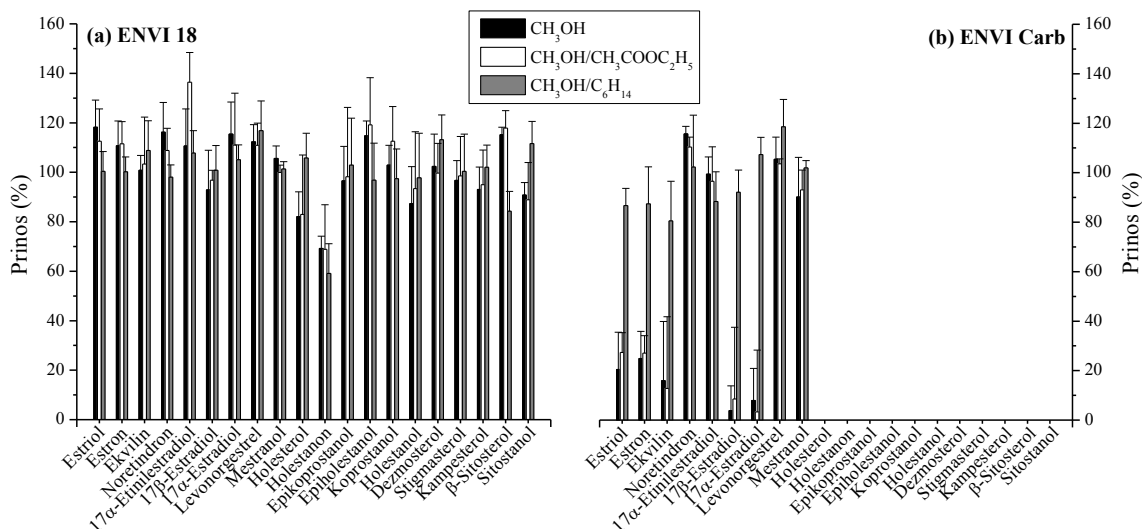
Za prečišćavanje dobijenih ekstrakata sedimenata testirana su četiri pakovanja kolone za prečišćavanje: smeša silika-gela i anhidrovanog Na_2SO_4 , kao i HLB, C-18 i ugljenično pakovanje. Kao rastvarači za eluiranje odabranih analita sa kolona za prečišćavanje isprobani su metanol, smeša metanol/etil-acetat (1:1, v/v) i smeša metanol/heksan (1:1, v/v). Rastvarači za eluiranje su testirani na četiri odabrana pakovanja za prečišćavanje ekstrakata sedimenata. Rezultati eksperimenata su prikazani na slikama 4.33 i 4.34.



Slika 4.33. Prinosi odabranih steroidnih jedinjenja pri prečišćavanju na kolonama: (a) silika-gel/anhidrovani Na_2SO_4 ; (b) Oasis HLB, uz eluiranje pomoću tri rastvarača.

Pri prečišćavanju, visoki prinosi ispitivanih analita su dobijeni korišćenjem pakovanja silika-gel/anhidrovani Na_2SO_4 uz metanol kao eluent (99–110%), kao i uz smešu metanol/etil-acetat (96–122%) (slika 4.33a). Za većinu odabranih steroidnih jedinjenja prinosi su bili visoki i kada je za eluiranje korišćena smeša metanol/heksan (88–119%). Niski prinosi su dobijeni za noretindron (49%) i levonorgestrel (48%).

Primenom Oasis HLB kertridža za prečišćavanje dobijeni su visoki prinosi za sve ispitivane analite (slika 4.33b). Prinosi su bili u opsegu 86–119% kada je kao eluent korišćen metanol, 79–127% za smešu metanol/etil-acetat i 93–121% za smešu metanol/heksan.



Slika 4.34. Prinosi odabranih steroidnih jedinjenja pri prečišćavanju na kolonama: (a) Supelclean ENVI 18; (b) Supelclean ENVI Carb, uz eluiranje pomoću tri rastvarača.

Rezultati su pokazali da C-18 pakovanje pokazuje značajan afinitet prema holestanonu, s obzirom na to da je ovaj sterol eluiran sa niskim prinosom sa Supelclean ENVI 18 kertridža za prečišćavanje (slika 4.34a). Korišćenjem tri rastvarača za eluiranje, dobijeni su prinosi u opsegu 59–69%. Za ostale ispitivane analite dobijeni su visoki prinosi, kada je kao rastvarač za eluiranje korišćen metanol (82–118%), smeša metanol/etil-acetat (83–119%), kao i smeša metanol/heksan (84–113%). Izuzetak je bio veoma visok prinos dobijen za 17α-etinilestradiol (136%) primenom smeše metanol/etil-acetat za eluiranje.

Utvrđeno je da ugljenično pakovanje nije pogodno za prečišćavanje ekstrakta sa odabranim steroidnim jedinjenjima, pošto je adsorpcija sterola na pakovanju toliko jaka da se ne mogu eluirati ni sa jednim od testiranih rastvarača (slika 4.34b). Niski prinosi su zabeleženi i za većinu ispitivanih hormona, posebno uz primenu metanola kao eluenta (4–25%) ili smeše metanol/etil-acetat (3–27%). Može se zaključiti da je adsorpcija estriola, estrona, ekvilina, kao i 17β- i 17α-estradiola na ugljeničnom pakovanju takođe veoma visoka. Prinosi četiri steroidna hormona (noretindrona, 17α-etinilestradiola, levonorgestrela i mestranola) su bili visoki bez obzira na korišćeni rastvarač za eluiranje. Kada je metanol upotrebljen kao eluent, prinosi su bili u opsegu 90–116%, zatim 93–110% uz korišćenje smeše metanol/etil-acetat, kao i 88–119% sa smešom metanol/heksan. Takođe je uočeno da je smeša metanol/heksan efikasna za

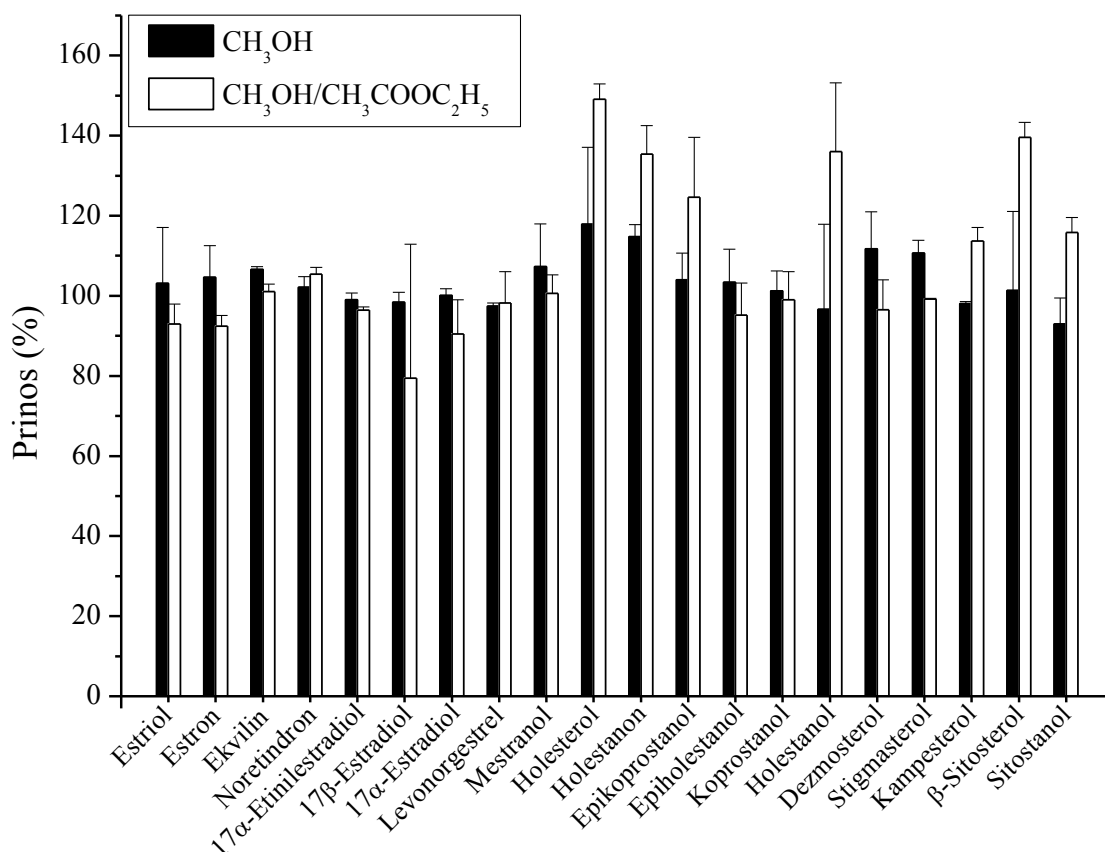
eluiranje svih ispitivanih steroidnih hormona sa Supelclean ENVI Carb kertridža (81–119%).

Imajući u vidu da je cilj optimizacije bio postići što bolje prečišćavanje ekstrakta sedimenta, uz što manji gubitak analita, Supelclean ENVI 18 i Supelclean ENVI Carb su odbačeni kao kertridži za prečišćavanje. Iako su dobri rezultati dobijeni korišćenjem i silika-gel/anhidrovani Na₂SO₄ kolone i Oasis HLB kertridža, kao optimalno za prečišćavanje je odabrano pakovanje silika-gel/anhidrovani Na₂SO₄, zbog niže cene. Kao dva najbolja rastvarača za eluiranje odabranih analita sa punjenja kolone odabrani su metanol i smeša metanol/etil-acetat.

4.5.1. Prečišćavanje ekstrakta realnog uzorka rečnog sedimenta

Nakon izbora silika-gel/anhidrovani Na₂SO₄ pakovanja kao optimalnog za prečišćavanje i dva rastvarača za eluiranje sa kojima su dobijeni najviši prinosi analita, efikasnost prečišćavanja je testirana na ekstraktu realnog uzorka rečnog sedimenta. Rezultati eksperimenta su grafički predstavljani na slici 4.35.

Rezultati su pokazali da je efikasnost prečišćavanja ekstrakta realnog uzorka sedimenta na odabranom punjenju veća kada se kao eluent koristi metanol (prinosi u opsegu 93–118%), nego kada se za eluiranje koristi smeša metanol/etil-acetat (79–149%). Naime, za čak pet sterola prinosi su bili iznad 120% kada je smeša rastvarača korišćena za eluiranje analita sa silika-gel/anhidrovani Na₂SO₄ kolone. Veoma visoke vrednosti prinosa se mogu objasniti kompleksnim sastavom matrice sedimenta, kao i složenim interakcijama koje steroli ostvaruju sa matricom. Konačno je utvrđeno da prečišćavanje ekstrakata uzoraka rečnih sedimenata treba izvoditi na kolonama pakovanim smešom silika-gel/anhidrovani Na₂SO₄ uz korišćenje čistog metanola kao rastvarača za eluiranje ispitivanih steroidnih jedinjenja sa kertridža.



Slika 4.35. Efikasnost prečišćavanja ekstrakta sedimenta na silika-gel/anhidrovani Na₂SO₄ pakovanju uz korišćenje dva rastvarača za eluiranje.

4.6. Validacija metode

Razvijena i optimizovana metoda analize uzoraka sedimenata je testirana i validirana analizom uzoraka kojima je dodat standardni rastvor ispitivanih steroida tako da koncentracija svih analita u uzorcima iznosi 50, 100, 250, 500, 1000 i 2000 ng g⁻¹. Određeni su sledeći parametri validacije metode: prinosi analita, ponovljivost metode (izražena preko relativne standardne devijacije, RSD), linearnost metode (izražena preko koeficijenta korelacije, R^2), granice detekcije i kvantifikacije (LOD i LOQ), kao i uticaj matrice (ME). Dobijeni rezultati su predstavljeni u tabeli 4.5.

Tabela 4.5. Parametri validacije metode ($n = 3$).

Steroid	Prinos, % (RSD, %)						R^2	LOD (ng g ⁻¹)	LOQ (ng g ⁻¹)	ME (%)
	Konzentracija (ng g ⁻¹)									
	50	100	250	500	1000	2000				
Estriol	103 (4)	99 (21)	101 (6)	105 (4)	92 (2)	93 (10)	0,985	9,5	31,6	16
Estron	87 (6)	80 (6)	88 (10)	86 (9)	92 (9)	84 (5)	0,993	12,5	41,6	7
Ekvilin	96 (4)	78 (2)	73 (13)	76 (10)	91 (6)	88 (8)	0,992	9,5	26,2	5
Noretindron	85 (5)	83 (7)	75 (4)	84 (6)	88 (8)	89 (5)	0,988	0,8	2,5	10
17 α -Etinilestradiol	78 (11)	90 (6)	89 (5)	104 (1)	89 (9)	93 (5)	0,998	2,2	7,5	-2
17 β -Estradiol	89 (9)	85 (1)	86 (7)	91 (1)	86 (7)	89 (2)	0,983	1,3	4,2	3
17 α -Estradiol	88 (2)	86 (1)	88 (4)	102 (1)	92 (3)	96 (11)	0,981	0,7	2,3	2
Levonorgestrel	92 (8)	86 (6)	85 (3)	86 (4)	89 (4)	88 (3)	0,987	4,8	16,1	1
Mestranol	88 (7)	86 (5)	90 (6)	108 (1)	100 (16)	92 (2)	0,984	1,4	4,8	0
Epikoprostanol	100 (7)	90 (27)	100 (5)	106 (1)	95 (6)	93 (5)	0,998	7,3	24,3	67
Epiholestanol	102 (1)	95 (8)	103 (4)	108 (9)	98 (6)	94 (9)	0,992	5,8	19,3	11
Koprostanol	107 (7)	109 (10)	99 (4)	116 (1)	91 (2)	93 (6)	0,988	2,7	9,0	15
Holestanol	100 (6)	111 (6)	94 (3)	93 (1)	102 (9)	105 (2)	0,999	2,7	9,0	-12
Holesterol	107 (10)	92 (28)	108 (8)	74 (7)	111 (13)	97 (15)	0,999	0,6	2,0	2
Holestanon	94 (1)	101 (2)	89 (4)	78 (14)	96 (7)	87 (1)	0,994	4,4	14,7	-27
Dezmosterol	81 (9)	92 (6)	96 (14)	88 (5)	99 (6)	88 (9)	0,998	15,0	50,0	-2
Stigmasterol	76 (8)	100 (5)	85 (3)	92 (5)	112 (4)	110 (6)	0,936	1,9	6,3	4
Kampesterol	98 (6)	104 (9)	103 (4)	106 (1)	93 (8)	101 (7)	0,981	3,6	12,0	15
β -Sitosterol	102 (7)	104 (26)	95 (21)	118 (1)	108 (15)	101 (5)	0,995	2,8	9,3	68
Sitostanol	107 (4)	98 (7)	97 (6)	92 (1)	110 (4)	109 (14)	0,948	5,8	19,3	29

Poznato je da su za metode analize uzoraka iz životne sredine prihvatljivi prinosi analita u opsegu 70%–120% (EPA, 2012). Analizom pripremljenih uzoraka sedimenata, u ispitivanom opsegu koncentracija (50–2000 ng g⁻¹), dobijeni su optimalni prinosi odabranih steroidnih hormona i sterola (73–118%). RSD vrednosti su bile ispod 20%, uz nekoliko izuzetaka, potvrđujući dobru ponovljivost razvijene analitičke metode.

Linearnost metode je takođe bila dobra, sa koeficijentima korelacije u opsegu 0,936–0,999. U Prilogu su dati rezultati korelaciono-regresione analize, prikazivanjem krivih zavisnosti površine pika svakog analita od koncentracije u ekstraktu (slika 21). Nasumična raspodela izračunatih rezidualnih vrednosti za svaki analit, bez izraženog trenda, je dodatno potvrdila dobru linearnost metode (Prilog, slika 22, tabela 1).

Izračunate vrednosti granica detekcije (0,6–15,0 ng g⁻¹) i granica kvantifikacije (2,0–50,0 ng g⁻¹) su bile niske za sve odabrane analite, ukazujući na osetljivost razvijene metode. Za većinu ispitivanih analita uticaj matrice nije bio izražen i kretao se od –12% za holestanol do 16% za estriol. Značajan uticaj matrice je zabeležen u slučaju holestanona (–27%), sitostanola (29%), i posebno epikoprostanola (67%) i β-sitosterola (68%).

4.7. Analiza realnih uzoraka rečnih sedimenata

Primenom razvijene metode u analizi rečnih sedimenata po prvi put su dobijeni podaci o stepenu zagađenosti sedimenata steroidnim jedinjenjima u Srbiji. Rezultati analize 11 uzoraka rečnih sedimenata uzetih iz nekoliko reka u Srbiji predstavljani su u tabeli 4.6. Rezultati analize su zatim iskorišćeni za utvrđivanje porekla fekalne materije u ispitivanim sedimentima korišćenjem odnosa sterola.

Od dvadeset analiziranih steroidnih jedinjenja, trinaest je detektovano u ispitivanim uzorcima rečnih sedimenata. Od devet traženih *steroidnih hormona* samo su mestranol i 17α-estradiol detektovani u analiziranim uzorcima. Mestranol je pronađen u uzorku sedimenta iz Dunava kod Smedereva (11 ng g⁻¹, uzorak S1), kao i u sedimentu reke Topčiderke (19 ng g⁻¹, uzorak S10) koji je uzorkovan nizvodno od brojnih ispusta otpadnih voda. Iako postoje studije usmerene na određivanje mestranola u sedimentima (Ternes *et al.*, 2002; Arditsoglou i Voutsas, 2012), tragovi ovog hormona nisu ranije zabeleženi.

Tabela 4.6. Koncentracija steroidnih jedinjenja u uzorcima rečnih sedimenata S1–S11 ($n = 2$).

Steroid	Koncentracija±SD (ng g ⁻¹)										
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11
<i>Hormoni</i>											
Mestranol	11±1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	19±3	ND
17α-Estradiol	ND	ND	13±0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Humani/životinjski steroli</i>											
Epikoprostanol	96±8	1066±200	41±8	42±5	204±36	73±13	161±7	220±21	ND	131±8	185±14
Epiholestanol	54±2	296±20	ND	22±4	ND	28±3	117±18	50±8	ND	ND	ND
Koprostanol	201±10	1907±270	767±99	233±35	1207±230	220±27	1142±62	1239±92	ND	1792±240	1939±340
Holestanol	203±24	1063±93	394±56	245±36	734±2	514±74	598±74	1172±141	ND	300±50	327±36
Holesterol	416±58	1543±230	367±52	70±12	548±73	264±43	535±20	284±43	307±33	603±49	192±6
Holestanon	188±11	1440±29	287±28	82±15	265±4	110±19	242±32	228±11	ND	139±19	120±13
<i>Biljni steroli</i>											
Dezmosterol	116±6	490±66	84±17	126±18	1126±132	131±17	80±5	110±15	ND	737±120	ND
Stigmasterol	216±34	655±62	255±38	227±11	1149±145	149±27	128±17	240±17	127±10	391±58	101±5
Kampesterol	129±21	1106±132	166±30	136±9	720±25	104±2	188±34	343±31	107±13	395±23	52±4
β-Sitosterol	644±120	1228±29	956±52	535±25	1245±119	305±28	503±61	1479±79	712±21	103±6	139±2
Sitostanol	260±10	682±123	261±24	77±15	428±34	179±30	262±11	238±22	ND	69±13	98±12
Σ sterola	2520	11476	3578	1796	7626	2078	3956	5602	1252	4660	3153
%Koprostanola	8	17	21	13	16	11	29	22	0	38	62

ND – nije detektovan

17 α -Estradiol je detektovan u koncentraciji od 13 ng g⁻¹ u rečnom sedimentu iz Dunava uzorkovanom kod Donjeg Milanovca (uzorak S3). Tragovi ovog steroidnog hormona su detektovani u uzorcima sedimenata iz reke Svratka u Češkoj (Matějčíček *et al.*, 2007), kao i u sedimentima iz Tokijskog zaliva u Japanu (Isobe *et al.*, 2006). Neke studije su pokazale da je 17 α -estradiol dominantan estrogeni hormon u izlučevinama stoke (Ivie *et al.*, 1986; Hoffmann *et al.*, 1997), zbog čega prisustvo ovog hormona može ukazati na zagađenje otpadom sa poljoprivrednih farmi. Prisustvo mestranola i 17 α -estradiola u sedimentima se može objasniti njihovim fizičko-hemijskim svojstvima (tabela 4.7). Naime, veliki afinitet ovih hormona za adsorpciju na sedimentima se objašnjava manjom rastvorljivosti u vodi i većim logK_{ow} vrednostima u odnosu na ostale steroidne hormone. Odsustvo ostalih ispitivanih hormona je najverovatnije posledica veće rastvorljivosti u vodi i niskih logK_{ow} vrednosti, zbog čega se ova jedinjenja ne akumuliraju u sedimentima.

Tabela 4.7. Fizičko-hemijska svojstva odabranih steroidnih jedinjenja.

Steroid	CAS br.	Rastvorljivost u vodi (mg L ⁻¹)	logK _{ow}	logK _{oc} ^a
Estriol	50-27-1	500,0	2,45	2,904
Estron	53-16-7	30,0	3,13	4,477
Ekvilin	474-86-2	1,4	3,35	4,477
Noretindron	68-22-4	7,0	2,97	3,430
17 α -Etinilestradiol	57-63-6	11,3	3,67	4,678
17 β -Estradiol	50-28-2	3,6	4,01	4,205
17 α -Estradiol	57-91-0	3,9	3,94	4,205
Levonorgestrel	797-63-7	2,1	3,48	3,729
Mestranol	72-33-3	0,3	4,61	4,321
Epikoprostanol	516-92-7	^a 3,4·10 ⁻⁴	8,82 ^a	6,151
Koprostanol	360-68-9	2,0·10 ⁻²	8,82	6,166
Epiholestanol	516-95-0	3,5·10 ⁻⁵	8,82	6,151
Holestanol	80-97-7	8,8·10 ⁻⁵	8,82	6,151
Holesterol	57-88-5	9,5·10 ⁻²	8,74	6,151
Holestanon	601-53-6	^a 3,0·10 ⁻⁴	8,31 ^a	6,423
Dezmosterol	313-04-2	2,0·10 ⁻⁴	8,65	6,151
Stigmasterol	83-48-7	1,1·10 ⁻⁵	9,43	6,656
Kampesterol	474-62-4	2,8·10 ⁻⁵	9,16	6,370
β -Sitosterol	83-46-5	1,3·10 ⁻⁵	9,65	6,656
Sitostanol	19466-47-8	9,8·10 ⁻⁵	9,73	6,656

Izvor: <http://esc.syrres.com/fatepointer/search.asp>

^a Izvor: <http://www.chemspider.com/>

Humani/životinjski steroli su u ispitivanim rečnim sedimentima bili prisutni u opsegu koncentracija 22–1939 ng g⁻¹, dok su *biljni steroli* detektovani u opsegu koncentracija 52–1479 ng g⁻¹ (tabela 4.6). Široka rasprostranjenost odabranih sterola u sedimentima je posledica njihove veoma niske rastvorljivosti u vodi i visokih logK_{ow} i logK_{oc} vrednosti (tabela 4.7). Od svih sterola, u rečnim sedimentima je u najvišoj koncentraciji detektovan koprostanol (do 1939 ng g⁻¹). Poređenjem pronađenih koncentracija koprostanola sa referentnom vrednošću od 500 ng g⁻¹ za indikaciju humane fekalne kontaminacije (González-Oreja i Saiz-Salinas, 1998) može se zaključiti da je oko 65% ispitivanih uzoraka zagađeno kanalizacionim otpadnim vodama (uzorci S2, S3, S5, S7, S8, S10 i S11, tabela 4.6). Takođe, na ovih sedam mesta uzorkovanja i procenat koprostanola u odnosu na ukupnu količinu sterola je bio veoma visok (> 16%, tabela 4.6) ukazujući na humano fekalno zagađenje. Slične vrednosti procenta koprostanola su izračunate i za uzorke sedimenata iz Malezije i Vijetnama (Isobe *et al.*, 2002). Uzorak sedimenta sakupljen iz reke Veliki Lug (uzorak S11) se može smatrati najzagađenijim, pošto je u ovom uzorku procenat koprostanola iznosio 62%. S druge strane, u sedimentu reke Topčiderke koji je uzet u blizini izvorišta reke (uzorak S9) nije detektovan koprostanol, pa se ovaj uzorak može smatrati nezagađenim. Studije su pokazale da procenat koprostanola u rečnom sedimentu između 2–3% ukazuje na to da reka nije pogodna za kupanje (Isobe *et al.*, 2002; Tolosa *et al.*, 2014), dok vrednosti preko 6% ukazuju na značajno zagađenje kanalizacionim vodama (Devane *et al.*, 2006; Campos *et al.*, 2012; Tolosa *et al.*, 2014). Slične koncentracije koprostanola pronađene su u sedimentima u Sjedinjenim Američkim Državama (100–7530 ng g⁻¹, Writer *et al.*, 1995), Maleziji i Vijetnamu (5–15497 ng g⁻¹, Isobe *et al.*, 2002), i Brazilu (14–447 ng g⁻¹, Machado *et al.*, 2014).

Pored koprostanola, steroli detektovani u visokim koncentracijama u sedimentima su *humani/životinjski holesterol* (70–1543 ng g⁻¹) i *biljni β-sitosterol* (103–1479 ng g⁻¹). Ove koncentracije su uporedive sa koncentracijama holesterola i β-sitosterola detektovanim u rečnim sedimentima u Brazilu (4–474 ng g⁻¹ i 9–759 ng g⁻¹, Martins *et al.*, 2007) i SAD-u (260–8290 ng g⁻¹ i 640–13 330 ng g⁻¹, Biache i Philp, 2013). S obzirom na to da je holesterol najzastupljeniji sterol u ljudskom organizmu, ali i da je prirodno prisutan kod životinja (Leeming *et al.*, 2015), visoke koncentracije ovog jedinjenja su očekivane u uzorcima rečnih sedimenata. Što se tiče β-sitosterola, pored

prirodnog unosa putem biljaka, mogući izvor ovog jedinjenja u rečnim sedimentima mogu biti i otpadne vode iz domaćinstava.

Epikoprostanol je u analiziranim uzorcima detektovan u značajnim koncentracijama (do 1066 ng g⁻¹, tabela 4.6). Koncentracije epikoprostanola detektovane u ovom istraživanju su slične vrednostima pronađenim u rečnim sedimentima u Maleziji i Vijetnamu (2–2028 ng g⁻¹, Isobe *et al.*, 2002) i Brazilu (10–4400 ng g⁻¹, Cordeiro *et al.*, 2008). S obzirom na to da se epikoprostanol formira u procesu mikrobiološke razgradnje koprostanola, visoke koncentracije detektovane u rečnim sedimentima u Srbiji ukazuju na humano fekalno zagađenje.

Razvijena metoda je primenjena u analizi sedimenta iz Venecijanskog zaliva, kao i aktivnog mulja iz PPOV u Veneciji, kako bi se sagledao uticaj dugogodišnjeg tretmana otpadnih voda na kvalitet sedimenata u zalivu i uočila razlika u odnosu na sedimente prikupljene u Srbiji na lokacijama gde ne postoje PPOV. Rezultati su prikazani u tabeli 4.8. U ispitivanim uzorcima nisu pronađeni tragovi steroidnih hormona. U sedimentu Venecijanskog zaliva steroli su detektovani u niskim koncentracijama, u opsegu 33–276 ng g⁻¹, a tragovi humanih/životinjskih sterola koprostanola, epikoprostanola i holestanola nisu pronađeni.

Tabela 4.8. Koncentracija steroidnih jedinjenja u uzorku sedimenta iz Venecijanskog zaliva i uzorku aktivnog mulja iz PPOV ($n = 2$).

Steroid	Koncentracija±SD (ng g ⁻¹)	
	Sediment Venecijanskog zaliva	Aktivni mulj iz PPOV
Humani/životinjski steroli		
Epikoprostanol	ND	7729±49
Koprostanol	ND	7787±98
Holestanol	ND	2416±456
Holesterol	269±22	2631±388
Holestanon	276±13	2389±245
Biljni steroli		
Dezmosterol	ND	1033±161
Stigmasterol	33±5	1004±23
Kampesterol	ND	1027±32
β-Sitosterol	191±12	3890±560
Sitostanol	ND	2753±172
Σ sterola	769	32660
%Koprostanola	0	24

ND – nije detektovan

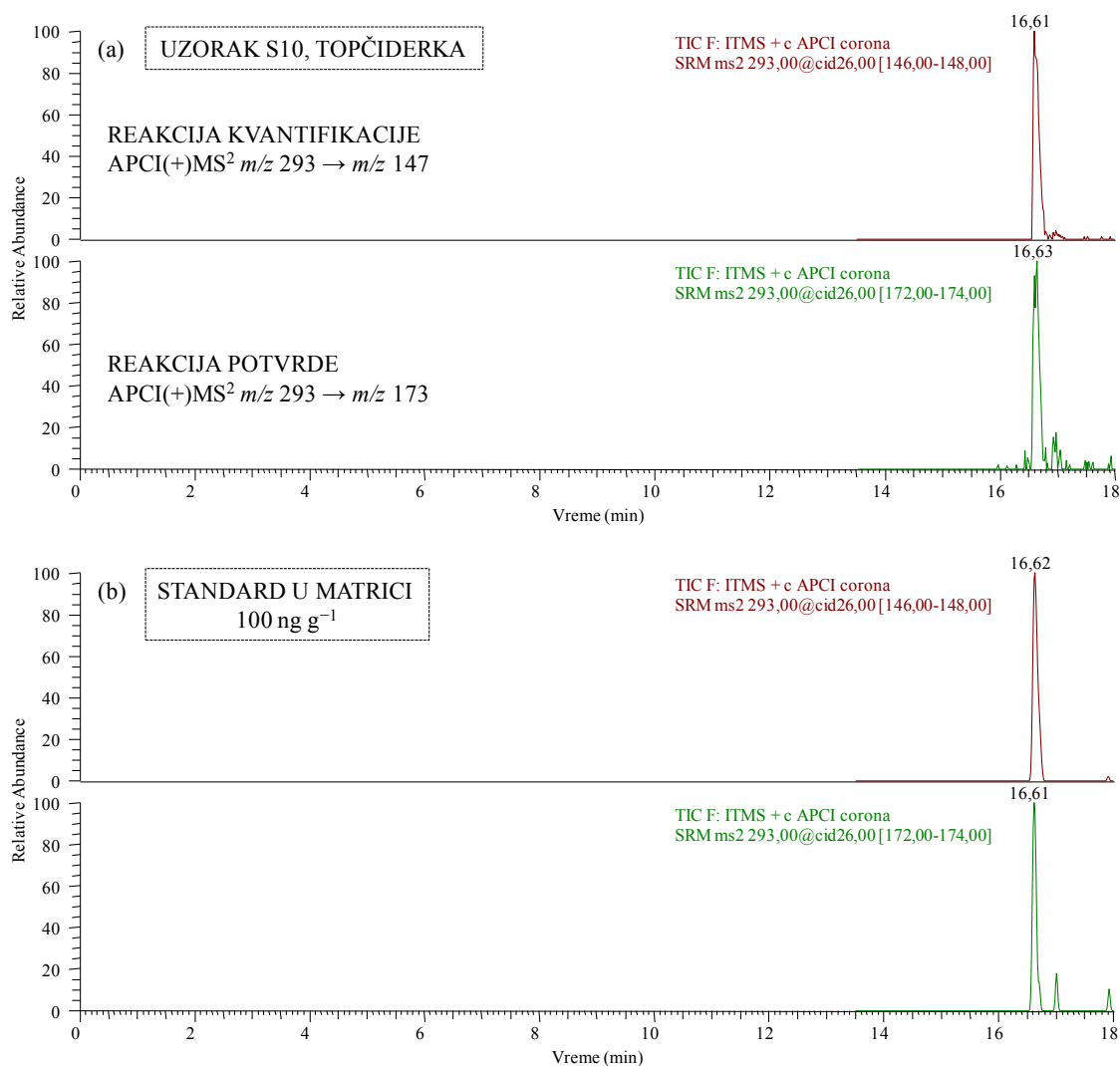
Dobijeni rezultati su u skladu sa činjenicom da se komunalne otpadne vode prečišćavaju pre otpuštanja u Venecijanski zaliv i sa rezultatom analize aktivnog mulja iz postojenja u kome su pronađene veoma visoke koncentracije svih sterola (1004–7787 ng g⁻¹). Rezultati ukazuju na visoku efikasnost uklanjanja sterola u procesu prečišćavanja komunalnih otpadnih voda, kao i izuzetan značaj i presudan uticaj ovih postojenja na kvalitet vodenih resursa.

4.8. Potvrda prisustva analita

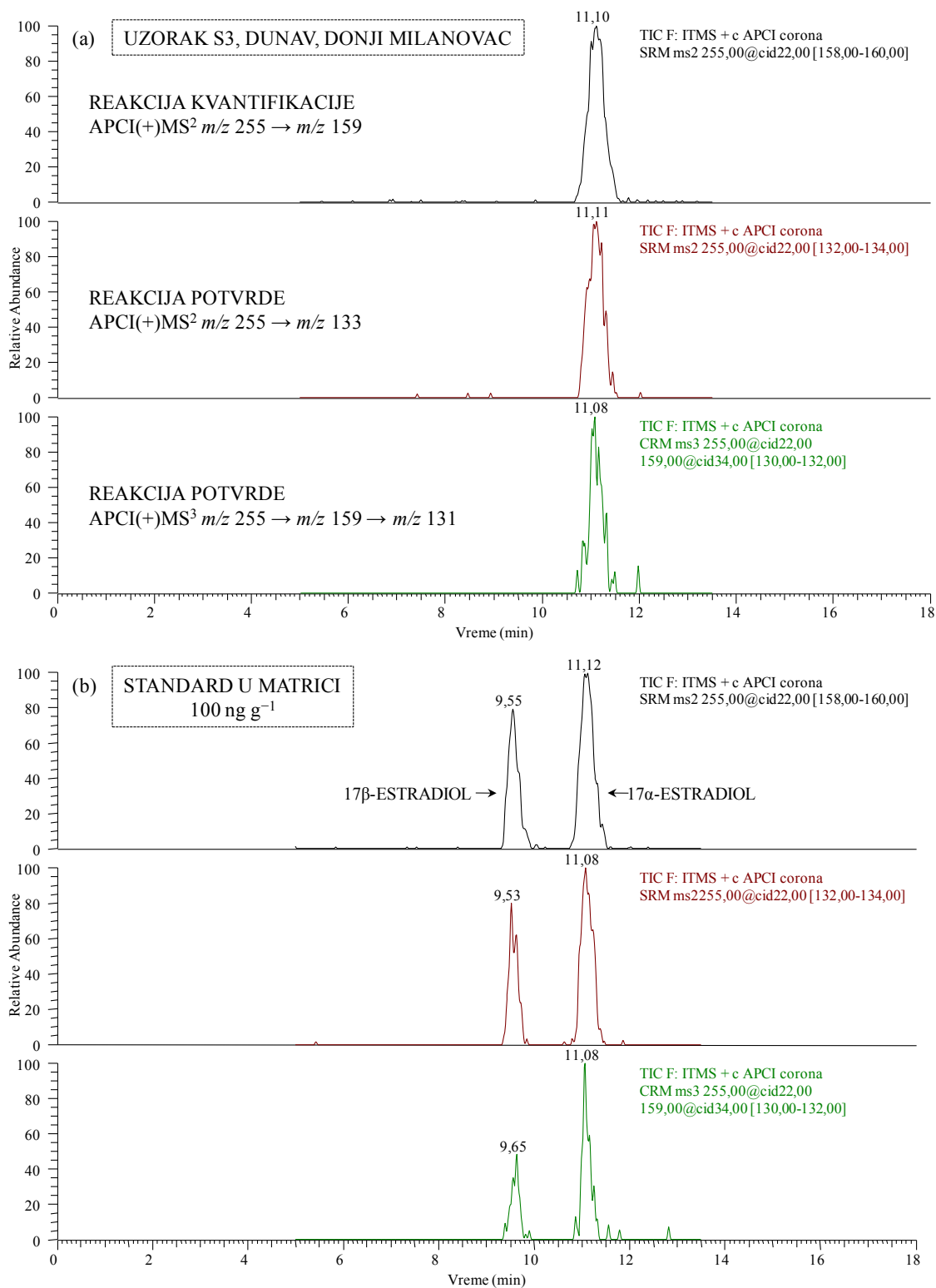
Uzorci u kojima su detektovani steroidni hormoni ili steroli su ponovo analizirani proširenom instrumentalnom metodom sa dodatnim SRM prelazima kako bi se potvrdilo prisustvo analita. Dodatne reakcije fragmentacije su odabrane iz masenih spektara analita (slike 4.6–4.25) i tabele 4.1. Primeri masenih hromatograma sa potvrdom prisustva steroidnih hormona prikazani su na slikama 4.36 (mestranol) i 4.37 (17 α -estradiol), dok su na slikama 4.38–4.45 predstavljeni primeri masenih hromatograma sa potvrdom prisustva detektovanih sterola. Za svaki analit su odabrana dva SRM prelaza između prekursor jona i dva najintenzivnija fragmentna jona, tj. reakcija kvantifikacije i reakcija potvrde. Za neke od analita su i dodatne MS³ reakcije fragmentacije iskorišćene za potvrdu prisustva.

Da bi se izbegli lažni pozitivni rezultati, retenciono vreme analita u masenom hromatogramu uzorka je poređeno sa retencionim vremenom analita u hromatogramu standarda u matrici sedimenta i u metanolu. Kao dokaz prisustva analita smatra se razlika u retencionim vremenima između 1–2% (López de Alda *et al.*, 2003). Ovo se najbolje može videti na primeru holestanona kod kojeg se u masenom hromatogramu uzorka i standarda koji odgovara matrici javljaju dva pika koji potiču od dva jedinjenja u uzorku sa istim reakcijama kvantifikacije i potvrde (slika 4.40a i 4.40b). Identifikacija holestanona je moguća tek nakon poređenja retencionih vremena dva jedinjenja sa retencionim vremenom holestanona u hromatogramu standardnog rastvora u metanolu (slika 4.40c). Na ovaj način je utvrđeno da uzorak sadrži nepoznato jedinjenje sa identičnim reakcijama fragmentacije kao i holestanon, koje se eluira sa hromatografske kolone 6 min pre holestanona. Slično je primećeno i u slučaju sitostanola, kod kojeg je

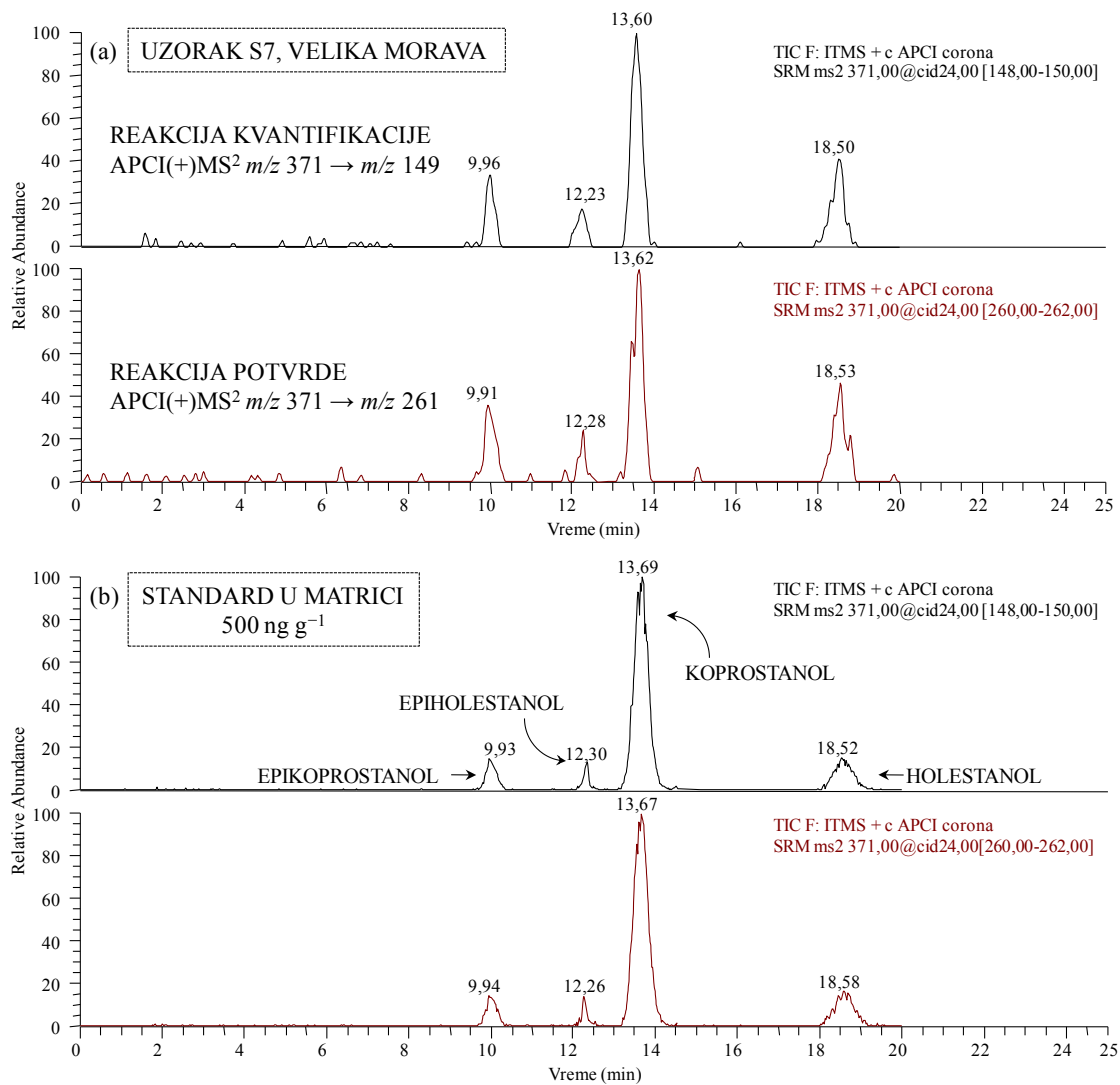
razlika u retencionom vremenu u odnosu na nepoznato jedinjenje u matrici uzorka iznosila oko 3 min (slika 4.45).



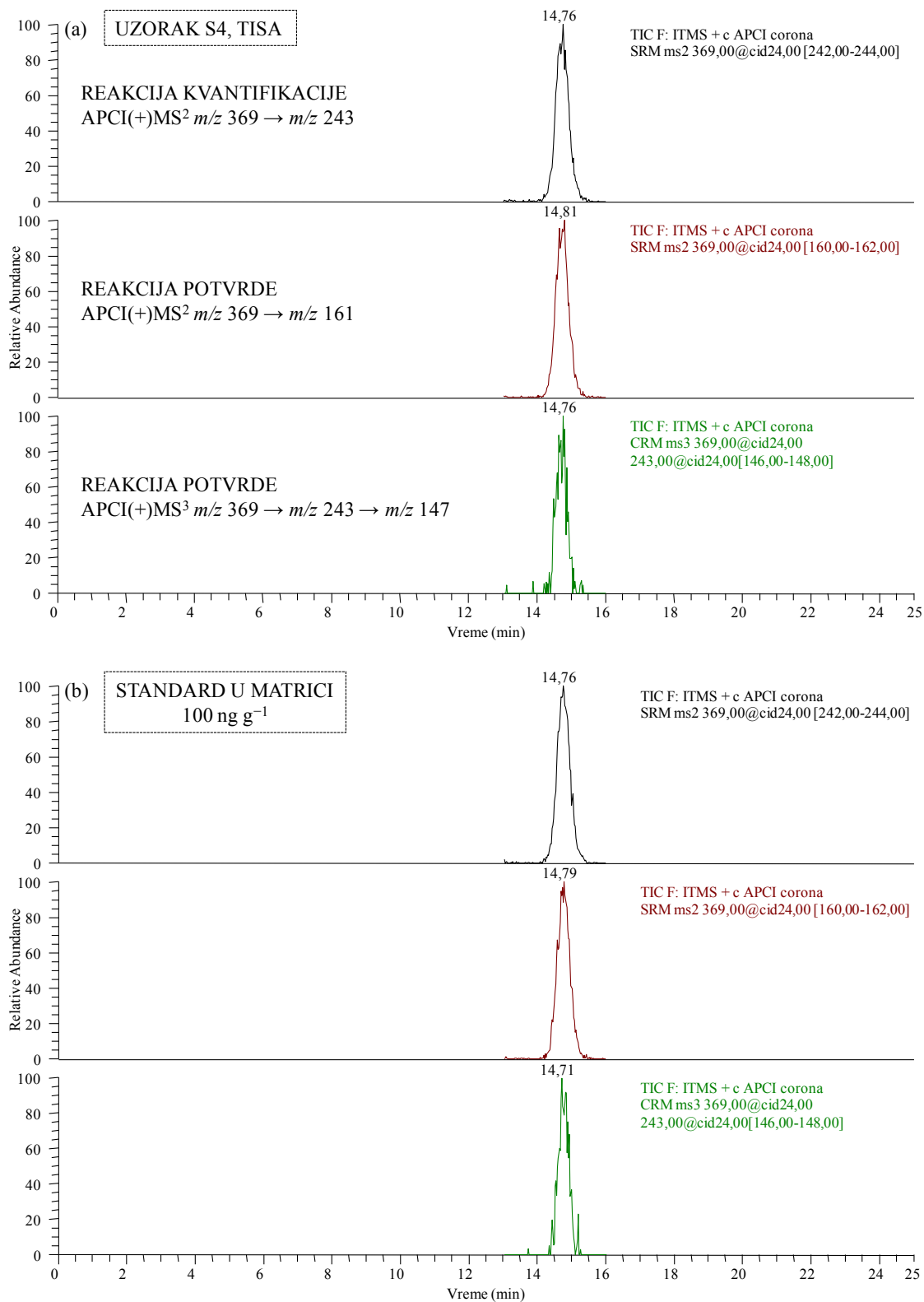
Slika 4.36. Maseni hromatogrami sa potvrdom prisustva mestranola: (a) uzorka sedimenta Topčiderke (S10); (b) standarda u matrici uzorka koncentracije 100 ng g⁻¹.



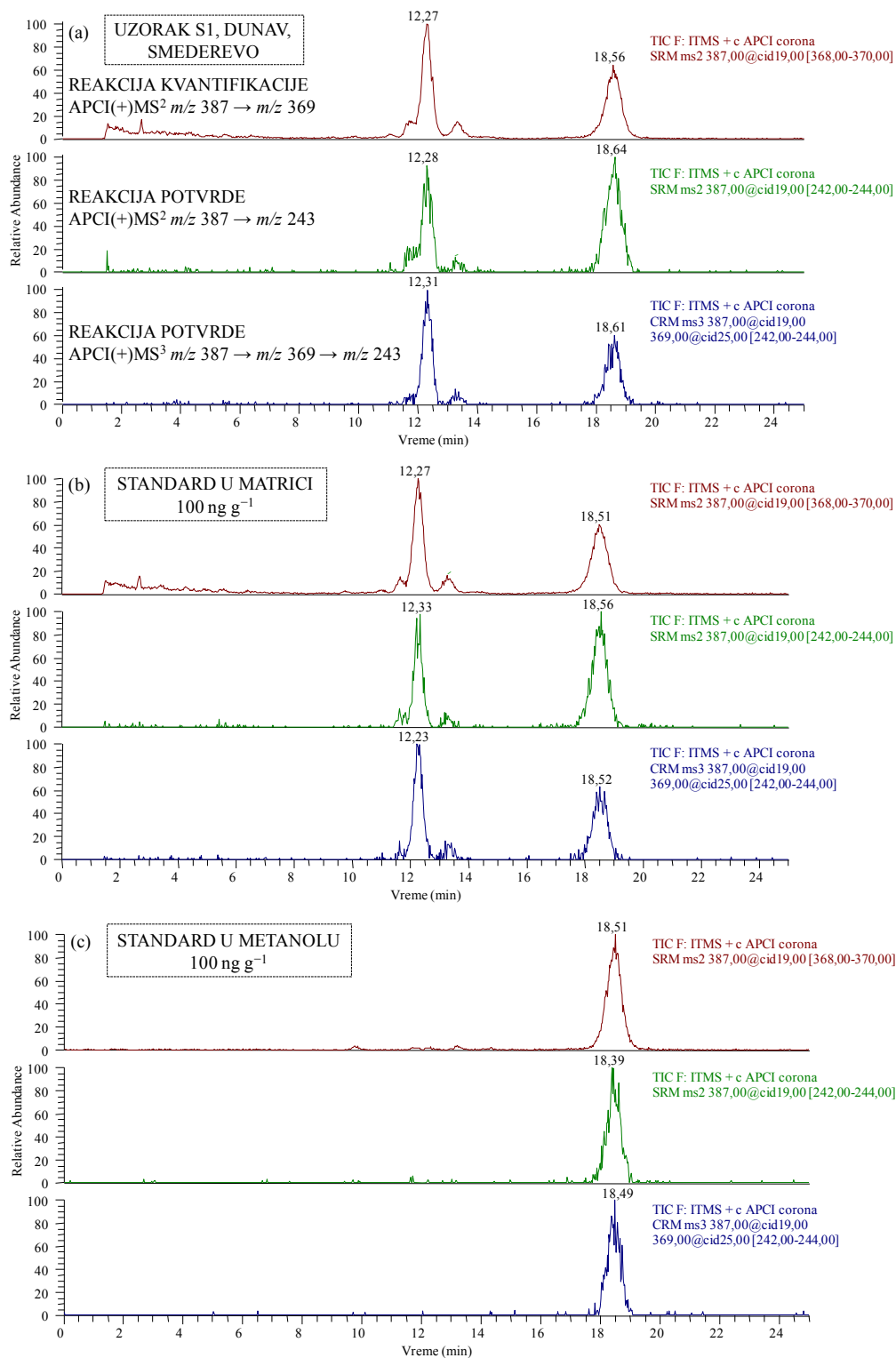
Slika 4.37. Maseni hromatogrami sa potvrdom prisustva 17α -estradiola: (a) uzorka sedimenta Dunava, kod Donjeg Milanovca (S3); (b) standarda u matrici uzorka koncentracije 100 ng g^{-1} .



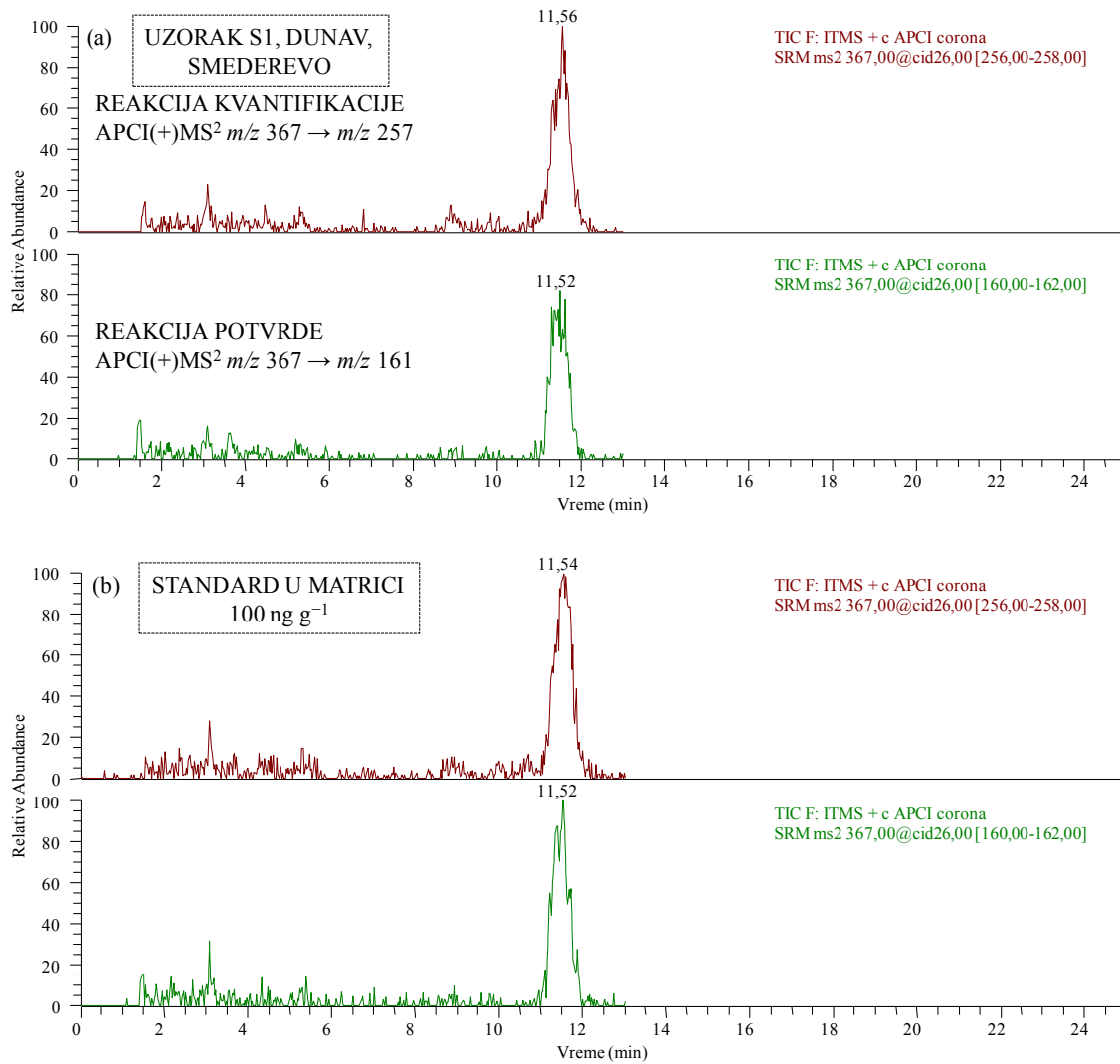
Slika 4.38. Maseni hromatogrami sa potvrdom prisustva epikoprostanola, epiholestanola, koprostanola i holestanola: (a) uzorka sedimenta Velike Morave (S7); (b) standarda u matrici uzorka koncentracije 500 ng g⁻¹.



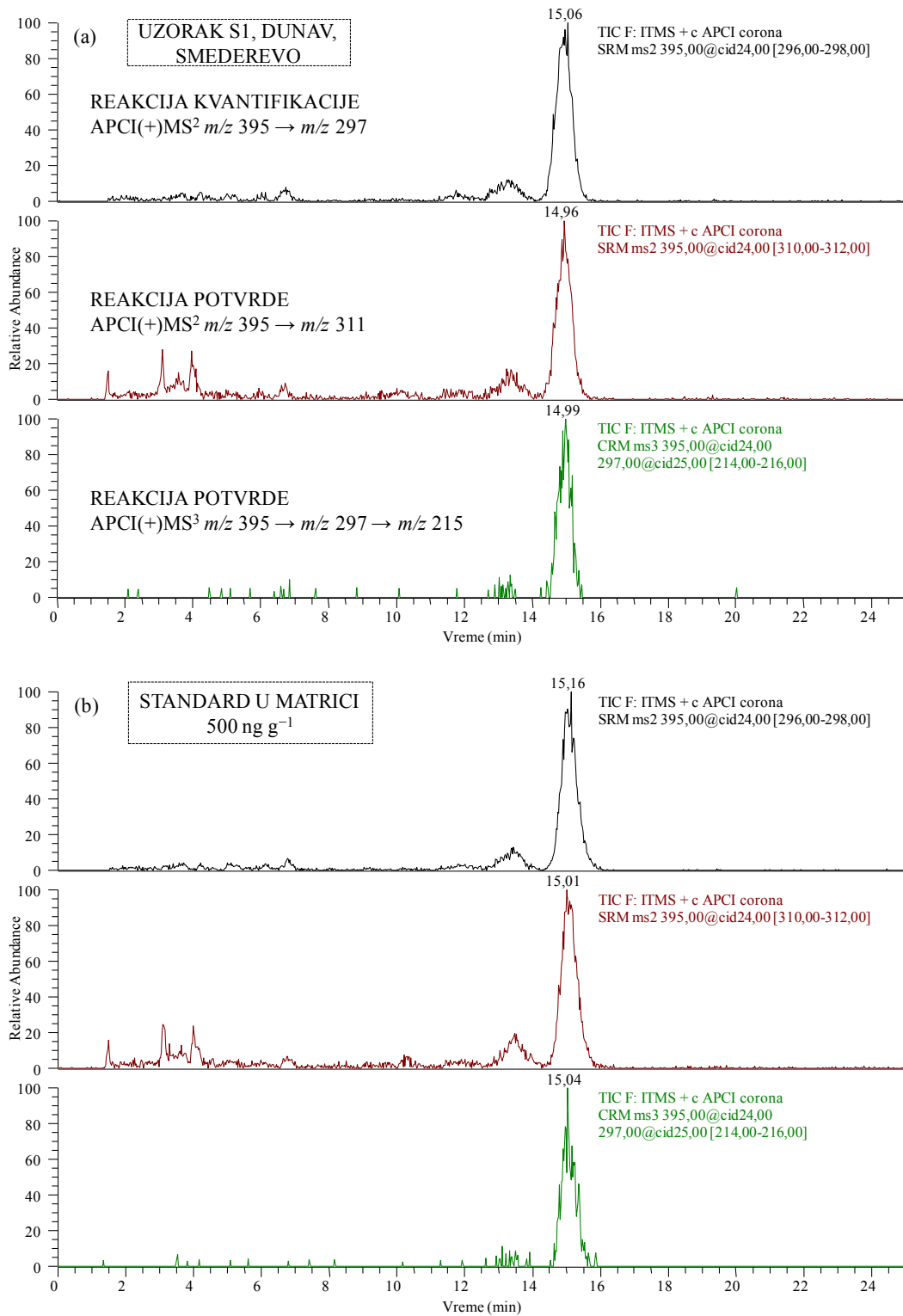
Slika 4.39. Maseni hromatogrami sa potvrdom prisustva holesterola: (a) uzorka sedimenta Tise (S4); (b) standarda u matrici uzorka koncentracije 100 ng g⁻¹.



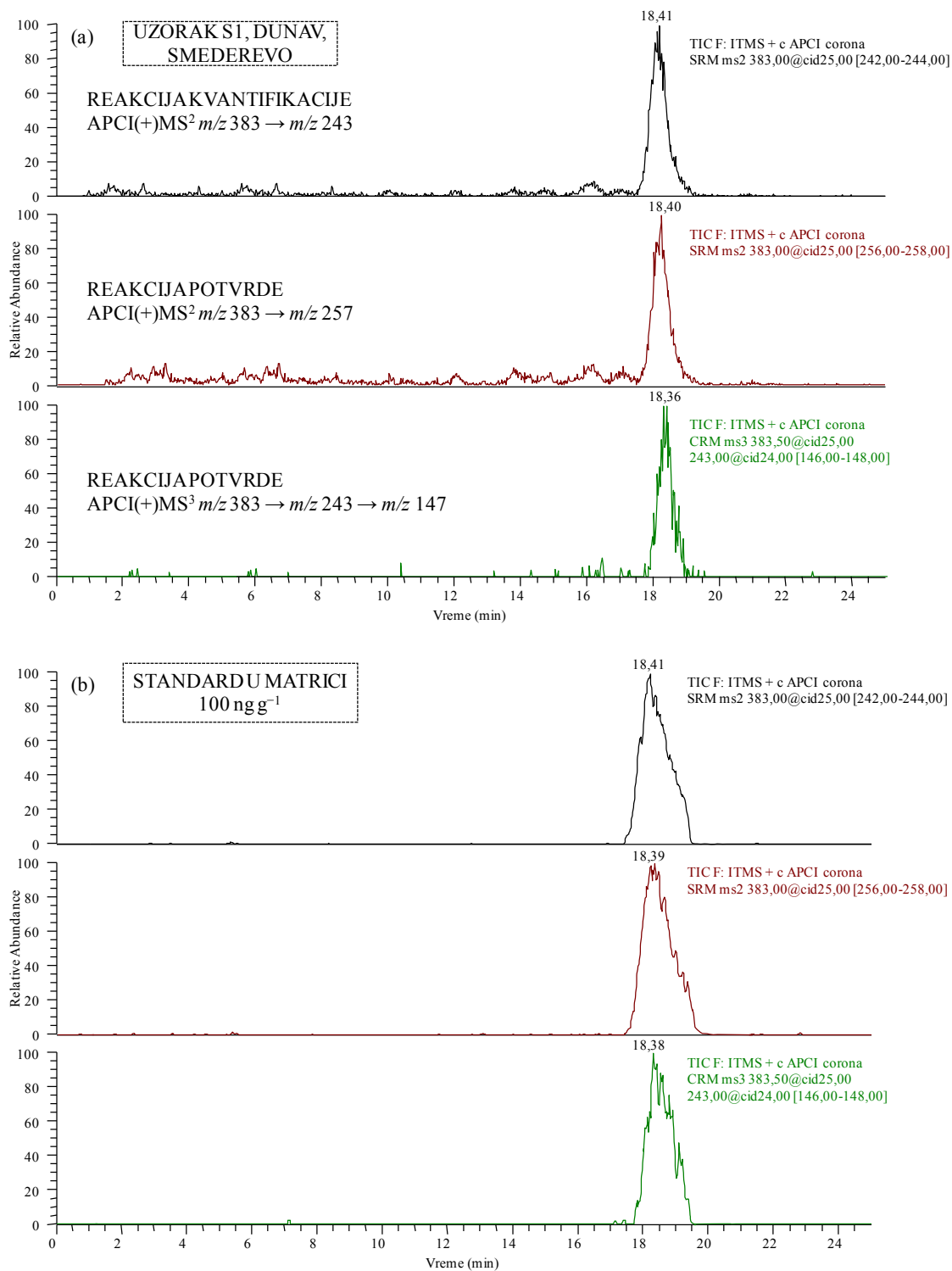
Slika 4.40. Maseni hromatogrami sa potvrdom prisustva holestanona: (a) uzorka sedimenta Dunava, kod Smedereva (S1); (b) standarda u matrici uzorka koncentracije 100 ng g^{-1} ; (c) standarda u metanolu koncentracije 100 ng g^{-1} .



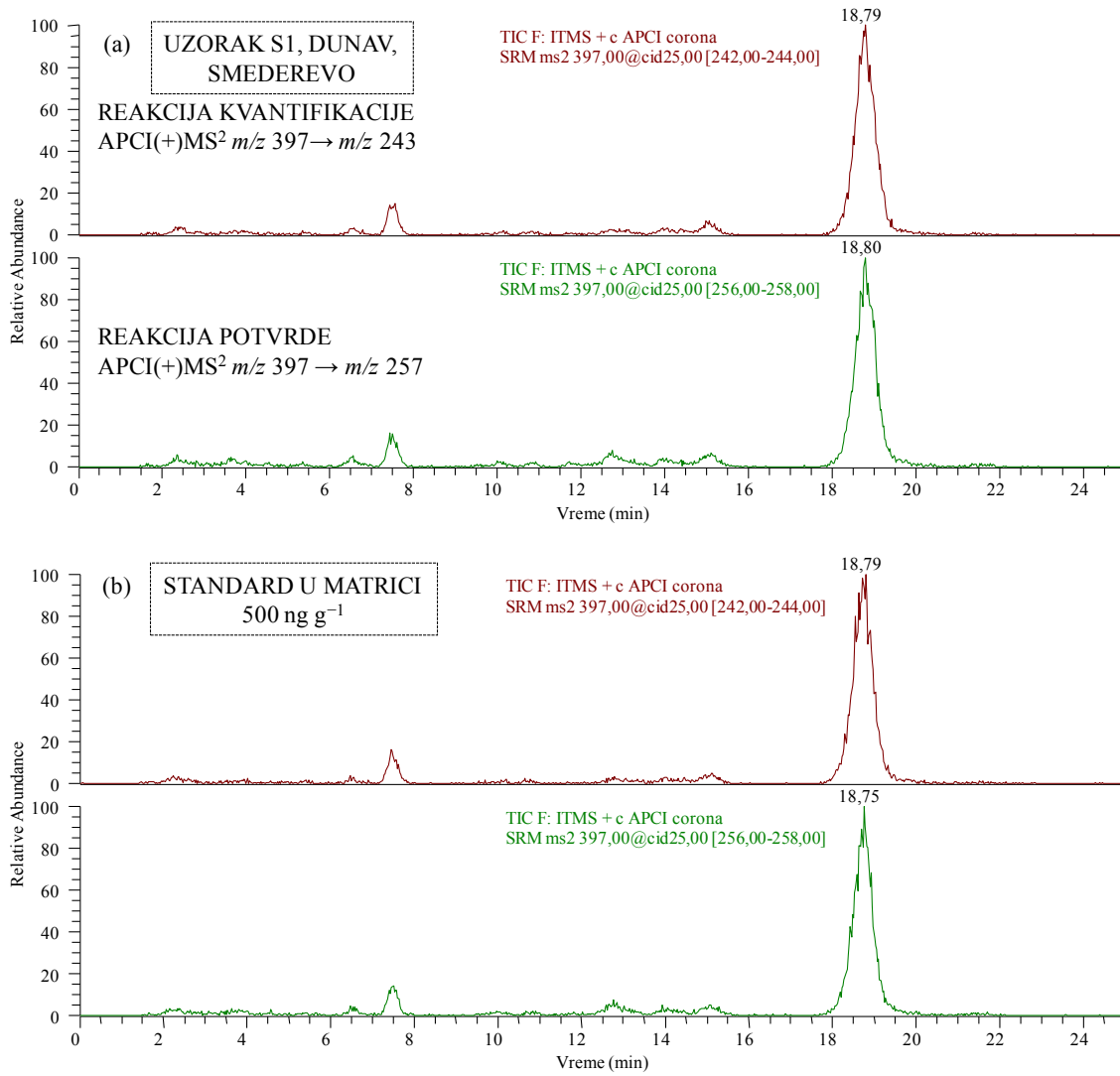
Slika 4.41. Maseni hromatogrami sa potvrdom prisustva dezmosterola: (a) uzorka sedimenta Dunava, kod Smedereva (S1); (b) standarda u matrici uzorka koncentracije 100 ng g⁻¹.



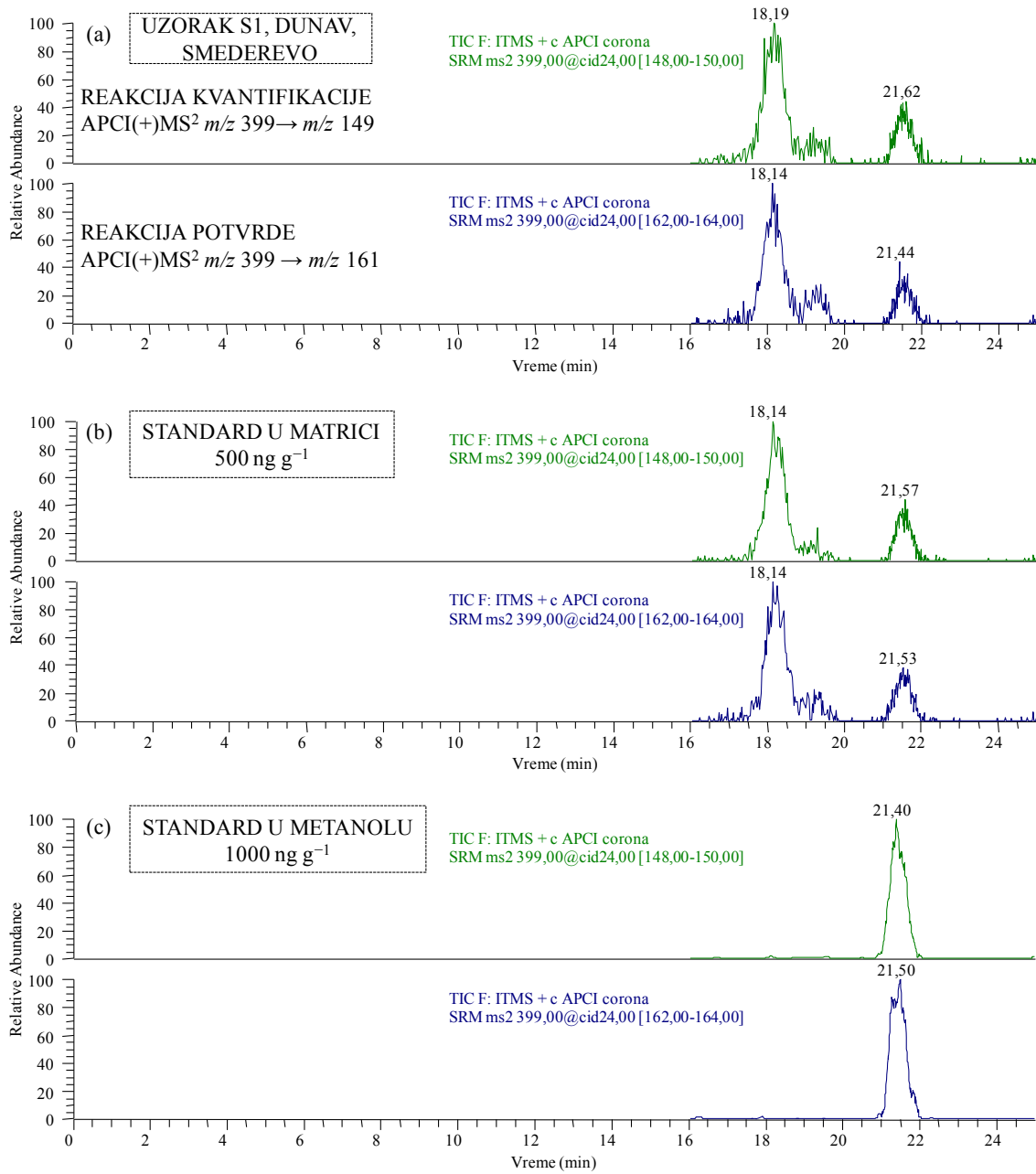
Slika 4.42. Maseni hromatogrami sa potvrdom prisustva stigmasterola: (a) uzorka sedimenta Dunava, kod Smedereva (S1); (b) standarda u matrici uzorka koncentracije 500 ng g⁻¹.



Slika 4.43. Maseni hromatogrami sa potvrdom prisustva kampesterola: (a) uzorka sedimenta Dunava, kod Smedereva (S1); (b) standarda u matrici uzorka koncentracije 100 ng g⁻¹.



Slika 4.44. Maseni hromatogrami sa potvrdom prisustva β -sitosterola: (a) uzorka sedimenta Dunava, kod Smedereva (S1); (b) standarda u matrici uzorka koncentracije 500 ng g⁻¹.



Slika 4.45. Maseni hromatogrami sa potvrdom prisustva sitostanola: (a) uzorka sedimenta Dunava, kod Smedereva (S1); (b) standarda u matrici uzorka koncentracije 500 $ng\ g^{-1}$; (c) standarda u metanolu koncentracije 1000 $ng\ g^{-1}$.

4.9. Utvrđivanje porekla zagađenja rečnih sedimenata primenom odnosa sterola

Na osnovu koncentracija sterola detektovanih u uzorcima rečnih sedimenata, za uzorke S1–S11 su izračunati odnosi sterola koji omogućavaju identifikaciju humanog fekalnog zagađenja i razlikovanje izvora fekalne materije u sedimentima. Izračunate vrednosti odnosa sterola prikazane su u tabeli 4.9.

Koprostanol/(koprostanol+holestanol) je najčešće korišćeni odnos za identifikaciju humane fekalne kontaminacije (odnos br. 1, tabela 2.4). Prema graničnoj vrednosti ovog odnosa većoj od 0,7, sedimenti iz dve male reke, Topčiderke i Velikog Luga (uzorci S10 i S11), su prepoznati kao zagađeni humanim fekalnim materijalom, tj. kanalizacionim otpadnim vodama. Vrednosti odnosa br. 1 izračunate za ostale ispitivane uzorke sedimenata (u opsegu 0,3–0,7, uzorci S1–S8) ukazuju na to da je pored antropogenog zagađenja prisutan i uticaj sterola iz prirodnih izvora. Naime, u životnoj sredini može doći do direktnog biogenog unosa holestanola u sedimente ili njegove sinteze iz holesterola (Carreira *et al.*, 2004). Slične vrednosti ovog odnosa su dobijene prilikom analize sedimenata iz Španije (Grimalt *et al.*, 1990) i Brazila (Carreira *et al.*, 2004; Cordeiro *et al.*, 2008). Iznenadjuće je da su vrednosti odnosa u opsegu 0,3–0,7 izračunate čak i za mesta uzorkovanja na kojima je procenat koprostanola bio veoma visok (npr. za uzorke S7 i S8, tabela 4.6). Treba imati u vidu da su neke studije pokazale da je granična vrednost odnosa od 0,7 previsoka za identifikaciju humane fekalne kontaminacije sedimenata i da je pogodnija vrednost odnosa veća od 0,5 (Isobe *et al.*, 2002, Leeming *et al.*, 1998). Slični rezultati su dobijeni i izračunavanjem odnosa (koprostanol+epikoprostanol)/(koprostanol+epikoprostanol+holestanol) (odnos br. 2, tabela 2.4). Ovaj odnos uzima u obzir mikrobiološku konverziju koprostanola u epikoprostanol. Pored uzoraka S10 i S11, dodatno je uzorak S2 prepoznat kao zagađen humanim fekalnim materijalom. Koprostanol/holestanol odnos (odnos br. 3, tabela 2.4) predstavlja pojednostavljen oblik odnosa br. 1. Prema referentnoj vrednosti ovog odnosa većoj od 0,5, skoro svi analizirani uzorci sedimenata identifikovani su kao zagađeni kanalizacionim otpadnim vodama. Izuzetak je bio uzorak S6 kod kojeg je prepoznat kombinovan uticaj sterola iz prirodnih i antropogenih izvora, jer je vrednost odnosa bila u opsegu 0,3–0,5 (tabela 4.9).

Tabela 4.9. Izračunati odnosi sterola za uzorke rečnih sedimenata S1–S11.

Uzorak	Odnos br.										
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.
S1	(~) 0,50	(~) 0,59	(+) 0,99	(-) 0,48	(+) 0,32	(+) 2,10	(~) 0,48	(-) 1,86	(-) 0,71	(-) 0,24	(-) 1,29
S2	(~) 0,64	(+) 0,74	(+) 1,79	(+) 1,24	(+) 0,73	(+) 1,79	(~) 0,56	(-) 1,51	(-) 1,93	(-) 0,36	(+) 0,36
S3	(~) 0,66	(~) 0,67	(+) 1,95	(+) 2,09	(+) 1,01	(+) 18,76	(+) 0,05	(-) 3,06	(-) 2,20	(-) 0,04	(+) 0,34
S4	(~) 0,49	(~) 0,53	(+) 0,95	(+) 3,30	(+) 0,74	(+) 5,51	(+) 0,18	(-) 9,54	(-) 3,90	(-) 0,09	(+) 0,33
S5	(~) 0,62	(~) 0,66	(+) 1,64	(+) 2,20	(+) 0,94	(+) 5,91	(+) 0,17	(-) 3,59	(-) 2,58	(-) 0,11	(+) 0,36
S6	(~) 0,30	(~) 0,36	(~) 0,43	(-) 0,83	(+) 0,28	(+) 2,99	(~) 0,33	(-) 1,55	(-) 1,11	(-) 0,10	(+) 0,81
S7	(~) 0,66	(~) 0,69	(+) 1,91	(+) 2,13	(+) 1,01	(+) 7,08	(+) 0,14	(-) 1,29	(-) 2,44	(-) 0,09	(+) 0,23
S8	(~) 0,51	(~) 0,55	(+) 1,06	(+) 4,36	(+) 0,85	(+) 5,63	(+) 0,18	(-) 6,42	(+) 5,14	(-) 0,09	(+) 0,19
S9	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	(-) 2,67	NI	NI	NI
S10	(+) 0,86	(+) 0,87	(+) 5,97	(+) 2,97	(+) 1,98	(+) 13,65	(+) 0,07	(+) 0,83	(-) 3,19	(-) 0,06	(+) 0,04
S11	(+) 0,86	(+) 0,87	(+) 5,93	(+) 10,12	(+) 3,74	(+) 10,48	(+) 0,10	(+) 0,99	(+) 10,12	(-) 0,08	(+) 0,05

(+) sigurna humana fekalna kontaminacija; (~) nesigurna humana fekalna kontaminacija; (-) nema humane fekalne kontaminacije;

NI – nije izračunat odnos (odgovarajući steroli nisu detektovani).

Uzimajući u obzir rezultate dobijene korišćenjem prva tri odnosa, kao i sugerisanu nižu graničnu vrednost za odnos br. 1 ($< 0,5$ za indikaciju antropogenog zagađenja), može se zaključiti da je većina ispitivanih sedimenata zagađena humanim fekalnim materijalom. Takođe, u rečnom sedimentu Save (uzorak S6) je utvrđeno prisustvo sterola i iz prirodnih i iz antropogenih izvora, a sediment Dunava, uzorkovan pre izliva otpadne vode u Smederevu (uzorak S1), sa najmanjim sadržajem koprostanola (8%, tabela 4.6), može se smatrati graničnim slučajem.

Za većinu analiziranih sedimenata vrednost koprostanol/holesterol odnosa (odnos br. 4, tabela 2.4) je bila veća od 1,0, što ukazuje na zagađenje komunalnim otpadnim vodama. Uzorak sedimenta reke Veliki Lug se posebno izdvaja sa najvišom vrednošću od 10,12 (uzorak S11, tabela 4.9). Ovako visoka vrednost ukazuje na zagađenje sedimenta sirovim, netretiranim kanalizacionim otpadnim vodama (Vane *et al.*, 2010). Vrednosti odnosa manje od 1,0, izračunate za uzorke S1 i S6, ukazuju na značajan uticaj sterola poreklom od životinja i biljaka, tj. sterola iz biogenih izvora.

Prema graničnoj vrednosti od 0,06 predloženoj za odnos koprostanol/(holesterol+holestanol) (odnos br. 5, tabela 2.4) svi ispitivani uzorci sedimenata su identifikovani kao zagađeni humanim fekalnim materijalom. Međutim, ponovo se izdvajaju uzorci S1 i S6 sa najnižim izračunatim vrednostima ovog odnosa (0,32 i 0,28, tabela 4.9). Ovi rezultati ukazuju na mogućnost da je referentna vrednost od 0,06 preniska za pouzdano utvrđivanje antropogenog zagađenja. Naime, u studiji u kojoj je predložen ovaj odnos (Writer *et al.*, 1995) korišćene su veoma niske koncentracije koprostanola ($> 10 \text{ ng g}^{-1}$) za identifikaciju humane fekalne kontaminacije. S obzirom na to da je nekoliko godina kasnije kao referentna predložena značajno veća koncentracija koprostanola ($> 500 \text{ ng g}^{-1}$, González-Oreja i Saiz-Salinas, 1998), može se zaključiti da granična vrednost odnosa br. 5 mora biti veća od 0,06.

Vrednosti izračunate za koprostanol/epikoprostanol i epikoprostanol/koprostanol odnose (odnosi br. 6 i 7, tabela 2.4) se mogu uporedo diskutovati, pošto jedan odnos predstavlja recipročni izraz drugog. Izračunate vrednosti koprostanol/epikoprostanol odnosa veće od 1,5 ukazuju na humano fekalno zagađenje svih ispitivanih uzoraka sedimenata (1,79–18,76, tabela 4.9). Slične vrednosti ovog odnosa su dobijene u studiji o zagađenju sedimenata iz Venecijanskog zaliva (1,55–13,24, Fattore *et al.*, 1996). Što se tiče epikoprostanol/koprostanol odnosa, referentna vrednost manja od 0,2 ukazuje na

zagađenje netretiranim otpadnim vodama. Starenjem fekalne materije dolazi do konverzije koprostanola u epikoprostanol i porasta vrednosti ovog odnosa. Vrednost veća od 0,8 ukazuje na antropogeno zagađenje pre dužeg vremenskog perioda ili uticaj prečišćenih otpadnih voda. Pošto se u blizini mesta uzorkovanja ne nalaze PPOV, jedini izvor sterola mogu biti netretirane kanalizacione otpadne vode. Prema izračunatim vrednostima odnosa br. 7, uzorci S1, S2 i S6 su identifikovani kao zagađeni pre nekog vremena (0,33–0,56, tabela 4.9), dok je za sve ostale uzorke utvrđeno kontinualno zagađenje sirovim, netretiranim otpadnim vodama (0,05–0,10). Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je epikoprostanol/koprostanol odnos pouzdaniji za utvrđivanje humanog fekalnog zagađenja od koprostanol/epikoprostanol odnosa. Takođe, koprostanol/epikoprostanol odnos je uspešno primenjen za razlikovanje antropogenih i prirodnih izvora sterola samo na Antarktiku (Venkatesan i Mirsadeghi, 1992; Martins *et al.*, 2002), dok je epikoprostanol/koprostanol odnos bio pouzdaniji za razlikovanje zagađenja poreklom od tretiranih i netretiranih otpadnih voda u područjima sa umerenom klimom (Mudge *et al.*, 1999; Martins *et al.*, 2007).

Za analizirane uzorke rečnih sedimenata izračunati su i odnosi sterola za razlikovanje izvora zagađenja. Prema odnosu (kampesterol+ β -sitosterol)/holesterol (odnos br. 8, tabela 2.5) manjem od 1,0, humana fekalna kontaminacija je utvrđena samo kod uzoraka S10 i S11 (0,83 i 0,99, tabela 4.9). Za većinu ostalih ispitivanih uzoraka, sa vrednostima odnosa većim od 1,5, prepoznata je kontaminacija otpadom poreklom od svinja (1,51–9,54). S obzirom na to da je čak i nezagađen uzorak sedimenta S9 prepoznat kao zagađen svinjskim đubrivom, odnos br. 8 se ne može smatrati pouzdanim, što se pokazalo i u samoj studiji u kojoj je odnos predložen (Jardé *et al.*, 2007). Takođe, visoke vrednosti ovog odnosa mogu ukazati i na prisustvo sterola iz biljnih izvora, tj. terestrijalni unos sterola (Volkman, 1986; Martins *et al.*, 2011). Vrednosti izračunate za odnos (koprostanol+epikoprostanol)/holesterol (odnos br. 9, tabela 2.5) mnogo veće od 3,7 ukazuju na antropogeno zagađenje uzoraka S8 i S11. Za većinu ostalih uzoraka, izvor fekalne materije se ne može utvrditi na osnovu vrednosti odnosa br. 9 (u opsegu 0,71–3,19, tabela 4.9). Uzorci S1 i S6 se ponovo izdvajaju, sa najnižim vrednostima ovog odnosa (0,71 i 1,11).

Na osnovu epikoprostanol/(koprostanol+holestanol) odnosa (odnos br. 10, tabela 2.5) koji omogućava razlikovanje sterola poreklom od čoveka i biljojeda, za uzorke S1 i

S2 (sedimenti Dunava, uzorkovani kod Smedereva), kao i uzorke S5 (sediment reke Tise) i S6 (sediment Save) prepoznat je uticaj sterola poreklom od biljojeda. S obzirom na to da čak ni uzorci S10 i S11 nisu prepoznati kao zagađeni fekalnom materijom, ovaj odnos se ne može smatrati pouzdanim za utvrđivanje zagađenja rečnih sedimenata.

Prema referentnoj vrednosti sitostanol/koprostanol odnosa (odnos br. 11, tabela 2.5) manjoj od 1,0, za većinu ispitivanih uzoraka sedimenata utvrđen je humani izvor zagađenja (0,04–0,81, tabela 4.9). Izuzetak je uzorak S1 (vrednost odnosa 1,29) za koji je utvrđeno prisustvo sterola poreklom od biljojeda. Iako je primenom ovog odnosa uzorak S6 prepoznat kao zagađen humanim fekalnim materijalom, izračunata vrednost od 0,81 je značajno veća u poređenju sa vrednostima za ostale uzorke, što ukazuje na to da je kod ovog uzorka prisutan i uticaj sterola iz prirodnih izvora.

U ispitivanom uzorku sedimenta iz Venecijanskog zaliva većina sterola nije detektovana, pa nije bilo moguće izračunavanje odgovarajućih odnosa. Za ovaj nezagađeni uzorak jedino je bilo moguće izračunati odnos br. 8, čija je vrednost manja od 1,0 ukazala na antropogeno zagađenje (tabela 4.10). Nepouzdanost ovog odnosa je potvrđena na uzorku aktivnog mulja iz PPOV u Veneciji u kojem nije prepoznato humano fekalno zagađenje. Izračunate vrednosti odnosa br. 6, 7 i 10 za uzorak aktivnog mulja ne ukazuju na zagađenje humanim fekalnim materijalom. Kod ovih odnosa je presudan uticaj epikoprostanola koji je u mulju prisutan u visokoj koncentraciji (7729 ng g^{-1} , tabela 4.8), približno jednakoj koncentraciji koprostanola (7787 ng g^{-1}). Poznato je da se koncentracija epikoprostanola povećava u aktivnom mulju koji zaostaje u PPOV, kao rezultat intenzivne, anaerobne mikrobiološke redukcije koprostanola (McCalley *et al.*, 1981). Zbog toga se odnosi sterola sa epikoprostanolom evidentno ne mogu primenjivati na uzorke mulja iz PPOV, već samo u identifikaciji izvora zagađenja rečnih sedimenata. S druge strane, na uzorku aktivnog mulja iz PPOV je potvrđena primenljivost odnosa br. 1, 2, 3, 4, 5, 9 i 11, jer je na osnovu referentnih vrednosti ovih odnosa prepoznata humana fekalna kontaminacija uzorka.

Tabela 4.10. Izračunati odnosi sterola za uzorak sedimenta iz Venecijanskog zaliva i uzorak aktivnog mulja iz PPOV.

Odnos br.	Sediment Venecijanskog zaliva	Aktivni mulj iz PPOV
1.	NI	(+) 0,76
2.	NI	(+) 0,87
3.	NI	(+) 3,22
4.	NI	(+) 2,96
5.	NI	(+) 1,54
6.	NI	(-) 1,01
7.	NI	(-) 0,99
8.	(+) 0,71	(-) 1,87
9.	NI	(+) 5,90
10.	NI	(-) 0,76
11.	NI	(+) 0,35

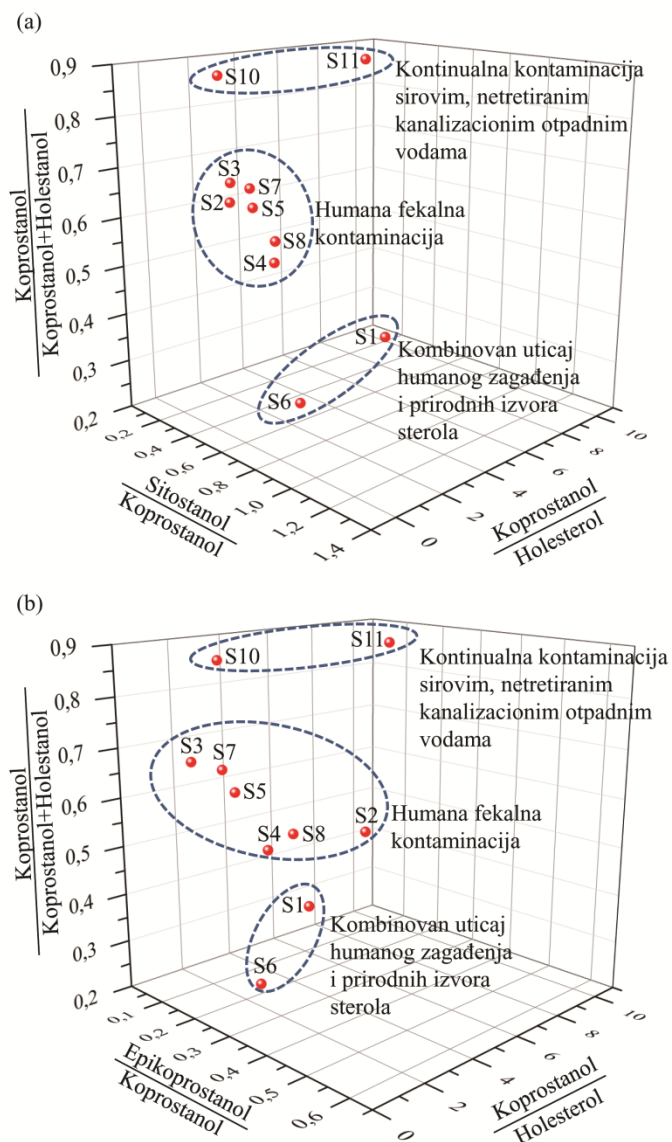
(+) sigurna humana fekalna kontaminacija; (-) nema humane fekalne kontaminacije; NI – nije izračunat odnos (odgovarajući steroli nisu detektovani).

Na osnovu prethodnog se može zaključiti da su najpouzdaniji odnosi sterola za utvrđivanje porekla zagađenja rečnih sedimenata: koprostanol/(koprostanol+holestanol), sa referentnom vrednošću većom od 0,5 za potvrdu humane fekalne kontaminacije, kao i koprostanol/holesterol, epikoprostanol/koprostanol i sitostanol/koprostanol. Ovi odnosi se često koriste pri različitim uslovima u životnoj sredini i različitom unosu organske materije. Dobijeni rezultati se mogu vizuelizovati pomoću 3D grafika zavisnosti odabranih odnosa (slika 4.46) na kojima se jasno izdvajaju tri grupe uzoraka u skladu sa prethodnom diskusijom:

- 1) grupa uzoraka rečnih sedimenata kontinualno zagađena sirovim, netretiranim kanizacionim otpadnim vodama (sedimenti Topčiderke i Velikog Luga, S10 i S11)
- 2) grupa uzoraka zagađena humanim fekalnim materijalom (sedimenti Dunava – S2 i S3, Tise – S4 i S5, i Velike Morave – S7 i S8)
- 3) grupa uzoraka za koju je utvrđen kombinovan uticaj antropogenog zagađenja i prirodnih izvora sterola (sediment Dunava, uzorkovan pre ispusta otpadne vode u Smederevu – S1, i sediment Save – S6)

Dobijeni rezultati pokazuju dobro slaganje sa izračunatim procentom koprostanola u odnosu na ukupnu količinu sterola za sve ispitivane uzorke sedimenata (tabela 4.6). Na

primer, najveći procenat koprostanola je izračunat za uzorke S10 (38%) i S11 (62%), dok su najmanji procenti određeni za uzorke S1 (8%) i S6 (11%). Na osnovu rezultata procene zagađenja rečnih sedimenata u Srbiji komunalnim otpadnim vodama može se zaključiti da je za pouzdano utvrđivanje porekla fekalne materije u sedimentima, pored procenta koprostanola u odnosu na ukupnu količinu sterola, potrebno koristiti najmanje tri odnosa sterola.



Slika 4.46. 3D grafik zavisnosti odabranih odnosa sterola: (a) sitostanol/koprostanol, koprostanol/holesterol i koprostanol/(koprostanol+holestanol) odnosa; (b) epikoprostanol/koprostanol, koprostanol/holesterol i koprostanol/(koprostanol+holestanol) odnosa.

5. ZAKLJUČAK

Cilj ovog rada bio je razvoj nove, brze i osjetljive multirezidualne metode za istovremeno određivanje tragova steroidnih hormona i humanih/životinjskih i biljnih sterola u rečnim sedimentima. U okviru istraživanja izvršena je optimizacija postupka pripreme uzoraka sedimenata i instrumentalne metode tečne hromatografije u sprezi sa tandem masenom spektrometrijom. Posebna pažnja posvećena je poboljšanju hromatografskog razdvajanja steroidnih hormona i sterola sa identičnim reakcijama fragmentacije u masenom detektoru. Razvijena i validirana metoda je primenjena u analizi rečnih sedimenata, pri čemu su po prvi put dobijeni podaci o stepenu zagađenosti sedimenata steroidnim jedinjenjima u Srbiji. Na osnovu koncentracija detektovanih sterola, izračunati su odnosi sterola pomoću kojih su utvrđeni izvori zagađenja rečnih sedimenata. Analizom rezultata dobijenih u ovom radu mogu se izvesti sledeći zaključci:

○ ***O optimalnim uslovima hromatografskog razdvajanja i maseno-spektrometrijskoj detekciji analita:***

- ∞ Optimalno hromatografsko razdvajanje steroidnih hormona postignuto je na Zorbax Eclipse[®] XDB-C₁₈ reverzno-faznoj koloni. U cilju potpunog hromatografskog razdvajanja hormona sa identičnim MSⁿ reakcijama fragmentacije (estriola i estrona, kao i 17 α - i 17 β -estradiola) potrebno je koristiti mobilnu fazu sastava 55% metanola i 45% vode.
- ∞ Efikasno hromatografsko razdvajanje četiri humana/životinjska sterola sa istim MSⁿ reakcijama fragmentacije: epikoprostanola, epiholestanola, koprostanola i holestanola postignuto je na LiChrospher RP-18 EC koloni.
- ∞ Za efikasnu jonizaciju odabranih steroidnih jedinjenja potrebno je koristiti hemijsku jonizaciju na atmosferskom pritisku. Sva ispitivana jedinjenja u procesu jonizacije formirala su samo pozitivne jone analita.
- ∞ Kvantifikacija odabranih analita je uspešno urađena praćenjem karakteristične reakcije fragmentacije prekursor jona u najintenzivniji i najstabilniji fragmentni jon.

- ∞ Dodatne MSⁿ reakcije su iskorišćene za potvrdu prisustva analita, ponovnom analizom pozitivnih uzoraka uz proširenu instrumentalnu metodu sa dodatnim SRM prelazima.
- ***O optimalnim parametrima ultrazvučne ekstrakcije i postupka prečišćavanja dobijenih ekstrakata:***
 - ∞ Kao optimalan rastvarač u postupku ultrazvučne ekstrakcije dvadeset odabranih steroidnih jedinjenja iz rečnih sedimenata odabran je metanol.
 - ∞ U optimizaciji mase sedimenta za ekstrakciju nisu uočene značajne razlike u prinosima pri ekstrakciji 1,0 i 2,0 g sedimenta, zbog čega je kao optimalna odabrana masa od 2,0 g jer se time postiže veći faktor predkoncentrovanja.
 - ∞ U cilju smanjenja vremena pripreme uzorka sedimenta za analizu, kao optimalno je odabrano vreme ultrazvučne ekstrakcije od 3×10 min.
 - ∞ S obzirom na to da su rečni sedimenti veoma kompleksne matrice čiji sastojci i nečistoće mogu uticati na rezultate analize, potrebno je uraditi i prečišćavanje dobijenih ekstrakata. Kao optimalno pakovanje kolone za prečišćavanje odabrana je smeša silika-gela i anhidrovanog Na₂SO₄.
 - ∞ Kao najefikasniji rastvarač za eluiranje odabranih analita sa kolone za prečišćavanje odabran je metanol.
 - ∞ Za optimizovanu i validiranu analitičku metodu vrednosti prinosa odabranih steroidnih hormona i sterola su bile visoke (73–118%), sa RSD vrednostima generalno ispod 20%, potvrđujući dobru ponovljivost razvijene metode.
 - ∞ Linearnost optimizovane metode je bila dobra, sa koeficijentima korelacije u opsegu od 0,936 za stigmasterol do 0,999 za holestanon i holesterol.
 - ∞ Granice detekcije razvijene i validirane metode su bile u opsegu 0,6–15 ng g⁻¹, dok su granice kvantifikacije bile u opsegu 2–50 ng g⁻¹.
 - ∞ Uticaj matrice za većinu analita nije bio izražen (–12% za holestanol do 16% za estriol). Značajan uticaj matrice je zabeležen u slučaju holestanona (–27%), sitostanola (29%), epikoprostanola (67%) i β-sitosterola (68%). Eliminacija uticaja matrice postignuta je primenom metode standardnog dodatka kao tehnike kalibracije.

○ ***O rezultatima analize realnih uzoraka rečnih sedimentata:***

- ☞ Od devet analiziranih steroidnih hormona, samo su tragovi 17α -estradiola i mestranola pronađeni u rečnim sedimentima. Analiza uzoraka sedimentata je pokazala široku rasprostranjenost sterola. U najvećoj koncentraciji detektovan je humani/životinjski sterol koprostanol, biomarker antropogenog zagađenja.
- ☞ Na osnovu koncentracija sterola detektovanih u ispitivanim uzorcima izračunati su odnosi sterola za identifikaciju humanog fekalnog zagađenja i razlikovanje izvora fekalne materije u sedimentima.
- ☞ Od jedanaest testiranih odnosa sterola, kao najpouzdaniji za utvrđivanje porekla zagađenja rečnih sedimentata mogu se izdvojiti sledeća četiri odnosa: koprostanol/(koprostanol+holestanol) (sa referentnom vrednošću većom od 0,5 za potvrdu humane fekalne kontaminacije), koprostanol/holesterol, epikoprostanol/koprostanol i sitostanol/koprostanol.
- ☞ Da bi se pouzdano mogao utvrditi izvor fekalne materije u sedimentima, pored procenta koprostanola u odnosu na ukupnu količinu sterola, neophodno je koristiti najmanje tri odnosa sterola.
- ☞ Rezultati su pokazali da je većina ispitivanih rečnih sedimentata iz Srbije prepoznata kao zagađena humanim fekalnim materijalom. Za dva uzorka je utvrđen kombinovan uticaj antropogenog zagađenja i prirodnih izvora sterola poreklom od biljojeda. Dobijeni rezultati se mogu objasniti činjenicom da u blizini mesta uzorkovanja ne postoje postojenja za prečišćavanje otpadnih voda, zbog čega se velike količine sterola oslobađaju u prirodne vodotoke.

LITERATURA

- Al-Odaini, N.A., Zakaria, M.P., Yaziz, M.I., Surif, S., 2010. Multi-residue analytical method for human pharmaceuticals and synthetic hormones in river water and sewage effluents by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1217, 6791–6806.
- Alsalahi, M.A., Latif, M.T., Ali, M.M., Dominick, D., Khan, M.F., Mustafa, N.I.H., Nadzir, M.S.M., Nasher, E., Zakaria, M.P., 2015. Sterols as biomarkers in the surface microlayer of the estuarine areas. *Mar. Pollut. Bull.* 93, 278–283.
- Andersen, H., Siegrist, H., Halling-Sørensen, B., Ternes, T.A., 2003. Fate of estrogens in a municipal sewage treatment plant. *Environ. Sci. Technol.* 37, 4021–4026.
- Arditsoglou, A., Voutsas, D., 2012. Occurrence and partitioning of endocrine-disrupting compounds in the marine environment of Thermaikos Gulf, Northern Aegean Sea, Greece. *Mar. Pollut. Bull.* 64, 2443–2452.
- Ardrey, R.E., 2003. *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry: An introduction.* John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England.
- Barber, L.B., Writer, J.H., 1998. Impact of the 1993 flood on the distribution of organic contaminants in bed sediments of the Upper Mississippi River. *Environ. Sci. Technol.* 32, 2077–2083.
- Baronti, C., Curini, R., D’Ascenzo, G., Di Corcia, A., Gentili, A., Samperi, R., 2000. Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water. *Environ. Sci. Technol.* 34, 5059–5066.
- Barreiros, L., Queiroz, J.F., Magalhães, L.M., Silva, A.M.T., Segundo, M.A., 2016. Analysis of 17- β -estradiol and 17- α -ethinylestradiol in biological and environmental matrices – A review. *Microchem. J.* 126, 243–262.
- Bartlett, P.D., 1987. Degradation of coprostanol in an experimental system. *Mar. Pollut. Bull.* 18, 27–29.
- Bataglioni, G.A., Meurer, E., de Albergaria-Barbosa, A.C., Bicego, M.C.C., Weber, R.R., Eberlin, M.N., 2015. Determination of geochemically important sterols and triterpenols in sediments using ultrahigh-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS). *Anal. Chem.* 87, 7771–7778.
- Beck, J., Totsche, K.U., Kögel-Knabner, I., 2008. A rapid and efficient determination of natural estrogens in soils by pressurised liquid extraction and gas chromatography-

- mass spectrometry. *Chemosphere* 71, 954–960.
- Belfroid, A.C., Van Der Horst, A., Vethaak, A.D., Schäfer, A.J., Rijs, G.B.J., Wegener, J., Cofino, W.P., 1999. Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in the Netherlands. *Sci. Total Environ.* 225, 101–108.
- Benfenati, E., Cools, E., Fattore, E., Fanelli, R., 1994. A GC-MS method for the analysis of fecal and plant sterols in sediment samples. *Chemosphere* 29, 1393–1405.
- Bhat, S. V., Nagasampagi, B.A., Sivakumar, M., 2005. *Chemistry of natural products*. Springer, Berlin, Germany.
- Biache, C., Philp, R.P., 2013. The use of sterol distributions combined with compound specific isotope analyses as a tool to identify the origin of fecal contamination in rivers. *Water Res.* 47, 1201–1208.
- Bikle, D.D., 2014. Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications. *Chem. Biol.* 21, 319–329.
- Bouman, A., Jan Heineman, M., Faas, M.M., 2005. Sex hormones and the immune response in humans. *Hum. Reprod. Update* 11, 411–423.
- Braga, O., Smythe, G.A., Schafer, A.I., Feitz, A.J., 2005. Steroid estrogens in primary and tertiary wastewater treatment plants. *Water Sci. Technol.* 52, 273–278.
- Bull, I.D., Bergen, P.F. Van, Nott, C.J., Poulton, P.R., Evershed, R.P., 2000. Organic geochemical studies of soils from the Rothamsted classical experiments–V . The fate of lipids in different long-term experiments. *Org. Geochem.* 31, 389–408.
- Bull, I.D., Lockheart, M.J., Elhmmali, M.M., Roberts, D.J., Evershed, R.P., 2002. The origin of faeces by means of biomarker detection. *Environ. Int.* 27, 647–654.
- Campos, V., Fracício, R., Fraceto, L.F., Rosa, A.H., 2012. Fecal sterols in estuarine sediments as markers of sewage contamination in the Cubatão Area, São Paulo, Brazil. *Aquat. Geochem.* 18, 433–443.
- Cañabate-Díaz, B., Segura Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., Belmonte Vega, A., Garrido Frenich, A., Martínez Vidal, J.L., Duran Martos, J., 2007. Separation and determination of sterols in olive oil by HPLC-MS. *Food Chem.* 102, 593–598.
- Canuel, E.A., Martens, C.S., 1996. Reactivity of recently deposited organic matter: Degradation of lipid compounds near the sediment-water interface. *Geochim.*

- Cosmochim. Acta 60, 1793–1806.
- Careri, M., Elviri, L., Mangia, A., 2001. Liquid chromatography-UV determination and liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric characterization of sitosterol and stigmasterol in soybean oil. *J. Chromatogr. A* 935, 249–257.
- Cargouët, M., Perdiz, D., Mouatassim-Souali, A., Tamisier-Karolak, S., Levi, Y., 2004. Assessment of river contamination by estrogenic compounds in Paris area (France). *Sci. Total Environ.* 324, 55–66.
- Carreira, R.S., Wagener, A.L.R., Readman, J.W., 2004. Sterols as markers of sewage contamination in a tropical urban estuary (Guanabara Bay, Brazil): Space-time variations. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 60, 587–598.
- Chang, H., Wan, Y., Wu, S., Fan, Z., Hu, J., 2011. Occurrence of androgens and progestogens in wastewater treatment plants and receiving river waters: Comparison to estrogens. *Water Res.* 45, 732–740.
- Combalbert, S., Hernandez-Raquet, G., 2010. Occurrence, fate, and biodegradation of estrogens in sewage and manure. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86, 1671–1692.
- Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, *Official Journal of the European Communities* L221, 8–36.
- Cordeiro, L.G.S.M., Carreira, R.S., Wagener, A.L.R., 2008. Geochemistry of fecal sterols in a contaminated estuary in southeastern Brazil. *Org. Geochem.* 39, 1097–1103.
- Council Directive 86/278/EEC of 12 June 1986 on the protection of the environment, and in particular of the soil, when sewage sludge is used in agriculture, *Official Journal of the European Communities* L181, 6–12.
- Council Directive 96/22/EC of 29 April 1996 concerning the prohibition on the use in stockfarming of certain substances having a hormonal or thyrostatic action and of beta-agonists, and repealing Directives 81/602/EEC, 88/146/EEC and 88/299/EEC, *Official Journal of the European Communities* L125, 3–9.
- Council Directive 96/23/EC of 29 April 1996 on measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products and repealing Directives 85/358/EEC and 86/469/EEC and Decisions 89/187/EEC and 91/664/EEC, *Official*

- Journal of the European Communities L125, 10–32.
- Council Regulation 2377/90 of 26 June 1990 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin, Official Journal of the European Communities L224, 1–8.
- D'Ascenzo, G., Di Corcia, A., Gentili, A., Mancini, R., Mastropasqua, R., Nazzari, M., Samperi, R., 2003. Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities. *Sci. Total Environ.* 302, 199–209.
- Dam, H., 1934. The formation of coprosterol in the intestine. II The action of intestinal bacteria on cholesterol. *Biochem. J.* 28, 820–825.
- Daughton, C.G., 2012. Real-time estimation of small-area populations with human biomarkers in sewage. *Sci. Total Environ.* 414, 6–21.
- de Hoffmann, E., Stroobant, V., 2007. *Mass Spectrometry. Principles and applications.* John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England.
- Dean, J.R., 2003. *Methods for environmental trace analysis.* John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, England.
- Decision 2015/495, Commission Implementing Decision (EU) 2015/495 of 20 March 2015 establishing a watch list of substances for Union-wide monitoring in the field of water policy pursuant to Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council, Official Journal of the European Communities L78, 40–42.
- DEQ, 2009. Senate Bill 737 Development of a Priority Persistent Pollutant List (P³L) for Oregon.
- Devane, M., Saunders, D., Gilpin, B., 2006. Faecal sterols and fluorescent whiteners as indicators of the source of faecal contamination. *Chem. New Zeal.* 74–77.
- Dutka, B.J., Chau, A.S.Y., Coburn, J., 1974. Relationship between bacterial indicators of water pollution and fecal sterols. *Water Res.* 8, 1047–1055.
- Dykstra, C.M., Giles, H.D., Banerjee, S., Pavlostathis, S.G., 2014. Biotransformation of phytosterols under aerobic conditions. *Water Res.* 58, 71–81.
- Elhmmali, M.M., Roberts, D.J., Evershed, R.P., 1997. Bile acids as a new class of sewage pollution indicator. *Environ. Sci. Technol.* 31, 3663–3668.
- EPA, 2012. OCSPP 850.6100: Environmental chemistry methods and associated independent laboratory validation, 10 strana.

- EPA, CCL-3, <https://www.epa.gov/ccl/contaminant-candidate-list-3-ccl-3>, datum poslednjeg pristupa: 30.03.2016.
- Eyssen, H.J., Parmentier, G.G., Compennolle, F.C., de Pauw, G., Piessens-Denef, M., 1973. biohydrogenation of sterols by eubacterium ATCC 21,408 - Nova Species. Eur. J. Biochem. 36, 411–421.
- Fattore, E., Benfenati, E., Marelli, R., Cools, E., Fanelli, R., 1996. Sterols in sediment samples from Venice Lagoon, Italy. Chemosphere 33, 2383–2393.
- Fernandez, M.P., Ikonomou, M.G., Buchanan, I., 2007. An assessment of estrogenic organic contaminants in Canadian wastewaters. Sci. Total Environ. 373, 250–269.
- Fetter, E., Krauss, M., Brion, F., Kah, O., Scholz, S., Brack, W., 2014. Effect-directed analysis for estrogenic compounds in a fluvial sediment sample using transgenic *cyp19a1b*-GFP zebrafish embryos. Aquat. Toxicol. 154, 221–229.
- Field, K.G., Samadpour, M., 2007. Fecal source tracking, the indicator paradigm, and managing water quality. Water Res. 41, 3517–3538.
- Froehner, S., Martins, R.F., Errera, M.R., 2009. Assessment of fecal sterols in Barigui River sediments in Curitiba, Brazil. Environ. Monit. Assess. 157, 591–600.
- Froehner, S., Machado, K.S., Stefan, E., Bleninger, T., da Rosa, E.C., de Castro Martins, C., 2012. Occurrence of selected estrogens in mangrove sediments. Mar. Pollut. Bull. 64, 75–79.
- Furtula, V., Liu, J., Chambers, P., Osachoff, H., Kennedy, C., Harkness, J., 2012a. Sewage treatment plants efficiencies in removal of sterols and sterol ratios as indicators of fecal contamination sources. Water. Air. Soil Pollut. 223, 1017–1031.
- Furtula, V., Osachoff, H., Derksen, G., Juahir, H., Colodey, A., Chambers, P., 2012b. Inorganic nitrogen, sterols and bacterial source tracking as tools to characterize water quality and possible contamination sources in surface water. Water Res. 46, 1079–1092.
- Gagné, F., Blaise, C., Lachance, B., Sunahara, G.I., Sabik, H., 2001. Evidence of coprostanol estrogenicity to the freshwater mussel *Elliptio complanata*. Environ. Pollut. 115, 97–106.
- Gomes, R.L., Avcioglu, E., Scrimshaw, M.D., Lester, J.N., 2004. Steroid-estrogen determination in sediment and sewage sludge: A critique of sample preparation and chromatographic/mass spectrometry considerations, incorporating a case study in

- method development. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 23, 737–744.
- González-Oreja, J.A., Saiz-Salinas, J.I., 1998. Short-term spatio-temporal changes in urban pollution by means of faecal sterols analysis. *Mar. Pollut. Bull.* 36, 868–875.
- Goodfellow, R.M., Cardoso, J., Eglinton, G., Dawson, J.P., Best, G.A., 1977. A faecal sterol survey in the Clyde Estuary. *Mar. Pollut. Bull.* 8, 272–276.
- Gorga, M., Insa, S., Petrovic, M., Barceló, D., 2014. Analysis of endocrine disrupters and related compounds in sediments and sewage sludge using on-line turbulent flow chromatography – liquid chromatography – tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1352, 29–37.
- Gorga, M., Insa, S., Petrovic, M., Barceló, D., 2015. Occurrence and spatial distribution of EDCs and related compounds in waters and sediments of Iberian rivers. *Sci. Total Environ.* 503-504, 69–86.
- Gottschall, N., Topp, E., Edwards, M., Payne, M., Kleywegt, S., Russell, P., Lapen, D.R., 2013. Hormones, sterols, and fecal indicator bacteria in groundwater, soil, and subsurface drainage following a high single application of municipal biosolids to a field. *Chemosphere* 91, 275–286.
- Gourmelon, M., Caprais, M.P., Mieszkin, S., Marti, R., Wéry, N., Jardé, E., Derrien, M., Jadas-Hécart, A., Communal, P.Y., Jaffrezic, A., Pourcher, A.M., 2010. Development of microbial and chemical MST tools to identify the origin of the faecal pollution in bathing and shellfish harvesting waters in France. *Water Res.* 44, 4812–4824.
- Grimalt, J.O., Fernandez, P., Bayona, J.M., Albaiges, J., 1990. Assessment of fecal sterols and ketones as indicators of urban sewage inputs to coastal waters. *Environ. Sci. Technol.* 24, 357–363.
- Hájková, K., Pulkrabová, J., Schůrek, J., Hajšlová, J., Poustka, J., Nápravníková, M., Kocourek, V., 2007. Novel approaches to the analysis of steroid estrogens in river sediments. *Anal. Bioanal. Chem.* 387, 1351–1363.
- Harwood, D.T., Handelsman, D.J., 2009. Development and validation of a sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay to simultaneously measure androgens and estrogens in serum without derivatization. *Clin. Chim. Acta* 409, 78–84.
- Harwood, J.J., 2014. Molecular markers for identifying municipal, domestic and

- agricultural sources of organic matter in natural waters. *Chemosphere* 95, 3–8.
- Hatcher, P.G., McGillivray, P.A., 1979. Sewage contamination in the New York Bight. Coprostanol as an indicator. *Environ. Sci. Technol.* 13, 1225–1229.
- Hibberd, A., Maskaoui, K., Zhang, Z., Zhou, J.L., 2009. An improved method for the simultaneous analysis of phenolic and steroidal estrogens in water and sediment. *Talanta* 77, 1315–1321.
- Hoffmann, B., Goes de Pinho, T., Schuler, G., 1997. Determination of free and conjugated oestrogens in peripheral blood plasma, feces and urine of cattle throughout pregnancy. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 105, 296–303.
- Holtvoeth, J., Vogel, H., Wagner, B., Wolff, G.A., 2010. Lipid biomarkers in Holocene and glacial sediments from ancient Lake Ohrid (Macedonia, Albania). *Biogeosciences* 7, 3473–3489.
- Honda, A., Yamashita, K., Miyazaki, H., Shirai, M., Ikegami, T., Xu, G., Numazawa, M., Hara, T., Matsuzaki, Y., 2008. Highly sensitive analysis of sterol profiles in human serum by LC-ESI-MS/MS. *J. Lipid Res.* 49, 2063–2073.
- Huerta-Fontela, M., Galceran, M.T., Ventura, F., 2011. Occurrence and removal of pharmaceuticals and hormones through drinking water treatment. *Water Res.* 45, 1432–1442.
- Hughes, K.A., Thompson, A., 2004. Distribution of sewage pollution around a maritime Antarctic research station indicated by faecal coliforms, *Clostridium perfringens* and faecal sterol markers. *Environ. Pollut.* 127, 315–321.
- Ibañez, E., Borrós, S., Comellas, L., 2000. Quantification of sterols, 5 α - and 5 β -stanols in sewage sludge, manure and soils amended with these both potential fertilizers. *Fresenius J. Anal. Chem.* 366, 102–105.
- Inoue, K., Kubota, S., Seyama, Y., 1999. Cholestanol induces apoptosis of cerebellar neuronal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 256, 198–203.
- Isobe, K.O., Tarao, M., Zakaria, M.P., Chiem, N.H., Minh, L.Y., Takada, H., 2002. Quantitative application of fecal sterols using gas chromatography – mass spectrometry to investigate fecal pollution in tropical waters: Western Malaysia and Mekong Delta, Vietnam. *Environ. Sci. Technol.* 4497–4507.
- Isobe, T., Serizawa, S., Horiguchi, T., Shibata, Y., Managaki, S., Takada, H., Morita, M., Shiraishi, H., 2006. Horizontal distribution of steroid estrogens in surface

- sediments in Tokyo Bay. *Environ. Pollut.* 144, 632–638.
- Ivie, G.W., Christopher, R.J., Munger, C.E., Coppock, C.E., 1986. Fate and residues of [4-¹⁴C] estradiol-17 β after intramuscular injection into Holstein steer calves. *J. Anim. Sci.* 62, 681–690.
- Jäpelt, R.B., Silvestro, D., Smedsgaard, J., Jensen, P.E., Jakobsen, J., 2011. LC-MS/MS with atmospheric pressure chemical ionisation to study the effect of UV treatment on the formation of vitamin D3 and sterols in plants. *Food Chem.* 129, 217–225.
- Jardé, E., Gruau, G., Mansuy-Huault, L., Peu, P., Martinez, J., 2007. Using sterols to detect pig slurry contribution to soil organic matter. *Water. Air. Soil Pollut.* 178, 169–178.
- Jeanneau, L., Jardé, E., Gruau, G., 2011. Influence of salinity and natural organic matter on the solid phase extraction of sterols and stanols: Application to the determination of the human sterol fingerprint in aqueous matrices. *J. Chromatogr. A* 1218, 2513–2520.
- Jeng, W.L., Han, B.C., 1994. Sedimentary coprostanol in Kaohsiung Harbour and the Tan-Shui Estuary, Taiwan. *Mar. Pollut. Bull.* 28, 494–499.
- Jeng, W., Wang, J., Hanb, B., 1996. Coprostanol distribution in marine sediments of southwestern Taiwan. *Environ. Poll.* 94, 47–52.
- Jobling, S., Williams, R., Johnson, A., Taylor, A., Gross-Sorokin, M., Nolan, M., Tyler, C.R., Van Aerle, R., Santos, E., Brighty, G., 2006. Predicted exposures to steroid estrogens in U.K. Rivers correlate with widespread sexual disruption in wild fish populations. *Environ. Health Perspect.* 114, 32–39.
- Johnson, A.C., Williams, R.J., Simpson, P., Kanda, R., 2007. What difference might sewage treatment performance make to endocrine disruption in rivers? *Environ. Pollut.* 147, 194–202.
- Jürgens, M.D., Williams, R.J., Johnson, A.C., 1999. Fate and behaviour of steroid oestrogens in rivers: A scoping study. Natural Environment Research Council, Technical report P161, 1–80.
- Keski-Rahkonen, P., Huhtinen, K., Desai, R., Harwood, D.T., Handelsman, D.J., 2013. LC-MS analysis of estradiol in human serum and endometrial tissue: Comparison of electrospray ionization, atmospheric pressure chemical ionization and atmospheric pressure photoionization. *J. Mass Spectrom.* 48, 1050–1058.

- Kostiainen, R., Kauppila, T.J., 2009. Effect of eluent on the ionization process in liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1216, 685–699.
- Koyama, J., Kitoh, A., Nakai, M., 2013. Relative contribution of endocrine-disrupting chemicals to the estrogenic potency of marine sediments of Osaka Bay, Japan. *Water Air Soil Pollut.* 224:1570, str. 1–9.
- Labadie, P., Budzinski, H., 2005. Determination of steroidal hormone profiles along the Jalle d' Eysines River (near Bordeaux, France). *Environ. Sci. Technol.* 39, 5113–5120.
- Labadie, P., Cundy, A.B., Stone, K., Andrews, M., Valbonesi, S., Hill, E.M., 2007. Evidence for the migration of steroidal estrogens through river bed sediments. *Environ. Sci. Technol.* 41, 4299–4304.
- Lai, K.M., Johnson, K.L., Scrimshaw, M.D., Lester, J.N., 2000. Binding of waterborne steroid estrogens to solid phases in river and estuarine systems. *Environ. Sci. Technol.* 34, 3890–3894.
- Lange, I.G., Daxenberger, A., Schiffer, B., Witters, H., Ibarreta, D., Meyer, H.H.D., 2002. Sex hormones originating from different livestock production systems: Fate and potential disrupting activity in the environment. *Anal. Chim. Acta* 473, 27–37.
- Larsson, D.G.J., Adolfsson-Erici, M., Parkkonen, J., Pettersson, M., Berg, A.H., Olsson, P.-E., Forlin, L., 1999. Ethinylloestradiol — an undesired fish contraceptive? *Aquat. Toxicol.* 45, 91 – 97.
- LeBlanc, L.A., Latimer, J.S., Ellis, J.T., Quinn, J.G., 1992. The geochemistry of coprostanol in waters and surface sediments from Narragansett Bay. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 34, 439–458.
- Lee, H.B., Peart, T.E., Chan, J., Gris, G., 2004. Occurrence of endocrine-disrupting chemicals in sewage and sludge samples in Toronto, Canada. *Water Qual. Res. J. Canada* 39, 57–63.
- Leeming, R., Ball, A., Ashbolt, N., Nichols, P., 1996. Using faecal sterols from humans and animals to distinguish faecal pollution in receiving waters. *Water Res.* 30, 2893–2900.
- Leeming, R., Bate, N., Hewlett, R., Nichols, P., 1998. Discriminating faecal pollution: A case study of stormwater entering Port Phillip Bay, Australia. *Water Sci. Technol.* 38, 15–22.

- Leeming, R., Stark, J.S., Smith, J.J., 2015. Novel use of faecal sterols to assess human faecal contamination in Antarctica: a likelihood assessment matrix for environmental monitoring. *Antarct. Sci.* 27, 31–43.
- Liu, X.L., Wu, F., Deng, N.S., 2003. Photodegradation of 17 α -ethynylestradiol in aqueous solution exposed to a high-pressure mercury lamp (250 W). *Environ. Pollut.* 126, 393–398.
- Liu, R., Zhou, J.L., Wilding, A., 2004. Microwave-assisted extraction followed by gas chromatography-mass spectrometry for the determination of endocrine disrupting chemicals in river sediments. *J. Chromatogr. A* 1038, 19–26.
- Liu, S., Ying, G.-G., Zhao, J.-L., Chen, F., Yang, B., Zhou, L.-J., Lai, H.-J., 2011. Trace analysis of 28 steroids in surface water, wastewater and sludge samples by rapid resolution liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1218, 1367–1378.
- López de Alda, M.J., Gil, A., Paz, E., Barceló, D., 2002. Occurrence and analysis of estrogens and progestogens in river sediments by liquid chromatography-electrospray-mass spectrometry. *Analyst* 127, 1299–1304.
- López de Alda, M.J., Díaz-Cruz, S., Petrovic, M., Barceló, D., 2003. Liquid chromatography–(tandem) mass spectrometry of selected emerging pollutants (steroid sex hormones, drugs and alkylphenolic surfactants) in the aquatic environment. *J. Chromatogr. A* 1000, 503–526.
- López-Jiménez, F.J., Rosales-Marcano, M., Rubio, S., 2013. Restricted access property supramolecular solvents for combined microextraction of endocrine disruptors in sediment and sample cleanup prior to their quantification by liquid chromatography – tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1303, 1–8.
- Ma, Y.C., Kim, H.Y., 1997. Determination of steroids by liquid chromatography/mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 8, 1010–1020.
- Machado, K.S., Froehner, S., Sáñez, J., Figueira, R.C.L., Ferreira, P.A.L., 2014. Assessment of historical fecal contamination in Curitiba, Brazil, in the last 400 years using fecal sterols. *Sci. Total Environ.* 493, 1065–1072.
- MacLachy, D.L., Van Der Kraak, G.J., 1995. The phytoestrogen β -sitosterol alters the reproductive endocrine status of goldfish. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 134, 305–312.

- Magi, E., Scapolla, C., Di Carro, M., Liscio, C., 2010. Determination of endocrine-disrupting compounds in drinking waters by fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 45, 1003–1011.
- Martín, J., Santos, J.L., Aparicio, I., Alonso, E., 2010. Multi-residue method for the analysis of pharmaceutical compounds in sewage sludge, compost and sediments by sonication-assisted extraction and LC determination. *J. Sep. Sci.* 33, 1760–1766.
- Martínez-Vidal, J.L., Garrido-Frenich, A., Escobar-García, M. A., Romero-González, R., 2007. LC–MS determination of sterols in olive oil. *Chromatographia* 65, 695–699.
- Martins, C.C., Venkatesan, M.I., Montone, R.C., 2002. Sterols and linear alkylbenzenes in marine sediments from Admiralty Bay, King George Island, South Shetland Islands. *Antarct. Sci.* 14, 244–252.
- Martins, C.D.C., Montone, R.C., Gamba, R.C., Pellizari, V.H., 2005. Sterols and fecal indicator microorganisms in sediments from Admiralty Bay, Antarctica. *Brazilian J. Oceanogr.* 53, 1–12.
- Martins, C.D.C., Fillmann, G., Montone, R.C., 2007. Natural and anthropogenic sterols inputs in surface sediments of Patos Lagoon, Brazil. *J. Braz. Chem. Soc.* 18, 106–115.
- Martins, C.C., Seyffert, B.H., Braun, J.A.F., Fillmann, G., 2011. Input of organic matter in a large South American tropical estuary (Paranaguá estuarine system, Brazil) indicated by sedimentary sterols and multivariate statistical approach. *J. Braz. Chem. Soc.* 22, 1585–1594.
- Martins, C.C., Aguiar, S.N., Wisnieski, E., Ceschim, L.M.M., Figueira, R.C.L., Montone, R.C., 2014a. Baseline concentrations of faecal sterols and assessment of sewage input into different inlets of Admiralty Bay, King George Island, Antarctica. *Mar. Pollut. Bull.* 78, 218–223.
- Martins, C.C., Cabral, A.C., Barbosa-Cintra, S.C.T., Dauner, A.L.L., Souza, F.M., 2014b. An integrated evaluation of molecular marker indices and linear alkylbenzenes (LABs) to measure sewage input in a subtropical estuary (Babitonga Bay, Brazil). *Environ. Pollut.* 188, 71–80.
- Marvin, C., Coakley, J., Mayer, T., Brown, M., Thiessen, L., 2001. Application of

- faecal sterol ratios in sediments and effluents as source tracers. *Water Qual. Res. J. Canada* 36, 781–792.
- Masoner, J.R., Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Cozzarelli, I.M., Gray, J.L., Schwab, E.A., 2014. Contaminants of emerging concern in fresh leachate from landfills in the conterminous United States. *Environ. Sci. Process. Impacts* 16, 2335–54.
- Matějčiček, D., Houserová, P., Kubáň, V., 2007. Combined isolation and purification procedures prior to the high-performance liquid chromatographic-ion-trap tandem mass spectrometric determination of estrogens and their conjugates in river sediments. *J. Chromatogr. A* 1171, 80–89.
- Matějčiček, D., Vlček, J., Burešová, A., Pelcova, P., 2013. Online molecularly imprinted solid-phase extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of hormones in water and sediment samples. *J. Sep. Sci.* 36, 1509–1515.
- McCalley, D. V., Cooke, M., Nickless, G., 1981. Effect of sewage treatment on faecal sterols. *Water Res.* 15, 1019–1025.
- McDonald, J.G., Thompson, B.M., McCrum, E.C., Russell, D.W., 2007. Extraction and analysis of sterols in biological matrices by high performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry. *Methods Enzymol.* 432, 145–170.
- McDonald, J.G., Smith, D.D., Stiles, A.R., Russell, D.W., 2012. A comprehensive method for extraction and quantitative analysis of sterols and secosteroids from human plasma. *J. Lipid Res.* 53, 1399–1409.
- McKenna, P., Morgan, S.J., Bosanquet, R.C., Laker, M.F., 1990. A case of cerebrotendinous xanthomatosis II: The sterol content of a cataractous lens. *Br. J. Ophthalmol.* 74, 629–630.
- Meljon, A., Watson, G.L., Wang, Y., Shackleton, C.H.L., Griffiths, W.J., 2013. Analysis by liquid chromatography-mass spectrometry of sterols and oxysterols in brain of the newborn *Dhcr7*^{Δ3-5/T93M} mouse: a model of Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Biochem. Pharmacol.* 86, 43–55.
- Mendiara, I., Domeño, C., Nerín, C., 2012. Development of a fast sample treatment for the analysis of free and bonded sterols in human serum by LC-MS. *J. Sep. Sci.* 35, 3308–3316.

- Miège, C., Karolak, S., Gabet, V., Jugan, M.-L., Oziol, L., Chevreuil, M., Levi, Y., Coquery, M., 2009. Evaluation of estrogenic disrupting potency in aquatic environments and urban wastewaters by combining chemical and biological analysis. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 28, 186–195.
- Miskelly, A., Hall, E., Aggelen, G. Van, 2003. Effects of pulp mill wastewater treatment on phytosterol biotransformation and genomic response in rainbow trout 2008.
- Mitra, S., 2003. *Sample preparation techniques in analytical chemistry*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- Mo, S., Dong, L., Hurst, W.J., Van Breemen, R.B., 2013. Quantitative analysis of phytosterols in edible oils using APCI liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Lipids* 48, 949–956.
- Mudge, S.M., Bebianno, M.J.A.F., East, J.A., Barreira, L.A., 1999. Sterols in the Ria Formosa Lagoon, Portugal. *Water Res.* 33, 1038–1048.
- Mudge, S.M., Duce, C.E., 2005. Identifying the source, transport path and sinks of sewage derived organic matter. *Environ. Pollut.* 136, 209–220.
- Murtaugh, J.J., Bunch, R.L., 1967. Sterols as a measure of fecal pollution. *Water Pollut. Control Fed.* 39, 404–409.
- Myant, N.B., 1973. Cholesterol metabolism. *J. clin. Path.*, 26, suppl. (Ass. Clin. Path.) 5, 1–4.
- Nakada, N., Tanishima, T., Shinohara, H., Kiri, K., Takada, H., 2006. Pharmaceutical chemicals and endocrine disrupters in municipal wastewater in Tokyo and their removal during activated sludge treatment. *Water Res.* 40, 3297–3303.
- Nash, J.P., Kime, D.E., Van der Ven, L.T.M., Wester, P.W., Brion, F., Maack, G., Stahlschmidt-Allner, P., Tyler, C.R., 2004. Long-term exposure to environmental concentrations of the pharmaceutical ethynylestradiol causes reproductive failure in fish. *Environ. Health Perspect.* 112, 1725–1733.
- Nieminen, P., Mustonen, A.-M., Lindström-Seppä, P., Asikainen, J., Mussalo-Rauhamaa, H., Kukkonen, J.V.K., 2002. Phytosterols act as endocrine and metabolic disruptors in the European polecat (*Mustela putorius*). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 178, 22–8.
- Niessen, W.M.A., 2006. *Liquid chromatography-mass spectrometry. General principles*

- and instrumentation, Taylor and Francis Group, LLC, Boca Raton, New York, USA.
- Nieto, A., Borrull, F., Pocurull, E., Marcé, R.M., 2008. Determination of natural and synthetic estrogens and their conjugates in sewage sludge by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1213, 224–230.
- Nishimura, M., Koyama, T., 1977. The occurrence of stanols in various living organisms and the behavior of sterols in contemporary sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta* 41, 379–385.
- Orrego, R., Guchardi, J., Hernandez, V., Krause, R., Roti, L., Armour, J., Ganeshakumar, M., Holdway, D., 2009. Pulp and paper mill effluent treatments have differential endocrine-disrupting effects on rainbow trout. *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 181–188.
- Patton, D., Reeves, A.D., 1999. Sterol concentrations and temporal variations on the North Shore mudflats of the Firth of Tay, Scotland. *Mar. Pollut. Bull.* 38, 613–618.
- Peck, M., Gibson, R.W., Kortenkamp, A., Hill, E.M., 2004. Sediments are major sinks of steroidal estrogens in two United Kingdom rivers. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 945–952.
- Petrovic, M., Eljarrat, E., Lopez, M.J., Alda, D., López De Alda, M.J., Barceló, D., 2002a. Recent advances in the mass spectrometric analysis related to endocrine disrupting compounds in aquatic environmental samples. *J. Chromatogr. A* 974, 23–51.
- Petrovic, M., Solé, M., López de Alda, M.J., Barceló, D., 2002b. Endocrine disruptors in sewage treatment plants, receiving river waters, and sediments: Integration of chemical analysis and biological effects on feral carp. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 2146–2156.
- Pratt, C., Warnken, J., Leeming, R., Arthur, M.J., Grice, D.I., 2008. Degradation and responses of coprostanol and selected sterol biomarkers in sediments to a simulated major sewage pollution event: A microcosm experiment under sub-tropical estuarine conditions. *Org. Geochem.* 39, 353–369.
- Purdom, C.E., Hardiman, P.A., Bye, V.V.J., Eno, N.C., Tyler, C.R., Sumpter, J.P., 1994. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chem. Ecol.* 8,

- 275–285.
- Quéméneur, M., Marty, Y., 1994. Fatty acids and sterols in domestic wastewaters. *Water Res.* 28, 1217–1226.
- Quignot, N., Tournier, M., Pouech, C., Cren-Olivé, C., Barouki, R., Lemazurier, E., 2012. Quantification of steroids and endocrine disrupting chemicals in rat ovaries by LC-MS/MS for reproductive toxicology assessment. *Anal. Bioanal. Chem.* 403, 1629–1640.
- Reddy, S., Brownawell, B.J., 2005. Analysis of estrogens in sediment from a sewage-impacted urban estuary using high-performance liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 1041–1047.
- Reddy, S., Iden, C.R., Brownawell, B.J., 2005. Analysis of steroid conjugates in sewage influent and effluent by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 77, 7032–7038.
- Reeves, A., Patton, D., 2005. Faecal sterols as indicators of sewage contamination in estuarine sediments of the Tay Estuary, Scotland: An extended baseline survey. *Hydrol. Earth Syst. Sci.* 9, 81–94.
- Ren, D., Li, L., Schwabacher, A.W., Young, J.W., Beitz, D.C., 1996. Mechanism of cholesterol reduction to coprostanol by *Eubacterium coprostanoligenes* ATCC 51222. *Steroids* 61, 33–40.
- Richard, E.C., Hamacher, C., Farias, C.O., Dore, M.P., Ribeiro, N.C.M., Passos, M.A., Martinho, P.F., Godoy, J.M., Carreira, R.S., 2014. Historical evolution of organic matter accumulation in a Coastal Bay in the SW Atlantic, Brazil: Use of sterols and n-alcohols as molecular markers. *J. Braz. Chem. Soc.* 25, 1380–1390.
- Ronan, J.M., McHugh, B., 2013. A sensitive liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the determination of natural and synthetic steroid estrogens in seawater and marine biota, with a focus on proposed Water Framework Directive Environmental Quality Standards. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 27, 738–46.
- Roser, D., Leeming, R., Ashbolt, N., Gardner, T., Stewart, J., 2006. Estimating non-point source contaminant loads using faecal sterols, bacterial indicators and hydrology. 9th International Riversymposium „Managing rivers with climate change and expanding populations“, Brisbane, 1–12.

- Rouessac, F., Rouessac, A., 2007. Chemical Analysis: Modern instrumentation methods and techniques. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England.
- Rozenberg, R., Ruibal-Mendieta, N.L., Petitjean, G., Cani, P., Delacroix, D.L., Delzenne, N.M., Meurens, M., Quetin-Leclercq, J., Habib-Jiwan, J.L., 2003. Phytosterol analysis and characterization in spelt (*Triticum aestivum* ssp. *spelta* L.) and wheat (*T. aestivum* L.) lipids by LC/APCI-MS. *J. Cereal Sci.* 38, 189–197.
- Ryökkynen, A., Nieminen, P., Mustonen, A.M., Pyykönen, T., Asikainen, J., Hänninen, S., Mononen, J., Kukkonen, J.V.K., 2005. Phytoestrogens alter the reproductive organ development in the mink (*Mustela vison*). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 202, 132–139.
- Saeed, T., Al-Bloushi, A., Abdullah, H.I., Al-Khabbaz, A., Jamal, Z., 2012. Preliminary assessment of sewage contamination in coastal sediments of Kuwait following a major pumping station failure using fecal sterol markers. *Aquat. Ecosyst. Health Manag.* 15, 25–32.
- Saeed, T., Al-Shimmari, F., Al-Mutairi, A., Abdullah, H., 2015. Spatial assessment of the sewage contamination of Kuwait's marine areas. *Mar. Pollut. Bull.* 94, 307–317.
- Savichtcheva, O., Okabe, S., 2006. Alternative indicators of fecal pollution: Relations with pathogens and conventional indicators , current methodologies for direct pathogen monitoring and future application perspectives. *Water Res.* 40, 2463–2476.
- Seguel, C.G., Mudge, S.M., Salgado, C., Toledo, M., 2001. Tracing sewage in the marine environment: Altered signatures in Concepción Bay, Chile. *Water Res.* 35, 4166–4174.
- Segura Carretero, A., Carrasco-Pancorbo, A., Cortacero, S., Gori, A., Cerretani, L., Fernández-Gutiérrez, A., 2008. A simplified method for HPLC-MS analysis of sterols in vegetable oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 110, 1142–1149.
- Servos, M.R., Bennie, D.T., Burnison, B.K., Jurkovic, A., McInnis, R., Neheli, T., Schnell, A., Seto, P., Smyth, S.A., Ternes, T.A., 2005. Distribution of estrogens, 17 β -estradiol and estrone, in Canadian municipal wastewater treatment plants. *Sci. Total Environ.* 336, 155–170.
- Shafir, M., Avisar, D., 2012. Development method for extracting and analyzing

- antibiotic and hormone residues from treated wastewater sludge and composted biosolids. *Water, Air, Soil Pollut.* 223, 2571–2587.
- Shah, V.G., Hugh Dunstan, R., Geary, P.M., Coombes, P., Roberts, T.K., Von Nagy-Felsobuki, E., 2007. Evaluating potential applications of faecal sterols in distinguishing sources of faecal contamination from mixed faecal samples. *Water Res.* 41, 3691–3700.
- Shareef, A., Angove, M.J., Wells, J.D., 2006. Optimization of silylation using N-methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide, N, O-bis-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide and N-(tert-butyltrimethylsilyl)-N-methyltrifluoroacetamide for the determination of the estrogens estrone and 17 α -ethinylestradiol by gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1108, 121–128.
- Sherwin, M.R., van Vleet, E.S., Fossato, V.U., Dolci, F., 1993. Coprostanol (5 β -cholestan-3 β -ol) in lagoonal sediments and mussels of Venice, Italy. *Mar. Pollut. Bull.* 26, 501–507.
- Shore, L.S., Kapulnik, Y., Gurevich, M., Winger, S., Badamy, H., Shemesh, M., 1995. Induction of phytoestrogen production in *Medicago Sativa* leaves by irrigation with sewage water. *Environ. Exp. Bot.* 35, 363–369.
- Silva, C.P., Otero, M., Esteves, V., 2012. Processes for the elimination of estrogenic steroid hormones from water: A review. *Environ. Pollut.* 165, 38–58.
- Sl. gl. RS (Službeni glasnik Republike Srbije), br. 91/2005 – Pravilnik o utvrđivanju programa sistematskog praćenja rezidua farmakoloških, hormonskih i drugih štetnih materija kod životinja, proizvoda životinjskog porekla, hrane životinjskog porekla i hrane za životinje. Beograd: JP Službeni glasnik.
- Snow, D.D., Bartelt-Hunt, S.L., Devivo, S., Saunders, S., Cassada, D.A., 2009. Detection, occurrence, and fate of emerging contaminants in agricultural environments. *Water Environ. Res.* 81, 941–958.
- Snyder, S.A., Villeneuve, D.L., Snyder, E.M., Giesy, J.P., 2001. Identification and quantification of estrogen receptor agonists in wastewater effluents. *Environ. Sci. Technol.* 35, 3620–3625.
- Snyder, S.A., Westerhoff, P., Yoon, Y., Sedlak, D.L., 2003. Pharmaceuticals, personal care products, and endocrine disruptors in water: Implications for the water industry. *Environ. Eng. Sci.* 20, 449–469.

- Snyder, S.A., Adham, S., Redding, A.M., Cannon, F.S., DeCarolis, J., Oppenheimer, J., Wert, E.C., Yoon, Y., 2007. Role of membranes and activated carbon in the removal of endocrine disruptors and pharmaceuticals. *Desalination* 202, 156–181.
- Sosa-Ferrera, Z., Mahugo-Santana, C., Santana-Rodríguez, J.J., 2012. Steroid hormones in biological and environmental samples: Extraction and determination techniques, in: *Steroids: Biosynthesis, Functions and Health Implications*, Nova Science Publishers, Inc., New York, USA.
- Standley, L.J., Kaplan, L., Smith, D., 2000. Molecular tracers of organic matter sources to surface water resources. *Environ. Sci. Technol.* 34, 3124–3130.
- Stempvoort, D.R. Van, Roy, J.W., Grabuski, J., Brown, S.J., Bickerton, G., Sverko, E., 2013. An artificial sweetener and pharmaceutical compounds as co-tracers of urban wastewater in groundwater. *Sci. Total Environ.* 461-462, 348–359.
- Stolker, A.A.M., Brinkman, U.A.T., 2005. Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals - A review. *J. Chromatogr. A* 1067, 15–53.
- Tadeo, J.L., Sánchez-Brunete, C., Albero, B., García-Valcárcel, A.I., Pérez, R.A., 2012. Analysis of emerging organic contaminants in environmental solid samples. *Cent. Eur. J. Chem.* 10, 480–520.
- Takada, H., Farrington, J.W., Bothner, M.H., Johnson, C.G., Tripp, B.W., Farrington, J.W., Bothner, M.H., Johnson, C.G., Tripp, B.W., 1994. Transport of sludge-derived organic pollutants to deep-sea sediments at Deep Water Dump Site 106. *Environ. Sci. Technol.* 28, 1062–1072.
- Taverniers, I., De Loose, M., Van Bockstaele, E., 2004. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *TrAC-Trends Anal. Chem.* 23, 535–552.
- Ternes, T.A., Kreckel, P., Mueller, J., 1999a. Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - II. Aerobic batch experiments with activated sludge. *Sci. Total Environ.* 225, 91–99.
- Ternes, T.A., Stumpf, M., Mueller, J., Haberer, K., Wilken, R.D., Servos, M., 1999b. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *Sci. Total Environ.* 225, 81–90.
- Ternes, T.A., Andersen, H., Gilberg, D., Bonerz, M., 2002. Determination of estrogens

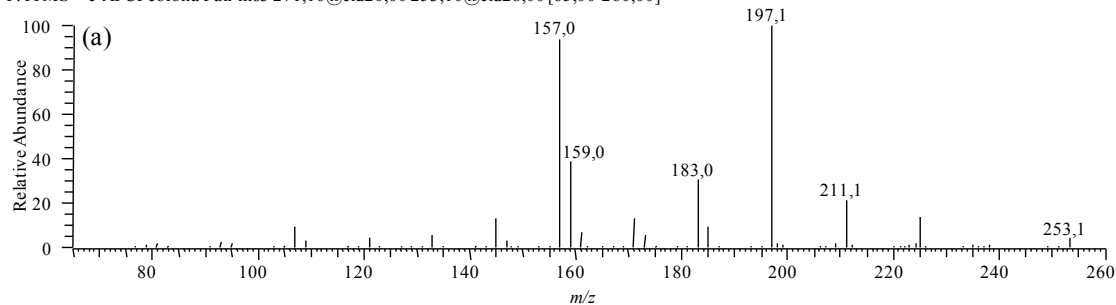
- in sludge and sediments by liquid extraction and GC/MS/MS. *Anal. Chem.* 74, 3498–3504.
- Thorpe, K.L., Cummings, R.I., Hutchinson, T.H., Scholze, M., Brighty, G., Sumpter, J.P., Tyler, C.R., 2003. Relative potencies and combination effects of steroidal estrogens in fish. *Environ. Sci. Technol.* 37, 1142–1149.
- Tolosa, I., Mesa, M., Alonso-Hernandez, C.M., 2014. Steroid markers to assess sewage and other sources of organic contaminants in surface sediments of Cienfuegos Bay, Cuba. *Mar. Pollut. Bull.* 86, 84–90.
- Tremblay, L., Van der Kraak, G., 1999. Comparison between the effects of the phytosterol β -sitosterol and pulp and paper mill effluents on sexually immature rainbow trout. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 329–336.
- Tse, T.J., Codling, G., Jones, P.D., Thoms, K., Liber, K., Giesy, J.P., Wheater, H., Doig, L.E., 2014. Reconstructing long-term trends in municipal sewage discharge into a small lake in northern Manitoba, Canada. *Chemosphere* 103, 299–305.
- Vane, C.H., Kim, A.W., McGowan, S., Leng, M.J., Heaton, T.H.E., Kendrick, C.P., Coombs, P., Yang, H., Swann, G.E.A., 2010. Sedimentary records of sewage pollution using faecal markers in contrasting peri-urban shallow lakes. *Sci. Total Environ.* 409, 345–356.
- Varagić, V.M., Milošević, M.P., 1995. *Farmakologija XI prerađeno i dopunjeno izdanje*. Elit Medica, Beograd.
- Vega-Morales, T., Sosa-Ferrera, Z., Santana-Rodríguez, J.J., 2010. Determination of alkylphenol polyethoxylates, bisphenol-A, 17α -ethynylestradiol and 17β -estradiol and its metabolites in sewage samples by SPE and LC/MS/MS. *J. Hazard. Mater.* 183, 701–711.
- Venkatesan, M.I., Santiago, C.A., 1989. Sterols in ocean sediments: novel tracers to examine habitats of cetaceans, pinnipeds, penguins and humans. *Mar. Biol.* 102, 431–437.
- Venkatesan, M.I., Kaplan, I.R., 1990. Sedimentary coprostanol as an index of sewage addition in Santa Monica basin, southern California. *Environ. Sci. Technol.* 24, 208–214.
- Venkatesan, M.I., Mirsadeghi, F.H., 1992. Coprostanol as sewage tracer in McMurdo Sound, Antarctica. *Mar. Pollut. Bull.* 25, 328–333.

- Viglino, L., Prévost, M., Sauvé, S., 2011. High throughput analysis of solid-bound endocrine disruptors by LDTD-APCI-MS/MS. *J. Environ. Monit.* 13, 583–590.
- Volkman, J.K., 1986. A review of sterol markers for marine and terrigenous organic matter. *Org. Geochem.* 9, 83–99.
- Vollhardt, P., Schore, N., 1999. *Organic Chemistry*, W. H. Freeman and Company, New York, USA.
- Vulliet, E., Wiest, L., Baudot, R., Grenier-Loustalot, M.F., 2008. Multi-residue analysis of steroids at sub-ng/L levels in surface and ground-waters using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1210, 84–91.
- Vulliet, E., Cren-Olivé, C., Grenier-Loustalot, M.-F., 2011. Occurrence of pharmaceuticals and hormones in drinking water treated from surface waters. *Environ. Chem. Lett.* 9, 103–114.
- Walker, R.W., Wun, C.K., Litsky, W., Dutka, B.J., 1982. Coprostanol as an indicator of fecal pollution. *CRC Crit. Rev. Environ. Control* 12, 91–112.
- Wang, C., Gardinali, P.R., 2012. Comparison of multiple API techniques for the simultaneous detection of microconstituents in water by on-line SPE-LC-MS/MS. *J. Mass Spectrom.* 47, 1255–1268.
- Wang, H., Zhou, X., Zhang, Y., Chen, H., Li, G., Xu, Y., Zhao, Q., Song, W., Jin, H., Ding, L., 2012. Dynamic microwave-assisted extraction coupled with salting-out liquid-liquid extraction for determination of steroid hormones in fish tissues. *J. Agric. Food Chem.* 60, 10343–10351.
- Wardroper, A.M.K., Maxwell, J.R., 1978. Sterols of a diatomaceous ooze from Walvis Bay. *Steroids* 32, 203–221.
- Writer, J.H., Leenheer, J.A., Barber, L.B., Amy, G.L., Chapra, S.C., 1995. Sewage contamination in the upper Mississippi River as measured by the fecal sterol, coprostanol. *Water Res.* 29, 1427–1436.
- Ying, G.G., Kookana, R.S., Ru, Y.J., 2002. Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. *Environ. Int.* 28, 545–551.
- Young, R.B., Borch, T., 2009. Sources, presence, analysis, and fate of steroid sex hormones in freshwater ecosystems - A review, in: *Aquatic ecosystem research trends*. Nova Science Pub Inc., New York, USA.

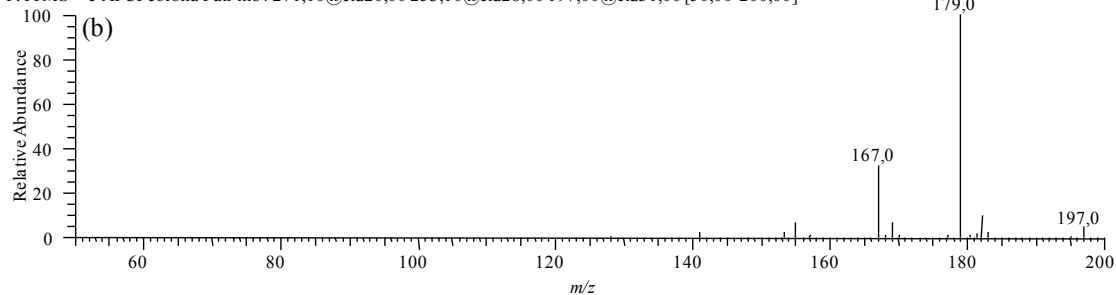
- Zarrouk, W., Carrasco-Pancorbo, A., Zarrouk, M., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., 2009. Multi-component analysis (sterols, tocopherols and triterpenic dialcohols) of the unsaponifiable fraction of vegetable oils by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-ion trap mass spectrometry. *Talanta* 80, 924–934.
- Zhang, C., Wang, Y., Qi, S., 2008. Identification and significance of sterols in MSW landfill leachate. *J. Chromatogr. B* 874, 1–6.
- Zhang, L.-F., Liu, C.-F., Meng, Y.-B., 2009. Isolation and determination of sterols in rapeseed oil by HPLC-MS. *Anal. Lett.* 42, 1650–1661.
- Zhang, Z., Rhind, S.M., Kerr, C., Osprey, M., Kyle, C.E., 2011. Selective pressurized liquid extraction of estrogenic compounds in soil and analysis by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 685, 29–35.
- Zhao, Y., Boyd, J.M., Sawyer, M.B., Li, X., 2014. Liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of free and conjugated estrogens in breast cancer patients before and after exemestane treatment. *Anal. Chim. Acta* 806, 172–179.
- Zheng, B., An, L., Chang, H., Liu, Y., Jiang, Z., 2014. Evidence for the presence of sex steroid hormones in Zhikong scallop, *Chlamys farreri*. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 143, 199–206.
- Zuo, Y., Zhang, K., Deng, Y., 2006. Occurrence and photochemical degradation of 17 α -ethinylestradiol in Acushnet River Estuary. *Chemosphere* 63, 1583–1590.

PRILOG

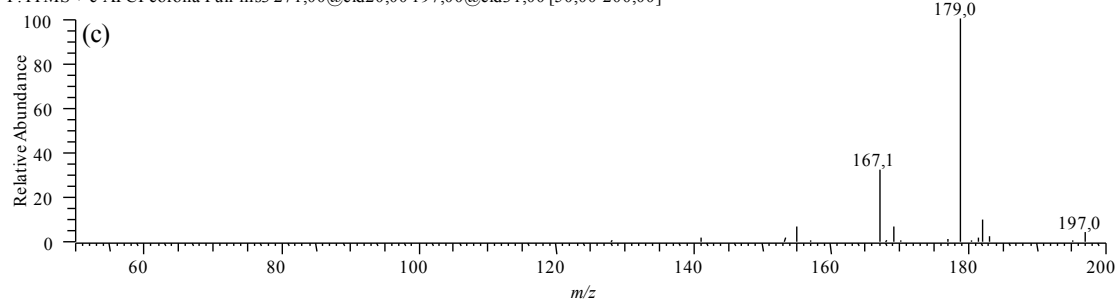
F: ITMS + c APCI corona Full ms3 271,10@cid20,00 253,10@cid28,00 [65,00-260,00]



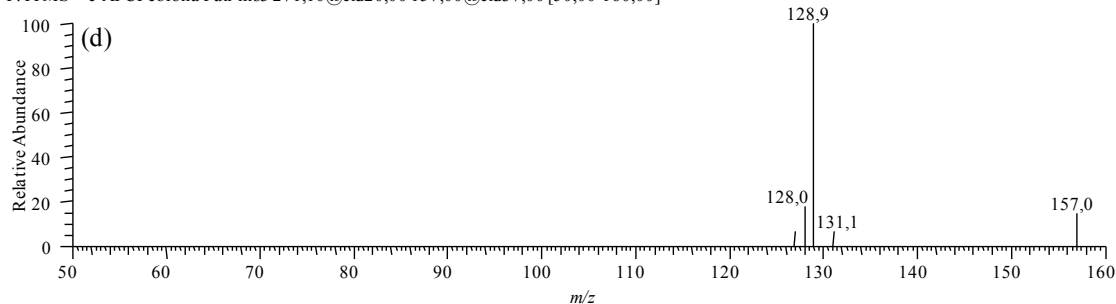
F: ITMS + c APCI corona Full ms4 271,10@cid20,00 253,10@cid28,00 197,00@cid31,00 [50,00-200,00]



F: ITMS + c APCI corona Full ms3 271,00@cid20,00 197,00@cid31,00 [50,00-200,00]

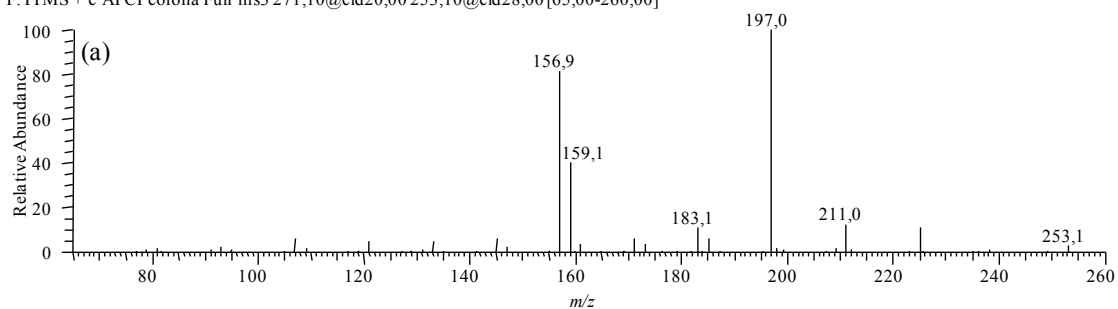


F: ITMS + c APCI corona Full ms3 271,10@cid20,00 157,00@cid37,00 [50,00-160,00]

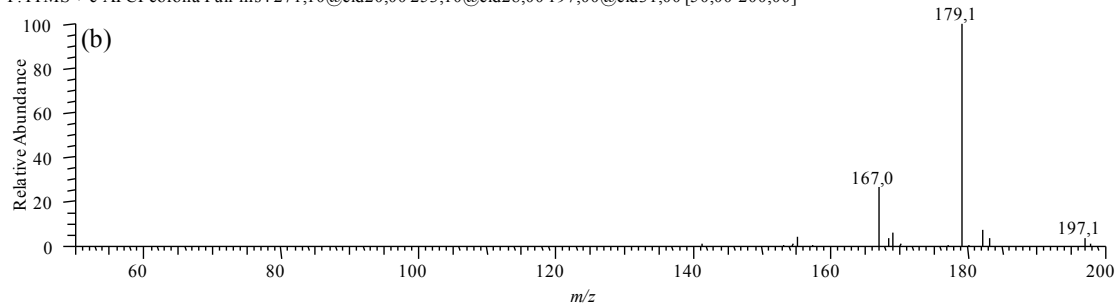


Slika 1. MS^n maseni spektri estriola: (a) $APCI(+)$ $MS^3 [M-H_2O+H]^+$; (b) $APCI(+)$ $MS^4 [M-H_2O+H]^+$; (c) $APCI(+)$ $MS^3 [M-H_2O+H]^+$; (d) $APCI(+)$ $MS^3 [M-H_2O+H]^+$.

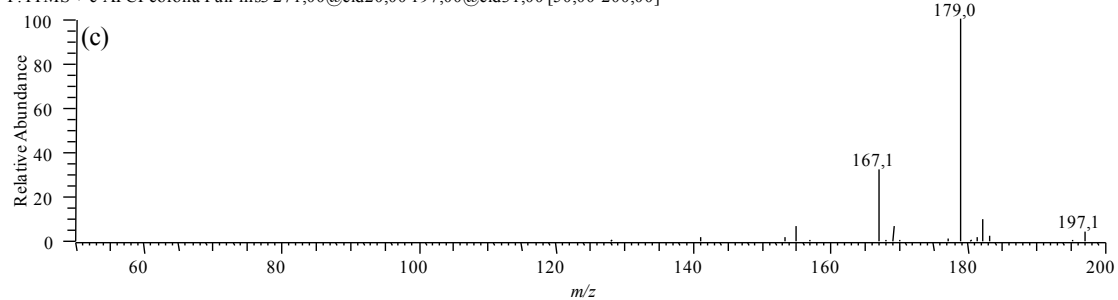
F: ITMS + c APCI corona Full ms3 271,10@cid20,00 253,10@cid28,00 [65,00-260,00]



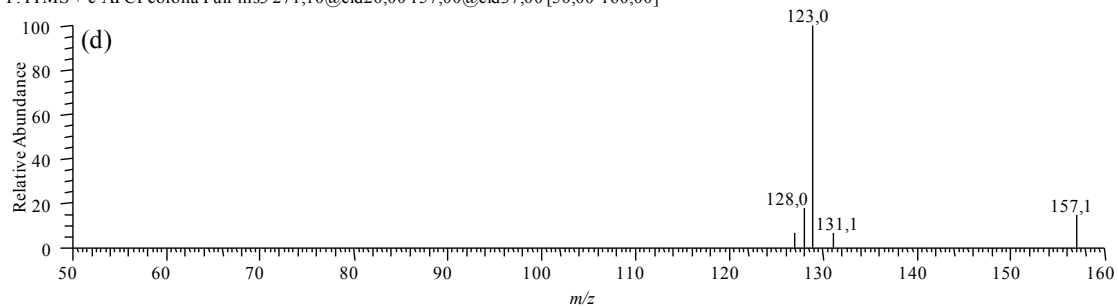
F: ITMS + c APCI corona Full ms4 271,10@cid20,00 253,10@cid28,00 197,00@cid31,00 [50,00-200,00]



F: ITMS + c APCI corona Full ms3 271,00@cid20,00 197,00@cid31,00 [50,00-200,00]

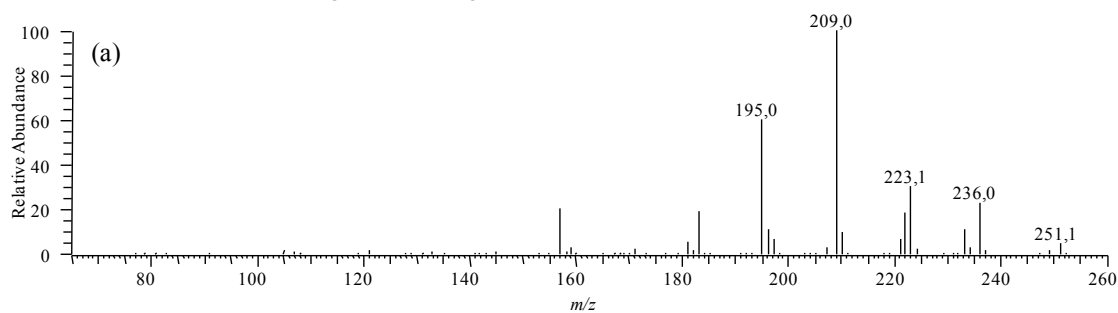


F: ITMS + c APCI corona Full ms3 271,10@cid20,00 157,00@cid37,00 [50,00-160,00]

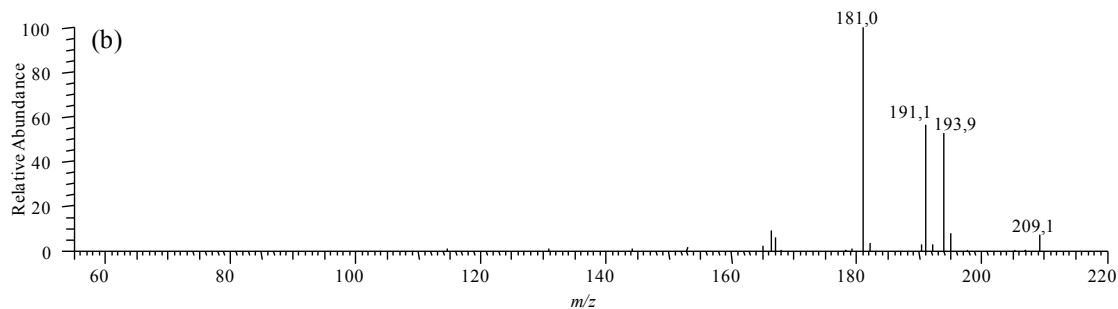


Slika 2. MSⁿ maseni spektri estrona: (a) APCI(+) MS^3 $[M+H]^+$; (b) APCI(+) MS^4 $[M+H]^+$; (c) APCI(+) MS^3 $[M+H]^+$; (d) APCI(+) MS^3 $[M+H]^+$.

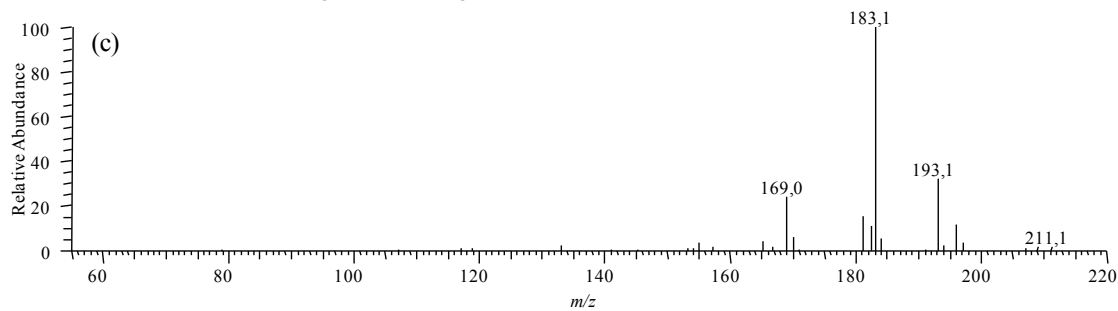
F: ITMS + c APCI corona Full ms3 269,10@cid23,00 251,10@cid31,00 [65,00-260,00]



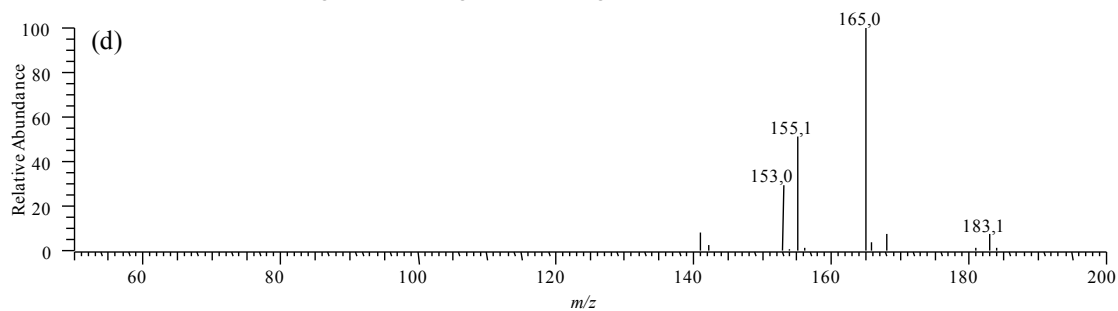
F: ITMS + c APCI corona Full ms4 269,10@cid23,00 251,10@cid31,00 209,00@cid33,00 [55,00-220,00]



F: ITMS + c APCI corona Full ms3 269,1@cid23,00 211,10@cid32,00 [55,00-220,00]

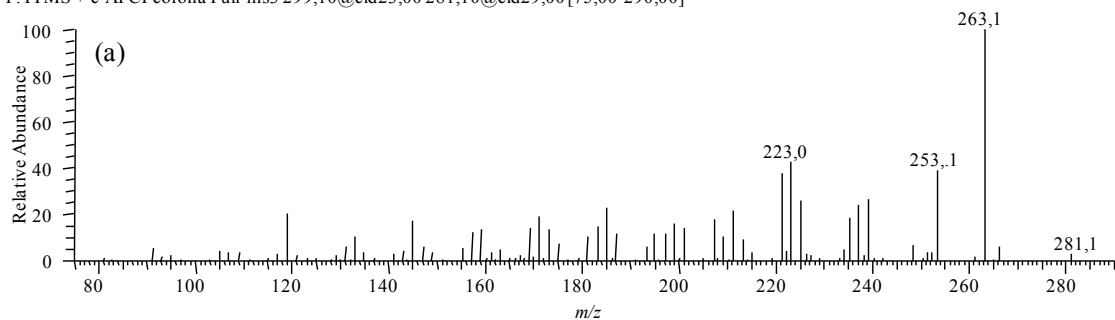


F: ITMS + c APCI corona Full ms4 269,1@cid23,00 211,10@cid32,00 183,00@cid31,00 [50,00-200,00]

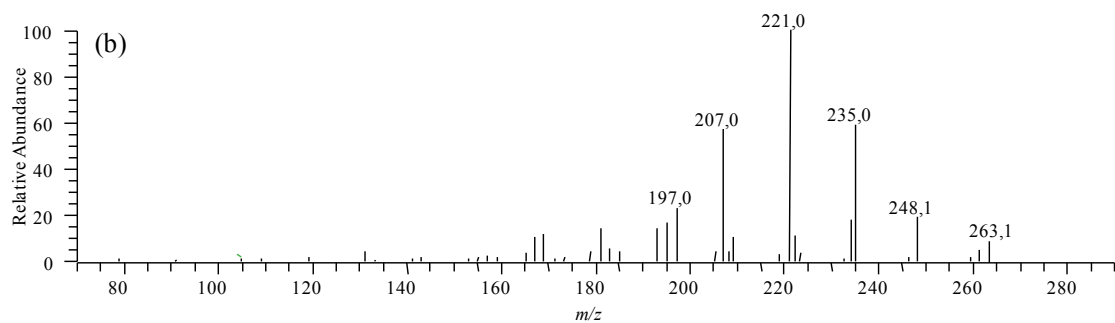


Slika 3. MSⁿ maseni spektri ekvilina: (a) APCI(+) $MS^3 [M+H]^+$; (b) APCI(+) $MS^4 [M+H]^+$; (c) APCI(+) $MS^3 [M+H]^+$; (d) APCI(+) $MS^4 [M+H]^+$.

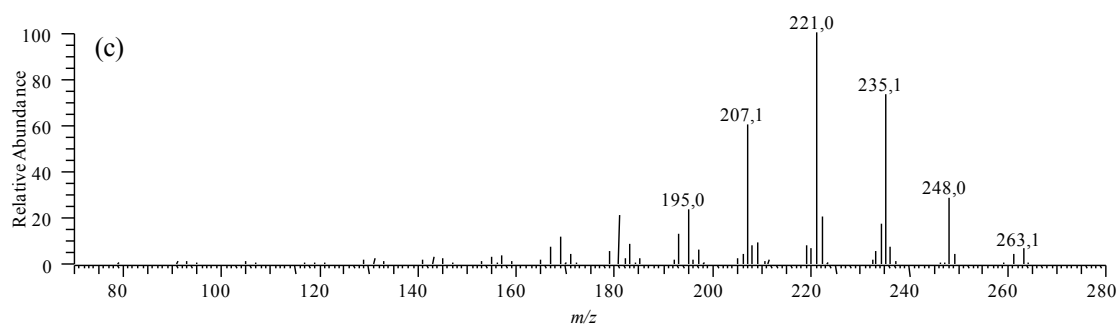
F: ITMS + c APCI corona Full ms3 299,10@cid23,00 281,10@cid29,00 [75,00-290,00]



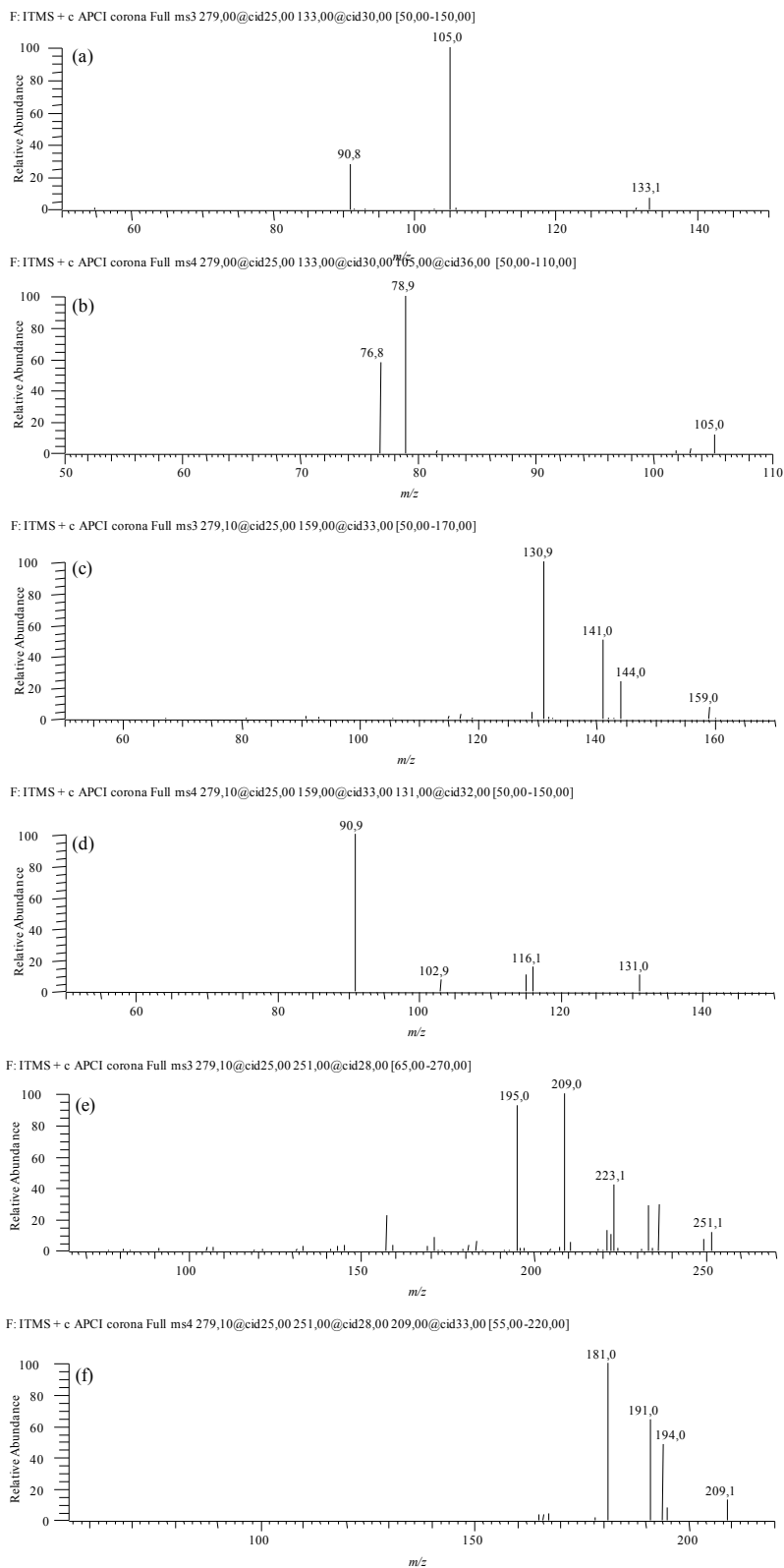
F: ITMS + c APCI corona Full ms4 299,10@cid23,00 281,00@cid29,00 263,10@cid30,00 [70,00-290,00]



F: ITMS + c APCI corona Full ms3 299,10@cid23,00 263,10@cid30,00 [70,00-280,00]

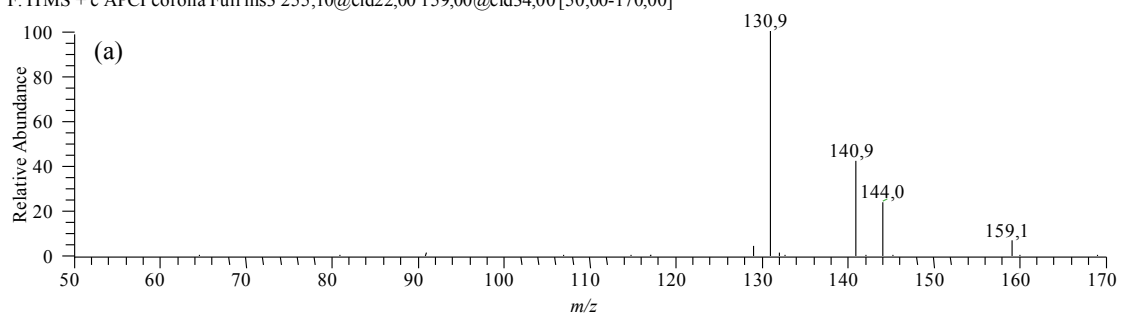


Slika 4. MS^n maseni spektri noretindrona: (a) APCI(+) $MS^3 [M+H]^+$; (b) APCI(+) $MS^4 [M+H]^+$; (c) APCI(+) $MS^3 [M+H]^+$.

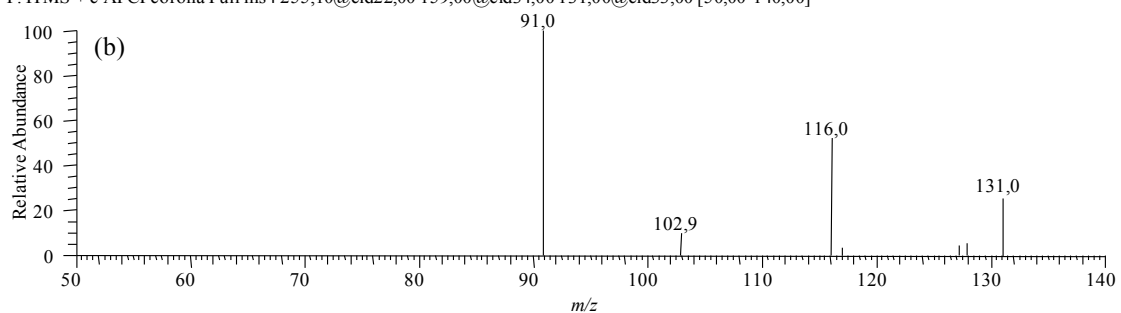


Slika 5. MSⁿ maseni spektri 17α-etiilestradiola: (a) APCI(+) $MS^3 [M-H_2O+H]^+$; (b) APCI(+) $MS^4 [M-H_2O+H]^+$; (c) APCI(+) $MS^3 [M-H_2O+H]^+$; (d) APCI(+) $MS^4 [M-H_2O+H]^+$; (e) APCI(+) $MS^3 [M-H_2O+H]^+$; (f) APCI(+) $MS^4 [M-H_2O+H]^+$.

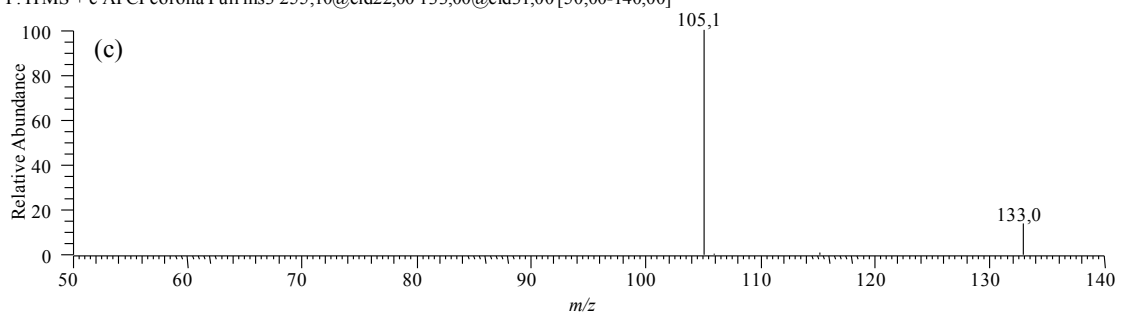
F: ITMS + c APCI corona Full ms3 255,10@cid22,00 159,00@cid34,00 [50,00-170,00]



F: ITMS + c APCI corona Full ms4 255,10@cid22,00 159,00@cid34,00 131,00@cid33,00 [50,00-140,00]

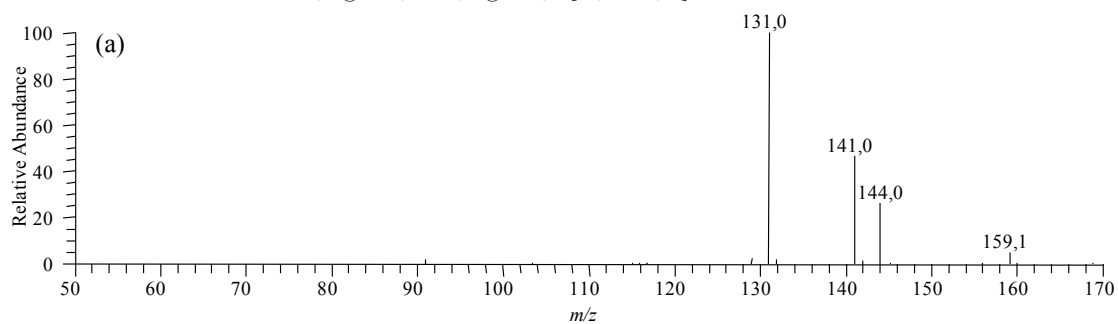


F: ITMS + c APCI corona Full ms3 255,10@cid22,00 133,00@cid31,00 [50,00-140,00]

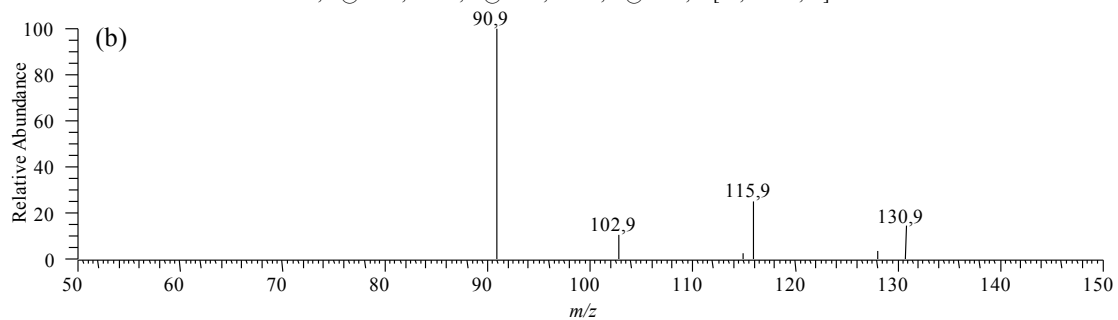


Slika 6. MS^n maseni spektri 17β -estradiola: (a) $APCI(+)$ $MS^3[M-H_2O+H]^+$; (b) $APCI(+)$ $MS^4[M-H_2O+H]^+$; (c) $APCI(+)$ $MS^3[M-H_2O+H]^+$.

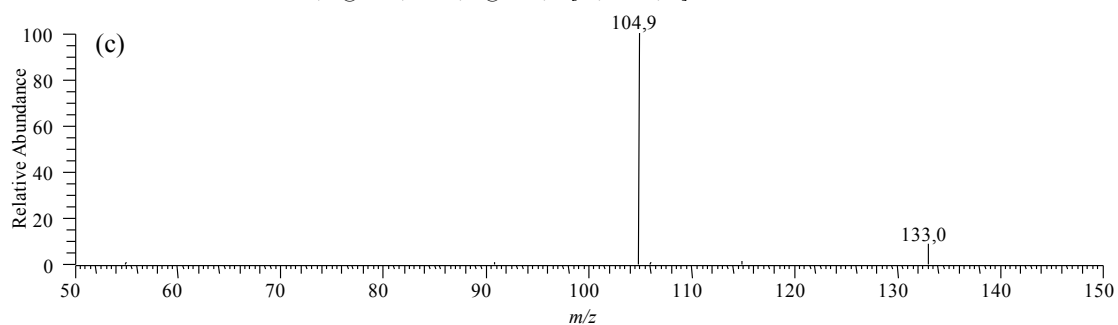
F: ITMS + c APCI corona Full ms3 255,10@cid22,00 159,00@cid34,00 [50,00-170,00]



F: ITMS + c APCI corona Full ms4 255,10@cid22,00 159,00@cid34,00 131,00@cid33,00 [50,00-150,00]

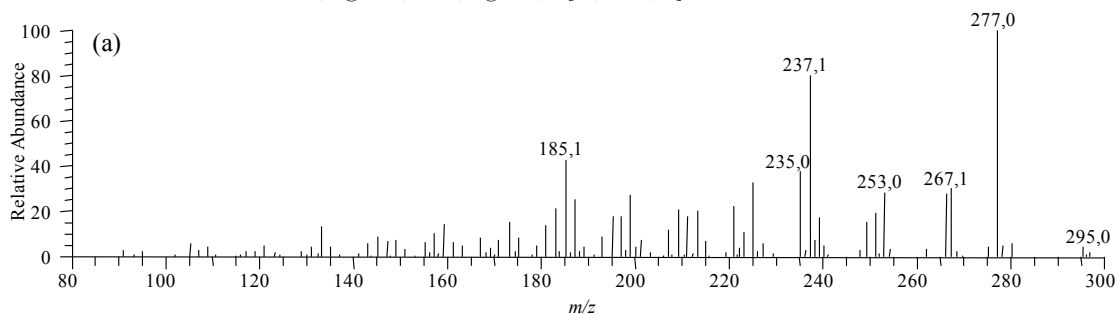


F: ITMS + c APCI corona Full ms3 255,10@cid22,00 133,00@cid31,00 [50,00-150,00]

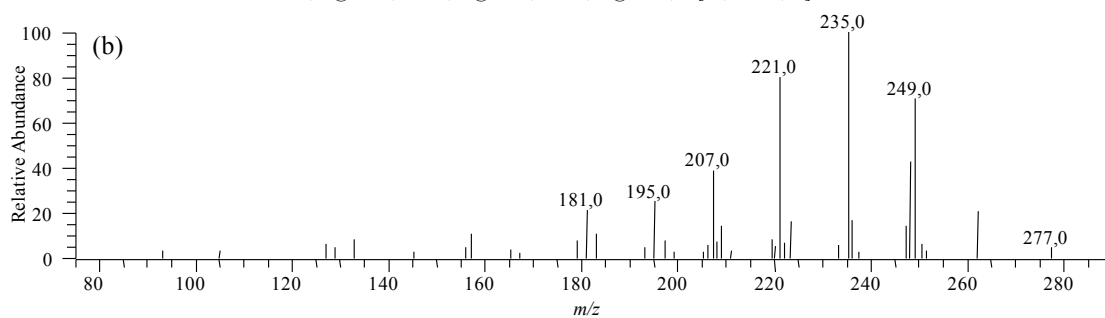


Slika 7. MSⁿ maseni spektri 17 α -estradiola: (a) APCI(+) $MS^3[M-H_2O+H]^+$; (b) APCI(+) $MS^4[M-H_2O+H]^+$; (c) APCI(+) $MS^3[M-H_2O+H]^+$.

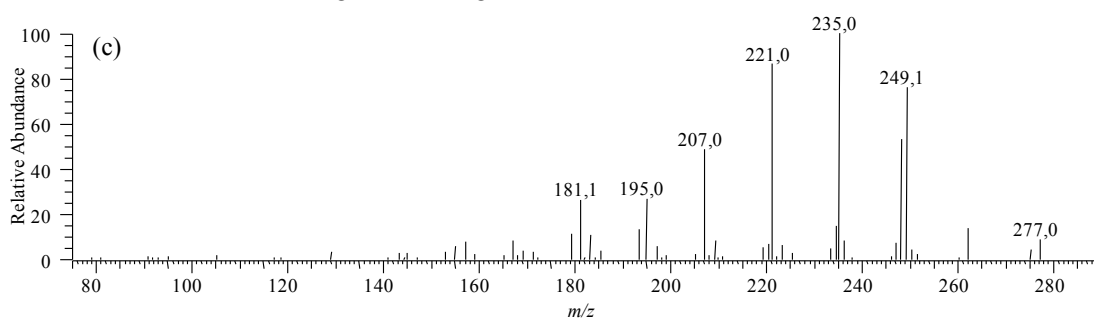
F: ITMS + c APCI corona Full ms3 313,00@cid22,00 295,00@cid29,00 [80,00-300,00]



F: ITMS + c APCI corona Full ms4 313,00@cid22,00 295,00@cid29,00 277,00@cid30,00 [75,00-290,00]

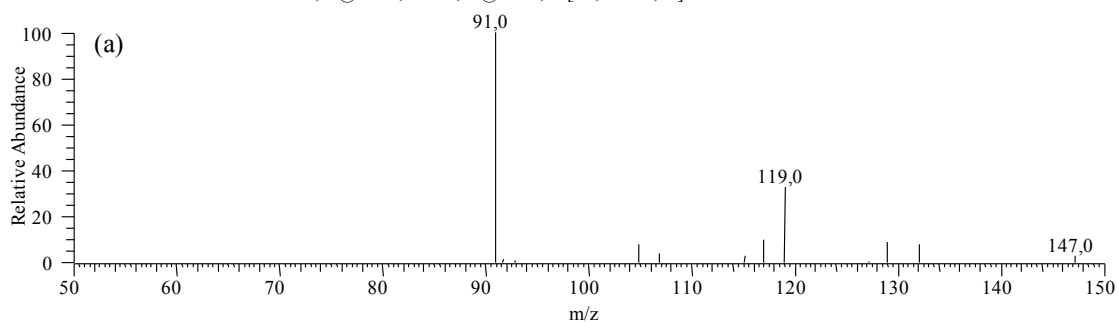


F: ITMS + c APCI corona Full ms3 313,00@cid22,00 277,00@cid30,00 [75,00-300,00]

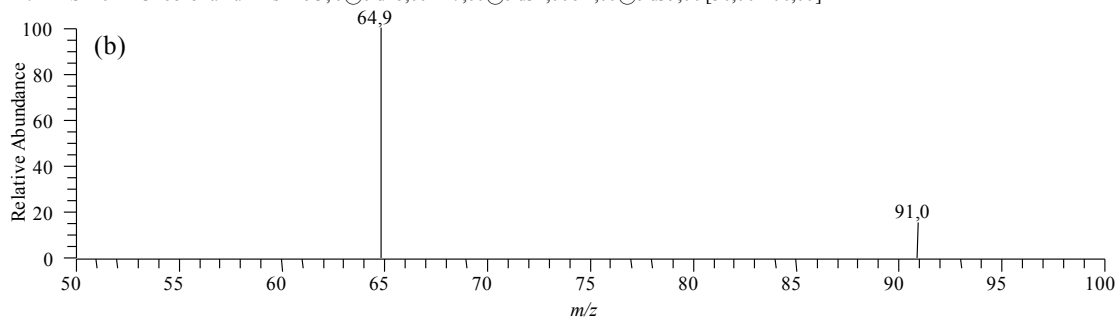


Slika 8. MSⁿ maseni spektri levonorgestrela: (a) APCI(+)-MS³ [M+H]⁺; (b) APCI(+)-MS⁴ [M+H]⁺; (c) APCI(+)-MS³ [M+H]⁺.

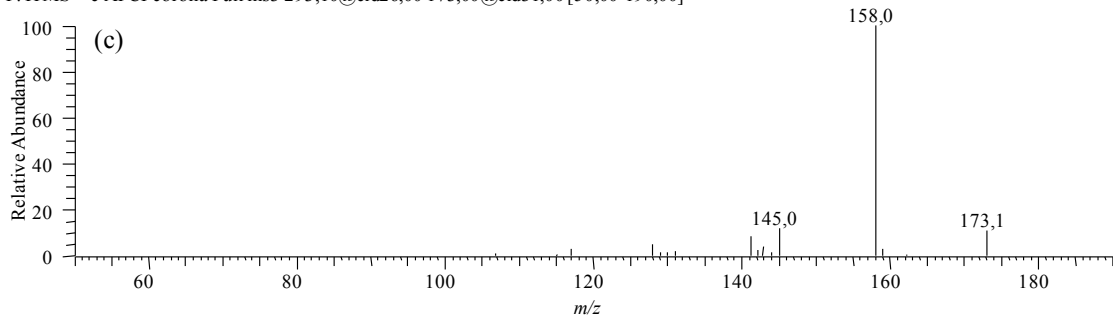
F: ITMS + c APCI corona Full ms3 293,10@cid26,00 147,00@cid32,00 [50,00-150,00]



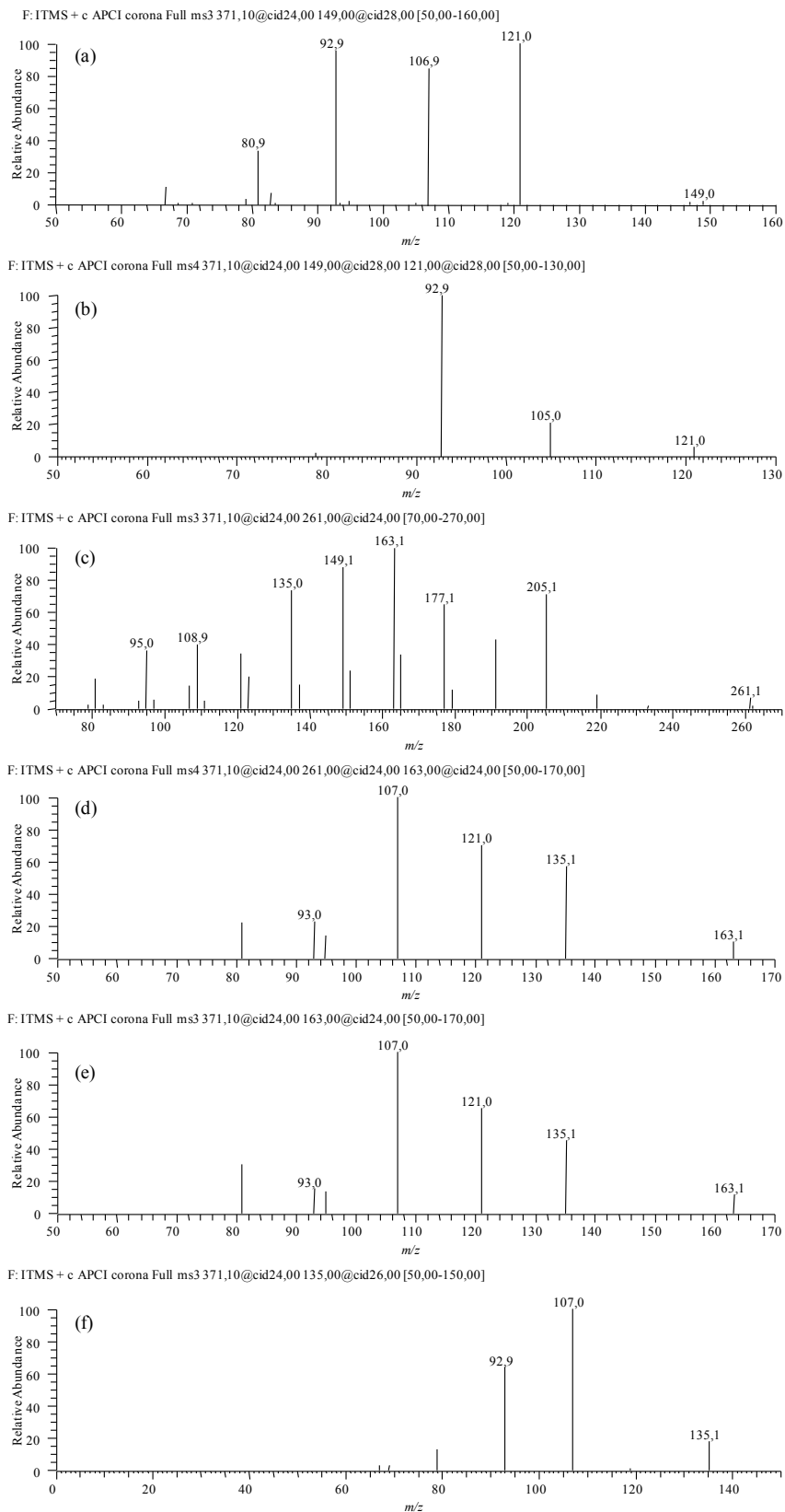
F: ITMS + c APCI corona Full ms4 293,0@cid26,00 147,00@cid32,00 91,00@cid39,00 [50,00-100,00]



F: ITMS + c APCI corona Full ms3 293,10@cid26,00 173,00@cid31,00 [50,00-190,00]

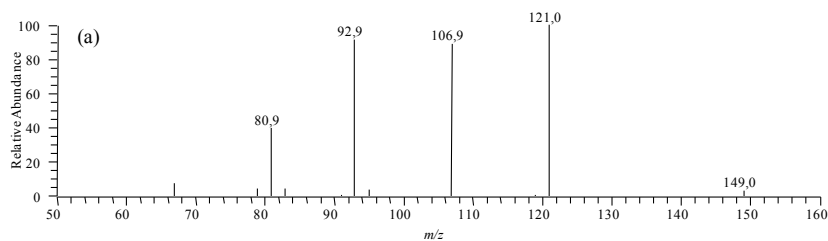


Slika 9. MS^n maseni spektri mestranola: (a) $APCI(+)$ MS^3 $[M-H_2O+H]^+$; (b) $APCI(+)$ MS^4 $[M-H_2O+H]^+$; (c) $APCI(+)$ MS^3 $[M-H_2O+H]^+$.

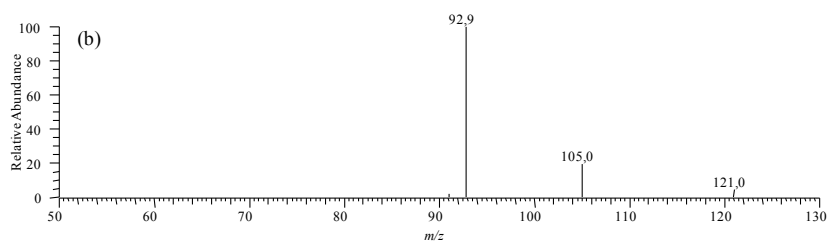


Slika 10. MS^n maseni spektri epikoprostanola: (a) APCI(+) MS^3 $[M-H_2O+H]^+$; (b) APCI(+) MS^4 $[M-H_2O+H]^+$; (c) APCI(+) MS^3 $[M-H_2O+H]^+$; (d) APCI(+) MS^4 $[M-H_2O+H]^+$; (e) APCI(+) MS^3 $[M-H_2O+H]^+$; (f) APCI(+) MS^3 $[M-H_2O+H]^+$.

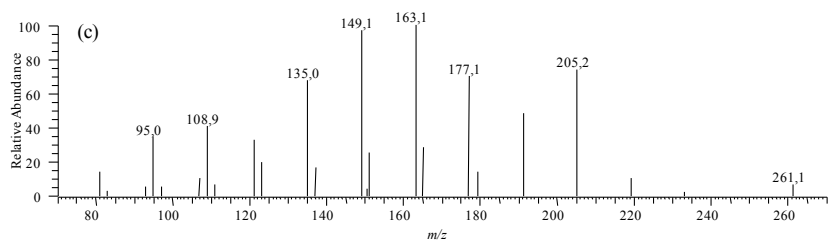
F: ITMS + c APCI corona Full ms3 371,10@cid24,00 149,00@cid28,00 [50,00-160,00]



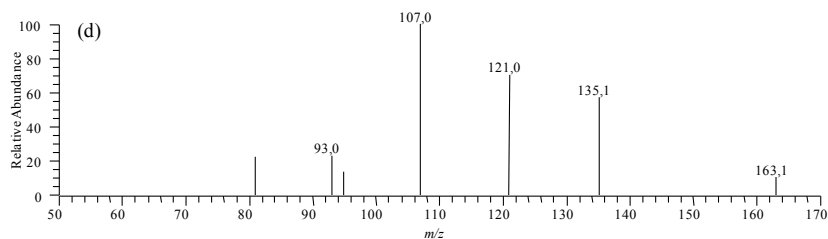
F: ITMS + c APCI corona Full ms4 371,10@cid24,00 149,00@cid28,00 121,00@cid28,00 [50,00-130,00]



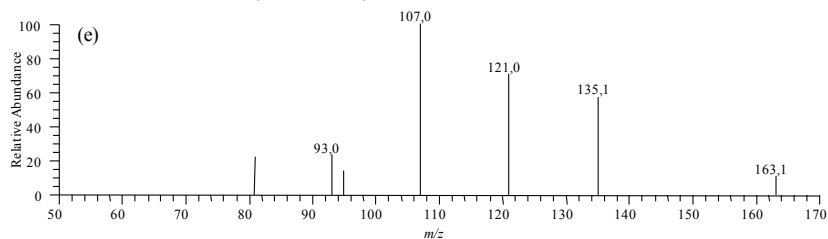
F: ITMS + c APCI corona Full ms3 371,10@cid24,00 261,00@cid24,00 [70,00-270,00]



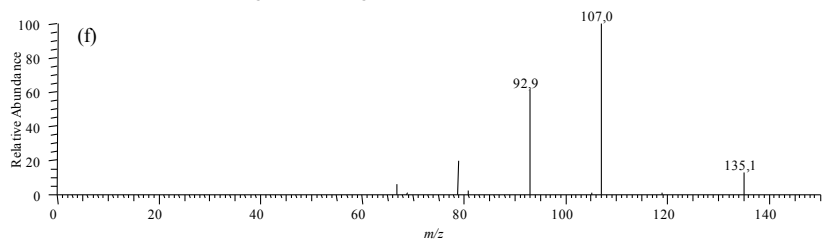
F: ITMS + c APCI corona Full ms4 371,10@cid24,00 261,00@cid24,00 163,00@cid24,00 [50,00-170,00]



F: ITMS + c APCI corona Full ms3 371,10@cid24,00 163,00@cid24,00 [50,00-170,00]

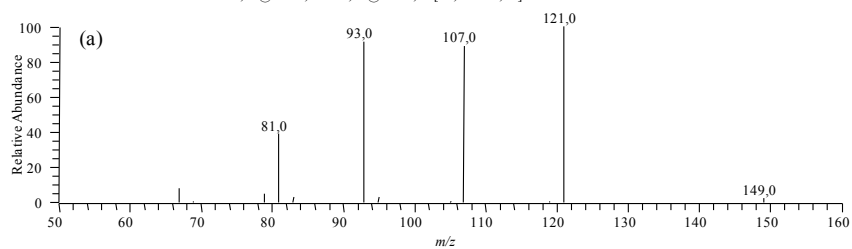


F: ITMS + c APCI corona Full ms3 371,10@cid24,00 135,00@cid26,00 [50,00-150,00]

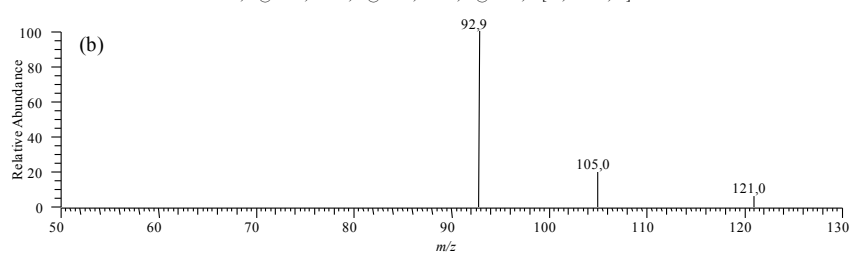


Slika 11. MSⁿ maseni spektri epiholestanola: (a) APCI(+) $MS^3 [M-H_2O+H]^+$; (b) APCI(+) $MS^4 [M-H_2O+H]^+$; (c) APCI(+) $MS^3 [M-H_2O+H]^+$; (d) APCI(+) $MS^4 [M-H_2O+H]^+$; (e) APCI(+) $MS^3 [M-H_2O+H]^+$; (f) APCI(+) $MS^3 [M-H_2O+H]^+$.

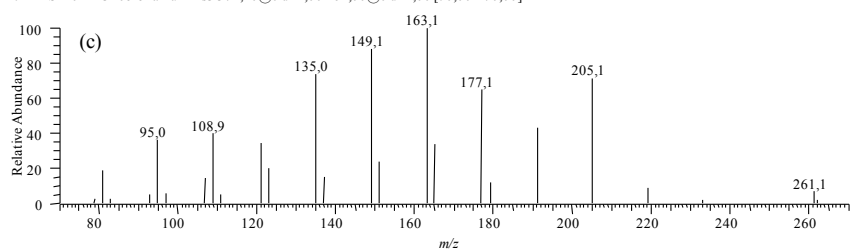
F: ITMS + c APCI corona Full ms3 371,10@cid24,00 149,00@cid28,00 [50,00-160,00]



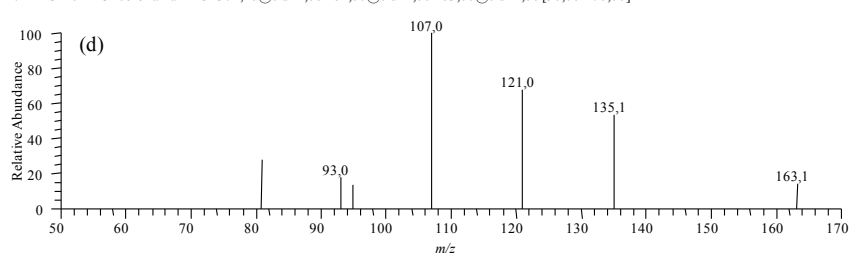
F: ITMS + c APCI corona Full ms4 371,10@cid24,00 149,00@cid28,00 121,00@cid28,00 [50,00-130,00]



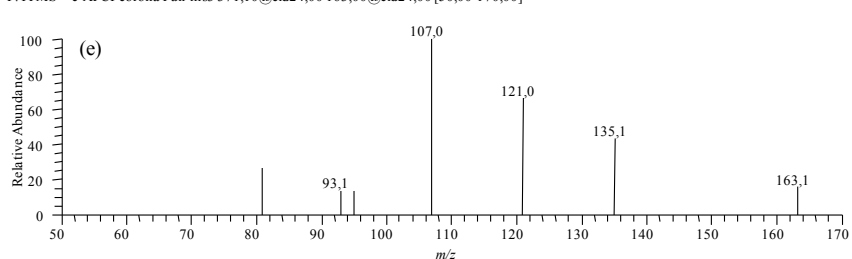
F: ITMS + c APCI corona Full ms3 371,10@cid24,00 261,00@cid24,00 [70,00-270,00]



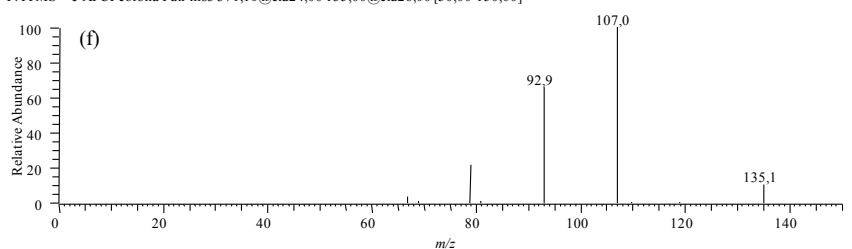
F: ITMS + c APCI corona Full ms4 371,10@cid24,00 261,00@cid24,00 163,00@cid24,00 [50,00-170,00]



F: ITMS + c APCI corona Full ms3 371,10@cid24,00 163,00@cid24,00 [50,00-170,00]

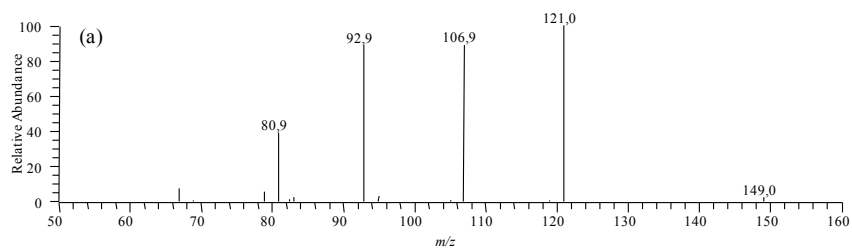


F: ITMS + c APCI corona Full ms3 371,10@cid24,00 135,00@cid26,00 [50,00-150,00]

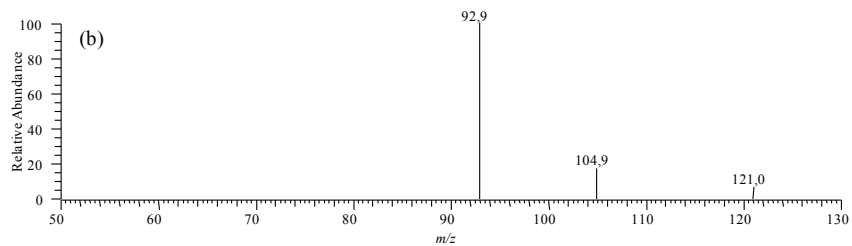


Slika 12. MS^n maseni spektri koprostanola: (a) $APCI(+)$ MS^3 $[M-H_2O+H]^+$; (b) $APCI(+)$ MS^4 $[M-H_2O+H]^+$; (c) $APCI(+)$ MS^3 $[M-H_2O+H]^+$; (d) $APCI(+)$ MS^4 $[M-H_2O+H]^+$; (e) $APCI(+)$ MS^3 $[M-H_2O+H]^+$; (f) $APCI(+)$ MS^3 $[M-H_2O+H]^+$.

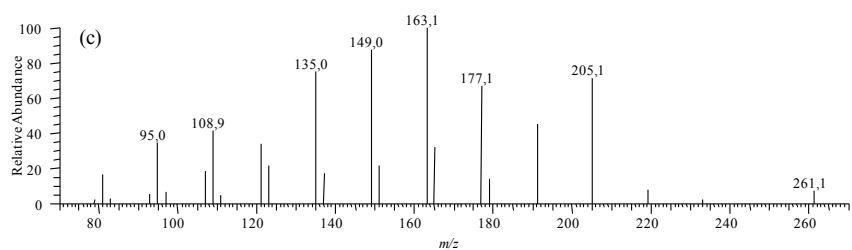
F: ITMS + c APCI corona Full ms3 371,10@cid24,00 149,00@cid28,00 [50,00-160,00]



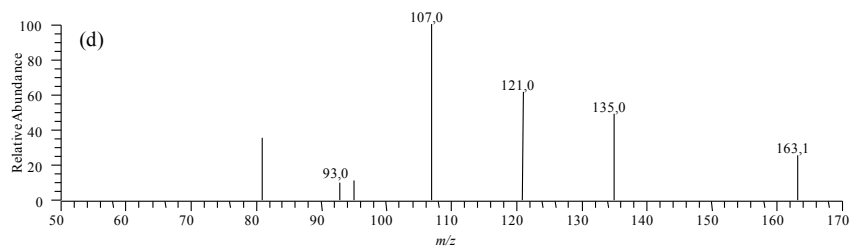
F: ITMS + c APCI corona Full ms4 371,10@cid24,00 149,00@cid28,00 121,00@cid28,00 [50,00-130,00]



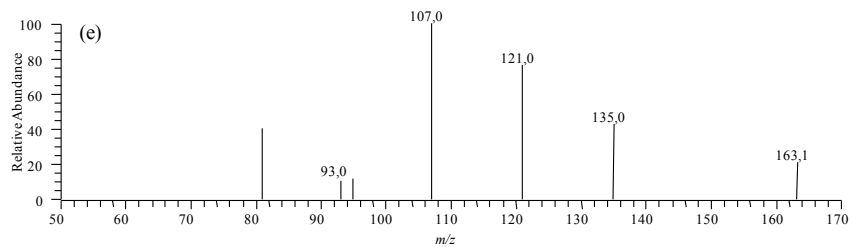
F: ITMS + c APCI corona Full ms3 371,10@cid24,00 261,00@cid24,00 [70,00-270,00]



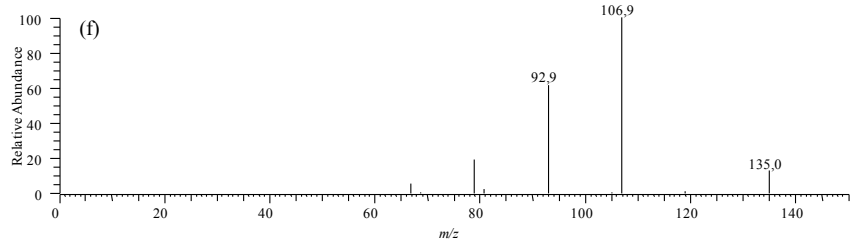
F: ITMS + c APCI corona Full ms4 371,10@cid24,00 261,00@cid24,00 163,00@cid24,00 [50,00-170,00]



F: ITMS + c APCI corona Full ms3 371,10@cid24,00 163,00@cid24,00 [50,00-170,00]

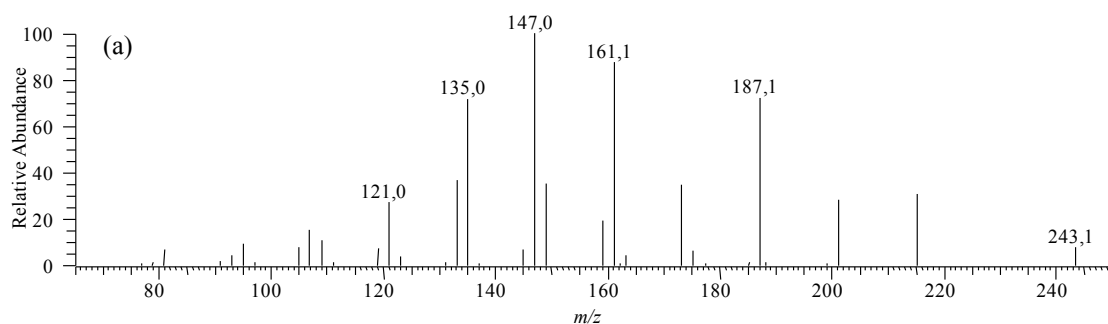


F: ITMS + c APCI corona Full ms3 371,10@cid24,00 135,00@cid26,00 [50,00-150,00]

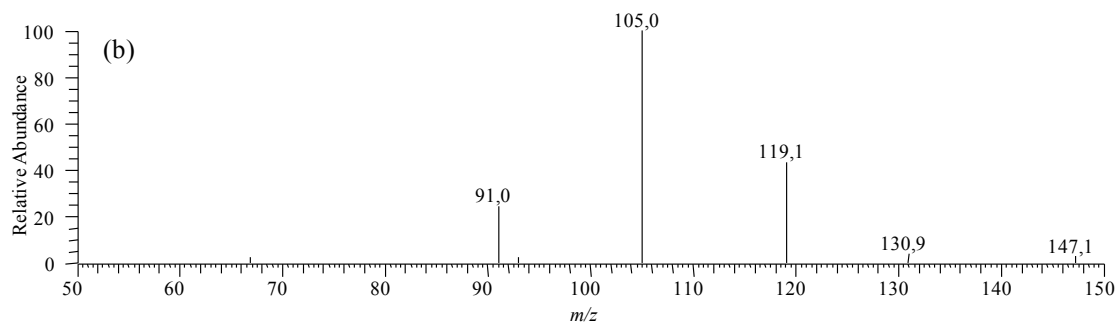


Slika 13. MSⁿ maseni spektri holestanola: (a) APCI(+) $MS^3 [M-H_2O+H]^+$; (b) APCI(+) $MS^4 [M-H_2O+H]^+$; (c) APCI(+) $MS^3 [M-H_2O+H]^+$; (d) APCI(+) $MS^4 [M-H_2O+H]^+$; (e) APCI(+) $MS^3 [M-H_2O+H]^+$; (f) APCI(+) $MS^3 [M-H_2O+H]^+$.

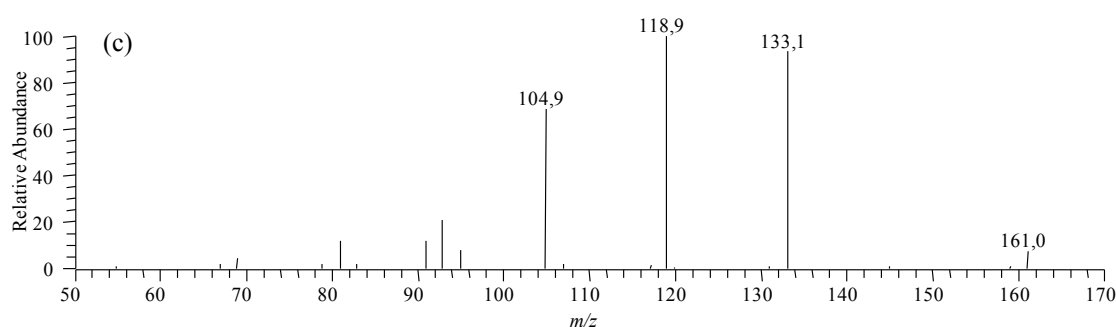
F: ITMS + c APCI corona Full ms3 369,00@cid24,00 243,00@cid24,00 [65,00-250,00]



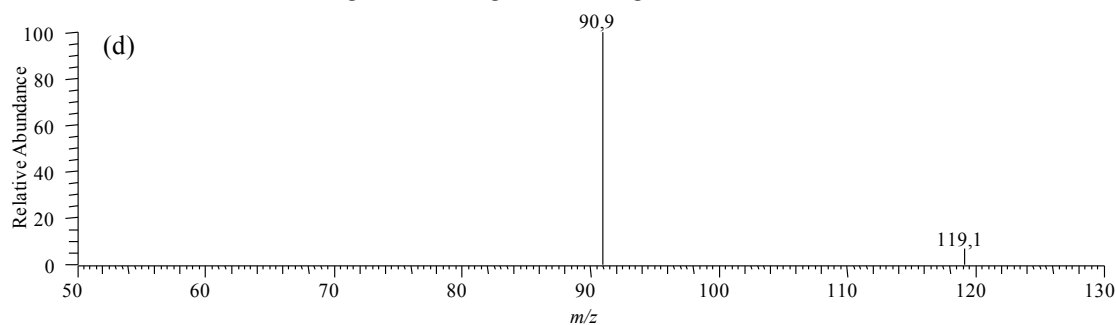
F: ITMS + c APCI corona Full ms4 369,00@cid24,00 243,10@cid24,00 147,00@cid27,00 [50,00-150,00]



F: ITMS + c APCI corona Full ms3 369,10@cid24,00 161,00@cid27,00 [50,00-170,00]

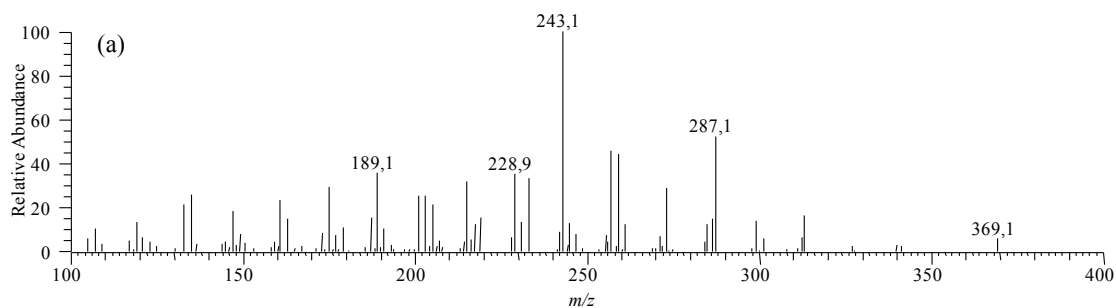


F: ITMS + c APCI corona Full ms4 369,40@cid24,00 161,00@cid27,00 119,00@cid30,00 [50,00-130,00]

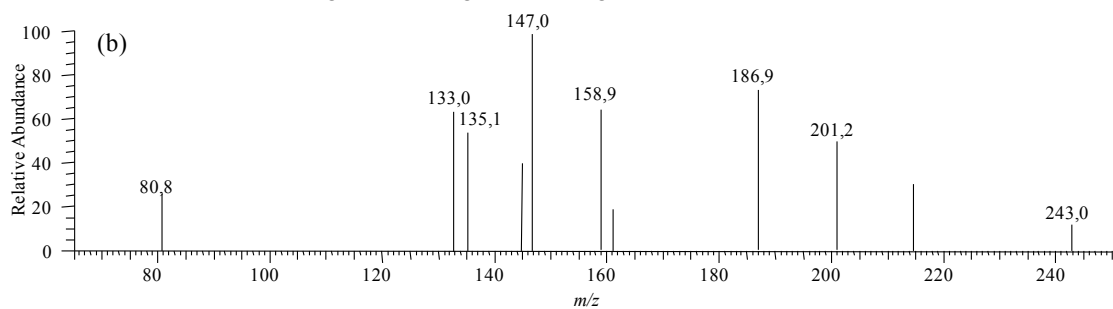


Slika 14. MS^n maseni spektri holesterola: (a) $APCI(+)$ $MS^3 [M-H_2O+H]^+$; (b) $APCI(+)$ $MS^4 [M-H_2O+H]^+$; (c) $APCI(+)$ $MS^3 [M-H_2O+H]^+$; (d) $APCI(+)$ $MS^4 [M-H_2O+H]^+$.

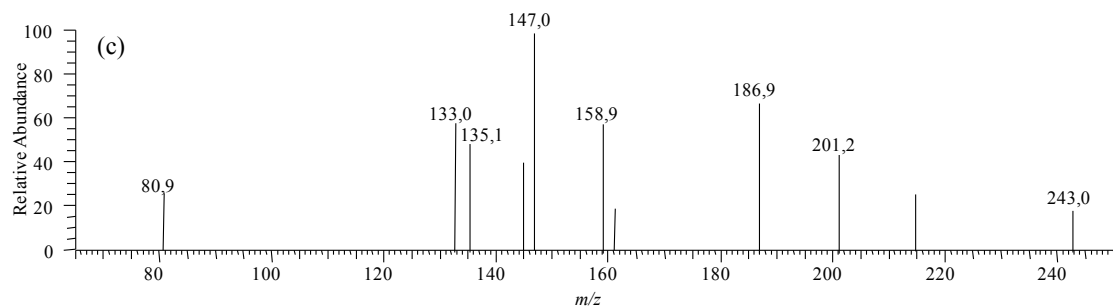
F: ITMS + c APCI corona Full ms3 387,10@cid19,00 369,10@cid25,00 [100,00-400,00]



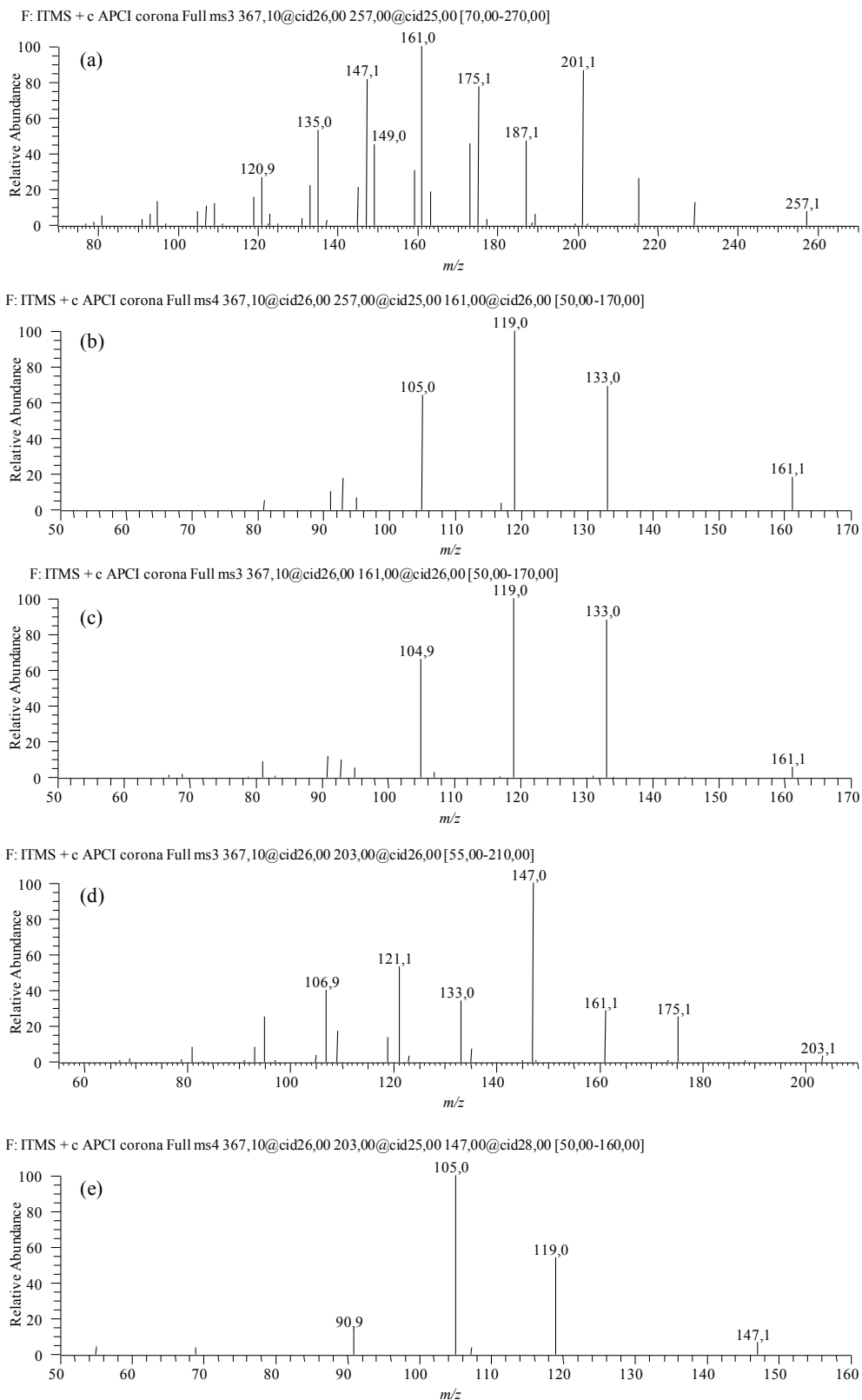
F: ITMS + c APCI corona Full ms4 387,10@cid19,00 369,00@cid25,00 243,00@cid25,00 [65,00-250,00]



F: ITMS + c APCI corona Full ms3 387,10@cid19,00 243,00@cid25,00 [65,00-250,00]

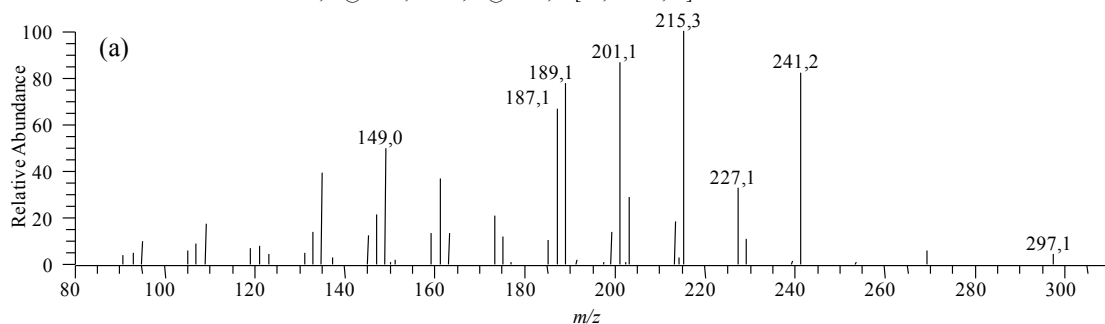


Slika 15. MSⁿ maseni spektri holestanona: (a) APCI(+)-MS³ [M+H]⁺; (b) APCI(+)-MS⁴ [M+H]⁺; (c) APCI(+)-MS³ [M+H]⁺.

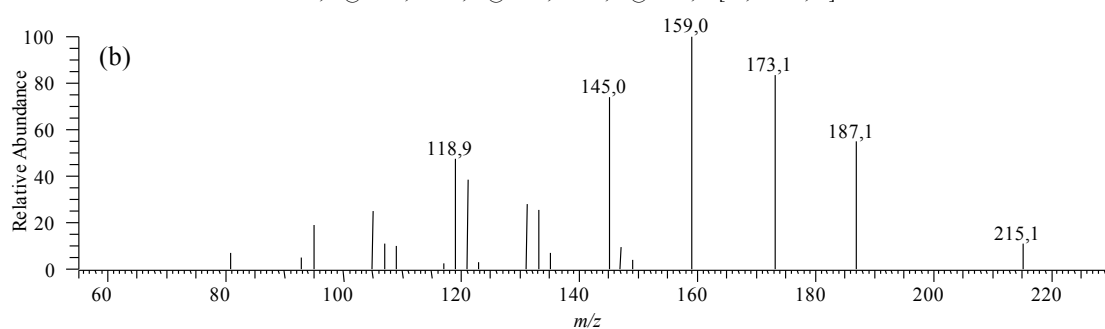


Slika 16. MS^n maseni spektri dezmosterola: (a) $APCI(+)MS^3 [M-H_2O+H]^+$; (b) $APCI(+)MS^4 [M-H_2O+H]^+$; (c) $APCI(+)MS^3 [M-H_2O+H]^+$; (d) $APCI(+)MS^3 [M-H_2O+H]^+$; (e) $APCI(+)MS^4 [M-H_2O+H]^+$.

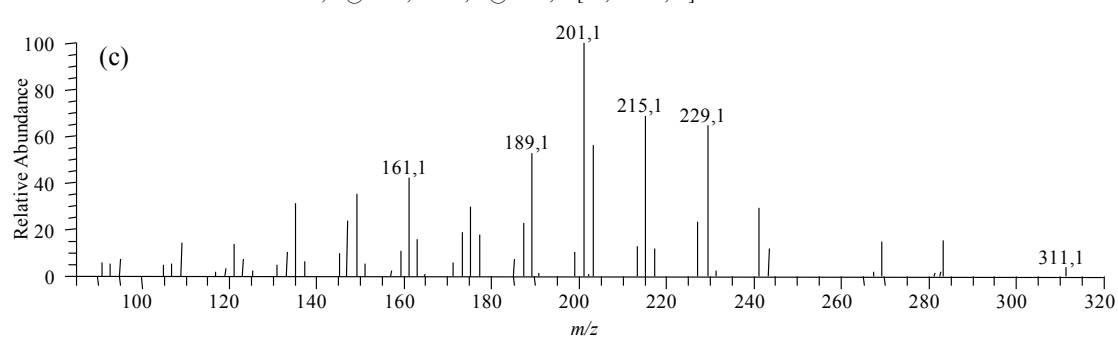
F: ITMS + c APCI corona Full ms3 395,10@cid24,00 297,00@cid25,00 [80,00-310,00]



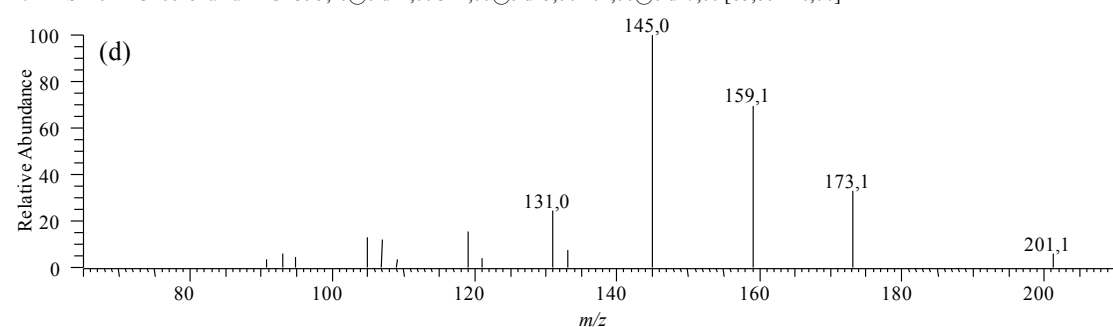
F: ITMS + c APCI corona Full ms4 395,10@cid24,00 297,00@cid25,00 215,00@cid25,00 [55,00-230,00]



F: ITMS + c APCI corona Full ms3 395,10@cid24,00 311,00@cid25,00 [85,00-320,00]

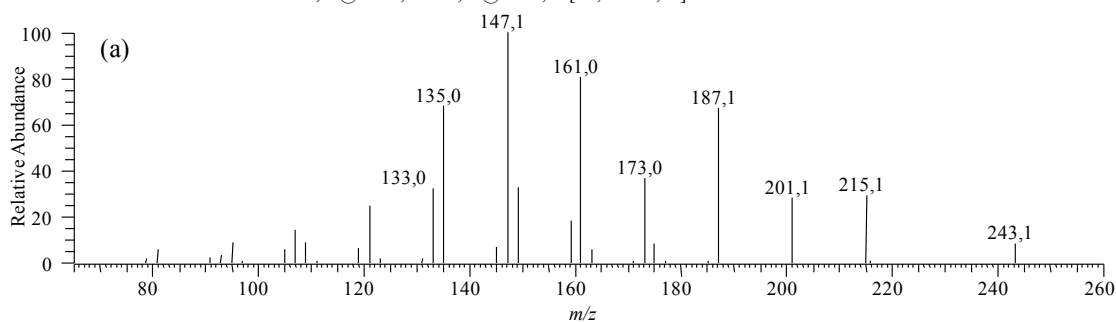


F: ITMS + c APCI corona Full ms4 395,10@cid24,00 311,00@cid25,00 201,00@cid27,00 [65,00-210,00]

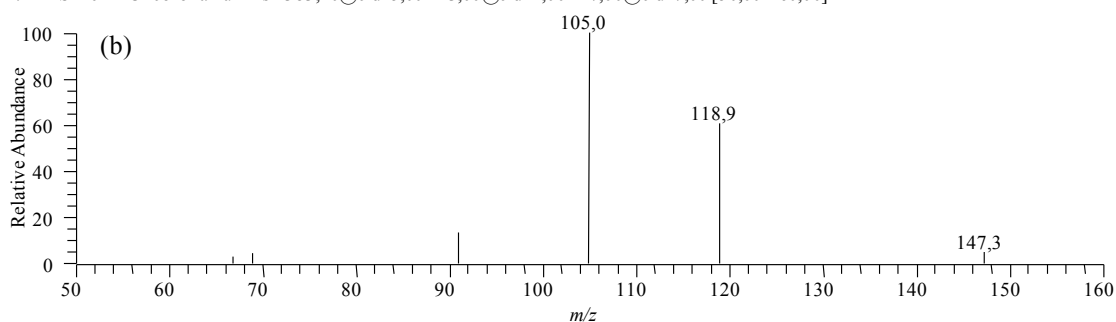


Slika 17. MSⁿ maseni spektri stigmasterola: (a) APCI(+) $MS^3 [M-H_2O+H]^+$; (b) APCI(+) $MS^4 [M-H_2O+H]^+$; (c) APCI(+) $MS^3 [M-H_2O+H]^+$; (d) APCI(+) $MS^4 [M-H_2O+H]^+$.

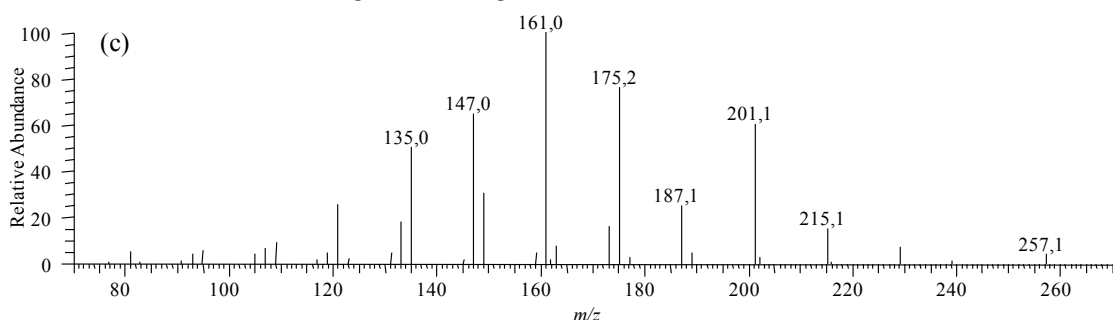
F: ITMS + c APCI corona Full ms3 383,10@cid25,00 243,00@cid24,00 [65,00-260,00]



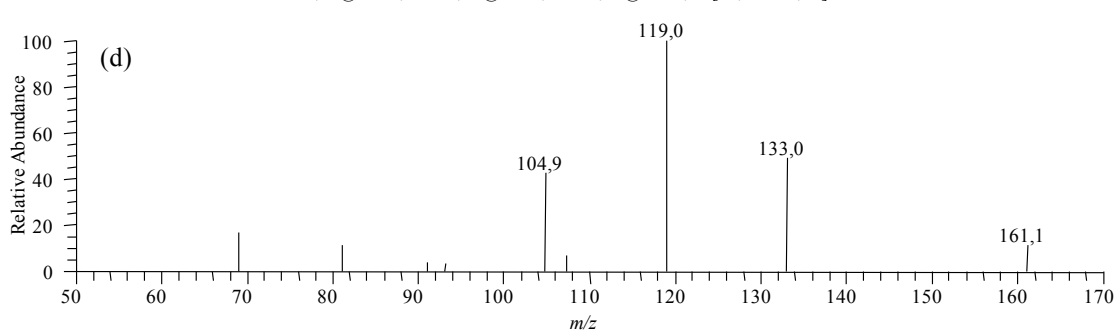
F: ITMS + c APCI corona Full ms4 383,10@cid25,00 243,00@cid24,00 147,00@cid27,00 [50,00-160,00]



F: ITMS + c APCI corona Full ms3 383,10@cid25,00 257,00@cid24,00 [70,00-270,00]

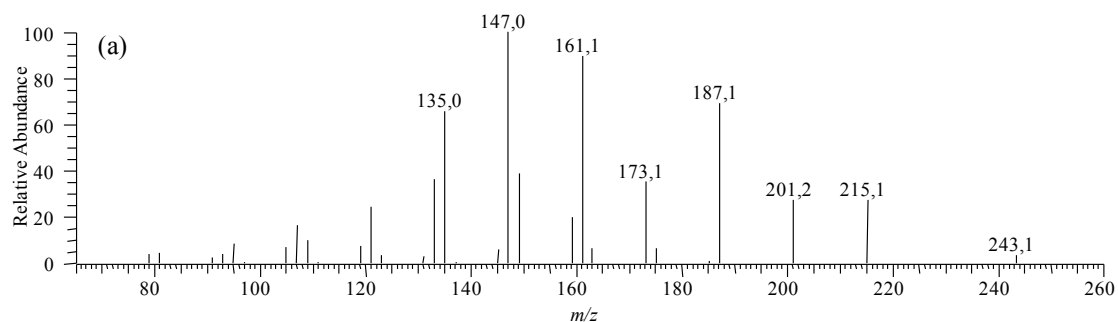


F: ITMS + c APCI corona Full ms4 383,10@cid25,00 257,00@cid24,00 161,00@cid28,00 [50,00-170,00]

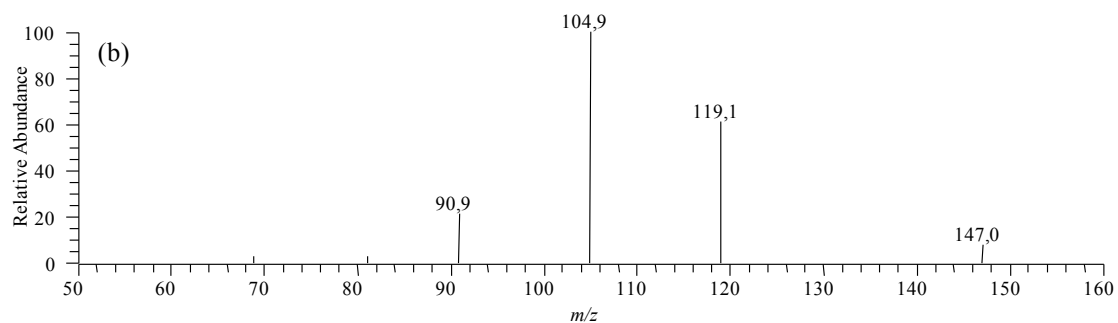


Slika 18. MS^n maseni spektri kampesterola: (a) $APCI(+)$ MS^3 $[M-H_2O+H]^+$; (b) $APCI(+)$ MS^4 $[M-H_2O+H]^+$; (c) $APCI(+)$ MS^3 $[M-H_2O+H]^+$; (d) $APCI(+)$ MS^4 $[M-H_2O+H]^+$.

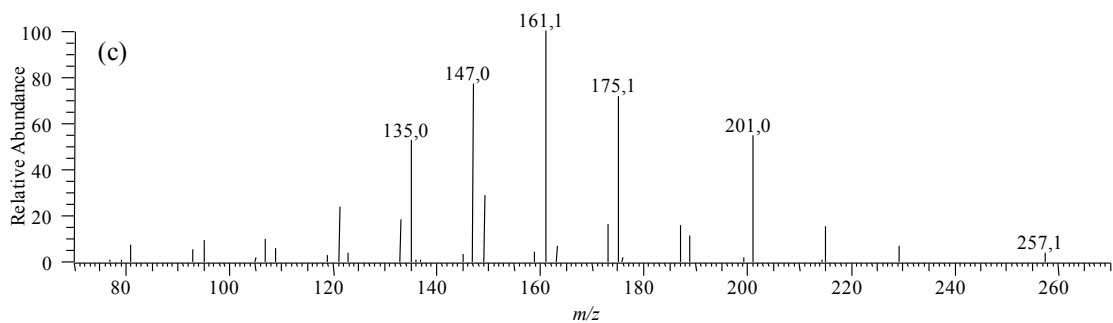
F: ITMS + c APCI corona Full ms3 397,00@cid25,00 243,00@cid25,00 [65,00-260,00]



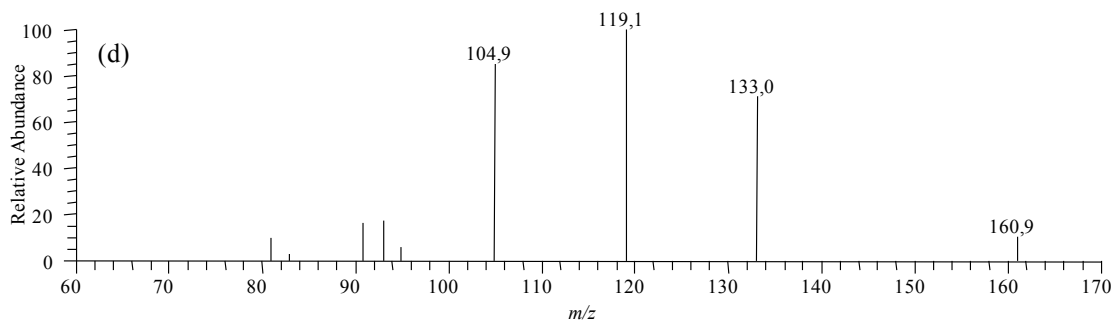
F: ITMS + c APCI corona Full ms4 397,00@cid25,00 243,00@cid25,00 147,00@cid28,00 [50,00-160,00]



F: ITMS + c APCI corona Full ms3 397,00@cid25,00 257,00@cid24,00 [70,00-270,00]

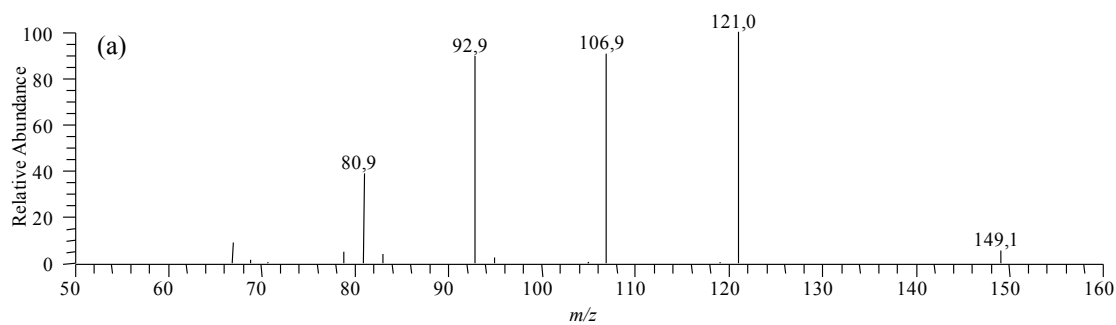


F: ITMS + c APCI corona Full ms4 397,10@cid25,00 257,00@cid24,00 161,00@cid26,00 [60,00-170,00]

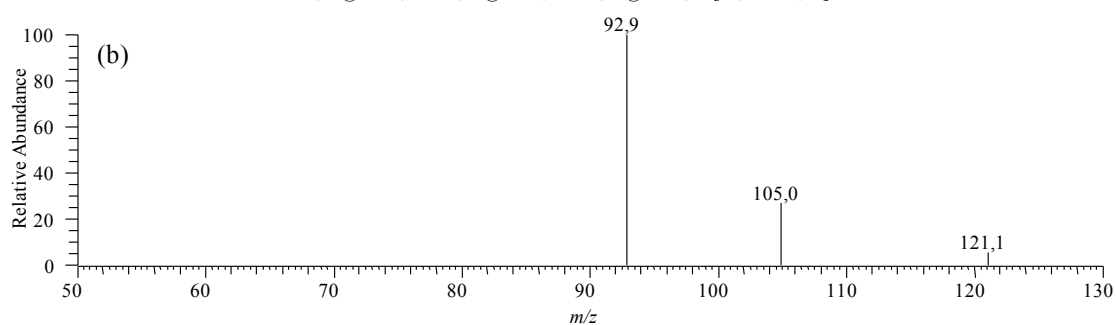


Slika 19. MS^n maseni spektri β -sitosterola: (a) $APCI(+)$ MS^3 $[M-H_2O+H]^+$; (b) $APCI(+)$ MS^4 $[M-H_2O+H]^+$; (c) $APCI(+)$ MS^3 $[M-H_2O+H]^+$; (d) $APCI(+)$ MS^4 $[M-H_2O+H]^+$.

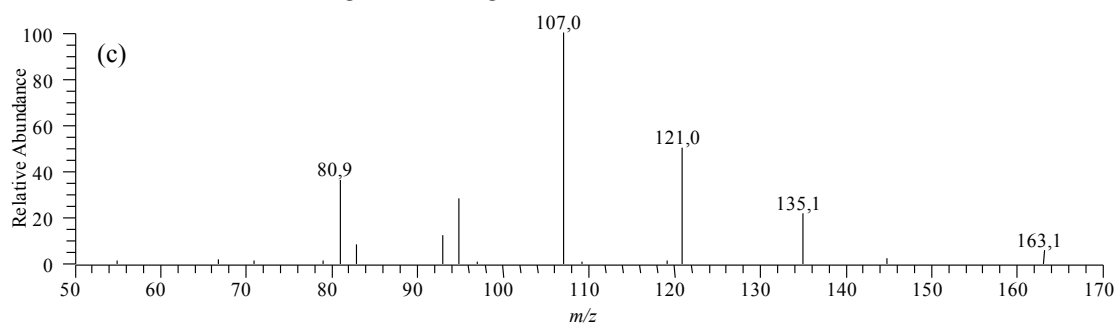
F: ITMS + c APCI corona Full ms3 399,10@cid24,00 149,00@cid27,00 [50,00-160,00]



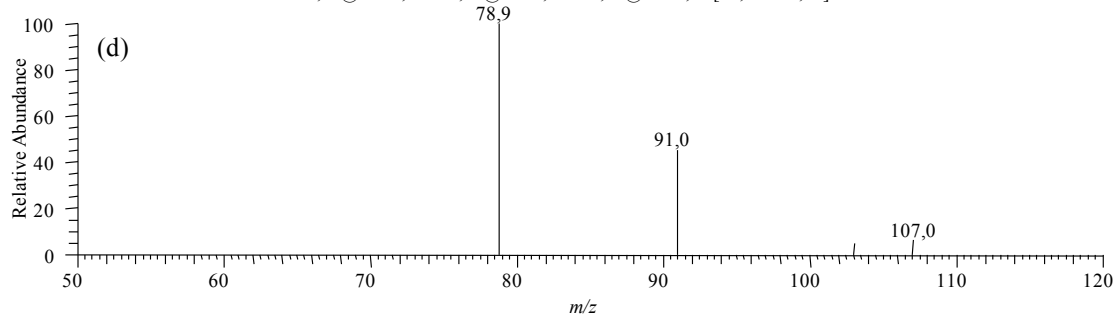
F: ITMS + c APCI corona Full ms4 399,10@cid24,00 149,00@cid27,00 121,00@cid28,00 [50,00-130,00]



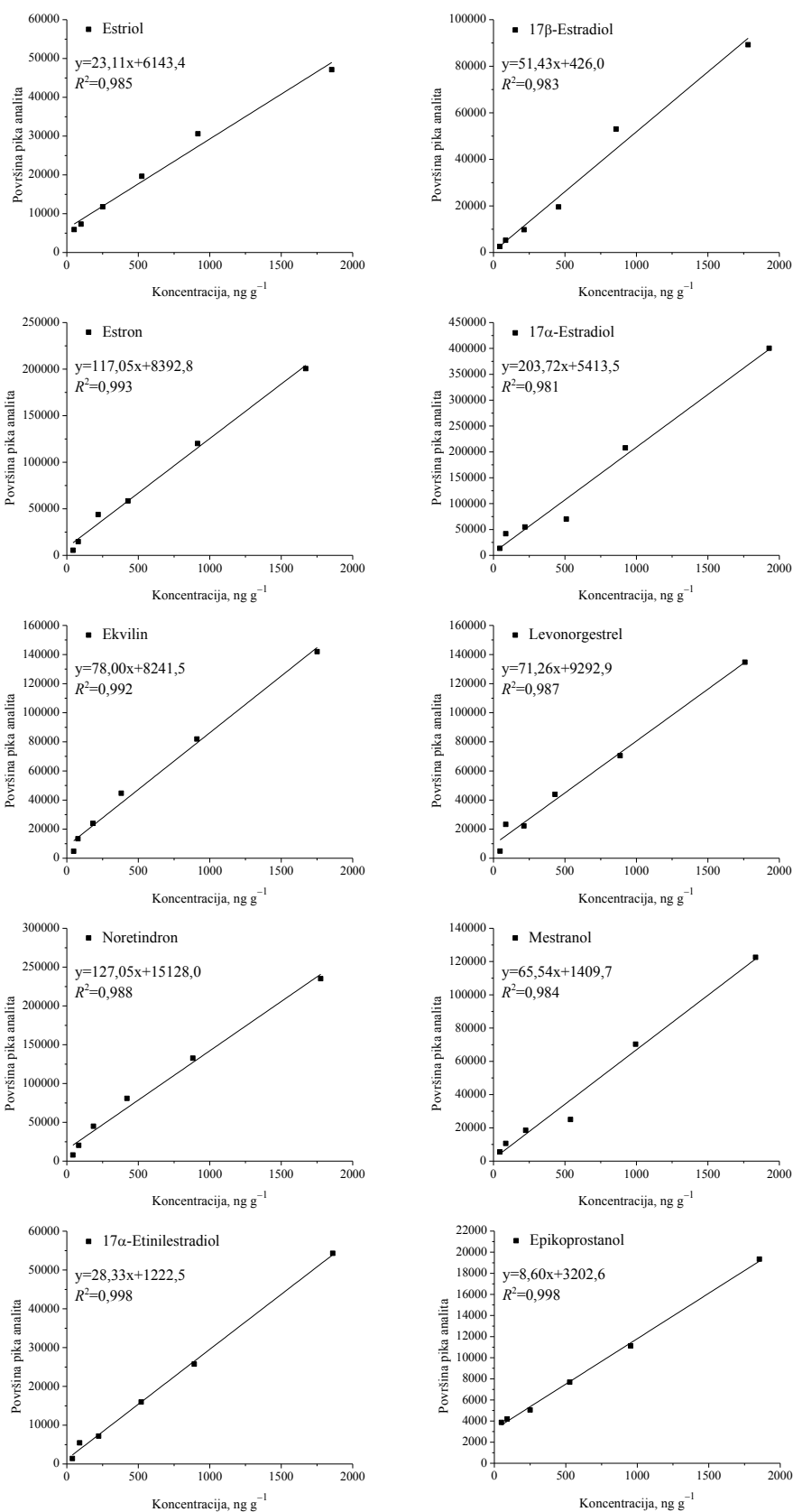
F: ITMS + c APCI corona Full ms3 399,10@cid24,00 163,00@cid26,00 [50,00-170,00]



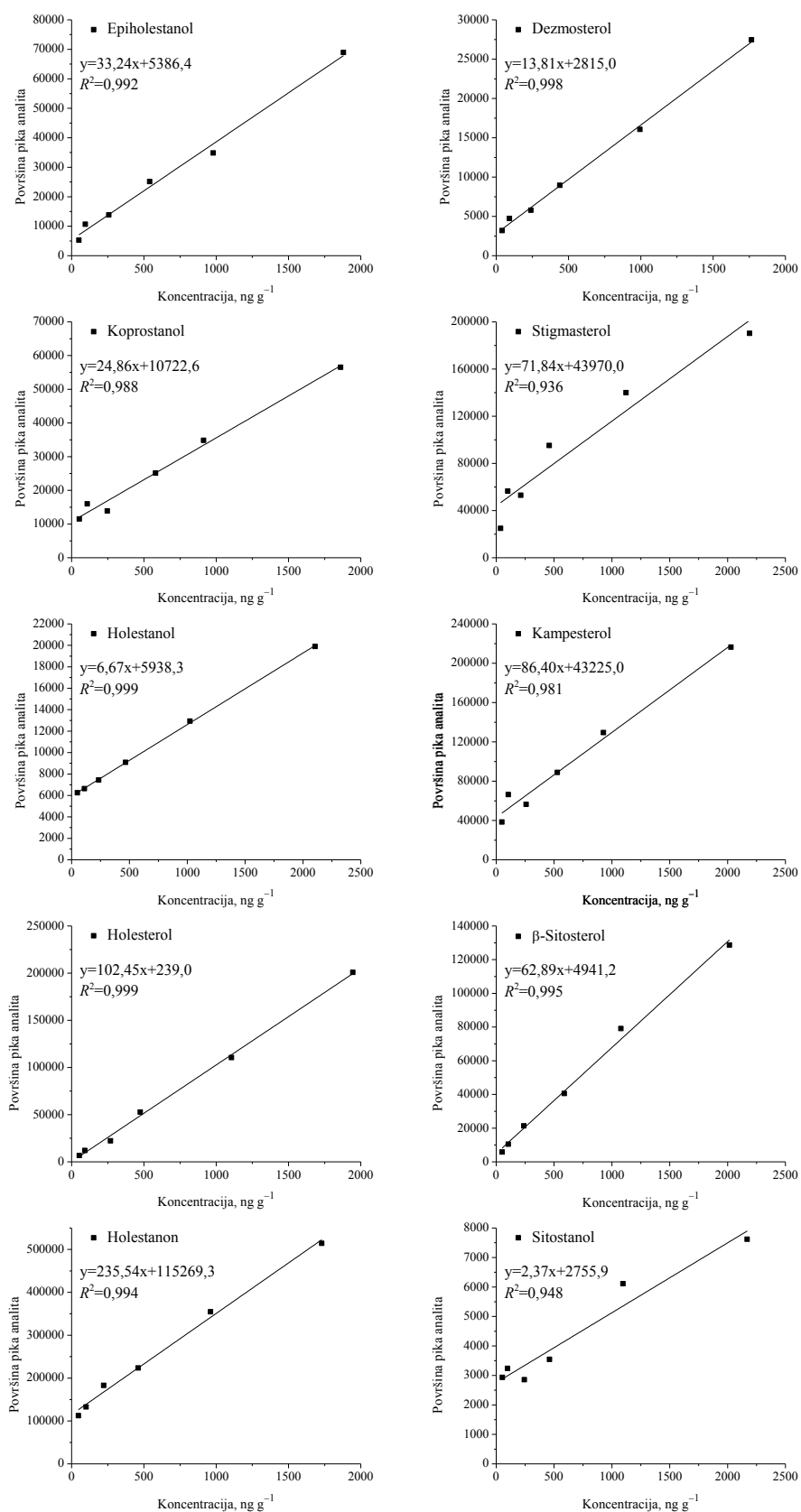
F: ITMS + c APCI corona Full ms4 399,10@cid24,00 163,00@cid26,00 107,00@cid29,00 [50,00-120,00]



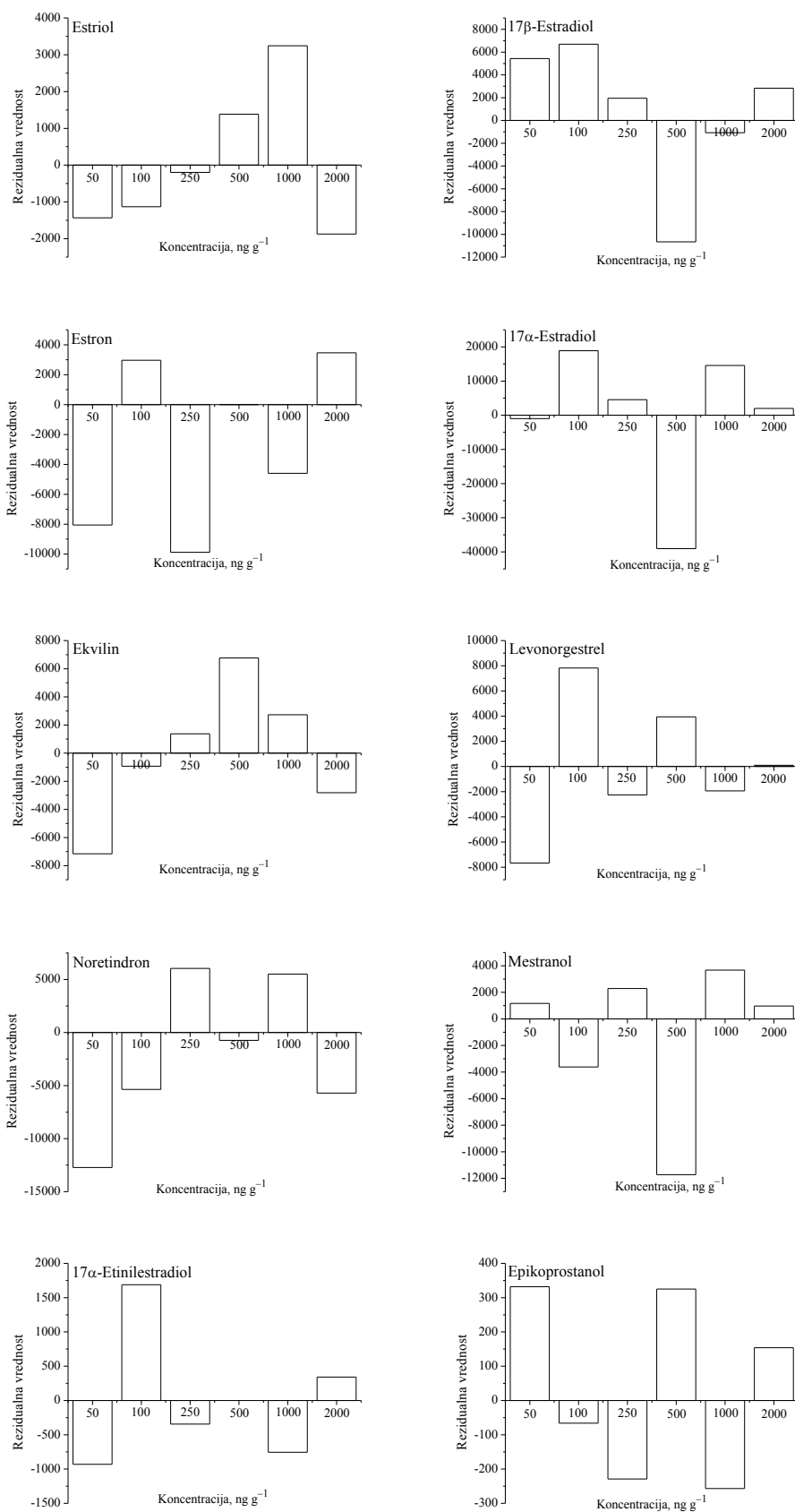
Slika 20. MS^n maseni spektri sitostanola: (a) $APCI(+)$ $MS^3 [M-H_2O+H]^+$; (b) $APCI(+)$ $MS^4 [M-H_2O+H]^+$; (c) $APCI(+)$ $MS^3 [M-H_2O+H]^+$; (d) $APCI(+)$ $MS^4 [M-H_2O+H]^+$.



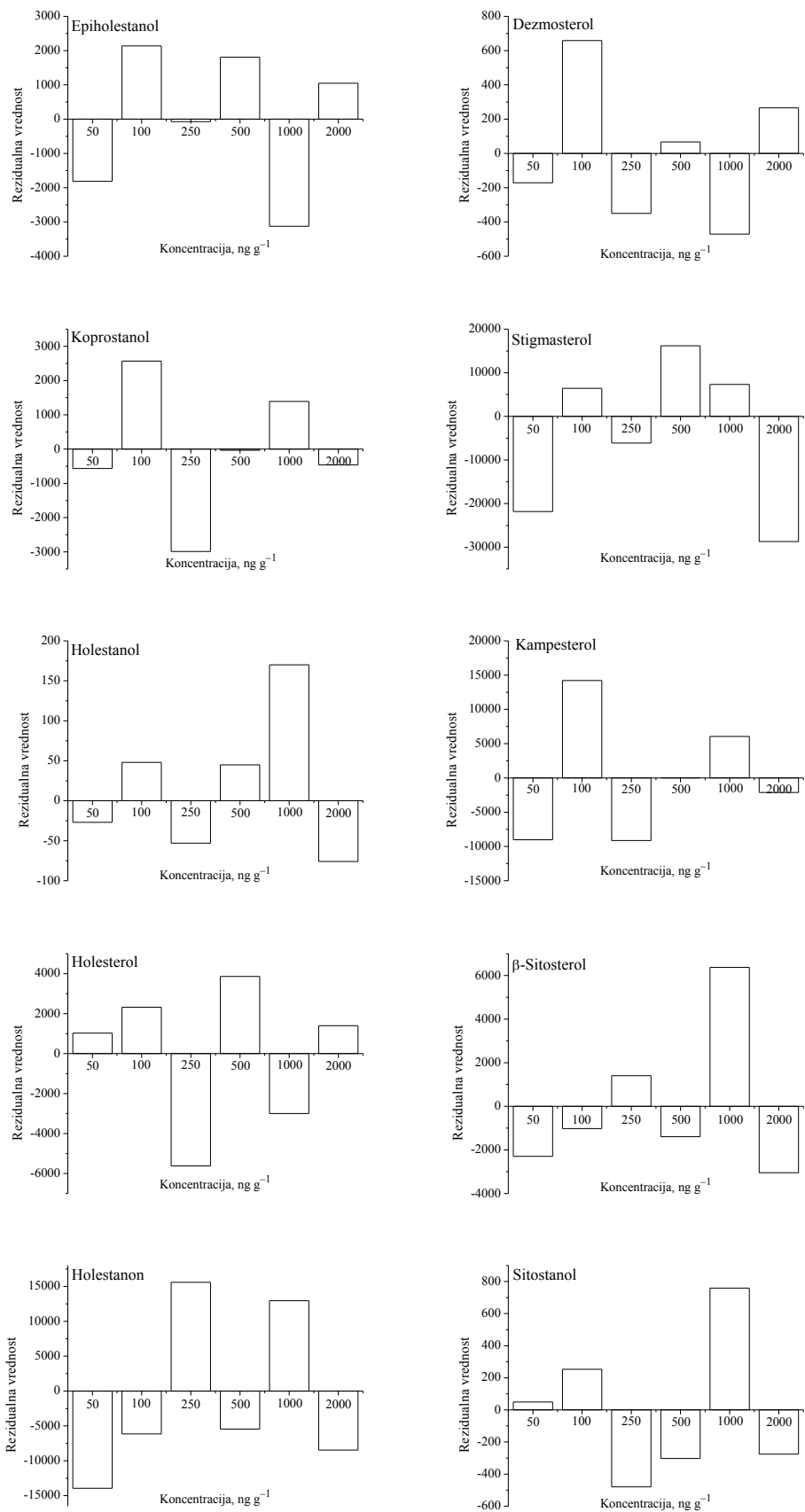
Slika 21. Rezultati korelaciono-regresione analize.



Slika 21. (nastavak)



Slika 22. Grafički prikaz rezidualnih vrednosti izračunatih iz odgovarajućih jednačina prave za šest koncentracija.



Slika 22. (nastavak)

Tabela 1. Rezidualne vrednosti izračunate iz odgovarajućih jednačina prave za šest koncentracija.

Steroid	Rezidualna vrednost					
	Koncentracija (ng g ⁻¹)					
	50	100	250	500	1000	2000
Estriol	-1433	-1129	-197	1386	3244	-1872
Estron	-8054	2962	-9880	4	-4594	3463
Ekvilin	-7155	-924	1375	6763	2728	-2809
Noretindron	-12726	-5366	6047	-739	5501	-5706
17 α -Etinilestradiol	-931	1689	-344	0	-755	341
17 β -Estradiol	5440	6691	1952	-10658	-1071	2832
17 α -Estradiol	-995	18894	4566	-39032	14559	1994
Levonorgestrel	-7676	7824	-2258	3945	-1935	100
Mestranol	1171	-3612	2290	-11722	3678	969
Epikoprostanol	332	-66	-229	325	-257	154
Epiholestanol	-1813	2136	-73	1808	-3126	1048
Koprostanol	-566	2567	-2988	-33	1390	-463
Holestanol	-27	48	-53	45	170	-76
Holesterol	1026	2324	-5620	3862	-2999	1396
Holestanon	-13945	-6146	15597	-5454	12952	-8464
Dezmosterol	-171	659	-350	67	-471	266
Stigmasterol	-21819	6430	-6109	16173	7344	-28697
Kampesterol	-9019	14209	-9135	5	6059	-2118
β -Sitosterol	-2297	-1021	1403	-1395	6369	-3045
Sitostanol	49	253	-480	-303	759	-276

OBJAVLJENI NAUČNI RADOVI IZ DOKTORSKE DISERTACIJE

Radovi u međunarodnim časopisima izuzetnih vrednosti – M21a

1. Matić Bujagić I., Grujić S., Jauković Z., Laušević M., Sterol ratios as a tool for sewage pollution assessment of river sediments in Serbia, *Environmental Pollution*, 213 (2016) 76-83.
2. Matić I., Grujić S., Jauković Z., Laušević M., Trace analysis of selected hormones and sterols in river sediments by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization–tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1364 (2014) 117-127.

BIOGRAFIJA AUTORA

Ivana Matić Bujagić je rođena 25.02.1988. godine u Aranđelovcu. Tehnološko-metalurški fakultet Univerziteta u Beogradu, studijski program Hemijska tehnologija, studijsko područje Inženjerstvo zaštite životne sredine, upisala je školske 2007/2008. godine. Diplomirala je 2011. godine na Katedri za inženjerstvo zaštite životne sredine sa prosečnom ocenom tokom studija 9,26. Master studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu, smer Inženjerstvo zaštite životne sredine, upisala je školske 2011/2012. godine. Diplomirala je 2012. godine sa prosečnom ocenom u toku studija 9,88.

Školske 2012/2013. godine upisala je doktorske akademske studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu na smeru Hemija, pod rukovodstvom dr Svetlane Grujić, van. prof. Tehnološko-metalurškog fakulteta. Na doktorskim studijama je uspešno položila sve ispite predviđene planom i programom, kao i završni ispit sa prosečnom ocenom 10. Oblast naučno-istraživačkog rada Ivane Matić Bujagić obuhvata razvoj, validaciju i primenu analitičkih metoda korišćenjem tečne hromatografije sa tandem masenom spektrometrijom za analizu tragova zagađujućih materija u uzorcima vode i sedimenata.

Četiri puta je nagrađena Poveljom Pante S. Tutundžić Tehnološko-metalurškog fakulteta za izuzetan uspeh na osnovnim akademskim studijama. Dobitnik je takođe i specijalnog priznanja Srpskog hemijskog društva za 2012. godinu za izuzetan uspeh u toku studija.

Od 2012. godine Ivana Matić Bujagić je uključena u projekat finansiran od strane Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije. Od februara 2016. godine zaposlena je kao saradnik u nastavi–demonstrator na VŠSS „Beogradska politehnika“ u Beogradu i kao spoljni saradnik na projektu osnovnih istraživanja na Tehnološko-metalurškom fakultetu.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Ивана Матић Бујагић

број индекса 4007/2012

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

ОДРЕЂИВАЊЕ ТРАГОВА СТЕРОИДНИХ ХОРМОНА И СТЕРОЛА КАО
ИНДИКАТОРА ИЗВОРА ЗАГАЂЕЊА РЕЧНИХ СЕДИМЕНАТА МЕТОДОМ
ТЕЧНЕ ХРОМАТОГРАФИЈЕ СА ТАНДЕМ МАСЕНОМ
СПЕКТРОМЕТРИЈОМ

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 13.06.2016.

Ивана Матић Бујагић

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Ивана Матић Бујагић

Број индекса 4007/2012

Студијски програм Хемија

Наслов рада Одређивање трагова стероидних хормона и стерола као
индикатора извора загађења речних седимената методом течне хроматографије
са тандем масеном спектрометријом

Ментор Светлана Грујић

Потписани/а Ивана Матић Бујагић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 13.06.2016.

Ивана Матић Бујагић

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

ОДРЕЂИВАЊЕ ТРАГОВА СТЕРОИДНИХ ХОРМОНА И СТЕРОЛА КАО
ИНДИКАТОРА ИЗВОРА ЗАГАЂЕЊА РЕЧНИХ СЕДИМЕНАТА МЕТОДОМ
ТЕЧНЕ ХРОМАТОГРАФИЈЕ СА ТАНДЕМ МАСЕНОМ
СПЕКТРОМЕТРИЈОМ

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 13.06.2016.

Ивана Мајић Бујаић

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.