



**PETI NAUČNO-STRUČNI  
SKUP POLITEHNIKA**

# **ZBORNİK RADOVA**



**BEOGRADSKA  
POLITEHNIKA**



Beograd, 13. decembar 2019. godine

**Izdavač**

Beogradska politehnika  
Brankova 17, Beograd  
[www.politehnika.edu.rs](http://www.politehnika.edu.rs)

**Za izdavača**

prof. dr Vojkan Lučanin

**Urednici sekcija:**

dr Jelena Drobac  
dr Ivana Matić Bujagić  
dr Svetozar Sofijanić  
dr Aleksandra Nastasić  
dr Nenad Đorđević

**Tehnička priprema i dizajn korica**

Tim Beogradske politehnike

**Dizajn logoa Skupa**

Dušan Borović



## EKSTRAKCIJA ESTROGENIH HORMONA IZ VODE KORIŠĆENJEM AKTIVIRANE UGLJENIČNE TKANINE KAO ADSORBENTA

*Danijela Prokić<sup>1</sup>, Inovacioni centar Tehnološko-metalurškog fakulteta  
Ivana Matić Bujagić<sup>2</sup>, VŠSS Beogradska politehnika  
Marija Vukčević<sup>3</sup>, Tehnološko-metalurški fakultet  
Ana Kalijadis<sup>4</sup>, Institut za nuklearne nauke, Vinča“  
Tatjana Đurkić<sup>5</sup>, Tehnološko-metalurški fakultet*

**Apstrakt:** *Prisustvo estrogenih hormona u vodenoj sredini, čak i u veoma niskim koncentracijama, može imati ozbiljne negativne efekte na zdravlje ljudi i akvatičnih životinja. Stoga je važan razvoj metoda za praćenje prisustva tragova ovih supstanci u vodi. Koncentracije estrogenih hormona u vodi su reda veličine ng/l, pa je za njihovu detekciju i kvantifikaciju potrebno razviti efikasnu tehniku pripreme uzorka, koja obuhvata izolovanje i predkoncentrisanje analita. U ovom radu ispitivana je mogućnost ekstrakcije estrogenih hormona (estrona, 17 $\beta$ -estradiola i 17 $\alpha$ -etinilestradiola) iz vodenih rastvora na čvrstoj fazi, uz korišćenje nemodifikovane i hemijski modifikovane aktivirane ugljenične tkanine (ACC) kao adsorbenta. Metoda disperzivne ekstrakcije na čvrstoj fazi za predkoncentrisanje hormona na ACC optimizovana je izborom odgovarajućeg organskog rastvarača, temperature na kojoj se vrši predkoncentrisanje kao i odabirom najefikasnijeg adsorbensa. Koncentracija ispitivanih hormona nakon ekstrakcije određivana je metodom tečne hromatografije u sprezi sa tandem masenom spektrometrijom.*

**Ključne reči:** estrogeni hormoni, ekstrakcija, aktivirana ugljenična tkanina

## EXTRACTION OF ESTROGENIC HORMONES FROM WATER USING ACTIVATED CARBON CLOTH AS AN ADSORBENT

**Abstract:** *The presence of estrogenic hormones in water resources, even at very low concentrations, may have serious negative effects on people and aquatic organisms. Therefore, the development of methods for monitoring these substances in water at trace level is important. The typical concentrations of estrogenic hormones in natural waters are in the order of magnitude of ng/l. Therefore, the development of an efficient sample preparation technique, which includes isolation and preconcentration of analytes, as well as a sensitive detection method, is of great importance. In this paper, the possibility of extraction of estrogenic hormones (estrone, 17 $\beta$ -estradiol, 17 $\alpha$ -ethinylestradiol) from water solutions on a solid phase, using unmodified and chemically modified activated carbon cloth (ACC) as an adsorbent, was investigated. Method of dispersive solid phase extraction of hormones onto ACC was optimized by choosing the most appropriate organic solvent, temperature and the most efficient adsorbent. The concentration of investigated hormones was measured by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry.*

**Keywords:** estrogenic hormones, extraction, activated carbon cloth

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

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

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

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

<sup>5</sup> [tanjav@tmf.bg.ac.rs](mailto:tanjav@tmf.bg.ac.rs)

## 1. UVOD

Prisustvo steroidnih hormona u životnoj sredini privlači sve veću pažnju naučnika zbog njihovog negativnog uticaja na životinjski svet. U životnoj sredini ova jedinjenja dolaze u kontakt sa različitim organizmima, pri čemu mogu prouzrokovati niz promena, kao što su produkcija vitelogenina (proteina čija je produkcija karakteristična samo za ženke) kod muških jedinki riba, pojavu feminizacije mužjaka riba [1], uticaj na plodnost, smanjenje koncentracije testosterona u serumu pojedinih vrsta životinja, što je primećeno u oblastima u čijoj blizini se ispuštaju efluenti otpadnih voda [2].

Glavni načini dospevanja ovih jedinjenja u životnu sredinu su preko komunalnih otpadnih voda, otpadnih voda bolnica, otpada sa stočnih farmi [3]. Ove komponente su u životnoj sredini prisutne u veoma niskim koncentracijama, reda veličine ng/L. Stoga je za njihovu detekciju i kvantifikaciju potrebno razviti efikasnu tehniku pripreme uzorka, koja obuhvata izolovanje i predkoncentrisanje analita. Disperzivna ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. Dispersive solid-phase extraction, DSPE) je tehnika koja integriše ekstrakciju i koncentrisanje analita u jedan korak. Porozni materijali su pogodni kao adsorbenti za disperzivnu ekstrakciju na čvrstoj fazi zbog njihove razvijene specifične površine, visoke zapremine pora, kao i mogućnosti podešavanja veličine pora [4]. U ovom radu ispitivana je mogućnost DSPE estrogenih hormona iz vodenih rastvora uz korišćenje nemodifikovane i hemijski modifikovane aktivirane ugljenične tkanine (ACC) kao adsorbenta.

## 2. EKSPERIMENTALNI DEO

U okviru eksperimentalnog dela ovog rada najpre je ispitana efikasnost nemodifikovane i hemijski modifikovanih ACC za adsorpciju i desorpciju odabranih hormona: estrona (E1), 17 $\beta$ -estradiola (E2) i 17 $\alpha$ -etinilestradiola (EE2) iz vodenih rastvora. Ispitivanje adsorpcije vršeno je pri početnoj pH vrednosti rastvora 7, u šaržnom sistemu 3 h, na sobnoj temperaturi (25 °C) pri konstantnoj brzini mešanja (200 o min<sup>-1</sup>). Adsorpcija hormona na ispitivanim materijalima (0,02 g) je vršena iz 25 cm<sup>3</sup> rastvora smeše hormona koncentracije 100  $\mu$ g dm<sup>-3</sup>. Nakon adsorpcije, materijali su prebačeni u plastične kivete.

Desorpcija hormona različitim organskim rastvaračima (u porcijama od po 2,5 cm<sup>3</sup>) je vršena sonifikacijom uzoraka ACC u ultrazvučnom kupatilu 15 min. Nakon sonifikacije uzorci su stavljeni na vorteks. Nakon desorpcije rastvarači su upareni do suva pod strujom azota, a hormoni su rekonstituisani u 1 cm<sup>3</sup> smeše metanola i 0,1% vodenog rastvora mravlje kiseline, pri čemu je sadržaj metanola iznosio 75%.

Uticaj organskog rastvarača na prinos metode disperzivne ekstrakcije hormona ispitan je korišćenjem različitih organskih rastvarača, metanola (MeOH), acetonitrila (ACN), acetona, etil acetata, kao i smeše metanola i dihlormetana (MeOH/DCM), za desorpciju hormona sa površine uzorka ACC/HNO<sub>3</sub>.

Uticaj temperature na prinos metode ekstrakcije hormona ispitan je korišćenjem smeše MeOH/DCM kao rastvarača za desorpciju i ACC/HNO<sub>3</sub> kao adsorbenta. Desorpcija hormona vršena je na temperaturi od 25 °C, odnosno 40 °C.

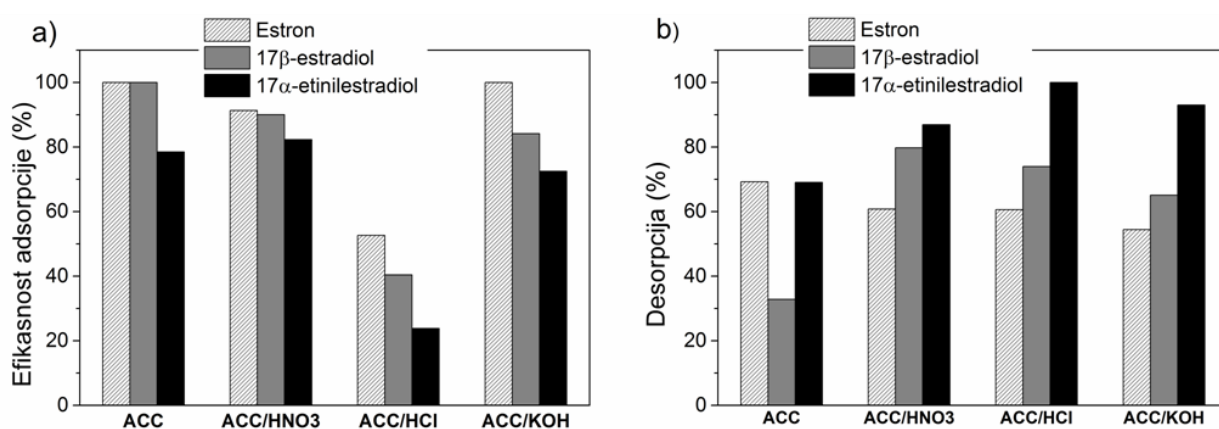
U cilju izbora optimalnog adsorbenta, ekstrakcija ispitivanih hormona vršena je korišćenjem nemodifikovane ACC i ACC modifikovane sa HNO<sub>3</sub>, HCl ili KOH. ACC/HNO<sub>3</sub> i ACC/KOH su dobijene zagrevanjem ACC tri sata na temperaturi ~ 80 °C, u rastvoru 5 M HNO<sub>3</sub> i 4 M KOH respektivno, dok je ACC/HCl dobijena potapanjem ACC u 1 M rastvor HCl tri sata, bez zagrevanja. Posle modifikacije, ACC su ispirane u destilovanoj vodi do konstantne pH vrednosti filtrata i sušene na temperaturi od 110 °C.

Koncentracija hormona zaostalih u rastvoru nakon adsorpcije kao i koncentracija desorbovanih hormona ispitivana je metodom tečne hromatografije u sprezi sa tandem masenom spektrometrijom. Za razdvajanje hormona je korišćen tečni hromatograf Surveyor (Thermo Fisher Scientific, SAD), opremljen reverzno-faznom kolonom Zorbax Eclipse XDB-C18 (75 mm x 4.6 mm x 3.5  $\mu$ m), pri konstantnom protoku mobilne faze. Sastav mobilne faze bio je 75% metanola i 25% mravlje

kiseline (0,1% vodeni rastvor). Metoda je bila izokratska. Detekcija i kvantifikacija hormona vršena je korišćenjem LCQ Advantage (Thermo Fisher Scientific, SAD) masenog spektrometra sa elektrosprej jonskim izvorom i jonskim trapom. Snimanje je vršeno u pozitivnom modu jonizacije.

### 3. REZULTATI I DISKUSIJA

U cilju optimizacije metode disperzivne ekstrakcije na čvrstoj fazi za analizu hormona iz vodenih rastvora, najpre je izvršen izbor odgovarajućeg adsorbensa. Mogućnost primene nemodifikovane i modifikovanih ACC za adsorpciju i desorpciju hormona prikazana je na slici 1. Na osnovu slike 1a) uočava se da se kod svih materijala najbolje adsorbuje estron, dok se najslabije adsorbuje 17 $\alpha$ -etinilestradiol. Najveća efikasnost adsorpcije za sva tri hormona postignuta je pri korišćenju materijala ACC (78,5-100%), zatim na materijalima ACC/KOH (72,5-100%) i ACC/HNO<sub>3</sub> (82,3-91,3%), dok su najslabiji rezultati dobijeni na ACC/HCl (23,8-52,6%). U pogledu desorpcije, korišćenjem smeše rastvarača MeOH/DCM, najveći stepen desorpcije za E1 je dobijen sa tkanine ACC, za E2 sa tkanine ACC/HNO<sub>3</sub>, a za EE2 sa tkanine ACC/HCl (slika 1b).



Slika 1.a) Efikasnost adsorpcije hormona na različitim materijalima, b) desorpcija hormona

U tabeli 1 prikazani su prinosi metode pri upotrebi nemodifikovane i modifikovanih ACC kao adsorbenata. Najbolji prinosi DSPE metode dobijeni su korišćenjem tkanine ACC/HNO<sub>3</sub>, koja je odabrana kao najoptimalniji adsorbent.

Tabela 1. Prinosi metode pri upotrebi različitih materijala kao adsorbenata

Materijal	Prinosi (%)		
	Estron	17 $\beta$ -estradiol	17 $\alpha$ -etinilestradiol
ACC	69,3	32,8	54,2
ACC/HNO <sub>3</sub>	55,5	71,8	71,6
ACC/HCl	31,9	29,9	23,8
ACC/KOH	54,5	54,8	67,5

Metoda disperzivne ekstrakcije na čvrstoj fazi za analizu hormona iz vodenih rastvora, optimizovana je i izborom odgovarajućeg organskog rastvarača. U tabeli 2 prikazani su prinosi DSPE metode za sve ispitivane hormone.

**Tabela 2.** Prinosi DSPE metoda za ispitivane hormone pri upotrebi različitih rastvarača za desorpciju uz korišćenje ACC/HNO<sub>3</sub> kao adsorbenta

Rastvarač	Prinosi (%)		
	Estron	17β-estradiol	17α-etinilestradiol
MeOH/DCM	55,5	71,8	71,6
MeOH	13,2	11,9	33,2
ACN	11,6	5,57	35,1
Aceton	33,2	33,7	61,4
Etil acetat	23,2	22,3	28,2

Kao što se iz tabele 2 može videti, najviši prinosi za sva tri ispitana hormona dobijeni su pri korišćenju smeše MeOH/DCM, dok su najlošiji rezultati dobijeni pri korišćenju ACN-a za hormon estron i 17β-estradiol, kao i pri korišćenju etil acetata za hormon 17α-etinilestradiol. Na osnovu ovih rezultata, kao najoptimalniji rastvarač za desorpciju odabranih hormona sa ACC/HNO<sub>3</sub> odabrana je smeša MeOH/DCM.

Prinosi DSPE metode dobijeni ispitivanjem uticaja temperature na ekstrakciju hormona sa ACC prikazani su u tabeli 3. Pokazano je da zagrevanje uzorka tokom desorpcije dovodi do povećanja prinosa ispitivanih hormona za oko 10%.

**Tabela 3.** Uticaj temperature na prinos metode pri upotrebi materijala ACC/HNO<sub>3</sub>

Temperatura	Prinosi (%)		
	Estron	17β-estradiol	17α-etinilestradiol
Sobna temperatura (25 °C)	55,5	71,8	71,6
40 °C	62,6	79,2	81,0

Na osnovu dobijenih rezultata optimalna metoda disperzivne ekstrakcije na čvrstoj fazi za analizu hormona izvodi se korišćenjem ACC/HNO<sub>3</sub> kao adsorbenta, smeše MeOH/DCM kao organskog rastvarača za desorpciju koja se vrši na povišenoj temperaturi od 40 °C.

#### 4. ZAKLJUČAK

Nemodifikovana i modifikovane aktivirane ugljenične tkanine korišćene su kao adsorbenti u metodi disperzivne ekstrakcije na čvrstoj fazi za predkoncentrisanje estrogenih hormona. Pokazano je da primenjeni hemijski tretmani imaju značajnog uticaja kako na efikasnost adsorpcije tako i na efikasnost desorpcije hormona sa površine adsorbenta. Parametri DSPE metode su optimizovani u cilju odabira najoptimalnijeg adsorbenta, organskog rastvarača za desorpciju, kao i temperature na kojoj se vrši desorpcija. Kao najpogodniji material za adsorpciju i desorpciju hormona pokazao se ACC/HNO<sub>3</sub>. Najviši prinosi postignuti su korišćenjem smeše MeOH/DCM za desorpciju hormona. Uočeno je da povećanje temperature dovodi do značajnijih povećanja u prinosu metode. Optimizovana DSPE metoda dala je zadovoljavajuće prinose za hormone 17β-estradiol i 17α-etinilestradiol, dok za estron nisu postignute dovoljno visoke vrednosti, pa je potrebno sprovesti dodatna istraživanja i optimizaciju metode u pogledu ekstrakcije estrona na uzorcima ACC.

**Zahvalnica:** Ovaj rad je finansiran od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, Republike Srbije kroz projekat OI 172007

## LITERATURA

- [1] Suri, R.P.S.; Singh, T.S.; Chimchirian, R.F.: Effect of process conditions on the analysis of free and conjugated estrogen hormones by solid-phase extraction–gas chromatography/mass spectrometry (SPE–GC/MS), *Environ Monit Assess*, 184. (2012) 3., pp. 1657-1669, 0167-6369
- [2] Folmar, L.C.; Denslow, N.D.; Rao, V.; Chow, M.; Crain, D.A.; Enblom, J.; Marcino, J.; Guillette, L.J.: Vitellogenin induction and reduced serum testosterone concentrations in feral male carp (*Cyprinus caprio*) captured near a major metropolitan sewage treatment plant, *Environ Health Perspect*, 104. (1996) 10., pp. 1096-1101, 0091-6765
- [3] Ying, G.G.; Kookana, R.S.; Ru, Y.R.: Occurrence and fate of hormone steroids in the environment, *Environ Int*, 28. (2002) 6., pp. 545-551, 0160-4120
- [4] Zhang, S.; Lu, F.; Ma, X.; Yue, M.; Li, Y.; Liu, J.; Yuo, J.: Quaternary ammonium-functionalized MCM-48 mesoporous silica as a sorbent for the dispersive solid-phase extraction of endocrine disrupting compounds in water, *Journal of Chromatography A*, 1557. (2018)., pp. 1-8, 0021-967



**BEOGRADSKA  
POLITEHNIKA**



ISBN: 978-86-7498-081-1



9 788674 980811