



**ŠESTI NAUČNO-STRUČNI  
SKUP POLITEHNIKA**

# **ZBORNİK RADOVA**



Beograd, 10. decembar 2021. godine

**Izdavač**

Akademija tehničkih strukovnih studija Beograd  
Katarine Ambrozić 3, Beograd  
[www.atssb.rs](http://www.atssb.rs)

**Za izdavača**

dr Marina Stamenović, profesor strukovnih studija

**Urednici sekcija**

dr Ivana Matić Bujagić

dr Svetozar Sofijanić

dr Sanja Petronić

dr Željko Ranković

dr Kovička Banjević

dr Vladanka Stupar

mr Jelena Zdravković

dr Nenad Đorđević

**Tehnička priprema i dizajn korica**

ATSSB — Odsek Beogradska politehnika

**Dizajn logoa Skupa**

Dušan Berović



## ANALIZA ESTROGENIH HORMONA IZ UZORAKA POVRŠINSKIH, PODZEMNIH I OTPADNIH VODA

Marina Maletić<sup>1</sup>, Inovacioni centar Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerzitet u Beogradu  
Marija Vukčević<sup>2</sup>, Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu  
Danijela Prokić<sup>3</sup>, Inovacioni centar Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerzitet u Beogradu  
Ana Kalijadis<sup>4</sup>, Institut za nuklearne nauke "Vinča", Univerzitet u Beogradu  
Biljana Babić<sup>5</sup>, Institut za fiziku, Univerzitet u Beogradu  
Tatjana Đurkić<sup>6</sup>, Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu

**Apstrakt:** Prisustvo estrogenih hormona u vodenim ekosistemima posledica je ispuštanja neprečišćenih otpadnih komunalnih voda, kao i nemogućnost potpunog uklanjanja estrogenih hormona u postrojenjima za prečišćavanje otpadnih voda. Budući da prisustvo estrogenih hormona u životnoj sredini, čak i u veoma niskim koncentracijama, može imati negativan uticaj na endokrini sistem ljudi i životinja, u ovom radu je praćeno prisustvo estrona, 17 $\beta$ -estradiola i 17 $\alpha$ -etinilestradiola u uzorcima podzemnih, površinskih i otpadnih voda, prikupljenih sa područja Beograda, Novog Sada, Velike Morave i Peka. Određivanje koncentracije hormona u pomenutim uzorcima voda vršeno je metodom tačne hromatografije u sprezi sa tandem masenom spektrometrijom (LC-MS/MS). Kako su estrogeni hormoni obično prisutni u veoma niskim koncentracijama u uzorcima vode iz životne sredine, pre analize je potrebno izvršiti njihovo izolovanje i koncentrisanje. Predkoncentrisanje hormona vršeno je primenom prethodno optimizovane metode ekstrakcije na čvrstoj fazi, uz korišćenje modifikovanog ugljeničnog kriogela kao sorbenta. Kod svih ispitivanih uzoraka vode potvrđeno je prisustvo bar jednog od ispitivanih hormona. Najviše koncentracije hormona zabeležene su u uzorcima otpadnih voda, kao što je i očekivano, ali su ispitivani hormoni detektovani i u uzorcima površinskih i podzemnih voda.

**Ključne reči:** estrogeni hormoni, analiza vode, ekstrakcija na čvrstoj fazi, ugljenični kriogel

## THE ANALYSIS OF ESTROGEN HORMONES FROM GROUND WATER, SURFACE WATER, AND WASTEWATER

**Abstract:** The major route for estrogen hormones to reach the aquatic environment is via communal wastewater and their incomplete removal in wastewater treatment plants. Since the presence of estrogen hormones in the environment can have a negative effect on human and wildlife endocrine system, in this study, the presence of estrone, 17 $\beta$ -estradiol, and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol in the ground water, surface water, and wastewater samples, collected from Belgrade, Novi Sad, Velika Morava, and Pek area, was monitored. Hormones concentration in collected water samples was determined by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Taking into consideration that

<sup>1</sup>[mvukasinovic@tmf.bg.ac.rs](mailto:mvukasinovic@tmf.bg.ac.rs)

<sup>2</sup>[marijab@tmf.bg.ac.rs](mailto:marijab@tmf.bg.ac.rs)

<sup>3</sup>[dprokic@tmf.bg.ac.rs](mailto:dprokic@tmf.bg.ac.rs)

<sup>4</sup>[anadovic@vinca.rs](mailto:anadovic@vinca.rs)

<sup>5</sup>[babic@ipb.ac.rs](mailto:babic@ipb.ac.rs)

<sup>6</sup>[tanjav@tmf.bg.ac.rs](mailto:tanjav@tmf.bg.ac.rs)

*hormones are usually present at low concentrations in the environmental water, their determination requires an enrichment step, prior to analysis. Isolation and preconcentration of the analytes were carried out applying the previously optimized method of solid-phase extraction, using modified carbon cryogel as a sorbent. The presence of at least one of the examined hormones was confirmed in all of the tested water samples. Although the highest concentration of the hormones was detected in wastewater samples, as expected, tested hormones were also detected in samples of ground water and surface water.*

**Keywords:** estrogen hormones, water analysis, solid-phase extraction, carbon cryogel

## 1. UVOD

Estrogeni hormoni pripadaju grupi ometajućih komponenata endokrinog sistema. Spadaju u grupu egzogenih zagađujućih materija koji nakon ulaska u organizam mogu narušavati regulaciju endokrinog sistema, izazivajući ozbiljne posledice u reprodukciji i razvoju ljudi i životinja [1]. Ova jedinjenja, iako prisutna u veoma niskim koncentracijama, mogu imati štetne efekte na akvatične organizme [2]. Glavni način njihovog dospevanja u životnu sredinu su efluenti otpadnih voda, koji se nakon nepotpunog uklanjanja ovih komponenti u postrojenjima za prečišćavanje otpadnih voda ispuštaju u vodotokove [3]. Pojedine studije pokazuju da je izlaganje ovim supstancama povezano sa pojavom različitih endokrinih poremećaja [4,5,6]. Prema tome, razvoj i primena osetljive, brze i tačne analitičke metode za praćenje tragova ovih jedinjenja u vodi su veoma važni i neophodni. Imajući u vidu da su ova jedinjenja u životnoj sredini prisutna u veoma niskim koncentracijama, njihova detekcija zahteva razvoj efikasne metode pripreme uzoraka koja obuhvata izolovanje i predkoncentrisanje analita. Za ovu svrhu najčešće se koristi metoda ekstrakcije na čvrstoj fazi (engl. solid-phase extraction, SPE), koja omogućava izolaciju, prečišćavanje i koncentrisanje komponenti od interesa iz tečnog uzorka [7]. Cilj ovog rada bio je da se ispita prisustvo tragova estrogenih hormona u podzemnim, površinskim i otpadnim vodama, prikupljenih sa područja Beograda, Novog Sada, Velike Morave i Peka, primenom prethodno optimizovane metode ekstrakcije na čvrstoj fazi, uz korišćenje ugljeničnog kriogela, modifikovanog sa  $\text{HNO}_3$ , kao sorbenta.

## 2. EKSPERIMENTALNI DEO

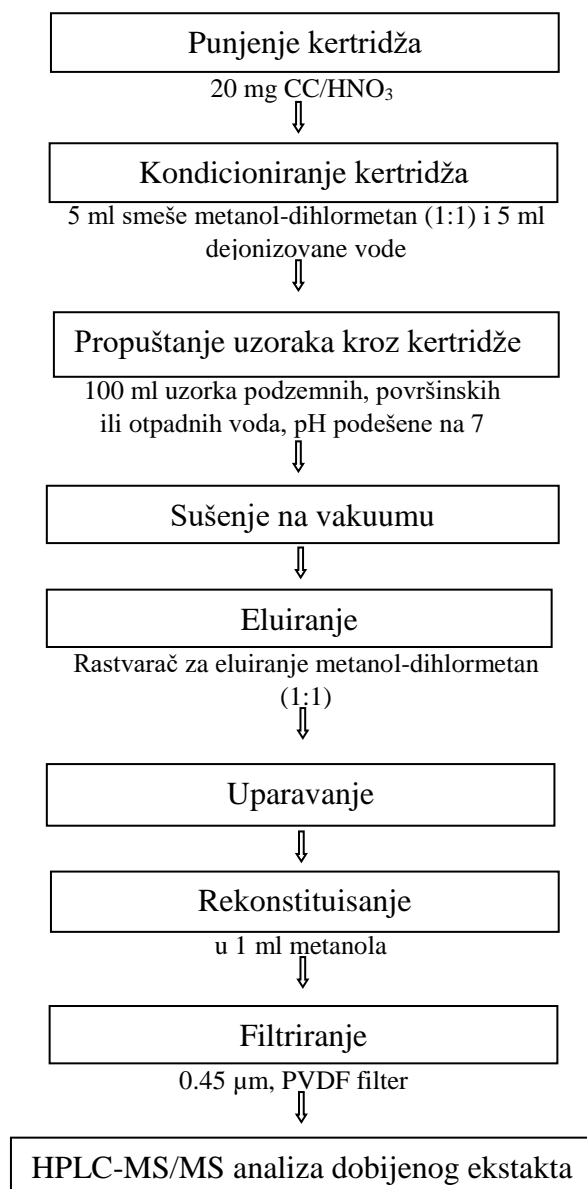
U okviru eksperimentalnog dela ovog rada vršena je primena prethodno optimizovane SPE metode za izolovanje estrogenih hormona iz realnih uzoraka vode [8]. Optimizacija SPE metode vršena je izborom odgovarajuće mase sorbenta, zapremine rastvora, početne pH vrednosti rastvora, kao i vrste organskog rastvarača za eluiranje. Uzorci vode su sakupljeni u plastične boce od 1L i čuvani u zamrzivaču. Pre nanošenja uzoraka, kertridži su napunjeni odgovarajućom masom ugljeničnog kriogela modifikovanog sa  $\text{HNO}_3$  (CC/ $\text{HNO}_3$ ). Optimizovana SPE metoda prikazana je na Slici 1.

Optimizovana metoda je bila primenjena na realne uzorke podzemnih, površinskih i otpadnih voda. Sakupljena su po tri uzorka od svih vrsta voda. Uzorci podzemnih voda (engl. *ground water*, GW) obeleženi kao GW1, GW2 i GW3, sakupljeni su iz Reni bunara sa područja Beograda. Uzorci površinskih voda (engl. *surface water*, SW), označeni kao SW1, SW2 i SW3 sakupljeni su sa područja Dunava (lokalitet Novi Sad), Velike Morave i Peka, dok su otpadne vode (engl. *wastewater*, WW), označene kao WW1, WW2 i WW3 bile uzorkovane na lokalitetima Arandelovca i Beograda. Pre ekstrakcije na čvrstoj fazi, uzorci vode su filtrirani kroz filtere sa staklenim vlaknima, veličine pora 1-3  $\mu\text{m}$ .

## 3. REZULTATI

U ovom radu određivani su granica detekcije (engl. *limit of detection*, LOD), granica kvantifikacije (engl. *limit of quantitation*, LOQ) i efekat matrice (engl. *matrix effect*, ME) optimizovane metode za određivanje niskih koncentracija odabranih hormona iz uzoraka vode. Vrednosti LOD i LOQ za svaki ispitivani analit izračunate su na osnovu odnosa signala i šuma (engl. *signal to noise*, S/N),

očitanih sa hromatograma. Granica detekcije metode određena je kao koncentracija analita pri kojoj je vrednost S/N iznosila 3, dok je granica kvantifikacije određena kao koncentracija analita, dobijena pri vrednosti S/N = 10. Granice detekcije iznosile su 8,78 ng/L za estron; 6,96 ng/L za 17 $\beta$ -estradiol i 16,75 ng/L za 17 $\alpha$ -etinilestradiol, dok su se vrednosti LOQ iznosile 29,28 ng/L za estron, 23,19 ng/L za 17 $\beta$ -estradiol i 55,84 ng/L za 17 $\alpha$ -etinilestradiol.



**Slika 1.** Šematski prikaz optimizovane SPE metode  
**Izvor:** *Izvorno autorsko*

Uticaj matrice je određen korišćenjem standarda koji odgovara matrici uzorka i standardnog rastvora hormona. Efekat matrice je čest problem kod LC-MS/MS analize, koji može dovesti do smanjenja ili povećanja odziva instrumenta, odnosno signala [9]. Vrednosti ME, koje su više ili niže od 100 %, ukazuju da je intezitet signala zbog uticaja matrice povećan, odnosno smanjen. Efekat matrice prilikom ispitivanja odabranih hormona iz podzemnih, površinskih i otpadnih voda prikazan je u Tabeli 1.

Rezultati prikazani u Tabeli 1 pokazuju da komponente matrice nemaju značajan uticaj na intenzitet signala. Izuzetak je hormon 17 $\beta$ -estradiol kod uzorka otpadne vode, gde je efekat matrice 121,19 %, što ukazuje da matrica ovog uzorka dovodi do značajnog povećanja signala.

**Tabela 1.** Efekat matrice prilikom analize odabranih hormona iz podzemnih, površinskih i otpadnih voda

Jedinjenje	Efekat matrice (%)		
	Podzemna voda	Površinska voda	Otpadna voda
Estron	93,64	89,36	94,18
17 $\beta$ -estradiol	116,63	114,50	121,19
17 $\alpha$ -etinilestradiol	102,35	102,68	111,30

Detektovane koncentracije odabranih hormona u ispitivanim uzorcima podzemnih, površinskih i otpadnih voda prikazane su u Tabeli 2.

**Tabela 2.** Detektovane koncentracije ispitivanih hormona u uzorcima podzemnih, površinskih i otpadnih voda

Uzorak	Lokacija	Jedinjenje	Detktovane koncentracije (ng/L)
GW1	Beograd	Estron	228,22
		17 $\beta$ -estradiol	139,66
		17 $\alpha$ -etinilestradiol	147
GW2		Estron	315
		17 $\beta$ -estradiol	139,64
		17 $\alpha$ -etinilestradiol	200,95
GW3		Estron	nd
		17 $\beta$ -estradiol	30,23
		17 $\alpha$ -etinilestradiol	nd
SW1	Pek	Estron	190
		17 $\beta$ -estradiol	88
		17 $\alpha$ -etinilestradiol	104
SW2	Dunav	Estron	280,65
		17 $\beta$ -estradiol	85,02
		17 $\alpha$ -etinilestradiol	79,37
SW3	Velika Morava	Estron	nd
		17 $\beta$ -estradiol	37,75
		17 $\alpha$ -etinilestradiol	<LOQ
WW1	Arandelovac	Estron	1605
		17 $\beta$ -estradiol	1113
		17 $\alpha$ -etinilestradiol	960
WW2	Beograd 1	Estron	798,65
		17 $\beta$ -estradiol	96,44
		17 $\alpha$ -etinilestradiol	82,65
WW3	Beograd 2	Estron	648,90
		17 $\beta$ -estradiol	nd
		17 $\alpha$ -etinilestradiol	nd

nd- nije detektovano; <LOQ – detektovano ispod granice kvantifikacije

U svim uzorcima detektovano je prisustvo bar jednog ispitivanog hormona. Od ukupno devet mesta uzorkovanja, na šest je utvrđeno prisustvo sva tri ispitivana hormona, pri čemu su kod svih šest lokaliteta koncentracije estrona bile najviše u poređenju sa koncentracijama ostala dva hormona. Rezultati prikazani u Tabeli 2. pokazuju da neki hormoni nisu detektovani na mestima uzorkovanja GW3 (estron i 17 $\alpha$ -etinilestradiol), SW3 (estron) i WW3 (17 $\beta$ -estradiol i 17 $\alpha$ -etinilestradiol). Takođe je uočljivo da je u uzorku SW3 detektovan hormon 17 $\alpha$ -etinilestradiol, ali u koncentraciji ispod granice kvantifikacije.

U uzorcima podzemnih voda koncentracije detektovanih hormona su bile u opsegu 30,23-315 ng/L. Kao najmanje zagađen pokazao se uzorak GW3, gde je detektovan samo hormon 17 $\beta$ -estradiol. Koncentracije ispitivanih hormona u površinskim vodama Peka, Dunava i Velike Morave (uzorci SW1 i SW2 i SW3) kretale su se od 37,75 do 280,65 ng/L, što se pokazalo nešto više u odnosu na koncentracije hormona u površinskim vodama na području Kine i Portugalije, prikazanim u nekim prethodnim studijama [10,11].

Očekivano, najviše koncentracije ispitivanih hormona detektovane su u uzorcima otpadnih voda, u opsegu 82,65 – 1605 ng/L. U svim uzorcima otpadnih voda najviše koncentracije su zabeležene za estron, pri čemu je najviša koncentracija ovog hormona detektovana iz uzorka WW1, uzorkovanog na ulazu otpadnih voda u postrojenje za prečišćavanje na teritoriji Arandelovca. Na ovom mestu uzorkovanja otpadnih voda, zabeležene su i najviše koncentracije 17 $\beta$ -estradiola i 17 $\alpha$ -etinilestradiola.

#### 4. ZAKLJUČAK

U ovom radu ispitivana je mogućnost primene prethodno optimizovane SPE metode na realnim uzorcima voda, uz korišćenje ugljeničnog kriogela modifikovanog azotnom kiselinom kao sorbenta. Granice detekcije optimizovane metode su se kretale od 6,96 do 16,75 ng/L, dok su granice kvantifikacije bile u opsegu 23,19-55,84 ng/L. Pokazano je da kod ispitivanih uzoraka vode efekat matrice nema veliki uticaj na tačnost LC-MS/MS metode. Nakon primene optimizovane metode ekstrakcije na čvrstoj fazi za pripremu realnih uzoraka vode i LC-MS/MS analize, utvrđeno je prisustvo estrogenih hormona u površinskim, podzemnim i otpadnim vodama. U svim ispitivanim uzorcima detektovano je prisustvo barem jednog hormona, a najviše koncentracije zabeležene su u uzorcima otpadnih voda, posebno u otpadnim vodama na lokalitetu Arandelovac. Rezultati ispitivanja ukazuju na značajno prisustvo estrogenih hormona u akvatičnoj sredini, kao i na potrebu monitoringa ovih supstanci.

#### ZAHVALNICA

Ovaj rad je finansiran od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, Republike Srbije (Ugovor br. 451-03-9/2021-14/200135 i 451-03-9/2021-14/200287).

#### LITERATURA

- [1] Liao, K.; Mei, M.; Li, H.; Huang, X.; Wu, C.: Multiple monolithic fiber solid-phase microextraction based on a polymeric ionic liquid with high-performance liquid chromatography for the determination of steroid sex hormones in water and urine, *Journal of Separation Science*, Vol. 39 (2016) No. 3, pp. 566–575, pp 1615-9306, ISSN 16159314
- [2] Saaristo, M.; Craft, J.A.; Lehtonen, K.K.; Lindström.: Sand goby (*Pomatoschistus minutus*) males exposed to an endocrine disrupting chemical fail in nest and mate competition, *Hormones and Behavior*, Vol. 56 (2009) No. 3, pp. 315-321, ISSN 0018-506X
- [3] Naldi, A.C.; Fayad, B.P.; Prévost M.; Sauvé S.: 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, *Chemistry Central Journal*, Vol. 10 (2016), 30, ISSN 1752-153X
- [4] Choi, J.; Eom, J.; Kim, J.; Lee, S.; Kim, Y.: Association between some endocrine-disrupting chemicals and childhood obesity in biological samples of young girls: A cross-sectional study, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, Vol. 38 (2014), No. 1, pp. 51-57, ISSN 1382-6689
- [5] Hauser, R.; Skakkebaek, N.E.; Huss, U.; Toppari J.; Juul, A.; Andersson A.M.; Kortenkamp A.; Heindel, J.J.; Trasande L.: Male Reproductive Disorders, Diseases, and Costs of Exposure to Endocrine-Disrupting Chemicals in the European Union, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, Vol. 100 (2015) No. 4, pp. 1267–1277, ISSN 0021-972X

- [6] Hu, Y.; Yang, Q.; Sun, J.; Chen, Q.; Fan, J.; Mei, Y.: Adsorption and Desorption Behaviors of Four Endocrine Disrupting Chemicals in Soils from the Water-Level Fluctuation Zone of the Three Gorges Reservoir, China, *Sustainability*, Vol. 10 (2018) No. 7, 2531, 2071-1050
- [7] Lalović, B.; Đurkić, T.; Vukčević M.; Janković-Častvan, I.; Kalijadis, A.; Laušević, Z; Laušević M.: Solid-phase extraction of multi-class pharmaceuticals from environmental water samples onto modified multi-walled carbon nanotubes followed by LC-MS/MS, *Environmental Science and Pollution Research*, Vol. 24 (2017), pp. 20784–20793, 0944-1344
- [8] Prokić, D., Vukčević, M., Maletić, M., Kalijadis, A., Babić, B., Janković-Častvan, I. & Đurkić, T.: Ekstrakcija estrogenih hormona iz vode korišćenjem ugljeničnog kriogela kao sorbenta, *Proceedings of 34. Međunarodni kongres o procesnoj industriji*, Stanojević, M., Jovović, A., pp. 123-127, 978-86-85535-08-6, Fakultet tehničkih nauka Univerziteta u Novom Sadu, jun 2021, Savez mašinskih i elektrotehničkih inženjera i tehničara Srbije (SMEITS), Novi Sad, 2021
- [9] Gineys, N., Giroud, B., Vulliet E.: Analytical method for the determination of trace levels of steroid hormones and corticosteroids in soil, based on PLE/SPE/LC-MS/MS, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Vol. 397 (2010) No. 6, pp. 2295–2302, 1618-2642
- [10] Liu, S., Ying, G.G., Zhao, J.L., Chen, F., Yang, B., Zhou, J.L., Lai, H.j.: Trace analysis of 28 steroids in surface water, wastewater and sludge samples by rapid resolution liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, Vol. 1218 (2011) No. 10, pp. 1367–1378, 0021-9673
- [11] Rocha, S., Domingues, V.F., Pinho, C., Fernandes V.C., Delerue-Matos, C., Gameiro, P., Mansilha, C.: Occurrence of Bisphenol A, Estrone, 17 $\beta$ -estradiol and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol in Portuguese rivers, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, Vol. 90 (2013) No. 1, pp. 73-78, 0007-4861





AKADEMIJA TEHNIČKIH  
STRUKOVNIH STUDIJA  
BEOGRAD

[atssb.edu.rs](http://atssb.edu.rs)

ISBN-978-86-7498-087-3

