

UNIVERZITET U BEOGRADU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

Zorica D. Jauković

**RAZVOJ I PRIMENA METODE ANALIZE
ODABRANIH STEROLA I STEROIDNIH
HORMONA U PRIRODNIM I OTPADNIM
VODAMA TEČNOM HROMATOGRFIJOM
SA TANDEM MASENOM
SPEKTROMETRIJOM**

doktorska disertacija

Beograd, 2023

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Zorica D. Jauković

**DEVELOPMENT AND APPLICATION OF THE
METHOD OF ANALYSIS OF SELECTED
STEROLS AND STEROID HORMONES IN
NATURAL AND WASTEWATERS BY LIQUID
CHROMATOGRAPHY WITH TANDEM MASS
SPECTROMETRY**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2023

Mentor:

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

Članovi komisije:

Dr Tatjana Đurkić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

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

Datum odbrane: _____

Zahvalnica

Veliku zahvalnost za izradu ove doktorske disertacije dugujem svojim kolegama, profesorima i tehničarima sa Katedre za analitičku hemiju i kontrolu kvaliteta sa Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu, kao i saradnicima koji su uključeni u rad Laboratorije za masenu spektrometriju na istoj Katedri.

Svojoj mentorki, dr Svetlani Grujić, vanrednom profesoru Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu, zahvaljujem na podršci, izvanrednom zalaganju i pomoći, kako u eksperimentalnom radu, tako i u toku pisanja naučnih radova i ove teze.

Koleginicama dr Marini Radišić, dr Nikolini Antić i dr Tanji Radović od srca hvala na deljenju znanja, druženju i nesebičnoj pomoći. Takođe, posebnu zahvalnost dugujem dr Ivani Matić Bujagić, dr Ljiljani Tolić Stojadinović i dr Marini Maletić. Hvala na vremenu koje smo provodile zajedno, druženju i bezrezervnom razumevanju.

Zahvalnost dugujem i kolegama iz JKP Beogradski vodovod i kanalizacija, Vukomanu Sekuliću, Slavici Pjević i Ani Jauković, na pomoći prilikom prikupljanja uzoraka i eksperimentalnog rada.

Profesorkama dr Mili Laušević, dr Slavici Ražić i dr Tatjani Đurkić zahvaljujem se na posvećenosti, izuzetnoj podršci u realizaciji i pisanju naučnih radova i ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem se kolegama iz kompanije Agrosava d.o.o., na stručnoj pomoći i razumevanju, kao i na pomoći i podršci prilikom štampanja ove doktorske disertacije.

Mojoj porodici dugujem najveću zahvalnost na strpljenju, razumevanju i podršci tokom ovog puta, bilo je teških trenutaka i mnogo odricanja, sa vama je sve mnogo lakše i zabavnije.

Zorica Jauković

RAZVOJ I PRIMENA METODE ANALIZE ODABRANIH STEROLA I STEROIDNIH HORMONA U PRIRODNIM I OTPADNIM VODAMA TEČNOM HROMATOGRAFIJOM SA TANDEM MASENOM SPEKTROMETRIJOM

Sažetak

Prisustvo steroidnih jedinjenja u prirodnim i otpadnim vodama i njihov štetan uticaj na vodeni ekosistem su prepoznati u naučnoj zajednici nekoliko decenija. Istraživanje ekotoksičnosti ovih emergentnih zagađujućih materija pokazalo je da njihovi tragovi u vodenoj sredini mogu izazvati različite štetne efekte po vodene organizme. Steroli i steroidni hormoni su opsežno istraženi u različitim matricama životne sredine, te je dokazano da neki od njih čine prirodne konstituente ispitivanih matrica, ali u životnu sredinu u velikim količinama dospevaju iz netretiranih otpadnih voda iz domaćinstava, industrije i poljoprivrede. Metode procene zagađenja životne sredine komunalnim otpadnim vodama pri rutinskom monitoringu podrazumevaju upotrebu bakterijskih indikatora, međutim, ovi tradicionalni fekalni markeri mogu biti nepouzdati i mogu potceniti zdravstveni rizik, čak i kada ispunjavaju regulatorne standarde. Hemijski markeri, poput sterola, široko se koriste za praćenje fekalne kontaminacije životne sredine, podržavajući i dopunjujući konvencionalne indikatore zagađenja. Pored koncentracije koprostanola, upotrebom odnosa sterola moguće je odrediti nivo fekalne kontaminacije i razlikovati zagađenje poreklom od čoveka od biogenog unosa poreklom od viših biljaka ili životinja.

U ovom radu opisan je razvoj i optimizacija analitičke metode za istovremenu ekstrakciju, određivanje i pouzdanu potvrdu dvadeset steroida različitih klasa (humani/životinjski i biljni steroli, prirodni i sintetski steroidni hormoni) u rečnim i otpadnim vodama, kao i u suspendovanom materijalu vodenih uzoraka. Uzorci vode su pripremljeni ekstrakcijom na čvrstoj fazi, a suspendovani materijal ultrazvučnoj ekstrakcijom. Dobijeni ekstrakti su analizirani metodom tečne hromatografije sa tandem masenom spektrometrijom, uz korišćenje linearnog jonskog trapa kao masenog analizatora. Razvijena je instrumentalna metoda za potpuno hromatografsko razdvajanje svih analita, a posebno onih sa identičnim reakcijama fragmentacije, zasnovana na upotrebi C8 kolone i acetonitrila kao organskog rastvarača u mobilnoj fazi. Optimizovana metoda je obezbedila visoke prinose analita sa relativnim standardnim devijacijama generalno manjim od 20%. Postignute su niske granice detekcije i kvantifikacije. Metoda je pokazala dobru linearnost u opsegu ispitivanih koncentracija.

Rasprostranjenost steroidnih jedinjenja u životnoj sredini i nivo fekalnog zagađenja procenjeni su u oblasti ušća reka Dunava i Save u Beogradu, u kome se sirova komunalna otpadna voda ispušta u vodotokove bez tretmana. Posebna pažnja je posvećena raspodeli steroida između rastvorne i suspendovane faze uzoraka rečnih i otpadnih voda, s obzirom na afinitet sterola da se vezuju za suspendovane čestice. Takođe je procenjena efikasnost uklanjanja steroidnih jedinjenja u dva postrojenja za prečišćavanje otpadnih voda u Srbiji. Humani/životinjski steroli koprostanol i holesterol, kao i fitosterol β -sitosterol bili su dominantna jedinjenja u svim uzorcima vode. Zastupljenost sterola i raspodela između faza u rečnoj vodi bili su drugačiji od onih u sirovoj otpadnoj vodi, što ukazuje na izraženiji biogeni unos poreklom od viših biljaka, kao i veći uticaj otpadnih voda na sastav suspendovane faze. Utvrđena je izražena kontaminacija istraživanog područja, pri čemu je Dunav više zagađen ispuštanjem netretiranih otpadnih voda od Save zbog različitih hidrodinamičkih uslova koji dovode do značajno viših nivoa sterola u suspendovanim česticama. Takođe je pokazano da se svi detektovani humani/životinjski steroli i fitosteroli dominantno vezuju za čestice suspendovanog materijala uzoraka rečne i otpadne vode, u poređenju sa rastvornom fazom. Naglašena je potreba da se u praćenju zagađenja životne sredine steroidnim jedinjenjima uzmu u obzir i analiziraju i rastvorna i suspendovana faza kako bi se dobila realna slika o kontaminaciji steroidima i njihovoj sudbini u vodenoj sredini. Konačno, utvrđena je visoka stopa uklanjanja sterola u postojenjima za tretman otpadnih voda (> 98% za koprostanol i holesterol), kao i da je od izračunatih odnosa sterola samo koprostanol/(koprostanol + holestanol) dovoljno osetljiv da na njega utiče poboljšanje kvaliteta prečišćene otpadne vode.

Sažetak

Ključne reči: steroidna jedinjenja, steroli, steroidni hormoni, rečna voda, otpadna voda, postrojenja za prečišćavanje otpadnih voda, suspendovana materija, tečna hromatografija-tandem masena spektrometrija, odnosi sterola, fekalna kontaminacija.

Naučna oblast: Hemijske nauke

Uža naučna oblast: Analitička hemija i Hemija životne sredine

DEVELOPMENT AND APPLICATION OF THE METHOD OF ANALYSIS OF SELECTED STEROLS AND STEROID HORMONES IN NATURAL AND WASTEWATERS BY LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH TANDEM MASS SPECTROMETRY

Abstract

The presence of steroid compounds in natural waters and wastewater and their harmful effects on the aquatic ecosystem have been recognized by the scientific community for several decades. Ecotoxicity research of these emerging contaminants has shown that trace amounts in the aquatic environment can cause various adverse effects on aquatic organisms. Sterols and steroid hormones have been extensively investigated in various environmental matrices, and it has been shown that some of them are natural constituents of the investigated matrices, but they enter the environment in large quantities via untreated wastewater from households, industry and agriculture. Methods for assessing environmental pollution with municipal wastewater in routine monitoring involve the use of bacterial indicators, however, these traditional fecal markers can be unreliable and may underestimate the health risk, even when they meet regulatory standards. Chemical markers, such as sterols, are widely used to monitor fecal contamination of the environment, supporting and complementing conventional pollution indicators. In addition to the concentration of coprostanol, by using the sterol ratios it is possible to determine the level of fecal contamination and to distinguish between anthropogenic pollution and biogenic input from higher plants or animals.

This paper describes the development and optimization of an analytical method for the simultaneous extraction, determination and reliable confirmation of twenty steroids of different classes (human/animal and plant sterols, natural and synthetic steroid hormones) in river water and wastewater, as well as in suspended material of water samples. Water samples were prepared by solid-phase extraction, and suspended material by ultrasonic extraction. The obtained extracts were analyzed by liquid chromatography with tandem mass spectrometry, using a linear ion trap as a mass analyzer. An instrumental method was developed for the complete chromatographic separation of all analytes, especially those with identical fragmentation reactions, based on the use of a C8 column and acetonitrile as an organic solvent in the mobile phase. The optimized method provided high analyte recoveries with relative standard deviations generally lower than 20%. Low limits of detection and quantification were achieved. The method showed good linearity in the range of tested concentrations.

The distribution of steroid compounds in the environment and the level of fecal pollution were assessed in the confluence area of the Danube and the Sava rivers in Belgrade, where raw municipal wastewater is discharged into waterways without treatment. Special attention was paid to the distribution of steroids between the dissolved and suspended phases of river and wastewater samples, considering the affinity of sterols to bind to suspended particles. The efficiency of steroid removal in two wastewater treatment plants in Serbia was also evaluated. The human/animal sterols coprostanol and cholesterol as well as the phytosterol β -sitosterol were the dominant compounds in all water samples. The pattern of sterols and the distribution between phases in river water were different from those in raw wastewater, which indicates a more pronounced biogenic input originating from higher plants, as well as a greater influence of wastewater on the composition of the suspended phase. Extensive contamination of the investigated area was determined, whereby the Danube is more polluted by the discharge of untreated wastewater than the Sava due to different hydrodynamic conditions that lead to significantly higher levels of sterols in suspended particles. It was also shown that all detected human/animal sterols and phytosterols bind dominantly to suspended particles of river and wastewater samples, compared to the dissolved phase. The need to consider and analyze both the dissolved and suspended phases in the monitoring of environmental pollution with steroid compounds was emphasized in order to obtain a realistic picture of steroid contamination and their fate in the aquatic environment. Finally, a high removal rate of sterols in wastewater treatment was determined (> 98% for coprostanol and cholesterol), as well as that of the calculated sterol ratios,

Abstract

only coprostanol/(coprostanol + cholestanol) is sensitive enough to be affected by the improvement of the quality of treated wastewater.

Keywords: steroid compounds, sterols, steroid hormones, river water, wastewater, wastewater treatment plants, suspended material, liquid chromatography-tandem mass spectrometry, sterol ratios, fecal contamination.

Scientific field: Chemical sciences

Scientific subfield: Analytical Chemistry and Environmental Chemistry

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DEO	3
2.1. Steroidna jedinjenja - osnovni pojmovi i podela.....	3
2.2. Putevi dospevanja steroidnih jedinjenja u životnu sredinu	5
2.3. Transformacije steroidnih jedinjenja i postojanost u životnoj sredini	6
2.4. Prisustvo steroidnih jedinjenja u prirodnim i otpadnim vodama	8
2.5. Zakonska regulativa o steroidnim jedinjenjima u svetu i Republici Srbiji	21
2.6. Uklanjanje steroidnih jedinjenja u postrojenjima za prečišćavanje otpadnih voda.....	22
2.7. Negativni efekti prisustva steroidnih jedinjenja u životnoj sredini.....	23
2.8. Steroli kao hemijski markeri izvora zagađenja	23
2.9. Steroli i steroidni hormoni odabrani za analizu u prirodnim i otpadnim vodama.....	28
2.10. Priprema uzoraka vode za određivanje tragova steroidnih jedinjenja	30
2.11. Ekstrakcija suspendovanog materijala uzoraka vode za određivanje tragova steroidnih jedinjenja	33
2.12. Instrumentalne metode za analizu tragova steroidnih jedinjenja.....	34
2.12.1. Tečna hromatografija visokih performansi	35
2.12.2. Masena spektrometrija	36
2.12.2.1. Tehnike jonizacije	36
2.12.2.2. Maseni analizatori	38
2.12.2.3. Tandem masena spektrometrija	40
3. EKSPERIMENTALNI DEO	41
3.1. Priprema rastvora odabranih steroidnih jedinjenja i korišćeni reagensi.....	41
3.2. Snimanje masenih spektara steroidnih jedinjenja	44
3.3. Optimizacija hromatografskog razdvajanja steroidnih jedinjenja.....	44
3.4. Optimizacija LC-MS/MS parametara	45
3.5. Priprema uzoraka.....	45
3.5.1. Optimizacija ekstrakcije na čvrstoj fazi uzoraka vode.....	45
3.5.1.1. Izbor sorbenta	45
3.5.1.2. Izbor pH vrednosti uzoraka	47
3.5.1.3. Izbor eluenta	47
3.5.1.4. Izbor zapremine uzoraka	47
3.5.1.5. Izbor zapremine eluenta	47
3.5.2. Ultrazvučna ekstrakcija suspendovanog materijala	47
3.6. Kalibracija	48
3.7. Validacija metode.....	48

Sadržaj

3.8. Uzimanje uzoraka površinskih i otpadnih voda	49
3.8.1. Uzorkovanje površinskih voda.....	49
3.8.2. Uzorkovanje komunalnih otpadnih voda	51
3.8.3. Uzorkovanje otpadnih voda iz postrojenja za prečišćavanje	52
4. REZULTATI I DISKUSIJA.....	54
4.1. Maseni spektri odabranih steroidnih jedinjenja.....	54
4.2. Optimizacija LC-MS/MS parametara	57
4.3. Optimizacija ekstrakcije na čvrstoj fazi uzoraka vode.....	59
4.3.1. Izbor sorbenta.....	60
4.3.2. Izbor pH vrednosti uzoraka.....	62
4.3.3. Izbor eluenta.....	63
4.3.4. Izbor zapremine uzoraka	64
4.3.5. Izbor zapremine eluenta	65
4.4. Validacija metode.....	66
4.5. Analiza uzoraka površinskih voda	68
4.6. Analiza uzoraka komunalnih otpadnih voda	70
4.7. Potvrda prisustva analita	73
4.8. Rasprostranjenost sterola u rečnoj vodi i odnosi sterola	74
4.9. Steroli detektovani u PPOV i efikasnost njihovog uklanjanja	78
5. ZAKLJUČAK.....	82
LITERATURA.....	85
PRILOG	97
OBJAVLJENI NAUČNI RADOVI IZ DOKTORSKE DISERTACIJE	103
BIOGRAFIJA AUTORA.....	104

1. UVOD

Savremen način života podrazumeva upotrebu proizvoda nastalih sintezom novih hemijskih supstanci i razvojem novih tehnologija. Svakodnevnom upotrebom ovih proizvoda veliki deo supstanci putem otpadnih voda dospeva u prirodne vodotokove. Praćenje sudbine aktivnih supstanci, njihovih metabolita i transformacionih proizvoda u životnoj sredini, kao i određivanje toksičnosti prema živom svetu, jedan je od najvećih izazova naučnika koji se bave zaštitom životne sredine. Unapređivanjem postojećih i razvojem novih analitičkih metoda za detektovanje zagađujućih supstanci u kompleksnim matricama omogućeno je praćenje jedinjenja prisutnih u izuzetno niskim koncentracijama, reda veličine ng L^{-1} . Mnoge od ovih supstanci ranije nije bilo moguće detektovati zbog nedovoljno osetljivih analitičkih metoda koje su bile na raspolaganju. Nazvane su emergentnim zagađujućim supstancama (*eng.* emerging pollutants), a zbog ograničenih podataka o njihovoj sudbini u životnoj sredini i ekotoksičnom uticaju, nisu uključene u redovne monitoring programe.

Steroidna jedinjenja, steroli i steroidni hormoni, su emergentne zagađujuće supstance koje imaju kako prirodno, tako i sintetsko poreklo. Najvažniji put dospevanja ovih supstanci u prirodni ekosistem je putem ispuštanja otpadnih voda, komunalnih i sa farmi životinja, ali i spiranjem poljoprivrednog zemljišta, deponija čvrstog otpada i dr. Iako se steroidna jedinjenja mogu delimično ukloniti tretmanom otpadnih voda u postrojenjima za prečišćavanje, u Republici Srbiji ova postrojenja su malobrojna i često funkcionišu sa smanjenom efikasnošću. Prečišćene otpadne vode i aktivni mulj iz postrojenja nekad se koriste za navodnjavanje i đubrenje poljoprivrednog zemljišta, što je još jedan način dospevanja ovih jedinjenja u prirodnu sredinu.

Postoji opravdana sumnja da steroli i steroidni hormoni prisutni u životnoj sredini predstavljaju rizik po živi svet u vodi. Najčešći neželjeni efekti su akutna i hronična toksičnost prema vodenim organizmima, gubitak staništa i biodiverziteta, ali i uticaj na reproduktivne, endokrine i metaboličke poremećaje kod vodenih životinja.

Humani/životinjski steroli proizvode se u digestivnom traktu ljudi i životinja, a javljaju se u vidu metaboličkog fekalnog otpada. Koriste se kao indikatori fekalne kontaminacije u prirodnoj sredini i kao alternativa mikrobiološkim pokazateljima fekalnog zagađenja. Današnje široko primenjive mikrobiološke metode za procenu kvaliteta vode (koliformne i *Enterococcus* bakterije) ne ispunjavaju u potpunosti zahteve potrebne za efikasno i pouzdano bavljenje ovim problemom. U svetu su i hemijski markeri humanog zagađenja našli svoju primenu, kao dopuna tradicionalnim indikatorima. Pored sterola, često se kao hemijski markeri zagađenja koriste veštački zaslađivači, kofein, farmaceutski proizvodi i proizvodi za ličnu negu. Određivanjem koncentracija sterola u vodenom ekosistemu i njihovih odnosa, moguće je dokazati da li postoji humano zagađenje, a odnosi sterola mogu i razlikovati poreklo zagađenja.

Pregled studija o praćenju fekalnog zagađenja prirodnih voda korišćenjem steroidnih jedinjenja pokazuje da većina detaljno istražuje rastvornu fazu uzoraka vode, dok samo nekolicina razmatra i suspendovanu fazu (Wang *et al.*, 2010; András *et al.*, 2013; Zali *et al.*, 2021). Suspendovana materija je sastavni deo uzorka vode, a analiza zagađujućih supstanci vezanih za suspendovane čestice doprinosi sveobuhvatnoj proceni kvaliteta vode. Pošto mnogi steroidi ispoljavaju hidrofobna svojstva i imaju tendenciju da se lako vezuju za suspendovane čestice, ispitivanje i rastvorne i suspendovane faze je od suštinskog značaja za potpuni pregled obima fekalnog zagađenja vode. Analiza suspendovane faze pruža informacije o nedavnom unosu zagađujućih materija, dok analiza sedimenata pruža informacije o hroničnoj kontaminaciji i može ukazati na žarišta i mesta konačnog taloženja otpadnih čestica (Cabral i Martins, 2018).

Steroli i prirodni i sintetski steroidni hormoni spadaju u grupu steroidnih jedinjenja i imaju iste puteve dospevanja u životnu sredinu. Otuda je i nastala potreba da budu simultano analizirani, kako u rastvornoj fazi uzoraka vode, tako i u suspendovanoj. Malobrojni su radovi koji se bave monitoringom ovih supstanci istovremeno, a većina kao tehniku određivanja koristi gasnu hromatografiju u sprezi sa masenom spektrometrijom. Uzimajući u obzir to da su ova jedinjenja

Uvod

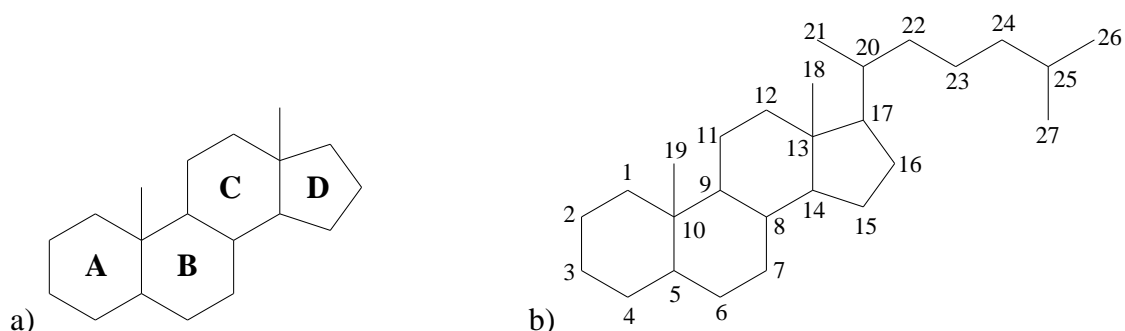
uglavnom termički labilna i teško isparljiva, postupkom derivatizacije se prevode u oblik pogodan za ovaj tip analize. Taj dodatni korak u pripremi uzoraka poskupljuje i produžava analizu, te je razumna potreba za tehnikom koja će biti jednostavna, efikasna i ekonomična. Takva tehnika je tečna hromatografija u sprezi sa masenom spektrometrijom koja predstavlja dobar izbor za određivanje sterola i steroidnih hormona u vodenoj matrici, tj. uzorcima prirodnih voda, kao i otpadnih voda kompleksne matrice.

Ova doktorska disertacija se bavi razvojem, optimizacijom i primenom multirezidualne metode za detekciju dvadeset steroidnih jedinjenja u različitim matricama vodenog ekosistema. Humani/životinjski i biljni steroli i steroidni hormoni odabrani za analizu su određeni metodom tečne hromatografije u sprezi sa masenom spektrometrijom. Koncentracije ovih jedinjenja su određivane u površinskoj vodi, komunalnoj otpadnoj vodi i otpadnoj vodi na ulazu i izlazu iz postrojenja za prečišćavanje, i u rastvornoj i u suspendovanoj fazi uzoraka. Razvijene su i optimizovane metode za pripremu uzoraka, kao i instrumentalna metoda tečne hromatografije u sprezi sa tandem masenom spektrometrijom. Najveći izazov predstavljalo je razlikovanje i hromatografsko razdvajanje izomernih supstanci sa identičnim molarnim masama i reakcijama identifikacije i potvrde prisustva. Nakon validacije, metoda je primenjena na velikom broju uzoraka i dobijeni su podaci o prisustvu ovih jedinjenja u vodenoj sredini u našoj zemlji, posebno reka Dunava i Save na širem području Beograda, kao najvećeg grada u kome ne postoji postrojenje za prečišćavanje komunalnih otpadnih voda. Posebna pažnja je posvećena uticaju direktnog izlivanja kanala otpadnih voda na sadržaj steroida u rečnoj vodi, kao i daljoj raspodeli steroidnih jedinjenja između rastvorne i suspendovane faze uzoraka vode. Preračunati su i odnosi sterola za sve ispitivane uzorke i matrice u cilju identifikacije fekalnog zagađenja, a odabrani su i oni koji su dovoljno osetljivi da se mogu primeniti kao indikatori poboljšanja kvaliteta prečišćenih voda.

2. TEORIJSKI DEO

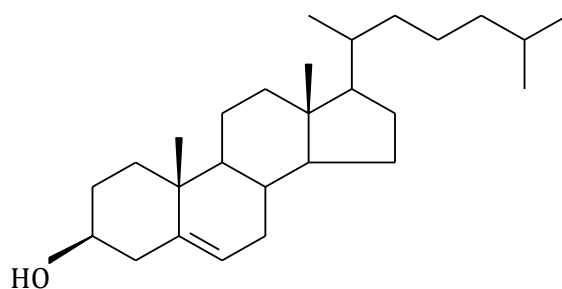
2.1. Steroidna jedinjenja - osnovni pojmovi i podela

Steroidna jedinjenja predstavljaju grupu biološki aktivnih organskih supstanci sa specifičnom molekulskom strukturom. Za ova jedinjenja karakteristična je struktura koju čine četiri cikloalkanska prstena - tri cikloheksanska i jedan ciklopentanski prsten (slika 2.1a). Numeracija ugljenikovih atoma vrši se na način prikazan na slici 2.1b. Različite funkcionalne grupe se vezuju na karakteristična mesta u strukturi, poput metil grupa koje se najčešće nalaze na C-10 i C-13 atomima, kao i alkilnog bočnog lanca na C-17 atomu, što povećava broj i raznolikost steroidnih jedinjenja i njihovih bioloških funkcija (Moss, 1989).



Slika 2.1. Karakteristična struktura steroida sa oznakama prstena (a) i numeracija ugljenikovih atoma u strukturi na primeru holestana (b)

Steroidi kod kojih se na C-3 atomu nalazi hidroksilna grupa i koji imaju veći deo strukture holestana nazivaju se steroli (holesterol, slika 2.2). Predstavljaju podgrupu steroidnih jedinjenja koja se prirodno nalazi u većini eukariotskih organizama, kao što su životinje, biljke i gljive, a mogu da ih proizvedu i neke bakterije (Whei *et al.*, 2016). Steroli biljnog porekla zovu se biljni ili fitosteroli (*eng.* phytosterols), životinjskog porekla zoosteroli (*eng.* zoosterols ili animal sterols), a steroli koji nastaju kao produkti humanog metabolizma nazivamo humanim sterolima.



Slika 2.2. Hemijska struktura holesterola

Humani steroli najčešće su prepoznati po najviše istraživanom sterolu - koprostanolu. Kao najzastupljeniji sterol humanog fekalnog otpada, jedan je od glavnih indikatora humanog zagađenja (Murtaugh i Bunch, 1967). Koprostanol čini oko 60% ukupnih sterola u humanom metaboličkom otpadu (Leeming *et al.*, 1996), a dnevno ljudski organizam izluči između 200 i 700 mg ovog sterola čineći ga dominantnom organskom supstancom u komunalnim otpadnim vodama (Daughton, 2012). Kada se u uzorcima iz životne sredine detektuje 5–6% koprostanola u odnosu na ukupne sterole,

smatra se da je zagađenje humanog porekla (Devane *et al.*, 2006). Pored koprostanola, u grupu humanih sterola spadaju: epikoprostanol, epiholestanol, holestanon, holestanol i drugi. S obzirom na to da se navedeni steroli nalaze i u životinjskom otpadu, u različitoj količini u odnosu na humani fekalni materijal, najčešće se razmatraju kao humani/životinjski steroli.

Biomedicinski značaj holesterola, kao najvažnijeg humanog/životinjskog sterola, je taj što predstavlja osnovni sterol u ljudskom organizmu. Glavni je konstituent ćelijske membrane i ima funkciju prekursora polnih hormona, kortikalnih hormona, vitamina D i žučne kiseline. Holesterol se u organizmu biosintetiše iz acetil koenzima A, kao i masne kiseline. U svakodnevnoj ishrani, nalazi se u namirnicama životinjskog porekla, poput žumanca jajeta, mesa, iznutrica, itd. Holesterol poseduje jedinstveno amfifilno svojstvo, ponaša se i hidrofilno i lipofilno zbog svoje karakteristične strukture sa nepolarnim i polarnim delovima. Amfifilnost mu omogućuje da ima strukturnu ulogu u ćelijskoj membrani, ali i u spoljašnjem sloju lipoproteina. Najpoznatiji derivat holesterola je 7-dehidroholesterol. Kada se ljudska koža izloži sunčevim zracima, do 65% 7-dehidroholesterol se konvertuje u previtamin D₃, koji se skladišti u epidermalnom sloju kože, a zatim transformiše u holekalciferol (vitamin D₃) (MacLaughlin *et al.*, 1982). Vitamin D i njegovi sterolni prekursori se formiraju i u biljkama (Jäpelt *et al.*, 2011).

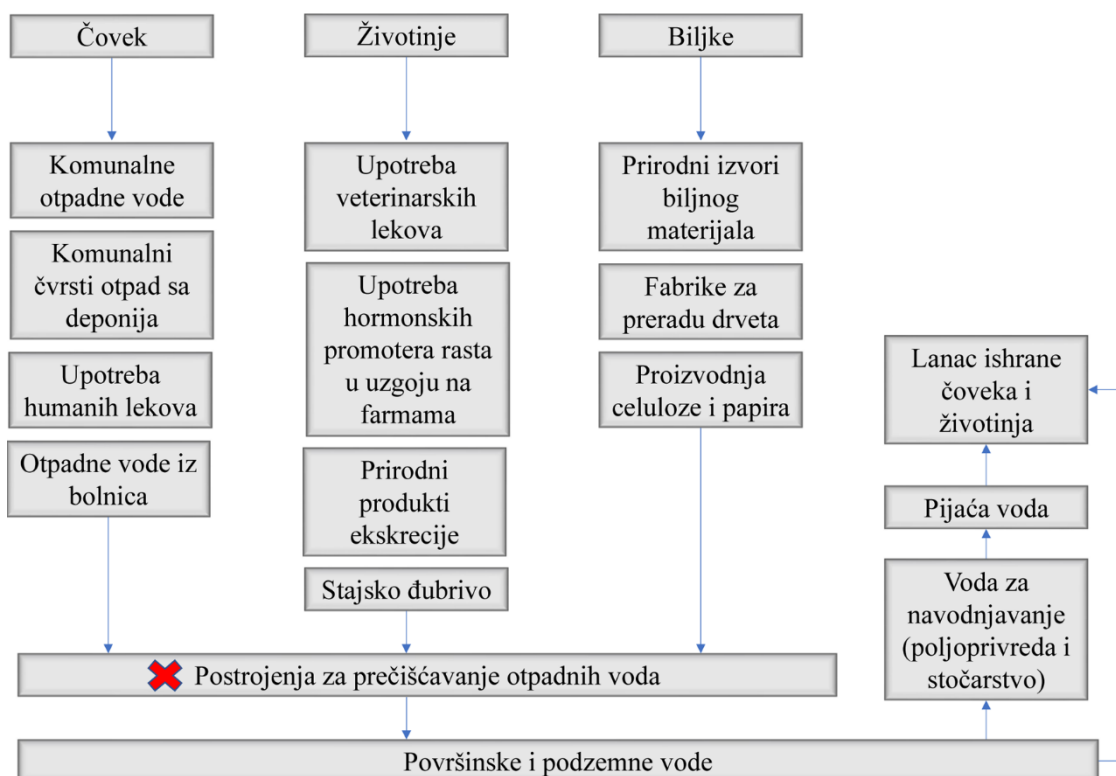
Biljni steroli nastaju u biljkama i predstavljaju strukturne analoge holesterolu, sa istim funkcijama u biljkama kao što holesterol ima u životinjskom organizmu, a najvažnija je regulacija fluidnosti ćelijske membrane (Brufau *et al.*, 2008). Biljni steroli i holesterol imaju važnu ulogu u adaptaciji biljaka na stres izazvan promenama u životnoj sredini (Kuiper, 2006). Iako su strukturno veoma slični holesterolu (steroidno jezgro i hidroksilna grupa na C-3 atomu), biljni steroli se razlikuju po stepenu zasićenosti hemijskih veza i konfiguracije sporednog lanca na C-24 atomu. Postoji više od 250 različitih biljnih sterola, od kojih su tri najzastupljenija: β -sitosterol, kampesterol i stigmasterol. Biljni steroli se mogu naći u hrani biljnog porekla, kao što su: voće, povrće, orašasti proizvodi, semenke, mahunarke i žitarice (Clifton, 2002; Lu *et al.*, 2007). Najveću koncentraciju biljnih sterola imaju biljna ulja, kao npr. kukuruzno ulje (800–1500 mg/100 g), palmino ulje (70–100 mg/100 g) (Piironen *et al.*, 2000; Phillips *et al.*, 2005), maslinovo ulje (Martínez-Vidal *et al.*, 2007) i ulje od repice (887 mg/100 g, Schwartz *et al.*, 2008). Zbog izuzetnog hipoholesterolemijskog delovanja pogodni su kao dodaci u ishrani, a njihovom upotrebom se značajno smanjuju rizici od kardiovaskularnih oboljenja (Marangoni i Poli, 2010). Takođe, *in vitro* testovi pokazali su protivupalni, antibakterijski, antigljivični, antiulcerativni i antitumorni kapacitet ekstrakata makroalgi bogatih fitosterolima (Lopes *et al.*, 2013), a određeni biljni lekovi imaju snažno diuretsko i antibakterijsko delovanje (Zhao *et al.*, 2009).

Pored sterola, steroidnim jedinjenjima pripadaju i steroidni hormoni. Prema strukturnim karakteristikama steroidni hormoni kod kičmenjaka se mogu podeliti u pet grupa (Liu *et al.*, 2009): androgeni, estrogeni, progestogeni (ili gestageni), glukokortikoidi i mineralokortikoidi. Androgeni hormoni se prirodno sintetišu u nadbubrežnim žlezdama, testisima i jajnicima, a najčešće se pominju kao muški polni hormoni. Zaduženi su za razvoj muških polnih karakteristika, iako ih u malim količinama ima i u ženskom organizmu. Veštački (sintetski) analozi ovih jedinjenja se koriste u veterinarskoj i humanoj medicini. Od prirodnih androgenih hormona najpoznatiji su testosteron, androsteron i dihidrotosteron, a od sintetskih metiltosteron (Liu *et al.*, 2009). Estrogeni hormoni su ključni za razvoj ženskog reproduktivnog sistema i regulaciju ženskih polnih obeležja. Tipično se nazivaju ženskim polnim hormonima, iako su prisutni i u muškom organizmu. Najpoznatiji prirodni estrogeni su estron (E1), 17 β -estradiol (E2) i estriol (E3), a sintetski - 17 α -etinilestradiol (EE2) (Liu *et al.*, 2009). Estrogeni (poput EE2) i progestogeni (kao što je levonorgestrel) se najčešće koriste u medicinske svrhe, npr. za kontracepciju, lečenje raka prostate i dojke, kao i lečenje neplodnosti (Matějček i Kubáň, 2007). Promoteri rasta na bazi 17 α -estradiola i njegovih metabolita veoma se koriste u stočarstvu, a njihova ekološka sudbina pokazuje veliki potencijal za endokrine poremećaje kod životinja u vodenom ekosistemu (Blackwell *et al.*, 2014). Takođe, imaju negativan uticaj na plodnost i preživljavanje slatkovodnih vrsta riba (Robinson *et al.*, 2017). Progestogeni hormoni su zaduženi za održavanje menstrualnog ciklusa žena i za održavanje trudnoće. Progesteron je prirodni hormon, dok su najpoznatiji sintetski predstavnici levonorgestrel i noretindron (Liu *et al.*, 2011b).

Glukokortikoidi i mineralkortikoidi se najčešće pominju kao grupa jedinjenja - kortikosteroidi. Glukokortikoidi nastaju u nadbubrežnoj žlezdi i imaju ulogu u kontroli metabolizma glukoze. Predstavljaju deo mehanizma koji daje povratne informacije imunom sistemu, što dovodi do smanjenja imunskog odgovora, kao što su upalni procesi. U medicini se koriste za lečenje bolesti uzrokovanih preaktivnim imunološkim sistemom, poput alergije, astme, autoimunih bolesti i dr. Kortizol i kortizon su prirodni glukokortikoidi, a najpoznatiji sintetski su prednizon, deksametazon, beklometazon i triamcinolon (Schoech *et al.*, 2009; Kugathas i Sumpter, 2011). Mineralkortikoidi prirodno nastaju u kori nadbubrežne žlezde, a najpoznatiji predstavnik je aldosteron. Njihova najvažnija funkcija je regulacija balansa soli i vode u organizmu. Sintetski predstavnici su spironolakton i fludrokortizon (Runnalls *et al.*, 2010). U novije vreme, posebno su postali interesantni anaboličko-androgeni steroidi, kao najčešće farmakološke supstance detektovane u doping kontroli sportista. Ove supstance profesionalni sportisti upotrebljavaju kako bi poboljšali performanse, iako je njihova upotreba veoma rizična (Becue *et al.*, 2010).

2.2. Putevi dospevanja steroidnih jedinjenja u životnu sredinu

Steroidna jedinjenja dospevaju u životnu sredinu kao posledica antropogenog uticaja, ali i prirodnim putem iz biljnog sveta i metaboličkog otpada divljih životinja. Međutim, na životnu sredinu, njenu obnovljivost i samoodrživost, najveći uticaj ima čovek. Urbanizacija, industrijalizacija i poljoprivreda najvažnije su tekovine modernog čoveka, iako se njihovi negativni uticaji na prirodne resurse često ne stavljaju u fokus istraživanja. Najvažniji putevi dospevanja steroidnih jedinjenja u životnu sredinu i prirodne vodotokove predstavljeni su na slici 2.3.



Slika 2.3. Putevi dospevanja steroidnih jedinjenja u prirodu i lanac ishrane

Najzastupljeniji put dospevanja steroida u prirodu je kontinualno ispuštanje komunalnih otpadnih voda, sa ili bez prečišćavanja, u rečne tokove. U Republici Srbiji postoji svega 42 postrojenja za prečišćavanje otpadnih voda, od kojih manji broj radi po projektnim kriterijumima, dok većina radi sa efikasnošću daleko ispod projektovane (Agencija za zaštitu životne sredine, 2019). Domaćinstva koja su povezana na gradsku kanalizaciju čine dve trećine od ukupnog broja domaćinstava, dok preostala poseduju septičke jame ili direktno ispuštaju otpadne vode u manje vodotokove. Samo 18% komunalnih otpadnih voda se tretira pre otpuštanja, a najčešći tip tretmana je sekundarni (66%), zatim tercijerni (27%) i konačno primarni tretman (7%) (Republički zavod za statistiku, 2020, 2021). Beograd kao glavni i najveći grad u Republici Srbiji nema postrojenje za tretman otpadnih voda. Ovaj put dospevanja mnogih zagađujućih materija u životnu sredinu je poguban po vodeni ekosistem i nedvosmisleno umanjuje prirodni kapacitet samoodrživosti životne sredine.

Komunalne otpadne vode su izvor zagađenja humanim/životinjskim sterolima, produktima metabolizma čoveka i životinja, a najzastupljeniji u prirodi su holesterol i koprostanol. Visoke koncentracije ova dva sterola detektovane su u površinskim vodama (Škrbić *et al.*, 2018), efluentima iz PPOV (Furtula *et al.*, 2012; András *et al.*, 2013; Reichwaldt *et al.*, 2017) i procednim vodama deponija čvrstog otpada (Zhang *et al.*, 2008; Masoner *et al.*, 2016).

Iako su biljni steroli prirodno prisutni u životnoj sredini, veće koncentracije u vodotokovima se povezuju sa svakodnevnom ishranom čoveka i životinja (biljna ulja, žitarice, voće i povrće) (Phillips *et al.*, 2005) i upotrebom suplemenata prilikom lečenja kardiovaskularnih oboljenja (Clifton, 2002). Otpadne vode iz procesa prerade drveta i proizvodnje celuloze i papira takođe se smatraju značajnim putem dospevanja fitosterola u okolinu (Mahmood-Khan i Hall, 2003), a u najvećoj koncentraciji se najčešće nalazi β -sitosterol (Orrego *et al.*, 2010).

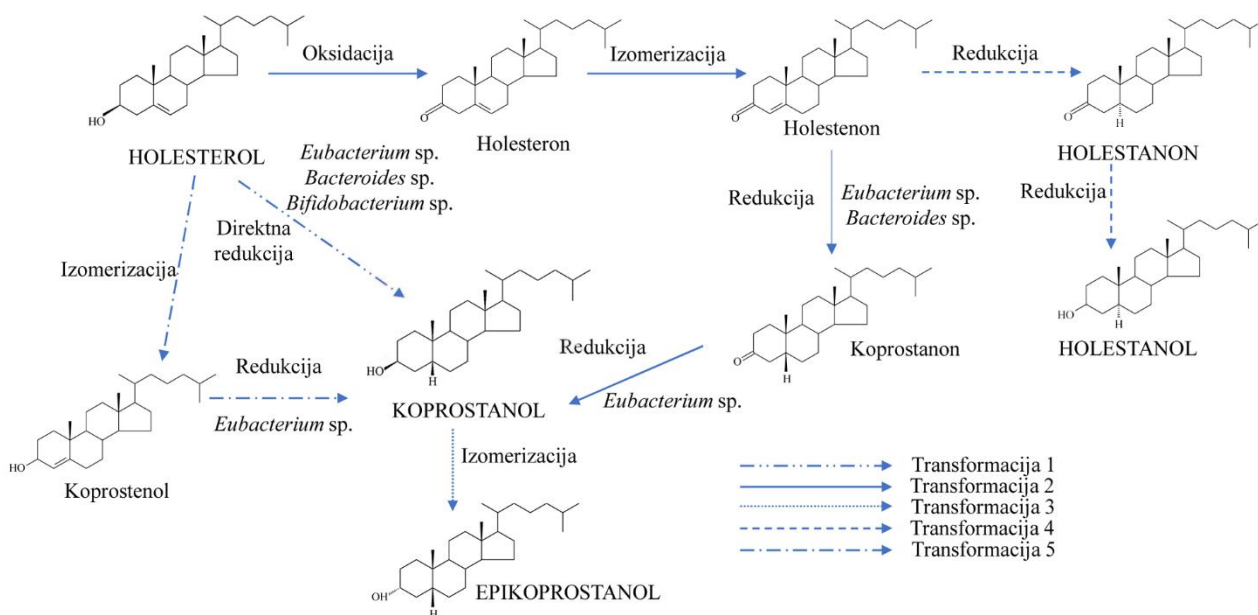
Istim putem kao i steroli, u životnu sredinu dospevaju i steroidni hormoni, koji imaju veliku primenu u humanoj medicini, ali se i prirodno izlučuju iz ljudskog organizma (Shore i Shemesh, 2003; Limpiyakorn *et al.*, 2011). Steroidni hormoni se koriste i u veterinarskoj medicini, pa su otpadne vode sa farmi, iz mlekararstva, kao i iz uzgajališta ribe, specifične po nalaženju estrogena 17α -estradiola i estrona, kao i androgenih hormona testosterona i androstenediona (Kolodziej *et al.*, 2004).

U nekim zemljama postoji praksa da se prečišćene otpadne vode iz postrojenja koriste za navodnjavanje poljoprivrednog zemljišta, a zaostali aktivni mulj kao đubrivo (Yang *et al.*, 2012; Gottschall *et al.*, 2013; Gray *et al.*, 2017). Dodatno, korišćenjem stajskog đubriva (Jardé *et al.*, 2007; Tyagi *et al.*, 2009), steroli i steroidni hormoni mogu dospeti u prirodno okruženje, a spiranjem poljoprivrednog zemljišta i u površinske i podzemne vode, i konačno - lanac ishrane (Fennell *et al.*, 2021).

2.3. Transformacije steroidnih jedinjenja i postojanost u životnoj sredini

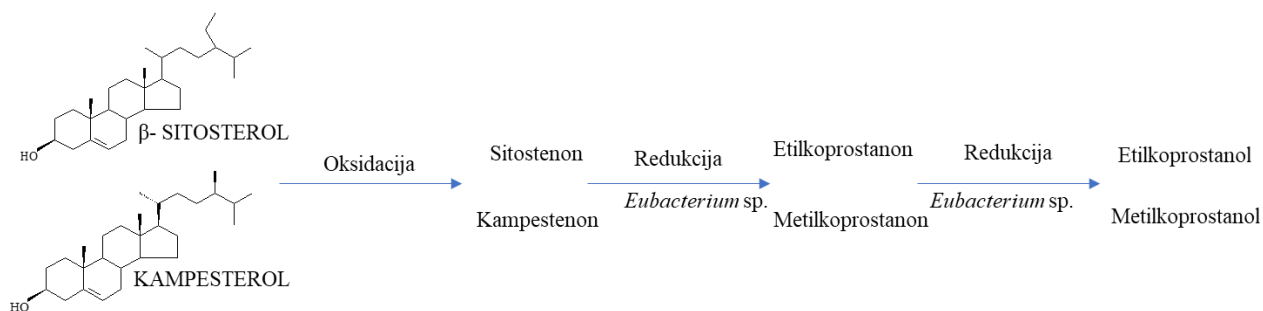
Steroidna jedinjenja se metabolišu u jetri čoveka i životinja, a transformacioni produkti se izlučuju kao metaboliti, konjugati, ali i kao nepromenjeni molekuli (Evgenidou *et al.*, 2015). Iako su za živi svet u prirodi najveći problem nepromenjeni, aktivni oblici steroida, njihovi metaboliti i drugi transformacioni proizvodi mogu potencijalno predstavljati još veću opasnost (Ojogoro *et al.*, 2021).

Pod uticajem mikrobiološke flore gastrointestinalnog trakta odigravaju se različite biotransformacije sterola. Najvažniji i najzastupljeniji sterol u metaboličkom otpadu je koprostanol, glavni produkt biotransformacije holesterola. Direktno formiranje koprostanola se odigrava redukcijom dvostruke veze holesterola (transformacija 1, slika 2.4). Moguća je i oksidacija holesterola do holesterona, koji izomerizuje u holestenon i dalje se redukuje do koprostanona i koprostanola (transformacija 2; Björkhem *et al.*, 1973). Koprostanol se u manjoj meri konvertuje u epikoprostanol (transformacija 3). Još jedan način redukcije holestenona je konverzija u holestanol (transformacija 4; Wong, 2014). Koprostanol je identifikovan kao izomer holesterola koji se redukcijom transformiše u koprostanol (transformacija 5; Mott *et al.*, 1980).



Slika 2.4. Putevi transformacije holesterola u koprostanol u gastrointestinalnom traktu

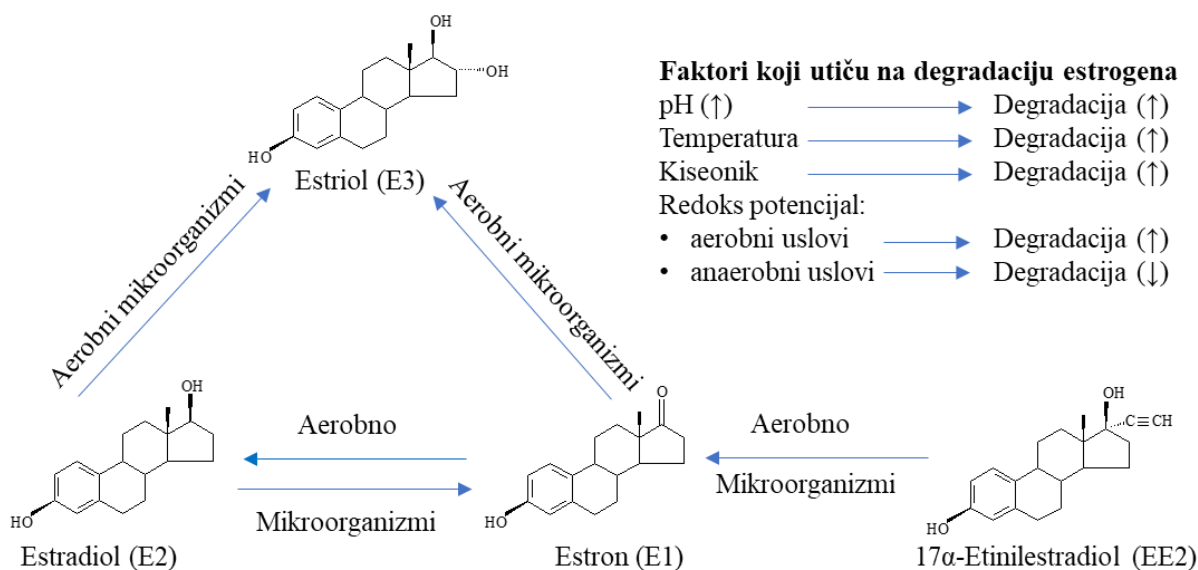
U gastrointestinalnom traktu transformišu se i fitosteroli, u biljne stenone i stanone, i konačno stanole. Tako se β -sitosterol i kampesterol biotransformišu u etil- i metilkoprostanon, a zatim i etil- i metilkoprostanol (slika 2.5; Wong, 2014).



Slika 2.5. Putevi transformacije β -sitosterola i kampesterola u gastrointestinalnom traktu

Nakon dospevanja u životnu sredinu, steroidna jedinjenja, kao i većina emergentnih zagađujućih materija, podležu procesima transformacije pod različitim uticajima, kao što su temperatura, ultraljubičasto zračenje (fotodegradacija), prisustvo mikroorganizama (biodegradacija), prisustvo/odsustvo kiseonika (oksidacija/redukcija) i mnogi drugi (Farré *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2019). U vodenoj sredini, koprostanol se brže razgrađuje od npr. naftnih ugljovodonika, polihlorovanih bifenila i policikličnih aromatičnih ugljovodonika, ali je veoma postojan kada se inkorporira u sedimente, u anoksičnim uslovima (Bartlett *et al.*, 1987). Fitosteroli, β -sitosterol i kampesterol, intenzivno se mikrobiološki degraduju u suspendovanom materijalu površinskih voda (Rontani *et al.*, 2014). Moguće su i različite aerobne i anaerobne mikrobiološke degradacije steroidnih estrogena i androgena u prirodi (Zhang *et al.*, 2016). Prirodni estrogeni E1, E2 i E3, kao i sintetski estrogen EE2, su međusobno povezani metaboličkim putevima, pa mikroorganizmi mogu da konvertuju jedan estrogen u drugi (Adeel *et al.*, 2017). Putevi konverzije estrogena u aerobnim uslovima prikazani su na slici 2.6. Postojanost estrogena u prirodi zavisi od dostupnosti kiseonika. Utvrđeno je da je u rečnoj

vodi, pod aerobnim uslovima, poluživot estrona i 17 β -estradiola tri, odnosno četiri dana (Adeel *et al.*, 2017). Takođe je pokazano da je moguća potpuna mikrobiološka degradacija norgestrela i više od 95% progesterona u roku od pet dana (Peng *et al.*, 2014). U poređenju sa prirodnim estrogenima, sintetski estrogen 17 α -etinilestradiol je mnogo otporniji na biorazgradnju (Pauwels *et al.*, 2008).



Slika 2.6. Putevi konverzije prirodnih i sintetskih estrogena i faktori koji utiču na degradaciju (Adeel *et al.*, 2017)

2.4. Prisustvo steroidnih jedinjenja u prirodnim i otpadnim vodama

U narednim tabelama prikazan je literaturni pregled najčešće analiziranih i detektovanih humanih/životinjskih sterola (tabela 2.1), biljnih sterola (tabela 2.2) i steroidnih hormona (tabela 2.3) u uzorcima različitih vodenih matrica. Navedene su metode pripreme uzoraka, koncentracije detektovanih sterola i steroidnih hormona, kao i metode instrumentalne analize.

Kada je reč o prisustvu sterola u životnoj sredini, koprostanol je kao najznačajniji hemijski indikator humanog fekalnog zagađenja bio predmet mnogih studija koje su pokazale da je veoma rasprostranjen u vodenoj sredini. U literaturi je zabeležen širok opseg koncentracija ovog sterola (tabela 2.1), a najveće koncentracije u rečnoj vodi su detektovane u Japanu (68 $\mu\text{g L}^{-1}$, Nakagawa *et al.*, 2019) i Australiji (11 $\mu\text{g L}^{-1}$, Hussain *et al.*, 2010; 30 $\mu\text{g L}^{-1}$, Sullivan *et al.*, 2010). Visoke koncentracije u prirodnim vodama se najčešće objašnjavaju velikim uticajem komunalnih otpadnih voda na vodene resurse, a zabeležene su izuzetno visoke koncentracije koprostanola u otpadnoj vodi na ulazu u postrojenje za prečišćavanje (914 $\mu\text{g L}^{-1}$, Furtula *et al.*, 2012). Smatra se i da su procedne vode deponija čvrstog otpada značajan izvor koprostanola u životnoj sredini zbog veoma visokih koncentracija (190 $\mu\text{g L}^{-1}$, Zhang *et al.*, 2008).

Slično koprostanolu, holesterol se u prirodnim vodama nalazi u širokom opsegu koncentracija, mada najčešće u nešto nižoj koncentraciji (tabela 2.1). Tako je u literaturi zabeležen najveći nivo holesterola od 11 $\mu\text{g L}^{-1}$ u rečnoj vodi u Vojvodini (Škrbić *et al.*, 2018). Često je detektovan u svakom analiziranom uzorku, što se može objasniti njegovim poreklom – prirodnim, terestrijalnim (Volkman, 1986), kao i antropogenim (Leeming *et al.*, 1996). Najvažniji antropogeni izvor holesterola su komunalne otpadne vode koje sadrže i do 1061 $\mu\text{g L}^{-1}$ ovog sterola na ulazu u PPOV (Furtula *et al.*, 2012). U poređenju sa rastvornim delom uzorka vode, suspendovani deo sadrži značajno veću količinu holesterola. Tako je u suspendovanoj frakciji rečne vode u Brazilu zabeležena koncentracija od 35 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Albuquerque de Assis Costa *et al.*, 2018). Analiza obe frakcije uzorka vode nije uobičajena, što se može videti iz pregleda literaturnih podataka u tabelama 2.1–2.3.

Tabela 2.1. Pregled detektovanih koncentracija humanih/životinjskih sterola u uzorcima voda i korišćenih metoda analize

Humani/životinjski sterol	Tip vodene matrice	Metoda ekstrakcije	Koncentracija, ng L ⁻¹		Metoda analize	Literatura
			Rastvorni deo	Suspendovani deo		
<i>Koprostanol</i>						
Rečna voda		SPE	ND-21	ND-0,49 ng g ⁻¹	GC-MS	Noblet <i>et al.</i> , 2004
		UZE, LLE	ND-79	ND-294	GC-MS	Standley <i>et al.</i> , 2000
		SPE	19-42	99-266	GC-MS/MS	Andrási <i>et al.</i> , 2013
		LLE	18-68340	–	GC-MS	Nakagawa <i>et al.</i> , 2019
		LLE	308-11327	–	GC-MS	Hussain <i>et al.</i> , 2010
		LLE	ND-30000	–	GC-MS	Sullivan <i>et al.</i> , 2010
		LLE	32-10210	–	GC-MS	Škrbić <i>et al.</i> , 2018
		LLE	9200	–	GC-FID	Gilli <i>et al.</i> , 2006
		SPE	33-4900	–	GC-MS	Kong <i>et al.</i> , 2015
		SPE	10-2717	–	GC-MS	Peng <i>et al.</i> , 2008
		LLE	470-1300	–	GC-MS	Kolpin <i>et al.</i> , 2004
		LLE	ND-1285	–	GC-MS	Devane <i>et al.</i> , 2006
		SPE	15-278	–	GC-MS	Wu <i>et al.</i> , 2009
		UZE	–	7-11513	GC-MS	Isobe <i>et al.</i> , 2002
		SE	–	10-5600	GC-MS	Cordeiro <i>et al.</i> , 2008
Koncentracija, µg L⁻¹						
Otpadna voda (ulazna u PPOV)		UZE	1,9-2,4	285-324	GC-MS	Isobe <i>et al.</i> , 2002
		SPE	37-46	22-488	GC-MS/MS	Andrási <i>et al.</i> , 2013
		LLE	394-914	–	GC-MS	Furtula <i>et al.</i> , 2012
		SPE	99	–	GC-MS	Jeanneau <i>et al.</i> , 2011
		LLE	37	–	GC-FID	Gilli <i>et al.</i> , 2006
		SPE	1,9-8,4	–	GC-HRMS	Fernandez <i>et al.</i> , 2007
Procedna voda deponija		SPE	176	–	GC-MS/MS	Masoner <i>et al.</i> , 2016
		SPE	5,5-190	–	GC-MS	Zhang <i>et al.</i> , 2008

Tabela 2.1. (nastavak)

Humani/životinjski sterol	Tip vodene matrice	Metoda ekstrakcije	Koncentracija, ng L ⁻¹		Metoda analize	Literatura
			Rastvorni deo	Suspendovani deo		
<i>Holesterol</i>						
Rečna voda		SPE	186–608	1,8-87 ng g ⁻¹	GC-MS	Noblet <i>et al.</i> , 2004
		UZE, LLE	ND–207	11–952	GC-MS	Standley <i>et al.</i> , 2000
		SPE	88–170	14–534	GC-MS/MS	Andrási <i>et al.</i> , 2013
		LLE	288–10500	–	GC-MS	Škrbić <i>et al.</i> , 2018
		LLE	1914–8775	–	GC-MS	Devane <i>et al.</i> , 2006
		LLE	ND–6500	–	GC-MS	Sullivan <i>et al.</i> , 2010
		SPE	1140–6380	–	GC-MS	Kong <i>et al.</i> , 2015
		LLE	1600–4300	–	GC-MS	Kolpin <i>et al.</i> , 2004
		LLE	205–1353	–	GC-MS	Hussain <i>et al.</i> , 2010
		SPE	431–1304	–	GC-MS/MS	Thomson <i>et al.</i> , 2021
		SPE	37–190	–	GC-MS	Wu <i>et al.</i> , 2009
		ASE	–	30–34800	GC-MS	Albuquerque de Assis Costa <i>et al.</i> , 2018
		UZE	–	395–15023	GC-MS	Isobe <i>et al.</i> , 2002
		SE	–	10–11000	GC-MS	Cordeiro <i>et al.</i> , 2008
Podzemna voda		SPE	504–1167	–	GC-MS/MS	Thomson <i>et al.</i> , 2021
Koncentracija, µg L⁻¹						
Otpadna voda (ulazna u PPOV)		UZE	9,9–18	551–762	GC-MS	Isobe <i>et al.</i> , 2002
		SPE	7,6–43	95–442	GC-MS/MS	Andrási <i>et al.</i> , 2013
		LLE	459–1061	–	GC-MS	Furtula <i>et al.</i> , 2012
		SPE	18–137	–	GC-HRMS	Fernandez <i>et al.</i> , 2007
		SPE	122	–	GC-MS	Jeanneau <i>et al.</i> , 2011
Procedna voda deponija		SPE	32	–	GC-MS/MS	Masoner <i>et al.</i> , 2016
		SPE	6,0–39	–	GC-MS	Zhang <i>et al.</i> , 2008

Tabela 2.1. (nastavak)

Humani/životinjski sterol	Tip vodene matrice	Metoda ekstrakcije	Koncentracija, ng L ⁻¹		Metoda analize	Literatura
			Rastvorni deo	Suspendovani deo		
<i>Epikoprostanol</i>						
Rečna voda		SPE	ND	ND–0,40 ng g ⁻¹	GC-MS	Noblet <i>et al.</i> , 2004
		UZE, LLE	ND–5	ND–44	GC-MS	Standley <i>et al.</i> , 2000
		LLE	50–4210	–	GC-MS	Škrbić <i>et al.</i> , 2018
		LLE	ND–1000	–	GC-MS	Sullivan <i>et al.</i> , 2010
		SPE	8,0–11	–	GC-MS	Wu <i>et al.</i> , 2009
		LLE	ND–63	–	GC-MS	Devane <i>et al.</i> , 2006
		ASE	–	20–13200	GC-MS	Albuquerque de Assis Costa <i>et al.</i> , 2018
		UZE	–	14–2028	GC-MS	Isobe <i>et al.</i> , 2002
		SE	–	10–200	GC-MS	Cordeiro <i>et al.</i> , 2008
		Otpadna voda (ulazna u PPOV)		SPE	1800	–
LLE	10390–25320			–	GC-MS	Furtula <i>et al.</i> , 2012
Procedna voda deponija		SPE	2700–64380	–	GC-MS	Zhang <i>et al.</i> , 2008
<i>Epiholestanol</i>						
Rečna voda		SPE	12–23	–	GC-MS	Wu <i>et al.</i> , 2009
		SE	–	320–7500	GC-MS	Cordeiro <i>et al.</i> , 2008
Otpadna voda (ulazna u PPOV)		LLE	1380–2530	–	GC-MS	Furtula <i>et al.</i> , 2012
		SPE	2200	–	GC-MS	Jeanneau <i>et al.</i> , 2011

Tabela 2.1. (nastavak)

Humani/životinjski sterol	Tip vodene matrice	Metoda ekstrakcije	Koncentracija, ng L ⁻¹		Metoda analize	Literatura	
			Rastvorni deo	Suspendovani deo			
Holestanol							
	Rečna voda	SPE	ND-41	0,17-7,2 ng g ⁻¹	GC-MS	Noblet <i>et al.</i> , 2004	
		UZE, LLE	ND-58	ND-124	GC-MS	Standley <i>et al.</i> , 2000	
		LLE	31-21197	-	GC-MS	Nakagawa <i>et al.</i> , 2019	
		LLE	123-7020	-	GC-MS	Škrbić <i>et al.</i> , 2018	
		LLE	ND-3600	-	GC-MS	Sullivan <i>et al.</i> , 2010	
		SPE	130-1370	-	GC-MS	Kong <i>et al.</i> , 2015	
		LLE	296-960	-	GC-MS	Devane <i>et al.</i> , 2006	
		SPE	ND-490	-	GC-MS	Wu <i>et al.</i> , 2009	
		ASE	-	60-4980	GC-MS	Albuquerque de Assis Costa <i>et al.</i> , 2018	
		UZE	-	22-2201	GC-MS	Isobe <i>et al.</i> , 2002	
		SE	-	10-1300	GC-MS	Cordeiro <i>et al.</i> , 2008	
		Otpadna voda (ulazna u PPOV)	UZE	560-1270	23-30	GC-MS	Isobe <i>et al.</i> , 2002
			SPE	13000	-	GC-MS	Jeanneau <i>et al.</i> , 2011
	Procedna voda deponija	SPE	12720-122200	-	GC-MS	Zhang <i>et al.</i> , 2008	
Holestanon							
	Rečna voda	SPE	ND-10	ND-5,2 ng g ⁻¹	GC-MS	Noblet <i>et al.</i> , 2004	
		SE	-	10-1300	GC-MS	Cordeiro <i>et al.</i> , 2008	
		UZE, LLE	ND	ND-66	GC-MS	Standley <i>et al.</i> , 2000	
	Otpadna voda (ulazna u PPOV)	LLE	4090-8100	-	GC-MS	Furtula <i>et al.</i> , 2012	

ND – nije detektovan; SPE – ekstrakcija na čvrstoj fazi (*eng.* solid-phase extraction); UZE – ultrazvučna ekstrakcija; LLE – tečno-tečno ekstrakcija (*eng.* liquid-liquid extraction); GC – gasna hromatografija; MS – masena spektrometrija; MS/MS – tandem masena spektrometrija; FID – plameno-jonizujući detektor; HRMS – masena spektrometrija visoke rezolucije; PPOV – postrojenje za prečišćavanje otpadnih voda; SE – Soksletova ekstrakcija; ASE – ubrzana ekstrakcija rastvaračem (*eng.* accelerated solvent extraction).

Ostali humani/životinjski steroli su manje rasprostranjeni u životnoj sredini. Prisustvo epikoprostanola ukazuje na uticaj tretiranih otpadnih voda (Mudge i Seguel, 1999; Martins *et al.*, 2007) ili fekalno zagađenje koje se dogodilo pre određenog vremena (Mudge i Duce, 2005; Adnan *et al.*, 2012). Naime, ovaj sterol uglavnom nastaje mikrobiološkom transformacijom koprostanola (McCalley *et al.*, 1981) u procesima prečišćavanja u PPOV ili tokom vremena. U rečnoj vodi je detektovan u koncentraciji do $4,2 \mu\text{g L}^{-1}$ u rastvornoj frakciji (Škrbić *et al.*, 2018), dok je u suspendovanom delu uzorka voda pronađeno do $13,2 \mu\text{g L}^{-1}$ (Albuquerque de Assis Costa *et al.*, 2018). U otpadnoj vodi na ulazu u postrojenja za prečišćavanje u Kanadi zabeleženo je do $25 \mu\text{g L}^{-1}$ (Furtula *et al.*, 2012), a u procednim vodama deponija u Kini detektovano je do $64 \mu\text{g L}^{-1}$ epikoprostanola (Zhang *et al.*, 2008).

Prisustvo epiholestanola u malim koncentracijama u prirodnim vodama upućuje na to da nije došlo do intenzivne mikrobiološke konverzije holesterola u kojoj pod specifičnim, anoksičnim uslovima on nastaje (Cordeiro *et al.*, 2008). U retkim studijama u kojima je ispitivana rasprostranjenost ovog sterola u rečnoj vodi, detektovano je $0,012\text{--}0,023 \mu\text{g L}^{-1}$ u rastvornom delu uzoraka vode u Singapuru (Wu *et al.*, 2009) i $0,32\text{--}75 \mu\text{g L}^{-1}$ u suspendovanom materijalu u Brazilu (Cordeiro *et al.*, 2008). U otpadnim vodama na ulazu u PPOV u Francuskoj (Jeanneau *et al.*, 2011) i Kanadi (Furtula *et al.*, 2012) pronađeno je do $2,2 \mu\text{g L}^{-1}$ i $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$ epiholestanola, respektivno.

Holestanol, kao termodinamički najstabilniji 5α -izomer koprostanola, nastaje u procesu redukcije holesterola (Leeming *et al.*, 1996), pa se javlja i u nezagađenim sredinama. Naime, pokazano je da se manje količine mogu naći u anaerobnim uslovima u sedimentima koji nisu kontaminirani fekalnim otpadom (Nishimura, 1982). Ipak, najznačajniji izvor holestanola u prirodi su otpadne vode. U komunalnoj otpadnoj vodi na ulazu u PPOV u Francuskoj detektovan je u maksimalnoj koncentraciji od $13 \mu\text{g L}^{-1}$ (Jeanneau *et al.*, 2011), a u procednim vodama deponije čvrstog otpada u Kini pronađeno je čak $122 \mu\text{g L}^{-1}$ holestanola (Zhang *et al.*, 2008). Najveća koncentracija ovog sterola u rečnim vodama zabeležena je u Japanu ($21 \mu\text{g L}^{-1}$, Nakagawa *et al.*, 2019).

U odnosu na ostale humane/životinjske sterole, holestanon se ređe detektuje u uzorcima prirodnih i otpadnih voda (tabela 2.1). Odsutnost holestanona može se pripisati nedostatku aerobne mikrobiološke aktivnosti jer nastaje degradacijom holesterola pod aerobnim uslovima (Cordeiro *et al.*, 2008; Prost *et al.*, 2018). Pregledom dostupne literature, utvrđeno je da je u komunalnoj otpadnoj vodi holestanon detektovan samo u Kanadi u opsegu koncentracija $4,1\text{--}8,1 \mu\text{g L}^{-1}$ (Furtula *et al.*, 2012).

Biljke sintetišu kompleksnu smešu fitosterola u kojoj dominiraju β -sitosterol i stigmasterol, koji regulišu fluidnost i propustljivost ćelijske membrane, slično holesterolu kod sisara (Hartmann, 1998). Biljni steroli se mogu koristiti kao specifični markeri za dokazivanje terestrijalnog ili morskog porekla organske materije u prirodi (Volkman, 1986). Veoma visoke koncentracije biljnih sterola u prirodnim vodama najčešće potiču od otpada iz domaćinstava, poput ostataka hrane i biljnih ulja, a važan izvor predstavljaju i otpadne vode iz industrije papira (Mahmood-Khan i Hall, 2003).

U rečnoj vodi, najviše su zastupljeni β -sitosterol i stigmasterol (tabela 2.2), sa najvećim koncentracijama detektovanim u Australiji ($11 \mu\text{g L}^{-1}$, Sullivan *et al.*, 2010) i Vojvodini ($3,0 \mu\text{g L}^{-1}$, Škrbić *et al.*, 2018), respektivno. U otpadnim vodama, nađena je značajno veća količina β -sitosterola na ulazu u PPOV u Kanadi ($416 \mu\text{g L}^{-1}$, Furtula *et al.*, 2012), ali i u procednim vodama deponija u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD, $190 \mu\text{g L}^{-1}$, Masoner *et al.*, 2016). Stigmasterol je detektovan u znatno nižim koncentracijama od β -sitosterola. Tako je u otpadnoj vodi na ulazu u postrojenje za prečišćavanje u Kanadi pronađeno $54 \mu\text{g L}^{-1}$ stigmasterola (Furtula *et al.*, 2012), dok je u procednoj vodi deponija u Kini detektovano $3,5 \mu\text{g L}^{-1}$ ovog sterola (Zhang *et al.*, 2008). Sličan trend raspodele dva fitosterola uočen je i za suspendovani deo uzoraka prirodnih i otpadnih voda.

Tabela 2.2. Pregled detektovanih koncentracija biljnih sterola u uzorcima voda i korišćenih metoda analize

Biljni sterol	Tip vodene matrice	Metoda ekstrakcije	Koncentracija, ng L ⁻¹		Metoda analize	Literatura
			Rastvorni deo	Suspendovani deo		
<i>β-Sitosterol</i>						
Rečna voda		SPE	ND-44	ND-17,28 ng g ⁻¹	GC-MS	Noblet <i>et al.</i> , 2004
		SPE	128-379	22-1796	GC-MS/MS	Andrási <i>et al.</i> , 2013
		LLE	ND-11000	–	GC-MS	Sullivan <i>et al.</i> , 2010
		LLE	1712-5510	–	GC-MS	Devane <i>et al.</i> , 2006
		SPE	665-3270	–	GC-MS	Kong <i>et al.</i> , 2015
		LLE	2300-2900	–	GC-MS	Kolpin <i>et al.</i> , 2004
		LLE	96-2000	–	GC-MS	Škrbić <i>et al.</i> , 2018
		ASE	–	110-7380	GC-MS	Albuquerque de Assis Costa <i>et al.</i> , 2018
		UZE	–	22-1126	GC-MS	Isobe <i>et al.</i> , 2002
		Koncentracija, µg L⁻¹				
Otpadna voda (ulazna u PPOV)		UZE	4,7-8,1	231-276	GC-MS	Isobe <i>et al.</i> , 2002
		SPE	ND-42	ND-130	GC-MS/MS	Andrási <i>et al.</i> , 2013
		LLE	154-416	–	GC-MS	Furtula <i>et al.</i> , 2012
		SPE	7,3-35	–	GC-HRMS	Fernandez <i>et al.</i> , 2007
		SPE	28	–	GC-MS	Jeanneau <i>et al.</i> , 2011
Procedna voda deponija		SPE	190	–	GC-MS/MS	Masoner <i>et al.</i> , 2016
		SPE	16-59	–	GC-MS	Zhang <i>et al.</i> , 2008
<i>Stigmasterol</i>						
Koncentracija, ng L⁻¹						
Rečna voda		SPE	13-55	ND-2,5 ng g ⁻¹	GC-MS	Noblet <i>et al.</i> , 2004
		SPE	ND-23	ND-188	GC-MS/MS	Andrási <i>et al.</i> , 2013
		LLE	341-2980	–	GC-MS	Škrbić <i>et al.</i> , 2018
		SPE	240-1550	–	GC-MS	Kong <i>et al.</i> , 2015
		UZE	–	84-7628	GC-MS	Isobe <i>et al.</i> , 2002
		ASE	–	60-2210	GC-MS	Albuquerque de Assis Costa <i>et al.</i> , 2018

Tabela 2.2. (nastavak)

Biljni sterol	Tip vodene matrice	Metoda ekstrakcije	Koncentracija, ng L ⁻¹		Metoda analize	Literatura
			Rastvorni deo	Suspendovani deo		
	Otpadna voda (ulazna u PPOV)	SPE	ND–7500	12000–49000	GC-MS/MS	Andrási <i>et al.</i> , 2013
		UZE	970–1600	36000–39000	GC-MS	Isobe <i>et al.</i> , 2002
		LLE	26050–54220	–	GC-MS	Furtula <i>et al.</i> , 2012
		SPE	403–13860	–	GC-HRMS	Fernandez <i>et al.</i> , 2007
		SPE	3800	–	GC-MS	Jeanneau <i>et al.</i> , 2011
	Procedna voda deponija	SPE	ND–3500	–	GC-MS	Zhang <i>et al.</i> , 2008
<i>Kampesterol</i>						
	Rečna voda	SPE	ND	ND–5,69 ng g ⁻¹	GC-MS	Noblet <i>et al.</i> , 2004
		SPE	160–1000	–	GC-MS	Kong <i>et al.</i> , 2015
		LLE	30–1090	–	GC-MS	Škrbić <i>et al.</i> , 2018
		ASE	–	80–2950	GC-MS	Albuquerque de Assis Costa <i>et al.</i> , 2018
		UZE	–	89–2194	GC-MS	Isobe <i>et al.</i> , 2002
	Otpadna voda (ulazna u PPOV)	UZE	2000–3800	98000–109000	GC-MS	Isobe <i>et al.</i> , 2002
		LLE	70860–176780	–	GC-MS	Furtula <i>et al.</i> , 2012
		SPE	530–8812	–	GC-HRMS	Fernandez <i>et al.</i> , 2007
		SPE	3200	–	GC-MS	Jeanneau <i>et al.</i> , 2011
	Procedna voda deponija	SPE	3700–18000	–	GC-MS	Zhang <i>et al.</i> , 2008
<i>Sitostanol</i>						
	Rečna voda	SPE	24–272	ND–5,82 ng g ⁻¹	GC-MS	Noblet <i>et al.</i> , 2004
		LLE	9–1220	–	GC-MS	Škrbić <i>et al.</i> , 2018
		LLE	ND–1100	–	GC-MS	Sullivan <i>et al.</i> , 2010
		SPE	43–190	–	GC-MS	Kong <i>et al.</i> , 2015
		UZE	–	24–855	GC-MS	Isobe <i>et al.</i> , 2002
	Otpadna voda (ulazna u PPOV)	UZE	110–400	10000–11000	GC-MS	Isobe <i>et al.</i> , 2002
		LLE	26890–58970	–	GC-MS	Furtula <i>et al.</i> , 2012
		SPE	6400	–	GC-MS	Jeanneau <i>et al.</i> , 2011
	Procedna voda deponija	SPE	8900–48000	–	GC-MS	Zhang <i>et al.</i> , 2008

Tabela 2.2. (nastavak)

Biljni sterol	Tip vodene matrice	Metoda ekstrakcije	Koncentracija, ng L ⁻¹		Metoda analize	Literatura
			Rastvorni deo	Suspendovani deo		
<i>Dezmosterol</i>						
	Otpadna voda (ulazna u PPOV)	LLE	5270–11510	–	GC-MS	Furtula <i>et al.</i> , 2012
		SPE	3390–4857	–	GC-HRMS	Fernandez <i>et al.</i> , 2007

ND – nije detektovan; SPE – ekstrakcija na čvrstoj fazi (*eng.* solid-phase extraction); UZE – ultrazvučna ekstrakcija; LLE – tečno-tečno ekstrakcija (*eng.* liquid-liquid extraction); GC – gasna hromatografija; MS – masena spektrometrija; MS/MS – tandem masena spektrometrija; HRMS – masena spektrometrija visoke rezolucije; PPOV– postrojenje za prečišćavanje otpadnih voda; SE – Soksletova ekstrakcija; ASE – ubrzana ekstrakcija rastvaračem (*eng.* accelerated solvent extraction).

Ostali biljni steroli (kampesterol, sitostanol i dezmosterol) su manje zastupljeni u životnoj sredini i manje ispitivani. Kampesterol i sitostanol su detektovani u rečnoj vodi Vojvodine u maksimalnoj koncentraciji od $1,1 \mu\text{g L}^{-1}$ i $1,2 \mu\text{g L}^{-1}$, respektivno (Škrbić *et al.*, 2018), dok prisustvo dezmosterola u prirodnim vodama nije ispitivano ni u jednoj dostupnoj studiji. Najviše koncentracije tri fitosterola nađene su u otpadnim vodama na ulazu u PPOV u Kanadi ($177 \mu\text{g L}^{-1}$ kampesterola, $59 \mu\text{g L}^{-1}$ sitostanola i $12 \mu\text{g L}^{-1}$ dezmosterola; Furtula *et al.*, 2012).

Kada je reč o steroidnim hormonima, i to estrogenima kao najčešće ispitivanim, čovek izlučuje 90–95% putem urina, dok preostalih 5–10% izlučuje fekalnim putem (Ying *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2009; Yadav i Dabur, 2022). Estrogeni hormoni se izlučuju u konjugovanim oblicima (D'Ascenzo *et al.*, 2003). Žene izlučuju veću količinu estrogena od muškaraca, a količina zavisi od reproduktivnog statusa žene. Procenjeno je da je u SAD-u srednja dnevna vrednost ekskrecije estrogena po stanovniku sledeća: $15,2 \mu\text{g E1}$, $7,87 \mu\text{g E2}$; $133 \mu\text{g E3}$ i $0,544 \mu\text{g EE2}$ (Kostich *et al.*, 2013). Takođe je procenjeno da se u Ujedinjenom Kraljevstvu (UK) izlučuje oko četiri puta veća količina estrogena na farmama životinja nego što izlučuje stanovništvo (Johnson *et al.*, 2006). Zabeležene su godišnje vrednosti ekskrecije estrona (E1) i estriola (E3), poreklom sa farmi životinja, od 1315 kg i 570 kg , respektivno (Ray *et al.*, 2013). Pored komunalnih otpadnih voda i otpadnih voda sa farmi, značajan izvor steroidnih hormona u životnoj sredini su i otpadne vode mlekara, kao i uzgajališta ribe (Kolodziej *et al.*, 2004).

Na osnovu pregleda dostupne literature (tabela 2.3) može se videti da su opsežne studije o prisustvu steroidnih hormona u rečnim vodama sprovedene u Kini (Peng *et al.*, 2008; Chang *et al.*, 2009), Kanadi (Naldi *et al.*, 2016), SAD-u (Wang *et al.*, 2012), Francuskoj (Vulliet *et al.*, 2008) i Švajcarskoj (Rechsteiner *et al.*, 2020). Rezultati su pokazali da su hormoni generalno zastupljeni u manjim koncentracijama nego steroli, sa manjom učestalosti detektovanja. Najčešće pronađeni steroidni hormoni su estron i 17β -estradiol (E2), a u najvišoj koncentraciji hormoni su detektovani u rekama Tajvana ($185 \mu\text{g L}^{-1}$ estrona i $87 \mu\text{g L}^{-1}$ estriola; Chou *et al.*, 2015). Pored rečne vode, steroidni hormoni su pronađeni u tragovima i u podzemnoj vodi (Vulliet *et al.*, 2008) koja je esencijalna za proizvodnju pijaće vode. S obzirom na to da hormoni izazivaju fiziološke efekte kod organizama pri veoma niskim koncentracijama (Shore i Shemesh, 2003), njihovo prisustvo u podzemnim vodama je zabrinjavajuće, a u retkim studijama tragovi su detektovani i u vodi za piće (Naldi *et al.*, 2016). Pored najčešće analiziranih prirodnih estrogena E1, E2 i E3, u prirodnim vodama su često detektovani sintetski hormoni - estrogen 17α -etinilestradiol (EE2) i gestagen noretindron.

Veći broj studija se bavio nivoima steroidnih hormona u otpadnoj vodi na ulazu u postrojenja za prečišćavanje, poput istraživanja u Kanadi (Fernandez *et al.*, 2007; Naldi *et al.*, 2016), Nemačkoj (Schlüsener i Bester, 2005), Mađarskoj (Andrási *et al.*, 2013), na Tajvanu (Chen *et al.*, 2009; Limpiyakorn *et al.*, 2011), itd. Najveće koncentracije hormona zabeležene su u Nemačkoj (470 ng L^{-1} estriola, Schlüsener i Bester, 2005), na Tajvanu (230 ng L^{-1} estrona, Chen *et al.*, 2009) i u Kanadi (224 ng L^{-1} noretindrona, Fernandez *et al.*, 2007). U procednim vodama deponija otpada, 2016. godine tim američkih naučnika je ispitivao prisustvo 101 organske supstance, od čega 17 steroidnih hormona, i pronašao tragove estriola, estrona i i noretindrona (Masoner *et al.*, 2016).

Za razliku od sterola koji su izrazito zastupljeniji u suspendovanom materijalu uzoraka vode, steroidni hormoni su dominantno prisutni u rastvornom delu. U retkim slučajevima kada su nađeni i u suspendovanom materijalu, prisutni su u manjoj ili sličnoj koncentraciji kao u rastvorom delu uzorka (tabela 2.3).

Tabela 2.3. Pregled detektovanih koncentracija steroidnih hormona u uzorcima voda i korišćenih metoda analize

Steroidni hormon	Tip vodene matrice	Metoda ekstrakcije	Koncentracija, ng L ⁻¹		Metoda analize	Literatura
			Rastvorni deo	Suspendovani deo		
<i>Estriol (E3)</i>						
Rečna voda		SPE, UZE	ND–87	–	LC-MS/MS	Chou <i>et al.</i> , 2015
		On-line SPE	< 10	–	LC-MS/MS	Naldi <i>et al.</i> , 2016
		LLE	ND–1,0	–	LC-MS/MS	Rechsteiner <i>et al.</i> , 2020
		SPE	ND–1,0	–	GC-MS	Peng <i>et al.</i> , 2008
Pijaća voda		On-line SPE	< 3,6	–	LC-MS/MS	Naldi <i>et al.</i> , 2016
Otpadna voda (ulazna u PPOV)		SPE	470	–	LC-MS/MS	Schlisener i Bester, 2005
		SPE	85–390	ND	GC-MS/MS	Andrási <i>et al.</i> , 2013
		SPE	105	–	LC-MS/MS	Chen <i>et al.</i> , 2009
		SPE	72	–	LC-MS/MS	Limpiyakorn <i>et al.</i> , 2011
		On-line SPE	< 52	–	LC-MS/MS	Naldi <i>et al.</i> , 2016
		SPE	ND–20	–	GC-HRMS	Fernandez <i>et al.</i> , 2007
Procedna voda deponija		SPE	6,5	–	GC-MS/MS	Masoner <i>et al.</i> , 2016
<i>Estron (E1)</i>						
Rečna voda		SPE, UZE	ND–185	–	LC-MS/MS	Chou <i>et al.</i> , 2015
		SPE	8–65	–	GC-MS	Peng <i>et al.</i> , 2008
		SPE	6,0–27	–	LC-MS/MS	Pailler <i>et al.</i> , 2009
		On-line SPE	< 9,7	–	LC-MS/MS	Naldi <i>et al.</i> , 2016
		SPE	0,25–8,0	–	LC-MS/MS	Chang <i>et al.</i> , 2009
		LLE	ND–3,5	–	LC-MS/MS	Rechsteiner <i>et al.</i> , 2020
		SPE	ND–1,5	2,2	GC-MS	Wang <i>et al.</i> , 2012
		SPE	ND–0,30	–	LC-MS	Vulliet <i>et al.</i> , 2008
Podzemna voda		SPE	0,80–3,5	–	LC-MS	Vulliet <i>et al.</i> , 2008
Pijaća voda		On-line SPE	< 13	–	LC-MS/MS	Naldi <i>et al.</i> , 2016

Tabela 2.3. (nastavak)

Steroidni hormon	Tip vodene matrice	Metoda ekstrakcije	Koncentracija, ng L ⁻¹		Metoda analize	Literatura
			Rastvorni deo	Suspendovani deo		
	Otpadna voda (ulazna u PPOV)	SPE	230	–	LC-MS/MS	Chen <i>et al.</i> , 2009
		SPE	87	–	LC-MS/MS	Schlüsener i Bester, 2005
		SPE	44	–	LC-MS/MS	Limpiyakorn <i>et al.</i> , 2011
		SPE	ND–33	–	GC-HRMS	Fernandez <i>et al.</i> , 2007
		On-line SPE	< 26	–	LC-MS/MS	Naldi <i>et al.</i> , 2016
		SPE	14	–	LC-MS/MS	Pailler <i>et al.</i> , 2009
		Procedna voda deponija	SPE	145	–	GC-MS/MS
<i>17β-Estradiol (E2)</i>						
	Rečna voda	SPE	6,0–35	–	LC-MS/MS	Pailler <i>et al.</i> , 2009
		SPE, UZE	ND–28	–	LC-MS/MS	Chou <i>et al.</i> , 2015
		On-line SPE	< 9,5	–	LC-MS/MS	Naldi <i>et al.</i> , 2016
		SPE	0,13–2,3	–	LC-MS/MS	Chang <i>et al.</i> , 2009
		SPE	1,0–2,0	–	GC-MS	Peng <i>et al.</i> , 2008
		SPE	0,41–1,9	ND–0,35	GC-MS	Wang <i>et al.</i> , 2012
		SPE	ND–0,73	ND	GC-MS/MS	Andrási <i>et al.</i> , 2013
		LLE	ND–0,61	–	LC-MS/MS	Rechsteiner <i>et al.</i> , 2020
Podzemna voda	SPE	0,30–1,3	–	LC-MS	Vulliet <i>et al.</i> , 2008	
Pijaća voda	On-line SPE	< 6,1	–	LC-MS/MS	Naldi <i>et al.</i> , 2016	
	Otpadna voda (ulazna u PPOV)	SPE	102	–	LC-MS/MS	Pailler <i>et al.</i> , 2009
		SPE	84	–	LC-MS/MS	Chen <i>et al.</i> , 2009
		SPE	16–27	6,6–32	GC-MS/MS	Andrási <i>et al.</i> , 2013
		SPE	22	–	LC-MS/MS	Schlüsener i Bester, 2005
		On-line SPE	< 14	–	LC-MS/MS	Naldi <i>et al.</i> , 2016
		SPE	11	–	LC-MS/MS	Limpiyakorn <i>et al.</i> , 2011
		SPE	ND–11	–	GC-HRMS	Fernandez <i>et al.</i> , 2007

Tabela 2.3. (nastavak)

Steroidni hormon	Tip vodene matrice	Metoda ekstrakcije	Koncentracija, ng L ⁻¹		Metoda analize	Literatura
			Rastvorni deo	Suspendovani deo		
<i>17α-Estradiol</i>						
	Rečna voda	LLE	ND–11	–	LC-MS/MS	Rechsteiner <i>et al.</i> , 2020
		SPE	1,0–2,0	–	GC-MS	Peng <i>et al.</i> , 2008
		SPE	0,04–0,91	–	LC-MS/MS	Chang <i>et al.</i> , 2009
	Podzemna voda	SPE	0,40–1,6	–	LC-MS	Vulliet <i>et al.</i> , 2008
	Otpadna voda (ulazna u PPOV)	SPE	ND–1,0	–	GC-HRMS	Fernandez <i>et al.</i> , 2007
<i>17α-Etinilestradiol (EE2)</i>						
	Rečna voda	SPE, UZE	ND–51	–	LC-MS/MS	Chou <i>et al.</i> , 2015
		On-line SPE	< 25	–	LC-MS/MS	Naldi <i>et al.</i> , 2016
		SPE	1,6–16	–	LC-MS/MS	Chang <i>et al.</i> , 2009
		SPE	ND–1,0	–	GC-MS	Peng <i>et al.</i> , 2008
	Podzemna voda	SPE	0,50–3,0	–	LC-MS	Vulliet <i>et al.</i> , 2008
	Pijaća voda	On-line SPE	< 7,2	–	LC-MS/MS	Naldi <i>et al.</i> , 2016
	Otpadna voda (ulazna u PPOV)	On-line SPE	< 62	–	LC-MS/MS	Naldi <i>et al.</i> , 2016
		SPE	24	–	LC-MS/MS	Pailler <i>et al.</i> , 2009
		SPE	ND–2,0	–	GC-HRMS	Fernandez <i>et al.</i> , 2007
	<i>Noretindron</i>					
	Rečna voda	SPE	1,6–16	–	LC-MS/MS	Chang <i>et al.</i> , 2009
		SPE	2,7–2,8	–	LC-MS	Vulliet <i>et al.</i> , 2008
	Podzemna	SPE	4,2–5,6	–	LC-MS	Vulliet <i>et al.</i> , 2008
	Otpadna voda (ulazna u PPOV)	SPE	224	–	GC-HRMS	Fernandez <i>et al.</i> , 2007
	Procedna voda deponija	SPE	30	–	GC-MS/MS	Masoner <i>et al.</i> , 2016
<i>Levonorgestrel</i>						
	Rečna voda	SPE	5,3–7,0	–	LC-MS	Vulliet <i>et al.</i> , 2008
	Podzemna voda	SPE	7,4–11	–	LC-MS	Vulliet <i>et al.</i> , 2008

ND – nije detektovan; SPE – ekstrakcija na čvrstoj fazi (*eng.* solid-phase extraction); UZE – ultrazvučna ekstrakcija; LLE – tečno-tečno ekstrakcija (*eng.* liquid-liquid extraction); GC – gasna hromatografija; MS – masena spektrometrija; MS/MS – tandem masena spektrometrija; HRMS – masena spektrometrija visoke rezolucije; PPOV – postrojenje za prečišćavanje otpadnih voda; SE – Soksletova ekstrakcija; ASE – ubrzana ekstrakcija rastvaračem (*eng.* accelerated solvent extraction).

2.5. Zakonska regulativa o steroidnim jedinjenjima u svetu i Republici Srbiji

Veliki broj studija širom sveta se bavi proučavanjem uticaja raznih organskih jedinjenja, antropogenog porekla, u prirodi na živi svet. Pokazano je da metaboliti, aktivne supstance i njihovi transformacioni proizvodi dovode do niza negativnih efekata kod biljnog i životinjskog sveta. Zbog toga je još 70-ih godina dvadesetog veka u Evropi usvojena direktiva o zagađenju određenim opasnim supstancama ispuštenim u vodu sredinu (Council Directive 76/464/EEC). Jedna od najznačajnijih direktiva u vezi sa zaštitom vodenih resursa je direktiva 2000/60/EC o uspostavljanju okvira za zajedničko delovanje u oblasti politike voda koju je Evropska unija (EU) usvojila 2000. godine. Poznata je kao „Water Framework Directive“ (Council Directive 2000/60/EC). Prema ovoj direktivi, definisane su i regulisane 33 prioritetne supstance koje predstavljaju najveći problem u životnoj sredini i moraju biti predmet monitoringa. Lista prioriternih supstanci je ažurirana i proširena 2013. godine na 45 supstanci (Directive 2013/39/EU). Na pomenutoj listi nisu navedeni steroidni hormoni niti steroli. Međutim, EU je 2015. godine uspostavila listu zagađujućih supstanci za koje dostupne informacije ukazuju da mogu predstavljati značajan rizik po vodu sredinu, ali za koje su podaci monitoringa nedovoljni za donošenje zaključka o stvarnom riziku i uključivanju u listu prioriternih supstanci (Decision 2015/495 i Decision 2018/840). Na ovoj listi, poznatoj kao „watch list“, navedeno je 15 visoko toksičnih supstanci, uključujući tri steroidna hormona (E1, E2 i EE2). Ova tri hormona su 2022. godine predložena za uključivanje na listu prioriternih supstanci (EC Proposal, 2022).

U SAD-u, Agencija za zaštitu životne sredine (*eng.* Environmental Protection Agency, EPA) je objavila listu zagađujućih supstanci koje ne podležu nacionalnim propisima o pijaćoj vodi, a poznato je ili se očekuje da se pojavljuju u javnom vodovodnom sistemu (*eng.* Contaminant Candidate List, CCL). Najnovija, peta lista (CCL-5) uključuje: 66 hemijskih supstanci, tri hemijske grupe (per- i polifluoroalkilne supstance - PFAS, cijanotoksine i dezinfekcione nusproizvode) i 12 mikrobioloških vrsta (EPA, 2021). Od steroidnih jedinjenja, na ovoj listi se nalazi 17 α -etinilestradiol, a planirano je njegovo uključivanje u zakonsku regulativu o vodi za piće.

Odsek za kvalitet životne sredine u državi Oregon, u SAD-u, je objavio listu prioriternih perzistentnih zagađujućih supstanci, tzv. P³ listu (*eng.* priority persistent pollutant list) u cilju smanjenja zagađenja vodenih ekosistema. Lista uključuje bioakumulativne toksične supstance koje imaju dokumentovane efekte na zdravlje čoveka, životinje i vodeni svet. Na najnovijoj listi se nalazi veliki broj steroidnih jedinjenja, steroli koprostanol, holesterol, sitostanol i β -sitosterol, kao i 17 steroidnih hormona, kao što su estron, estriol, 17 α -estradiol, 17 β -estradiol, 17 α -etinilestradiol, mestranol, ekvilin i noretindron (P3, 2019).

Pored zaštite životne sredine, nekoliko direktiva i uredbi EU reguliše upotrebu veterinarsko-medicinskih proizvoda na farmskim životinjama kako bi se obezbedio visok nivo zaštite za zdravlje životinja, kao i očuvanje javnog zdravlja. Od 1996. godine je na snazi direktiva 96/22/EC o zabrani primene supstanci sa hormonskim (estrogenim, androgenim i gestagenim) i tireostatskim delovanjem na farmske životinje koje se koriste za proizvodnju hrane, jer to može uticati na kvalitet namirnica životinjskog porekla i biti opasno za potrošače (Council Directive 96/22/EC). Uredba iz 2019. godine reguliše proizvodnju, stavljanje u promet, distribuciju, strogu kontrolu i ograničenu primenu na životinjama veterinarsko-medicinskih proizvoda koji sadrže supstance sa hormonalnim, anaboličnim, antiinfektivnim, antiparazitskim, protivupalnim, opojnim ili psihotropnim svojstvima (Regulation EU 2019/6).

U Republici Srbiji, steroidna jedinjenja još uvek nisu uvrštena u redovne monitoring programe. Međutim, zakonska regulativa strogo kontroliše upotrebu i prisustvo steroidnih hormona kod farmskih životinja i u proizvodima životinjskog porekla. Tako je, prema Zakonu o stočarstvu, zabranjeno davanje hormonalnih preparata domaćim životinjama koje se koriste u proizvodne svrhe, da bi se podsticao rast, proizvodnja mleka, mesa, jaja ili iz drugih razloga (Zakon o stočarstvu, 2009). Prema Zakonu o veterinarstvu, 2005. godine je uveden program sistematskog praćenja rezidua farmakoloških, hormonskih i drugih štetnih materija kod životinja, proizvoda životinjskog porekla i hrane za životinje (Zakonu o veterinarstvu, 2005).

2.6. Uklanjanje steroidnih jedinjenja u postrojenjima za prečišćavanje otpadnih voda

Uklanjanje organskih zagađujućih supstanci u PPOV je složen proces sa mnogo mogućih mehanizama delovanja. Istraživanja su pokazala da se steroidna jedinjenja uklanjaju sa visokom efikasnošću u procesima prečišćavanja, ali nepotpuno, zbog čega se otpadne vode smatraju primarnim izvorom ovih jedinjenja u vodenom ekosistemu. Na efikasnost uklanjanja može uticati vrsta tretmana koji se koristi u PPOV (biološki ili hemijski), kao i fizičko-hemijske karakteristike prisutnih zagađujućih supstanci (npr. rastvorljivost u vodi, isparljivost, jačina adsorbovanja na aktivni mulj, brzina razgradnje abiotičkim i biotičkim procesima) (Evgenidou *et al.*, 2015). Efikasnost eliminacije steroidnih jedinjenja u PPOV zavisi i od operativnih uslova i uslova okoline. Najvažniji od operativnih uslova su hidrauličko vreme zadržavanja, vreme zadržavanja mulja i kinetika biorazgradnje, dok su neki od glavnih uslova okoline, koji utiču na kinetiku razgradnje jedinjenja, temperatura (niža efikasnost tokom zime), redoks uslovi (različita efikasnost pri anaerobnim i aerobnim uslovima) i pH vrednost (Evgenidou *et al.*, 2015).

Efikasnost uklanjanja steroidnih jedinjenja iz otpadnih voda najviše zavisi od tipa tehnologije prečišćavanja koji je primenjen. Prvi i najvažniji korak u procesu prerade otpadnih voda u PPOV je primarni tretman koji obuhvata fizičke metode taloženja. Suspendovane čestice se talože u procesu koagulacije, dodatkom koagulansa (npr. aluminijum-sulfata ili gvožđe(III)-hlorida) kako bi se povećala agregacija manjih čestica, a zatim i flokulacije, gde se otpadna voda polako meša kako bi se podstakli sudari između čestica i formirali još veći agregati, uz dodatak flokulanta. Nakon koagulacije i flokulacije, voda teče u sedimentacione bazene u kojima se pod uticajem gravitacije agregirane čestice talože na dno bazena. Kolektivni proces koagulacije, flokulacije i sedimentacije naziva se primarnim tretmanom. Nakon primarne obrade, voda se podvrgava sekundarnoj (tj. biološkoj) preradi. Najčešći sistem biološkog tretmana uključuje upotrebu aktivnog mulja koji sadrži bakterije i protozoe i koristi se za adsorpciju i biorazgradnju organskih supstanci otpadne vode. Primarni i sekundarni tretman prečišćavanja čine konvencionalnu obradu otpadnih voda (Oulton *et al.*, 2010).

Nakon konvencionalnog tretmana, često se u PPOV koriste napredni procesi obrade zbog sve strožijih zahteva zakonske regulative za ispuštanje otpadnih voda, kao što su napredna filtracija ili hemijska dezinfekcija. Napredne tehnike filtracije koje se obično koriste uključuju filtriranje peskom za uklanjanje suspendovanih čvrstih materija ili filtraciju aktivnim ugljem za uklanjanje organskih mikropolutanata. Hemijska dezinfekcija se koristi za uklanjanje štetnih patogena upotrebom oksidanata, najčešće na bazi hlora. Međutim, ove supstance su štetne za živi svet, zbog čega se u prečišćenu otpadnu vodu, pre ispuštanja, dodaje sredstvo za dehlorisanje (Letterman, 1999). Ostale metode dezinfekcije uključuju ozonizaciju ili korišćenje ultraljubičastog (*eng.* ultraviolet, UV) zračenja (Tchobanoglous *et al.*, 2003). Nakon tretmana, efluent se ispušta u prihvatne vode, najčešće površinske.

Efikasnost uklanjanja humanih/životinjskih i biljnih sterola u PPOV je veoma visoka, i za rastvornu fazu uzoraka otpadne vode (91–100%, Jeanneau *et al.*, 2011; Furtula *et al.*, 2012; András *et al.*, 2013) i za suspendovanu fazu (do 99%, András *et al.*, 2013). Nakon sekundarnog tretmana, otpadna voda sadrži značajno smanjene nivoe sterola što se objašnjava izraženim uklanjanjem fizičkim procesima, a zatim intenzivnim biološkim tretmanom sa aktivnim muljem koji nakon digestije sadrži veliku koncentraciju sterola (McCalley *et al.*, 1981). Međutim, steroli se slabo razgrađuju hemijskim tretmanima otpadnih voda, kao što je hlорisanje, dok se ozonizacijom može ukloniti 25–50% humanih/životinjskih i biljnih sterola (Scales *et al.*, 2019).

Kao i u slučaju sterola, steroidni hormoni se sa visokom efikasnošću uklanjaju u procesima prerade otpadne vode. Biološki tretman eliminiše 85–100% estrogena E1, E2, E3 i EE2 (Johnson i Sumpter, 2001; Schlüsener i Bester, 2005; András *et al.*, 2011). Uklanjanje steroidnih hormona u PPOV može biti i značajno niže, a njihove koncentracije u tretiranoj otpadnoj vodi nakon prečišćavanja mogu čak biti veće nego u netretiranoj. Smatra se da se u takvim slučajevima jednom konjugovani estrogeni podvrgavaju hemijskoj ili enzimskoj disocijaciji u aktivnom mulju ponovno

formirajući aktivne estrogene (Ternes *et al.*, 1999). Mikrobiološki tretman otpadne vode je glavni proces kojim se u PPOV uklanjaju estrogene (Pratish *et al.*, 2020). Utvrđeno je da stepen biorazgradnje estrogene u PPOV opada u nizu $E3 > E2 > E1 > EE2$ (Garcia *et al.*, 2019). Uočeno je da veći procenat razgradnje estrogene imaju postrojenja sa dužim hidrauličkim vremenom zadržavanja jer se osigurava dovoljno vremena za rast mikroorganizama i duže vreme kontakta sa materijalom koji adsorbuje estrogene (Maeng *et al.*, 2013).

2.7. Negativni efekti prisustva steroidnih jedinjenja u životnoj sredini

Istraživanja ekotoksičnosti sterola i steroidnih hormona, prisutnih u tragovima u vodenoj sredini, su pokazala da ova jedinjenja mogu imati štetne posledice po vodene organizme, poput reproduktivne disfunkcije, poremećaja rasta i endokrinih poremećaja. Pokazano je da koprostanol (Gagné *et al.*, 2001) i β -sitosterol (Orrego *et al.*, 2010) imaju estrogene efekat na vodene organizme, najčešće izazivajući reproduktivnu disfunkciju kod riba. Takođe, biljni steroli (β -sitosterol, stigmasterol, kampesterol i dezmosterol) prisutni u otpadnim vodama drveno-prerađivačke industrije, kao i industrije celuloze i papira, izazivaju brojne endokrine i metaboličke (Martin-Creuzburg i Von Elert, 2004), ali i reproduktivne poremećaje (Munkittrick *et al.*, 1998) kod živog sveta u vodi.

Prisustvo tragova prirodnih i sintetskih steroidnih hormona u prirodnim vodama (obično nivoa ng L^{-1}) prouzrokuje izrazito negativne efekte na vodene organizme (Runnalls *et al.*, 2010; Bain *et al.*, 2015). Smatra se da su bioakumulacija i kumulativni efekat više steroidnih hormona glavni razlozi izraženog narušavanja fizioloških funkcija živog sveta u vodi (Runnalls *et al.*, 2015). Posebno se izdvajaju estron i 17β -estradiol zbog njihove sposobnosti da izazivaju fiziološke efekte pri znatno nižim koncentracijama od ostalih steroida (Shore i Shemesh, 2003).

2.8. Steroli kao hemijski markeri izvora zagađenja

Za procenu fekalnog zagađenja vodenih resursa standardno su korišćene bakteriološke metode određivanja koliformnih i *Enterococcus* bakterija (Field i Samadpour, 2007). Koliformne bakterije, tj. ukupni koliformi, fekalni koliformi i *Escherichia coli* (*E. coli*), se i dalje određuju prilikom ispitivanja biološkog kvaliteta voda za piće, rekreaciju i ribolov (Farnleitner *et al.*, 2010). Međutim, mikrobiološki indikatori imaju mnogo ograničenja, kao što su nedostatak specifičnosti, detektovanje kratkoročnog zagađenja, smanjeno preživljavanje bakterija u hemijski zagađenim vodama i dugo vreme analize (Li *et al.*, 2021). Zbog svoje specifičnosti i stabilnosti, steroidna jedinjenja su našla primenu kao hemijski markeri izvora zagađenja. Profil sterola u ljudskom i životinjskom fekalnom materijalu je jedinstven, pa se može smatrati „otiskom prsta“ svakog organizma. U prvobitnim studijama vršena je analiza sirovog fekalnog materijala čoveka i životinja, kako bi se utvrdili sterolni profili specifični za različite organizme. Utvrđeno je da je fekalni sterol dominantan u sterolnom profilu čoveka, svinje i mačke - koprostanol, dok je kod ptica gotovo potpuno odsutan (Leeming *et al.*, 1996). Pokazano je da je epikoprostanol fekalni sterol najzastupljeniji kod ovce, dok je holestanol najstabilniji izomer prisutan u nezagađenim sredinama (Leeming *et al.*, 1996; Jardé *et al.*, 2007). Iz analiza sterolnih profila proistekli su različiti odnosi sterola koji se primenjuju za identifikaciju fekalnog zagađenja u matricama iz životne sredine (Leeming *et al.*, 1996; Gourmelon *et al.*, 2010; Devane *et al.*, 2015; Hargan *et al.*, 2018). Sterolni odnosi se koriste i za razlikovanje humanog fekalnog zagađenja (komunalne otpadne vode, otpadne vode i otpadni mulj iz PPOV, septičke jame) od životinjskog (farme svinja ili krava, zemljište tretirano stajskim đubrivom) (Blanch *et al.*, 2006; Tyagi *et al.*, 2009; Jaffrezic *et al.*, 2011).

Samo prisustvo koprostanola smatra se indikatorom humanog fekalnog zagađenja (Murtaugh i Bunch, 1967). Međutim, utvrđeno je da količina koprostanola veća od 5–6% u odnosu na ukupnu količinu detektovanih sterola ukazuje na humano fekalno zagađenje u uzorcima iz životne sredine (Devane *et al.*, 2006). Osnova izbora koprostanola kao glavnog hemijskog markera zagađenja je upravo njegova postojanost u životnoj sredini, posebno u anoksičnim uslovima, zbog čega se koristi za identifikaciju trenutnog, kratkoročnog zagađenja voda, ali i istorijskog, dugoročnog zagađenja sedimenata.

U tabeli 2.4 navedeni su odnosi sterola koji se najčešće koriste za određivanje fekalnog zagađenja poreklom od čoveka, dok su u tabeli 2.5 izdvojeni najvažniji odnosi sterola koji se koriste za razlikovanje između humanog i životinjskog fekalnog zagađenja. Svi navedeni sterolni odnosi i njihove granične vrednosti se koriste za identifikaciju zagađenja uzoraka vode, i rastvorne i suspendovane frakcije, kao i za uzorke sedimenata.

U literaturi najčešće korišćen sterolni odnos za identifikaciju humanog zagađenja je količnik koprostanola i zbira koprostanola i holestanola (odnos br. 1, tabela 2.4; Grimalt *et al.*, 1990; Kong *et al.*, 2015; Reichwaldt *et al.*, 2017). Koprostanol i holestanol su izomeri koji nastaju različitim procesima redukcije holesterola (koprostanol u gastrointestinalnog traktu sisara, a holestanol uglavnom u prirodnim nezagađenim sredinama), pa je njihov odnos važan za razlikovanje izvora zagađenja (Grimalt *et al.*, 1990). Vrednost ovog odnosa veća od 0,7 ukazuje na humano fekalno zagađenje, dok vrednosti ispod 0,3 ukazuju na izostanak humanog zagađenja. Opseg između 0,3 i 0,7 smatra se nesigurnom oblašću za identifikaciju zagađenja.

Odnos br. 2 (koprostanol + epikoprostanol/(koprostanol + epikoprostanol + holestanol)) uzima u obzir mikrobiološku transformaciju koprostanola u epikoprostanol i uticaj starosti fekalnog zagađenja (Bull *et al.*, 2002). Epikoprostanol je prisutan u tragovima u humanom fekalnom materijalu i nastaje konverzijom koprostanola u procesu digestije mulja tokom tretmana otpadnih voda (McCalley *et al.*, 1981), ali i starenjem fekalnog materijala (Adnan *et al.*, 2012). Zbog toga se koncentracija epikoprostanola može koristiti kao indikator nivoa prečišćavanja otpadnih voda ili starosti fekalnog zagađenja (Mudge i Seguel, 1999; Martins *et al.*, 2007). Ovaj odnos ima iste referentne vrednosti kao odnos br. 1.

Odnos koprostanol/holesterol (odnos br. 3) se smatra veoma pouzdanim odnosom za razlikovanje između izvora sterola, sa vrednošću > 1 koja ukazuje na antropogeni izvor i vrednošću < 1 tipičnom za visok unos iz prirodnih izvora (Zhang *et al.*, 2008). Odnos br. 4 (koprostanol/(holesterol + holestanol)) je predložen za identifikaciju humanog fekalnog unosa u uzorcima iz životne sredine, sa referentnom vrednošću $> 0,06$ koja se koristi za potvrdu uticaja komunalnih otpadnih voda (Writer *et al.*, 1995).

Odnos koprostanol/epikoprostanol (odnos br. 5) se može koristiti za razlikovanje antropogenog fekalnog unosa od unosa drugih sisara (Zhang *et al.*, 2008). Vrednost odnosa veća od 1,5 ukazuje na humano fekalno zagađenje. Odnos br. 6 (epikoprostanol/koprostanol) se smatra pouzdanim odnosom za procenu nivoa prečišćavanja otpadnih voda i razlikovanje uticaja tretiranih i netretiranih komunalnih otpadnih voda (Martins *et al.*, 2007), kao i za određivanje starosti fekalne materije (Adnan *et al.*, 2012; Reichwaldt *et al.*, 2017). Vrednost odnosa ispod 0,2 ukazuje na nedavni unos sirove neprečišćene otpadne vode, dok vrednost iznad 0,8 sugeriše da je izvor sterola ili tretirana otpadna voda ili netretirana otpadna voda ispuštena pre dužeg vremena.

Pored odnosa sterola koji se koriste za identifikaciju zagađenja koje potiče od komunalnih otpadnih voda, predložen je niz odnosa koji bi mogli da razlikuju humano i životinjsko fekalno zagađenje u životnoj sredini (tabela 2.5). Naime, na kvalitet rečne vode može uticati i fekalno zagađenje poreklom od različitih životinja, posebno u poljoprivrednim oblastima sa praksom rasprostiranja stočnog ili svinjskog stajskog đubriva (Jardé *et al.*, 2007; Derrien *et al.*, 2011; Jaffrezic *et al.*, 2011).

Odnos br. 7 ((koprostanol + epikoprostanol)/holesterol) je predložen na osnovu analize kravljeg, svinjskog i živinskog fekalnog materijala (Jardé *et al.*, 2007). Pomoću ovog odnosa može se jasno razlikovati fekalno zagađenje poreklom od svinja od drugih izvora zagađenja, koristeći referentnu vrednost veću od 3,7. Vrednost odnosa ispod 0,7 ukazuje na zagađenje poreklom od krava, dok vrednost mnogo veća od 3,7 ukazuje na humano zagađenje.

Odnos br. 8 (sitostanol/koprostanol) se može koristiti da razlikovanje između zagađenja poreklom od krava (vrednost > 1) i svinja (< 1) u analiziranim uzorcima (Derrien *et al.*, 2011; Jaffrezic *et al.*, 2011). Smatra se da vrednost odnosa manja od 1 ukazuje i na antropogeno zagađenje, zajedno sa nizom markera koji se koriste za određivanje porekla zagađenja (Gourmelon *et al.*, 2010).

Koprostanol/holestanol odnos (odnos br. 9) može identifikovati fekalno zagađenje poreklom od biljojeda sisara/čoveka (vrednost > 0,5) i potencijalno ukazati na kontaminaciju poreklom od ptica (< 0,5; Devane *et al.*, 2015). Takođe, predložena su dva odnosa sterola specifična za fekalno zagađenje poreklom od ptica (odnosi br. 10 i br. 11; Devane *et al.*, 2015). Međutim, mnogi od ovih odnosa (tabela 2.5) uključuju dva markera specifična za životinje, 24-etilkoprostanol (24-etil-5 β -holestan-3 β -ol) i 24-etilepikoprostanol (24-etil-5 β -holestan-3 α -ol). Ova dva sterola su glavni fekalni biomarkeri biljojeda (Leeming *et al.*, 1996; Devane *et al.*, 2015; Nash *et al.*, 2005) koji mogu pomoći pri razlikovanju fekalne kontaminacije poreklom od čoveka i biljojeda sisara (Devane *et al.*, 2015) ili pri razlikovanju zagađenja poreklom od krava i svinja (Derrien *et al.*, 2011; Jaffrezic *et al.*, 2011). Ipak, procena obima životinjskog fekalnog doprinosa u studiji bila je ograničena zbog nedostatka ova dva markera specifična za životinje, ali i zbog činjenice da je dominantni izvor sterola u ispitivanom području – izlivanje netretiranih komunalnih otpadnih voda.

Tabela 2.4. Odnosi sterola koji se koriste za određivanje fekalnog zagađenja poreklom od čoveka

Odnos br.	Odnos sterola	Vrednost odnosa koji ukazuje na humano fekalno zagađenje			Literatura
		Da	Nesigurno	Ne	
1.	$\frac{\text{Koprostanol}}{\text{Koprostanol} + \text{Holestanol}}$	> 0,7	0,3–0,7	< 0,3	Grimalt <i>et al.</i> , 1990; Bull <i>et al.</i> , 2002; Devane <i>et al.</i> , 2006; Martins <i>et al.</i> , 2007; Zhang <i>et al.</i> , 2008; Jeanneau <i>et al.</i> , 2011; Adnan <i>et al.</i> , 2012; Furtula <i>et al.</i> , 2012; Alsalahi <i>et al.</i> , 2015; Kong <i>et al.</i> , 2015; Reichwaldt <i>et al.</i> , 2017
2.	$\frac{\text{Koprostanol} + \text{Epikoprostanol}}{\text{Koprostanol} + \text{Epikoprostanol} + \text{Holestanol}}$	> 0,7	0,3–0,7	< 0,3	Bull <i>et al.</i> , 2002; Furtula <i>et al.</i> , 2012
3.	$\frac{\text{Koprostanol}}{\text{Holesterol}}$	> 1,0	–	< 1,0	Zhang <i>et al.</i> , 2008; Jeanneau <i>et al.</i> , 2011; Adnan <i>et al.</i> , 2012; Furtula <i>et al.</i> , 2012; Alsalahi <i>et al.</i> , 2015; Kong <i>et al.</i> , 2015; Reichwaldt <i>et al.</i> , 2017
4.	$\frac{\text{Koprostanol}}{\text{Holesterol} + \text{Holestanol}}$	> 0,06	–	–	Writer <i>et al.</i> , 1995; Jeanneau <i>et al.</i> , 2011; Furtula <i>et al.</i> , 2012
5.	$\frac{\text{Koprostanol}}{\text{Epikoprostanol}}$	> 1,5	–	< 1,5	Devane <i>et al.</i> , 2006; Zhang <i>et al.</i> , 2008; Furtula <i>et al.</i> , 2012; Reichwaldt <i>et al.</i> , 2017
6.	$\frac{\text{Epikoprostanol}}{\text{Koprostanol}}$	< 0,2	0,2–0,8	> 0,8	Martins <i>et al.</i> , 2007; Adnan <i>et al.</i> , 2012; Furtula <i>et al.</i> , 2012; Alsalahi <i>et al.</i> , 2015; Kong <i>et al.</i> , 2015

Tabela 2.5. Odnosi sterola koji se koriste za razlikovanje između humanog i životinjskog fekalnog zagađenja

Odnos br.	Odnos sterola	Vrednost odnosa (izvor zagađenja)	Literatura
7.	$\frac{\text{Koprostanol} + \text{Epikoprostanol}}{\text{Holesterol}}$	< 0,7 (krave)	Jardé <i>et al.</i> , 2007
		> 3,7 (svinje)	
8.	$\frac{\text{Sitostanol}}{\text{Koprostanol}}$	>>> 3,7 (ljudi)	Derrien <i>et al.</i> , 2011
		0,9–2,2 (krave)	
		1,5–6,8 (svinje)	Derrien <i>et al.</i> , 2011
		1,5–3,3 (krave)	
9.	$\frac{\text{Koprostanol}}{\text{Holestanol}}$	0,2 –1,0 (svinje)	Jaffrezic <i>et al.</i> , 2011
		> 1 (krave)	Gourmelon <i>et al.</i> , 2010
		< 1 (svinje)	
10.	$\frac{\text{Holestanol}}{\text{Holestanol} + \text{Koprostanol} + \text{Epikoprostanol}}$	> 1 (krave)	Devane <i>et al.</i> , 2015
		< 1 (svinje/ljudi)	
11.	$\frac{\text{24-Etilholestanol}}{\text{24-Etilholestanol} + \text{24-Etilkoprostanol} + \text{24-Etilepikoprostanol}}$	> 0,5 (biljojedi sisari/ljudi)	Devane <i>et al.</i> , 2015
		< 0,5 ptice	
12.	$\frac{\text{Koprostanol}}{\text{Koprostanol} + \text{24-Etilkoprostanol}}$	$\geq 0,5$ (ptice)	Devane <i>et al.</i> , 2015
		$\geq 0,4$ (ptice)	
13.	$\frac{\text{24-Etilkoprostanol}}{\text{Ukupni steroli}} * 100$	> 0,75 (krave)	Devane <i>et al.</i> , 2015
		< 0,3 (biljojedi sisari)	
14.	$\frac{\text{Koprostanol}}{\text{Koprostanol} + \text{24-Etilkoprostanol}} * 100$	> 5–6% (biljojedi sisari)	Devane <i>et al.</i> , 2015
		33–47% (krave)	
		44–67% (svinje)	Derrien <i>et al.</i> , 2011
		< 50% (krave)	
> 59% (svinje)	Jaffrezic <i>et al.</i> , 2011		

2.9. Steroli i steroidni hormoni odabrani za analizu u prirodnim i otpadnim vodama

Steroidna jedinjenja koja su izabrana u ovom radu za identifikaciju, kvantifikaciju i praćenje u uzorcima prirodnih i otpadnih voda predstavljaju istaknute predstavnike svojih podgrupa, supstance čiji se efekti u životnoj sredini prate u mnogim studijama, ali koje nisu uključene u obavezne monitoring programe. Osnovni razlog za ovakav izbor je njihov značajan sadržaj u komunalnim otpadnim vodama, kao i njihova specifičnost kao indikatora porekla zagađenja. Pregledom literature zaključeno je da su dvadeset odabranih steroida (šest humanih/životinjskih sterola, pet biljnih sterola i devet steroidnih hormona) najčešće analizirani u studijama u svetu, u raznim matricama životne sredine. U tabeli 2.6 dat je pregled trivijalnih i hemijskih (IUPAC) naziva odabranih steroidnih jedinjenja, sa odgovarajućim CAS brojevima i nominalnim masama.

U ovom radu ispitivane su dve grupe steroidnih jedinjenja, steroli (humani/životinjski i biljni) i steroidni hormoni. Humani/životinjski steroli pažnju dobijaju kao supstance koje nastaju tokom metabolizma i dominiraju u fekalnom materijalu ljudi i životinja. Redukcijom holesterola, osnovne gradivne supstance ćelijske membrane, u gastrointestinalnom traktu nastaju koprostanol, epikoprostanol, holestanol i holestanon, kao najrasprostranjeniji produkti (slika 2.4; Mott *et al.*, 1980). Koprostanol je najistraživaniji sterol, dominantan u humanom fekalnom otpadu, i najvažniji hemijski indikator zagađenja humanog porekla (Leeming *et al.*, 1996). Holestanol je njegov termodinamički najstabilniji izomer, najčešće prisutan u nezagađenim sredinama (Nishimura, 1982). Epikoprostanol je prisutan u tragovima u fekalnom otpadu čoveka, a dugotrajna inkubacija fekalne materije (u PPOV ili u prirodi) može podstaći mikrobiološku transformaciju koprostanola u epikoprostanol (McCalley *et al.*, 1981). Zbog toga odnos ova dva sterola može razlikovati unos tretirane i netretirane komunalne otpadne vode (Martins *et al.*, 2007) ili može ukazati na starost fekalnog zagađenja (Adnan *et al.*, 2012). Holestanon nastaje degradacijom holesterola pod aerobnim uslovima, a epiholestanol pod anoksičnim uslovima, pa njihovo prisustvo ukazuje na intenzitet aerobne ili anaerobne mikrobiološke aktivnosti (Cordeiro *et al.*, 2008; Prost *et al.*, 2018).

Fitosteroli su prirodni konstituenti ćelijske membrane biljaka, kao što je to holesterol u humanom/životinjskom organizmu. Velike koncentracije ovih supstanci u prirodnim vodama ukazuju na unos otpadnih voda iz domaćinstava, bogatih biljnim uljima (Phillips *et al.*, 2005). Takođe, biljni steroli imaju široku upotrebu kao suplementi jer utiču na snižavanje nivoa holesterola u plazmi (Clifton, 2002). β -Sitosterol, zajedno sa stigmasterolom, kampesterolom i dezmosterolom se nalazi u otpadnim vodama drveno-prerađivačke industrije, industrije celuloze i papira (Mahmood-Khan i Hall, 2003). Sitostanol nastaje kao redukcionni proizvod transformacije β -sitosterola i kampesterola u gastrointestinalnom traktu biljojeda, pa se može koristiti za identifikaciju fekalnog zagađenja koje oni prouzrokuju (Gourmelon *et al.*, 2010).

Tabela 2.6. Trivijalni i hemijski nazivi odabranih steroidnih jedinjenja sa CAS brojevima i nominalnim masama)

	Steroid	Hemijski (IUPAC-ov) naziv	CAS broj	Nominalna masa
<i>Steroli</i>				
	Holesterol	Holest-5-en-3 β -ol	57-88-5	386
	Koprostanol	5 β -Holestan-3 β -ol	360-68-9	388
<i>Humani/ životinjski steroli</i>	Epikoprostanol	5 β -Holestan-3 α -ol	516-92-7	388
	Epiholestanol	5 α -Holestan-3 α -ol	516-95-0	388
	Holestanol	5 α -Holestan-3 β -ol	80-97-7	388
	Holestanon	5 α -Holestan-3-on	566-88-1	386
<i>Biljni steroli</i>	β -Sitosterol	24-Etilholest-5-en-3 β -ol	83-46-5	414
	Stigmasterol	24-Etilholest-5,22-dien-3 β -ol	83-48-7	412
	Kampesterol	24-Metilholest-5-en-3 β -ol	474-62-4	400
	Dezmosterol	Holesta-5,24-dien-3 β -ol	313-04-2	384
	Sitostanol	24-Etil-5 α -holestan-3 β -ol	83-45-4	416
<i>Steroidni hormoni</i>				
<i>Prirodni hormoni</i>	Estriol (E3)	1,3,5(10)-Estratrien-3,16 α ,17 β -triol	50-27-1	288
	Estron (E1)	1,3,5(10)-Estratrien-3-ol-17-on	53-16-7	270
	17 β -Estradiol (E2)	1,3,5(10)-Estratrien-3,17 β -diol	50-28-2	272
	17 α -Estradiol	1,3,5(10)-Estratrien-3,17 α -diol	57-91-0	272
	Ekvilin	1,3,5(10),7-Estratetraen-3-ol-17-on	474-86-2	268
<i>Sintetski hormoni</i>	17 α -Etinilestradiol (EE2)	1,3,5(10)-Estratrien-17 α -etinil-3,17 β -diol	57-63-6	296
	Mestranol	1,3,5(10)-Estratrien-17 α -etinil-3,17 β -diol-3-metiletar	72-33-3	310
	Noretindron	4-Estren-17 α -etinil-17 β -ol-3-on	68-22-4	298
	Levonorgestrel	4-Estren-17 α -etinil-18-homo-17 β -ol-3-on (+/-)	6533-00-2	312

Najviše istraživana grupa steroidnih jedinjenja su steroidni hormoni, prirodni i sintetski. Većina prirodnih hormona poseduje svoje analoge u sintetskim supstancama koje su proizvedene kao supstitucionni proizvodi. U radu je izabrano pet prirodnih estrogena (estriol, estron, 17 α -estradiol, 17 β -estradiol, ekvilin) i četiri sintetska hormona (estrogeni 17 α -etinilestradiol i mestranol, i gestageni noretindron i levonorgestrel). Prirodni estrogeni stimulišu razvoj ženskih polnih karakteristika i reproduktivnog sistema, dok se sintetski steroidni hormoni koriste u medicinske svrhe, poput lečenja neplodnosti, ali i za kontracepciju (Matějčiek i Kubán, 2007). Sintetski estrogeni imaju veliku primenu kao promotori rasta domaćih životinja u stočarstvu (Blackwell *et al.*, 2014).

2.10. Priprema uzoraka vode za određivanje tragova steroidnih jedinjenja

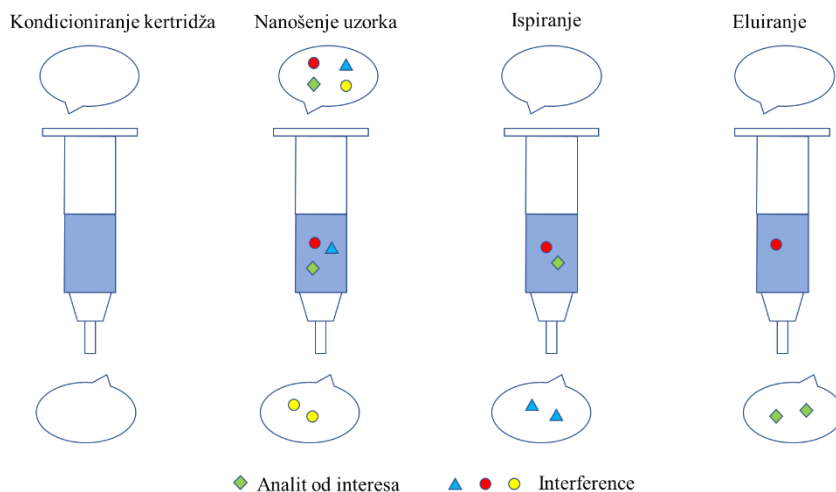
Koncentracije steroidnih jedinjenja u prirodnim i otpadnim vodama su niske, te je priprema ovakvih uzoraka neophodan korak da bi analiti bili koncentrovani i kvantifikovani primenom instrumentalnih metoda. Prilikom predkoncentrisanja, koncentruju se i sastojci vodene matrice (organskog ili neorganskog porekla) koji mogu ometati analizu, pa je neophodno ih ukloniti ili smanjiti njihov uticaj i pripremiti uzorak tako da se izoluju i koncentrišu samo analiti od interesa. Instrumentalna metoda za kvantitativnu analizu, kao i fizičko-hemijska svojstva analita (kiselo-bazna svojstva, isparljivost, stabilnost, rastvorljivost u vodi i organskim rastvaračima) i oblik uzorka (tečan, čvrsti, polu-čvrsti itd.) određuju koja će metoda pripreme biti upotrebljena. Optimalna je ona metoda koja je jednostavna, efikasna, selektivna, ekonomična, zahteva razumno vreme, a može se kombinovati sa širokim spektrom instrumentalnih metoda za kvantifikaciju analita (MARLAP Manual, 2004).

Tragovi steroidnih jedinjenja u vodenim matricama mogu se predkoncentrisati upotrebom dve metode: tečno-tečne i tečno-čvrste ekstrakcije. Primenom tečno-tečne ekstrakcije, analizirana supstanca se ekstrahuje iz jedne tečne faze u drugu u kojoj je njena rastvorljivost veća. Jednostavnost primene i aparature, kao i cena, su prednosti ove metode ekstrakcije. Međutim, nedostaci su mala selektivnost, mali broj rastvarača koji su nemešljivi i velika zapremina (sa aspekta zaštite životne sredine) utrošenog rastvarača (Silvestre *et al.*, 2009). Za ekstrakciju zagađujućih supstanci iz vodenih uzoraka iz životne sredine široko se koriste i tečno-fazne mikroekstrakcione metode (*eng.* liquid-phase microextraction, LPME). Među njima, najviše su u upotrebi disperzivna tečno-tečna mikroekstrakcija (*eng.* dispersive liquid-liquid microextraction, DLLME) i tečno-tečna mikroekstrakcija uz pomoć vorteksa (*eng.* vortex-assisted liquid-liquid microextraction) (Hashemi *et al.*, 2017). DLLME metoda se zasniva na upotrebi ekstrakcionog i disperzivnog rastvarača pomoću kojih se organske zagađujuće supstance odvajaju u vidu kapljica od vodenog uzorka i analiziraju (Chang i Huang, 2010).

Kod tečno-čvrste ekstrakcije, raspodela analita se vrši između tečnog uzorka i čvrstog sorbenta. Uzorak vode se propušta kroz poroznu čvrstu fazu koja ima veliki afinitet prema analitima koji se tako zadržavaju na sorbentu, a zatim eluiraju izborom odgovarajućeg rastvarača. Najčešće upotrebljavane tečno-čvrste metode za ekstrakciju i predkoncentrisanje steroidnih jedinjenja iz vodenih uzoraka su ekstrakcija na čvrstoj fazi (*eng.* solid-phase extraction, SPE) i mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (*eng.* solid-phase microextraction, SPME) (Andaluri *et al.*, 2017). Međutim, SPE metoda se mnogo više upotrebljava zbog veće osetljivosti, tj. nižih koncentracija koje mogu da se odrede korišćenjem ove metode. Prednosti SPE metode su brzina, efikasnost, manja potrošnja organskih rastvarača, kao i mogućnost automatizovanja, a ograničenje je upotreba skupih jednokratnih kolona pakovanih čvrstom fazom (López de Alda i Barceló, 2001).

Procedura ekstrakcije na čvrstoj fazi prikazana je na slici 2.7. Nakon izbora odgovarajuće SPE kolone, eksperimentalnu proceduru čine četiri osnovna koraka:

1. kondicioniranje kolone – propuštanje male zapremine odgovarajućeg rastvarača kroz pakovanje kolone u cilju pripreme sorbenta za adsorpciju analita
2. nanošenje uzorka – propuštanje uzorka vode kroz kolonu, pri čemu se analit adsorbuje na pakovanje kolone
3. ispiranje kolone – propuštanje minimalne zapremine odgovarajućeg rastvarača (obično dejonizovane vode sa malim sadržajem organskog rastvarača) kroz kolonu radi uklanjanja nečistoća i soli iz uzorka vode koji su se zadržali na sorbentu
4. eluiranje analita – propuštanje odgovarajućeg rastvarača u kojem se analit dobro rastvara i njegovo desorbovanje sa pakovanja kolone



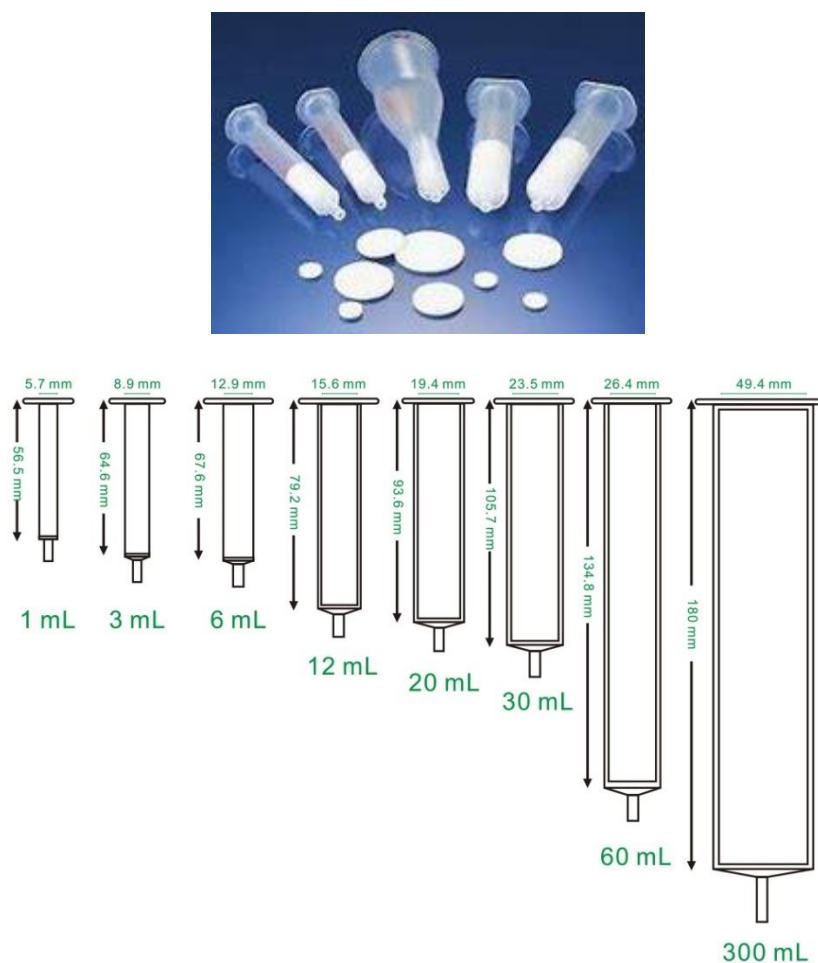
Slika 2.7. Prikaz ekstrakcije na čvrstoj fazi

Ekstrakcija na čvrstoj fazi podrazumeva upotrebu kertridža (kolona, špriceva, diskova) koji su napunjeni odgovarajućom masom (mg ili g) sorbenta, a koji mogu biti različitih oblika i zapremina, napravljeni od različitih materijala (stakleni/polietilenski/polipropilenski) (slika 2.8). Veličina čestica sorbenta kojim se kertridži pune tipično se kreće u opsegu 40–60 μm . Pakovanje sorbenta unutar kertridža drže porozne teflonske ili polietilenske/polipropilenske frite. Debljina sloja sorbenta treba da bude dovoljna da dopusti lagan protok uzorka vode kroz kertridž, a da efikasno zadrži analite od interesa tako da ne dođe do proboja (*eng.* breakthrough) kertridža, jer u tom slučaju dolazi do ispiranja analita sa sorbenta. Uzorak se propušta kroz sorbent gravitacijom ili uz pomoć pritiska ili vakuuma. Vodeni uzorak mora biti prethodno profiltriran, a postoje i kertridži koji imaju integrisane filtere (Hennion, 1999). U zavisnosti od zapremine uzorka koji se propušta kroz sorbent, postoje različiti špricevi i diskovi za brzo filtriranje i propuštanje uzorka, a zatim i eluiranje. Upotrebom tzv. laminarnih ekstrakcionih diskova moguće je u roku od 5 minuta izvršiti nanošenje 1 L uzorka na sorbent bez prethodnog filtriranja, što je veoma značajno u obradi velikog broja uzoraka (Pichon *et al.*, 1998).

Specifične interakcije analita iz vodenog uzorka sa sorbentom određuju tip ekstrakcije na čvrstoj fazi. Ekstrakcija na čvrstoj fazi može biti (Hennion, 1999):

1. normalno-fazna (nepolarina matrica uzorka, polarni analiti i sorbent). Sorbenti: hemijski modifikovani silikatni materijali sa vezanim polarnim funkcionalnim grupama.
2. reverzno-fazna (polarna matrica uzorka, nepolaran/slabo polaran analit i nepolaran sorbent). Sorbenti: silikatni materijali modifikovani nepolarnim alkil (C_{18} i C_8) ili aril grupama.
3. jonoizmenjivačka (sorbent sa katjonskim/anjonskim funkcionalnim grupama zadržava jone analita suprotnog naelektrisanja).

Za ekstrakciju steroidnih jedinjenja iz vodenih uzoraka najčešće se koristi reverzno-fazna SPE metoda, uz korišćenje C_{18} sorbenta, tj. silikatnog materijala modifikovanog C_{18} -grupama (Noblet *et al.*, 2004; Vulliet *et al.*, 2008; Zali *et al.*, 2021). Prilikom modifikovanja silikatnog materija, poput silika-gela, nije moguće ostvariti reakciju sa svim raspoloživim silanolnim grupama, pa se one koje nisu derivatizovane često dalje modifikuju kako bi im se smanjila aktivnost. To se obično radi uz pomoć reagensa sa trimetilsilil-grupama (npr. trimetilsilil-hlorid). Ovaj postupak se naziva „end-capping“ i smanjuje neželjene interakcije polarnih ili naelektrisanih analita sa pakovanjem. Tokom postupka nastaje manje polaran i manje kiseo silikatni materijal (Hennion, 1999).



Slika 2.8. Kolone za izvođenje ekstrakcije na čvrstoj fazi
(AuroraPro Scientific, 2023; GenPore, 2023)

Ekstrakcija zagađujućih supstanci iz vodenih uzoraka iz životne sredine je posebno unapređena uvođenjem polimernih sorbenata. Ovi materijali su omogućili multirezidualnu ekstrakciju širokog spektra supstanci sa veoma različitom polarnošću i različitim kiselo-baznim svojstvima. Najčešće korišćen polimerni sorbent za ekstrakciju tragova emergentnih zagađujućih supstanci iz vodenih uzoraka je HLB (*eng.* hydrophilic-lipophilic balance) sorbent (Oasis, Waters, SAD), sa uravnoteženim hidrofilnim i lipofilnim svojstvima koji omogućava ekstrakciju kiselih, neutralnih i baznih analita u širokom opsegu vrednosti pH. Hidrofilna svojstva potiču od N-vinilpirolidona, a lipofilna svojstva od divinilbenzena. U mnogim studijama je upotrebljen za ekstrakciju i predkoncentrisanje steroidnih jedinjenja (Gourmelon *et al.*, 2010; András *et al.*, 2013; Chou *et al.*, 2015). Često su u upotrebi i SPE kolone pakovane kopolimerom stirena i divinilbenzena, ali se obično koriste zajedno sa kolonama punjenim nepolarnim sorbentom poput ugljeničnog (Kong *et al.*, 2015) ili C18 (Wang *et al.*, 2012).

Na efikasnost ekstrakcije analita veoma utiče pH-vrednost uzorka vode jer određuje hemijski oblik analita, njegovu stabilnost i interakciju sa sorbentom (Díaz-Cruz i Barceló, 2005). Veliki uticaj na efikasnost ekstrakcije, ali i na instrumentalnu analizu, imaju sastojci matrice prirodnih i otpadnih voda koji mogu da se eluiraju zajedno sa analitima od interesa. Njihov uticaj je veći na nižim pH-vrednostima. Prisustvo sastojaka matrice može uticati na smanjenje adsorpcije analita, ali i na brže dostizanje proboja kertridža. Takođe, može doći do smanjenja efikasnosti jonizacije analita i ometanja njihove detekcije (Pichon *et al.*, 1998).

Na slici 2.9 je prikazana aparatura neophodna za izvođenje ekstrakcije na čvrstoj fazi, za istovremenu ekstrakciju većeg broja uzoraka. Aparatura se sastoji od staklene kade sa izvodom za vezivanje vakuum pumpe. Na izvodu se nalazi manometar koji reguliše pritisak. Staklena kada se zatvara perforiranim poklopcem na koji se postavljaju SPE kolone pakovane odabranim sorbentom. Unutar kade se postavlja stalak sa kivetama tako da se ispod svake kolone nalazi kiveta u kojoj se sakuplja ekstrakt dobijen eluiranjem sorbenta pogodnim rastvaračem.



Slika 2.9. Aparatura za ekstrakciju na čvrstoj fazi (Biocomma, 2023; Coleparmer, 2023)

2.11. Ekstrakcija suspendovanog materijala uzoraka vode za određivanje tragova steroidnih jedinjenja

Za ekstrakciju analita iz suspendovanog materijala uzoraka vode mogu da se koriste sledeće metode:

1. Soksletova ekstrakcija (*eng.* Soxhlet extraction)
2. ultrazvučna ekstrakcija (*eng.* ultrasonic extraction)
3. mikrotalasna ekstrakcija (*eng.* microwave-assisted extraction)
4. tečna ekstrakcija pod pritiskom (*eng.* pressurized liquid extraction)

Soksletova ekstrakcija je najčešće korišćena metoda ekstrakcije organskih jedinjenja iz čvrstih matrica. Prednosti metode su jednostavnost i ekonomičnost. U poređenju sa drugim metodama, nedostaci Soksletove ekstrakcije su trajanje (6–24 h) i upotreba velike količine rastvarača (150–500 mL). Zbog korišćenja velikih zapremina rastvarača, neophodno je uparavanje uzorka nakon ekstrakcije, a iskorišćeni organski rastvarač predstavlja problem po životnu sredinu (Morales-Muñoz *et al.*, 2005).

Kod ultrazvučne ekstrakcije, za homogenizaciju i ekstrakciju analita iz čvrstih uzoraka koriste se ultrazvučni talasi. Prednosti metode su trajanje (10–60 min) i upotreba manjih zapremina organskih rastvarača. Ova metoda se odvija na sobnoj temperaturi i atmosferskom pritisku (Liu *et al.*, 2011a).

Kod mikrotalasne ekstrakcije, zagrevanjem organskog rastvarača u mikrotalasnoj pećnici postiže se ekstrakcija organskih zagađujućih supstanci iz čvrstih matrica. Prednost metode je vreme ekstrakcije (10–30 min) i manja zapremina rastvarača (10–70 mL) (Liu *et al.*, 2004).

Tečna ekstrakcija pod pritiskom se odvija na visokim pritiscima (7–21 MPa) i temperaturama od 40 °C do 200 °C. Na povišenim pritiscima i temperaturama ekstrakcija rastvaračem je efikasnija zbog veće rastvorljivosti i bolje interakcije rastvarača sa čvrstom matricom. Naime, na 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) (Zhang *et al.*, 2011; Herrero *et al.*, 2013).

2.12. Instrumentalne metode za analizu tragova steroidnih jedinjenja

Savremene analitičke metode se razvijaju u skladu sa izazovom određivanja sve nižih koncentracija zagađujućih supstanci u raznovrsnim matricama životne sredine. Odabir analitičke metode zavisi prvenstveno od prirode i fizičko-hemijskih svojstava supstanci, ali i od koncentracionih nivoa u životnoj sredini. Kada je u pitanju određivanje tragova organskih jedinjenja u uzorcima iz životne sredine, hromatografske tehnike su nezaobilazne. Tečna hromatografija (*eng.* liquid chromatography, LC) i gasna hromatografija (*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), su najčešće korišćene metode za analizu sterola i steroidnih hormona. Za analizu sterola generalno se koristi GC-MS metoda (Gourmelon *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2011). Međutim, ova metoda je pogodnija za termički stabilne i isparljive supstance, a steroli to nisu. Ovo ograničenje se može prevazići prevođenjem u derivate, a ovaj korak u pripremi uzoraka zahteva dodatno vreme i troškove (Wu *et al.*, 2009). Priprema različitih vrsta uzoraka za analizu podrazumeva upotrebu različitih metoda u cilju koncentrisanja analita od interesa, kao i smanjenja ili eliminisanja uticaja nečistoća iz matrice.

LC-MS metoda se široko primenjuje za analizu steroidnih hormona u površinskim vodama (Lima Gomes *et al.*, 2013; Chou *et al.*, 2015; Rechsteiner *et al.*, 2020), podzemnim vodama (Vulliet *et al.*, 2008) i sedimentima (Wang *et al.*, 2012), kao i u otpadnim vodama (Chen *et al.*, 2009; Guo *et al.*, 2013), procednim vodama deponija (Masoner *et al.*, 2016) i u vodi za piće (Naldi *et al.*, 2016). Što se sterola tiče, LC-MS se najviše koristi za analizu biljnih sterola u biološkim uzorcima (Baila-Rueda *et al.*, 2013; John *et al.*, 2014) i biljnim uljima (Martínez-Vidal *et al.*, 2007). U literaturi se može naći svega nekoliko radova dve grupe autora o LC-MS analizi humanih/životinjskih i biljnih sterola u sedimentima (Matić *et al.*, 2014; Bataglione *et al.*, 2015, 2016), dok su vodeni uzorci iz životne sredine analizirani LC-MS metodom na prisustvo sterola u samo jednom radu (Wang i Gardinali, 2012). Sadržaj sterola i steroidnih hormona u suspendovanoj materiji vodenih uzoraka nikada nije ispitivan LC-MS metodom.

Pošto steroli i steroidni hormoni pripadaju istoj hemijskoj grupi steroidnih jedinjenja i imaju iste puteve dospevanja u životnu sredinu, postoji potreba za metodom za njihovo istovremeno određivanje. Ipak, u literaturi je zabeležen mali broj metoda za njihovu zajedničku analizu, a gotovo sve se zasnivaju na primeni gasne hromatografije u sprezi sa masenom spektrometrijom (Furtula *et al.*, 2012; András *et al.*, 2013; Gottschall *et al.*, 2013) ili masenom spektrometrijom visoke rezolucije (Ikonomou *et al.*, 2008). Zajednička analiza sterola i steroidnih hormona uz upotrebu tečne hromatografije u sprezi sa masenom hromatografijom u literaturi je izuzetno retka. Objavljene su dve metode za istovremenu LC-MS analizu sterola i steroidnih hormona (Wang i Gardinali, 2012; Matić *et al.*, 2014). Međutim, u studiji iz 2014. godine, četiri humana/životinjska sterola nisu potpuno hromatografski razdvojeni, već su detektovani kao triplet u masenom hromatogramu.

2.12.1. Tečna hromatografija visokih performansi

Tečna hromatografija visokih performansi (*eng.* high performance liquid chromatography, HPLC) je najčešće korišćena tehnika tečne hromatografije za razdvajanje komponenata smeše organskih jedinjenja, koje se zatim identifikuju i kvantifikuju spektroskopskim metodama. Osnovni principi HPLC tehnike su (Gika *et al.*, 2016):

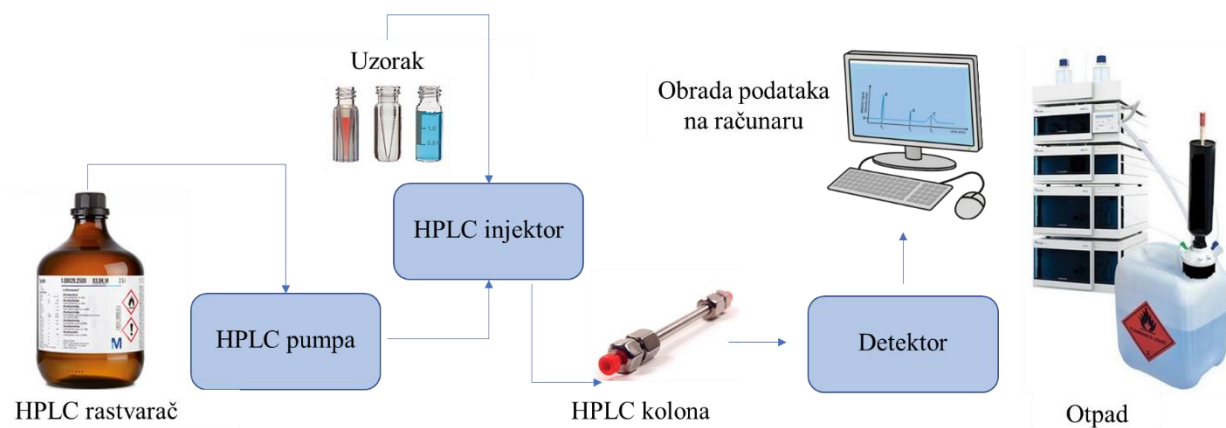
- ✓ Razdvajanje komponenata smeše se odvija u koloni, na osnovu različitih interakcija komponenata sa stacionarnom i mobilnom fazom.
- ✓ Stacionarna faza je materijal sa veoma malim česticama i time velikom kontaktnom površinom i predstavlja pakovanje hromatografske kolone.
- ✓ Mobilna faza je rastvarač ili smeša rastvarača koja pod visokim pritiskom prolazi kroz kolonu.
- ✓ Uzorak se injektuje u tok mobilne faze neposredno pre kolone.
- ✓ Komponente uzorka prolaze kroz kolonu različitim brzinama zbog različitog stepena interakcije sa stacionarnom fazom.
- ✓ Nakon napuštanja kolone, razdvojene komponente se detektuju, a detektor šalje signal računaru.
- ✓ Konačni rezultat je hromatogram koji omogućava identifikaciju i kvantifikaciju detektovanih komponenata smeše.

Zbog različitih interakcija komponenata smeše sa stacionarnom i mobilnom fazom, zadržavanje supstanci u hromatografskom sistemu različito traje i predstavlja retenciono vreme. Kvalitativna analiza se izvodi poređenjem retencionog vremena analita iz uzorka sa retencionim vremenom analita iz standardnog rastvora, pod istim eksperimentalnim uslovima. Međutim, retenciono vreme nije dovoljno specifično za pouzdanu identifikaciju analita, pa se taj problem rešava kombinovanjem tečne hromatografije sa tehnikama koje pružaju dodatne informacije o analitu, poput masene spektrometrije.

Tečna hromatografija visokih performansi je metoda izbora za supstance različitih polarnosti, koje su termički nestabilne i slabo isparljive. Mobilna faza se primenjuje pod visokim pritiskom koji ne bi smeo da pređe 400 bar. Sastoji se od smeše rastvarača, a analit mora da bude rastvoran u jednom od njih. Mobilna faza takođe mora biti visoke čistoće, hemijski inertna i kompatibilna sa detektorom. Kroz HPLC sistem može proticati izokraski (sastav se ne menja tokom vremena, pri konstantnom protoku) ili gradijentno (udeo rastvarača se menja tokom vremena, pri konstantnom ili promenljivoj protoku). Hromatografska kolona se sastoji od cilindričnog kućišta od nerđajućeg čelika, dužine od 50 do 500 mm, sa pakovanjem veličine čestica 3–10 μm . Čestice su obično sfernog oblika, ujednačene veličine, silikatnog ili polimernog sastava, sa određenim brojem modifikovanih aktivnih centara sa specifičnim hemijskim grupama neophodnim za specifične interakcije. Stacionarna faza mora da bude nerastvorljiva u mobilnoj fazi, stabilna na promene pritiska, temperature i pH-vrednosti. Velika specifična površina pakovanja kolone omogućava visok stepen razdvajanja, tj. visoku rezoluciju (Gika *et al.*, 2016).

Osnovni delovi HPLC uređaja su prikazani na slici 2.10:

- boce sa rastvaračima koji čine mobilnu fazu
- pumpa (obezbeđuje visok pritisak i stabilan protok mobilne faze)
- injektor (sistem za unošenje uzorka u tok mobilne faze)
- kolona (sa stacionarnom fazom)
- detektor (UV, maseni, itd.)
- računar (sistem za obradu podataka)



Slika 2.10. Osnovni delovi tečnog hromatografa visokih performansi

2.12.2. Masena spektrometrija

Masena spektrometrija je analitička tehnika kojom se komponente uzorka identifikuju prema odnosu njihove mase i naelektrisanja (m/z). Jedna od najvažnijih prednosti ove metode je izuzetna osetljivost i mogućnost razlikovanja hemijskih supstanci u kompleksnoj smeši. Masena spektrometrija se koristi za određivanje sastava nepoznatog uzorka (kvalitativna analiza), izotopskog sastava uzorka, strukture molekula na osnovu fragmentacije molekula, molarne mase supstance, količine supstance u uzorku (kvantitativna analiza), fizičkih i hemijskih svojstava materije, kao i za proučavanje ponašanja jona u vakuumu. Ova tehnika se zasniva na jonizaciji uzorka, pri čemu se dobijaju molekularni joni ili njihovi fragmenti, a zatim se meri njihov m/z odnos. Postupak analize u masenom spektrometru se sastoji od unošenja uzorka, jonizacije uzorka nekom od različitih tehnika jonizacije (u jonskom izvoru), razdvajanju jona dejstvom električnog i/ili magnetnog polja na osnovu m/z odnosa (u masenom analizatoru), detekcije jona i dobijanju masenog spektra uzorka. Maseni spektar predstavlja grafički prikaz odnosa relativne količine jona i vrednosti m/z odnosa. U njemu se mogu naći molekularni joni (daju podatak o masi molekula uzorka), fragmentni joni (daju podatak o strukturi molekula uzorka), izotopski joni (daju podatak o elementarnom sastavu molekula uzorka), preuređeni joni nastali gubitkom malih neutralnih molekula (npr. H_2O , HCN) i višestruko naelektrisani joni (Herbert i Johnstone, 2002).

Za izvođenje maseno-spektrometrijske analize potrebne su vakuum pumpe koje obezbeđuju vakuum (obično 10^{-6} – 10^{-7} Torr, 1 Torr = 133,3 Pa) neophodan za sprečavanje sudaranja jona sa molekulima inertnog gasa (najčešće He ili Ar) ili vazduha u masenom analizatoru, na putu od jonskog izvora do detektora, što bi dovelo do njihovog razelektrisanja (Abian, 1999).

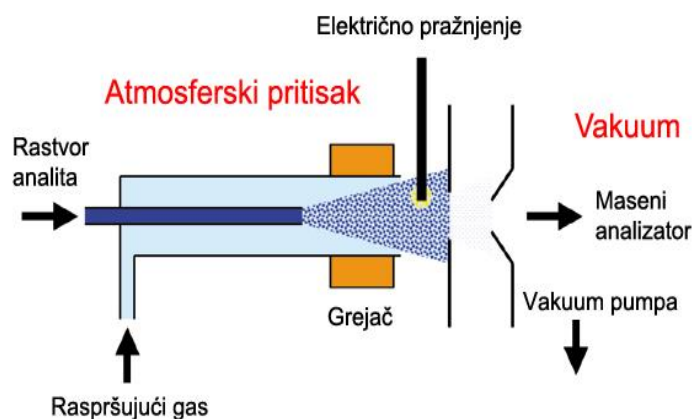
2.12.2.1. Tehnike jonizacije

Za jonizaciju uzorka u jonskom izvoru masenog spektrometra mogu se koristiti različite tehnike (Voyksner, 1994; Herbert i Johnstone, 2002):

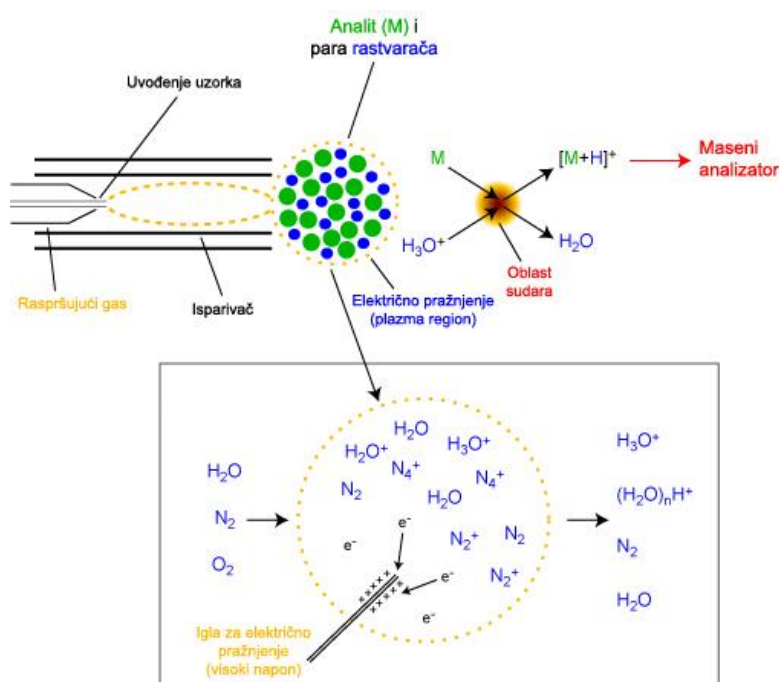
- jonizacija elektronskim udarom (*eng.* electron impact ionization, EI)
- termosprej jonizacija (*eng.* thermospray ionization, TS)
- hemijska jonizacija (*eng.* chemical ionization, CI)
- hemijska jonizacija na atmosferskom pritisku (*eng.* atmospheric pressure chemical ionization, APCI)
- elektrosprej jonizacija (*eng.* electrospray ionization, ESI)
- MALDI (*eng.* matrix-assisted laser desorption ionization) itd.

APCI i ESI spadaju u „meke“ jonizacione tehnike pri kojima dolazi do ograničene fragmentacije molekula analita. Obe tehnike se odigravaju na atmosferskom pritisku i najčešće se koriste u LC-MS analizi. Kod APCI, jonizacija se odigrava u gasnoj fazi, za razliku od ESI kod koje se dešava u tečnoj fazi (Dong *et al.*, 2018). Za jonizaciju polarnijih analita najčešće se koristi ESI, dok se APCI obično koristi za jonizaciju srednje i slabo polarnih analita (Abian, 1999; Holčapek *et al.*, 2012). Kao slabo polarna jedinjenja, steroli ne jonizuju u elektrosprej izvoru, dok se polarniji steroidni hormoni mogu jonizovati korišćenjem obe tehnike. Zbog toga je u zajedničkoj metodi za analizu tragova sterola i steroidnih hormona pogodniji APCI za jonizaciju svih ispitivanih analita.

Na slici 2.11 prikazan je mehanizam delovanja APCI jonskog izvora. Proces započinje tako što se rastvor analita uvodi u pneumatski raspršivač, gde se u struji azota formira sprej. Nastale kapljice se zatim desolvatizuju u zagrejanj kvarcnoj cevi, a analiti iz uzorka se prevode u gasovito stanje. Pomoću električnog pražnjenja (*eng.* corona discharge) nastaje niz primarnih i sekundarnih jona koji u daljim sudarima sa molekulima analita formiraju jone analita, najčešće protonovane molekule $[M+H]^+$ (slika 2.12). Formirani joni prolaze kroz jonsku kapilaru do masenog analizatora (Abian, 1999; Weston, 2010).



Slika 2.11. Prikaz hemijske jonizacije na atmosferskom pritisku (Dong *et al.*, 2018)



Slika 2.12. Prikaz APCI tehnike i jona koji nastaju električnim pražnjenjem (Gates, 2022)

Prednosti upotrebe APCI tehnike za jonizaciju analita su (Ardrey, 2003; Dong *et al.*, 2018):

- iako je analit izložen većim temperaturama (nego kod npr. elektrospreja), termički nestabilna jedinjenja se mogu proučavati bez razlaganja
- optimalna je za jonizaciju slabo do umereno polarnih jedinjenja
- kao „meko“ tehnika jonizacije, omogućava određivanje molekulske mase analita koji se proučava
- može da se primenjuje pri protocima mobilne faze do 2 mL min^{-1}
- manje je osetljiva na prisustvo pufera u mobilnoj fazi (od npr. ESI)
- manje je osetljiva na promene eksperimentalnih uslova (od npr. ESI)

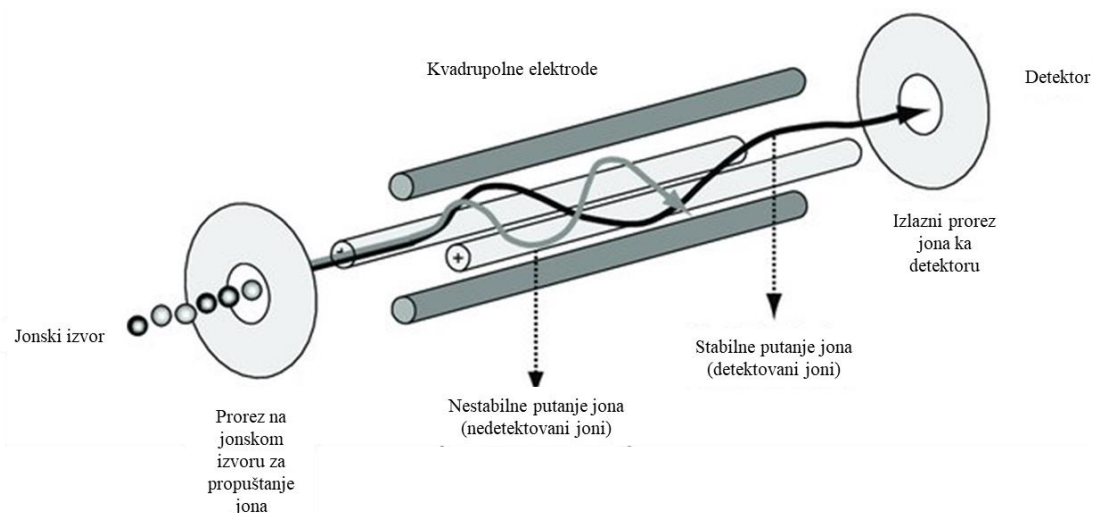
Nedostaci APCI tehnike su (Ardrey, 2003; Dong *et al.*, 2018):

- spektri mogu sadržati adukte analita sa sastojcima mobilne faze koji mogu ometati interpretaciju rezultata
- ako se ne koristi MS/MS fragmentacija, strukturne informacije o analitu nisu dostupne
- jonizacija nije efikasna pri veoma malim protocima mobilne faze

2.12.2.2. Maseni analizatori

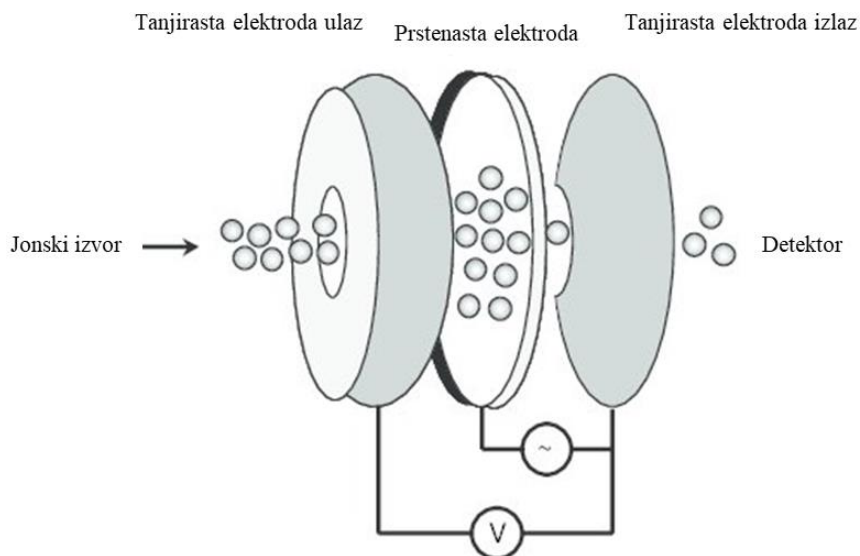
Nakon jonizacije u jonskom izvoru, joni analita ulaze u maseni analizator koji se nalazi pod vakuumom. Postoji veliki broj masenih analizatora kod kojih se na različite načine vrši separacija jona na osnovu m/z odnosa, kao što su:

- magnetni analizator
- analizator vremena preleta jona (*eng.* time of flight, TOF)
- kvadrupol
- jonski trap
- orbitrap i dr.



Slika 2.13. Prikaz kvadrupolnog masenog analizatora (Cajka *et al.*, 2008)

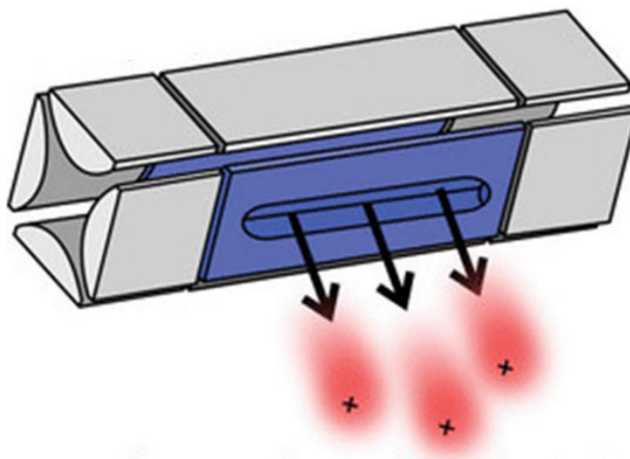
Kod magnetnog analizatora se separacija jona odvija u magnetnom polju, kod kvadrupola u električnom polju, a kod jonskog trapa u trodimenzionalnom električnom polju. Selektivnost masenog analizatora zavisi od rezolucije, opsega molekulskih masa i brzine snimanja spektra, a izbor analizatora zavisi od zahteva analize. Nemački fizičar Wolfgang Pol (Wolfgang Paul) je 50-ih godina 20. veka opisao uspešno razvijen kvadrupolni analizator iz koga je kasnije nastao jonski trap. Primenom definisane radiofrekvencije i stalnih potencijala između četiri paralelne elektrode dolazi do separacije jona tako da samo oni sa m/z odnosom u okviru određenog raspona mogu izvoditi oscilacije konstantne amplitude, imati stabilne putanje i prikupljati se na kraju analizatora, kroz prorez ka detektoru (slika 2.13). Wolfgang Pol je 1989. godine dobio Nobelovu nagradu iz fizike za ovaj pronalazak (Dong *et al.*, 2018).



Slika 2.14. Prikaz 3D jonskog trapa (Cajka *et al.*, 2008)

Jonski trap je maseni analizator niske rezolucije, visoke osetljivosti, sa mogućnošću skeniranja više jonskih proizvoda. Sastoji se od jedne cilindrične prstenaste elektrode i dve elektrode tanjirastog oblika (slika 2.14). Jedna od tanjirastih elektroda ima centralni otvor kroz koji se joni uvode u trap, dok druga tanjirasta elektroda ima nekoliko otvora kroz koje joni prolaze do detektora. Unutar trapa joni se kreću po stabilnim trodimenzionalnim putanjama i mogu se čuvati u trapu od nekoliko milisekundi do nekoliko sati. U 3D jonskom trapu je prisutan i helijum koji u sudaru sa jonima smiruje njihove oscilacije i stabilise ih. Promenom električnog polja prstenaste elektrode joni se izbacuju iz trapa na osnovu m/z odnosa do detektora, pri čemu se dobija maseni spektar (March, 1998).

U poređenju sa trodimenzionalnim jonskim trapom, linearni trap (2D trap) ima veći kapacitet skladištenja jona, što doprinosi povećanju opsega analitičkog određivanja i osetljivosti masenog analizatora. Linearni jonski trap se sastoji od dva para elektroda koje su podeljene u tri segmenta (slika 2.15). Četiri elektrode su tako postavljene da se u središnjem segmentu dve naspramne elektrode nalaze prorezi za izbacivanje jona ka detektoru. Prilikom uvođenja jona u trap, svaki segment elektroda se nalazi na različitom naponu. U trapu se nalazi inertan gas, najčešće helijum, kako bi se interakcije jona svele na minimum i obezbedile njihove stabilne putanje. Povećanjem napona, joni se prema m/z odnosu izbacuju iz trapa kroz proreze na elektrodama ka detektoru (Herbert i Johnstone, 2002; Douglas *et al.*, 2005).



Slika 2.15. Prikaz 2D linearnog jonskog trapa (Douglas *et al.*, 2005)

2.12.2.3. Tandem masena spektrometrija

Važnost masene spektrometrije kao tehnike je u tome što može da obezbedi informaciju o molekulskoj masi analita, ali i informacije koje se odnose na strukturu molekula analita, a koje se mogu dobiti fragmentacijom. Postoje dva načina na koje se ovo može ostvariti. Jedan od njih je tzv. fragmentacija u izvoru (*eng.* in source fragmentation), a drugi način je primena tandem masene spektrometrije (MS/MS). Tandem masena spektrometrija je tehnika u kojoj se prvo izoluju joni od interesa, a zatim vrši njihova fragmentacija (putem sudara sa inertnim gasom) i analiza dobijenih fragmentnih jona. Selekcija jona, fragmentacija i naknadna analiza proizvoda se u jonskom trapu izvodi u istom prostoru, ali u različito vreme. Jedna od bitnih prednosti jonskog trapa u odnosu na druge masene analizatore je mogućnost višestepene tandem masene spektrometrije (MS^n), gde n predstavlja broj konsektivnih reakcija fragmentacije. Ovo je važno kod analita sa istom molekulskom masom koji će imati različite fragmentne jone, čime će se nedvosmisleno utvrditi o kom analitu se radi. Prednost tandem masene spektrometrije je i ta da je moguće identifikovati i razlikovati supstance koje nisu potpuno hromatografski razdvojene. Međutim, u slučaju izomernih jedinjenja, koja imaju identične molekulske mase i fragmentne jone, ipak je neophodno postići potpuno hromatografsko razdvajanje (Herbert i Johnstone, 2002; Ardrey, 2003).

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Priprema rastvora odabranih steroidnih jedinjenja i korišćeni reagensi

U tabeli 3.1 prikazane su hemijske strukture i nominalne mase odabranih humanih/životinjskih i biljnih sterola, kao i prirodnih i sintetskih steroidnih hormona.

Tabela 3.1. Hemijske i strukturne formule i nominalne mase odabranih steroidnih jedinjenja

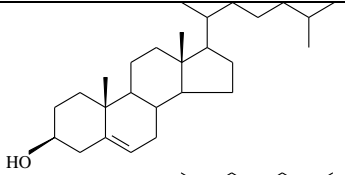
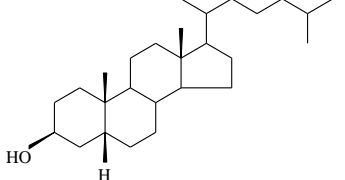
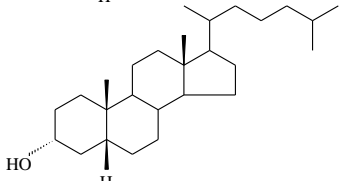
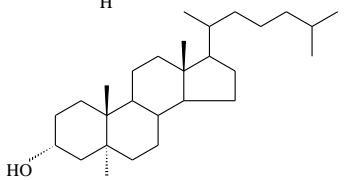
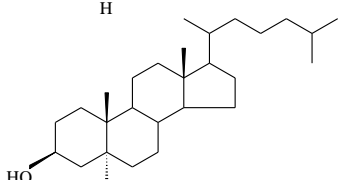
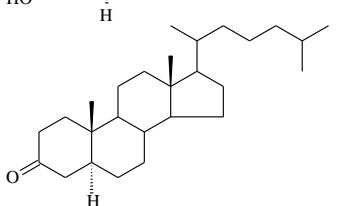
Steroid	Hemijska formula	Nominalna masa	Hemijska struktura
<i>Humani/životinjski steroli</i>			
Holesterol	$C_{27}H_{46}O$	386	
Koprostanol	$C_{27}H_{48}O$	388	
Epikoprostanol	$C_{27}H_{48}O$	388	
Epiholestanol	$C_{27}H_{48}O$	388	
Holestanol	$C_{27}H_{48}O$	388	
Holestanon	$C_{27}H_{46}O$	386	

Tabela 3.1 (nastavak)

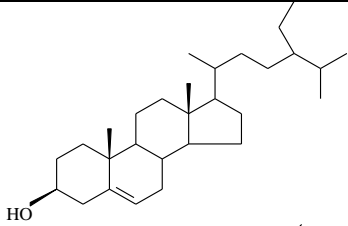
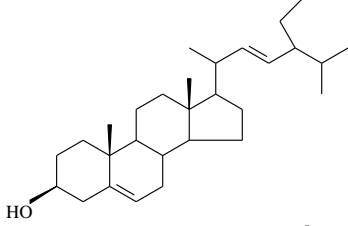
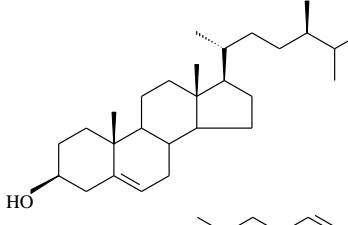
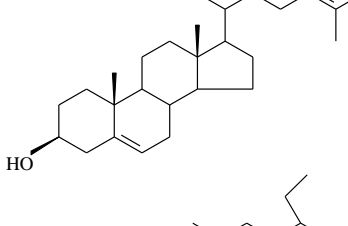
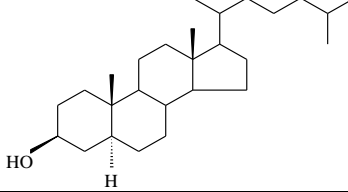
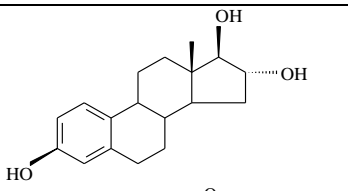
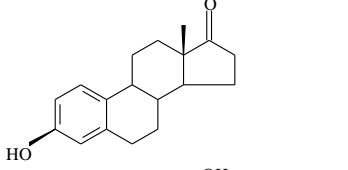
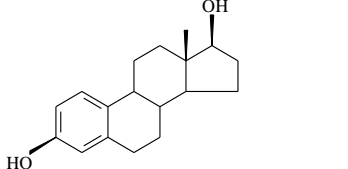
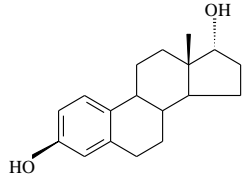
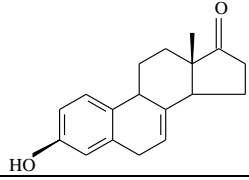
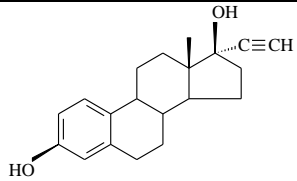
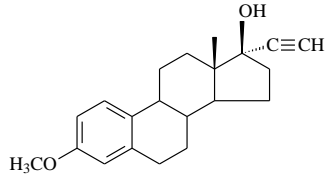
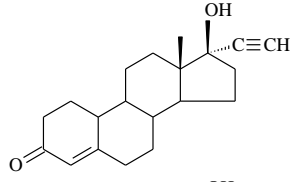
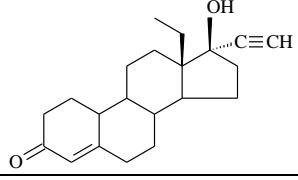
Steroid	Hemijska formula	Nominalna masa	Hemijska struktura
<i>Biljni steroli</i>			
β -Sitosterol	$C_{29}H_{50}O$	414	
Stigmasterol	$C_{29}H_{48}O$	412	
Kampesterol	$C_{28}H_{48}O$	400	
Dezmosterol	$C_{27}H_{44}O$	384	
Sitostanol	$C_{29}H_{52}O$	416	
<i>Prirodni hormoni</i>			
Estriol (E3)	$C_{18}H_{24}O_3$	288	
Estron (E1)	$C_{18}H_{22}O_2$	270	
17 β -Estradiol (E2)	$C_{18}H_{24}O_2$	272	

Tabela 3.1 (nastavak)

Steroid	Hemijska formula	Nominalna masa	Hemijska struktura
17 α -Estradiol	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	272	
Ekvilin	C ₁₈ H ₂₀ O ₂	268	
Sintetski hormoni			
17 α -Etinilestradiol (EE2)	C ₂₀ H ₂₄ O ₂	296	
Mestranol	C ₂₁ H ₂₆ O ₂	310	
Noretindron	C ₂₀ H ₂₆ O ₂	298	
Levonorgestrel	C ₂₁ H ₂₈ O ₂	312	

Za eksperimentalni rad korišćeni su analitički standardi visoke čistoće (> 99%) za dvadeset steroida: šest humanih/životinjskih sterola (holesterol, koprostanol, epikoprostanol, epiholestanol, holestanol i holestanon), pet biljnih sterola (β -sitosterol, stigmasterol, kampesterol, dezmosterol i sitostanol) i devet hormona (estriol, estron, 17 β -estradiol, 17 α -estradiol, ekvilin, 17 α -etinilestradiol, mestranol, noretindron i levonorgestrel) proizvođača Steraloids Inc. (Newport, SAD). Standardni rastvori svakog analita su pripremljeni u metanolu, pri koncentraciji od 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Zajednički standardni rastvor svih steroida pripremljen je tako da svaki analit u smeši ima koncentraciju 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Za potrebe eksperimenata, zajednički standardni rastvor svih steroida je razblaživan do nižih koncentracija. Svi standardni rastvori su čuvani na temperaturi od $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Korišćeni organski rastvarači (acetonitril, metanol, dihlormetan i etil-acetat) su bili HPLC čistoće, proizvođača J.T. Baker (Deventer, Holandija) ili Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemačka). Koncentrovana sirćetna kiselina i rastvor amonijaka, korišćeni za podešavanje pH vrednosti vodenih uzoraka, bili su analitičke čistoće. Dejonizovana voda je dobijena propuštanjem destilovane vode kroz GenPure dejonizator (TKA, Niederelbert, Nemačka) za dobijanje ultra čiste vode (provodnosti 0,055 $\mu\text{S cm}^{-1}$).

3.2. Snimanje masenih spektara steroidnih jedinjenja

Maseni spektri analita dobijeni su korišćenjem LTQ XL linearnog jonskog trapa (Thermo Scientific, Waltham, SAD). Korišćene su dve jonizacione tehnike: hemijska jonizacija na atmosferskom pritisku (APCI) i elektrosprej jonizacija (ESI). Maseni spektri svakog analita su snimljeni pri koncentraciji od $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, unošenjem standardnog rastvora u metanolu direktno u maseni spektrometar, bez struje mobilne faze. Utvrđeno je da je efikasna jonizacija svih odabranih steroidnih jedinjenja postignuta upotrebom APCI tehnike, dok ESI nije pokazala visoku efikasnost u jonizaciji svih sterola i steroidnih hormona. Optimizovani su parametri APCI jonskog izvora: temperatura kapilare ($200 \text{ }^\circ\text{C}$) i temperatura isparivača ($400 \text{ }^\circ\text{C}$). U spektru svakog analita odabran je najintenzivniji jon kao prekursor, a zatim je izvršena optimizacija energije sudara sa atomima helijuma u jonskom trapu (tzv. kolizione energije) kako bi se dobio najintenzivniji i najstabilniji fragmentni jon za reakciju identifikacije i kvantifikacije steroida. Daljim fragmentisanjem dobijenih jona, odabrani su drugi fragmentni joni neophodni za reakciju potvrde prisustva analita. Obrada rezultata izvršena je pomoću softverskih paketa Xcalibur v. 2.2 (Thermo Scientific, SAD).

3.3. Optimizacija hromatografskog razdvajanja steroidnih jedinjenja

U ovom radu je korišćen Dionex UltiMate 3000 HPLC sistem (Thermo Scientific, SAD). Hromatografsko razdvajanje steroida je vršeno na reverzno-faznoj Zorbax Eclipse[®] XDB-C8 koloni, dimenzija $150 \text{ mm} \times 3,0 \text{ mm}$ sa česticama veličine $3,5 \mu\text{m}$ (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD). Korišćena je i odgovarajuća Zorbax Eclipse[®] XDB-C8 predkolona, dimenzija $12,5 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$ sa česticama veličine $5 \mu\text{m}$. Mobilna faza se sastojala od dejonizovane vode, acetonitrila i 10% (v/v) vodenog rastvora sirćetne kiseline. Zapremina od $10 \mu\text{L}$ uzorka je injektovana u sistem. Ispitivanjem različitih gradijenata mobilne faze utvrđeno je da se optimalno hromatografsko razdvajanje steroidnih jedinjenja postiže korišćenjem gradijenta prikazanog u tabeli 3.2. Nakon 45 min analize, početni uslovi su ponovo uspostavljeni i zadržani narednih 10 min, kao priprema za sledeću analizu.

Tabela 3.2. Sastav i gradijent mobilne faze za optimalno hromatografsko razdvajanje odabranih steroidnih jedinjenja

Vreme (min)	Protok (mL min^{-1})	Dejonizovana voda (%)	Acetonitril (%)	10% (v/v) rastvor sirćetne kiseline (%)
00,00	0,4	50	45	5
10,00	0,4	45	50	5
10,01	1,5	12	83	5
20,00	1,5	12	83	5
20,01	0,4	12	83	5
35,00	0,4	12	83	5
40,00	0,4	0	95	5
45,00	0,4	0	95	5
45,01	0,4	50	45	5
55,00	0,4	50	45	5

3.4. Optimizacija LC-MS/MS parametara

Nakon izbora odgovarajućih hromatografskih uslova i sastava mobilne faze, optimizovani su instrumentalni uslovi za dodatno povećanje osetljivosti i pouzdanu identifikaciju i potvrdu prisustva tragova odabranih analita. Standardni rastvor svakog analita koncentracije $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ je unosen u tok mobilne faze upotrebom eksternog špric injektora. Sastav mobilne faze je menjan u skladu sa uslovima pri kojima svaki pojedinačni analit eluira sa kolone, prema gradijentu prikazanom u tabeli 3.2. Na osnovu rezultata konsektivnih reakcija fragmentacije prekursor jona, izabrane su karakteristične reakcije fragmentacije za kvantitativno određivanje, a zatim i za potvrdu prisustva svakog analita u konačno razvijenoj LC-MS/MS metodi. Za svaki analit, prilikom praćenja odabrane reakcije fragmentacije (*eng.* selected reaction monitoring, SRM), izvršena je optimizacija širine opsega izolacije prekursor jona, izbor optimalne kolizione energije i identifikacija najintenzivnijeg fragmentnog jona. SRM detekcija podeljena je na devet vremenskih segmenata. U svakom segmentu su snimane maksimalno četiri reakcije fragmentacije, kako bi se zadržala optimalna osetljivost masenog detektora. Iako tandem masena spektrometrija omogućava analizu različitih analita bez potpune hromatografske separacije, zbog postojanja velikog broja izomera među odabranim steroidnim jedinjenjima bilo je neophodno hromatografski ih potpuno razdvojiti.

3.5. Priprema uzoraka

3.5.1. Optimizacija ekstrakcije na čvrstoj fazi uzoraka vode

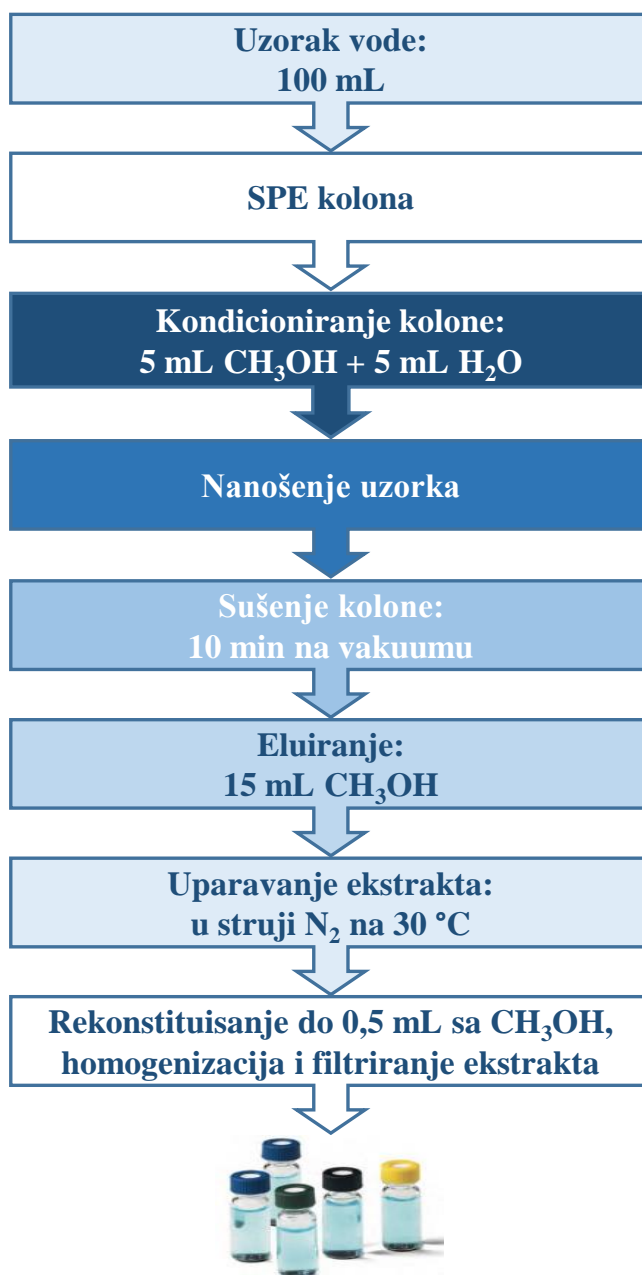
Priprema uzoraka vode SPE metodom podrazumeva izolovanje i predkoncentrisanje analita, kao i prečišćavanje ekstrakta od pratećih sastojaka vodene matrice. Optimizovani su sledeći parametri koji mogu uticati na efikasnost SPE procedure: vrsta sorbenta, pH i zapremina uzorka vode, vrsta i zapremina rastvarača za eluiranje. U procesu SPE optimizacije korišćen je uzorak podzemne vode kao slepa proba, koji je analiziran i u kome nije utvrđeno prisustvo analita.

3.5.1.1. Izbor sorbenta

Pregledom literature utvrđeno je da se za ekstrakciju tragova steroidnih jedinjenja iz vode koristi nekoliko vrsta sorbenata različitih proizvođača (Vulliet *et al.*, 2008; Gourmelon *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012; András *et al.*, 2013; Chou *et al.*, 2015; Kong *et al.*, 2015; Zali *et al.*, 2021), a za optimizaciju odabrani su sledeći:

- ✓ Supelclean ENVI-18 (500 mg/6 mL) sa polimerno vezanim oktadecil grupama
- ✓ Supelclean ENVI Carb (500 mg/6 mL) sa grafitnim ugljenikom
- ✓ Supelclean ENVI Chrom P (250 mg/6 mL) sa polistiren-divinilbenzen kopolimerom
- ✓ Supelclean ENVI Florisil (500 mg/3 mL) sa magnezijum-silikatom
- ✓ Supelclean LC-8 (500 mg/3 mL) sa monomerno vezanim oktil grupama
- ✓ Supelclean LC-Si (500 mg/3 mL) sa silika-gelom
- ✓ Supelclean LC-Ph (500 mg/3 mL) sa monomerno vezanim fenil grupama (svi Supelclean sorbenti su proizvodi kompanije Supelco, Bellefonte, SAD)
- ✓ Strata-X (200 mg/6 mL) sa polistiren-divinilbenzen-*N*-vinilpirolidon kopolimerom koji poseduje uravnotežena hidrofilna i lipofilna svojstva (proizvođača Phenomenex, Torrance, SAD)
- ✓ Oasis HLB (200 mg/6 mL) sa polistiren-divinilbenzen-*N*-vinilpirolidon kopolimerom (proizvođača Waters, Milford, SAD)

Procedura ekstrakcije na čvrstoj fazi korišćena pri izboru optimalnog sorbenta je prikazana na slici 3.1. U 100 mL podzemne vode (bez podešavanja pH) je dodat standardni rastvor svih analita tako da je koncentracija svakog od njih bila 500 ng L^{-1} u početnom uzorku, odnosno 100 ng mL^{-1} u konačno dobijenom ekstraktu nakon SPE procedure. SPE kertridži su prethodno kondicionirani sa 5 mL metanola, a zatim sa 5 mL dejonizovane vode. Pripremljeni uzorci su naneti na pakovanje kolona pri protoku od oko 1 mL min^{-1} . Kertridži su zatim sušeni pod vakuumom tokom 10 min, a analiti su eluirani sa 15 mL metanola u staklene kivete. Ekstrakti su upareni u struji azota u vodenom kupatilu na $30 \text{ }^\circ\text{C}$ i rekonstituisani do 0,5 mL sa metanolom. Konačni ekstrakti su homogenizovani upotrebom Vorteks mešalice i filtrirani kroz $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ poliviniliden-difluorid (PVDF) filtere ($\text{Ø} 4 \text{ mm}$), proizvođača Roth (Karlsruhe, Nemačka), u bočice za autosempler i analizirani. Svi naredni eksperimenti optimizacije su izvedeni na isti način, koristeći parametre optimizovane u prethodnim koracima.



Slika 3.1. Procedura ekstrakcije na čvrstoj fazi

3.5.1.2. Izbor pH vrednosti uzoraka

Sledeći korak u optimizaciji SPE procedure za pripremu uzoraka vode je odabir pH vrednosti uzoraka pri kojoj će se izvoditi ekstrakcija. Ispitivane su pH vrednosti: 3,0, 6,0, 7,5 i 9,0. U uzorak podzemne vode, kome je dodat standardni rastvor svih analita na prethodno opisan način, ukapavana je koncentrovana sirćetna kiselina ili rastvor amonijaka koncentracije 5 mol L^{-1} do postizanja odgovarajuće pH. Prosečna pH vrednost podzemne vode je bila 7,5. Pripremljen uzorak je ekstrahovan prema prethodno opisanoj SPE proceduri.

3.5.1.3. Izbor eluenta

Kada su izabrani odgovarajući sorbent i pH vrednost uzorka vode, sledeći korak je izbor optimalnog rastvarača za eluiranje steroidnih jedinjenja sa pakovanja kertridža. Korišćena su četiri rastvarača: acetonitril, etil-acetat, dihlormetan i metanol. U literaturi se za ekstrakciju steroida iz vodenih uzoraka najčešće koriste metanol i etil-acetat (Fernandez *et al.*, 2007; András *et al.*, 2013). SPE procedura je modifikovana tako da je ispitivani rastvarač korišćen svuda gde je bilo neophodno koristiti organski rastvarač (CH_3OH na slici 3.1).

3.5.1.4. Izbor zapremine uzoraka

Prilikom pripreme uzoraka vode, optimalna zapremina uzorka je ona sa kojom se postiže što veći stepen predkoncentrisanja, što veća brzina izvođenja eksperimenta, ali i što manje koncentrovanje nepoželjnih sastojaka vodene matrice koji mogu ometati analizu steroida koji su prisutni u tragovima. U ovom eksperimentu ispitivane su sledeće zapremine uzorka vode: 100 mL, 200 mL, 250 mL, 300 mL i 500 mL. U svaki uzorak vode je dodata različita zapremina istog standardnog rastvora smeše steroida, tako da se u finalnom ekstraktu dobije koncentracija od 100 ng mL^{-1} svakog analita.

3.5.1.5. Izbor zapremine eluenta

Izbor optimalne zapremine rastvarača za eluiranje ima za cilj da se steroidna jedinjenja efikasno desorbuju sa SPE sorbenta, a da pritom zapremina organskog rastvarača, koji se zatim uparava, bude što manja zbog kraćeg vremena pripreme uzoraka vode. Maksimalna zapremina eluenta je bila 15 mL, jer je to zapremina staklene kivete u kojoj se eluat sakuplja, pa su ispitane i manje zapremine rastvarača za eluiranje od 6 mL, 9 mL i 12 mL.

3.5.2. Ultrazvučna ekstrakcija suspendovanog materijala

Da bi se suspendovana faza vodenog uzorka odvojila od rastvorne faze, svaki uzorak vode (1 L) je filtriran pomoću filtera sa staklenim mikrovlaknima (Whatman GmbH, Dassel, Nemačka), i to prvo sa filterima veličine pora 1–3 μm , a zatim sa filterima veličine pora 0,7 μm . Svi korišćeni filteri prethodno su izmereni sa analitičkom preciznošću. Filteri sa suspendovanim materijalom su ostavljeni u mraku, na sobnoj temperaturi, tokom 24 h da se osuše. Prilikom filtriranja pojedinih uzoraka bilo je potrebno više filtera, te su oni nakon sušenja objedinjeni i zajedno ekstrahovani. Filtrat svakog uzorka je odmah pripremljen korišćenjem optimizovane SPE procedure.

Ultrazvučna ekstrakcija odabranih steroidnih jedinjenja iz suspendovanog materijala izvršena je korišćenjem prilagođenog postupka za ekstrakciju steroida iz rečnih sedimenata (Matić *et al.*, 2014). Filteri sa staklenim mikrovlaknima su smešteni u plastične epruvete (50 mL) i ekstrahovani korišćenjem 25 mL metanola, u ultrazvučnom kupatilu tokom 10 min. Postupak je ponovljen i 50 mL dobijenog ekstrakta je centrifugirano 10 min pri brzini od 4000 obrtaja u minuti. Zatim je supernatant dekantovan i uparen u blagoj struji azota do zapremine od 4 mL. Ekstrakt je podeljen na četiri dela, od kojih su dva uparena do suva, a zatim je dodat standardni rastvor tako da se dobiju dve koncentracije potrebne za kalibraciju, tj. za kvantitativno određivanje ekstrahovanih steroida. U preostala dva dela ekstrakta nije dodat standardni rastvor, već su analizani kao uzorci. Ekstrakti i standardi su filtrirani korišćenjem 0,45 µm PVDF filtera i analizirani. Koncentracije steroidnih jedinjenja u suspendovanoj fazi, dobijene u ng g⁻¹, su pretvorene u ng L⁻¹ znajući masu suspendovane materije i zapreminu svakog uzorka vode, da bi se mogle uporediti sa koncentracijama steroida u rastvornoj fazi.

3.6. Kalibracija

Tokom optimizacije SPE procedure za pripremu rastvorne faze uzoraka vode korišćena je eksterna kalibracija sa standardima koji odgovaraju matrici uzorka (*eng.* matrix-matched standards). Standardi su pripremljeni pri koncentraciji od 100 ng mL⁻¹ dodavanjem standardnog rastvora svih steroidnih jedinjenja u ekstrakt slepe probe dobijen SPE procedurom. Naime, ako se koristi standard koji sadrži komponente matrice kao i uzorak koji se analizira, moguće je potpuno kompenzovati uticaj matrice.

Kada su analizirani realni uzorci vode, tj. uzorci površinske i otpadne vode, korišćena je metoda standardnog dodatka za analizu rastvorne faze. Ova metoda kalibracije uzima u obzir uticaj matrice, kao i nepotpunu ekstrakciju analita prilikom SPE procedure (Zembrzuska *et al.*, 2016). Nakon filtracije, svaki uzorak vode je podeljen na pet delova od 200 mL. Kalibracioni rastvori su pripremljeni dodavanjem standardnih rastvora pri koncentracijama 10–1000 ng L⁻¹ (za uzorke rečne vode) i 0,1–10 µg L⁻¹ (za uzorke otpadnih voda). Zbog male količine suspendovanog materijala, kvantifikacija analita u suspendovanoj fazi uzoraka vode izvršena je deljenjem dobijenog ekstrakta (4 mL) na četiri dela, od kojih su dva uparena do suva i dodat je 1 mL standardnog rastvora pri koncentracijama od 0,1 i 1 µg mL⁻¹ (za suspendovani materijal rečne vode), odnosno 5 i 25 µg mL⁻¹ (za suspendovani materijal otpadne vode), dok u preostala dva nije dodavan standardni rastvor i analizirani su kao uzorci.

3.7. Validacija metode

Pri validaciji razvijene i optimizovane metode određeni su sledeći parametri: prinos, ponovljivost, linearnost, granica detekcije (*eng.* limit of detection, LOD), granica kvantifikacije (*eng.* limit of quantification, LOQ) i uticaj matrice (*eng.* matrix effect, ME). Metoda je validirana analizom uzoraka površinske vode na četiri nivoa koncentracije (10, 25, 50 i 100 ng L⁻¹) i uzoraka otpadne vode na pet nivoa koncentracije (50, 100, 250, 1000 i 5000 ng L⁻¹). Prinos metode, koji pokazuje njenu tačnost, određen je korišćenjem standarda koji odgovaraju matrici uzorka. Ponovljivost metode, izražena kao relativna standardna devijacija (RSD), određena je analizom tri probe svakog uzorka, u tri uzastopna dana. Linearnost metode je određena snimanjem standarda koji odgovaraju matrici uzorka u opsegu koncentracija koje su izabrane za uzorke površinskih i otpadnih voda (Martínez Bueno *et al.*, 2011; Robles-Molina *et al.*, 2014). Za odabrane sterole i steroidne hormone izračunati su koeficijenti korelacije (R^2). Granice detekcije i kvantifikacije su određene za svaki analit u obe

vrste vodene matrice kao najniže koncentracije analita sa odnosom signala i šuma 3 i 10 (*eng.* signal to noise, S/N), respektivno (Huerta-Fontela *et al.*, 2010; Farré *et al.*, 2016). Određene su dodavanjem standardnog rastvora svih analita pri niskim koncentracijama u realne uzorke površinskih i otpadnih voda.

Uticaj matrice, tj. smanjenje ili povećanje signala analita u prisustvu sastojaka matrice, u masenoj spektrometriji zavisi od sinergijskog efekta mnogih uslova uključenih u analitičku proceduru. Kada se uporede uticaji matrice kod najčešće korišćenih tehnika ESI i APCI, nije moguće generalizovati da se smanjenje signala očekuje kod ESI, a poboljšanje signala kod APCI (Gosetti *et al.*, 2010). Da bi se procenio uticaj matrice za površinske i otpadne vode, korišćeni su kalibracioni rastvori koji odgovaraju matrici uzorka u izabranom opsegu koncentracija. Izračunat je kao odnos površine pika analita standarda koji odgovara matrici (umanjene za površinu pika analita prisutnog u slepoj probi) i površine pika analita standardnog rastvora u metanolu. Od dobijene vrednosti (u %) oduzeto je 100 da bi se dobio procenat smanjenja (negativna vrednost) ili povećanja signala analita (pozitivna vrednost):

$$ME(\%) = \frac{P_{matrica} - P_{slepa\ proba}}{P_{metanol}} \times 100 - 100$$

$P_{matrica}$ je površina pika analita standarda koji odgovara matrici, $P_{slepa\ proba}$ je površina pika analita u slepoj probi i $P_{metanol}$ je površina pika analita standardnog rastvora u metanolu.

U cilju obezbeđenja kontrole kvaliteta, uz svaku seriju uzoraka analizirane su i slepe probe. Za rastvornu fazu uzoraka vode, slepa proba je bila dejonizovana voda (200 mL) ekstrahovana prema SPE proceduri. Za suspendovanu fazu, slepa proba su bili filteri od staklenih mikrovlakana sa veličinom pora od 0,7 mm i 1–3 mm ekstrahovani opisanom procedurom ultrazvučne ekstrakcije. Odabrani steroidi nisu detektovani u slepim probama.

3.8. Uzimanje uzoraka površinskih i otpadnih voda

3.8.1. Uzorkovanje površinskih voda

Uzorci površinskih voda, analizirani u ovoj studiji, su prikupljeni u junu 2020. godine na području Beogradu, oko ušća Dunava u reku Savu (slika 3.2, tabela 3.3). Rečna voda je uzorkovana na devet lokacija u gusto naseljenom području pod uticajem kanalizacionih ispusta u blizini, sa izuzetkom uzorka RV1 koji je uzet u prigradskom naselju Novi Banovci na Dunavu. Sakupljena su tri uzorka iz Save (pre ušća, uzorci RV2–RV4), pet uzoraka iz Dunava (dva pre ušća – uzorci RV1 i RV5, i tri nakon ušća, uzorci RV7–RV9) i jedan uzorak sa ušća dve reke (uzorak RV6). Mesto uzimanja uzorka RV9 nalazilo se u maloj uvali, udaljenoj od glavnog toka reke, sa ograničenim protokom i mešanjem vode.

Uzorci rečne vode su uzimani u središnjem toku reke na dubini od 50 cm, direktnim uzorkovanjem, sa čamca. Svi uzorci vode su prikupljeni u PVC bocama od 1 L i čuvani u zamrzivaču bez konzervansa do pripreme za analizu, nekoliko dana nakon uzorkovanja. Na dan uzorkovanja nije bilo padavina, a u prethodna dva dana bilo je 1,2 mm padavina koje su opisane kao slaba rosulja.

Svaki uzorak vode je profiltriran da bi se odvojile rastvorna i suspendovana faza. Prosečna koncentracija suspendovane materije dobijene filtriranjem devet uzoraka rečne vode bila je $83 \pm 12 \text{ mg L}^{-1}$ (u rasponu od 70 mg L^{-1} do 105 mg L^{-1}).



Slika 3.2. Mapa toka Dunava i ušća sa Savom u Beogradu sa mestima uzimanja uzoraka rečnih voda (RV) i otpadnih voda (OV)

Tabela 3.3. Opis mesta uzimanja uzoraka rečne vode (RV) Save i Dunava

Uzorak	Geografska širina	Geografska dužina	Opis mesta uzorkovanja
RV1	44.9414	20.3033	Dunav; 18 km pre ušća sa rekom Savom
RV2	44.7962	20.4259	Sava; 4 km pre ušća
RV3	44.7989	20.4336	Sava; 3,5 km pre ušća; nizvodno od najvećeg ispusta kanalizacione otpadne vode (OV1)
RV4	44.8019	20.4400	Sava; 2,7 km pre ušća
RV5	44.8233	20.4368	Dunav; 500 m pre ušća
RV6	44.8241	20.4434	Ušće
RV7	44.8305	20.4828	Dunav; 3,6 km posle ušća
RV8	44.8279	20.5091	Dunav; 5,6 km posle ušća
RV9	44.8231	20.5359	Dunav; 8,5 km posle ušća; mala uvala

3.8.2. Uzorkovanje komunalnih otpadnih voda

Uzorci sirovih otpadnih voda prikupljeni su sa šest kanalizacionih ispusta (OV1–OV6), u gusto naseljenom delu Beograda, oko ušća Save u Dunav, zajedno sa odgovarajućim uzorcima rečne vode uzetim nizvodno, u junu 2020. godine (slika 3.2; tabela 3.4). Uzorci OV1 i OV5 uzeti su iz dva najveća kanalizaciona kanala sa 518224, odnosno 164653 stanovnika priključenih na svaki od kanala. Beogradska kanalizacija ima 29 ispusta komunalne otpadne vode koji se izlivaju u Dunav i Savu, a šest ispitivanih kanala ispušta oko 80% beogradske kanalizacione vode. Uzorci vode su uzimani direktno iz otpadnog kanala i čuvani u PVC bocama od 1 L u zamrzivaču bez konzervansa do pripreme za analizu, nekoliko dana nakon uzorkovanja.

Da bi se odvojio suspendovani materijal od rastvorne faze, uzorci otpadne vode su profiltrirani. Za šest uzoraka sirovih otpadnih voda sa širokim opsegom broja stanovnika priključenih na kanal otpadne vode (4620–518224, tabela 3.4), dobijen je širok opseg koncentracija suspendovane materije (32–149 mg L⁻¹, prosečno 98±42 mg L⁻¹).

Tabela 3.4. Opis mesta uzimanja uzoraka kanalizacionih otpadnih voda (OV)

Uzorak	Geografska širina	Geografska dužina	Površina zahvata	Srednji godišnji protok, m ³ /god.	Broj stanovnika priključenih na ispust
OV1 (Sajam)	44.7976	20.4346	7277 ha; najveći ispust	48723120	518224
OV2 (Lasta)	44.8118	20.4494	113 ha	7726320	23041
OV3 (Nova fekalna)	44.8257	20.4247	323 ha	1447962	56179
OV4 (Dorćol)	44.8293	20.4694	92 ha	5045760	17284
OV5 (Istovarište)	44.8245	20.4953	1112 ha; drugi najveći ispust	19552320	164653
OV6 (Ada Huja 1)	44.8239	20.5035	50 ha	1482192	4620

3.8.3. Uzorkovanje otpadnih voda iz postrojenja za prečišćavanje

S obzirom na to da u Beogradu ne postoji postojenje za prečišćavanje otpadnih voda, u ovoj studiji je ispitivan sadržaj steroidnih jedinjenja u otpadnoj vodi pre i posle tretmana u dva postrojenja koje se nalaze u Zucu (PPOV1) i Topoli (PPOV2). U tabeli 3.5 predstavljeni su srednji godišnji protoci (m³/dan) za ulaznu i izlaznu otpadnu vodu, kao i broj ekvivalent stanovnika za koji je svako postrojenje projektovano.

Tehnološki proces prečišćavanja u postrojenju u Zucu se sastoji iz sledećih faza:

- mehanički predtretman otpadne vode koji podrazumeva korišćenje automatske grube rešetke, sa mehanizmom transporta izdvojenog materijala u odgovarajući ekološki kontejner za odlaganje
- prepumpavanje otpadnih voda iz crpne stanice u uređaj za fino prečišćavanje otpadnih voda (sadrži finu rešetku), kao i za separaciju masnoća i peska
- zadržavanje mehanički prečišćene vode u bazenu (egalizatoru)
- biološko prečišćavanje otpadne vode na bazi aktivnog mulja sa nitrifikacijom
- odlaganje mulja iz procesa u odgovarajuće rezervoare

Slično postrojenju u Zucu, proces prečišćavanja u postrojenju za tretman otpadnih voda u Topoli se sastoji od mehaničkog predtretmana u više faza, nakon čega sledi biološko prečišćavanje na bazi aktivnog mulja. Kod oba postrojenja, na kanalizacionu mrežu su priključena samo domaćinstva i ugostiteljski objekti.

Kompozitni 24-časovni uzorci ulazne i izlazne otpadne vode iz svakog PPOV su prikupljeni automatskim uređajima za uzorkovanje. Nakon filtriranja uzoraka i odvajanja rastvorne i suspendovane faze, za dva postojenja sa kapacitetima od 1000 (Zuce) i 8000 (Topola) ekvivalent stanovnika dobijeno je 102 mg L⁻¹ i 190 mg L⁻¹ suspendovane materije za otpadnu vodu na ulazu u postrojenje. Nakon tretmana, koncentracija suspendovanog materijala u prečišćenoj otpadnoj vodi iz PPOV2 je značajno smanjena na 7 mg L⁻¹, dok je u efluentu iz PPOV1 smanjena na 65 mg L⁻¹.

Tabela 3.5. Opis mesta uzimanja uzoraka otpadnih voda iz postrojenja za prečišćavanje (PPOV)

Uzorak	Opis mesta uzorkovanja	Srednji godišnji protok, m ³ /dan		Broj ekvivalent stanovnika (ES)
		Ulazna OV	Izlazna OV	
PPOV1	Zuce, ruralno naselje blizu Beograda sa oko 2000 stanovnika	128	116	1000*
PPOV2	Topola, grad u centralnoj Srbiji sa oko 5000 stanovnika, sa više ruralnih naselja	1089	978	8000

* Za vreme uzorkovanja 2020. godine, kapacitet postrojenja je bio polovina od projektovanog kapaciteta za 2000 ES koji je dostignut u 2021.

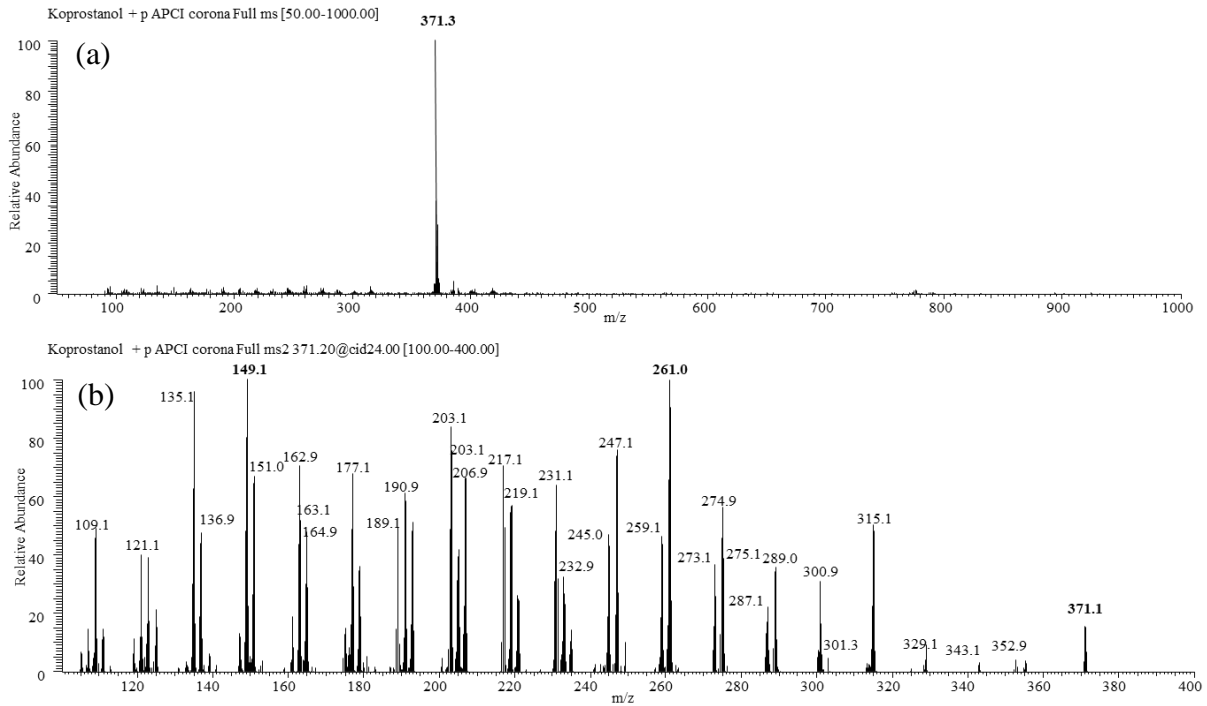
4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Maseni spektri odabranih steroidnih jedinjenja

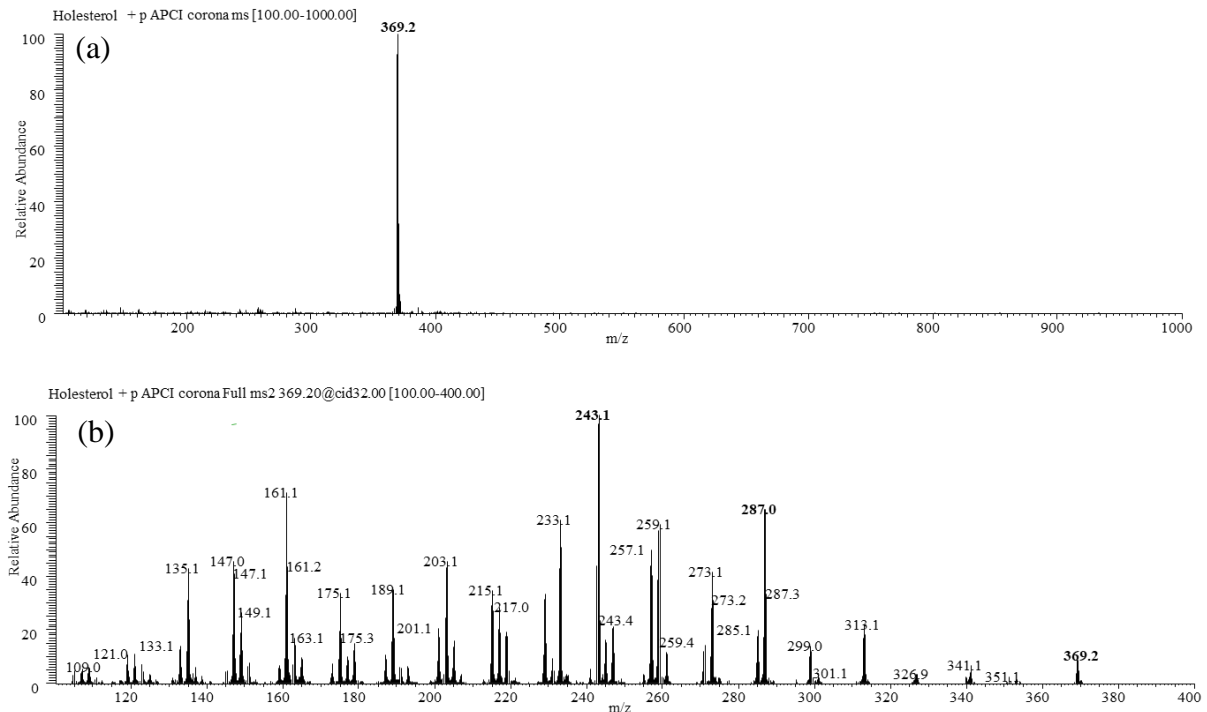
Maseni spektri svih odabranih steroidnih jedinjenja dobijeni su korišćenjem LTQ XL linearnog jonskog trapa, kao masenog spektrometra, a kao tehnike jonizacije ovih analita korišćene su hemijska jonizacija na atmosferskom pritisku i elektrosprej jonizacija. Utvrđeno je da se ESI nije pokazala kao efikasna za dobijanje stabilnih jona analita za većinu steroidnih jedinjenja, osim za svega nekoliko steroidnih hormona (noretindrona, 17α -etinilestradiola, 17α - i 17β -estradiola i levonorgestrela). Zbog toga je APCI izabrana kao tehnika jonizacije.

Identifikacija prekursor jona za svaki analit izvršena je snimanjem masenih spektara u opsegu m/z 50–1000 u pozitivnom režimu rada jonskog izvora (APCI+). Kao prekursor joni za pet analita (estron, noretindron, ekvilin, levonorgestrel, holestanon) odabrani su protonovani molekuli $[M+H]^+$, dok su kod svih ostalih analita najintenzivniji bili protonovani dehidratizirani joni $[M-H_2O+H]^+$. Najzastupljeniji joni u MS spektru podvrgnuti su daljoj MS^n analizi. Za svaki analit optimizovana je koliziona energija i identifikovan je najzastupljeniji fragmentni jon. Kod većine ispitivanih analita MS^2 fragmentacijom nastaje više od jednog fragmentnog jona. Na osnovu dobijenih rezultata, za svaki analit je odabrana karakteristična reakcija fragmentacije prekursor jona u najintenzivniji i najstabilniji fragmentni jon na osnovu koje je vršena kvantifikacija. Za potvrdu su odabrani dodatni fragmentni joni prekursor jona ili joni nastali daljom fragmentacijom fragmentnih jona odabranih za kvantifikaciju analita. Maseni spektri karakterističnih predstavnika svake grupe steroidnih jedinjenja (humanih/životinjskih sterola, biljnih sterola i steroidnih hormona) prikazani su na slikama 4.1–4.4. Karakteristične reakcije fragmentacije koje su odabrane za kvantifikaciju i potvrdu prisustva svakog analita prikazane su u tabeli 4.1. Rezultati celokupne MS^n analize odabranih steroidnih jedinjenja prikazani su u Prilogu (tabela 1). Kao što se vidi iz tabele 4.1, estriol i estron imaju identične reakcije fragmentacije, tj. imaju isti prekursor jon (m/z 271) i iste fragmentne jone za kvantifikaciju i potvrdu prisustva analita. Slično je i sa druga dva izomera među hormonima, 17β - i 17α -estradiolom, koji imaju identične prekursor jone (m/z 255) i identične fragmentne jone. Među odabranim humanim/životinjskim sterolima postoje četiri izomera (epikoprostanol, epiholestanol, koprostanol i holestanol) koji imaju iste prekursor (m/z 371) i fragmentne jone. Kada je reč o izomerima, masenom spektrometrijom ih je nemoguće razlikovati, jer imaju istovetne reakcije za kvantifikaciju i potvrdu prisustva analita. Jedino rešenje je optimizacija hromatografskog razdvajanja kako bi se ovi analiti razlikovali po retencionom vremenu, tj. vremenu eluiranja sa hromatografske kolone.

Rezultati i diskusija

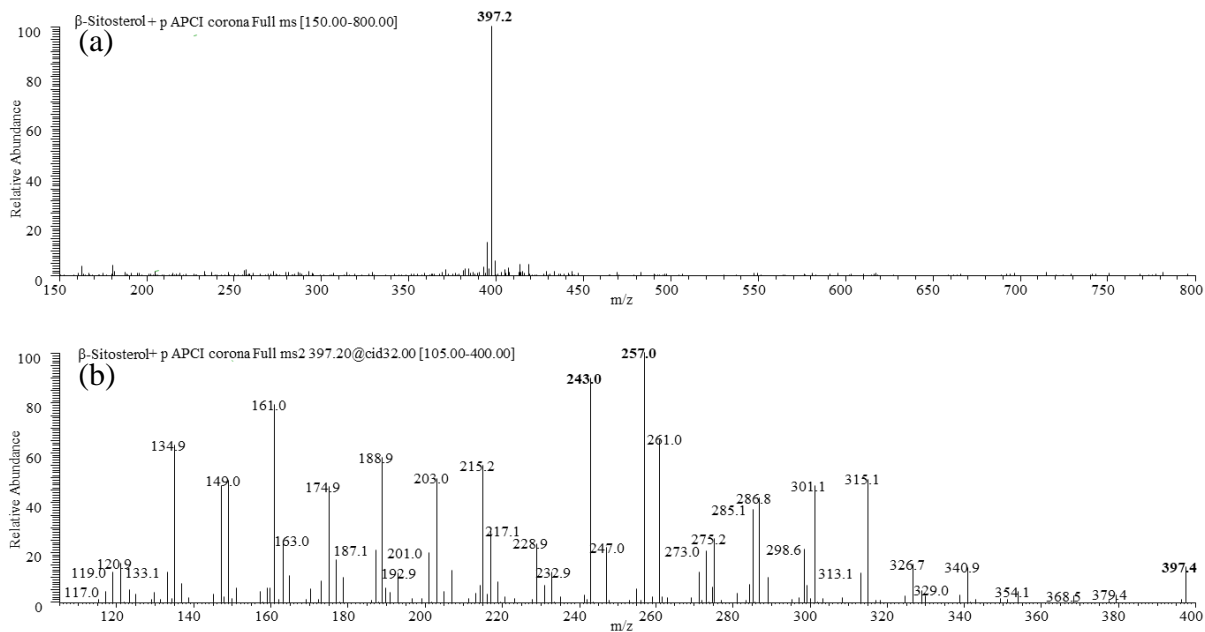


Slika 4.1. Maseni spektri koprostanola: (a) APCI(+)-MS; (b) APCI(+)-MS² [M-H₂O+H]⁺

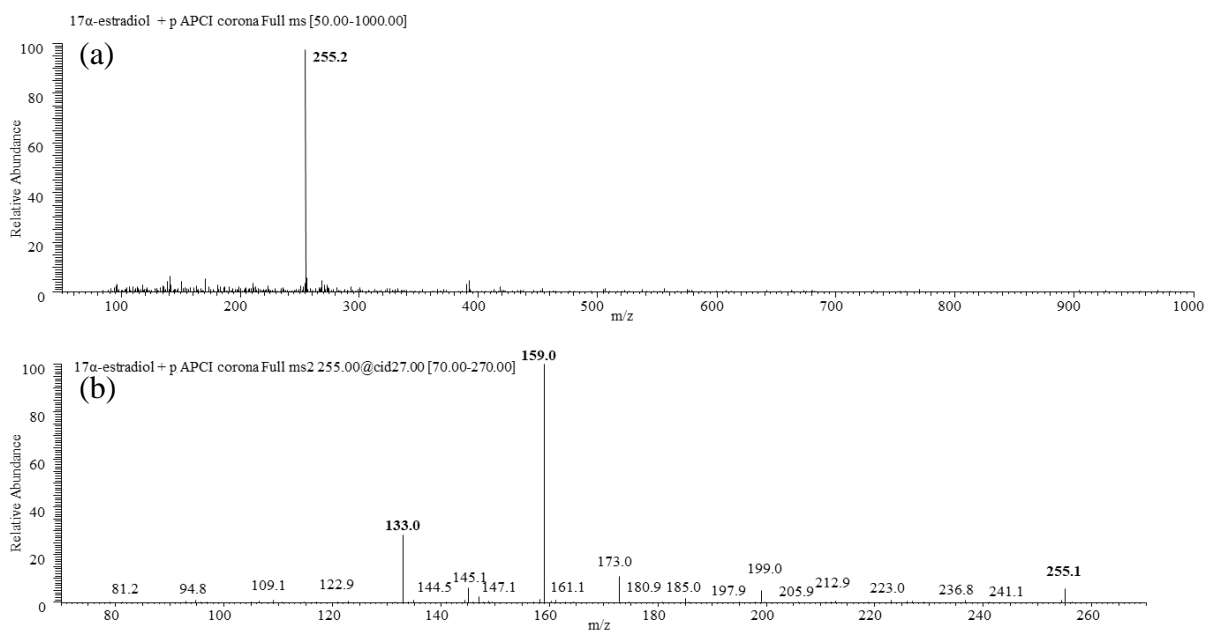


Slika 4.2. Maseni spektri holesterola: (a) APCI(+)-MS; (b) APCI(+)-MS² [M-H₂O+H]⁺

Rezultati i diskusija



Slika 4.3. Maseni spektri β -sitosterola: (a) APCI(+)-MS; (b) APCI(+)-MS² [M-H₂O+H]⁺



Slika 4.4. Maseni spektri 17α -estradiola: (a) APCI(+)-MS; (b) APCI(+)-MS² [M-H₂O+H]⁺

Tabela 4.1. Reakcije fragmentacije odabrane za kvantifikaciju i potvrdu prisustva svakog analita

	Reakcija kvantifikacije	Kolizijska energija, (%)	Reakcija potvrde
<i>Steroidni hormoni</i>			
Estriol	271[M-H ₂ O+H] ⁺ →253	20	271→197
Estron	271[M+H] ⁺ →253	20	271→197
17β-Estradiol	255[M-H ₂ O+H] ⁺ →159	22	255→133
17α-Estradiol	255[M-H ₂ O+H] ⁺ →159	22	255→133
17α-Etinilestradiol	279[M-H ₂ O+H] ⁺ →133	25	279→205
Noretindron	299[M+H] ⁺ →281	23	299→263
Ekvilin	269[M+H] ⁺ →251	23	269→211
Levonorgestrel	313[M+H] ⁺ →295	22	313→277
Mestranol	293[M-H ₂ O+H] ⁺ →147	26	293→173
<i>Steroli</i>			
Dezmosterol	367[M-H ₂ O+H] ⁺ →257	26	367→161
Holesterol	369[M-H ₂ O+H] ⁺ →243	24	369→287
Kampesterol	383[M-H ₂ O+H] ⁺ →243	25	383→257
Epikoprostanol	371[M-H ₂ O+H] ⁺ →149	24	371→261
Epiholesterol	371[M-H ₂ O+H] ⁺ →149	24	371→261
Koprostanol	371[M-H ₂ O+H] ⁺ →149	24	371→261
Holesterol	371[M-H ₂ O+H] ⁺ →149	24	371→261
Stigmasterol	395[M-H ₂ O+H] ⁺ →297	24	395→311
Holestanon	387[M+H] ⁺ →369	19	387→243
β-Sitosterol	397[M-H ₂ O+H] ⁺ →243	25	397→257
Sitostanol	399[M-H ₂ O+H] ⁺ →149	24	399→163

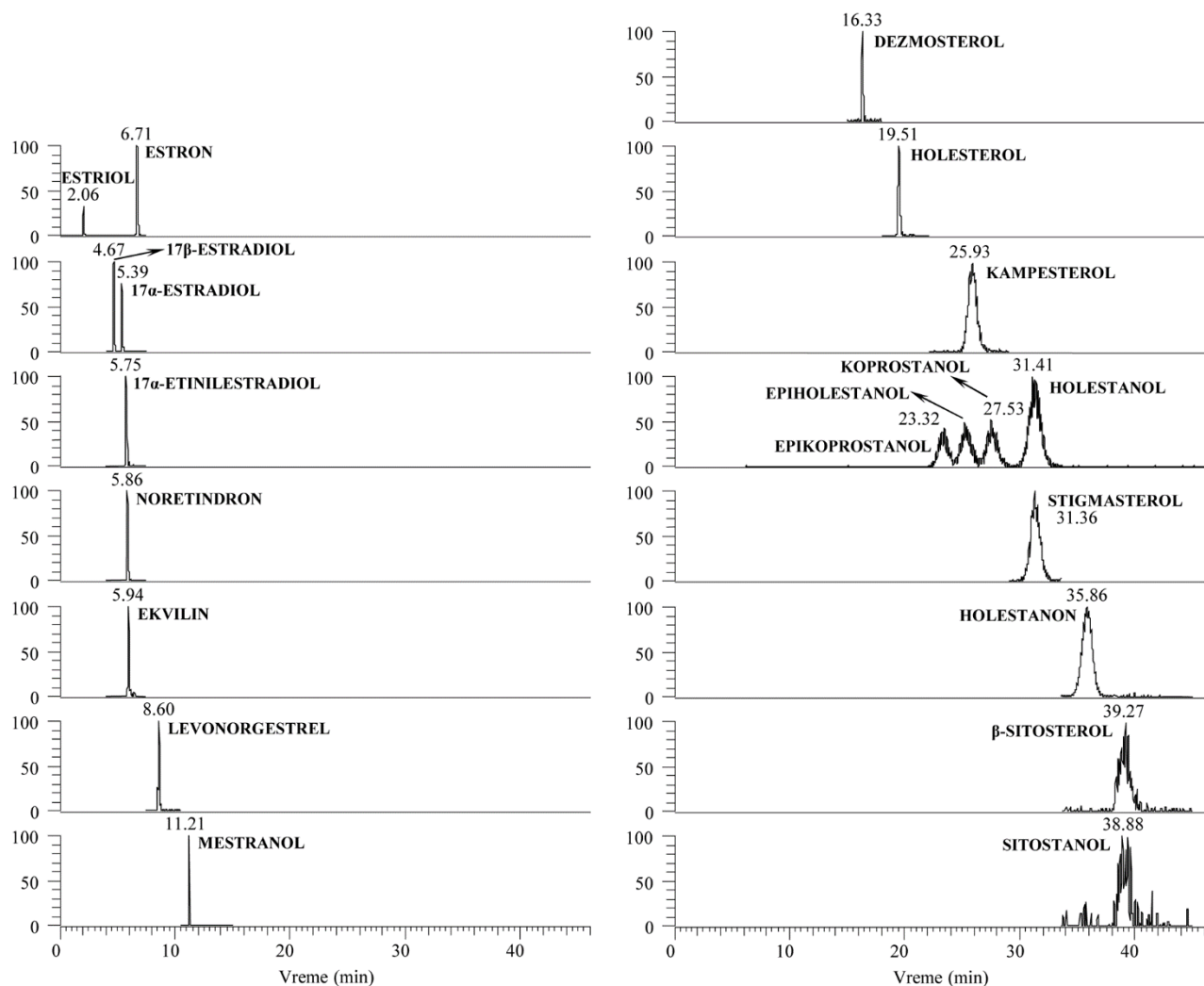
4.2. Optimizacija LC-MS/MS parametara

MS parametri za kvantitativno određivanje odabranih steroidnih jedinjenja pri optimalnom hromatografskom razdvajanju prikazani su u tabeli 4.2. Kako bi se obezbedila optimalna osetljivost, praćenje karakterističnih reakcija fragmentacije analita je podeljeno u devet vremenskih segmenata, pri čemu se u svakom segmentu prati maksimalno četiri reakcije.

Primenom optimizovanih parametara, pri LC-MS/MS analizi standardnih rastvora i ekstrakata dobijeni su maseni hromatogrami odabranih reakcija fragmentacije za svaki analit. Karakteristični SRM hromatogrami dobijeni analizom ekstrakta otpadne vode u koji je dodat standardni rastvor pri koncentraciji od 1 µg L⁻¹, prikazani su na slici 4.5.

Tabela 4.2. MS parametri za kvantitativno određivanje odabranih steroidnih jedinjenja

	Vremenski segment (min)	Prekursor jon (<i>m/z</i>)	Koliziorna energija (%)	Fragmentni jon (<i>m/z</i>)
<i>Steroidni hormoni</i>				
Estriol	I (0–4,0)	271	20	253
Estron	I i II (0–7,5)	271	20	253
17 β -Estradiol	II (4,0–7,5)	255	22	159
17 α -Estradiol		255	22	159
17 α -Etinilestradiol		279	25	133
Noretindron		299	23	281
Ekvilin		269	23	251
Levonorgestrel	III (7,5–10,5)	313	22	295
Mestranol	IV (10,5–15,0)	293	26	147
<i>Steroli</i>				
Dezmosterol	V (15,0–18,0)	367	26	257
Holesterol	VI (18,0–22,0)	369	24	243
Kampesterol	VII (22,0–29,0)	383	25	243
Epikoprostanol	VII i VIII (22,0–33,5)	371	24	149
Epiholestanol		371	24	149
Koprostanol		371	24	149
Holestanol		371	24	149
Stigmasterol	VIII (29,0–33,5)	395	24	297
Holestanon	IX (33,5–45,0)	387	19	369
β -Sitosterol		397	25	243
Sitostanol		399	24	149



Slika 4.5. Karakterističan maseni hromatogram odabranih steroidnih jedinjenja dobijen LC-MS/MS analizom ekstrakta uzorka otpadne vode u koji je dodat standardni rastvor pri koncentraciji od $1 \mu\text{g L}^{-1}$

4.3. Optimizacija ekstrakcije na čvrstoj fazi uzorka vode

Parametri koji su optimizovani za efikasnu pripremu uzorka površinske i otpadne vode su: tip sorbenta, pH vrednost uzorka vode, rastvarač za eluiranje, zapremina uzorka vode i zapremina eluenta. Za ekstrakciju izabranih steroida ispitano je devet komercijalno dostupnih SPE kolona, četiri pH vrednosti uzorka vode, četiri organska rastvarača za eluiranje, pet različitih zapremina uzorka vode i četiri različite zapremine optimalnog rastvarača za eluiranje. U tabeli 4.3 prikazana su fizička svojstva odabranih steroidnih jedinjenja, i to rastvorljivost u vodi i koeficijent raspodele između organske i vodene faze (*eng.* octanol-water partition coefficient, K_{ow}), koja su neophodna za diskusiju dobijenih rezultata.

Tabela 4.3. Fizička svojstva odabranih steroida

	Rastvorljivost u vodi (mg L ⁻¹)	log K _{ow} ^a
<i>Humani/životinjski steroli</i>		
Holesterol	9,5 · 10 ^{-2b}	8,74
Koprostanol	3,4 · 10 ⁻⁴	8,82
Epikoprostanol	3,4 · 10 ⁻⁴	8,82
Epiholesterol	3,4 · 10 ⁻⁴	8,82
Holesterol	3,4 · 10 ⁻⁴	8,82
Holestanon	2,9 · 10 ⁻⁴	8,31
<i>Biljni steroli</i>		
β-Sitosterol	4,6 · 10 ⁻⁵	9,65
Stigmasterol	7,3 · 10 ⁻⁵	9,43
Kampesterol	1,5 · 10 ⁻⁴	9,16
Dezmosterol	5,0 · 10 ⁻⁴	8,65
Sitostanol	3,8 · 10 ⁻⁵	9,73
<i>Prirodni hormoni</i>		
Estriol (E3)	27,3 ^b	2,45 ^b
Estron (E1)	30,0 ^b	3,13 ^b
17β-Estradiol (E2)	3,6 ^b	4,01 ^b
17α-Estradiol	3,9 ^b	3,94
Ekvilin	1,4 ^b	3,35
<i>Sintetski hormoni</i>		
17α-Etinilestradiol (EE2)	11,3 ^b	3,67 ^b
Mestranol	1,1 ^b	4,61 ^b
Noretindron	7,0 ^b	2,97 ^b
Levonorgestrel	2,1 ^b	3,48 ^b

^aIzvor: <http://www.chemspider.com/>

^bIzvor: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

4.3.1. Izbor sorbenta

Rezultati izbora tipa sorbenta za ekstrakciju na čvrstoj fazi dvadeset odabranih steroidnih jedinjenja prikazani su u tabeli 4.4. Utvrđeno je da se Envi Carb, Envi Florisil i LC-Si sorbenti ne mogu koristiti za ekstrakciju svih odabranih steroida iz vodenih matrica. Pošto grafitni ugljenik Envi Carb SPE kolone ima veliki afinitet za adsorpciju slabo polarnih (steroli) do srednje polarnih (steroidni hormoni) jedinjenja (log K_{ow}, tabela 4.3), većina se ne može eluirati sa pakovanja. S druge strane, magnezijum-silikat iz Florisil sorbenta ima nizak afinitet vezivanja za većinu steroida, pošto je dizajniran da zadrži polarne supstance. Silika-gel u LC-Si koloni ima izraženu sposobnost da zadrži polarnije steroidne hormone, dok se manje polarni steroli ekstrahuju iz uzorka vode sa srednjom efikasnošću. Naime, iako se većina sterola efikasno ekstrahuje korišćenjem silika-gela (71–123%, tabela 4.4), 36% njih pokazuje prinos manji od 70%.

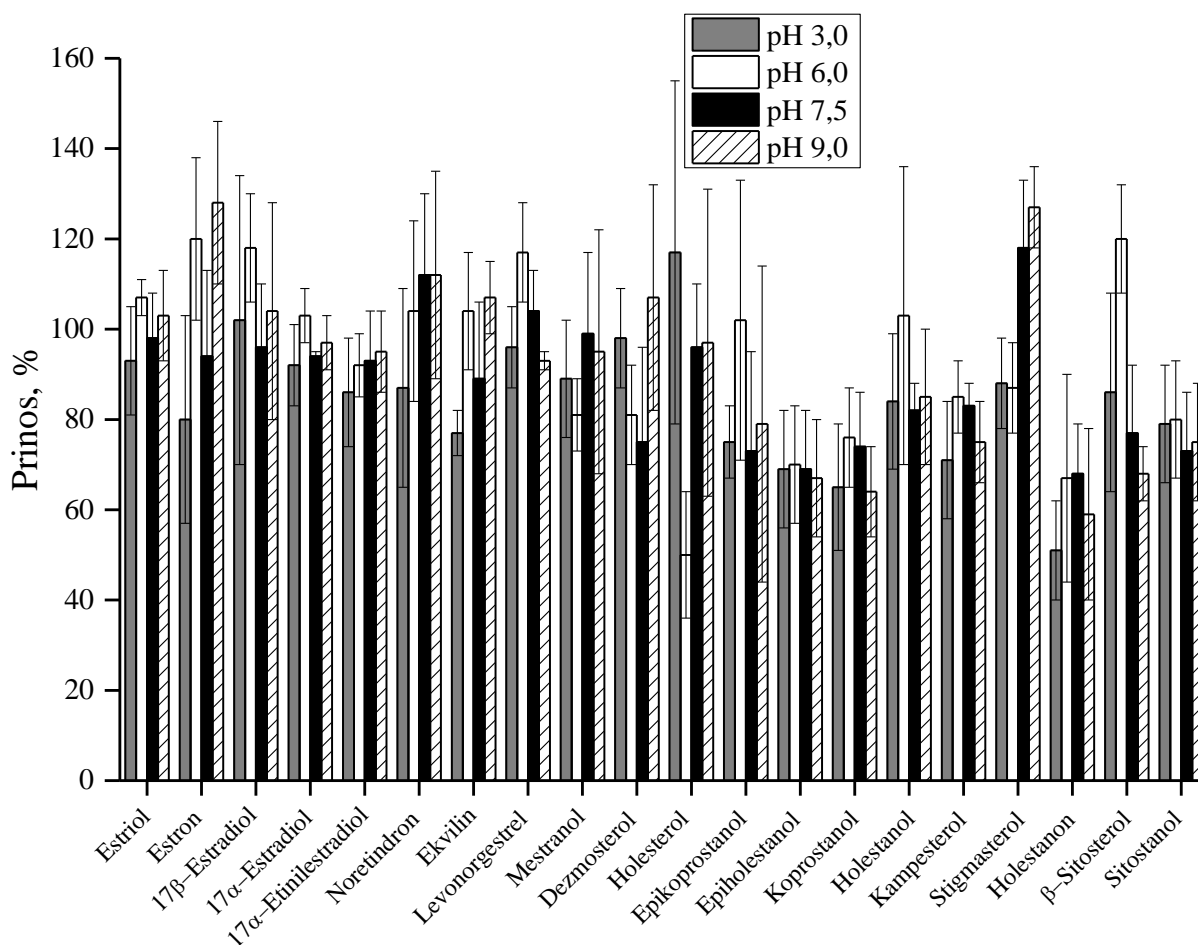
Tabela 4.4. Prinosi odabranih steroida dobijeni korišćenjem različitih SPE kolona

Steroidi	Envi-18	Envi Carb	Envi Chrom P	Envi Florisil	LC-8	LC-Si	LC-Ph	Strata-X	Oasis HLB
	Prinos, % (RSD, %)								
<i>Steroidni hormoni</i>									
Estriol	92 (6)	–	97 (2)	–	96 (8)	–	102 (7)	105 (7)	103 (4)
Estron	90 (22)	–	94 (14)	–	98 (15)	–	77 (12)	95 (6)	100 (11)
17 β -Estradiol	91 (5)	–	96 (11)	–	101 (7)	–	105 (1)	88 (7)	107 (21)
17 α -Estradiol	84 (8)	–	84 (12)	–	102 (5)	–	78 (11)	97 (9)	99 (5)
17 α -Etinilestradiol	84 (14)	–	89 (18)	–	83 (17)	–	89 (14)	98 (13)	94 (15)
Noretindron	81 (21)	114 (14)	94 (11)	–	115 (4)	–	97 (8)	98 (9)	98 (8)
Ekvilin	81 (12)	–	84 (13)	–	107 (6)	–	107 (21)	102 (8)	96 (6)
Levonorgestrel	87 (21)	90 (22)	94 (4)	–	116 (10)	–	118 (8)	122 (9)	121 (5)
Mestranol	80 (19)	–	77 (15)	8 (13)	96 (11)	17 (14)	86 (9)	94 (2)	99 (11)
<i>Steroli</i>									
Dezmosterol	99 (21)	–	119 (21)	74 (10)	103 (21)	69 (6)	89 (14)	74 (19)	71 (13)
Holesterol	82 (20)	18 (9)	95 (23)	71 (7)	35 (21)	123 (9)	91 (13)	99 (5)	101 (13)
Epikoprostanol	76 (13)	–	74 (17)	–	76 (14)	93 (19)	125 (4)	76 (8)	91 (1)
Epiholestanol	70 (13)	–	67 (13)	–	69 (13)	65 (13)	88 (13)	57 (13)	90 (11)
Koprostanol	78 (11)	–	64 (22)	–	71 (13)	74 (13)	74 (8)	61 (10)	82 (9)
Holestanol	52 (15)	–	69 (18)	–	85 (11)	62 (18)	76 (4)	59 (16)	78 (2)
Kampesterol	61 (21)	–	51 (4)	–	79 (23)	71 (17)	88 (9)	74 (9)	96 (4)
Stigmasterol	47 (16)	–	45 (19)	42 (19)	115 (15)	113 (9)	74 (22)	76 (23)	71 (18)
Holestanon	97 (4)	–	38 (16)	57 (20)	46 (14)	33 (18)	74 (19)	22 (19)	106 (5)
β -Sitosterol	90 (13)	–	53 (13)	–	76 (16)	80 (20)	90 (20)	125 (23)	101 (15)
Sitostanol	85 (3)	–	60 (13)	–	79 (10)	85 (13)	88 (13)	70 (13)	89 (3)

Što se tiče ostalih testiranih pakovanja kertridža, dobijeni su visoki prinosi za sve odabrane steroidne hormone: 80–92% (za Envi-18), 77–97% (za Envi Chrom P), 83–116% (za LC-8), 77–118% (za LC-Ph), 88–122% (za Strata-X) i 94–121% (za Oasis HLB). Međutim, značajne razlike između SPE sorbenata se primećuju kada se uporede efikasnosti ekstrakcije sterola. Najniži prinosi su ostvareni kada se koristi Envi Chrom P, sa 73% sterola ekstrahovanih sa niskom efikasnošću (< 70%). Sorbenti sa vezanim oktadecil (Envi-18) i oktil (LC-8) grupama pokazuju srednju efikasnost ekstrakcije, sa prinosima za većinu sterola u opsegu 70–99% i 71–115%, respektivno, dok 27% sterola nije efikasno ekstrahovano (prinos niži od 70%). Kada se uporede oba SPE kertridža sa polistiren-divinilbenzen-*N*-vinilpirolidon kopolimerom, Strata-X i Oasis HLB, drugi daje bolje rezultate. Strata-X je manje uspešan u ekstrakciji 36% sterola, dok Oasis HLB pokazuje dobre prinose za sve odabrane sterole (71–106%, tabela 4.4). Konačno, najveći prinosi za sva steroidna jedinjenja su dobijeni korišćenjem LC-Ph (74–125%) i Oasis HLB (71–121%) kertridža. Međutim, Oasis HLB sorbent je odabran kao optimalan jer je uočeno da za ekstrakciju sterola obezbeđuje uži opseg prinosa (71–106% u poređenju sa 74–125% za LC-Ph), uz veći broj jedinjenja ekstrahovanih sa efikasnošću koja je blizu ciljane vrednosti od 100%.

4.3.2. Izbor pH vrednosti uzoraka

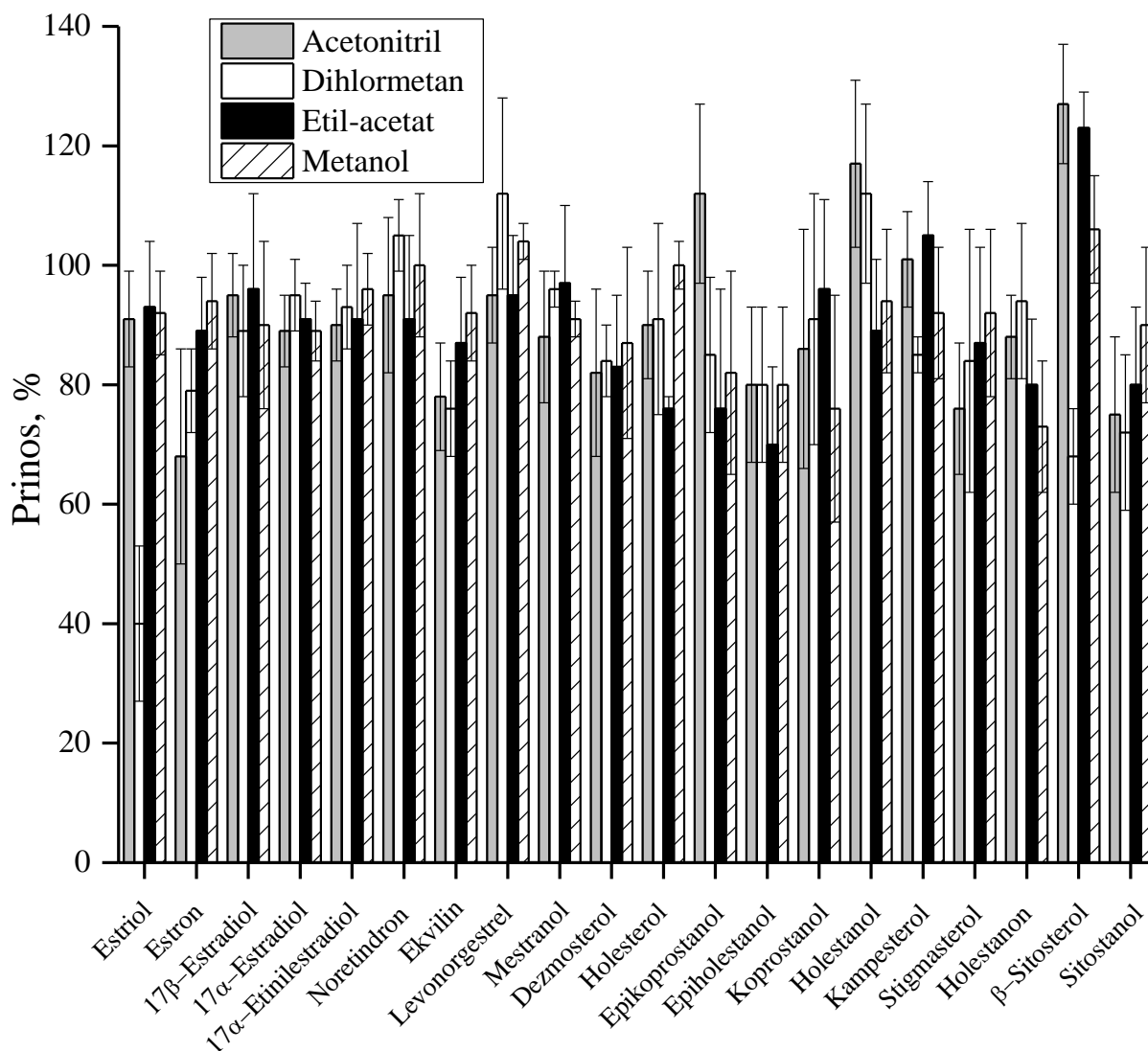
Sledeći korak optimizacije bio je izbor optimalne pH vrednosti uzorka vode. Rezultati za ispitivane pH vrednosti od 3,0, 6,0, 7,5 i 9,0 prikazani su na slici 4.6. Generalno, uticaj pH nije bio toliko izražen i postignuta je slična efikasnost ekstrakcije za sve analite pri svim ispitivanim pH vrednostima. Uz nekoliko izuzetaka, postignuti su visoki prinosi: 71–117% (pri pH = 3,0), 70–120% (pri pH = 6,0), 73–118% (pri pH = 7,5) i 75–128% (pri pH = 9,0). Međutim, 20% odabranih steroida je ekstrahovano sa niskom efikasnošću (< 70%) pri pH = 9,0, 15% steroida pri pH = 3,0 i 10% steroida pri pH = 6,0 i 7,5. Kada se uporede steroli ekstrahovani sa prinosima manjim od 70% kod poslednje dve pomenute pH, primećuje se da su nešto veće vrednosti prinosa pri pH = 7,5. Zbog toga je konačno izabrano da se SPE procedura izvodi bez podešavanja pH uzorka vode, tj. na pH vrednosti od 7,5.



Slika 4.6. Prinosi odabranih steroidnih jedinjenja pri četiri ispitane pH vrednosti uzorka vode

4.3.3. Izbor eluenta

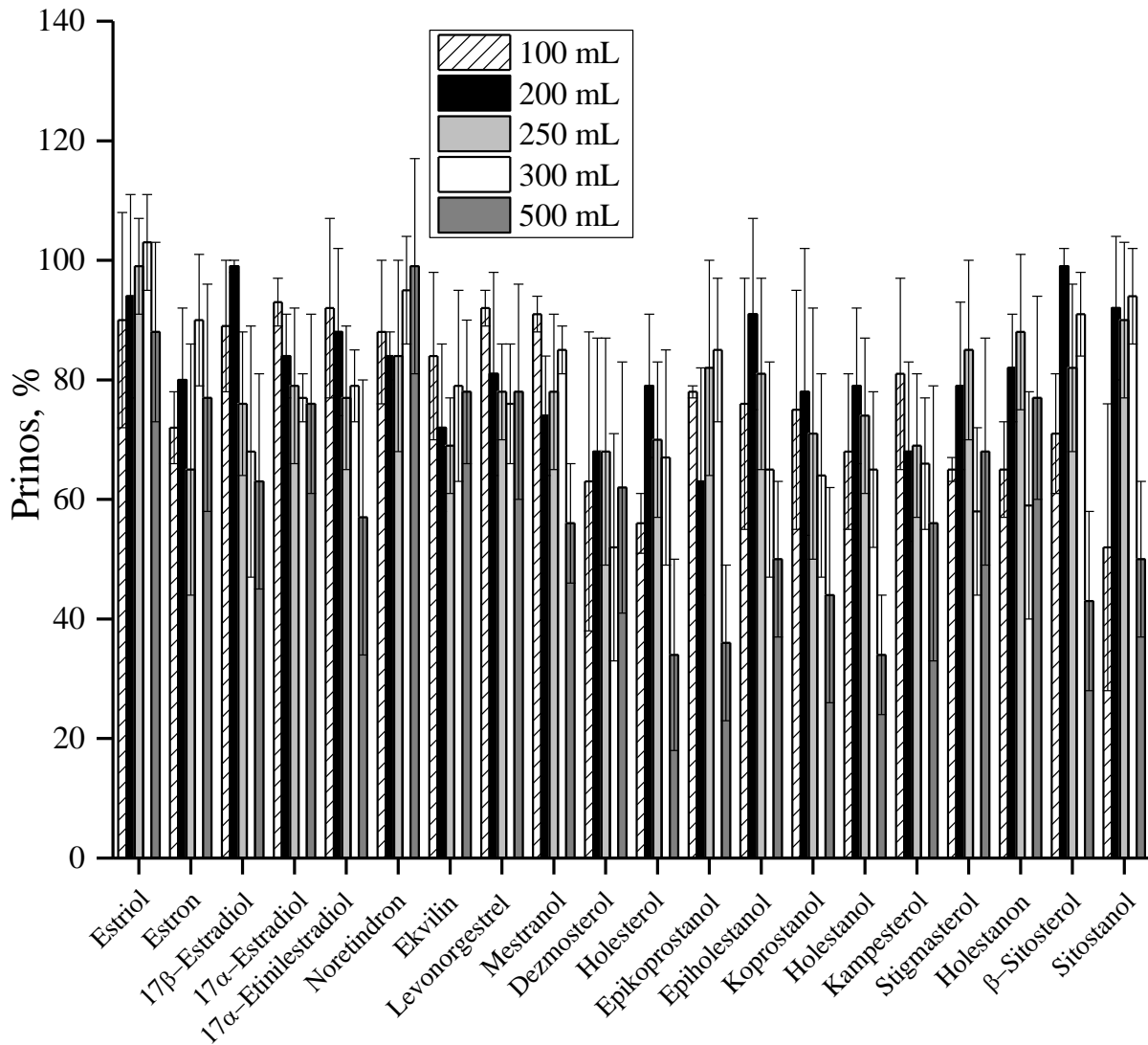
Ispitana su četiri rastvarača za optimalno eluiranje steroidnih hormona i sterola, i to: acetonitril, dihlormetan, etil-acetat i metanol. Rezultati eksperimenta su predstavljeni na slici 4.7. Uz nekoliko izuzetaka, svi ispitani eluenti su pokazali visoku efikasnost ekstrakcije, u opsegu 70–120%. Kada se koristi acetonitril, estron se eluira sa niskim prinosom (68%), a β-sitosterol sa previše visokim prinosom (127%). Prinos estriola korišćenjem dihlormetana je neprihvatljivo nizak (samo 40%). Etil-acetat i metanol su pokazali sličnu efikasnost ekstrakcije. Međutim, uži opseg prinosa je dobijen korišćenjem metanola (73–106%, u poređenju sa 70–123% za etil-acetat), tako da je on odabran kao optimalni rastvarač za eluiranje svih odabranih steroidnih jedinjenja.



Slika 4.7. Prinosi odabranih steroidnih jedinjenja pri upotrebi četiri različita rastvarača za eluiranje

4.3.4. Izbor zapremine uzoraka

Zapremina uzorka vode je optimizovana poređenjem rezultata dobijenih za 100 mL, 200 mL, 250 mL, 300 mL i 500 mL (slika 4.8). Faktor predkoncentrisanja treba da bude što je moguće veći, ali ako je zapremina uzorka prevelika postoji mogućnost probijanja kapaciteta sorbenta pre eluiranja. Utvrđeno je da je došlo do značajnog gubitka analita pri korišćenju zapremine uzorka od 300 mL i 500 mL. Za uzorke vode zapremine 300 mL prinos manji od 70% je postignut za 45% steroida, a čak 60% steroidnih jedinjenja za uzorke zapremine 500 mL. Kada je testirano 100 mL uzorka vode, 30% analita je pokazalo nisku efikasnost ekstrakcije. Za zapremine uzoraka od 200 mL i 250 mL, dobijeni su slični prinosi. Ipak, tri steroida su ekstrahovana sa manjom efikasnošću kada je korišćeno 200 mL uzorka, u poređenju sa četiri steroidna jedinjenja koja su izolovana sa niskim prinosom iz 250 mL uzorka vode. Zaključeno je da je zapremina od 200 mL najbolji izbor za zapreminu uzorka vode, jer obezbeđuje visok prinos za većinu odabranih steroida uz kraće vreme potrebno za pripremu uzorka i visok faktor predkoncentrisanja.

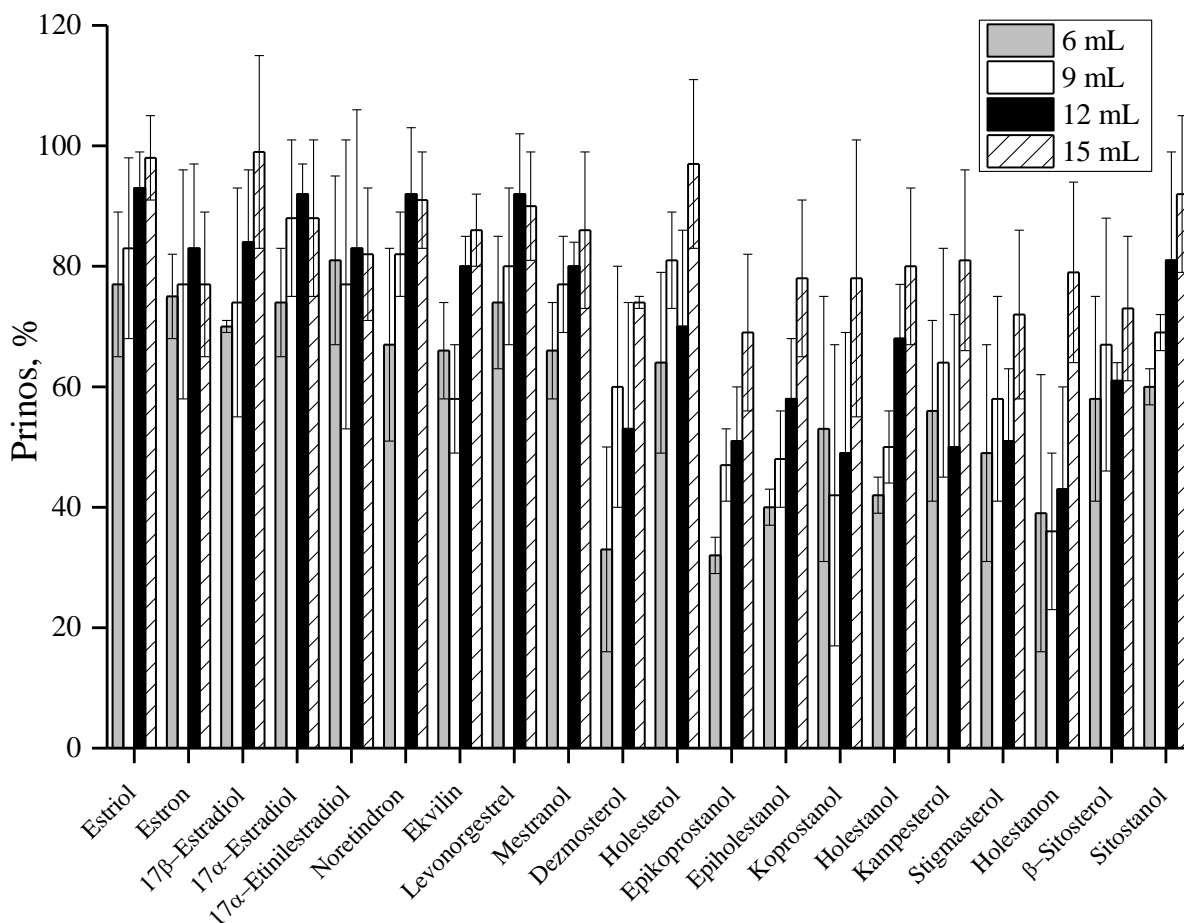


Slika 4.8. Prinosi odabranih steroidnih jedinjenja pri upotrebi različitih zapremina uzorka vode

4.3.5. Izbor zapremine eluenta

U poslednjem koraku optimizacije SPE procedure testirana je zapremina rastvarača za eluiranje. Rezultati ispitivanja za zapremine od 6 mL, 9 mL, 12 mL i 15 mL metanola su predstavljeni na slici 4.9. Pokazano je da zapremine eluenta od 6 mL, 9 mL i 12 mL nisu bile dovoljne za potpuno eluiranje svih sterola sa pakovanja kertridža. Jedino korišćenjem 15 mL metanola sva odabrana steroidna jedinjenja su eluirana sa prinosom većim od 70% (u opsegu 70–99%).

Konačno, optimalni parametri SPE procedure za određivanje steroida u uzorcima vode su sledeći: ekstrakcija 200 mL uzorak vode, bez podešavanja pH, korišćenjem HLB kertridža i eluiranje analita sa sorbenta koristeći 15 mL metanola.



Slika 4.9. Prinosi odabranih steroidnih jedinjenja pri upotrebi različitih zapremina rastvarača za eluiranje

4.4. Validacija metode

Rezultati validacije metode za pripremu i analizu površinske i otpadne vode su prikazani u tabeli 4.5. Utvrđeno je da je metoda pokazala visoku tačnost za odabrane opsege koncentracije, sa prinosima od 70% do 112% za površinske vode, odnosno u opsegu 70–114% za uzorke otpadnih voda. Ponovljivost metode je takođe bila visoka sa RSD vrednostima generalno nižim od 20%. U opsegu testiranih koncentracija postignuta je prihvatljiva linearnost, sa koeficijentima korelacije od 0,9812 do 0,9995 za površinske vode (slika 1, Prilog), odnosno od 0,9844 do 0,9999 za otpadne vode (slika 2, Prilog). Sa optimizovanom metodom su postignute niske granice detekcije i kvantifikacije. Vrednosti granice detekcije i kvantifikacije za analite u površinskoj vodi bili su 0,7–15,0 ng L⁻¹ i 2,3–50,0 ng L⁻¹, respektivno, odnosno za uzorke otpadnih voda 1,7–15,0 ng L⁻¹ i 5,7–50,0 ng L⁻¹, respektivno.

U tabeli 4.5 su prikazane vrednosti uticaja matrice pri koncentraciji od 100 ng L⁻¹ za površinske vode i 5000 ng L⁻¹ za otpadne vode. Pokazano je da sastojci matrice nisu imali značajan uticaj na signale analita. Uticaj matrice je bio niži od 20% za sve odabrane steroide u obe vodene matrice na svim testiranim nivoima koncentracije. Povećanje signala od 20% primećeno je za 17α-etinilestradiol u površinskoj vodi, dok je smanjenje signala od 16% zabeleženo za koprostanol u otpadnoj vodi.

Tabela 4.5. Parametri validacije metode ($n = 3$) za površinske i otpadne vode: prinos, ponovljivost (relativna standardna devijacija, RSD), linearnost (koeficijent korelacije, R^2), granica detekcije (*eng.* limit of detection, LOD), granica kvantifikacije (*eng.* limit of quantification, LOQ) i uticaj matrice (*eng.* matrix effect, ME)

Steroidi	Površinska voda					Otpadna voda											
	Prinos, % (RSD, %)				R^2	LOD, ng L ⁻¹	LOQ, ng L ⁻¹	ME, %	Prinos, % (RSD, %)					R^2	LOD, ng L ⁻¹	LOQ, ng L ⁻¹	ME, %
	Konzentracija, ng L ⁻¹								Konzentracija, ng L ⁻¹								
	10	25	50	100	50	100	250	1000	5000								
Estriol	80 (7)	81 (16)	76 (16)	87 (22)	0,9824	5,8	19,3	+5	90 (16)	90 (11)	92 (6)	88 (12)	88 (17)	0,9844	9,4	31,3	+15
Estron	95 (13)	112 (9)	94 (22)	112 (16)	0,9828	2,9	9,7	+2	94 (6)	107 (2)	96 (13)	85 (3)	103 (1)	0,9989	3,0	10,0	+3
17 β -Estradiol	86 (21)	96 (7)	101 (24)	88 (10)	0,9891	6,8	22,7	+1	92 (11)	105 (7)	96 (7)	84 (3)	101 (3)	0,9999	3,2	10,7	+5
17 α -Estradiol	98 (13)	102 (4)	90 (12)	105 (2)	0,9935	2,1	7,0	+11	110 (12)	88 (16)	98 (2)	85 (7)	99 (6)	0,9999	4,1	13,7	+4
17 α -Ethinilestradiol	81 (11)	80 (15)	92 (10)	103 (14)	0,9983	2,6	8,7	+20	90 (12)	93 (23)	114 (2)	102 (1)	106 (7)	0,9999	8,8	29,3	-1
Noretindron	87 (15)	84 (1)	95 (11)	109 (4)	0,9951	2,3	7,7	-9	105 (1)	95 (2)	97 (1)	83 (10)	101 (3)	0,9974	3,4	11,3	-2
Ekvilin	99 (10)	102 (17)	86 (11)	109 (6)	0,9876	2,6	8,7	+1	96 (5)	103 (1)	96 (7)	81 (9)	101 (2)	0,9979	4,4	14,7	0
Levonorgestrel	100 (14)	87 (7)	99 (6)	90 (19)	0,9812	1,8	6,0	+19	101 (11)	107 (9)	98 (6)	95 (6)	101 (2)	0,9984	5,0	16,7	+9
Mestranol	86 (22)	105 (14)	90 (9)	105 (17)	0,9935	0,7	2,3	+9	104 (7)	92 (6)	106 (6)	89 (4)	98 (2)	0,9999	1,7	5,7	+15
Dezmosterol	85 (13)	83 (24)	106 (2)	75 (16)	0,9977	2,7	9,0	+3	96 (1)	96 (12)	74 (16)	80 (5)	81 (13)	0,9996	9,4	31,3	+7
Holesterol	112 (3)	92 (15)	83 (21)	92 (8)	0,9960	2,4	8,0	-3	100 (4)	98 (10)	100 (17)	83 (1)	91 (8)	0,9872	6,8	22,7	-4
Epikoprostanol	90 (5)	105 (7)	83 (23)	97 (13)	0,9982	5,8	19,3	+1	88 (6)	75 (5)	90 (13)	74 (15)	73 (20)	0,9963	7,1	23,7	+9
Epiholestanol	80 (8)	74 (19)	70 (8)	85 (10)	0,9977	2,8	9,3	+1	83 (5)	88 (8)	93 (13)	89 (7)	90 (15)	0,9935	10,0	33,3	-1
Koprostanol	95 (10)	91 (8)	93 (10)	110 (11)	0,9898	4,4	14,7	+18	98 (17)	107 (1)	92 (7)	85 (17)	97 (5)	0,9938	5,2	17,3	-16
Holestanol	83 (7)	85 (14)	72 (20)	103 (19)	0,9829	15,0	50,0	-1	88 (7)	102 (13)	70 (17)	76 (13)	77 (8)	0,9995	6,3	21,0	+2
Kampesterol	103 (13)	70 (18)	76 (12)	78 (16)	0,9995	2,1	7,0	+2	90 (17)	102 (9)	78 (15)	73 (7)	75 (3)	0,9998	6,8	22,7	+1
Stigmasterol	95 (17)	95 (13)	89 (14)	79 (7)	0,9961	2,6	8,7	+7	102 (5)	89 (7)	97 (2)	76 (13)	77 (8)	0,9986	7,9	26,3	0
Holestanon	101 (4)	71 (13)	81 (9)	72 (6)	0,9906	3,0	10,0	+9	93 (10)	80 (14)	73 (13)	78 (8)	87 (15)	0,9993	15,0	50,0	-1
β -Sitosterol	100 (6)	98 (16)	104 (18)	94 (1)	0,9963	4,7	15,7	+13	94 (5)	98 (1)	95 (10)	81 (5)	83 (1)	0,9909	6,5	21,7	+8
Sitostanol	77 (16)	72 (11)	74 (12)	88 (15)	0,9995	2,9	9,7	-4	110 (12)	109 (14)	98 (6)	79 (18)	86 (8)	0,9931	5,8	19,3	-5

4.5. Analiza uzoraka površinskih voda

Dobijeni rezultati za rastvornu i suspendovanu fazu uzoraka rečne vode (tabela 4.6) su pokazali da humani/životinjski sterol holestanon i devet odabranih steroidnih hormona nisu detektovani ni u jednom od analiziranih uzoraka vode. Steroidni hormoni su obično prisutni u prirodnoj vodi u veoma niskim koncentracijama (Ojoghero *et al.*, 2021). Na primer, u Dunavu u Mađarskoj (Andrási *et al.*, 2013) pronađeni su niski nivoi 17 β -estradiola (do 0,7 ng L⁻¹) i 17 α -etinilestradiola (do 1,2 ng L⁻¹) u rastvornoj fazi uzoraka vode, dok je u u suspendovanoj fazi nađen samo 17 α -etinilestradiol (do 0,5 ng L⁻¹). Nemogućnost detektovanja steroidnih hormona u uzorcima rečne vode može biti objašnjeno vrednostima granica detekcije i kvantifikacije primenjene analitičke metode (tabela 4.5). Primenjena i validirana metoda je ograničena pri detektovanju analita prisutnih u niskim koncentracijama koje su blizu granice detekcije. Što se tiče holestanona, pošto pretežno nastaje razgradnjom holesterola u aerobnim uslovima, njegovo odsustvo se može pripisati nedostatku aerobne mikrobiološke aktivnosti (Cordeiro *et al.*, 2008; Prost *et al.*, 2018).

Pet humanih/životinjskih sterola (holesterol, koprostanol, epikoprostanol, epiholestanol i holestanol) identifikovani su u rastvornoj i suspendovanoj fazi svih ispitivanih uzoraka, uz izuzetak uzorka RV6 koji u rastvornoj fazi sadrži samo holesterol, što ukazuje na to da se radi o najmanje kontaminiranom uzorku. Holesterol je dominantno jedinjenje u obe faze uzoraka rečne vode (11,9–49,6% od ukupne koncentracije svih detektovanih sterola za rastvornu fazu i 22,0–39,9% za suspendovanu fazu, tabela 4.6). Nivoi holesterola su očekivano bili mnogo veći u suspendovanoj fazi (842–38199 ng L⁻¹) nego u rastvornoj fazi (158–1938 ng L⁻¹) uzoraka površinske vode, s obzirom na njegovu nisku rastvorljivost u vodi i visok log K_{ow} (tabela 4.3). Zapravo svi nađeni steroli imaju veoma nisku rastvorljivost u vodi ($3,8 \cdot 10^{-5}$ – $9,5 \cdot 10^{-2}$ mg L⁻¹) i veoma visoke log K_{ow} vrednosti (8,31–9,73) što objašnjava njihov afinitet prema suspendovanoj materiji prilikom raspodele između rastvorne i suspendovane faze. Na osnovu dobijenih rezultata, utvrđeno je da je 57,4–97,5% humanih/životinjskih sterola i 46,9–94,6% fitosterola prisutnih u uzorcima rečne vode vezano za čestice suspendovane materije u poređenju sa rastvornom fazom. U retkim studijama o kvalitetu rečne vode u kojima se prate i steroli, poput studije sprovedene na severu Srbije (Škrbić *et al.*, 2018), pronađeni su slični nivoi sterola u rastvornoj fazi uzoraka vode iz reka Dunav, Tisa i Begej, u rasponu od 288 do 1950 ng L⁻¹. Međutim, znatno niže koncentracije nađene su u Dunavu u Mađarskoj (88–170 ng L⁻¹, Andrási *et al.*, 2013) i reci Prut u rečnom slivu Dunava na rumunsko-moldavskoj granici (22–150 ng L⁻¹, Moldovan *et al.*, 2018). S druge strane, praćenje kvaliteta površinske vode u tri rečna sliva u Kini, sa gusto naseljenim urbanim područjima, pokazalo je veći nivo holesterola u opsegu 1325–6378 ng L⁻¹ (Kong *et al.*, 2015). Nivoi holesterola detektovani u suspendovanoj fazi takođe su bili znatno veći od onih u Dunavu u Mađarskoj (160–534 ng L⁻¹, Andrási *et al.*, 2013), a slični onim pronađenim u osam reka najvećeg metropolitikog regiona Brazila (30–34800 ng L⁻¹, Albuquerque de Assis Costa *et al.*, 2018).

Iako se komunalne i industrijske otpadne vode, kao i spiranje poljoprivrednog zemljišta, smatraju glavnim faktorima koji doprinose prisustvu holesterola u rečnoj vodi, on takođe može da potiče i iz prirodnih izvora, pa čak i da se sintetiše u slatkoj vodi od strane organizama kao što su alge, fitoplanktoni i makrofiti (Volkman, 2005; Alsalahi *et al.*, 2015). Zbog toga se holesterol ne smatra markerom specifičnim za antropogenu kontaminaciju vodene sredine.

Još jedan humani/životinjski sterol koji je veoma prisutan u ispitivanim uzorcima rečne vode je koprostanol (do 34,5% u rastvornoj fazi i 8,4–41,2% u suspendovanoj fazi). Ako koprostanol čini više od 5–6% ukupnih sterola, to ukazuje na kanalizaciju kao glavni izvor zagađenja (Devane *et al.*, 2006). Prema ovom kriterijumu, svi uzorci pokazuju kontaminaciju poreklom od komunalnih otpadnih voda, a najveće zagađenje je detektovano u uzorcima RV5 i RV9. Takođe je sugerisano da koncentracije koprostanola u opsegu 60–400 ng L⁻¹ u rastvornoj fazi (Leeming i Nichols, 1996) i 1000–2230 ng L⁻¹ u suspendovanoj fazi (Cabral i Martins, 2018) ukazuju na kontaminaciju kanizacionom otpadnom vodom koja odgovara postojećim bakterijskim graničnim vrednostima (za *Escherichia coli* i *Enterococci*) što ukazuje na loš kvalitet vode i potencijalno neupotrebljivu vodu za rekreaciju.

Tabela 4.6. Koncentracije detektovanih sterola u rastvornoj fazi* (suspendovanoj fazi)** uzoraka rečne vode (RV)

<i>Steroidi</i>	Koncentracija±SD, ng L⁻¹								
	RV1	RV2	RV3	RV4	RV5	RV6	RV7	RV8	RV9
Holesterol	195±16* (3092±356)**	332±54 (842±224)	853±182 (1568±149)	158±22 (896±103)	271±15 (6758±626)	261±51 (873±153)	330±54 (3074±375)	529±16 (3931±991)	1938±198 (38199±5944)
Koprostanol	71±5 (951±93)	113±7 (306±57)	384±71 (531±108)	65±6 (487±56)	197±26 (7553±1415)	– (572±52)	109±20 (1593±201)	232±25 (2558±192)	1814±331 (44472±3682)
Epikoprostanol	33±5 (243±32)	92±8 (124±7)	35±5 (134±6)	63±4 (249±47)	45±1 (224±30)	– (203±30)	89±11 (197±39)	65±9 (211±18)	239±43 (1957±136)
Epiholestanol	26±5 (117±6)	30±1 (58±11)	14±2 (80±7)	17±3 (80±6)	19±1 (72±11)	– (73±14)	19±2 (48±8)	32±3 (54±9)	85±8 (258±31)
Holestanol	39±3 (613±125)	68±8 (136±22)	37±2 (168±28)	61±10 (212±45)	77±7 (800±161)	– (206±12)	135±14 (339±36)	85±13 (347±21)	419±63 (4459±251)
β-Sitosterol	295±23 (2180±414)	– (646±95)	296±14 (906±188)	811±78 (795±92)	– (1137±148)	– (699±100)	681±78 (1200±223)	193±13 (1636±143)	– (15001±1730)
Stigmasterol	131±13 (1052±206)	35±4 (252±30)	36±1 (268±38)	104±6 (243±22)	– (349±25)	118±5 (250±34)	128±19 (400±34)	55±2 (601±63)	488±104 (8557±710)
Kampesterol	– (253±35)	– (98±14)	25±1 (94±16)	– (44±4)	– (114±12)	– (98±11)	– (132±14)	– (209±32)	163±19 (1508±137)
Dezmosterol	47±6 (533±65)	– (82±8)	34±2 (86±9)	45±4 (91±16)	– (85±3)	61±3 (93±12)	35±4 (159±22)	45±1 (219±39)	114±9 (361±23)
Sitostanol	– (2315±214)	– (251±25)	133±21 (391±45)	– (972±198)	– (1272±104)	273±35 (514±72)	– (567±76)	476±35 (420±32)	– (4605±733)
%Holesterola	23,3 (27,3)	49,6 (30,1)	46,2 (37,1)	11,9 (22,0)	44,5 (36,8)	36,6 (24,4)	21,6 (39,9)	30,9 (38,6)	36,8 (32,0)
%Koprostanola	8,5 (8,4)	16,9 (10,9)	20,8 (12,6)	4,9 (12,0)	32,3 (41,2)	0 (16,0)	7,1 (20,7)	13,6 (25,1)	34,5 (37,3)

Koprostanol je nađen u rastvornoj fazi uzoraka, pri koncentraciji u opsegu 65–1814 ng L⁻¹, sa izuzetkom uzorka RV6 koji je identifikovan kao najmanje zagađen. Što se tiče suspendovane faze uzoraka rečne vode, koprostanol je detektovan u koncentracijama u rasponu od 306 ng L⁻¹ do 44472 ng L⁻¹, pri čemu je najveća koncentracija pronađena u najkontaminiranijem uzorku RV9. Ovi nivoi su mnogo viši od onih u studijama koje su ispitivale kvalitet vode Dunava u Mađarskoj (19–42 ng L⁻¹ za rastvornu fazu, 99–266 ng L⁻¹ za suspendovanu fazu, András *et al.*, 2013) i manje naseljenom severnom delu Srbije (32–430 ng L⁻¹ za rastvornu fazu, Škrbić *et al.*, 2018). Međutim, detektovane koncentracije koprostanola su niže od onih u jako naseljenim područjima Kine (do 4450 ng L⁻¹ za rastvornu fazu, Kong *et al.*, 2015) i Brazila (30–205000 ng L⁻¹ za suspendovani materijal, Albuquerque de Assis Costa *et al.*, 2018). Autori dve studije smatraju da su glavni uzroci veoma zagađenih površinskih voda nedovoljna efikasnost tretmana kanalizacione otpadne vode i neadekvatan postojeći sistem za kontrolu ispuštanja zagađujućih materija (Kong *et al.*, 2015), uz izražen nedostatak osnovne sanitarne mreže (Albuquerque de Assis Costa *et al.*, 2018).

Od pet ispitivanih fitosterola, najzastupljeniji je bio β-sitosterol, detektovan u koncentracijama do 811 ng L⁻¹ u rastvornoj fazi uzoraka vode, i u opsegu 646–15001 ng L⁻¹ u suspendovanoj fazi. To je sterol koji se prirodno nalazi u kopnenim vaskularnim biljkama i čini do 95% ukupnih sterola (Rontani *et al.*, 2014). To je takođe glavni sterol u otpadnom materijalu poreklom od biljojeda (Leeming *et al.*, 1996). S druge strane, β-sitosterol je glavni fitosterol mnogih rafiniranih biljnih ulja (Piironen *et al.*, 2000) i dobro je poznat po snižavanju holesterola u serumu tokom dijetetskog tretmana (Rondanelli *et al.*, 2013). Tako su više vaskularne biljke i kopnena organska materija, kao i gradske otpadne vode, izvori ovog biljnog sterola u životnoj sredini. Zbog toga nije lako objasniti detektovane nivoe β-sitosterola i uporediti ih sa drugim dostupnim studijama. Niže koncentracije su zabeležene u Mađarskoj (128–379 ng L⁻¹ u rastvornoj fazi, 22–1796 ng L⁻¹ u suspendovanoj fazi, András *et al.*, 2013) i Brazilu (110–7380 ng L⁻¹, Albuquerque de Assis Costa *et al.*, 2018), a viši nivoi su nađeni u severnoj Srbiji (180–1470 ng L⁻¹ u rastvornoj fazi, Škrbić *et al.*, 2018) i Kini (665–3270 ng L⁻¹ u rastvornoj fazi, Kong *et al.*, 2015).

Takođe je procenjena raspodela sterola između rastvorne i suspendovane faze u uzorcima vode. Uzimajući u obzir visoke log *K*_{ow} vrednosti (8,31–8,82 za humane/životinjske sterole i 8,65–9,73 za fitosterole, tabela 4.3) i nisku rastvorljivost u vodi (tabela 4.3), očekuje se da će se steroli dominantno vezati za suspendovanu materiju. Na osnovu nađenih koncentracija u obe faze uzoraka rečne vode (tabela 4.6) utvrđeno je da se 83,0±11,9% humanih/životinjskih sterola i 87,1±15,2% biljnih sterola vezuje za suspendovanu materiju prilikom raspodele između rastvorne i suspendovane faze (u poređenju sa 17,0% i 12,9%, respektivno, koji ostaju u rastvornoj fazi).

4.6. Analiza uzoraka komunalnih otpadnih voda

Dobijeni rezultati i za rastvornu fazu i za suspendovani materijal uzoraka sirovih otpadnih voda (tabela 4.7) pokazuju da holestanon i devet steroidnih hormona nije pronađeno, a steroidi su zabeleženi u mnogo većim koncentracijama (izraženim u μg L⁻¹) u poređenju sa rečnom vodom. Steroidni hormoni se obično nalaze u otpadnim vodama u nižim koncentracijama od sterola. Na primer, u otpadnoj vodi na ulazu u dva PPOV u Mađarskoj (András *et al.*, 2013), 17β-estradiol i estriol su pronađeni u koncentracijama do 0,03 μg L⁻¹ i 0,4 μg L⁻¹, respektivno, u rastvornoj fazi. Estriol nije pronađen u suspendovanoj fazi, a 17β-estradiol je detektovan pri koncentraciji do 0,03 μg L⁻¹. Nemogućnost detektovanja steroidnih hormona u uzorcima otpadnih voda može se objasniti izračunatim granicama detekcije i kvantifikacije primenjene analitičke metode (tabela 4.5). Primenjena metoda pokazuje ograničenost pri detektovanju analita prisutnih u niskim koncentracijama blizu granice detekcije, posebno u kompleksnoj matrici otpadne vode. Odsustvo holestanona može se pripisati nedostatku aerobne mikrobiološke aktivnosti, pošto se holestanon pretežno formira degradacijom holesterola u aerobnim uslovima (Cordeiro *et al.*, 2008; Prost *et al.*, 2018).

Tabela 4.7. Koncentracije detektovanih sterola u rastvornoj fazi* (suspendovanoj fazi)** uzoraka otpadne vode (OV)

Steroidi	Koncentracija \pm SD, $\mu\text{g L}^{-1}$					
	OV1	OV2	OV3	OV4	OV5	OV6
Holesterol	5,9 \pm 0,2* (67 \pm 16)**	5,1 \pm 0,4 (54 \pm 5)	3,1 \pm 0,5 (97 \pm 12)	1,9 \pm 0,1 (70 \pm 14)	4,0 \pm 0,4 (40 \pm 11)	4,4 \pm 0,4 (86 \pm 20)
Koprostanol	12 \pm 2 (148 \pm 54)	6,9 \pm 1,1 (116 \pm 14)	3,4 \pm 0,1 (229 \pm 80)	3,8 \pm 0,2 (110 \pm 22)	11 \pm 1 (152 \pm 21)	7,9 \pm 0,5 (171 \pm 37)
Epikoprostanol	0,25 \pm 0,04 (3,0 \pm 0,4)	0,24 \pm 0,01 (2,3 \pm 0,1)	0,24 \pm 0,01 (4,1 \pm 0,9)	0,32 \pm 0,06 (7,0 \pm 0,5)	0,38 \pm 0,04 (2,4 \pm 0,3)	– (3,1 \pm 0,4)
Epiholestanol	0,12 \pm 0,04 (0,83 \pm 0,02)	0,11 \pm 0,01 (0,50 \pm 0,04)	0,05 \pm 0,01 (1,2 \pm 0,1)	0,13 \pm 0,02 (0,44 \pm 0,02)	0,07 \pm 0,01 (0,53 \pm 0,03)	0,29 \pm 0,06 (0,63 \pm 0,03)
Holestanol	0,86 \pm 0,22 (8,4 \pm 0,9)	0,63 \pm 0,08 (8,1 \pm 0,9)	0,30 \pm 0,01 (11 \pm 2)	0,27 \pm 0,08 (17 \pm 4)	1,3 \pm 0,4 (11 \pm 2)	– (15 \pm 3)
β -Sitosterol	3,2 \pm 0,1 (11 \pm 5)	3,6 \pm 0,3 (32 \pm 8)	2,0 \pm 0,2 (70 \pm 18)	0,97 \pm 0,29 (27 \pm 7)	2,7 \pm 0,1 (23 \pm 5)	2,3 \pm 0,1 (56 \pm 19)
Stigmasterol	0,53 \pm 0,08 (5,9 \pm 0,9)	0,80 \pm 0,18 (7,9 \pm 0,4)	0,32 \pm 0,04 (10 \pm 1)	– (28 \pm 4)	0,50 \pm 0,02 (4,3 \pm 0,3)	1,2 \pm 0,1 (12 \pm 1)
Kampesterol	0,21 \pm 0,02 (1,9 \pm 0,2)	0,26 \pm 0,02 (2,1 \pm 0,4)	0,15 \pm 0,02 (2,9 \pm 0,2)	0,06 \pm 0,02 (0,88 \pm 0,09)	0,18 \pm 0,02 (1,1 \pm 0,2)	0,22 \pm 0,01 (1,9 \pm 0,2)
Dezmosterol	– (0,45 \pm 0,06)	– (0,46 \pm 0,02)	– (0,56 \pm 0,01)	– (1,1 \pm 0,1)	– (0,29 \pm 0,03)	– (2,0 \pm 0,1)
Sitostanol	– (4,3 \pm 0,8)	– (3,1 \pm 0,3)	– (5,9 \pm 0,6)	– (1,9 \pm 0,2)	– (4,2 \pm 0,4)	– (5,1 \pm 0,8)
%Holesterola	25,6 (26,7)	28,9 (23,8)	32,4 (22,5)	25,5 (26,6)	19,9 (16,8)	27,0 (24,4)
%Koprostanola	52,0 (59,0)	39,1 (51,2)	35,6 (53,1)	51,0 (41,8)	54,6 (63,6)	48,4 (48,5)

Uzorci otpadnih voda sadržali su pet humanih/životinjskih sterola, sa koprostanolom koji je bio očekivano dominantan (35,6–54,6% za rastvornu fazu i 41,8–63,6% za suspendovanu fazu) pošto čini oko 60% ukupnih sterola u ljudskom fekalnom materijalu (Leeming *et al.*, 1996). Detektovan je u opsegu 3,4–12 $\mu\text{g L}^{-1}$ u rastvornoj fazi i 110–229 $\mu\text{g L}^{-1}$ u suspendovanoj fazi uzoraka otpadnih voda. Kako u dostupnim studijama nema navedenih koncentracija sterola u sirovim otpadnim vodama, pronađeni nivoi su upoređeni sa onim zabeleženim za otpadnu vodu na ulazu u PPOV. Međutim, prethodno određena prosečna koncentracija suspendovanih čestica u uzorcima otpadne vode sugeriše da sirova komunalna otpadna voda sadrži manju količinu suspendovanog materijala (prosečno 98 \pm 42 mg L^{-1}) od ulazne vode u PPOV (prosečno 146 \pm 62 mg L^{-1}). Zbog toga su koncentracije sterola u suspendovanoj fazi sirovih otpadnih voda ove studije niže od njihovih nivoa u vodama na ulazu u PPOV drugih studija. Najveće koncentracije koprostanola su nađene u rastvornoj fazi uzoraka iz dva najveća kanalizaciona kanala (12 i 11 $\mu\text{g L}^{-1}$, uzorci OV1 i OV5), sa srednjim godišnjim protokom od 48723120 i 19552320 m^3/god . Takođe je utvrđeno da su detektovane koncentracije znatno niže od onih pronađenih u otpadnoj vodi na ulazu u PPOV drugih studija, sa nižim srednjim godišnjim protocima.

Tako su više koncentracije koprostanola detektovane u ulaznoj vodi u dva PPOV u Mađarskoj (37–46 $\mu\text{g L}^{-1}$ u rastvornoj fazi, 22–488 $\mu\text{g L}^{-1}$ u suspendovanoj fazi, Andrási *et al.*, 2013), u PPOV u Francuskoj sa kapacitetom od 1800 ES i protokom od 160 m^3/dan (99 $\mu\text{g L}^{-1}$ u rastvornoj fazi, Jeanneau *et al.*, 2011), u PPOV u Nemačkoj sa protokom od 23000 m^3/dan (84 $\mu\text{g L}^{-1}$ u rastvornoj fazi, Beck i Radke, 2006) i u šest PPOV u Kanadi sa ulaznim protokom u opsegu od 900 do 30300 m^3/dan (394–914 $\mu\text{g L}^{-1}$ u rastvornoj fazi, Furtula *et al.*, 2012). Niže koncentracije koprostanola u kanalima otpadne vode u poređenju sa ulaznim vodama u PPOV mogu se objasniti činjenicom da su kanali stalno pod uticajem rečne vode i često su poplavljeni.

Holesterol je bio drugi humani/životinjski sterol detektovan u velikoj količini u kanalizacionim otpadnim vodama, zabeležen pri nivoima od 1,9–5,9 $\mu\text{g L}^{-1}$ u rastvornoj fazi. Hrana bogata holesterolom (meso i jestivo ulje) je glavni izvor velikih količina ovog sterola u otpadnim vodama iz domaćinstva (Leeming *et al.*, 1996). Pronađeni nivoi holesterola su mnogo niži od onih u ulaznim vodama prethodno pomenutih PPOV u Mađarskoj (7,6–43 $\mu\text{g L}^{-1}$, Andrási *et al.*, 2013), Francuskoj (122 $\mu\text{g L}^{-1}$, Jeanneau *et al.*, 2011), Nemačkoj (91 $\mu\text{g L}^{-1}$, Beck i Radke, 2006) i Kanadi (459–1061 $\mu\text{g L}^{-1}$, Furtula *et al.*, 2012). Koncentracije holesterola u suspendovanoj fazi uzoraka otpadnih voda (40–97 $\mu\text{g L}^{-1}$) takođe su niže od onih koje se nalaze u otpadnim vodama na ulazu u PPOV u Mađarskoj (95–442 $\mu\text{g L}^{-1}$, Andrási *et al.*, 2013). Kao i u slučaju koprostanola, niže koncentracije holesterola mogu se objasniti velikim uticajem visokog vodostaja reke, kao i manjim količinama suspendovanog materijala.

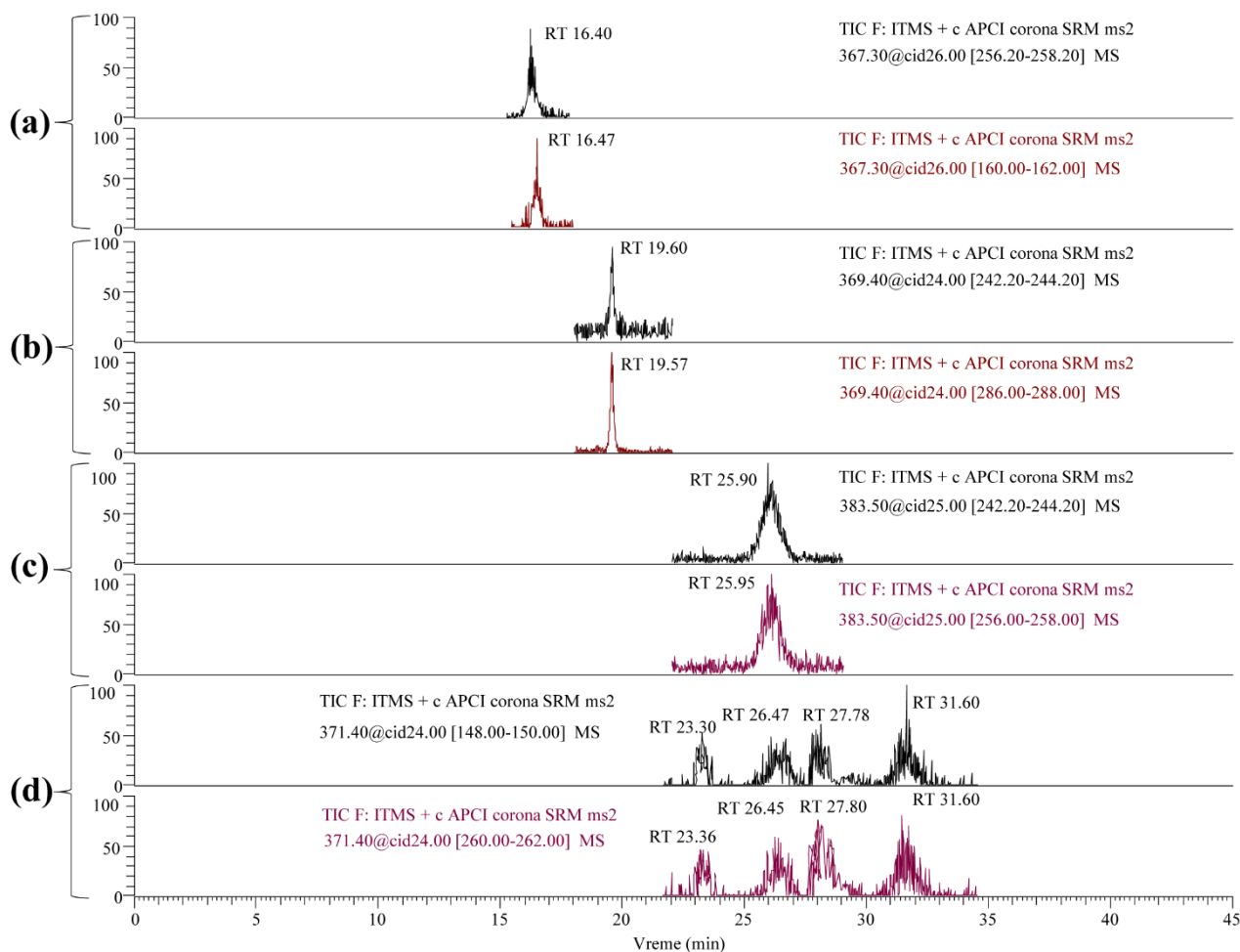
Što se tiče pet detektovanih fitosterola, β -sitosterol je ponovo bio najzastupljeniji, u opsegu koncentracija 0,97–3,6 $\mu\text{g L}^{-1}$ u rastvornoj fazi i 11–70 $\mu\text{g L}^{-1}$ u suspendovanoj fazi uzoraka otpadnih voda. U poređenju sa ulaznim vodama u PPOV, ovi nivoi su niži od onih u Mađarskoj (7,0–42 $\mu\text{g L}^{-1}$ u rastvornoj fazi, 76–130 $\mu\text{g L}^{-1}$ u suspendovanoj fazi, Andrási *et al.*, 2013), Francuskoj (28 $\mu\text{g L}^{-1}$ u rastvornoj fazi, Jeanneau *et al.*, 2011), Nemačkoj (16 $\mu\text{g L}^{-1}$ u rastvornoj fazi, Beck i Radke, 2006) i Kanadi (154–416 $\mu\text{g L}^{-1}$ u rastvornoj fazi, Furtula *et al.*, 2012).

Posmatrajući prosečnu koncentraciju sterola svih uzoraka otpadne vode, u obe faze uzoraka dominira koprostanol (7,5 \pm 3,6 $\mu\text{g L}^{-1}$ u rastvornoj fazi i 154 \pm 43 $\mu\text{g L}^{-1}$ u suspendovanoj fazi), zatim holesterol (4,1 \pm 1,4 $\mu\text{g L}^{-1}$ i 69 \pm 21 $\mu\text{g L}^{-1}$) i β -sitosterol (2,5 \pm 0,9 $\mu\text{g L}^{-1}$ i 37 \pm 22 $\mu\text{g L}^{-1}$). Ostali steroli su prisutni u znatno manjim količinama, kao što je holestanol (0,56 \pm 0,47 $\mu\text{g L}^{-1}$ i 12 \pm 4 $\mu\text{g L}^{-1}$), stigmasterol (0,56 \pm 0,41 $\mu\text{g L}^{-1}$ i 11 \pm 8 $\mu\text{g L}^{-1}$), epikoprostanol (0,24 \pm 0,13 $\mu\text{g L}^{-1}$ i 3,7 \pm 1,8 $\mu\text{g L}^{-1}$), kampesterol (0,18 \pm 0,07 $\mu\text{g L}^{-1}$ i 1,8 \pm 0,7 $\mu\text{g L}^{-1}$) i epiholestanol (0,13 \pm 0,08 $\mu\text{g L}^{-1}$ i 0,69 \pm 0,29 $\mu\text{g L}^{-1}$). Dezmosterol nije pronađen u rastvornoj fazi sirove otpadne vode, ali je otkriven u niskoj koncentraciji od 0,81 \pm 0,65 $\mu\text{g L}^{-1}$ u suspendovanoj materiji. Jedina primetna razlika u obrascu prisustva sterola je u detektovanim nivoima sitostanola koji se ne detektuje u rastvornoj fazi, dok je u suspendovanoj fazi nađen u prosečnoj koncentraciji od 4,1 \pm 1,4 $\mu\text{g L}^{-1}$. U poređenju sa rečnom vodom, u otpadnim vodama je izraženije vezivanje za suspendovanu materiju prilikom raspodele između dve faze za humane/životinjske sterole (92,1 \pm 6,8%) i biljne sterole (95,0 \pm 5,7%), najverovatnije zbog veće količine suspendovanog materijala.

Pored toga, uspostavljena je direktna veza između ispuštanja sirove otpadne vode i visokih nivoa dva ključna humana/životinjska sterola, koprostanola i holesterola, u rečnim vodama. U dva najveća kanalizaciona kanala (OV1 i OV5) nađeni su visoki nivoi koprostanola u rastvornoj fazi (12 i 11 $\mu\text{g L}^{-1}$, respektivno, tabela 4.7). Odgovarajući uzorci površinske vode u koju se direktno izlivaju dva kanala (uzorci RV3 i RV8) sadrže 384 i 232 ng L^{-1} koprostanola u rastvornoj fazi (tabela 4.6), najveće koncentracije među svim uzorcima rečne vode pod uticajem ispusta sirove kanalizacije. Ista veza je primećena između najviših nivoa holesterola detektovanih u rastvornoj fazi uzorka OV1 (5,9 $\mu\text{g L}^{-1}$) i u odgovarajućoj prijemnoj rečnoj vodi (uzorak RV3, 853 ng L^{-1}). Što se tiče suspendovane faze, koncentracije koprostanola i holesterola u uzorku OV3 (229 i 97 $\mu\text{g L}^{-1}$, respektivno) bili su najviši među ispitivanim uzorcima otpadnih voda i odgovarajući uzorak RV5 se izdvojio kao onaj sa najvećim koncentracijama ovih sterola (7553 i 6758 ng L^{-1} , respektivno).

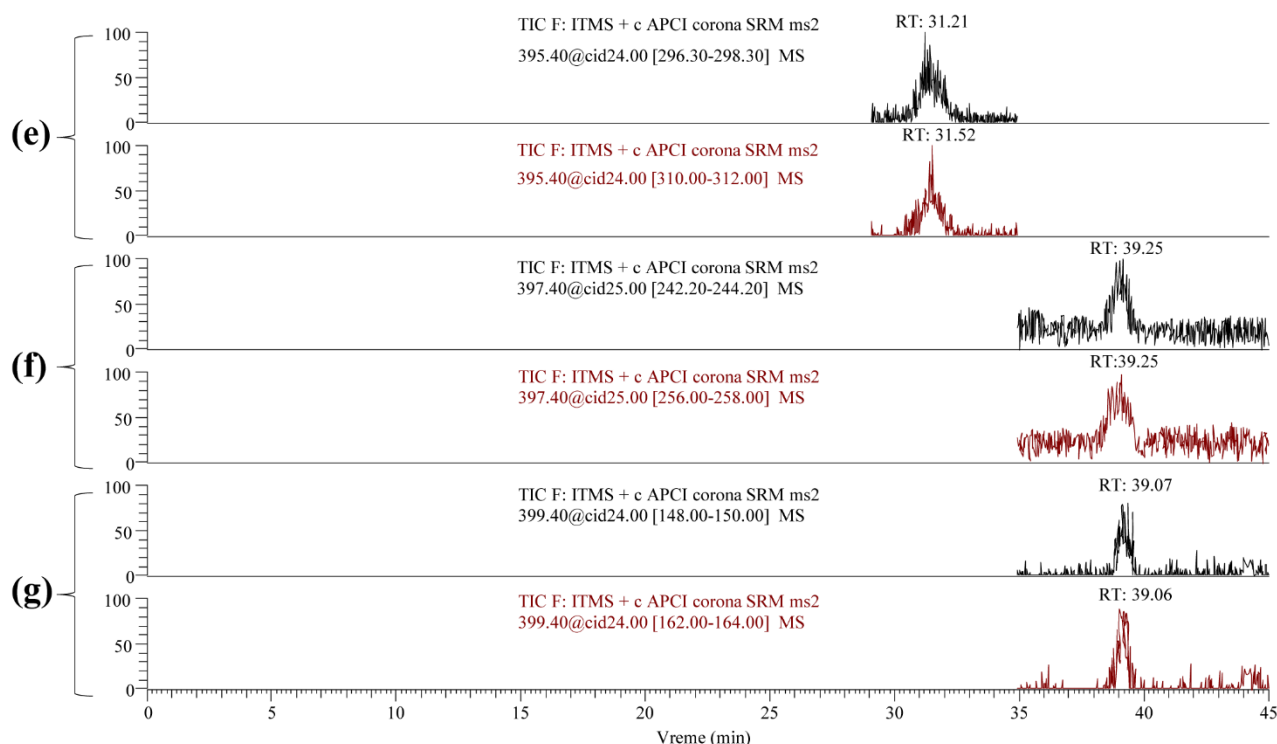
4.7. Potvrda prisustva analita

Potvrda prisustva analita je izvedena ponovnom analizom ekstrakata uzoraka u kojima su detektovana steroidna jedinjenja. U ponovljenoj analizi, instrumentalna metoda se dopunjuje dodatnim reakcijama fragmentacije koje su određene prilikom snimanja masenih spektara svakog analita (tabela 4.1, tabela 1 u Prilogu). Primer masenih hromatograma sa potvrdom prisustva detektovanih sterola prikazan je na slikama 4.10 i 4.11, za suspendovani materijal uzorka RV3 u kome su nađeni svi ispitivani steroli (osim holestanona). Za svaki analit se prate dve odabrane reakcije fragmentacije istog prekursor jona u dva najintenzivnija fragmentna jona.



Slika 4.10. Maseni hromatogrami potvrde prisustva sterola detektovanih u uzorku RV3: (a) dezmosterola; (b) holesterola; (c) kampesterola; (d) epikoprostanola, epiholestanola, koprostanola i holestanola

Rezultati i diskusija

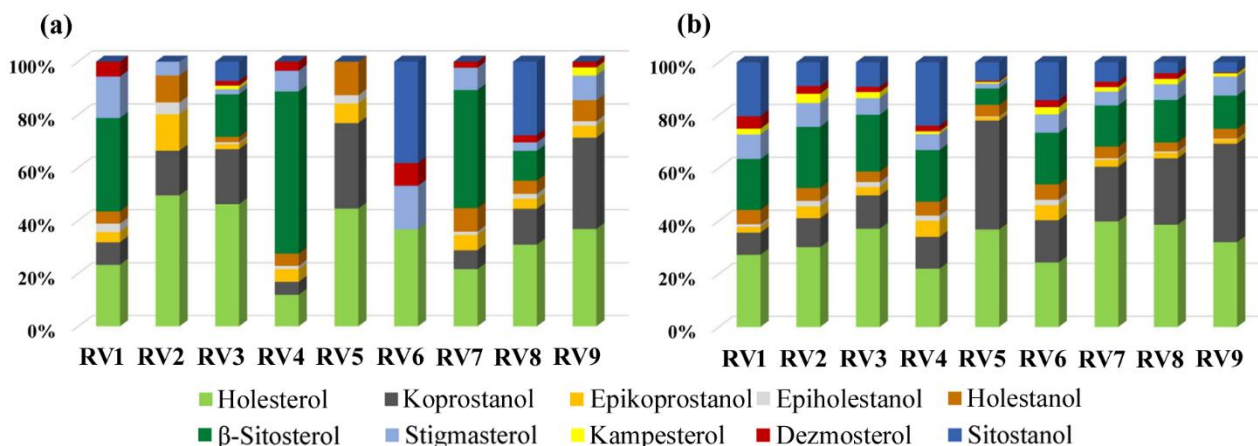


Slika 4.11. Maseni hromatogrami potvrde prisustva sterola detektovanih u uzorku RV3: (e) stigmasterola; (f) β -sitosterola; (g) sitostanola

4.8. Rasprostranjenost sterola u rečnoj vodi i odnosi sterola

Nivoi detektovanih sterola se takođe mogu prikazati u obliku grafikona kako bi se vizuelno izdvojili najzastupljeniji steroli u svakom uzorku i na taj način odredio nivo fekalne kontaminacije uzoraka površinskih voda (slika 4.12). Evidentno je da postoji razlika između raspodele sterola u rastvornoj i suspendovanoj fazi uzoraka rečne vode. Humani/životinjski steroli preovlađuju (više od 60% ukupnih sterola) u rastvornoj fazi uzoraka RV2, RV3, RV5 i RV9 (~90%, ~65%, 100% i ~80%, respektivno) i u suspendovanoj fazi uzoraka RV5, RV7, RV8 i RV9 (~80%, ~65%, ~65% i ~70%, respektivno). Uzimajući u obzir sastav obe faze uzoraka vode, izdvajaju se uzorci Dunava RV5 i RV9 kao najzagađeniji. Uzorak RV9 je uzet u maloj uvali, udaljenoj od glavnog toka Dunava, sa ograničenim protokom rečne vode (slika 3.2). Ovaj uzorak sadrži i najveće koncentracije svih humanih/životinjskih sterola među ispitivanim uzorcima rečne vode. Uzorak RV5 uzet je neposredno pre ušća Dunava u reku Savu, nizvodno od ispusta sirove otpadne vode (uzorak OV3).

S druge strane, visoki nivoi i najveća rasprostranjenost fitosterola zabeležena je za rastvornu fazu uzoraka RV1, RV4 i RV6 (~60%, ~75%, ~70%), kao i u suspendovanoj materiji uzorka RV1 (~60%). Sastav uzorka RV1, uzetog iz Dunava 18 km pre ušća, ukazuje na dominantan biogeni unos poreklom iz viših biljaka iz ruralnih područja (slika 3.2). Pored toga, iz grafikona se može uočiti da nijedan od četiri humana/životinjska sterola nije detektovan u rastvornoj fazi uzorka RV6, a njihovo prisustvo u suspendovanoj fazi uzorka je među najnižima. Dominantni biljni sterol u uzorku RV6 bio je sitostanol (tabela 4.6), jedan od glavnih sterola u fekalnom materijalu biljojeda (Leeming *et al.*, 1996), što ukazuje na dominantan unos sterola biogenog porekla. Očigledno je da je ušće dve reke, odakle je uzet uzorak RV6, najmanje kontaminirano, verovatno zbog turbulentnog mešanja i velikog razblaživanja.



Slika 4.12. Rasprostranjenost sterola u (a) rastvornoj fazi i (b) suspendovanoj fazi uzoraka rečne vode (RV)

Na osnovu prethodnih rezultata (slika 4.12, tabela 4.6), utvrđeno je ozbiljno zagađenje obe reke uzrokovano kanalizacionim otpadnim vodama, a uticaj je izraženiji na sastav suspendovane faze u poređenju sa rastvornom fazom uzoraka vode. Zapravo svi detektovani steroli su primarno vezani za suspendovanu materiju pri raspodeli između rastvorne i suspendovane faze, što ukazuje na neophodnost uzimanja obe faze u obzir prilikom istraživanja zagađenja životne sredine steroidima. Evidentno je da je za dobijanje pouzdane i realne slike kontaminacije steroidnim jedinjenjima i njihove sudbine u vodenoj sredini ključno odrediti raspodelu sterola između rastvorne i suspendovane faze.

Rasprostranjenost sterola i raspodela između faza u rečnoj vodi bili su drugačiji od onih u sirovoj otpadnoj vodi i ukazali su na mnogo veći uticaj fitosterola. Uzorak RV9 je isključen iz izračunavanja prosečnih koncentracija zbog izuzetno visokih nivoa svih detektovanih sterola. U rastvornoj fazi, dominantni sterol je bio holesterol ($366 \pm 226 \text{ ng L}^{-1}$), pa β -sitosterol ($285 \pm 313 \text{ ng L}^{-1}$) i zatim koprostanol ($146 \pm 121 \text{ ng L}^{-1}$), što ukazuje na izraženiji biogeni uticaj poreklom od viših biljaka. U suspendovanoj materiji uzoraka površinske vode, holesterol je takođe bio prisutan u najvećoj koncentraciji ($2629 \pm 2055 \text{ ng L}^{-1}$), dok je redosled prisustva promenjen za koprostanol ($1819 \pm 2435 \text{ ng L}^{-1}$) i β -sitosterol ($1150 \pm 527 \text{ ng L}^{-1}$). Očigledno je da sirova otpadna voda koja se ispušta duž obe reke ima veći uticaj na sastav suspendovane materije. Što se tiče drugih sterola, rasprostranjenost u obe faze bila je ista: sitostanol ($110 \pm 178 \text{ ng L}^{-1}$ u rastvornoj fazi i $838 \pm 685 \text{ ng L}^{-1}$ u suspendovanoj materiji), stigmasterol ($76 \pm 50 \text{ ng L}^{-1}$ i $427 \pm 280 \text{ ng L}^{-1}$), holestanol ($63 \pm 40 \text{ ng L}^{-1}$ i $353 \pm 236 \text{ ng L}^{-1}$), epikoprostanol ($53 \pm 31 \text{ ng L}^{-1}$ i $198 \pm 46 \text{ ng L}^{-1}$), dezmosterol ($33 \pm 22 \text{ ng L}^{-1}$ i $169 \pm 155 \text{ ng L}^{-1}$), kampesterol (25 ng L^{-1} u rastvornoj fazi uzorka RV3 i $130 \pm 68 \text{ ng L}^{-1}$ u suspendovanoj fazi) i epiholesterol ($20 \pm 10 \text{ ng L}^{-1}$ i $73 \pm 21 \text{ ng L}^{-1}$).

Pouzdaniji način za određivanje nivoa kontaminacije prirodnih voda komunalnim otpadnim vodama je korišćenje odnosa sterola. Izračunati odnosi detektovanih sterola i identifikacija humane fekalne kontaminacije u uzorcima površinskih voda prikazani su u tabeli 4.8. Prema referentnim vrednostima odnosa br. 1 (koprostanol/(koprostanol + holestanol)), uzorci RV3, RV5, RV8 i RV9 pokazuju pozitivnu kontaminaciju otpadnim kanalizacionim vodama za obe faze, što ukazuje na veliki uticaj ispuštanja sirovih otpadnih voda duž obe reke. Za ostale uzorke, vrednosti odnosa ukazuju na to da su detektovani steroli mešovitoog porekla, prirodnog i antropogenog, sa većim uticajem humanog zagađenja na sastav suspendovane materije što dovodi do pozitivnih vrednosti odnosa.

Rezultati i diskusija

Koristeći iste referentne vrednosti kao za odnos br. 1, odnos br. 2 (koprostanol + epikoprostanol/(koprostanol + epikoprostanol + holestanol)) kompenzuje uticaj starosti fekalne kontaminacije i dodatno ukazuje na to da je uzorak RV2 kontaminiran otpadnom vodom, pored uzoraka RV3, RV5, RV8 i RV9.

Tabela 4.8. Izračunati odnosi sterola za rastvornu fazu* i suspendovanu fazu** uzoraka rečne vode (RV) upotrebljeni za određivanje humane fekalne kontaminacije

Odnos br.	RV1	RV2	RV3	RV4	RV5	RV6	RV7	RV8	RV9
1.	(~) 0,65*	(~) 0,62	(+) 0,91	(~) 0,52	(+) 0,72	ni	(~) 0,45	(+) 0,73	(+) 0,81
	(~) 0,61**	(~) 0,69	(+) 0,76	(+) 0,70	(+) 0,90	(+) 0,74	(+) 0,82	(+) 0,88	(+) 0,91
2.	(+) 0,73	(+) 0,75	(+) 0,92	(~) 0,68	(+) 0,76	ni	(~) 0,59	(+) 0,78	(+) 0,83
	(~) 0,66	(+) 0,76	(+) 0,80	(+) 0,78	(+) 0,91	(+) 0,79	(+) 0,84	(+) 0,89	(+) 0,91
3.	(-) 0,36	(-) 0,34	(-) 0,45	(-) 0,41	(-) 0,73	ni	(-) 0,33	(-) 0,44	(-) 0,94
	(-) 0,31	(-) 0,36	(-) 0,34	(-) 0,54	(+) 1,12	(-) 0,66	(-) 0,52	(-) 0,65	(+) 1,16
4.	(+) 0,30	(+) 0,28	(+) 0,43	(+) 0,30	(+) 0,57	ni	(+) 0,23	(+) 0,38	(+) 0,77
	(+) 0,26	(+) 0,31	(+) 0,31	(+) 0,44	(+) 1,00	(+) 0,53	(+) 0,47	(+) 0,60	(+) 1,04
5.	(+) 2,15	(-) 1,23	(+) 10,97	(-) 1,03	(+) 4,38	ni	(-) 1,22	(+) 3,57	(+) 7,59
	(+) 3,91	(+) 2,47	(+) 3,96	(+) 1,96	(+) 33,72	(+) 2,82	(+) 8,09	(+) 12,12	(+) 22,72
6.	(~) 0,46	(-) 0,81	(+) 0,09	(-) 0,97	(~) 0,23	ni	(-) 0,82	(~) 0,28	(+) 0,13
	(~) 0,26	(~) 0,41	(~) 0,25	(~) 0,51	(+) 0,03	(~) 0,35	(+) 0,12	(+) 0,08	(+) 0,04

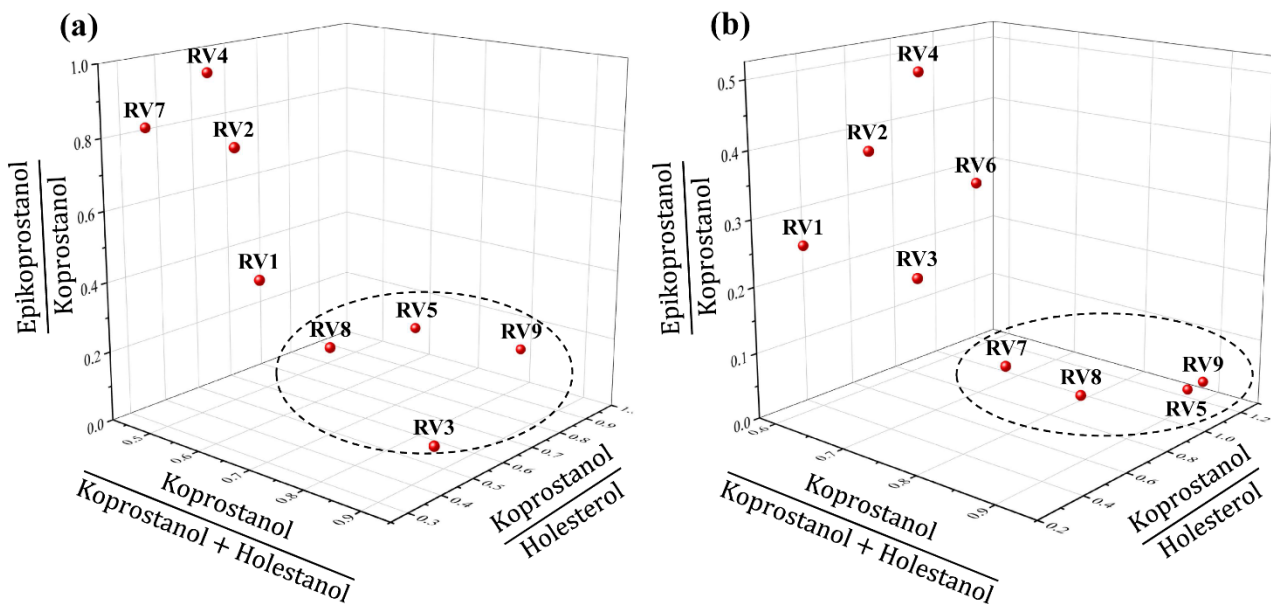
(+) sigurno humano fekalno zagađenje; (~) nesigurno humano fekalno zagađenje; (-) negativno humano fekalno zagađenje; ni – nije izračunato.

Na osnovu vrednosti odnosa br. 3 (koprostanol/holesterol) utvrđeno je humano zagađenje samo u suspendovanom materijalu uzoraka RV5 i RV9. Međutim, rastvorne faze ova dva uzorka su imale najveću vrednost odnosa (0,73 i 0,94, respektivno) u poređenju sa ostalim uzorcima (0,34–0,44, tabela 4.8). Neki autori su sugerisali da mnogo niža vrednost odnosa koprostanol/holesterol (> 0,2) treba da ukazuje na fekalno zagađenje (Grimalt *et al.*, 1990; Kong *et al.*, 2015). Prema referentnoj vrednosti 0,06 za odnos br. 4 (koprostanol/(holesterol + holestanol)), svi ispitivani uzorci pokazuju sigurno humano fekalno zagađenje. Međutim, uzorci RV5 i RV9 se ističu sa višim vrednostima odnosa za obe faze, rastvorne (0,57 i 0,77, respektivno) i suspendovane (1,00 i 1,04) u poređenju sa ostalim uzorcima površinske vode (0,23–0,43 za rastvornu fazu i 0,26–0,60 za suspendovanu fazu), što ukazuje na jako kontaminirana mesta uzorkovanja.

Za odnos koprostanol/epikoprostanol (odnos br. 5), vrednost veća od 1,5 je određena i za rastvornu i za suspendovanu fazu uzoraka RV1, RV3, RV5, RV8 i RV9, potvrđujući unos humanog otpada u obe ispitivane reke. S obzirom na to da na istraživanom području nema PPOV, vrednosti odnosa br. 6 (epikoprostanol/koprostanol) niže od 0,2 ukazuju na ispuštanje netretiranih otpadnih voda i prisustvo sirove fekalne materije humanog porekla. Utvrđeno je da je samo uzorak RV9 pozitivan na humano fekalno zagađenje, budući da su i rastvorna i suspendovana faza uzorka vode imale vrednost odnosa ispod 0,2. Ipak, uzorci RV3, SV5 i SV8 su imali pozitivnu vrednost odnosa za jednu fazu (rastvornu ili suspendovanu), dok je druga faza imala vrednost veoma blizu referentne vrednosti 0,2 (do 0,28).

Poređenjem vrednosti odnosa sterola izračunatih za rastvornu i suspendovanu fazu svakog uzorka rečne vode (tabela 4.8), može se primetiti da su vrednosti odnosa (odnosi br. 1 – br. 5) dobijeni za rastvornu fazu generalno niži od onih za suspendovani materijal. Zbog raspodele između dve faze uzorka vode u kojoj se steroli pretežno vezuju za suspendovani materijal, dobijene su veće vrednosti npr. odnosa br. 1 (0,61–0,91) i odnosa br. 3 (0,31–1,16) u poređenju sa onim za rastvornu fazu (0,45–0,91 i 0,33–0,94, respektivno). Zbog viših vrednosti nekih odnosa dobijenih za suspendovanu fazu, više uzoraka je prepoznato kao pozitivno na humano fekalno zagađenje. U slučaju odnosa br. 6, sa vrednostima manjim od 0,2 koje ukazuju na pozitivno zagađenje poreklom od čoveka, dobijene su niže vrednosti za suspendovani materijal (0,03–0,51) u poređenju sa rastvornom fazom (0,09–0,97). Jasno je da kada se ispituje zagađenje životne sredine steroidnim jedinjenjima i njihova sudbina u vodenj sredini, neophodno je razmotriti i analizirati obe faze vodenih uzoraka.

Dobijeni rezultati za odnose sterola i izvedeni zaključci mogu se vizuelizovati korišćenjem 3D dijagrama tri najpouzdanija odnosa sterola br. 1, br. 3 i br. 6, za rastvornu i suspendovanu fazu površinskih uzoraka vode, respektivno (slika 4.13). Naime, u dosadašnjem radu ova tri odnosa su se pokazala kao najpouzdanija za procenu kanizacionog zagađenja sedimenata u slivu reke Dunav (Matić Bujagić *et al.*, 2016). Odnosi br. 1 i br. 2 su veoma slični jer uzimaju u obzir iste ključne biomarkere. Uključivanje epikoprostanola u odnos br. 2 što kompenzuje uticaj starosti fekalnog zagađenja nije značajno poboljšalo procenu fekalne kontaminacije Dunava i Save (tabela 4.8). Zbog toga je odnos br. 1 izabran za 3D dijagrame kao jedan od najpouzdanijih i najčešće korišćenih odnosa sterola. Odnos br. 5 (koprostanol/epikoprostanol) je recipročan odnosu br. 6, iako referentne vrednosti ova dva odnosa nisu recipročne. Izračunate vrednosti odnosa br. 5 ukazale su na kanizaciono zagađenje skoro svih ispitivanih uzoraka rečne vode, dok je odnos br. 6 mogao da razlikuje nivoe fekalne kontaminacije (tabela 4.8). Očigledno je da je odnos br. 6 selektivniji, zbog čega je izabran kao pouzdaniji od odnosa br. 5 za praćenje izvora fekalnog zagađenja. U poređenju sa odnosom br. 3 (koprostanol/holesterol), odnos br. 4 (koprostanol/(holesterol + holestanol)) manje je selektivan jer je pokazao sigurno zagađenje svih rečnih voda humanim otpadnim materijalom. Čini se da je referentna vrednost 0,06 previše niska da bi se pouzdano identifikovala humana fekalna kontaminacija. Tri najpouzdanija odnosa sterola su primenjena za procenu fekalnog zagađenja Dunava i Save korišćenjem 3D dijagrama.



Slika 4.13. 3D dijagrami tri najpouzdanija odnosa sterola za (a) rastvornu fazu i (b) suspendovanu fazu uzoraka rečne vode (RV) sa izdvojenim najzagađenijim uzorcima

Iz 3D dijagrama se može videti da postoji razlika između uzoraka koji su se izdvojili kao najzagađeniji u rastvornoj i suspendovanoj fazi uzoraka vode. U oba slučaja, kao jako kontaminirani, izdvojili su se uzorci RV5, RV8 i RV9. Međutim, dodatno se istakao uzorak RV3 u rastvornoj fazi, dok je uzorak RV7 izdvojen u suspendovanoj fazi. Očigledno je da postoji veoma veliki uticaj najvećeg gradskog ispusta otpadnih voda (uzorak OV1, slika 3.2) na sastav rastvorne faze uzorka RV3. Zapravo, najviši nivo koprostanola u rastvornoj fazi svih ispitivanih uzoraka zabeležen je u uzorku RV3 reke Save (384 ng L^{-1} , tabela 4.6), pri čemu je uzorak RV9 isključen zbog specifičnih uslova na mestu uzorkovanja. Takođe se može primetiti da su koncentracije koprostanola u rastvornoj fazi generalno slične u uzorcima obe reke ($65\text{--}384 \text{ ng L}^{-1}$, za uzorke Save RV2, RV3, RV4, u poređenju sa $71\text{--}232 \text{ ng L}^{-1}$, za uzorke Dunava RV1, RV5, RV7, RV8).

Što se tiče suspendovane faze, svi uzorci Dunava pod uticajem ispuštanja komunalnih otpadnih voda u Beogradu pokazali su visoko fekalno zagađenje (slika 4.13b, uzorci RV5, RV7–RV9). Upoređujući nivoe koprostanola u suspendovanom materijalu obe reke, evidentno je da je Dunav ($951\text{--}7553 \text{ ng L}^{-1}$) mnogo zagađenija reka od Save ($306\text{--}531 \text{ ng L}^{-1}$). Ovo se može objasniti različitim hidrodinamičkim uslovima dve reke. Kako je prosečan godišnji protok Dunava oko 3,5 puta viši od njene pritoke Save (Simić *et al.*, 2017), ovaj visokoenergetski tok može da podstakne mobilizaciju čestica istaloženih na rečnom dnu i resuspendovanje sedimenata sa akumuliranim zagađujućim materijama. S druge strane, sporiji tok reke Save dovodi do taloženja suspendovanog materijala unetog otpadnim vodama, potencijalno povećavajući skladištenje zagađujućih supstanci u sedimentima.

4.9. Steroli detektovani u PPOV i efikasnost njihovog uklanjanja

Nivoi sterola detektovani u rastvornoj i suspendovanoj fazi otpadne vode na ulazu i izlazu iz dva PPOV u Republici Srbiji, kao i stepen njihovog uklanjanja tokom prečišćavanja, predstavljeni su u tabeli 4.9. Profili sterola uzoraka iz dva postrojenja bili su slični onima za uzorke iz kanizacionih otpadnih voda (tabela 4.7), pri čemu su najčešći steroli koprostanol, holesterol i β -sitosterol. Nivoi ovih sterola u PPOV su takođe uporedivi sa njihovim koncentracijama u sirovoj otpadnoj vodi (holesterol do $5,9 \mu\text{g L}^{-1}$, koprostanol do $12 \mu\text{g L}^{-1}$, β -sitosterol do $3,6 \mu\text{g L}^{-1}$, tabela 4.7).

Procenjena je efikasnost prečišćavanja (EP) sterola u dva PPOV i rezultati su upoređeni. Efikasnost prečišćavanja je procenjena poređenjem koncentracija sterola u ulaznoj i izlaznoj vodi iz postrojenja (Chang *et al.*, 2011). Iako su koncentracije steroidnih jedinjenja u ulaznoj vodi dva postrojenja bile slične, PPOV2 je efikasnije u prečišćavanju, sa mnogo nižim nivoima sterola u efluentima postrojenja. Iako oba PPOV primenjuju istu tehnologiju prečišćavanja (mehanički tretman praćen biološkim tretmanom sa aktivnim muljem), pokazuju velike razlike u performansama. PPOV1 nije bio u potpunosti operativan u vreme uzorkovanja, a rezultati su pokazali da je postrojenje radilo sa nižom efikasnošću od projektovane. Puni kapacitet od 2000 ekvivalent stanovnika (ES) je dostignut 2021. godine, godinu dana nakon uzorkovanja. Stepenn uklanjanja koprostanola bio je mnogo veći u PPOV2 (99% za rastvornu i 98% za suspendovanu fazu), nego u PPOV1 (52% za rastvornu fazu i 95% za suspendovani materijal). Dobijene vrednosti EP za PPOV2, kapaciteta 8000 ES i protoka ulazne vode od $1089 \text{ m}^3/\text{dan}$, uporedive su sa drugim studijama koje pokazuju veoma visoku efikasnost eliminacije koprostanola. U dva PPOV u Mađarskoj dobijene EP su bile 88–98% za rastvornu fazu i do 98% za suspendovanu fazu (Andrási *et al.*, 2013). PPOV u Francuskoj, kapaciteta 1800 ES i protoka ulazne vode od $160 \text{ m}^3/\text{dan}$, pokazalo je 99% EP za rastvornu fazu (Jeanneau *et al.*, 2011), dok je šest PPOV u Kanadi, sa protokom ulazne vode u opsegu $900\text{--}30300 \text{ m}^3/\text{dan}$, pokazalo EP od 86–100% za rastvornu fazu (Furtula *et al.*, 2012).

Tabela 4.9. Koncentracije detektovanih sterola i efikasnost prečišćavanja (EP) u rastvornoj fazi* i suspendovanoj fazi** uzoraka iz postrojenja za prečišćavanje otpadnih voda (PPOV)

Steroidi	Koncentracija±SD, µg L ⁻¹				Efikasnost prečišćavanja, %	
	PPOV1		PPOV2		PPOV1	PPOV2
	Ulaz	Izlaz	Ulaz	Izlaz		
Holesterol	6,7±1,4* (111±16)**	3,5±1,1 (18±3)	7,5±1,2 (117±8)	0,07±0,01 (2,4±0,7)	48 (84)	99 (98)
Koprostanol	11±3 (1210±196)	5,3±1,8 (56±7)	9,2±1,1 (91±5)	0,11±0,01 (2,1±0,4)	52 (95)	99 (98)
Epikoprostanol	0,45±0,11 (6,8±1,5)	0,15±0,04 (1,8±0,3)	1,1±0,06 (3,3±0,1)	0,17±0,01 (0,12±0,02)	67 (74)	85 (96)
Epiholestanol	0,11±0,02 (1,1±0,1)	0,07±0,02 (0,19±0,02)	0,26±0,05 (1,5±0,1)	0,04±0,01 (0,09±0,01)	36 (83)	85 (94)
Holestanol	0,81±0,19 (20±1)	0,58±0,15 (4,3±0,4)	0,58±0,12 (11±1)	0,09±0,01 (0,90±0,20)	28 (79)	84 (92)
β-Sitosterol	1,9±0,6 (103±22)	1,1±0,3 (15±3)	2,5±0,1 (50±6)	– (2,3±0,3)	42 (85)	100 (95)
Stigmasterol	13±3 (25±3)	0,38±0,10 (3,4±0,9)	– (7,3±0,1)	– (0,35±0,06)	97 (86)	– (95)
Kampesterol	0,25±0,02 (3,2±0,6)	0,07±0,01 (0,73±0,08)	– (2,9±0,1)	– (0,06±0,01)	72 (77)	– (98)
Dezmosterol	0,13±0,04 (2,8±0,2)	0,09±0,02 (0,56±0,04)	– (4,1±0,2)	– (0,37±0,08)	31 (80)	– (91)
Sitostanol	0,71±0,18 (8,4±1,9)	– (1,6±0,2)	3,1±0,7 (85±3)	– (0,57±0,05)	100 (81)	100 (99)

Slično koprostanolu, eliminacija holesterola tokom tretmana otpadnih voda je efikasnija u PPOV2 (99% za rastvornu fazu i 98% za suspendovani materijal), u poređenju sa PPOV1 (48% za rastvornu i 84% za suspendovanu fazu). Visoke EP vrednosti postignute u PPOV2 su slične onima dobijenim u PPOV u Mađarskoj (90–98% za rastvornu fazu i 89–99% za suspendovanu fazu, András *et al.*, 2013), Francuskoj (99% za rastvornu fazu, Jeanneau *et al.*, 2011) i Kanadi (86–99% za rastvornu fazu, Furtula *et al.*, 2012).

Ostali detektovani humani/životinjski steroli (epikoprostanol, epiholestanol i holestanol) su pokazali sličan trend eliminacije kao koprostanol i holesterol, sa niskim vrednostima EP dobijenim za rastvornu fazu otpadnih voda u PPOV1 (čak 28% za holestanol) i efikasnim uklanjanjem postignutim za suspendovani materijal u PPOV1 (iznad 70%), kao i za obe faze uzoraka otpadnih voda u PPOV2 (iznad 80% i 90%, respektivno). Visoke vrednosti EP epikoprostanola, epiholestanola i holestanola dobijene za rastvornu fazu u PPOV2 uporedive su sa rezultatima dobijenim u Francuskoj (91%, 100%, do 98%, respektivno, Jeanneau *et al.*, 2011) i Kanadi (69–99% za epikoprostanol, 82–100% za epiholestanol, Furtula *et al.*, 2012).

Što se tiče fitosterola, β -sitosterol i dezmosterol slede trend uklanjanja sličan humanim/životinjskim sterolima. Veoma visoke vrednosti EP za β -sitosterol su postignute u PPOV2 (100% za rastvornu fazu i 95% za suspendovani materijal) i za suspendovanu fazu otpadnih voda u PPOV1 (85%), dok su niske EP dobijene za rastvornu fazu u PPOV1 (43%). U sličnim studijama postignuto je efikasno uklanjanje β -sitosterola u dva PPOV u Mađarskoj (89% i 92% za rastvornu fazu i do 99% za suspendovani materijal, Andrási *et al.*, 2013), PPOV u Francuskoj (99% za rastvornu fazu, Jeanneau *et al.*, 2011) i šest PPOV u Kanadi (80–99% za rastvornu fazu, Furtula *et al.*, 2012). Za dezmosterol, postignuta je visoka efikasnost uklanjanja za suspendovani materijal oba PPOV (80% i 91%), dok je niska efikasnost uklanjanja dobijena za rastvornu fazu otpadne vode u PPOV1 (31%). Za ostale detektovane biljne sterole, stigmasterol, kampesterol i sitostanol, rezultati pokazuju visoke EP u oba ispitivana PPOV, i za rastvornu fazu (97%, 72%, 100%, respektivno, u PPOV1 i 100% za sitostanol u PPOV2) i za suspendovanu fazu (86%, 77%, 81%, respektivno, u PPOV1 i 99% za sitostanol u PPOV2). Ove vrednosti su uporedive sa onim u studijama sprovedenim u Francuskoj (do 96%, do 100%, 94%, respektivno, Jeanneau *et al.*, 2011) i Kanadi (do 96%, 88–99%, 87–100%, Furtula *et al.*, 2012).

Generalno, efikasnost uklanjanja sterola u PPOV2 je bila visoka, sa preko 80% EP postignutim za sve ispitivane sterole (84–100% u rastvornoj fazi i 91–99% u suspendovanom materijalu). S druge strane, PPOV1 je pokazalo niže vrednosti EP za rastvornu fazu, sa polovinom detektovanih jedinjenja uklonjenim sa EP < 50%, dok je EP bila veća za suspendovanu fazu (74–95%). Dobijeni rezultati su potvrdili da PPOV1 nije bilo u potpunosti operativno u vreme uzorkovanja.

Tabela 4.10. Izračunati odnosi sterola za rastvornu fazu* i suspendovanu fazu** uzoraka komunalne otpadne vode (OV)

Odnos br.	OV1	OV2	OV3	OV4	OV5	OV6
1.	(+) 0,93*	(+) 0,92	(+) 0,92	(+) 0,93	(+) 0,89	ni
	(+) 0,95**	(+) 0,93	(+) 0,95	(+) 0,87	(+) 0,93	(+) 0,92
2.	(+) 0,93	(+) 0,92	(+) 0,92	(+) 0,94	(+) 0,90	ni
	(+) 0,95	(+) 0,94	(+) 0,95	(+) 0,87	(+) 0,93	(+) 0,92
3.	(+) 2,03	(+) 1,35	(+) 1,10	(+) 2,00	(+) 2,75	(+) 1,80
	(+) 2,21	(+) 2,15	(+) 2,36	(+) 1,57	(+) 3,80	(+) 1,99
4.	(+) 1,78	(+) 1,20	(+) 1,00	(+) 1,75	(+) 2,08	ni
	(+) 1,96	(+) 1,87	(+) 2,12	(+) 1,26	(+) 0,22	(+) 1,69
5.	(+) 48,00	(+) 28,75	(+) 14,17	(+) 11,88	(+) 28,95	ni
	(+) 49,33	(+) 50,43	(+) 55,85	(+) 15,71	(+) 63,33	(+) 55,16
6.	(+) 0,02	(+) 0,03	(+) 0,07	(+) 0,08	(+) 0,03	ni
	(+) 0,02	(+) 0,02	(+) 0,02	(+) 0,06	(+) 0,02	(+) 0,02

(+) sigurno humano fekalno zagađenje; (–) nesigurno humano fekalno zagađenje;
(–) negativno humano fekalno zagađenje; ni – nije izračunato.

Tabela 4.11. Izračunati odnosi sterola za rastvornu fazu* i suspendovanu fazu** uzoraka otpadne vode iz postrojenja za prečišćavanje otpadnih voda (PPOV)

Odnos br.	PPOV1		PPOV2	
	Ulaz	Izlaz	Ulaz	Izlaz
1.	(+) 0,93*	(+) 0,90	(+) 0,94	(~) 0,55
	(+) 0,98**	(+) 0,93	(+) 0,89	(~) 0,70
2.	(+) 0,93	(+) 0,90	(+) 0,95	(+) 0,76
	(+) 0,98	(+) 0,93	(+) 0,90	(+) 0,71
3.	(+) 1,64	(+) 1,51	(+) 1,23	(+) 1,57
	(+) 10,90	(+) 3,11	(-) 0,78	(-) 0,88
4.	(+) 1,46	(+) 1,30	(+) 1,14	(+) 0,69
	(+) 9,24	(+) 2,51	(+) 0,71	(+) 0,64
5.	(+) 24,44	(+) 35,33	(+) 8,36	(-) 0,65
	(+) 177,94	(+) 18,06	(+) 27,58	(+) 17,5
6.	(+) 0,04	(+) 0,03	(+) 0,12	(-) 1,55
	(+) 0,01	(+) 0,06	(+) 0,04	(+) 0,06

(+) sigurno humano fekalno zagađenje; (~) nesigurno humano fekalno zagađenje;
 (-) negativno humano fekalno zagađenje.

Konačno, za uzorke sirove komunalne otpadne vode izračunati su odnosi sterola (tabela 4.10), kao i za uzorke ulazne i izlazne vode oba postrojenja za prečišćavanje otpadnih voda (tabela 4.11), da bi se utvrdile moguće vrednosti tipične za netretirane otpadne vode i odnosi koji mogu identifikovati poboljšanje kvaliteta otpadnih voda tokom tretmana u PPOV. Očekivano, svi uzorci kanalizacionih otpadnih voda pokazuju pozitivnu fekalnu kontaminaciju. Od šest testiranih odnosa, vrednosti tri odnosa: br. 1, br. 2 (0,87–0,95 za oba) i br. 6 (0,02–0,08) imaju uzan opseg i mogu se primeniti kao karakteristični za komunalne otpadne vode. Takođe je utvrđeno da su se samo u slučaju odnosa koprostanol/(koprostanol + holestanol), za obe faze uzorka vode, vrednosti smanjile od onih koje ukazuju na sigurnu humanu fekalnu kontaminaciju u ulaznoj vodi u PPOV do onih koje ukazuju na nesigurnu fekalnu kontaminaciju u efluentu. Tokom tretmana u PPOV2, vrednosti odnosa br. 1 su smanjene sa 0,94 za rastvornu fazu i 0,89 za suspendovani materijal do 0,55 i 0,70, respektivno.

5. ZAKLJUČAK

Svrha ove doktorske disertacije bila je razvoj i optimizacija nove analitičke metode za određivanje tragova steroidnih jedinjenja u uzorcima površinskih i otpadnih voda, i to u rastvornoj i suspendovanoj fazi uzoraka. Istraživanje je obuhvatilo optimizaciju procedure pripreme uzoraka vode i suspendovane materije za analizu, kao i instrumentalne metode tečne hromatografije u sprezi sa tandem masenom spektrometrijom. Analizirano je šest humanih/životinjskih sterola, pet biljnih sterola i devet steroidnih hormona. Tečno-hromatografska metoda razdvajanja odabranih steroidnih jedinjenja predstavljala je najveći izazov zbog postojanja izomernih jedinjenja koja imaju identične reakcije fragmentacije u masenom analizatoru, pa ih je nemoguće razlikovati metodom tandem masene spektrometrije. Novorazvijena i validirana metoda je primenjena u analizi realnih uzoraka površinskih i otpadnih voda, sa posebnom pažnjom posvećenom suspendovanom materijalu uzoraka. Rezultati su pokazali izuzetnu opterećenost vodenog ekosistema steroidnim jedinjenjima, posebno sterolima, na širem području Beograda, kao najvećeg grada Republike Srbije, bez postrojenja za preradu komunalne otpadne vode. Odnosi detektovani sterola su identifikovali izvore zagađenja koji su primarni činioci pogoršanja stanja životne sredine u urbanim sredinama. Na osnovu rezultata dobijenih u ovom radu mogu biti doneseni sledeći zaključci:

Optimalni uslovi za tečno-hromatografsko razdvajanje i maseno-spektrometrijsko detektovanje steroidnih jedinjenja:

- ✓ Optimalno hromatografsko razdvajanje svih 20 steroida postignuto je na Zorbax Eclipse® XDB-C₈ reverzno-faznoj koloni tokom 45 min analize. Izomerna jedinjenja steroidnih hormona koja imaju iste fragmentne jone (estriol i estron, odnosno 17 α - i 17 β -estradiol) potpuno su hromatografski razdvojena pri mobilnoj fazi sastava 45% acetonitrila, 50% dejonizovane vode i 5% rastvora sirćetne kiseline (10%, v/v).
- ✓ Četiri izomerna sterola (epikoprostanol, epiholestanol, koprostanol i holestanol) razdvojeni su na istoj hromatografskoj koloni koristeći mobilnu fazu sastava 83% acetonitrila, 12% dejonizovane vode i 5% rastvora sirćetne kiseline (10%, v/v).
- ✓ Sva odabrana steroidna jedinjenja su efikasno jonizovana upotrebom hemijske jonizacije na atmosferskom pritisku formirajući pritom isključivo pozitivne jone.
- ✓ Kao prekursor joni za pet analita odabrani su protonovani molekuli [M+H]⁺ (estron, noretindron, ekvilin, levonorgestrel i holestanon), dok su ostali kao najintenzivnije jone formirali protonovane dehidratisane jone [M-H₂O+H]⁺.
- ✓ Svi odabrani analiti su uspešno identifikovani i kvantifikovani upotrebom karakterističnih reakcija fragmentacije prekursor jona u najintenzivniji i najstabilniji fragmentni jon.
- ✓ U uzorcima koji su pozitivni na prisustvo steroidnih jedinjenja, potvrda prisustva je uspešno izvršena ponovno analizom ekstrakata uz korišćenje proširene instrumentalne metode koja uključuje dodatne MSⁿ reakcije fragmentacije.

Optimalni uslovi za ekstrakciju i predkoncentrisanje steroidnih jedinjenja iz uzoraka vode i suspendovanog materijala:

- ✓ Najbolji prinosi metode ekstrakcije uzoraka vode, za sve ispitivane analite, postignuti su primenom sorbenta OASIS HLB sa uravnoteženim hidrofилnim i lipofilnim svojstvima i metanola kao rastvarača za eluiranje, zapremine 15 mL.
- ✓ Optimalna vrednost pH uzorka vode pri kojoj je prinos metode najveći je 7,5, tj. SPE procedura se izvodi bez podešavanja pH ukoliko je vrednost pH realnog uzorka približna ovoj vrednosti.
- ✓ Za optimalnu zapreminu uzoraka površinske i otpadne vode odabrano je 200 mL. Ova zapremina uzorka obezbeđuje visoke prinose i visoke stepene predkoncentrisanja, uz kraće vreme potrebno za pripremu uzorka.

Zaključak

- ✓ Dobijeni prinosi metode za širok opseg testiranih koncentracija bili su u optimalnom opsegu od 70% do 112% za površinske vode, odnosno od 70% do 114% za otpadne vode.
- ✓ Dokazana je dobra ponovljivost razvijene metode sa RSD vrednostima uglavnom manjim od 20%. Dobijena je i dobra linearnost razvijene metode sa koeficijentom korelacije za površinske vode u opsegu od 0,9812 do 0,9995, odnosno od 0,9844 do 0,9999 za otpadne vode.
- ✓ Postignute su niske granice detekcije i kvantifikacije za sve odabrane analite u analiziranim vodenim matricama. U površinskoj vodi granica detekcije i granica kvantifikacije su bile u opsegu 0,7–15,0 ng L⁻¹ i 2,3–50,0 ng L⁻¹, respektivno, dok su za otpadne vode ove vrednosti bile 1,7–15,0 ng L⁻¹ i 5,7–50,0 ng L⁻¹, respektivno.
- ✓ Utvrđeno je da sastojci matrice nemaju značajan uticaj na signale analita. Uticaj matrice bio je niži od 20% za obe ispitivane vodene matrice na svim koncentracionim nivoima.
- ✓ Ultrazvučna ekstrakcija steroida iz suspendovanog materijala uspešno je izvršena korišćenjem prilagođenog postupka za ekstrakciju steroida iz rečnih sedimenata. Da bi se koncentracije analita u suspendovanoj fazi mogle uporediti sa onim u rastvornoj fazi uzoraka vode, bilo je neophodno koncentracije dobijene u ng g⁻¹ prevesti u ng L⁻¹ znajući masu suspendovane materije i zapreminu svakog uzorka vode.

Rezultati analize realnih uzoraka površinskih, komunalnih otpadnih i otpadnih voda iz PPOV:

- ✓ U analiziranim uzorcima površinskih i otpadnih voda nisu pronađeni tragovi steroidnih hormona, kao ni humanog/životinjskog sterola holestanona. Nemogućnost detektovanja steroidnih hormona se može objasniti ograničenošću primenjene metode prilikom detektovanja analita prisutnih u koncentracijama blizu granica detekcije, posebno u kompleksnoj matrici otpadnih voda. Odsustvo holestanona se može pripisati nedostatku aerobne mikrobiološke aktivnosti, pošto se pretežno formira degradacijom holesterola u aerobnim uslovima.
- ✓ U svim ispitivanim uzorcima vode, i u rastvornoj i u suspendovanoj fazi, pronađeno je pet humanih/životinjskih sterola, pri čemu je holesterol dominantno jedinjenje u rečnoj vodi, dok je koprostanol bio očekivano najistaknutiji u uzorcima otpadnih voda.
- ✓ Od pet ispitivanih biljnih sterola, β-sitosterol je bio najzastupljeniji.
- ✓ Rasprostranjenost sterola i raspodela između faza u rečnoj vodi bili su drugačiji od onih u sirovoj otpadnoj vodi, što ukazuje na izraženiji biogeni uticaj poreklom od viših biljaka, kao i veći uticaj ispuštanja otpadnih voda na sastav suspendovane materije.
- ✓ Utvrđeno je da se svi detektovani humani/životinjski i biljni steroli dominantno vezuju za čestice suspendovanog materijala uzoraka rečne vode (83,0±11,9% i 87,1±15,2%, respektivno), odnosno komunalne otpadne vode (92,1±6,8% i 95,0±5,7%), u poređenju sa rastvornom fazom. Zbog toga je za dobijanje pouzdane i realne slike kontaminacije steroidnim jedinjenjima i njihove sudbine u vodenoj sredini ključno uzeti u obzir obe faze, rastvornu i suspendovanu.
- ✓ Utvrđena je direktna veza između ispuštanja sirove otpadne vode i visokih nivoa dva ključna humana/životinjska sterola, koprostanola i holesterola, u rečnim vodama. Uzorci površinske vode u koju se direktno izlivaju dva najveća otpadna kanala sadrže najveće koncentracije među svim uzorcima rečne vode pod uticajem ispusta sirove kanalizacije.
- ✓ Utvrđeno je da je Dunav više zagađen ispuštanjem netretiranih komunalnih otpadnih voda od Save, zbog značajno veće koncentracije sterola u suspendovanom materijalu, dok su nivoi u rastvornoj fazi dve reke bili slični. Ovo se može objasniti različitim hidrodinamičkim uslovima dve reke koji dovode do različite sudbine steroida vezanih za suspendovanu materiju u vodenoj sredini.
- ✓ Utvrđeno je da je ušće dve reke najmanje kontaminirano, verovatno zbog turbulentnog mešanja vode i velikog razblaživanja.

Zaključak

- ✓ U poređenju sa sličnim studijama, nivoi sterola pronađeni u rečnoj vodi bili su znatno veći, dok su njihove koncentracije u otpadnim vodama bile znatno niže, što ukazuje na ozbiljno zagađenje steroidima na području ušća reka Dunava i Save u Beogradu.
- ✓ Upotreba odnosa sterola je pokazala pozitivnu humanu fekalnu kontaminaciju obe faze za većinu uzoraka rečne vode, ukazujući na veliki uticaj ispuštanja sirovih otpadnih voda duž obe reke. Međutim, kod nekih uzoraka zabeležen je veći uticaj na sastav suspendovane materije.
- ✓ Korišćenjem 3D dijagrama tri najpouzdanija odnosa sterola istaknuta je razlika između uzoraka koji su se izdvojili kao najzagađeniji u rastvornoj i suspendovanoj fazi uzoraka vode.
- ✓ Takođe je utvrđeno da su vrednosti odnosa sterola (odnosi br. 1 – br. 5) dobijene za suspendovanu fazu generalno bile veće od onih za rastvornu fazu.
- ✓ Efikasnost uklanjanja sterola u operativnom PPOV je bila visoka i uporediva sa sličnim studijama, sa preko 80% postignutim uklanjanjem za sve ispitivane sterole, kao i koprostanolom i holesterolom uklonjenim sa više od 98% iz rastvorne i suspendovane faze.
- ✓ Od šest testiranih odnosa, vrednosti tri odnosa br. 1, br. 2 (0,87–0,95 za oba) i br. 6 (0,02–0,08) imaju uske opsege koji se mogu primeniti kao karakteristični za komunalne otpadne vode.
- ✓ Utvrđeno je da je samo odnos koprostanol/(koprostanol + holestanol) bio dovoljno osetljiv da na njega utiče poboljšanje kvaliteta prečišćenih otpadnih voda, sa vrednostima koje se sa 0,94 za rastvornu i 0,89 za suspendovanu fazu (potvrđena humana fekalna kontaminacija) smanjuju na 0,55 i 0,70 (nesigurna fekalna kontaminacija).

LITERATURA

- 1) Abian, J., 1999. The coupling of gas and liquid chromatography with mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 34, 157–168.
- 2) Adeel, M., Song, X., Francis, D., Yang, Y., 2017. Environmental impact of estrogens on human, animal and plant life: a critical review. *Environ. Int.* 99, 107–119.
- 3) Adnan, N.H., Zakaria, M.P., Juahir, H., Ali, M.M., 2012. Faecal sterols as sewage markers in the Langat River, Malaysia: integration of biomarker and multivariate statistical approaches. *J. Environ. Sci. China* 24, 1600–1608.
- 4) Agencija za zaštitu životne sredine, Ministarstvo zaštite životne sredine Republike Srbije, 2019. Životna sredina u Srbiji 2004–2019. Dostupno na: http://www.sepa.gov.rs/download/FIN_JubilarnaPublikacija.pdf (poslednji pristup 06.03.2023.)
- 5) Albuquerque de Assis Costa, L., Mano Pessoa, D.M., da Silva Carreira, R., 2018. Chemical and biological indicators of sewage river input to an urban tropical estuary (Guanabara Bay, Brazil). *Ecol. Indic.* 90, 513–518.
- 6) Alsalahi, M.A., Latif, M.T., Ali, M.M., Dominick, D., Khan, M.F., Mustaffa, 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.
- 7) Andaluri, G., Suri, R.P.S., Graham, K., 2017. Steroid hormones in environmental matrices: extraction method comparison. *Environ. Monit. Assess.* 189, 626.
- 8) Andrási, N., Molnár, B., Dobos, B., Vasanits-Zsigrai, A., Záray, G., Molnár-Perl, I., 2013. Determination of steroids in the dissolved and in the suspended phases of wastewater and Danube River samples by gas chromatography, tandem mass spectrometry. *Talanta* 115, 367–373.
- 9) Ardrey, R.E., 2003. *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry: An introduction*. John Wiley & Sons, Chichester, UK.
- 10) AuroraPro Scientific, 2023. Dostupno na: [https://www.auroraprosci.com/Empty-Affinity-Chromatography-\(AC\)-Columns-Volume-1-mL-to-300-mL-Available](https://www.auroraprosci.com/Empty-Affinity-Chromatography-(AC)-Columns-Volume-1-mL-to-300-mL-Available) (poslednji pristup 06.03.2023.)
- 11) Baila-Rueda, L., Cenarro, A., Cofán, M., Orera, I., Barcelo-Batllori, S., Pocoví, M., Ros, E., Civeira, F., Nerín, C., Domeño, C., 2013. Simultaneous determination of oxysterols, phytosterols and cholesterol precursors by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry in human serum, *Anal. Methods* 5, 2249–2257.
- 12) Bain, P.A., Kumar, A., Ogino, Y., Iguchi, T., 2015. Nortestosterone-derived synthetic progestogens do not activate the progestogen receptor of Murray-Darling rainbowfish (*Melanotaenia fluviatilis*) but are potent agonists of androgen receptors alpha and beta. *Aquat. Toxicol.* 163, 97–101.
- 13) Barnes, K.K., Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Zaugg, S.D., Meyer, M.T., Barber, L.B., 2008. A national reconnaissance of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States - I) Groundwater. *Sci. Total Environ.* 402, 192–200.
- 14) Bartlett, P.D., 1987. Degradation of coprostanol in an experimental system, *Mar. Poll. Bull.* 18, 27–29.
- 15) Bataglione, G.A., Koolen, H.H.F., Weber, R.R., Eberlin, M.N., 2016. Quantification of sterol and triterpenol biomarkers in sediments of the Cananéia-Iguape estuarine-lagoonal system (Brazil) by UHPLC-MS/MS. *Int. J. Anal. Chem.* 8361375.
- 16) Bataglione, G.A., Meurer, E., de Albergaria-Barbosa, A.C.R., Bicego, M.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.

Literatura

- 17) Beck, M., Radke, M., 2006. Determination of sterols, estrogens and inorganic ions in waste water and size-segregated aerosol particles emitted from waste water treatment. *Chemosphere* 64, 1134–1140.
- 18) Becue, I., Van Poucke, C., Van Peteghem, C., 2010. An LC–MS screening method with library identification for the detection of steroids in dietary supplements. *J. Mass. Spectrom.* 46, 327–335.
- 19) Biocomma, 2023. Dostupno na: <https://www.biocomma.com/product/vacuum-manifolds-211.html> (poslednji pristup 06.03.2023.)
- 20) Björkhem, I., Gustafsson, J.A., Wrangé, Ö., 1973. Microbial transformation of cholesterol into coprostanol. *Eur. J. Biochem.* 37, 143–147.
- 21) Blackwell, B.R., Brown, T.R., Broadway, P.R., Buser, M.D., Brooks, J.C., Johnson, B.J., Cobb G.P., Smith, P.N., 2014. Characterization of trenbolone acetate and estradiol metabolite excretion profiles in implanted steers. *Environ. Toxicol. Chem.* 33, 2850–2858.
- 22) Blanch, A.R., Belanche-Munoz, L., Bonjoch, X., Ebdon, J., Gantzer, C., Lucena, F., Ottoson, J., Kourtis, C., Iversen, A., Kuhn, I., Moce, L., Muniesa, M., Schwartzbrod, J., Skrabber, S., Papageorgiou, G.T., Taylor, H., Wallis, J., Jofre, J., 2006. Integrated analysis of established and novel microbial and chemical methods for microbial source tracking. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5915–5926.
- 23) Brufau, G., Canela, M.A., Rafecas, M., 2008. Phytosterols: physiologic and metabolic aspects related to cholesterol-lowering properties. *Nutr. Res.* 28, 217–225.
- 24) 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.
- 25) Cabral, A.C., Martins, C.C., 2018. Insights about sources, distribution, and degradation of sewage and biogenic molecular markers in surficial sediments and suspended particulate matter from a human-impacted subtropical estuary. *Environ. Pollut.* 241, 1071–1081.
- 26) Cajka, T., Hajslova, J., Mastovska, K., 2008. Mass spectrometry and hyphenated instruments in food analysis. In: Ötleş S. (Ed.), *Handbook of Food Analysis Instruments*, CRC Press, Boca Raton, Florida, SAD, 197–228.
- 27) Chang, C.-C., Huang, S.-D., 2010. Determination of the steroid hormone levels in water samples by dispersive liquid–liquid microextraction with solidification of a floating organic drop followed by high-performance liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta* 662, 39–43.
- 28) Chang, H., Wan, Y., Hu, J. 2009. Determination and source apportionment of five classes of steroid hormones in urban rivers. *Environ. Sci. Technol.* 43, 7691–7698.
- 29) 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.
- 30) Chen, H.-C., Kuo, H.-W., Ding, W.-H., 2009. Determination of estrogenic compounds in wastewater using liquid chromatography–tandem mass spectrometry with electrospray and atmospheric pressure photoionization following desalting extraction. *Chemosphere* 74, 508–514.
- 31) Chou, P.-H., Lin, Y.-L., Liu, T.-C., Chen, K.-Y., 2015. Exploring potential contributors to endocrine disrupting activities in Taiwan’s surface waters using yeast assays and chemical analysis. *Chemosphere* 138, 814–820.
- 32) Clifton, P., 2002. Plant sterol and stanols-comparison and contrasts. Sterols versus stanols in cholesterol-lowering: is there a difference? *Atheroscler. Suppl.* 3, 5–9.
- 33) Coleparmer, 2023. Dostupno na: <https://www.coleparmer.com/i/thermo-scientific-nalgene-29970-45-2100-00-solid-phase-extraction-manifold-12-position/2997045> (poslednji pristup 06.03.2023.)
- 34) 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.

Literatura

- 35) Council Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy. Official Journal of the European Communities L327, 1–73.
- 36) Council Directive 76/464/EEC of 4 May 1976 on pollution caused by certain dangerous substances discharged into the aquatic environment of the Community. Official Journal of the European Communities L129, 23–29.
- 37) 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 Union L125, 3–9.
- 38) 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.
- 39) Daughton, C.G., 2012. Real-time estimation of small-area populations with human biomarkers in sewage. *Sci. Total Environ.* 414, 6–21.
- 40) 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.
- 41) Decision 2018/840, Commission Implementing Decision (EU) 2018/840 of 5 June 2018 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 and repealing Commission Implementing Decision (EU) 2015/495. Official Journal of the European Union L141, 9–12.
- 42) Derrien, M., Jardé, E., Gruau, G.R. and Pierson-Wickmann, A.C., 2011. Extreme variability of steroid profiles in cow feces and pig slurries at the regional scale: Implications for the use of steroids to specify fecal pollution sources in waters. *J. Agric. Food Chem.* 59, 7294–7302.
- 43) Devane, M., Saunders, D., Gilpin, B., 2006. Faecal sterols and fluorescent whiteners as indicators of the source of faecal contamination. *Chem. N. Z.* 70, 74–77.
- 44) Devane, M.L., Wood, D., Chappell, A., Robson, B., Webster-Brown, J. and Gilpin, B.J., 2015. Identifying avian sources of faecal contamination using sterol analysis. *Environ. Monit. Assess.* 187, 625.
- 45) Díaz-Cruz, M.S., Barceló, D., 2005. LC–MS² trace analysis of antimicrobials in water, sediment and soil, TrAC, *Trends Anal. Chem.* 24, 645–657.
- 46) Directive 2013/39/EU, Directive of the European Parliament and of the Council of 12 August 2013 amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy. Office Journal of the European Union L226, 1–17.
- 47) Dong, Y., Liu, J., Guo, T., 2018. Introduction of mass spectrometry and ambient ionization techniques. In: Dong, Y. (Ed.), *Direct Analysis in Real Time Mass Spectrometry: Principles and Practices of DART-MS*, John Wiley & Sons, New York, SAD, 1–42.
- 48) Douglas, D.J., Frank, A.J., Mao, D., 2005. Linear ion traps in mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* 24, 1–29.
- 49) EC Proposal, 2022. Proposal for a Directive of the European Parliament and of the Council amending Directive 2000/60/EC establishing a framework for Community action in the field of water policy, Directive 2006/118/EC on the protection of groundwater against pollution and deterioration and Directive 2008/105/EC on environmental quality standards in the field of water policy. European Commission, Brussels, 26. 10. 2022.
- 50) Environmental Protection Agency (EPA), 2021. Drinking Water Contaminant Candidate List 5 (CCL-5). Dostupno na: <https://www.epa.gov/ccl/contaminant-candidate-list-5-ccl-5> (poslednji pristup 06.03.2023.)

Literatura

- 51) Evgenidou, E.N., Konstantinou, I.K., Lambropoulou, D.A., 2015. Occurrence and removal of transformation products of PPCPs and illicit drugs in wastewaters: a review. *Sci. Total Environ.* 505, 905–926.
- 52) Farnleitner, A.H., Ryzinska-Paier, G., Reischer, G.H., Burtscher, M.M., Knetsch, S., Kirschner, A.K.T., Dirnböck, T., Kuschig, G., Mach, R.L., Sommer, R., 2010. *Escherichia coli* and *enterococci* are sensitive and reliable indicators for human, livestock and wildlife faecal pollution in alpine mountainous water resources. *J. App. Microbiol.* 109, 1599–1608.
- 53) Farré, M., Pérez, S., Kantiani, L., Barceló, D., 2008. Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment. *TrAC, Trends Anal. Chem.* 27, 991–1007.
- 54) Farré, M.J., Insa, S., Mamo, J., Barceló, D., 2016. Determination of 15 N-nitrosodimethylamine precursors in different water matrices by automated on-line solid-phase extraction ultra-high-performance-liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1458, 99–111.
- 55) Fennell, C., Misstear, B., O'Connell, D., Dubber, D., Behan, P., Danaher, M., Moloney, M., Gill, L., 2021. An assessment of contamination fingerprinting techniques for determining the impact of domestic wastewater treatment systems on private well supplies. *Environ. Pollut.* 268, 115687.
- 56) Fernandez, M.P., Ikonomou, M.G., Buchanan, I., 2007. An assessment of estrogenic organic contaminants in Canadian wastewaters. *Sci. Total Environ.* 373, 250–269.
- 57) Field, K.G., Samadpour, M., 2007. Fecal source tracking, the indicator paradigm, and managing water quality. *Water Res.* 41, 3517–3538.
- 58) Furtula, V., Liu, J., Chambers, P., Osachoff, H., Kennedy, C., Harkness, J., 2012. Sewage treatment plants efficiencies in removal of sterols and sterol ratios as indicators of fecal contamination sources. *Water Air Soil Pollut.* 223, 1017–1031.
- 59) 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.
- 60) Garcia, T.C., Curtis, T.P., Mroziak, W.R., Davenport, R.J., 2019. Enhanced estrogen removal in activated sludge processes through the optimization of the hydraulic flow pattern, *Water Res.* 164, 114905.
- 61) Gates, P., 2022. Atmospheric pressure chemical ionization. University of Bristol, UK. Dostupno na: <https://www.bristol.ac.uk/chemistry/facilities/nerc-lsmsf/techniques/hplcms/>, (poslednji pristup 06.03.2023.)
- 62) GenPore, 2023. Dostupno na: https://www.genpore.com/spe_column_frits.htm (poslednji pristup 06.03.2023.)
- 63) Gika, H., Kaklamanos, G., Manesiotis, P., Theodoridis, G., 2016. Chromatography: high-performance liquid chromatography. In: Caballero, B., Finglas, P.M., Toldrá, F. (Eds.), *Encyclopedia of Food and Health*, Academic Press, Cambridge, Massachusetts, SAD, 93–99.
- 64) Gilli, G., Rovere, R., Traversi, D., Schiliro, T., Pignata, C., 2006. Faecal sterols determination in wastewater and surface water. *J. Chromatogr. B* 843, 120–124.
- 65) Gosetti, F., Mazzucco, E., Zampieri, D., Gennaro, M.C., 2010. Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1217, 3929–3937.
- 66) 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.
- 67) Gourmelon, M., Caprais, M.P., Mieszkin, S., Marti, R., Wery, N., Jarde, E., Derrien, M., Jadas-Hecart, 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. *Wat. Res.* 44, 4812–4824.

Literatura

- 68) Gray, J.L., Borch, T., Furlong, E.T., Davis, J.G., Yager, T.J., Yang, Y.-Y., Kolpin, D.W., 2017. Rainfall-runoff of anthropogenic waste indicators from agricultural fields applied with municipal biosolids. *Sci. Total Environ.* 580, 83–89.
- 69) Griffiths, W.J., Wang, Y., 2009. Analysis of neurosterols by GC–MS and LC–MS/MS. *J. Chromatogr. B* 877, 2778–2805.
- 70) 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.
- 71) Guo, F., Liu, Q., Qu, G., Song, S., Sun, J., Shi, J., Jiang, G., 2013. Simultaneous determination of five estrogens and four androgens in water samples by online solid-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1281, 9–18.
- 72) Hargan, K.E., Stewart, E.M., Michelutti, N., Grooms, C., Kimpe, L.E., Mallory, M.L., Smol, J.P., Blais, J.M., 2018. Sterols and stanols as novel tracers of waterbird population dynamics in freshwater ponds. *Proc. R. Soc. B* 285, 20180631.
- 73) Hartmann, M.A., 1998. Plant sterols and the membrane environment. *Trends Plant Sci.* 3, 170–175.
- 74) Hashemi B., Zohrabi, P., Kim, K.-H., Shamsipur, M., Deep, A., Hong, J., 2017. Recent advances in liquid-phase microextraction techniques for the analysis of environmental pollutants. *TrAC, Trends Anal. Chem.* 97, 83–95.
- 75) Hennion, M.-C., 1999. Review: Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 856, 3–54.
- 76) Herbert, C.G., Johnstone, R.A.W., 2002. *Mass Spectrometry Basics*. CRC Press, Boca Raton, Florida, SAD.
- 77) Herrero, P., Borrull, F., Marcé, R.M., Pocurull, E., 2013. Pressurised liquid extraction and ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry to determine endogenous and synthetic glucocorticoids in sewage sludge. *Talanta* 103, 186–193.
- 78) Holčápek, M., Jirásko, R., Lísa, M., 2012. Recent developments in liquid chromatography–mass spectrometry and related techniques, a review. *J. Chromatogr. A* 1259, 3–15.
- 79) Huerta-Fontela, M., Galceran, M.T., Ventura, F., 2010. Fast liquid chromatography–quadrupole-linear ion trap mass spectrometry for the analysis of pharmaceuticals and hormones in water resources. *J. Chromatogr. A* 1217, 4212–4222.
- 80) Hussain, M.A., Ford, R., Hill, J., 2010. Determination of fecal contamination indicator sterols in an Australian water supply system. *Environ. Monit. Assess.* 165, 147–157.
- 81) Ikonomou, M.G., Cai, S.-S., Fernandez, M.P., Blair, J.D., Fischer, M., 2008. Ultra-trace analysis of multiple endocrine-disrupting chemicals in municipal and bleached kraft mill effluents using gas chromatography–high-resolution mass spectrometry. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 243–251.
- 82) 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.* 36, 4497–4507.
- 83) Jaffrezic, A., Jarde, E., Pourcher, A.M., Gourmelon, M., Caprais, M.P., Heddadj, D., Cottinet, P., Bilal, M., Derrien, M., Marti, R. and Mieszkina, S., 2011. Microbial and chemical markers: runoff transfer in animal manure-amended soils. *J. Environ. Qual.* 40, 959–968.
- 84) 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.
- 85) 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.

Literatura

- 86) 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.
- 87) John, C., Werner, P., Worthmann, A., Wegner, K., Tödter, K., Scheja, L., Rohn, S., Heeren, J., Fischer, M., 2014. A liquid chromatography–tandem mass spectrometry-based method for the simultaneous determination of hydroxy sterols and bile acids, *J. Chromatogr. A* 1371, 184–195.
- 88) Johnson A.C., Sumpter J.P., 2001. Removal of endocrine-disrupting chemicals in activated sludge treatment works. *Environ. Sci. Technol.* 35, 4697–4703.
- 89) Johnson, A.C., Williams, R.J., Matthiessen, P., 2006. The potential steroid hormone contribution of farm animals to freshwaters, the United Kingdom as a case study. *Sci. Total Environ.* 362, 166–178.
- 90) Kolodziej, E.P., Harter T., Sedlak, D. L., 2004. Dairy wastewater, aquaculture, and spawning fish as sources of steroid hormones in the aquatic environment. *Environ. Sci. Technol.* 38, 6377–6384.
- 91) Kolpin, D.W., Skopec, M., Meyer, M.T., Furlong, E.T., Zaugg, S.D., 2004. Urban contribution of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants to streams during differing flow conditions. *Sci. Total Environ.* 328, 119–130.
- 92) Kong, L., Kadokami, K., Wang, S., Duong, H.T., Chau, H.T.C., 2015. Monitoring of 1300 organic micro-pollutants in surface waters from Tianjin, North China. *Chemosphere* 122, 125–130.
- 93) Kostich, M., Flick, R., Martinson, J., 2013. Comparing predicted estrogen concentrations with measurements in US waters. *Environ. Pollut.* 178, 271–277.
- 94) Kugathas, S., Sumpter, J.P., 2011. Synthetic glucocorticoids in the environment: first results on their potential impacts on fish. *Environ. Sci. Technol.* 45, 2377–2383.
- 95) Kuiper, P.J.C., 2006. Adaptation mechanisms of green plants to environmental stress: The role of plant sterols and the phosphatidyl linolenoyl cascade in the functioning of plants and the response of plants to global climate change. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 851, 209–215.
- 96) Lee, H.J., Hong, S.H., Kim, M., Ha, S.Y., An, S.M., Shim, W.J., 2011. Tracing origins of sewage and organic matter using dissolved sterols in Masan and Haengam Bay, Korea. *Ocean Sci. J.* 46, 95–103.
- 97) Leeming, R., Ball, A., Ashbolt, N., Nichols, P., 1996. Using faecal sterols from humans and animals to distinguish faecal pollution in receiving waters. *Wat. Res.* 30, 2893–2900.
- 98) Leeming, R., Nichols, P.D., 1996. Concentration of coprostanol that correspond to existing bacterial indicator guideline limits. *Water Res.* 30, 2997–3006.
- 99) Letterman, R.D., 1999. *Water Quality and Treatment: A Handbook of Community Water Supplies*, McGraw-Hill, New York, SAD.
- 100) Li, E., Saleem, F., Edge, T.A., Schellhorn, H.E., 2021. Biological indicators for fecal pollution detection and source tracking: a review. *Processes* 9, 2058.
- 101) Lima Gomes, P.C.F., Barnes, B.B., Santos-Neto, Á.J., Lancas, F.M., Snow, N.H., 2013. Determination of steroids, caffeine and methylparaben in water using solid phase microextraction-comprehensive two dimensional gas chromatography–time of flight mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1299, 126–130.
- 102) Limpiyakorn, T., Homklin, S., Ong, S.K., 2011. Fate of estrogens and estrogenic potentials in sewerage systems. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 41, 1231–1270.
- 103) 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.
- 104) Liu, S., Ying, G.-G., Zhao, J.-L., Chen, F., Yang, B., Zhou, L.-J., Lai, H.-J., 2011a. 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.

Literatura

- 105) Liu, Z.-H., Kanjo, Y., Mizutani S., 2009. Urinary excretion rates of natural estrogens and androgens from humans, and their occurrence and fate in the environment: A review. *Sci. Total Environ.* 407, 4975–4985.
- 106) Liu, Z.-H., Ogejo, J.A., Pruden, A., Knowlton, K.F., 2011b. Occurrence, fate and removal of synthetic oral contraceptives (SOCs) in the natural environment: a review. *Sci. Total Environ.* 409, 5149–5161.
- 107) Lopes, G., Sousa, C., Valentão, P., Andrade, P.B., 2013. Sterols in algae and health. In: Hernández-Ledesma, B., Herrero, M. (Eds.), *Bioactive Compounds From Marine Foods: Plant and Animal Sources*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK, 173–191.
- 108) López de Alda, M.J., Barceló, D., 2001. Use of solid-phase extraction in various of its modalities for sample preparation in the determination of estrogens and progestogens in sediment and water. *J. Chromatogr. A* 938, 145–153.
- 109) Lu, B., Zhang, Y., Wu, X., Shi, J., 2007. Separation and determination of diversiform phytosterols in food materials using supercritical carbon dioxide extraction and ultraperformance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 588, 50–63.
- 110) MacLaughlin, J.A., Anderson, R.R., Holick, M.F., 1982. Spectral character of sunlight modulates photosynthesis of previtamin D₃ and its photoisomers in human skin. *Science* 216, 1001–1003.
- 111) Maeng, S.K., Choi, B.G., Lee, K.T., Song, K.G., 2013. Influences of solid retention time, nitrification and microbial activity on the attenuation of pharmaceuticals and estrogens in membrane bioreactors. *Water Res.* 47, 3151–3162.
- 112) Mahmood-Khan, Z., Hall, E.R., 2003. Occurrence and removal of plant sterols in pulp and paper mill effluents. *J. Environ. Eng. Sci.* 2, 17–26.
- 113) Marangoni, F., Poli, A., 2010. Phytosterols and cardiovascular health. *Pharmacol. Res.* 61, 193–199.
- 114) March, R.E., 1998. Quadrupole ion trap mass spectrometry: theory, simulation, recent developments and applications. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 12, 1543–1554.
- 115) MARLAP Manual, United States Environmental Protection Agency, 2004. *Multi-Agency Radiological Laboratory Analytical Protocols Manual*, Chapter 6: Selection and Application of an Analytical Method, 1–43.
- 116) Martin-Creuzburg, D., Von Elert, E., 2004. Impact of 10 dietary sterols on growth and reproduction of *Daphnia galeata*. *J. Chem. Ecol.* 30, 483–500.
- 117) Martínez Bueno, M.J., Uclés, S., Hernando, M.D., Dávoli, E., Fernández-Alba, A.R., 2011. Evaluation of selected ubiquitous contaminants in the aquatic environment and their transformation products. A pilot study of their removal from a sewage treatment plant. *Water Res.* 45, 2331–2341.
- 118) 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.
- 119) Martins, C.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.
- 120) Masoner, J.R., Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Cozzarelli, I.M., Gray, J.L., 2016. Landfill leachate as a mirror of today's disposable society: pharmaceuticals and other contaminants of emerging concern in finalleachate from landfills in the conterminous United States. *Environ. Toxicol. Chem.* 35, 906–918.
- 121) Matějček, D., Kubáň, V., 2007. High performance liquid chromatography/ion-trap mass spectrometry for separation and simultaneous determination of ethinylestradiol, gestodene, levonorgestrel, cyproterone acetate and desogestrel. *Anal. Chim. Acta* 588, 304–315.
- 122) Matić Bujagić, I., Grujić, S., Jauković, Z., Laušević, M., 2016. Sterol ratios as a tool for sewage pollution assessment of river sediments in Serbia. *Environ. Pollut.* 213, 76–83.

Literatura

- 123) Matić, I., Grujić, S., Jauković, Z., Laušević, M., 2014. Trace analysis of selected hormones and sterols in river sediments by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization–tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1364, 117–127.
- 124) McCalley, D.V., Cooke, M., Nickless, G., 1981. Effect of sewage treatment on faecal sterols. *Water Res.* 15, 1019–1025.
- 125) Moldovan, Z., Marincas, O., Povar, I., Lupascu, T., Longree, P., Simovic Rota, J., Singer, H., Alder, A. C., 2018. Environmental exposure of anthropogenic micropollutants in the Prut River at the Romanian-Moldavian border: a snapshot in the lower Danube River basin. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 31040–31050.
- 126) Morales-Muñoz, S., Luque-García, J.L., Ramos, M.J., Martínez-Bueno, M.J., Castro, M.D.L., 2005. Sequential automated focused microwave-assisted soxhlet extraction of compounds with different polarity from marine sediments prior to gas chromatography mass spectrometry detection. *Chromatografia* 62, 69–74.
- 127) Moss, G.P., 1989. Nomenclature of steroids. *Pure Appl. Chem.* 61, 1783–1822.
- 128) Mott, G.E., Brinkley, A.W., Mersinger, C.L., 1980. Biochemical characterization of cholesterol-reducing *Eubacterium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 40, 1017–1022.
- 129) Mudge, S.M., Duce, C.E., 2005. Identifying the source, transport path and sinks of sewage derived organic matter. *Environ. Pollut.* 136, 209–220.
- 130) Mudge, S.M., Seguel, C.G., 1999. Organic contamination of San Vicente Bay, Chile. *Mar. Pollut. Bull.* 38, 1011–1021.
- 131) Munkittrick, K.R., McMaster, M.E., McCarthy, L.H., Servos, M.R., Van Der Kraak, G.J., 1998. An overview of recent studies on the potential of pulp-mill effluents to alter reproductive parameters in fish. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* 1, 347–371.
- 132) Murtaugh, J.J., Bunch, R.L., 1967. Sterols as a measure of fecal pollution. *J. Water Pollut. Control Fed.* 39, 404–409.
- 133) Nakagawa, K., Amano, H., Berndtsson, R., Takao, Y., Hosono, T., 2019. Use of sterols to monitor surface water quality change and nitrate pollution source, *Ecol. Indic.* 107, 105534.
- 134) Naldi, A.C., Fayad, P.B., Prévost, M., Sauvé, S., 2016. Analysis of steroid hormones and their conjugated forms in water and urine by on-line solid-phase extraction coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Chem. Cent. J.* 10, 30.
- 135) Nash, D., Leeming, R., Clemow, L., Hannah, M., Halliwell, D. and Allen, D., 2005. Quantitative determination of sterols and other alcohols in overland flow from grazing land and possible source materials. *Wat. Res.* 39, 2964–2978.
- 136) Nishimura, M., 1982. 5 β -Isomers of stanols and stanones as potential markers of sedimentary organic quality and depositional paleoenvironments. *Geochim. Cosmochim. Acta* 46, 423–432.
- 137) Noblet, J.A., Young, D.L., Zeng, E.Y., Ensari, S., 2004. Use of fecal steroids to infer the sources of fecal indicator bacteria in the lower Santa Ana river watershed, California: sewage is unlikely a significant source. *Environ. Sci. Technol.* 38, 6002–6008.
- 138) Ojogoro, J.O., Scrimshaw, M.D., Sumpter, J.P., 2021. Steroid hormones in the aquatic environment. *Sci. Total Environ.* 792, 148306.
- 139) Orrego, R., Guchardi, J., Krause, R., Holdway, D., 2010. Estrogenic and anti-estrogenic effects of wood extractives present in pulp and paper mill effluents on rainbow trout. *Aquat. Toxicol.* 99, 160–167.
- 140) Oulton, R.L., Kohn, T., Cwiertny, D.M., 2010. Pharmaceuticals and personal care products in effluent matrices: a survey of transformation and removal during wastewater treatment and implications for wastewater management. *J. Environ. Monit.* 12, 1956–1978.
- 141) P3, 2019. Base list for DEQ priority toxics, Department of Environmental Quality, Oregon, SAD. Dostupno na: https://www.oregon.gov/deq/Hazards-and-cleanup/Documents/2019_BaseListPriorityToxics.pdf (poslednji pristup 06.03.2023).
- 142) Pailler, J.-Y., Krein, A., Pfister, L., Hoffmann, L., Guignard, C., 2009. Solid phase extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of sulfonamides,

- tetracyclines, analgesics and hormones in surface water and wastewater in Luxembourg. *Sci. Total Environ.* 407, 4736–4743.
- 143) Pauwels, B., Wille, K., Noppe, H., De Brabander, H., Van de Wiele, T., Verstraete, W., Boon, N., 2008. 17α -Ethinylestradiol cometabolism by bacteria degrading estrone, 17β -estradiol and estriol. *Biodegradation* 19, 683–693.
- 144) Peng, F.-Q., Ying, G.-G., Yang, B., Liu, S., Lai, H.-J., Liu, Y.-S., Chen, Z.-F., Zhou, G.-J., 2014. Biotransformation of progesterone and norgestrel by two freshwater microalgae (*Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa*): Transformation kinetics and products identification. *Chemosphere* 95, 581–588.
- 145) Peng, X., Yua, Y., Tang, C., Tan, J., Huang, Q., Wang, Z., 2008. Occurrence of steroid estrogens, endocrine-disrupting phenols, and acid pharmaceutical residues in urban riverine water of the Pearl River Delta, South China. *Sci. Total Environ.* 397, 158–166.
- 146) Phillips, K.M., Ruggio, D.M., Ashraf-Khorassani, M., 2005. Phytosterol composition of nuts and seeds commonly consumed in the United States. *J. Agric. Food Chem.* 53, 9436–9445.
- 147) Pichon, V., Charpak, M., Hennion, M.-C., 1998. Multiresidue analysis of pesticides using new laminar extraction disks and liquid chromatography and application to the French priority list. *J. Chromatogr. A* 795, 83–92.
- 148) Piironen, V., Toivo, J., Lampi, A.-M., 2000. Natural sources of dietary plant sterols. *J. Food Compos. Anal.* 13, 619–624.
- 149) Pratush, A., Ye, X., Yang, Q., Kan, J., Peng, T., Wang, H., Huang, T., Xiong, G., Hu, Z., 2020. Biotransformation strategies for steroid estrogen and androgen pollution. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 104, 2385–2409.
- 150) Prost, K., Bradel, P. L., Lehdorff, E., Amelung, W., 2018. Steroid dissipation and formation in the course of farmyard manure composting. *Org. Geochem.* 118, 47–57.
- 151) Ray, P., Zhao, Z., Knowlton, K.F., 2013. Emerging contaminants in livestock manure: hormones, antibiotics and antibiotic resistance genes. In: Kebreab, E. (Ed.), *Sustainable Animal Agriculture*, Cabi International, Boston, SAD, 268–283.
- 152) Rechsteiner, D., Wettstein, F.E., Warren, B.P., Vermeirssen, E.L.M., Simon, E., Schneider, M.K., Hollender, J., Bucheli, T.D., 2020. Natural estrogens in surface waters of a catchment with intensive livestock farming in Switzerland. *Environ. Sci.: Process. Impacts* 22, 2244–2255.
- 153) Regulation (EU) 2019/6 of the European Parliament and of the Council of 11 December 2018 on veterinary medicinal products and repealing Directive 2001/82/EC. *Official Journal of the European Union L4*, 43–167.
- 154) Reichwaldt, E.S., Ho, W.Y., Zhou, W., Ghadouani, A., 2017. Sterols indicate water quality and wastewater treatment efficiency. *Water Res.* 108, 401–411.
- 155) Republički zavod za statistiku, Republika Srbija, 2020, Statistički godišnjak Republike Srbije. Dostupno na: <https://www.stat.gov.rs/publikacije/publication/?p=12694> (poslednji pristup 06.03.2023.)
- 156) Republički zavod za statistiku, Republika Srbija, 2021, Otpadne vode iz naselja. Dostupno na: <https://publikacije.stat.gov.rs/G2021/Pdf/G20211102.pdf> (poslednji pristup 06.03.2023.)
- 157) Robinson, J.A., Staveley, J.P., Constantine, L., 2017. Reproductive effects on freshwater fish exposed to 17α -trenbolone and 17α -estradiol. *Environ. Toxicol. Chem.* 36, 636–644.
- 158) Robles-Molina, J., Lara-Ortega, F.J., Gilbert-López, B., García-Reyes, J.F., Molina-Díaz, A., 2014. Multi-residue method for the determination of over 400 priority and emerging pollutants in water and wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1350, 30–43.
- 159) Rondanelli, M., Monteferrario, F., Faliva, M.A., Perna, S., Antonello, N., 2013. Key points for maximum effectiveness and safety for cholesterol-lowering properties of plant sterols and use in the treatment of metabolic syndrome. *J. Sci. Food Agric.* 93, 2605–2610.
- 160) Rontani, J.-F., Charrière, B., Sempéré, R., Doxaran, D., Vaultier, F., Vonk, J.E., Volkman, J.K., 2014. Degradation of sterols and terrigenous organic matter in waters of the Mackenzie Shelf, Canadian Arctic. *Org. Geochem.* 75, 61–73.

Literatura

- 161) Rose, L.D., Akob, D.M., Tuberty, S.R., Corsi, S.R., DeCicco, L.A., Colby, J.D., Martin D.J., 2019. Use of high-throughput screening results to prioritize chemicals for potential adverse biological effects within a West Virginia watershed. *Sci. Total Environ.* 677, 362–372.
- 162) Runnalls, T.J., Beresford, N., Kugathas, S., Margiotta-Casaluci, L., Scholze, M., Scott, A.P., Sumpter, J.P., 2015. From single chemicals to mixtures-reproductive effects of levonorgestrel and ethinylestradiol on the fathead minnow. *Aquat. Toxicol.* 169, 152–167.
- 163) Runnalls, T.J., Margiotta-Casaluci, L., Kugathas, S., Sumpter, J.P., 2010. Pharmaceuticals in the aquatic environment: steroids and anti-steroids as high priorities for research. *Hum. Ecol. Risk. Assess.* 16, 1318–1338.
- 164) Scales, P.J., Wijekoon, K., Ladwig, C., Knight, A., Allinson, M., Allinson, G., Zhang, J., Gray, S., Packer, M., Northcott, K., Sheehan, D., 2019. A critical control point approach to the removal of chemicals of concern from water for reuse. *Wat. Res.* 160, 39–51.
- 165) Schlüsener, M.P., Bester, K., 2005. Determination of steroid hormones, hormone conjugates and macrolide antibiotics in influents and effluents of sewage treatment plants utilising high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry with electrospray and atmospheric pressure chemical ionization. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19, 3269–3278.
- 166) Schlüsener, M.P., Bester, K., 2005. Determination of steroid hormones, hormone conjugates and macrolide antibiotics in influents and effluents of sewage treatment plants utilising high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry with electrospray and atmospheric pressure chemical ionization. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19, 3269–3278.
- 167) Schoech, S.J., Rensel, M.A., Bridge, E.S., Boughton, R.K., Wilcoxon, T.E., 2009. Environment, glucocorticoids, and the timing of reproduction. *Gen. Comp. Endocrinol.* 163, 201–207.
- 168) Schwartz H., Ollilainen, V., Piironen, V., Lampi, A.-M., 2008. Tocopherol, tocotrienol and plant sterol contents of vegetable oils and industrial fats. *J. Food Compos. Anal.* 21, 152–161.
- 169) Shore, L.S., Shemesh, M., 2003. Naturally produced steroid hormones and their release into the environment. *Pure Appl. Chem.* 75, 1859–1871.
- 170) Silvestre, C.I.C., Santos, J.L.M., Lima, J.L.F.C., Zagatto, E.A.G., 2009. Liquid–liquid extraction in flow analysis: A critical review. *Anal. Chim. Acta* 652, 54–65.
- 171) Simić, Z., Milovanović, M., Melentijević, M., 2017. Assessment of flow periodicity of the Danube River and its major tributaries in Serbia, *Water Res. Manag.* 7, 29–44.
- 172) Standley, L.J., Kaplan, L.A., Smith, D., 2000. Molecular tracers of organic matter sources to surface water resources. *Environ. Sci. Technol.* 34, 3124–3130.
- 173) Sullivan, D., Brooks, P., Tindale, N., Chapman, S., Ahmed, W., 2010. Faecal sterols analysis for the identification of human faecal pollution in a non-sewered catchment. *Water Sci. Technol.* 61, 1355–1361.
- 174) Škrbić, B.D., Kadokami, K., Antić, I., 2018. Survey on the micro-pollutants presence in surface water system of northern Serbia and environmental and health risk assessment. *Environ. Res.* 166, 130–140.
- 175) Tchobanoglous, G., Burton, F.L., Stensel, H.D., 2003. *Wastewater Engineering: Treatment and Reuse*, McGraw-Hill, New York, SAD.
- 176) Ternes, T.A., Kreckel, P., Mueller, J., 1999. Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - II. Aerobic batch experiments with activated sludge. *Sci. Total Environ.* 225, 91–99.
- 177) Thompson, T.J., Briggs, M.A., Phillips, P.J., Blazer, V.S., Smalling, K.L., Kolpin, D.W., Wagner, T., 2021. Groundwater discharges as a source of phytoestrogens and other agriculturally derived contaminants to streams. *Sci. Total Environ.* 755, 142873.
- 178) Tyagi, P., Edwards D.R., Coyne, M.S., 2009. Fecal sterol and bile acid biomarkers: runoff concentrations in animal waste-amended pastures. *Water Air Soil Pollut.* 198, 45–54.
- 179) Volkman, J.K., 1986. A review of sterol markers for marine and terrigenous organic matter. *Org. Geochem.* 9, 83–99.
- 180) Volkman, J.K., 2005. Sterols and other triterpenoids: source specificity and evolution of biosynthetic pathways. *Org. Geochem.* 36, 139–159.

Literatura

- 181) Voyksner, R.D., 1994. Atmospheric pressure ionization LC/MS. New solutions for environmental analysis. *Environ. Sci. Technol.* 28, 118–127.
- 182) 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.
- 183) 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.
- 184) Wang, G., Ma, P., Zhang, Q., Lewis, J., Lacey, M., Furukawa, Y., O'Reilly, S.E., Meaux, S., McLachlane, J., Zhang, S., 2012. Endocrine disrupting chemicals in New Orleans surface waters and Mississippi Sound sediments. *J. Environ. Monit.* 14, 1353–1364.
- 185) Wang, J.-Z., Guan, Y.-F., Ni, H.-G., Liu, G.-J., Zeng, E.-Y., 2010. Fecal steroids in riverine runoff of the Pearl River Delta, South China: levels, potential sources and inputs to the coastal ocean. *J. Environ. Monit.* 12, 280–286.
- 186) Weston D.J., 2010. Ambient ionization mass spectrometry: current understanding of mechanistic theory, analytical performance and application areas. *Analyst* 135, 661–668.
- 187) Whei, J.H., Yin, X., Welander, P.V., 2016. Sterol synthesis in diverse bacteria. *Front. Microbiol.* 7, 1–19.
- 188) Wong, A., 2014. Chemical and microbiological considerations of phytosterols and their relative efficacies in functional foods for the lowering of serum cholesterol levels in humans: A review. *J. Funct. Foods* 6, 60–72.
- 189) 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.
- 190) Wu, J., Hu, R., Yue, J., Yang, Z., Zhang, L., 2009. Determination of fecal sterols by gas chromatography–mass spectrometry with solid-phase extraction and injection-port derivatization. *J. Chromatogr. A*, 1216, 1053–1058.
- 191) Yadav, A., Dabur, R., 2022. Rapid identification of 44 steroids in human urine samples using HPLC-ESI-QTOF-MS. *Curr. Pharm. Anal.* 18, 437–448.
- 192) Yang, Y.-Y., Gray, J.L., Furlong, E.T., Davis, J.G., ReVello, R.C., Borch, T., 2012. Steroid hormone runoff from agricultural test plots applied with municipal biosolids. *Environ. Sci. Technol.* 46, 2746–2754.
- 193) Ying, G.-G., Kookana, R.S., Ru, Y.-J. 2002. Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. *Environ. Int.* 28, 545–551.
- 194) Yu, W., Du, B., Yang, L., Zhang, Z., Yang, C., Yuan, S., Zhang, M., 2019. Occurrence, sorption, and transformation of free and conjugated natural steroid estrogens in the environment. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 26, 9443–9468.
- 195) Zakon o stočarstvu. Službeni glasnik Republike Srbije br. 41/2009, 93/2012 i 14/2016.
- 196) Zakon o veterinarstvu. Službeni glasnik Republike Srbije br. 91/2005 i 30/2010.
- 197) Zali, M.A., Juahir, H., Ismail, A., Retnam, A., Idris, A.N., Sefie, A., Tawnie, I., Saadudin, S.B., Ali, M.M., 2021. Tracing sewage contamination based on sterols and stanols markers within the mainland aquatic ecosystem: a case study of Linggi catchment, Malaysia. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 28, 20717–20736.
- 198) Zembrzuska, J., Budnik, I., Lukaszewski, Z., 2016. Monitoring of selected non-ionic surfactants in river water by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Environ. Manag.* 169, 247–252.
- 199) Zhang, C., Li, Y., Wang, C., Niu, L., Cai W., 2016. Occurrence of endocrine disrupting compounds in aqueous environment and their bacterial degradation: A review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 46, 1–59.
- 200) Zhang, C., Wang, Y., Qi, S., 2008. Identification and significance of sterols in MSW landfill leachate. *J. Chromatogr. B* 874, 1–6.

Literatura

- 201) 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.
- 202) Zhao, Y.-y., Cheng, X.-l., Zhang, Y., Zhao, Y., Lin, R.-c., Sun, W.-j., 2009. Simultaneous determination of eight major steroids from *Polyporus umbellatus* by high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry detections. *Biomed. Chromatogr.* 24, 222–230.

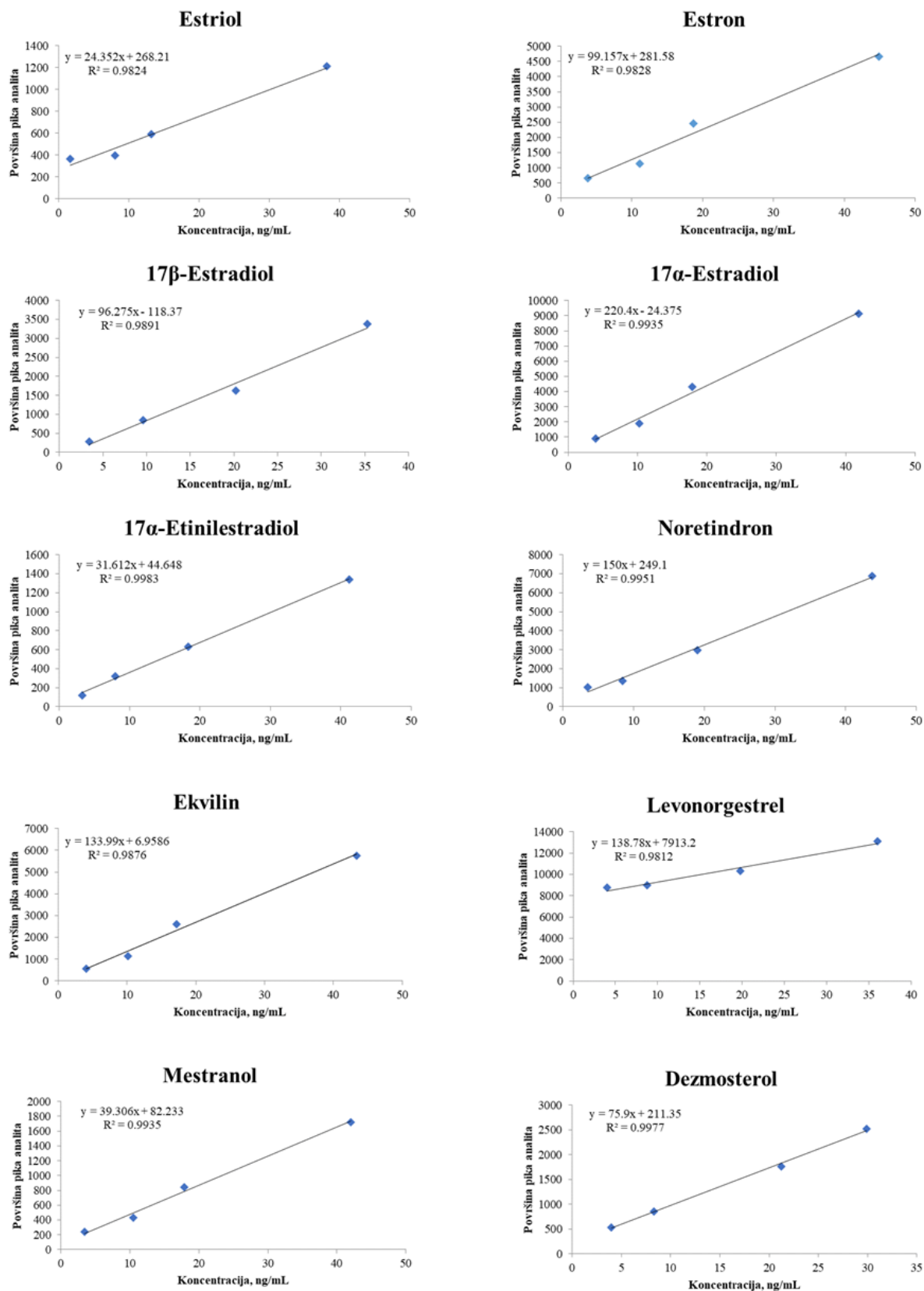
PRILOG

Tabela 1. MSⁿ reakcije fragmentacije odabranih steroidnih jedinjenja korišćenjem linearnog jonskog trapa

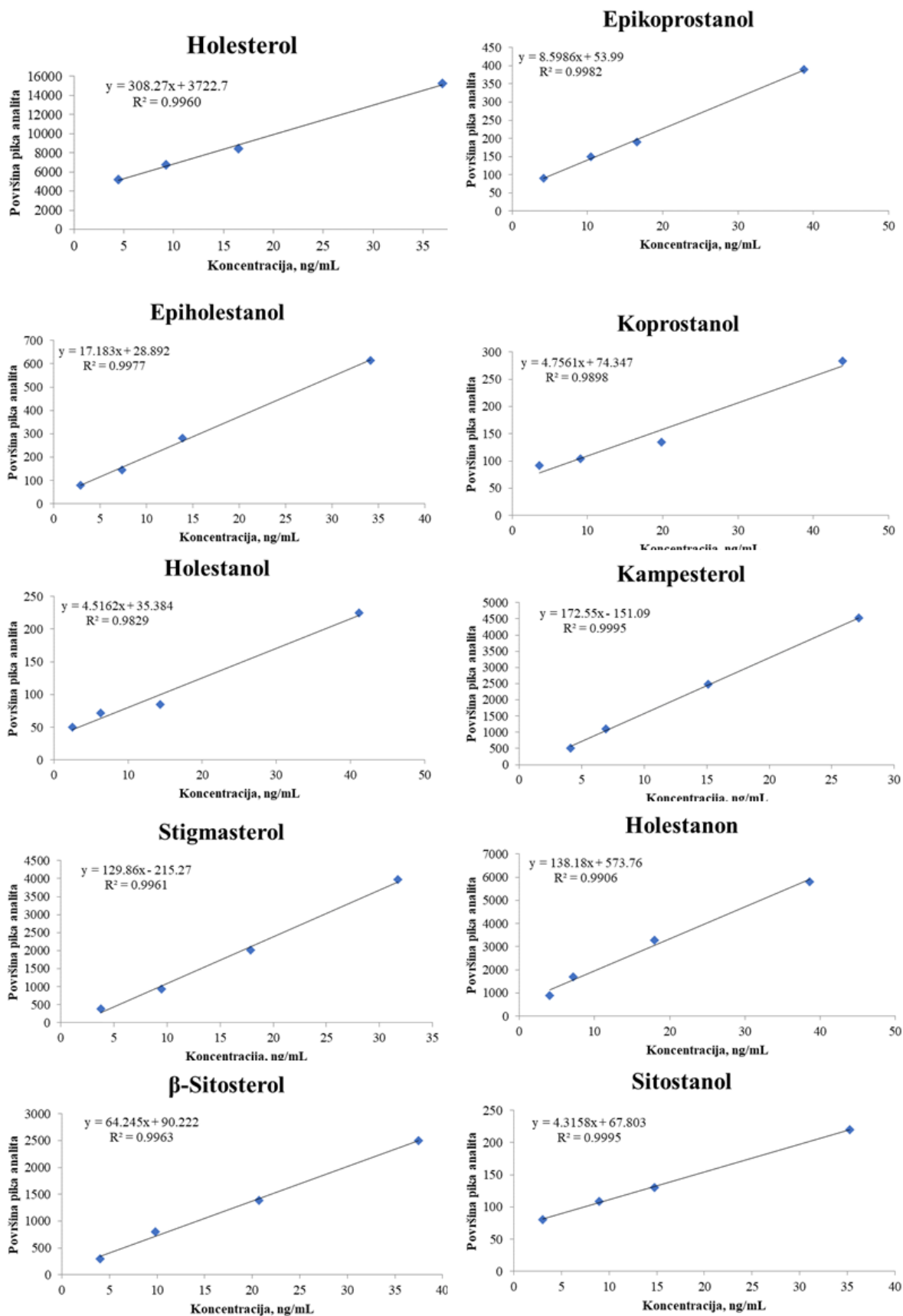
<i>Steroidi</i>	MS	CE, (%)	MS ²	CE, (%)	MS ³	CE, (%)	MS ⁴
<i>Steroidni hormoni</i>							
Estriol	271[M-H ₂ O+H] ⁺	20	253 197 157	28 31 37	197 179 130	31	179
Estron	271[M+H] ⁺	20	253 197 157	28 31 37	197 179 130	31	179
17β-Estradiol	255[M-H ₂ O+H] ⁺	22	159 133 173 145	34 31	131 105	33	91
17α-Estradiol	255[M-H ₂ O+H] ⁺	22	159 133 173 145	34 31	131 105	33	91
17α-Etinilestradiol	279[M-H ₂ O+H] ⁺	25	133 159 251 223	30 33 28	105 131 209	36 32 33	79 91 181
Noretindron	299[M+H] ⁺	23	281 263 223 239	29 30	263 221	30	221
Ekvilin	269[M+H] ⁺	23	251 211	31 32	209 183	33 31	181 165
Levonorgestrel	313[M+H] ⁺	22	295 277 245 237	29 30	277 235	30	235
Mestranol	293[M-H ₂ O+H] ⁺	26	147 173 133 265	32 31	91 158	39	65
<i>Steroli</i>							
Dezmosterol	367[M-H ₂ O+H] ⁺	26	257 161 203 243	25 26 25	161 119 147	26 28	119 105
Holesterol	369[M-H ₂ O+H] ⁺	24	243 161 257 287	24 27	147 119	27 30	105 91

Tabela 1. (nastavak)

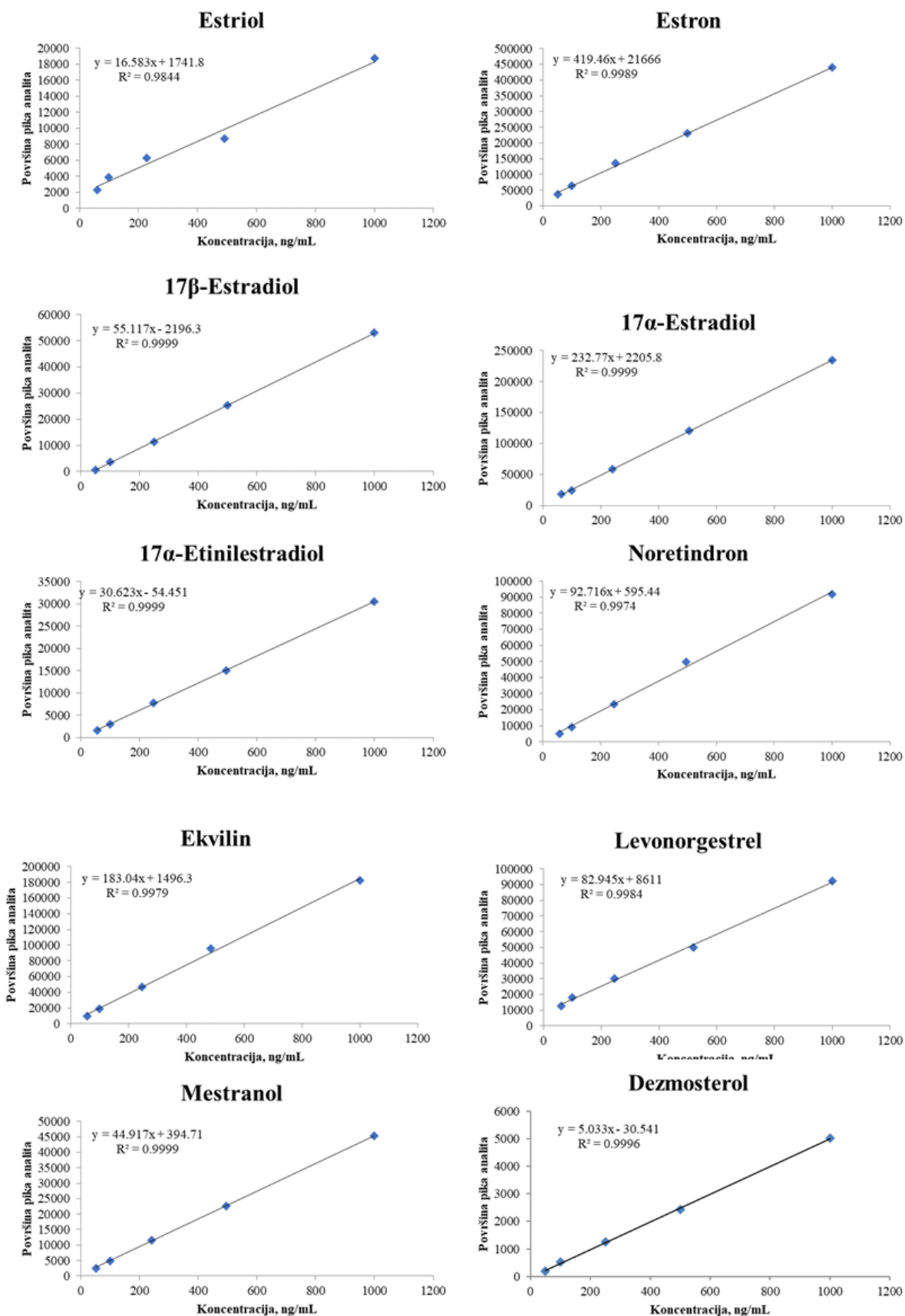
<i>Steroidi</i>	MS	CE, (%)	MS ²	CE, (%)	MS ³	CE, (%)	MS ⁴
Kampesterol	383[M-H ₂ O+H] ⁺	25	243	24	147	27	105
			257	24	161	28	119
			161				
			203				
Epikoprostanol	371[M-H ₂ O+H] ⁺	24	149	28	121	28	93
			261	24	163	24	107
			163	24	107		
			135	26	107		
Epiholestanol	371[M-H ₂ O+H] ⁺	24	149	28	121	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		
Stigmasterol	395[M-H ₂ O+H] ⁺	24	297	25	215	25	159
			311	25	201	27	145
			255				
Holestanon	387[M+H] ⁺	19	369	25	243	25	147
			243	25	147		
			287				
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				



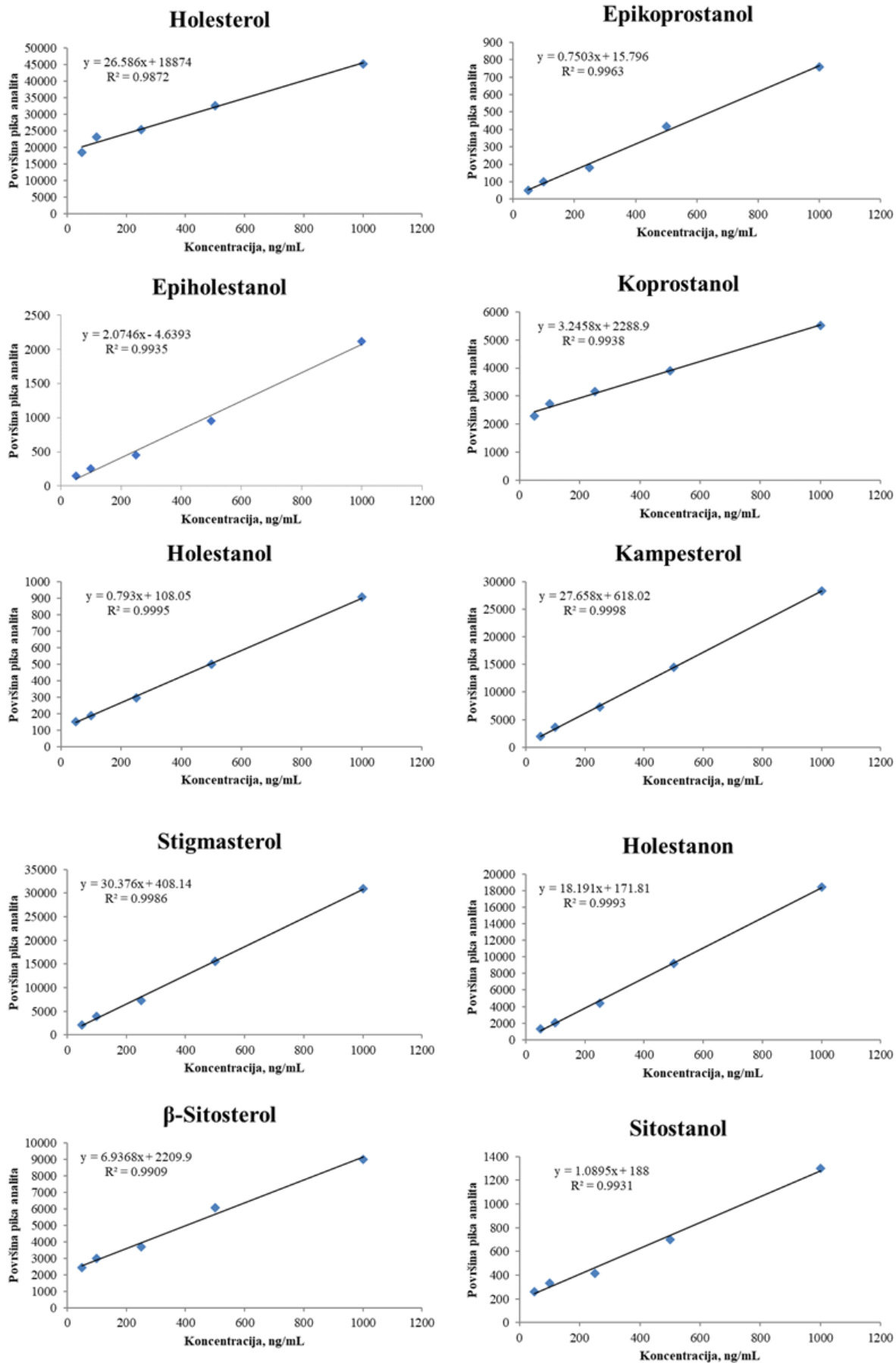
Slika 1. Linearnost metode za odabrana steroidna jedinjenja u površinskim vodama



Slika 1. (nastavak)



Slika 2. Linearnost metode za odabrana steroidna jedinjenja u otpadnim vodama



Slika 2. (nastavak)

OBJAVLJENI NAUČNI RADOVI IZ DOKTORSKE DISERTACIJE

Rad u vrhunskom međunarodnom časopisu, prvih 10% impact liste – M21a

Jauković, Z., Grujić, S., Matić Bujagić, I., Petković, A., Laušević, M., 2022. Steroid-based tracing of sewage-sourced pollution of river water and wastewater treatment efficiency: Dissolved and suspended water phase distribution. *Sci. Tot. Environ.* 846, 157510. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157510>.

Rad u vrhunskom međunarodnom časopisu – M21:

Jauković, Z., Grujić, S., Matić Bujagić, I., Laušević, M., 2017. Determination of sterols and steroid hormones in surface water and wastewater using liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. *Microchem. J.* 135, 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.07.011>.

BIOGRAFIJA AUTORA

Zorica Jauković (devojačko Pešić) rođena je 13. decembra 1985. godine u Dubrovniku, Republika Hrvatska. Osnovnu školu „Dašo Pavičić“ u Herceg Novom, Republika Crna Gora, završila je 2000. godine, a 2004. godine sa odličnim uspehom je završila Gimnaziju – opšti smer, takođe u Herceg Novom. Tehnološko-metalurški fakultet Univerziteta u Beogradu, studijski program – Neorganska hemijska tehnologija, smer – Tehnološka kontrola, upisala je školske 2004/2005. godine. Diplomirala je 2010. godine na Katedri za analitičku hemiju i kontrolu kvaliteta sa prosečnom ocenom tokom studija 8,32. Diplomski rad pod nazivom „Određivanje metamizola i njegovih metabolita u površinskim i podzemnim vodama“ odbranila je sa ocenom 10. Školske 2010/11. godine upisala je doktorske akademske studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu u Beogradu na smeru Hemija, pod rukovodstvom prof. dr Mile Laušević, redovnog profesora Tehnološko-metalurškog fakulteta. Na doktorskim studijama je uspešno položila sve ispite predviđene planom i programom sa prosečnom ocenom 10 i odbranila završni ispit sa temom „Steroli u uzorcima iz životne sredine“.

Završila je kurs „Škola proteomike-Teorijski i praktični osnovi“ (2015. godine), organizovan od strane Centra izuzetnih vrednosti za molekularne nauke o hrani, Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Završila je obuku „Određivanje fenola i polihlorovanih alkana kratkog lanca u vodi pomoću GC/MS“ (2016. godine), organizovanu od strane Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i Mreže za edukaciju i trening u javnim laboratorijama u oblasti životne sredine (NETREL) u okviru Tempus projekta. Takođe je 2017. godine položila ispit za Licenciranog savetnika za hemikalije i biocidne proizvode (Upravljanje hemikalijama i biocidnim proizvodima, Licenca izdata od strane Ministarstva zaštite životne sredine u skladu sa REACH i ECHA legislativom). Pohađala je radionicu za određivanje fizičko-hemijskih osobina i stabilnosti pri skladištenju za pesticidne proizvode prema Regulativi EC 1107/2009 u organizaciji IPA programa Evropske unije za Srbiju, 2020. godine (Workshop on the Physicochemical Properties and Storage Stability Requirements for Pesticide Products under Regulation EC 1107/2009).

Od 2011. do 2017. godine Zorica Jauković je bila angažovana na projektu finansiranom od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, pod nazivom „Razvoj i primena metoda i materijala za monitoring novih zagađujućih i toksičnih organskih materija i teških metala“. Od aprila 2017. godine zaposlena je u kompaniji Agrosava d.o.o., kao samostalni stručni saradnik za analitičku hemiju.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Зорица Јауковић

Број индекса 4061/2010

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

"Развој и примена методе анализе одабраних стерола и стероидних хормона у природним и отпадним водама течном хроматографијом са тандем масеном спектрометријом"

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

Потпис аутора

У Београду, 21.03.2023.

Z Jaukovic

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Зорица Јауковић

Број индекса 4061/2010

Студијски програм Хемија

Наслов рада "Развој и примена методе анализе одабраних стерола и стероидних хормона у природним и отпадним водама течном хроматографијом са тандем масеном спектрометријом"

Ментор проф. др Светлана Грујић

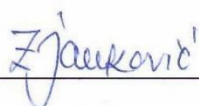
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива 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 аутора

У Београду, 21.03.2023.



Изјава о коришћењу

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

"Развој и примена методе анализе одабраних стерола и стероидних хормона у природним и отпадним водама течном хроматографијом 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 Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 21.03.2023.

Zjankovic

1. **Ауторство.** Дозвољаваће 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.** Дозвољаваће 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 прерада.** Дозвољаваће 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.** Дозвољаваће 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 прерада.** Дозвољаваће 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.** Дозвољаваће 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.

ОЦЕНА ИЗВЕШТАЈА О ПРОВЕРИ ОРИГИНАЛНОСТИ
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и налаза у извештају из програма „iThenticate“ којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације Зорице Јауковић под називом „Развој и примена методе анализе одабраних стерола и стероидних хормона у природним и отпадним водама течном хроматографијом са тандем масеном спектрометријом“, констатујем да индекс сличности текста износи сумарно 17%, при чему он потиче из 77 различитих извора, у оквиру којих је највећи степен појединачног подударања 5% и 2% из два извора, док су остали 1% из 7 извора, а $\leq 1\%$ из 68 извора.

Највећа подударност, од 5%, утврђена је са докторском дисертацијом Иване Матић Бујагић под називом „Одређивање трагова стероидних хормона и стерола као индикатора извора загађења речних седимената методом течне хроматографије са тандем масеном спектрометријом“ и она је доминантно последица навођења назива истих анализата, метода употребљених за идентификацију и квантификацију анализата, као и начина извођења метода и навођења уређаја који се користи у групи у којој аутор ради.

Подударност од 2% је последица претходно публикованих резултата докторандових истраживања који су проистекли из њене дисертације, највећим делом у сажетку дисертације на енглеском језику. Подударности од 1% и $\leq 1\%$ су последица читата, назива метода и њихових скраћеница („LC-MS“, „GC-MS“), имена аутора и других библиографских података о коришћеној литератури (нпр. „Leeming“, „et al. 1996“), употребе стручних термина типичних за област у коју спада дисертација, описа делова методолошких протокола за које су јасно наведене референце, као и јединица за концентрацију анализата (ng L^{-1}), што је у складу са чланом 9. Правилника.

На основу свега изнетог, а у складу са чланом 8. став 2. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду, изјављујем да извештај указује на оригиналност докторске дисертације, па се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

26. јун 2023. год.

Ментор:

Грујић Светлана

.....
Др Светлана Грујић, ванредни професор,
Универзитет у Београду,
Технолошко-металуршки факултет