



UNIVERZITET U NIŠU  
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET



**Jelena (S) Nikolić**

**Optimizacija postupaka pripreme uzoraka zemljišta za  
kvantitativnu analizu policikličnih aromatičnih  
ugljevodonika primenom metode gasna hromatografija-  
masena spektrometrija**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Niš, 2018





UNIVERSITY OF NIŠ  
FACULTY OF SCIENCES AND MATHEMATICS



**Jelena (S) Nikolić**

**Optimization of the soil samples preparations for the  
determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil  
by gas chromatography-mass spectrometry**

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2018.





UNIVERZITET U NIŠU  
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET



**Jelena (S) Nikolić**

**Optimizacija postupaka pripreme uzoraka zemljišta za  
kvantitativnu analizu policikličnih aromatičnih  
ugljovodonika primenom metode gasna hromatografija-  
masena spektrometrija**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Текст ове докторске дисертације ставља се на увид јавности, у складу са чланом 30., став 8. Закона о високом образовању ("Сл. гласник РС", бр. 76/2005, 100/2007 – аутентично тумачење, 97/2008, 44/2010, 93/2012, 89/2013 и 99/2014)

**НАПОМЕНА О АУТОРСКИМ ПРАВИМА:**

Овај текст сматра се рукописом и само се саопштава јавности (члан 7. Закона о ауторским и сродним правима, "Сл. гласник РС", бр. 104/2009, 99/2011 и 119/2012).

**Ниједан део ове докторске дисертације не сме се користити ни у какве сврхе, осим за упознавање са њеним садржајем пре одбране дисертације.**

Niš, 2018



## Подаци о докторској дисертацији

Ментор:

др Виолета Митић, редовни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Нишу

Наслов:

Оптимизација поступака припреме узорака земљишта за квантитативну анализу полицикличних ароматичних угљоводоника применом методе гасна хроматографија-масена спектрометрија

Резиме:

Полициклични ароматични угљоводоници (ПАУ) сврставају се у дуготрајне органске загађиваче, због чега је праћење њиховог садржаја у животној средини од изузетног значаја. Иако постоји велики број полицикличних ароматичних угљоводоника, Европска Комисија прописује обавезу праћења концентрација у животној средини за само њих 16. Анализа ПАУ у земљишту представља велики изазов због мале концентрације ових једињења и недовољне селективности органских растварача. Циљ дисертације била је оптимизација и валидација техника екстракције (ултразвучна екстракција, екстракција по Сокслету и QuEChERS) као и пречишћавања добијених екстраката за анализу 16 приоритетних полицикличних ароматичних угљоводоника у узорцима земљишта применом методе гасна хроматографија - масена спектрометрија. Након експеримената спроведених у циљу оптимизације и валидације закључено је да је техника за коју су постигнуте најбоље аналитичке карактеристике QuEChERS техника у којој је за екстракцију коришћена смеша растварача ацетонитрил/вода (1:2, v/v), а за пречишћавање добијених екстраката дијатомејска земља као сорбенс. Ефикасности добијене за ову комбинацију растварач/сорбенс биле су у интервалу од 81% за бензо[b]флуорантен до 109% за бензо[a]пирен. Употребом QuEChERS технике знатно је смањено време припреме узорака и употреба великих количина органских растварача, уз очување тачности и прецизности методе. Оптимизована QuEChERS техника коришћена је у анализи узорака земљишта са територије градског подручја Ниша. Концентрације укупних ПАУ варираше

су у зависности од места узорковања и биле су у распону 0,346 - 48,678 mg kg<sup>-1</sup>. Мултиваријантне методе статистичке анализе омогућиле су груписање узорака на основу садржаја ПАУ, тешких метала и основних карактеристика земљишта и утврђени су односи између анализираних компоненти.

Научна област:

Хемија

Научна  
дисциплина:

Аналитичка хемија

Кључне речи:

Полициклични ароматични угљоводоници, ПАУ, оптимизација, валидација, ултразвучна екстракција, екстракција по Сокслету, QuEChERS, гасна хроматографија, масена спектрометрија, тешки метали, анализа главних компоненти, кластер анализа

УДК:

[543.544.3 + 543.51] : [661.715.7 + 631.42]

CERIF  
класификација:

P 003 и P 300 Хемија и Аналитичка хемија

Тип лиценце  
Креативне  
заједнице:

CC BY-NC-ND



## Data on Doctoral Dissertation

Doctoral  
Supervisor:

Violeta Mitić Ph.D., full professor, Faculty of Science and Mathematics, University of Nis

Title:

Optimization of the soil samples preparations for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by gas chromatography-mass spectrometry

Abstract:

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) are pollutants of great concern due to their toxicity. European Commission classified 16 compounds as priority pollutants based on their toxicity, carcinogen potential and occurrence. PAH analysis in soil is of great importance, but due to PAHs low concentrations and low selectivity of organic solvents is challenge. The aim of this dissertation was to optimize extraction (ultrasound, Soxhlet extraction and QuEChERS) and clean up techniques for the extraction of 16 priority PAHs from soil, followed by GC - MS analysis. The best results were obtained by QuEChERS technique using acetonitrile/water (1:2, v/v) as extraction solvent and diatomaceous earth as clean up sorbent. Recovery values varied between 81% for benzo[b]fluoranthene to 109% for benzo[a]pyrene. Proposed QuEChERS technique is accurate and precise, but also cheaper and simpler than other methods used for PAH extraction from soil. Optimized QuEChERS technique was applied for real soil samples analysis from urban area of Niš. The content of total PAHs varied from 0,346 48,678 mg kg<sup>-1</sup>. Multivariate statistical analysis enabled grouping of soil samples based on PAH and heavy metal concentrations and soil properties.

Scientific  
Field:

Chemistry

Scientific  
Discipline:

Analytical chemistry

Key Words:

Polycyclic aromatic hydrocarbons, PAH, optimization, validation,

ultrasound extraction, Soxhlet extraction, QuEChERS, gas chromatography, mass spectrometry, heavy metal, PCA, cluster analysis

UDC: [543.544.3 + 543.51] : [661.715.7 + 631.42]

CERIF  
Classification: P 003 and P 300 Chemistry and Analytical chemistry

Creative  
Commons  
License Type: CC BY-NC-ND



**ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ  
НИШ**

**КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА**

Редни број, <b>РБР:</b>	
Идентификациони број, <b>ИБР:</b>	
Тип документације, <b>ТД:</b>	монографска
Тип записа, <b>ТЗ:</b>	текстуални / графички
Врста рада, <b>ВР:</b>	докторска дисертација
Аутор, <b>АУ:</b>	Јелена С. Николић
Ментор, <b>МН:</b>	Виолета Д. Митић
Наслов рада, <b>НР:</b>	Оптимизација поступака припреме узорака земљишта за квантитативну анализу полицикличних ароматичних угљоводоника применом методе гасна хроматографија-масена спектрометрија
Језик публикације, <b>ЈП:</b>	српски
Језик извода, <b>ЈИ:</b>	енглески
Земља публикавања, <b>ЗП:</b>	Србија
Уже географско подручје,	Србија
Година, <b>ГО:</b>	2018.
Издавач, <b>ИЗ:</b>	ауторски репринт
Место и адреса, <b>МА:</b>	Ниш, Вишеградска 33.
Физички опис рада, <b>ФО:</b> (поглавља/страна/	8 поглавља, 225 стране, 222 цитата, 36 табела, 58 слика
Научна област, <b>НО:</b>	Хемија
Научна дисциплина, <b>НД:</b>	Аналитичка хемија
Предметна одредница/Кључне речи, <b>ПО:</b>	Полициклични ароматични угљоводоници, ПАУ, оптимизација, валидација, ултразвучна екстракција, екстракција по Сокслету, QuEChERS, гасна хроматографија, масена спектрометрија, тешки метали, анализа главних компоненти, кластер анализа
<b>УДК</b>	[543.544.3 + 543.51] : [661.715.7 + 631.42]

Чува се, <b>ЧУ:</b>	библиотека
Важна напомена, <b>ВН:</b>	Експериментални део докторске дисертације је финансирано од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије, у оквиру пројеката "Природни производи биљака и лишајева: изоловање, идентификација, биолошка активност и примена" (евиденциони број 172047) и "Развој нових и побољшање постојећих електрохемијских, спектроскопских и проточних (ФИА) метода за праћење квалитета животне средине" (евиденциони број 172051)
Извод, <b>ИЗ:</b>	<p>Полициклични ароматични угљоводоници (ПАУ) сврставају се у дуготрајне органске загађиваче, због чега је праћење њиховог садржаја у животној средини од изузетног значаја. Иако постоји велики број полицикличних ароматичних угљоводоника, Европска Комисија прописује обавезу праћења концентрација у животној средини за само њих 16. Анализа ПАУ у земљишту представља велики изазов због мале концентрације ових једињења и недовољне селективности техника екстракције. Циљ дисертације била је оптимизација и валидација техника екстракције (ултразвучна екстракција, екстракција по Соклету и QuEChERS) као и пречишћавања добијених екстраката за анализу 16 приоритетних полицикличних ароматичних угљоводоника у узорцима земљишта применом методе гасна хроматографија - масена спектрометрија. Након експеримената спроведених у циљу оптимизације и валидације закључено је да је техника за коју су постигнуте најбоље аналитичке карактеристике QuEChERS техника у којој је за екстракцију коришћена смеша растварача ацетонитрил/вода (1:2, v/v), а за пречишћавање добијених екстраката дијатомејска земља као сорбенс. Ефикасности добијене за ову комбинацију растварач/сорбенс биле су у интервалу од 81% за бензо[b]флуорантен до 109% за бензо[a]пирен. Употребом QuEChERS технике знатно је смањено време припреме узорака и употреба великих количина</p>

---

органских растварања, уз очување тачности и прецизности методе. Оптимизована QuEChERS техника коришћена је у анализи узорака земљишта са територије градског подручја Ниша. Концентрације укупних ПАУ варирале су у зависности од места узорковања и биле су у распону 0,346 - 48,678 mg kg<sup>-1</sup>. Мултиваријантне методе статистичке анализе омогућиле су груписање узорака на основу садржаја ПАУ, тешких метала и основних карактеристика земљишта и утврђени су односи између анализираних компоненти.

---

Датум прихватања теме, ДП: 21.09.2016.год.

---

Датум одбране, ДО:

---

Чланови  
комисије

Председник:

Члан:

Члан:


Члан:

Члан, ментор:

---

Образац Q4.09.13 - Издање 1



	<b>ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ</b> <b>НИШ</b>
	<b>KEY WORDS DOCUMENTATION</b>

Accession number, <b>ANO</b> :	
Identification number, <b>INO</b> :	
Document type, <b>DT</b> :	monograph
Type of record, <b>TR</b> :	textual / graphic
Contents code, <b>CC</b> :	doctoral dissertation
Author, <b>AU</b> :	Jelena S. Nikolić
Mentor, <b>MN</b> :	Violeta D. Mitić
Title, <b>TI</b> :	Optimization of the soil samples preparations for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by gas chromatography-mass spectrometry
Language of text, <b>LT</b> :	Serbian
Language of abstract, <b>LA</b> :	English
Country of publication, <b>CP</b> :	Serbia
Locality of publication, <b>LP</b> :	Serbia
Publication year, <b>PY</b> :	2018.
Publisher, <b>PB</b> :	author's reprint
Publication place, <b>PP</b> :	Niš, Višegradska 33.
Physical description, <b>PD</b> : (chapters/pages/ref./tables/picture)	8 chapters, 225 pages, 222 references, 36 tables, 58 figures
Scientific field, <b>SF</b> :	Chemistry
Scientific discipline, <b>SD</b> :	Analytical chemistry
Subject/Key words, <b>S/KW</b> :	Polycyclic aromatic hydrocarbons, PAH, optimization, validation, ultrasound extraction, Soxhlet extraction, QuEChERS, gas chromatography, mass spectrometry, heavy metal, PCA, cluster analysis
<b>UC</b>	[543.544.3 + 543.51] : [661.715.7 + 631.42]
Holding data, <b>HD</b> :	library
Note, <b>N</b> :	PhD Research was funded by the Ministry of Education, Science and Technological Development of Republic Serbia, within the project "Natural products of plants and lichens: isolation, identification, biological activity and application" (No. 172047) and "Development of new and

	improvement of the existing electrochemical, spectroscopic and flow injection analysis (FIA) methods for monitoring the quality of the environment (No 172051)".
Abstract, <b>AB:</b>	Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) are pollutants of great concern due to their toxicity. European Commission classified 16 compounds as priority pollutants based on their toxicity, carcinogen potential and occurrence. PAH analysis in soil is of great importance, but due to PAHs low concentrations and low selectivity of organic solvents is challenge. The aim of this dissertation was to optimize extraction (ultrasound, Soxhlet extraction and QuEChERS) and clean up techniques for the extraction of 16 priority PAHs from soil, followed by GC - MS analysis. The best results were obtained by QuEChERS technique using acetonitrile/water (1:2, v/v) as extraction solvent and diatomaceous earth as clean up sorbent. Recovery values varied between 81% for benzo[b]fluoranthene to 109% for benzo[a]pyrene. Proposed QuEChERS technique is accurate and precise, but also cheaper and simpler than other methods used for PAH extraction from soil. Optimized QuEChERS technique was applied for real soil samples analysis from urban area of Niš. The content of total PAHs varied from 0,346 - 48,678 mg kg <sup>-1</sup> . Multivariate statistical analysis enabled grouping of soil samples based on PAH and heavy metal concentrations and soil properties.
Accepted by the Scientific Board	21.09.2016.
Defended on, <b>DE:</b>	
Defended Board, President:	
Member:	
Member:	
Member:	
Member, Mentor:	



*Ekperimentalni deo doktorske disertacije raden je u laboratorijama za Analitičku i Organsku hemiju, na Departmanu za hemiju (Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Nišu), u okviru projekata Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja „Prirodni proizvodi biljaka i lišajeva: izolovanje, identifikacija, biološka aktivnost i primena“, (evidencioni broj OI 172047) i „Razvoj novih i poboljšanje postojećih elektrohemijskih, spektroskopskih i protočnih (FIA) metoda za praćenje kvaliteta životne sredine“ (evidencioni broj OI 172051).*

*Neizmernu zahvalnost dugujem svojoj mentorki, prof. dr Violeti Mitić, na strpljivom i pažljivom usmeravanju u radu i velikoj pomoći i podršci tokom izrade ove disertacije, kao i tokom školovanja.*

*Podjednako se zahvaljujem prof. dr Vesni Stankov Jovanović, koja je nesebično uložila svoje iskustvo, znanje i vreme i angažovala se u svim fazama rada.*

*Drage moje profesorke, od srca vam hvala što ste me primile u svoj istraživački tim, i u mene uložile svoje znanje i životne kvalitete. Vaš entuzijazam i ljubav prema nauci biće mi uzor u daljem radu. Hvala vam na strpljenju, trudu i savetima!*

*Veliko hvala profesorima dr Gordani Stojanović, dr Snežani Nikolić – Mandić, dr Goranu Petroviću i dr Slađani Alagić na korisnim sugestijama koje su doprineli kvalitetnijem istraživanju i oblikovanju ovog rada.*

*Takođe se zahvaljujem dr Jeleni Mutić na pomoći pri određivanju sadržaja teških metala, kao i dr Draganu Cvetkoviću na korisnim savetima.*

*Ogromno HVALA mojoj kolegini i drugarici Mariji Dimitrijević, koja mi je nesebično pomagala i bila velika podrška tokom studiranja i izrade ove disertacije. Hvala ti na pomoći pri tehničkoj obradi disertacije.*

*Svim prijateljima, od detinjstva do danas, i kolegama sa Departmana za hemiju želim da se zahvalim na bezuslovnoj pomoći i podršci u radu.*

*Podrška mojih divnih roditelja, i mog brata bila je neprocenjiva. Vaša bezgranična ljubav i razumevanje doveli su me ovde gde sam danas.*

*Na samom kraju želim da zahvalim mojoj porodici, Aleksandru i Iskri. Hvala vam za ljubav, podršku i neverovatno strpljenje. Hvala vam što ste umeli da me nasmejete i kada nije bilo razloga za smeh. Volim vas beskrajno.*

*Hvala svima koji su verovali u mene!*



# Skraćenice

Acl - Acenaftilen

Acn - Acenaften

ACN - Acetonitril

AID - Automatic interaction detection statistička analiza

Ant - Antracen

ASE - Accelerated Solvent Extraction (Ekstrakcija rastvaračima koji se kreću velikom brzinom)

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry (Agencija za toksične supstance i registar bolesti)

BaA - Benzo[a]antracen

BaP - Benzo[a]piren

BaPDE - Benzo[a]piren-7,8-diol-9,10-epoksid

BbF - Benzo[b]fluoranten

BghiP - Benzo[g,h,i]perilen

BkF - Benzo[k]fluoranten

CDC - Centers for Disease Control and Prevention (Centar za kontrolu i prevenciju bolesti)

CHAID - Chi square automatic interaction detection statistička analiza

Chr - Hrižen

CI - chemical ionization (Hemijska jonizacija)

DAD - Diode array detector (Detektor sa nizom dioda)

DahA - Dibenzo[a,h]antracen

DNK - DezoksiriboNukleinska Kiselina

dSPE - Dispersive solid phase extraction (Ekstrakcija disperznom čvrstom fazom)

EA - Environmental Agency (Agencija za zaštitu životne sredine)

EI - Electron Impact (Elektronski udar)

ELSD - Evaporative light - scattering detektor

EPA - Environmental Protection Agency (Agencija za zaštitu životne sredine)

ESI - Electrospray Ionization (Jonizacija elektrosprejom)

EU - Evropska Unija

FAB - Fast Atom Bombardment (Bombardovanje brzim atomima)

FD&FI - Field Desorption/Ionization (Desorpcija/ionizacija u jakom polju);

FID - Flame Ionization Detector (Plameno jonizacioni detektor)

FLD - Fluorescentni detektor

Flr - Fluoranten

Flu - Fluoren

FMAE - Focused Microwave-Assisted Extraction (Usmerena mikrotalasna ekstrakcija)

GC - MS - Gas chromatography–mass spectrometry (Gasna hromatografija - masena spektrometrija)

GIS - Geografsku Informacionu Sistem analiza

GWRTAC - Ground-Water Remediation Technologies Analysis Center (Centar za remedijaciju podzemnih voda)

HCA - Hierarchical cluster analysis (Hijerarhijska klaster analiza)

HMW - High Molecular Weight

HPLC - High-Performance Liquid Chromatography (Tečna hromatografija visoke efikasnosti)

IARC- International Agency for Research on Cancer (Međunarodna agencija za istraživanje raka)

IcdP - Indeno[1,2,3-cd]piren

ICH- The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (Međunarodna konferencija o usklađivanju tehničkih uslova za registraciju lekova za ljudsku upotrebu)

ICP-OES - Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (Optičko-emisiona spektrometrija sa induktivno kuplovano plazmom)

IS - Internal standard (Unutrašnji standard)

IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry (Međunarodna unija za čistu i primenjenu hemiju)

LC - Liquid Chromatography (Tečna hromatografija)

LMW - Light Molecular Weight

LOD - Limit of Detection (Granica detekcije)

Log  $K_{ow}$  - Vrednost logaritma koeficijenta raspodele u sistemu oktanol-voda

LOQ - Limit of Quantification (Granica kvantifikacije)

m/z - Odnosa mase i naelektrisanja jona

MAE - Microwave-Assisted Extraction (Mikrotalasne ekstrakcija)

MALDI - Matrix Assisted Laser Desorption (Laserska desorpcija sa matriksa)

MS - Mass Spectrometer (Maseni detektor)

MVS - MultiVarijantna Statistička analiza

n.d. - Ispod granice detekcije

n.p. - Vrednost nije pronađena

Nap - naftalen

OECD - Organisation for Economic Co-operation and Development (Organizacija za ekonomsku saradnju i razvoja)

OM - Organic Matter (Organska materija)

PAU - Policiklični Aromatični Ugljovodonici

PC - Principal Component (Glavna komponenta)

PCA - Principal Component Analysis (Analiza glavnih komponenti)

PCB - PolyChlorinated Biphenyl (Polihlorovani bifenili)

PCDD - PolyChlorinated DibenzoDioxins (Polihlorovani dibenzo-*p*-dioksini)

PCDF - PolyChlorinated DibenzoFurans (Polihlorovani dibenzofurani)

PFE - Pressurized Fluid Extraction (Ekstrakcija rastvaračem pod pritiskom)

Phe - fenantren

PLE - Pressurized Liquid Extraction (Tečna ekstrakcija pod visokim pritiskom)

PMAE - Pressurized Microwave-Assisted Extraction (Mikrotalasna ekstrakcija pod pritiskom)

PSA - Primary-secondary amine (Primarni -sekundarni amin)

Pyr - Piren

QuEChERS - Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe

RSD - relativna standardna devijacija

Rt - Retenciono vreme

S - Standardna devijacija

S/N - Odnosa signal/šum bazne linije

$S^2$  - Varijansa

SAX - strong anion-exchange sorbent

SFE - Supercritical Fluid Extraction (Ekstrakcija superkritičnim fluidima)

SFE - Supercritical Fluid Extraction (ekstrakcije superkritičnim fluidima)

SIM - Single Ion Monitoring

SPE - Solid Phase Extraction (Ekstrakcija čvrstom fazom)

SPME - Solid Phase MicroExtraction (Mikroekstrakcija čvrstom fazom)

SRM - Standardni Referentni Materijal

SWE - Subcritical Water Extraction (Ekstrakcija subkritičnom vodom)

TCD - Thermal Conductivity Detector (Termalno provodljivi detektor)

TPP - TriPhenyl Phosphate

Uc - Uncertainty (Merna nesigurnost)

UDP-GA - Uridine DiPhosphate Glucuronic Acid

UGTs - UDP-GlucuronosylTransferase

USDA - United States Department of Agriculture (Ministarstvo poljoprivrede SAD)

UV - Ultra Violet (Ultraljubičasta)

WHO - World Health Organization (Svetska zdravstvena organizacija)

# Sadržaj

## Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Teorijske osnove .....	3
2.1. Policiklični aromatični ugljovodonici .....	3
2.1.1. Opšte osobine.....	3
2.1.2. Fizičko-hemijske osobine policikličnih aromatičnih ugljovodonika .....	7
2.1.3. Mehanizam nastajanja policikličnih aromatičnih ugljovodonika u životnoj sredini.....	9
2.1.4. Prisustvo i rasprostranjenost policikličnih aromatičnih ugljovodonika u životnoj sredini .....	9
2.1.5. Sudbina policikličnih aromatičnih ugljovodonika u životnoj sredini .....	11
2.1.6. Reaktivnost policikličnih aromatičnih ugljovodonika .....	16
2.1.7. Toksičnost policikličnih aromatičnih ugljovodonika.....	16
2.1.8. Metabolizam policikličnih aromatičnih ugljovodonika .....	18
2.3. Zemljište i njegov značaj .....	23
2.3.1. Opšte osobine.....	23
2.3.2. Hemijski sastav zemljišta.....	24
2.3.3. pH zemljišta .....	29
2.4. Analiza policikličnih aromatičnih ugljovodonika .....	31
2.4.1. Uvod.....	31
2.4.2. Prikupljanje i homogenizacija uzoraka zemljišta.....	32
2.4.3. Ekstrakcija PAU iz uzoraka zemljišta.....	35
2.4.4. Prečišćavanje dobijenih ekstrakata .....	43
2.4.5. QuEChERS tehnika.....	46
2.4.6. Instrumentalna analiza .....	51
2.5. Validacija analitičkih metoda.....	57
2.5.1. Specifičnost/selektivnost.....	59
2.5.2. Linearnost .....	60
2.5.3. Opseg metode (radno područje).....	61
2.5.4. Preciznost.....	62
2.5.5. Tačnost (efikasnost) .....	64
2.5.6. Granica detekcije.....	65
2.5.7. Granica kvantifikacije .....	66
2.5.8. Robusnost.....	66
2.5.9. Efekat matrice .....	67
2.5.10. Merna nesigurnost.....	68

## Sadržaj

2.6.	Statistička analiza.....	71
3.	Eksperimentalni deo.....	79
3.1.	Aparati.....	79
3.2.	Rastvori i reagensi.....	79
3.3.	Priprema standardnih rastvora policikličnih aromatičnih ugljovodonika .....	81
3.4.	Priprema model uzoraka zemljišta.....	83
3.5.	Prikupljanje realnih uzoraka zemljišta .....	83
3.6.	Optimizacija ultrazvučne ekstrakcije za analizu PAU iz uzoraka zemljišta .....	85
3.7.	Optimizacija ekstrakcije po Soksletu i prečišćavanja dobijenih ekstrakata .....	85
3.8.	Optimizacija QuEChERS tehnike za ekstrakciju PAU iz uzoraka zemljišta .....	86
3.9.	GC - MS analiza.....	87
3.10.	Analiza sadržaja PAU u uzorcima zemljišta prikupljenog na teritoriji grada.....	89
3.11.	Određivanje teških metala u zemljištu .....	89
3.12.	Određivanje karakteristika zemljišta.....	91
3.12.1.	Određivanje pH.....	91
3.12.2.	Određivanje elektroprovodljivosti .....	91
3.12.3.	Određivanje organskih supstanci .....	91
3.13.	Statistička obrada podataka.....	91
4.	Rezultati i diskusija.....	95
4.2.	Optimizacija i validacija metode ultrazvučne ekstrakcije policikličnih aromatičnih ugljovodonika iz uzoraka zemljišta.....	95
4.2.1.	Optimizacija i validacija metode ultrazvučne ekstrakcije policikličnih aromatičnih ugljovodonika iz zemljišta smešom rastvarača heksan/aceton .....	95
4.2.2.	Optimizacija i validacija metode ultrazvučne ekstrakcije policikličnih aromatičnih ugljovodonika iz zemljišta smešom rastvarača cikloheksan/aceton .....	103
4.3.	Optimizacija i validacija metode ekstrakcije po Soksletu policikličnih aromatičnih ugljovodonika iz uzoraka zemljišta.....	110
4.4.	Optimizacija i validacija QuEChERS tehnike za analizu policikličnih aromatičnih ugljovodonika .....	122
4.4.1.	Optimizacija QuEChERS tehnike pripreme uzoraka zemljišta za GC - MS analizu policikličnih aromatičnih ugljovodonika upotrebom smeše rastvarača acetonitril/voda .....	122
4.4.2.	Optimizacija QuEChERS tehnike pripreme uzoraka zemljišta za analizu policikličnih aromatičnih ugljovodonika upotrebom smeše rastvarača heksan/voda. ....	127
4.4.3.	Optimizacija QuEChERS tehnike pripreme uzoraka zemljišta za analizu policikličnih aromatičnih ugljovodonika upotrebom etil - acetata.....	133
4.4.4.	Optimizacija QuEChERS tehnike pripreme uzoraka zemljišta za analizu policikličnih aromatičnih ugljovodonika upotrebom smeše rastvarača heksan/aceton.....	139



## *Sadržaj*

4.3.5 Parametri validacije metode GS MS analize ekstrakta model uzoraka zemljišta pripremljenih QuEChERS tehnikom upotrebom smeše acetonitril/voda i dijatomejske zemlje kao sorbensa.....	144
4.5. Analiza sadržaja PAU u realnim uzorcima zemljišta.....	148
4.6. Osnovne hemijske karakteristike analiziranog zemljišta .....	160
4.7. Sadržaj metala u uzorcima zemljišta.....	164
4.8. Statistička analiza podataka dobijenih analizom sadržaja PAU, teških metala i osnovnih karakteristika u realnim uzorcima zemljišta .....	170
5. Zaključak.....	186
6. Literatura.....	194
7. Biografija .....	216
8. Bibliografija .....	218



*Uvod*





## 1. Uvod

Sa razvojem civilizacije došlo je do razvoja industrije, a samim tim i do zagađenja životne sredine. Ogromne količine različitih hemijskih jedinjenja svakodnevno se emituju u životnu sredinu. Putem vazduha, zemljišta i vode one dospevaju u hranu, a kroz lanac ishrane i do čoveka. Iako se toksične supstance u ljudskom organizmu obično nalaze u malim količinama, njihova akumulacija i/ili dugotrajna izloženost može biti štetna za ljudski organizam. Toksične supstance se dejstvom raznih parametara u životnoj sredini transformišu, i od njih mogu nastati produkti koji imaju veću toksičnost od polaznih jedinjenja. Zemljište predstavlja značajan izvor kako nutrijenata, tako i potencijalno toksičnih supstanci za biljke. Iz zemljišta toksične supstance isparavanjem mogu dospeti u atmosferu, a raznim fizičko-hemijskim procesima i u vodenu sredinu. Biljke usvajaju zagađujuće supstance iz zemljišta, gde mogu ispoljiti svoje štetno delovanje na biljni organizam, ali još značajnije, upotrebom biljaka u životinjskoj i/ili ljudskoj ishrani mogu narušiti funkcionisanje ovih organizama.

Policiklični aromatični ugljovodonici (PAU), u svojoj strukturi imaju dva ili više kondenzovanih benzenovih prstenova i pripadaju grupi perzistentnih (dugotrajnih) organskih zagađivača. Nastaju usled nepotpunog sagorevanja fosilnih goriva - nafte, uglja, prirodnog gasa, drveta... Postoji preko 100 jedinjenja koja pripadaju ovoj grupi, ali najčešće se proučava njih oko 40. Američka agencija za zaštitu životne sredine i Evropska unija odredile su 16 PAU čije je koncentracije u životnoj sredini neophodno pratiti - naftalen, acenaftilen, acenaften, fluoren, fenantren, antracen, fluoranten, piren, benzo[a]antracen, hrizen, benzo[b]fluoranten, benzo[k]fluoranten, benzo[a]piren, dibenzo[a,h]antracen, benzo[g,h,i]perilen i indeno[1,2,3-cd]piren. Ako se u obzir uzme njihovo toksično, mutageno i kancerogeno delovanje analiza ovih jedinjenja je od velikog značaja. Iako prisutni u svim sferama životne sredine, najveća akumulacija PAU zabeležena je u zemljištu, te je stoga njihova analiza u ovom delu životne sredine od izuzetnog značaja. Organske i neorganske toksične supstance u zemljištu predstavljaju važan indikator zagađenosti životne sredine. Iako u životnu sredinu mogu dospeti iz prirodnih izvora, najveće količine ovih jedinjenja potiču od antropogene aktivnosti. Pored organskih polutanata, kao što su PAU, u analitičkoj hemiji i hemiji životne sredine značajnu ulogu imaju i teški metali, koji pripadaju grupi neorganskih polutanata. Kao i PAU, i teški metali mogu nastati usled sagorevanja fosilnih goriva i pojedinih industrijskih procesa. Kada se nađu u zemljištu PAU i teški metali utiču na kvalitet



zemljišta, interagujući najpre sa enzimima prisutnim u zemljištu, a potom i sa organskom supstancom i mineralima.

Analiza policikličnih aromatičnih ugljovodonika predstavlja složen proces, koji se sastoji iz više koraka. Za svaki tip uzoraka zajedničke su sledeće faze: uzimanje uzorka, ekstrakcija PAU, prečišćavanje dobijenih ekstrakata i analiza PAU. Koraci koji zahtevaju najviše pažnje i najviše vremena su ekstrakcija i prečišćavanje dobijenih ekstrakata. Tokom ekstrakcije neophodno je izdvojiti željeni analit iz složenog matriksa uzorka. U slučaju PAU to se obično postiže smešom slabo polarnih organskih rastvarača. Kako organski rastvarači nisu dovoljno selektivni, iz uzorka se pored željenih PAU ekstrahuju i druga nepolarna jedinjenja. Njihovo razdvajanje obično se postiže prečišćavanjem dobijenih ekstrakata, gde se ko-ekstrahovane nečistoće uklanjaju.

Ova doktorska disertacija daje doprinos razvoju tehnika ekstrakcije i prečišćavanja ekstrakata za analizu 16 policikličnih aromatičnih ugljovodonika u uzorcima zemljišta, s obzirom da najčešće primenjivane tehnike pripreme uzorka zahtevaju dugo vreme rada i/ili skupu opremu. Danas se od analitičara zahteva visoka preciznost i tačnost, uz istovremenu analizu velikog broja uzoraka, sa što manjim troškovima analize. Analitičari se u poslednje vreme okreću novim tehnikama ekstrakcije, od kojih treba izdvojiti QuEChERS (Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe), koja se sastoji iz ekstrakcije pogodnim rastvaračem i prečišćavanja dobijenog ekstrakta ekstrakcijom disperznom čvrstom fazom. Ciljevi ove doktorske disertacije su sledeći:

- Optimizacija ultrazvučne ekstrakcije za analizu PAU u uzorcima zemljišta;
- Ekstrakcija PAU po Soksletu i optimizacija tehnike prečišćavanja dobijenih ekstrakata za analizu PAU u uzorcima zemljišta;
- Optimizacija QuEChERS tehnike primenom različitih kombinacija rastvarača i sorbenasa za analizu PAU u uzorcima zemljišta;
- Validacija optimizovanih tehnika;
- Analiza sadržaja policikličnih aromatičnih ugljovodonika u uzorcima zemljišta sa teritorije grada Niša;
- Analiza sadržaja teških metala i osnovnih karakteristika zemljišta u uzorcima sa teritorije grada Niša;
- Statistička obrada podataka u cilju razumevanja odnosa između pojedinačnih PAU, kao i između sadržaja PAU, metala i osnovnih karakteristika zemljišta.

*Teorijske osnove*







## 2. Teorijske osnove

### 2.1. Policiklični aromatični ugljovodonici

#### 2.1.1. Opšte osobine

Ubrzan razvoj industrije prouzrokovao je značajnu emisiju polutanata u životnu sredinu. Glavni faktor koji utiče na emisiju štetnih supstanci je čovek, koji svojim aktivnostima svakodnevno menja kvalitet celokupnog ekosistema. Organski i neorganski kontaminanti dospevaju u sve sfere životne sredine - vazduh, vodu i zemljište, u biljke i životinje, a kroz lanac ishrane i do čoveka.

Polutanti prisutni u životnoj sredini mogu da se podele na organske i neorganske. Jedna od najznačajnijih grupa organskih polutanata su policiklični aromatični ugljovodonici (PAU, PAH). Policiklični aromatični ugljovodonici su organska jedinjenja koja se sastoje od dva ili više kondenzovanih benzenovih prstenova. PAU obuhvataju grupu od preko 100 jedinjenja (ATSDR, 1995), dok se u životnoj sredini najčešće nalazi njih oko 40.

PAU u svojoj strukturi sadrže od dva (naftalen) do sedam (koronen) benzenovih prstenova. Pored toga što mogu imati različit broj prstenova, oni se razlikuju i po njihovom rasporedu, pa se tako i jedinjenja koja imaju isti broj prstenova mogu značajno razlikovati po osobinama (Lundstedt, 2003). U zavisnosti od broja prstenova, PAU se mogu podeliti na lake (light molecular weight - LMW), koji sadrže dva do tri kondenzovana prstena i teške (high molecular weight - HMW), koji sadrže četiri i više prstenova. Postoji nekoliko načina za imenovanje policikličnih aromatičnih ugljovodonika, a najveću primenu ima trivijalna nomenklatura, Pored trivijalne nomenklature u upotrebi je i nomenklatura koju je ustanovila Međunarodna unija za čistu i primenjenu hemiju (International Union of Pure and Applied Chemistry - IUPAC), koja se zasniva na sledećim pravilima (Ehrenhauser, 2015):

1. Struktura jedinjenja piše se tako da najveći broj prstenova leži u horizontalnom redu;
2. Horizontalna i vertikalna osa povlače se kroz centar horizontalnog reda, a molekul se orijentiše tako da maksimalan broj prstenova, koji ne leže u horizontalnoj ravni, bude u gornjem desnom, a minimalan u donjem levom kvadrantu;

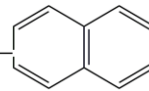
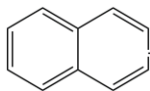
## Teorijske osnove



3. Atomi ugljenika se numerišu u smeru kazaljke na satu, pri čemu se sa numeracijom počinje od ugljenika koji nije deo ni jednog drugog prstena i koji se nalazi na gornjem desnom prstenu, dok se ugljenikovi atomi koji su deo dva ili više prstenova ne numerišu;
4. Veze između dva atoma koji nisu zajednički za dva ili više prstenova, obeležavaju se slovima abecede, pri čemu slovo "a" predstavlja vezu između atoma obeleženih sa 1 i 2;
5. Jedinjenje (ili izomer) koje sadži neki supstituent imenuje se tako što se ispred naziva supstituenta u zagradi napiše odgovarajući broj (slovo) ugljenikovog atoma, kako bi se označilo na kom mestu je došlo do supstitucije.

Američka agencija za zaštitu životne sredine (US EPA) i Evropska unija (EU) sačinile su listu 16 prioriternih PAU, te je praćenje njihovih koncentracija u životnoj sredini od velikog značaja. Lista prioriternih PAU sadrži sledeća jedinjenja: naftalen, acenaftilen, acenaften, fluoren, fenantren, antracen, fluoranten, piren, benzo[a]antracen, hrizen, benzo[b]fluoranten, benzo[k]fluoranten, benzo[a]piren, dibenzo[a,h]antracen, benzo[g,h,i]perilen i indeno[1,2,3-cd]piren (Tabela 1).

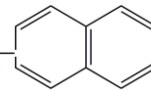
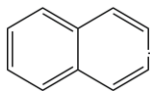
*Teorijske osnove*



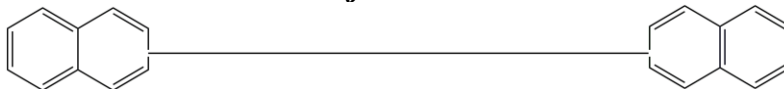
**Tabela 1.** Formule policikličnih aromatičnih ugljovodonika prioriternih za analizu

Naziv	Strukturna formula	Molekulska formula	CAS broj	Molekulska masa
Naftalen		C <sub>10</sub> H <sub>8</sub>	91-20-3	128
Acenaftilen		C <sub>12</sub> H <sub>8</sub>	208-96-8	152
Acenaften		C <sub>12</sub> H <sub>10</sub>	83-82-9	154
Fluoren		C <sub>13</sub> H <sub>10</sub>	86-73-7	166
Fenantren		C <sub>14</sub> H <sub>10</sub>	85-01-8	178
Antracen		C <sub>14</sub> H <sub>10</sub>	120-12-7	178
Fluoranten		C <sub>16</sub> H <sub>10</sub>	206-44-00	202
Piren		C <sub>16</sub> H <sub>10</sub>	129-00-0	202

*Teorijske osnove*



Benzo[a]antracen		$C_{18}H_{12}$	56-55-3	228
Hrizen		$C_{18}H_{12}$	218-01-9	228
Benzo[b]fluoranten		$C_{20}H_{12}$	205-99-2	252
Benzo[k]fluoranten		$C_{20}H_{12}$	207-08-9	252
Benzo[a]piren		$C_{20}H_{12}$	50-32-8	252
Indeno[1,2,3-cd]piren		$C_{22}H_{12}$	193-39-5	276
Dibenzo[a,h]antracen		$C_{22}H_{14}$	53-70-3	278
Benzo[g,h,i]perilen		$C_{22}H_{12}$	191-24-2	276



### 2.1.2. Fizičko-hemijske osobine policikličnih aromatičnih ugljovodonika

Fizičko-hemijske osobine policikličnih aromatičnih ugljovodonika znatno utiču na njihovo ponašanje u životnoj sredini. U zavisnosti od molekulske mase, fizičko-hemijske osobine PAU znatno variraju (*Mac Kay i sar.*, 1992) (Tabela 2). PAU niskih molekulskih masa su manje stabilni, manje lipofilni i lakše rastvorni u vodi u odnosu na PAU visokih molekulskih masa. PAU visokih molekulskih masa su stabilni i štetniji po ljudsko zdravlje od lakih (*Farhadian i sar.*, 2010).

**Tabela 2.** Fizičko-hemijske osobine 16 PAU prioriternih za analizu (*Nollet*, 2005)

PAU	Rastvorljivost (mmol l <sup>-1</sup> )	Tačka topljenja (°C)	Tačka ključanja (°C)	Log K <sub>ow</sub>	Napon pare 25 °C (Pa)
Naftalen	2,4 x 10 <sup>-1</sup>	81	218	3,37	10,9
Acenaftilen	np.	92	265	3,98	n.p.
Acenaften	2,9 x 10 <sup>-2</sup>	96	278	4,07	5,96 x 10 <sup>-1</sup>
Fluoren	1,2 x 10 <sup>-2</sup>	116	295	4,18	8,81 x 10 <sup>-2</sup>
Fenantren	7,2 x 10 <sup>-3</sup>	101	339	4,45	1,8 x 10 <sup>-2</sup>
Antracen	3,7 x 10 <sup>-4</sup>	216	340	4,45	7,5 x 10 <sup>-4</sup>
Fluoranten	1,3 x 10 <sup>-3</sup>	111	375	4,90	2,54 x 10 <sup>-1</sup>
Piren	7,2 x 10 <sup>-4</sup>	156	360	4,88	8,86 x 10 <sup>-4</sup>
Benzo[a]antracen	n.p.	160	435	5,61	7,3 x 10 <sup>-6</sup>
Hrizen	5,7 x 10 <sup>-7</sup>	255	448	5,16	1,3 x 10 <sup>-5</sup>
Benzo[b]fluoranten	n.p.	168	481	6,04	1,2 x 10 <sup>-7</sup>
Benzo[k]fluoranten	n.p.	217	481	6,06	5,5 x 10 <sup>-8</sup>
Benzo[a]piren	8,4 x 10 <sup>-7</sup>	175	495	6,06	1,5 x 10 <sup>-5</sup>
Indeno[1,2,3-cd]piren	n.p.	164	536	6,58	n.p.
Dibenzo[a,h]antracen	3,7 x 10 <sup>-10</sup>	267	524	6,50	0,8 x 10 <sup>-6</sup>
Benzo[g,h,i]perilen	6,0 x 10 <sup>-8</sup>	277	n.p.	6,84	2 x 10 <sup>-5</sup>

Log K<sub>ow</sub> - vrednost logaritma koeficijenta raspodele u sistemu oktanol-voda; n.p. - vrednost nije pronađena

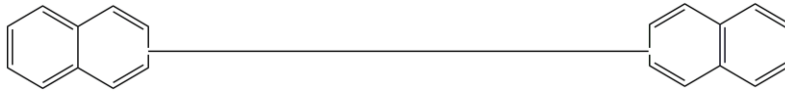
## Teorijske osnove



Policiklični aromatični ugljovodonici su čvrste supstance, bele, bledo zelene ili žute boje, dok neki mogu biti i u vidu zelenih kristala. Imaju visoke tačke ključanja i topljenja, nizak napon pare i slabo su rastvorni u vodi (*Skupinska i sar.*, 2014). Od pomenutih 16 PAU, koji su prioritetni za analizu, naftalen se, u poređenju sa ostalim jedinjenjima, nešto bolje rastvara u vodi. Rastvorljivost u vodi značajno opada sa porastom broja C atoma, odnosno broja kondenzovanih prstenova. Na rastvorljivost ovih jedinjenja u vodi utiče temperatura, pa se tako sa porastom temperature (5-30 °C) rastvorljivost povećava tri do četiri puta. Rastvorene i koloidne organske supstance prisutne u vodi takođe povećavaju rastvorljivost PAU, na taj način što se molekuli PAU ugrađuju u micele (*Neff*, 1979). Supstitucija atoma vodonika u policikličnim aromatičnim ugljovodonicima alkil grupama smanjuje njihovu rastvorljivost. U odnosu na rastvorljivost u vodi, rastvorljivost PAU u nepolarnim organskim rastvaračima i organskim kiselinama je značajna.

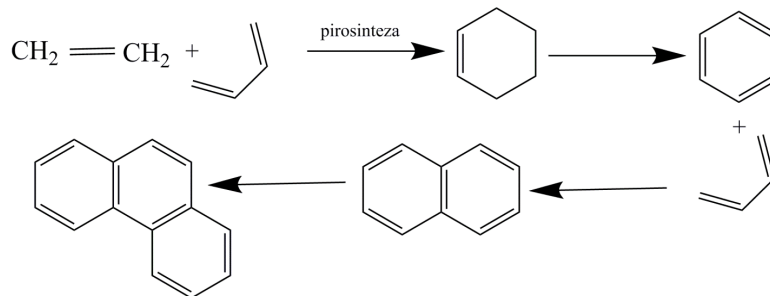
Kao i rastvorljivost, i napon pare opada sa porastom broja ugljenikovih atoma. Napon pare znatno utiče na prisustvo ovih jedinjenja u atmosferi. Jedinjenja manje molekulske mase imaju veći napon pare, pa se smatra da su relativno isparljiva, dok jedinjenja koja imaju veću molekulsku masu manje isparavaju (*Nollet*, 2005).

Koeficijent raspodele u sistemu oktanol-voda ( $K_{ow}$ ) se definiše kao količnik koncentracije jedinjenja u oktanolu i koncentracije jedinjenja rastvorenog u vodi. Ova konstanta ukazuje na sposobnost jedinjenja da se veže za zemljište odnosno organsku materiju zemljišta. Vrednost  $K_{ow}$  je, zapravo, mera hidrofobnosti nekog jedinjenja. Visoka vrednost  $K_{ow}$  ukazuje da jedinjenje ima veću sposobnost vezivanja za zemljište. Policiklični aromatični ugljovodonici se kao nepolarna jedinjenja odlikuju visokim vrednostima  $K_{ow}$  (Tabela 2). Vezivanje PAU za čvrstu fazu, odnosno zemljište se odvija procesima adsorpcije i apsorpcije (*Alexander*, 1994). Apsorpcijom se PAU vezuju za čvrstu fazu putem difuzije i disperzije, dok se adsorpcija najčešće odvija putem elektrostatičkih interakcija. Proces adsorpcije zahteva da privlačne sile naelektrisane površine interaguju sa jonizovanim delovima jedinjenja koje se adsorbuje. S obzirom na to da su policiklični aromatični ugljovodonici nepolarna jedinjenja, oni se za površinu zemljišta najčešće vezuju hidrofobnim interakcijama.



### 2.1.3. Mehanizam nastajanja policikličnih aromatičnih ugljovodonika u životnoj sredini

Policiklični aromatični ugljovodonici mogu nastati nepotpunim sagorevanjem organskih supstanci (*Keith i Telliard, 1979*). Mehanizam formiranja PAU nije sasvim razjašnjen, ali smatra se da podrazumeva procese pirolize i pirosinteze (*Ravindra i sar., 2008*). Tri moguća mehanizma formiranja PAU (*Haynes, 1991*) su Diels-Alderova cikloadicija, reakcije slobodnih radikala i jonske reakcije. Ovi procesi se odvijaju na visokim temperaturama, na kojima najpre dolazi do razgradnje većih molekula na manje fragmente, a nakon toga i njihovih međusobnih reakcija, kada se formiraju policiklični aromatični ugljovodonici (Slika 1) (*Lee i sar., 1981*).



**Slika 1.** Mehanizam nastajanja policikličnih aromatičnih ugljovodonika (*Lee i sar., 1981*)

Policiklični aromatični ugljovodonici su stabilni na visokim temperaturama, pa je tako njihov udeo značajno visok na temperaturama preko 500 °C. Na nižim temperaturama se mogu naći i supstituisani PAU.

### 2.1.4. Prisustvo i rasprostranjenost policikličnih aromatičnih ugljovodonika u životnoj sredini

Policiklični aromatični ugljovodonici u životnoj sredini su posledica kako prirodnih, tako i antropogenih aktivnosti (*WHO, 2003*). Od prirodnih izvora treba izdvojiti šumske požare i vulkanske erupcije kao značajne izvore PAU, premda, izversna količina PAU može nastati i kao posledica biološke aktivnosti biljaka i bakterija.

Izvori policikličnih aromatičnih ugljovodonika mogu se podeliti i na pirogene, petrogene i biološke (*Abdel-Shafy i Mansour, 2016*). PAU nastali pirogenim procesima se formiraju prilikom izlaganja organskih supstanci visokim temperaturama bez prisustva kiseonika ili sa

## Teorijske osnove



vrlo malom količinom kiseonika (destilacija uglja u koks i katran) ili pri termalnom krekovanju proizvoda nafte. Pirogeni procesi se dešavaju na temperaturama između 350 °C i 1200 °C, i češće se odigravaju u urbanim sredinama. Policiklični aromatični ugljovodonici takođe mogu nastati i na nižim temperaturama (100-150 °C), kroz petrogene procese. PAU nastali petrogenim putem potiču iz procesa sazrevanja sirove nafte, koji traju dugi niz godina ili mogu biti posledica izlivanja nafte i goriva u mora, okeane i zemljište. Retko se pominje da PAU mogu nastati i biološkim putem, sintezom u nekim biljkama ili bakterijama, kao i degradacijom organske supstance. Količina PAU nastalih kroz biološke procese znatno je manja u odnosu na količinu PAU nastalih kroz pirogene i petrogene procese.

Iako PAU mogu nastati u značajnim koncentracijama i putem prirodnih procesa, najveća količina ovih jedinjenja ipak nastaje ljudskom aktivnošću.

Antropogeni izvori PAU se mogu podeliti na (*Lee i Vu, 2010*):

1. Industrijske izvore - spaljivanje otpada, proizvodnja koksa i aluminijuma, proizvodnja cementa, procesi prerade nafte, industrija asfalta, proizvodnja gume;
2. Izvori iz domaćinstva - sagorevanje uglja, drveta, nafte i drugih energenata koji se koriste u grejnim sistemima imaju značajan udeo u ukupnoj emisiji PAU u životnu sredinu. Na količinu policikličnih aromatičnih ugljovodonika nastalih ovim putem utiču klima i tip grejanja. Ovaj vid nastajanja PAU ima značajan uticaj na ljudsko zdravlje, s obzirom na to da PAU nastali ovim putem obično ostaju u zatvorenom prostoru. *Zhu i saradnici (2009)* došli su do saznanja da 32,8% PAU u zatvorenom prostoru potiče od kuvanja. Još jedan od značajnih izvora PAU iz domaćinstva je i dim cigareta, pa tako domaćinstva u kojima se puši sadrže znatno veće količine PAU od onih u kojima se cigarete ne konzumiraju.
3. Mobilni izvori emisije - avioni, autobusi, automobili, motocikli predstavljaju najznačajniji izvor zagađenja policikličnim aromatičnim ugljovodonicima u gradovima. Tri su moguća mehanizma formiranja PAU u vozilima:
  - Sinteza iz manjih molekula prisutnih u gorivu;
  - Zaostali PAU u motoru i gorivu;
  - Piroliza ulja (*Baek i sar., 1991*).
4. Poljoprivredni izvori - spaljivanje biomase.



## Teorijske osnove



U manjim količinama PAU se koriste za izradu boja i pigmenata, (*Abdel-Shafy i Mansour*, 2016). Od jedinjenja zastupljenih u industriji treba izdvojiti:

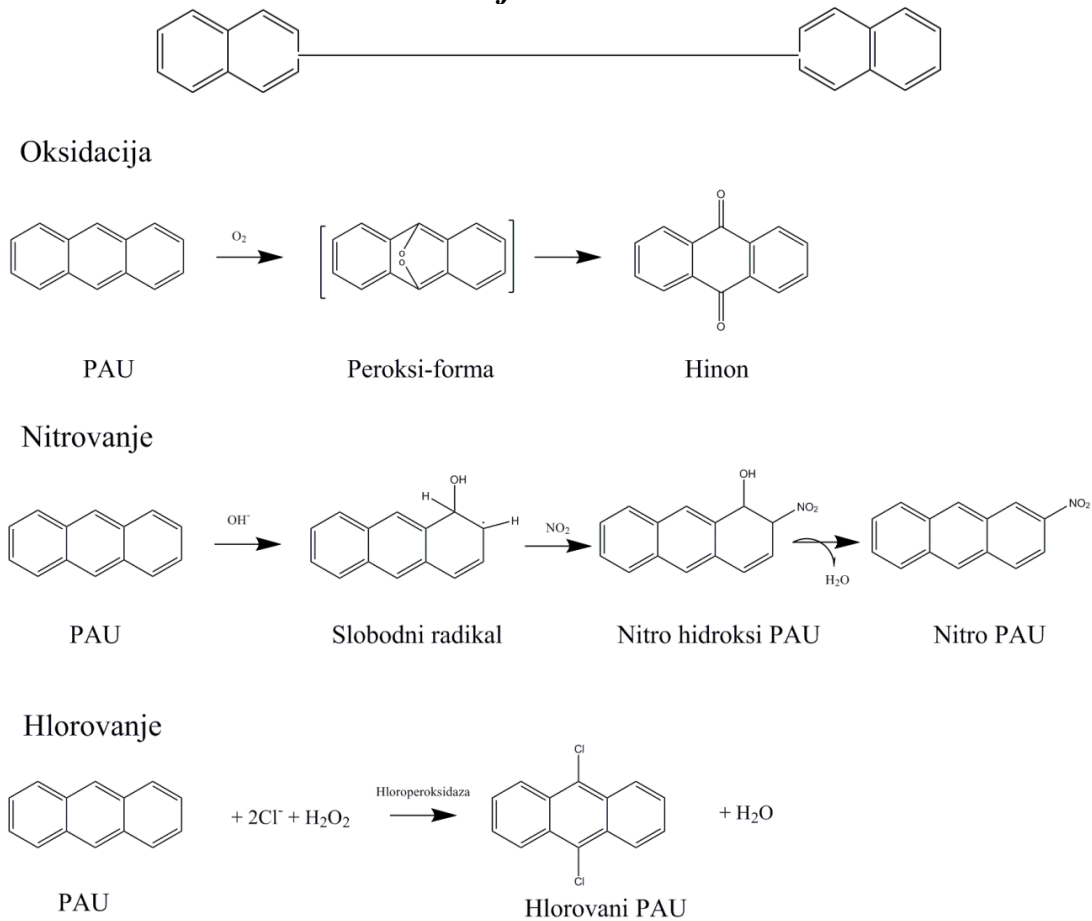
- Acenaften - izrada pigmenata, boja, plastike i pesticida;
- Antracen - rastvarač, izrada boja i pigmenata;
- Fluoranten - izrada hemikalija za poljoprivredu, boja i preparata u farmaceutskoj industriji;
- Fluoren - izrada boja, pigmenata, pesticida i plastike;
- Fenantren - izrada vlakana i pesticida;
- Piren - izrada pigmenata.

### 2.1.5. Sudbina policikličnih aromatičnih ugljovodonika u životnoj sredini

Policiklični aromatični ugljovodonici u životnoj sredini podležu mnoštvu hemijskih i bioloških procesa. Hemijske reakcije u kojima se ova jedinjenja transformišu i razlažu obično su katalizovane Sunčevom svetlošću. Procesi u kojima se PAU transformišu uključuju isparavanje i reakcije oksidacije i nitrovanja, i obično se odigravaju u atmosferi ili vodenoj sredini (*Fu i sar.*, 2012). U kojoj će se meri odigrati njihova transformacija zavisi od karakteristika samih jedinjenja, kao i od karakteristika sredine u kojoj se nalaze.

Najveći deo procesa u kojima PAU učestvuju odigrava se u atmosferi, gde oni mogu biti u gasovitoj fazi ili adsorbovani na površini čestica. Na reaktivnost PAU pored njihovih karakteristika, utiče i priroda čestica za koje su vezani, vrsta gasova prisutnih u atmosferi i količina Sunčeve svetlosti. Glavni putevi transformacije PAU u atmosferi su procesi oksidacije (indukovane ozonom) i hidroksilacije. Na Slici 2. prikazane su glavne reakcije transformacije PAU u atmosferi (*Manzetti*, 2003).

## Teorijske osnove



**Slika 2.** Procesi transformacije PAU u atmosferi (*Manzetti, 2003*)

Oksidacija PAU u atmosferi najčešće se odigrava uz pomoć Sunčeve svetlosti, u prisustvu molekula kiseonika u ekscitovanom obliku (*Nagpal, 1993*). Oksidacija se može odvijati i u prisustvu nekih drugih oksidanasa kao što su ozon ili hidroksilni radikali. PAU koji se nalaze na česticama lakše stupaju u reakcije oksidacije u odnosu na one koji se nalaze u gasnoj fazi atmosfere (*Fasnacht i Blough, 2003*). Nitro derivati policikličnih aromatičnih ugljovodonika nastaju u interakciji sa oksidima azota i azotnom kiselinom prisutnom u atmosferi. Pored toga, nitro PAU mogu nastati i u reakcijama sagorevanja (*Karavalakis i sar., 2011*), prilikom čega nastaju dinitro jedinjenja, kao što su 1,3-, 1,6- i 1,8-dinitro piren i mononitro PAU, za koje je dokazano da izazivaju astmu, alergije i rak pluća (*Nakagawa i sar., 1983*). Nitrovanje PAU odvija se mehanizmom elektrofilne aromatične supstitucije, a brzina ovog procesa zavisi od reakcionog medijuma i strukture jedinjenja, kao i njihovog oksidacionog i jonizacionog potencijala (*Pysh i Yang, 1963*). Prilikom nitrovanja PAU najčešće dolazi do formiranja katjon radikala, koji može da stupi u različite reakcije, pa vrlo često nitro PAU nisu glavni proizvod koji nastaje ovim reakcijama.

## Teorijske osnove



Dokazano je da oksid PAU, nastali u reakcijama oksidacije, mogu biti prekursori prilikom formiranja izrazito toksičnih polihlorovanih bifenila (PCB), polihlorovanih dibenzofurana (PCDF) i polihlorovanih dibenzo-*p*-dioksina (PCDD) (Hajizadehi sar., 2011).

Iz dosadašnjih istraživanja o ponašanju policikličnih aromatičnih ugljovodonika u životnoj sredini može se zaključiti sledeće:

1. Sa povećanjem molekula raste njegova sposobnost da apsorbuje svetlost, a samim tim i njegova reaktivnost;
2. Sa porastom aromatičnosti PAU postaju stabilniji;
3. Što je veći broj dvostrukih veza u molekulu brža je transformacija PAU u oksid i nitro derivate.

PAU u vodenu sredinu dospevaju iz atmosfere, usled atmosferske depozicije, kao i spiranjem sa zemljišta i vegetacije. S obzirom na to da su slabo rastvorni u vodi, obično se nalaze u sedimentima ili vodama koje su zagađene mastima i uljima. Koliko će se ova jedinjenja zadržati u vodenoj sredini, zavisi od stepena volatilizacije, pa tako PAU koji imaju manje molekulske mase lakše isparavaju i brže napuštaju vodenu sredinu, što se može zaključiti na osnovu napona pare pojedinačnih jedinjenja (Tabela 2). Jedinjenja veće molekulske mase koja teže isparavaju iz vodene sredine podležu procesima fotooksidacije i na taj način se razlažu. U procesima fotooksidacije obično nastaju proizvodi koji su toksičniji u odnosu na polazna jedinjenja. Još jedan od načina degradacije PAU u vodenoj sredini je i biodegradacija, uz pomoć različitih mikroorganizama prisutnih u vodi. Biodegradacija PAU u vodenoj sredini zavisi od uslova sredine, kao što su količina prisutnih nutrijenata, broj i vrsta mikroorganizama, kao i hemijska priroda jedinjenja koje podleže degradaciji (Ghosal i sar., 2016).

Policiklični aromatični ugljovodonici u zemljište dospevaju putem atmosferske depozicije, izlivanja vode ili odlaganja industrijskog otpada (Neff, 1979). U odnosu na vodenu sredinu, koncentracija PAU u obližnjem zemljištu može biti i do 1000 puta veća (Notar i sar., 2001). Kada dospeju u zemljište, ova jedinjenja podležu procesima isparavanja, ireverzibilne sorpcije, oticanja u vodenu sredinu i degradacije. Uzevši sve ovo u obzir, zemljište se može smatrati značajnim izvorom policikličnih aromatičnih ugljovodonika. Mobilnost ovih jedinjenja znatno utiče na njihovu biodostupnost, pa se tako sa povećanjem  $K_{ow}$  (povećanjem molekulske mase) smanjuje biodostupnost PAU (Brenner i sar., 2002). To znači da PAU manje molekulske mase imaju veću biodostupnost od PAU veće molekulske mase. S druge

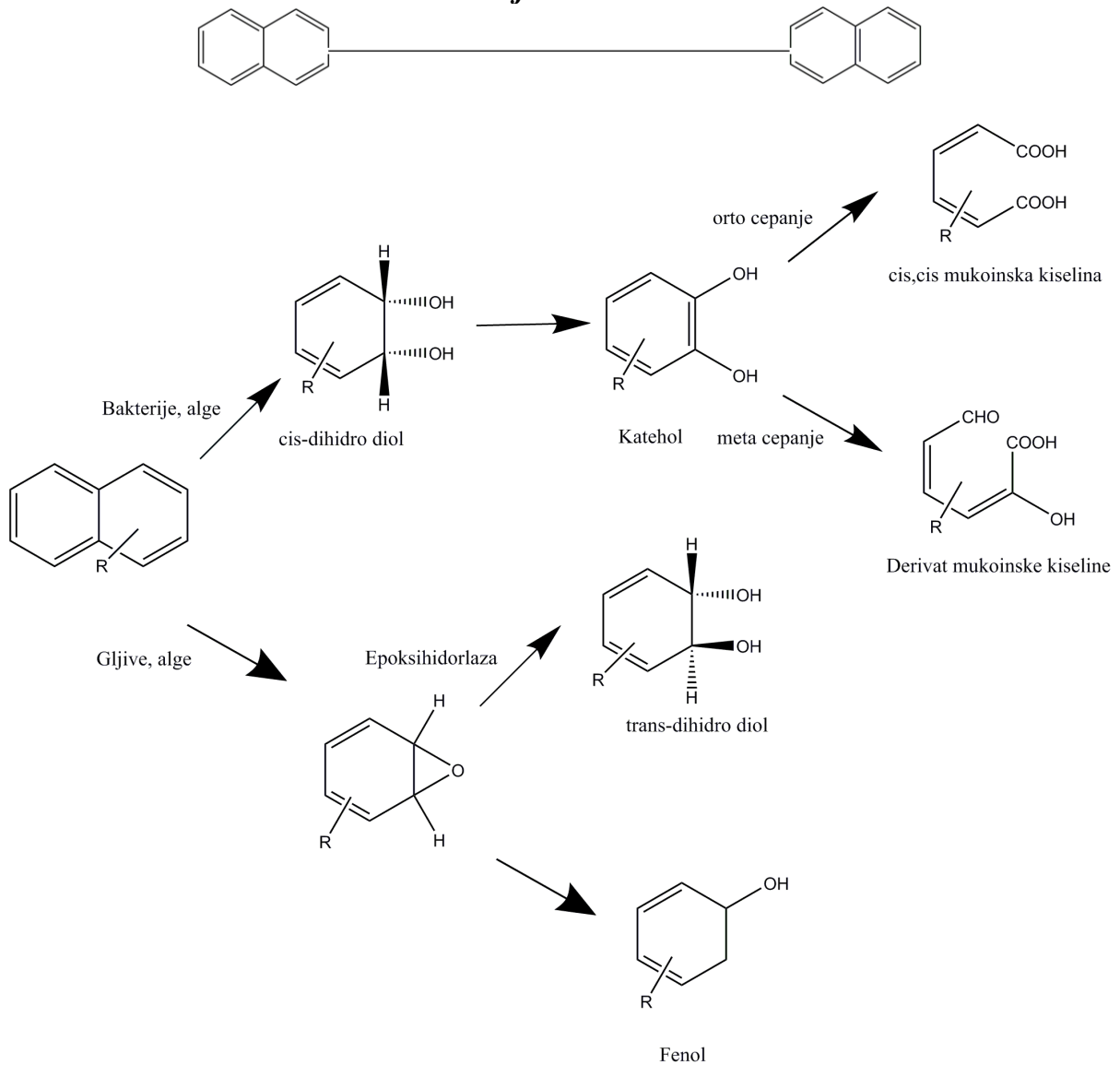
## Teorijske osnove



strane, policiklični aromatični ugljovodonici pirogenog porekla imaju manju biodostupnost u odnosu na one petrogenog, što je posledica adsorpcije PAU pirogenog porekla na proizvodima sagorevanja (*Gustafsson i sar., 1997*). Policiklični aromatični ugljovodonici prisutni u zemljištu podležu raznim procesima transformacije. Procesu fotooksidacije u zemljištu podležu samo PAU koji se nalaze u površinskom sloju, tako da ovaj proces ne doprinosi degradaciji PAU u zemljištu u velikoj meri. Na povišenoj temperaturi iz zemljišta mogu biti uklonjeni isparavanjem, nakon čega dospevaju u vazduh i migriraju u krajeve sa nižim temperaturama, gde se zadržavaju (*Watts i sar., 2008*). Teški PAU se jako vezuju za zemljišnu organsku supstancu, dok laki mogu migrirati kroz zemljište, pa je njihovo oticanje iz zemljišta proces koji nema veliki doprinos uklanjanju ovih jedinjenja. Zabrinjavajuć je visok stepen migriranja oksidativnih derivata PAU nastalih u procesima transformacije u atmosferi ako se u obzir uzme njihova toksičnost i kancerogeni potencijal. (*Bandowe i sar., 2011*). Glavni proces koji je vezan za policiklične aromatične ugljovodonike u zemljištu je sorpcija. Sadržaj organskih supstanci (organic matter - OM), sastav, struktura i prisustvo gline znatno utiču na proces sorpcije. PAU se vezuju za čestice veličine do 50 µm koje sadrže organske supstance. Istraživanja su pokazala da se naftalen vezuje za organsku supstancu u zemljištu hidrofobnim interakcijama sa aromatičnim fragmentima huminskih i fulvinskih kiselina (*Vasilkonov i sar., 2008*). Organska supstanca ima najveći značaj za vezivanje PAU u zemljištu, pa tako u zemljištima u kojima je procenat OM veći od 8% ona jedina učestvuje u vezivanju PAU u zemljištu, a ukoliko je procenat OM u zemljištu manji od 6%, u vezivanju PAU pored OM učestvuju i gline (*Hwang i sar., 2003a*).

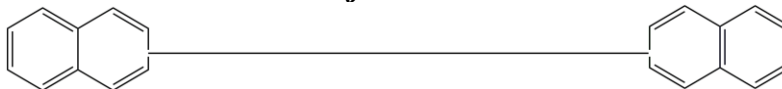
Degradacija PAU u zemljištu se odigrava uz pomoć prisutnih mikroorganizama. Razlaganjem ovih jedinjenja mikroorganizmi dobijaju ugljenik i energiju (*Johnsen i Karlson, 2007*). U procesu razgradnje PAU u zemljištu učestvuju bakterije, gljive i alge. Bakterije luče dioksidogenu, koja favorizuje oksidaciju nesupstituisanih PAU uz formiranje alifatičnih grupa. Bakterijski indukovana oksidacija se može odigrati kako u aromatičnom prstenu, tako i na ugljeniku za koji je vezan hetero atom ili u petočlanom prstenu. Gljive uz pomoć enzima monooksigenaza transformišu PAU u aromatične okside, koji nakon izomerizacije prelaze u fenolna jedinjenja. Alge u degradaciji PAU učestvuju najčešće u vodenoj sredini, formirajući policiklične fenole. *Labana i saradnici* (2007) su predstavili opštu šemu degradacije PAU u životnoj sredini (Slika 3).

## Teorijske osnove



**Slika 3.** Metabolizam PAU u prisustvu bakterija, gljiva i algi (*Labana i sar.*, 2007)

Jedinjenja sa dva ili tri prstena lakše podležu degradaciji od jedinjenja koja sadrže više prstenova, što je slučaj i sa supstituisanim PAU, koji lakše podležu degradaciji od nesupstituisanih jedinjenja. Od velikog značaja za degradaciju ovih jedinjenja u zemljištu su i uslovi sredine u kojima se nalaze. Degradacija je verovatnija u kiselim zemljištima pri oksidacionim uslovima u aerobnoj sredini. Neka istraživanja su pokazala da i temperatura značajno utiče na proces degradacije PAU u zemljištu. Dokazano je da se 84% PAU prisutnih u zemljištu razloži za 49 dana na temperaturi 42 °C, dok se oko 50% njih razgradi za isto vreme na temperaturi od 21 °C (*Iqbal i sar.*, 2007). Razgradnju PAU u zemljištu favorizuju i biljke, koje potpomažu razvoj mikroorganizama. Određeni proizvodi degradacije ovih jedinjenja predstavljaju prekursore u formiranju huminskih kiselina. Tokom biodegradacije



PAU se oksiduju i nastaju njihovi fenolni derivati koji imaju sličnosti sa molekulima huminskih kiselina.

### **2.1.6. Reaktivnost policikličnih aromatičnih ugljovodonika**

Sa hemijske tačke gledišta, policiklični aromatični ugljovodonici se smatraju slabo reaktivnim jedinjenjima i u reakcijama se obično transformišu u druge aromatične ugljovodonike. Reakcije karakteristične za ova jedinjenja su reakcije elektrofilne supstitucije, mada nekada mogu učestvovati i u reakcijama adicije, što obično zahteva veliku količinu energije. Distribucija elektrona u samom molekulu određuje reaktivna mesta (*Lee i sar.*, 1981), pa je tako kod naftalena verovatnije da će do supstitucije doći u poziciji 1 nego u poziciji 2, dok antracen i fenantren najčešće reaguju u poziciji 9 i 10, a fluoren u poziciji 9 (*Lundstedt*, 2003).

### **2.1.7. Toksičnost policikličnih aromatičnih ugljovodonika**

Policiklični aromatični ugljovodonici su jedni od prvih polutanata koji su okarakterisani kao izuzetno toksični i potencijalno kancerogeni. Prema Agenciji za zaštitu životne sredine (Environmental protection agency - EPA), benzo[a]piren je svrstan u red opasnih polutanata, s obzirom na njegov kancerogeni potencijal. Većina PAU svrstava se u toksične supstance, sa mogućim kancerogenim, mutagenim i teratogenim delovanjem (*ATSDR*, 2009). S obzirom na ove osobine, PAU su postali predmet velikog broja istraživanja (*Alagic i sar.*, 2017; *Kao i sar.*, 2014; *Sadowska-Rociek i sar.*, 2014; *Guerin i sar.*, 1999; *Sun i sar.*, 1998; *Menzie i sar.*, 1992).

Nakon akutnog izlaganja PAU, mogu se uočiti glavobolja, vrtoglavica, kašalj, iritirana koža, simptomi slični onima koji se mogu javiti i prilikom izlaganju drugim supstancama. Hronično izlaganje policikličnim aromatičnim ugljovodonicima dovodi do hroničnog bronhitisa, dermatitisa, crvenila, opekotina, iritacije očiju, kašlja, leukoplakije, raka usne duplje, leukemije i raka bubrega i bešike. Kancerogeni potencijal PAU potvrđen je ispitivanjima na laboratorijskim životinjama. Postoje indicije da izazivaju rak kože, pluća, bešike, jetre i creva. Neke studije takođe su potvrdile dejstvo na vaskularni, imuni i nervni sistem (*Dasgupta i Lahiri* 1992, *Szczeklik i sar.*, 1994, *Zhao* 1990). Ipak, u kliničkim studijama teško je utvrditi dejstvo pojedinačnih PAU, zato što se u istraživanjima najčešće koriste smeše ovih jedinjenja. Sigurno je da pojedina zanimanja nose sa sobom povećani rizik od izlaganja

## Teorijske osnove



PAU. Ugroženim kategorijama se smatraju radnici u proizvodnji aluminijuma, aktivnog uglja, katrana, prerade nafte i slično. Prema IARC (Internacionalna agencija za za istraživanje raka) (1983, 2010) većina PAU smatra se za kancerogene, ali najveći kancerogeni potencijal pokazuje benzo[a]piren, koji je svrstan u Grupu 1 kao dokazani kancerogen (IARC, 2010). Pored benzo[a]pirena, naftalen, hrizen, benzo[b]fluoranten, benzo[k]fluoranten, dibenzo[a,h]antracen, dibenzo[a,e]piren i dibenzo[a,l]piren dokazani su kancerogeni u ispitivanjima na eksperimentalnim životinjama. Sa povećanjem molarne mase raste i kancerogenost PAU, dok se akutna toksičnost smanjuje (Ravindra i sar., 2008).

Za markere emisije PAU koriste se benzo[a]piren, fluoranten i benzo[b]fluoranten (Dybing i sar., 2013). Boström i saradnici (2002) su predložili benzo[a]piren, fluoranten, fenantren, metilantracen/fenantren, piren, benzo[b]fluoranten, benzo[k]fluoranten, indeno[1,2,3-cd]piren, benzo[g,h,i]perilen, dibenzo[a]antracen, i dibenzo[a,l]piren kao marker jedinjenja za emisiju i praćenje zagađenja vazduha. S obzirom na svoju toksičnost i kancerogeni potencijal, benzo[a]piren je označen kao marker jedinjenje za izloženost ljudi policikličnim aromatičnim ugljovodonicima (Dybing i sar., 2013). U većini studija ukupna izloženost policikličnim aromatičnim ugljovodonicima se predstavlja preko toksičnog ekvivalenta benzo[a]pirena. Ovaj način izražavanja zasniva se na merenju koncentracije pojedinačnih PAU i povezuju se sa benzo[a]pirenom na osnovu podataka o kancerogenosti. Na primer, hrizen poseduje 1/1000 kancerogenosti benzo[a]pirena i ekvivalentnu toksičnu koncentraciju koja iznosi 0,001. Nova istraživanja ukazuju da je kancerogeni potencijal dibenzo[a,h]antracena do 10 puta veći od benzo[a]pirena (Cincinelli i sar., 2007). Ova izračunavanja su značajna kako bi se odredio rizik po ljudsko zdravlje, kao i za izračunavanje postepenog dugoročnog rizika od raka. U *in vitro* uslovima, većina PAU je slabo ili ni malo mutagena, međutim njihovi metaboliti imaju potencijalno mutageno delovanje. Mutageni efekat PAU dokazan je *in vivo* eksperimentima na životinjama, kao i u *in vitro* uslovima u ljudskim ćelijama. Mutageno delovanje PAU ispoljavaju nakon aktivacije mikrozomalnim enzimima jetre (Teranishi i sar., 1975). Međutim, naknadno je dokazano da su pored enzima prisutnih u jetri za mutageno delovanje PAU odgovorni i enzimi prisutni u drugim organima (Weekes i Brusick, 1975). Metaboliti PAU reaguju sa dezoksiribonukleinskom kiselinom (DNK) i na taj način je oštećuju. Mehanizam mutagenog delovanja PAU proučavan je kroz metabolizam benzo[a]pirena i benzo[a]piren-7,8-diol-9,10-epoksida (BaPDE) (Tarantini i sar., 2009). Benzo[a]piren i BaPDE se obično vezuju amino grupe purinskih baza nukleinskih kiselina. Nakon vezivanja



dolazi do transverzije, gde se pirimidinski nukleotid zamenjuje purinskim. Proces zamene pirimidinskih nukleotida purinskim nazivaju se G>T transverzije, iz razloga što najčešće dolazi do zamene timina guaninom. Slični procesi zabeleženi su i u *in vitro* istraživanjima u kojima su korišćene ljudske ćelije (Yang i sar., 1999), kao i u *in vivo* studijama sprovedenim na laboratorijskim životinjama (Miller i sar., 2000).

Teratogeno delovanje policikličnih aromatičnih ugljovodonika zabeleženo je kod eksperimentalnih životinja izloženih benzo[a]antracenu, benzo[a]pirenu i naftalenu (Wassenberg i Di Giulio, 2004). Istraživanja sprovedena na laboratorijskim životinjama dokazala su da ingestijom većih količina benzo[a]pirena tokom trudnoće dolazi do oštećenja ploda (Kristenseni sar., 1995). Iako ovakvo delovanje PAU na ljudima nije dokazano, sumnja se da je usled izlaganja trudnica policikličnim aromatičnim ugljovodonicima moguća pojava deformiteta kod dece i prevremenog porođaja.

#### **2.1.8. Metabolizam policikličnih aromatičnih ugljovodonika**

Nakon što uđu u ljudski organizam, policiklični aromatični ugljovodonici se metabolišu i izlučuju putem urina ili se zadržavaju u mleku i masnom tkivu. Metabolizam PAU u ljudskom organizmu nije dovoljno proučavan, međutim postoji jako puno podataka o apsorpciji, distribuciji i eliminaciji ovih jedinjenja u organizmu eksperimentalnih životinja. Jedan od najviše proučavanih PAU je piren i njegov metabolit 1-hidroksipiren, koji se iz organizma izlučuje urinom (Popp, 1997; Santella i sar., 1993, CDC, 2005).

Dejstvo policikličnih aromatičnih ugljovodonika na ljudski organizam odigrava se u više faza (ATSDR, 2009):

1. Apsorpcija;
2. Distribucija;
3. Metabolizam;
4. Eliminacija.

**Apsorpcija** se najčešće odigrava putem pluća i respiratornog trakta (udisanjem vazduha koji sadrži izvesne količine PAU), gastro – intestinalnog trakta (konzumiranjem kontaminirane hrane i/ili vode) ili kože (neposrednim kontaktom).

**Distribucija** policikličnih aromatičnih ugljovodonika u ljudskom organizmu je posledica njihove lipofilnosti. Zbog toga, ova jedinjenja i ako mogu biti prisutna u svim sistemima



## Teorijske osnove



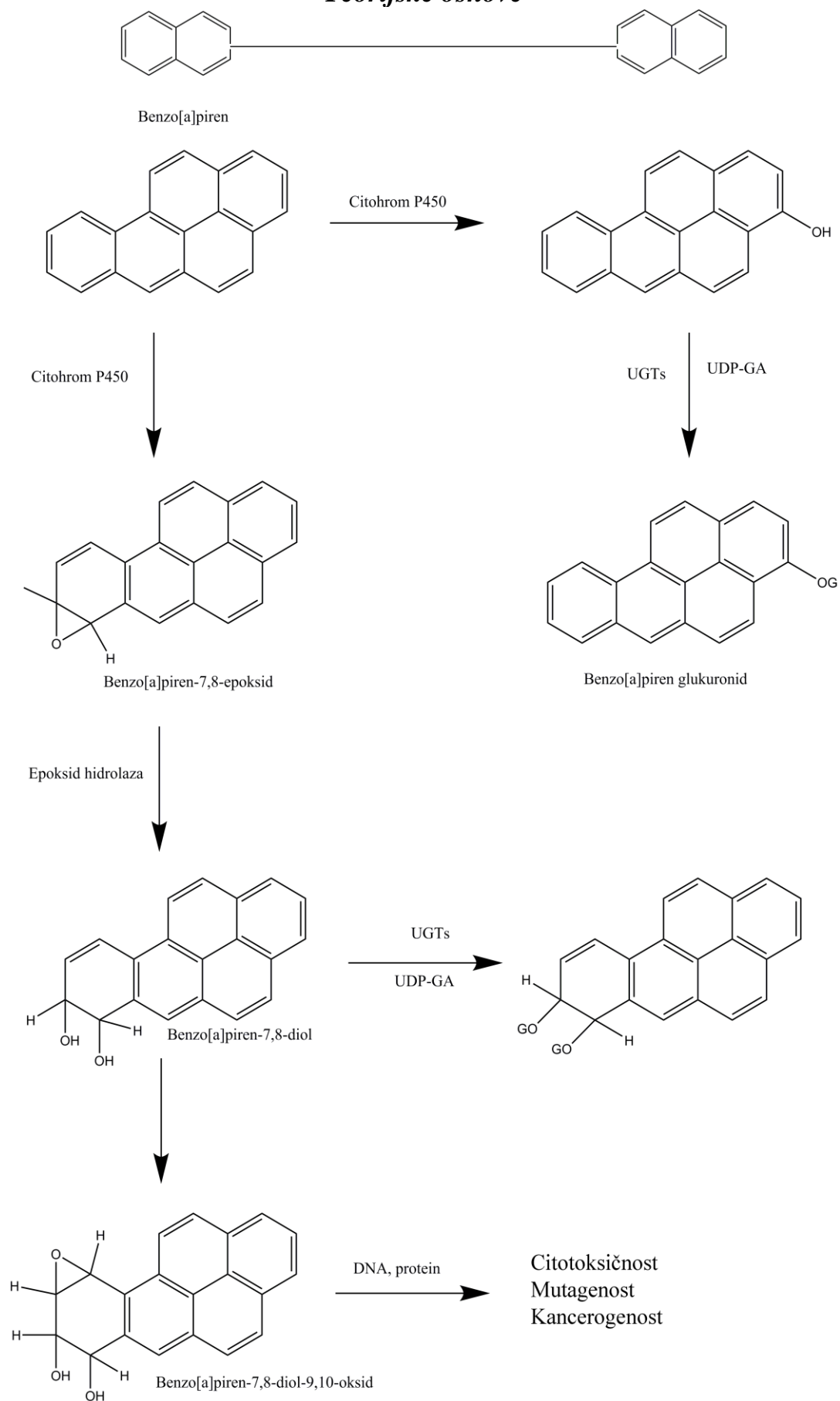
organa, najčešće se zadržavaju u masnim tkivima, majčinom mleku i pojedinim delovima gastrointestinalnog trakta.

**Metabolizam** PAU se odigrava sa ciljem njihove ekskrecije iz organizma, prevodenjem u polarnije metabolite, putem CYP enzimskog sistema (citohrom P-450), koji obuhvata mnoštvo enzima odgovornih za katalizu oksidacije organskih supstanci. Metabolizam PAU odvija se u dve faze (*Surh i sar.*, 1996):

- Faza 1 podrazumeva reakcije oksidacije PAU katalizovane enzimom citohrom P-450 i reakcije hidrosilacije katalizovane epoksid hidrolazama;
- Faza 2 podrazumeva složene reakcije konjugacije koje dodatno povećavaju rastvorljivost metabolita PAU.

Glavni derivati u metabolizmu PAU su epoksidi, kao proizvodi koji nastaju oksidacijom dvostruke veze u aromatičnim jedinjenjima. Ova jedinjenja su jako reaktivna i pomoću prisutnih enzima se dalje transformišu u jedinjenja kao što su dioli i fenoli (*Glatt i Oesch*, 1987). Najveći broj enzima odgovornih za transformaciju PAU se nalazi u jetri, plućima, koži i bubrezima. Međutim, nije zanemarljiv ni broj enzima prisutnih u nosu, mlečnim žlezdama, slezini, mozgu, eritrocitima, placenti i materici. Glavni enzim odgovoran za metabolizam PAU je citohrom P-450 monooksigenaza i epoksid hidrolaza. Jedan od najviše proučavanih je metabolizam benzo[a]pirena, koji započinje reakcijama epoksidacije (*IARC*, 1983) (Slika 4).

## Teorijske osnove



Slika 4. Metabolizam benzo[a]pirena (IARC, 1983)

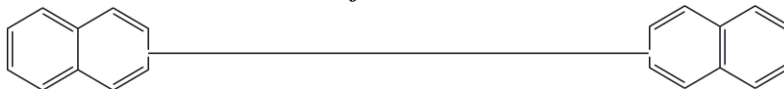
## Teorijske osnove



Epoksid koji se dobija u prvom koraku je 7,8-epoksid, koji se pod dejstvom epoksidnih hidrolaza transformiše u odgovarajuće stereoizomerne diole. Odvijanje ovih reakcija zavisi od stabilnosti epoksida, kao i od prisustva enzima na reakcionom mestu. Dioli nastali u ovom koraku dalje se mogu oksidovati do 7,8-dihidrodiola-9,10-epoksida, a terminacija se vrši pomoću enzima citohrom P-450. Dobijeni diol-epoksid se može javiti u četiri različita stereoizomerna oblika od kojih su neki kancerogeni. Epoksidi dobijeni u ovom koraku dalje se transformišu u konjugaciji sa glutationom, posredstvom enzima glutation-transferaze. Neizreagovali epoksidi se dalje mogu konvertovati u fenolna i diolna jedinjenja. Metaboliti nastali na ovaj način su nedovoljno rastvorni i kao takvi ne mogu da se adekvatno izlučuju iz organizma, pa dolazi do njihove akumulacije u organizmu ili do reakcije sa glukuronskom ili sumpornom kiselinom (Höner, 2001), kako bi se pospešilo njihovo izlučivanje iz organizma. PAU takođe mogu biti podvrgnuti reakcijama oksidacije i hidroksilacije, pri čemu se mogu dobiti različiti derivati (Lundstedt, 2003).

**Eliminacija** policikličnih aromatičnih ugljovodonika iz organizma odigrava se putem urina i fecesa.





## 2.3. Zemljište i njegov značaj

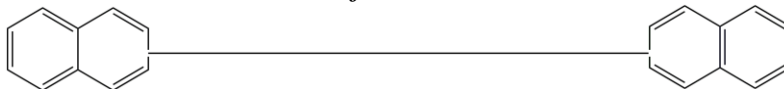
### 2.3.1. Opšte osobine

Zemljište se definiše kao „gornji sloj Zemljine kore koji je obrazovan od mineralnih čestica, organskih supstance, vode, vazduha i živih organizama“ (*European Commission, 2006*). Njihova kombinacija određuje osobine zemljišta: teksturu, strukturu, poroznost, boju i hemijske osobine. Zemljište predstavlja jedan složen i ranjiv sistem. Kako je formiranje zemljišta dugotrajan proces, ono se može smatrati teško obnovljivim izvorom. Kao spona između vazduha i vode, zemljište ima jako važne funkcije: proizvodnju hrane i biomase, skladištenje, filtraciju i transformaciju različitih supstanci, uključujući vodu, ugljenik i azot. Zemljište služi kao stanište za mnoge organizme, kao platforma za ljudsku aktivnost i izvor različitih materijala. Sadrži dvostruko veće količine ugljenika nego atmosfera, od čega većina potiče od vegetacije. Ove osobine zemljište čine jako značajnim sa sociološkog, ekonomskog i ekološkog aspekta. Međutim, u poslednje vreme zemljište sve više biva ugroženo, kako u Srbiji, tako i na globalnom nivou. Erozijske, salinizacione, zagađujuće, gubitak organske supstance su procesi koji se svakodnevno odigravaju u zemljištu. Ovi procesi imaju negativan uticaj na ekosisteme, klimu, ljudsko zdravlje i ekonomiju.

**Tekstura zemljišta** određena je veličinom čestica i zavisi od odnosa čestica peska, gline, mulja i organske supstance. Usled toga, tekstura zemljišta utiče na proces drenaže, odnosno u kojoj meri će se u zemljištu zadržati voda. Čestice peska su velike, pa su i pore između njih velike, što olakšava prolaz vazduha i vode kroz ovakva zemljišta, dok su čestice gline manje od 0,002 mm u prečniku, pa prolazak vode kroz ovakva zemljišta zahteva duži vremenski period.

**Struktura zemljišta** određena je načinom povezivanja čestica peska, gline i mulja. Na strukturu zemljišta utiču organska materija i živi organizmi prisutni u zemljištu. Ova osobina zemljišta utiče na rast biljaka, kretanje vode i vazduha kroz zemljište, i dostupnost nutrijenata biljkama.

**Poroznost zemljišta** predstavlja rastojanje između čestica u zemljištu. Ova osobina zemljišta utiče na kretanje vode i gasova kroz zemljište. Poroznost zemljišta zavisi od rasporeda čestica u zemljištu i njihove veličine. Može se podeliti na kapilarnu i nekapilarnu. Nekapilarna



poroznost predstavlja krupne šupljine i pukotine u zemljištu koje mogu biti različitog porekla: organskog ili hemijskog. Kapilarne pukotine ili pore javljaju se u sredinama gde veličina pora nije veća od 0,25 mm.

**Boja zemljišta** određena je hemijskim i mehaničkim sastavom zemljišta kao i njegovom vlažnošću. Tri osnovne boje koje preovlađuju u zemljištu su crna, crvena i bela. Od prisutnih hemijskih jedinjenja umnogome zavisi kakvu će boju zemljište imati:

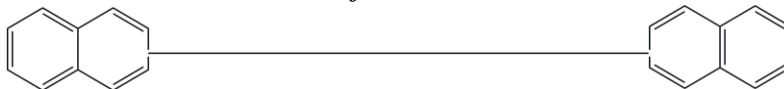
- Huminske supstance daju tamno-sivu, sivo-smeđu i crnu boju;
- Oksidi i hidroksidi gvožđa daju zemljištu crvenu, smeđu i žutu boju;
- Kvarc daje zemljištu belu i svetlo-sivu boju;
- Fero jedinjenja daju plavu i zelenu boju.

### 2.3.2. Hemijski sastav zemljišta

Zemljište predstavlja polidisperzni sistem koji se sastoji iz čvrste, tečne i gasovite faze. Sadrži organske i mineralne supstance, zemljišni rastvor i zemljišni vazduh. Mineralne supstance prisutne u zemljištu su čestice različite veličine određenog hemijskog i petrografskog sastava. Humus i mikroorganizmi prisutni u zemljištu predstavljaju organsku supstancu zemljišta. Zemljišna voda se sastoji od vode i u njoj rastvorenih organskih i mineralnih supstanci, dok zemljišni vazduh predstavlja smešu prisutnih gasova (*Frank i Tölgyessy, 1993*).

Mineralne supstance zemljišta čini 95 do 99% zemljišta (*Frank i Tölgyessy, 1993*) i sastoji se iz mnogo elemenata, ali samo njih osam je prisutno više od 1%: O (46,6%), Si (27,7%), Al (8,1%), Fe (5,0%), Ca (3,7%), Na (2,8%), K (2,6%), Mg (2,1%).

**Mineralne supstance** u zemljištu, i odgovorne su za snabdevanje biljaka elementima kao što su Ca, K, Mg i P. Iako postoji mnoštvo minerala u zemljištu, najzastupljeniji su silikati, dok su karbonati, sulfati, fosfati i sulfidi manje zastupljeni. U Zemljinoj kori silikati čine 75% mineralne supstance, dok je taj procenat u zemljištu znatno veći i ide do 96% (*Frank i Tölgyessy, 1993*). Struktura silikata ((SiO<sub>4</sub>)<sup>4-</sup>) je tetraedarska. Silicijum u tetraedru često biva zamenjen aluminijumom i tada dolazi do formiranja alumosilikata. Silikati u zemljištu se mogu podeliti na primarne i sekundarne. Primarni silikati prisutni u zemljištu su feldspati kod kojih su K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> i Ca<sup>2+</sup> vezani za negativno naelektrisan oktaedar. Treba naglasiti da su primarni silikati jako postojani i da ostaju neizmenjeni nakon metamorfoze. Sekundarni

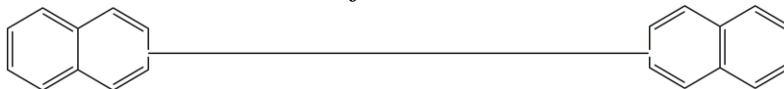


silikati se razlikuju od primarnih po hemijskom sastavu. Do hemijskih promena kojima nastaju zeoliti dolazi usled vulkanskih i hidrotermalnih procesa, dok gline nastaju usled površinskog starenja.

Pored elemenata prirodno prisutnih u zemljištu, u poslednje vreme je zabeleženo veće prisustvo teških metala (metala čija je gustina veća od  $5 \text{ g cm}^{-3}$ ), koji u zemljište dospevaju najčešće usled antropogenih aktivnosti. Teški metali su prisutni u zemljištu u tragovima ( $<1000 \text{ mg kg}^{-1}$ ) kao posledica pedogenetskih procesa (*Kabata-Pendias i Pendias, 2001*). Zemljište predstavlja depo teških metala, s obzirom na to da oni ne podležu mikrobiološkoj ili hemijskoj degradaciji (*Kirpichtchikova i sar., 2006*), u zemljištu se zadržavaju duži vremenski period (*Adriano, 2003*). Prisustvo ovih metala u zemljištu može da uspori i onemogući biodegradaciju organskih kontaminanata (*Maslin i Maier, 2009*). Teški metali predstavljaju rizik po ekosistem i čoveka. Biljke ih usvajaju iz zemljišta, ulaze u lanac ishrane, i dospevaju do čoveka. Najčešće prisutni teški metali u zemljištu su Pb, Cr, As, Zn, Cd, Cu, Hg i Ni (*GWRTAC, 1997*).

**Olovo** je metal koji je u zemljinoj kori prirodno prisutan u koncentracijama 10 do  $30 \text{ mg kg}^{-1}$  (*USDHHS, 1999*). U industrijskoj proizvodnji metala, olovo zauzima peto mesto, odmah nakon Fe, Cu, Al i Zn. Olovo se koristi u proizvodnji baterija, municije, cevi, pigmenta i vojnoj industriji. U zemljištu je olovo prisutno u obliku  $\text{Pb}^{2+}$  jona, kompleksa sa hidroksilnim jonima, kao i teško rastvornih sulfida, fosfata, karbonata i hidroksida. Glavni put unošenja olova u ljudski organizam su udisanje i ingestija. Takođe, olovo se može uneti i putem hrane s obzirom na to da zeleno lisnato povrće ima sposobnost da usvoji određenu količinu olova iz zemljišta jako onečišćenog ovim metalom. Olovo se akumulira u organizmu (mozak, kosti, bubrezi) i može dovesti i do smrtnog ishoda. Deca koja su izložena dejstvu olova imaju niži koeficijent inteligencije, mentalne poremećaje i hiperaktivnost. Kod odraslih, olovo dokazano utiče na nervni sistem, mozak, eritrocite i bubrege (*Baldwin i Marshall, 1999*).

**Hrom** je u zemljištu prisutan u više oksidacionih stanja, što je uslovljeno pH vrednošću zemljišta i redoks uslovima. Najčešće se nalazi kao  $\text{Cr}^{3+}$  i  $\text{Cr}^{6+}$ , zatim kao hromat ( $\text{CrO}_4^{2-}$ ) i dihromat ( $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ ).  $\text{Cr}^{3+}$  je prisutan u kiselim zemljištima ( $\text{pH} < 4$ ), gde formira komplekse sa  $\text{NH}_3$ ,  $\text{OH}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{CN}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  i pojedinim organskim ligandima.  $\text{Cr}^{6+}$  je mobilnija i toksičnija forma hroma, i njegova mobilnost raste sa porastom pH. Za ljude i životinje  $\text{Cr}^{3+}$  predstavlja esencijalni element, koji učestvuje u metabolizmu masti, proteina i glukoze (*Anderson,*



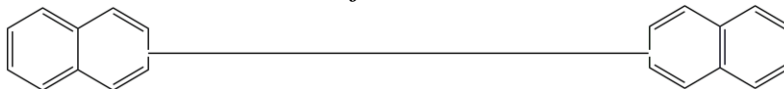
1981), dok je se  $\text{Cr}^{6+}$  smatra toksičnim. Hrom prisutan u obliku hromata i dihromata može da se istaloži u prisustvu metalnih katjona poput  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  i  $\text{Ag}^+$ . Koncentracija hroma u zemljištu je od 1 do 2000  $\text{mg kg}^{-1}$  (Shacklette i Boemgen, 1984) sa prosečnom vrednošću od 200  $\text{mg kg}^{-1}$  (Hawkes i Webb, 1962).

**Arsen** je u zemljištu prisutan u više oksidacionih stanja (-3, 0, +3 i +5) u zavisnosti od uslova sredine. U aerobnim uslovima dominantan je petovalentni arsen u formi arsenata ( $\text{AsO}_4^{3-}$ ) koji može da bude istaložen u prisustvu metalnih jona ili kompleksiran organskim ligandima. U redukcionim uslovima dominantan je trovalentni arsen u formi arsenita ( $\text{AsO}_3^{3-}$ ). Arsenit često biva adsorbovan na sulfidima metala ili drugim jedinjenjima metala i sumpora (sulfiti i sulfati). Pri ekstremno redukcionim uslovima arsen je u zemljištu prisutan u vidu elementarnog arsena ili arsina ( $\text{AsH}_3$ ). Biotransformacija arsena podrazumeva metilovanje i formiranje lako isparljivih dimetil ( $\text{HAs}(\text{CH}_3)_2$ ) i trimetil ( $\text{As}(\text{CH}_3)_3$ ) arsina. Arsen se smatra toksičnim elementom i može izazvati oštećenje kože, kardiovaskularnog sistema i povećan rizik od raka (Scragg, 2005).

**Cink** je element koji je u zemljinoj kori prisutan kao  $\text{Zn}^{2+}$ , obično u koncentracijama oko 50  $\text{mg kg}^{-1}$  (Alloway, 2008). Povećanje koncentracije cinka u životnoj sredini posledica je povećane antropogene aktivnosti poput prerade uglja, proizvodnje čelika, spaljivanja otpada i aktivnosti u rudnicima. Cink je element esencijalan za ljudsko zdravlje, međutim povišene koncentracije ovog elementa ispoljavaju negativan efekat, koji se obično manifestuje kroz poremećaj metabolizma bakra u organizmu i oštećenje nervnih ćelija.

**Kadmijum** zajedno sa Pb i Hg čini grupu metala koji su toksični i nemaju ni jednu dokazanu biološku funkciju. U zemljištu je prisutan kao dvovalentni katjon, i sličan je po osobinama cinku, pa može preuzeti njegovu ulogu u biljkama i negativno uticati na metaboličke procese. Glavni izvor kadmijuma u životnoj sredini su Ni/Cd baterije, ali ne treba zanemariti ni kadmijum koji potiče iz industrije boja i pigmenata, fosfatnih đubriva i elektronske industrije. Toksikološke studije pokazale su da kadmijum koji uđe u organizam biva zadržan dugi niz godina i negativno utiče na ljudsko zdravlje. Ovaj metal izaziva oštećenje bubrega, koje za rezultat ima proteinuriju, bolest koja nastaje usled oštećenja enzima koji su odgovorni za resorpciju proteina u bubrezima. Kadmijum takođe smanjuje aktivnost arilsulfataze, alkohol dehidrogenaze i lipoamid dehidrogenaze (Manahan, 2002).

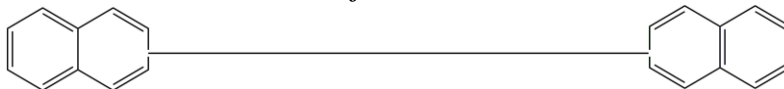




**Bakar** je još jedan od esencijalnih elemenata prisutnih u zemljištu. Neophodan je kako za razvoj biljaka, tako i za razvoj ljudskog i životinjskog organizma. Kod čoveka pomaže proizvodnju hemoglobina, dok je kod biljaka neophodan za proizvodnju semena i regulaciju usvajanja vode. Iako je esencijalan, ovaj element može biti i toksičan. U visokim dozama izaziva anemiju, oštećenje bubrega, jetre i oštećenje digestivnog trakta. Kada dospe u životnu sredinu, vrlo se lako transformiše u oblike koji nisu štetni. U zemljištu se lako vezuje za organsku supstancu te je slabo prisutan u jonskom obliku ( $\text{Cu}^{2+}$ ). Rastvorljivost bakra značajno raste pri pH oko 5,5 (*Martínez i Motto, 2000*).

**Živa** je jedini metal koji se na sobnoj temperaturi nalazi u tečnom stanju. Glavni izvor žive u životnoj sredini je proces sagorevanja uglja. Nakon što dospe u životnu sredinu, živa se može naći u obliku jona ( $\text{Hg}^{2+}$  i  $\text{Hg}_2^{2+}$ ), elementarnom stanju ( $\text{Hg}^0$ ) ili alkilovana (metil i etil derivati žive). Ukoliko u sredini u kojoj je živa prisutna preovlađuju oksidacioni uslovi, ona će biti u jonskom obliku, a ukoliko su uslovi redukcioni, joni bivaju redukovani do elementarne žive, iz koje dalje mogu nastati izuzetno toksični alkil derivati. U zemljište ovaj metal dospeva iz vodene sredine kroz sorpcione procese. Sorpcija žive raste sa porastom pH. Kada dospe u zemljište, može biti vezana za sulfidni anjon ili alkilovana pomoću mikroorganizama prisutnih u zemljištu, dok u ljudskom organizmu izaziva oštećenje bubrega (*Soderland i sar., 2010*).

**Organska supstanca zemljišta** čini znatno manji deo zemljišta u odnosu na mineralnu supstancu, ali ima veliki značaj. Iako njen sadržaj retko prelazi 10% ukupne mase zemljišta, ona znatno utiče na fizičke i hemijske karakteristike, kao i kvalitet zemljišta. Smatra se da se sastoji iz živih organizama prisutnih u zemljištu i nežive materije koja nastaje izumiranjem i razgradnjom živih organizama. U živi deo organske supstance spadaju mikroorganizmi, koren biljaka i životinje koje žive u zemljištu, dok neživi deo čine proteini, saharidi i lipidi. Ovaj deo organske supstance zemljišta naziva se humus. U pedologiji se humus definiše kao sistem organskih supstanci u zemljištu koji nastaje razlaganjem biljaka, životinja i mikroorganizama (*Whitehead i Tinsley, 1963*). Huminske supstance su glavni činioci humusa, njihov sadržaj je i do 90%. Najčešće su to organske kiseline ili polimerne supstance koje sadrže aromatične prstenove. Njihova kisela priroda omogućava da reaguju sa mineralnom supstancom zemljišta, gradeći organo-mineralne komplekse. Huminske supstance karakterišu se sledećim osobinama:

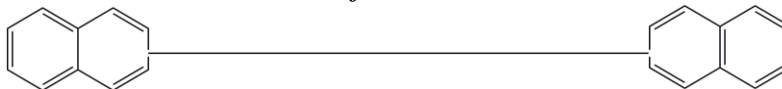


- Njihovi molekuli imaju visok sadržaj kiseonika;
- Imaju nizak sadržaj ugljenika i fenolnih grupa;
- Imaju visok sadržaj azota, koji se nalazi u aromatičnim prstenovima.

Huminske supstance prisutne u zemljištu mogu se podeliti u tri grupe: huminske kiseline, fulvo kiseline i humini. Huminske kiseline se rastvaraju u alkalnim rastvorima, dok su slabo rastvorne u vodi i mineralnim kiselinama. Mogu se taložiti iz rastvora mineralnim kiselinama i dvovalentnim i trovalentnim katjonima. Predstavljaju tamno obojene sferokoloide sa velikim kapacitetom vezivanja i stabilizovane su u kompleksima sa hidroksidima aluminijuma i gvožđa. Fulvo kiseline su svetlo obojene supstance koje ostaju u rastvoru nakon taloženja huminskih kiselina. U odnosu na huminske kiseline sadrže manje aromatičnih prstenova, i veliki broj karboksilnih, karbonilnih i hidroksilnih grupa. S obzirom na visok sadržaj karboksilnih grupa, znatno su kiselije u odnosu na huminske kiseline, i lako rastvorne u vodi, pa se retko nalaze u kompleksima sa mineralnom supstancom. Humini su supstance koje nisu rastvorne ni u alkalnim ni u kiselim rastvorima i one predstavljaju nerastvorni deo huminskih supstanci. Smatra se da su to supstance sa visokim sadržajem ugljenika i da se jako vezuju za mineralnu supstancu zemljišta.

Tečna komponenta zemljišta se sastoji iz soli, organskih supstanci i gasova rastvorenih u vodi i naziva se **zemljišni rastvor**. Sastav ove komponente je promenljiv i zavisi od vlažnosti zemljišta i reakcija prisutne vode sa prisutnim organskim i neorganskim jedinjenjima. Samo onaj deo vode koji može da rastvori prisutne materije predstavlja deo zemljišnog rastvora. To znači da vodena para i voda vezana adsorpcijom ne ulaze u sastav zemljišnog rastvora. Od neorganskih jedinjenja koje ulaze u sastav zemljišnog rastvora izdvajaju se hloridi, nitrati, karbonati, sulfati i fosfati, dok su najčešće prisutne organske supstance one koje imaju niske molekulske mase, kao što su fulvo kiseline. Odnos organskog i neorganskog dela zavisi od tipa zemljišta i godišnjeg doba. Od anjona u zemljišnom rastvoru najviše ima  $\text{HCO}_3^-$  i  $\text{NO}_3^-$ , koji čine 90% prisutnih anjona, dok od katjona najviše ima  $\text{H}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$  i nešto manje trovalentnih katjona ( $\text{Fe}^{3+}$  i  $\text{Al}^{3+}$ ).

Pored vode u zemljištu se takođe nalaze i gasovi poznati pod nazivom **zemljišni vazduh** (Frank i Tölgyessy, 1993). Gasovi u zemljište dospevaju iz vazduha i njihov sastav u zemljištu zavisi od sastava vazduha. Od gasova prisutnih u zemljištu treba izdvojiti:



- CO<sub>2</sub> - koji se u gornjem sloju zemljišta nalazi u granicama od 0,1-1,0%, dok u dubljim slojevima zemljišta može dostići i do 5%. Ovako visok sadržaj ovog jedinjenja u dubljim slojevima zemljišta posledica je razlaganja prisutne organske materije. CO<sub>2</sub> je važan regulator pH zemljišta.
- O<sub>2</sub> - čini 10-20% zemljišnog vazduha. Smanjenje količine kiseonika ispod 15% negativno utiče na razvoj biljaka.
- N<sub>2</sub> - kao i u atmosferi, azot je glavna komponenta zemljišnog vazduha. Pored molekulskog oblika, u zemljištu može biti prisutan i kao amonijak.

Pored ove tri komponente, koje su označene kao glavne komponente zemljišnog vazduha, treba pomenuti i prisustvo H<sub>2</sub>S, H<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> i SO<sub>2</sub>, koji nastaju razlaganjem organske materije prisutne u zemljištu.

### 2.3.3. pH zemljišta

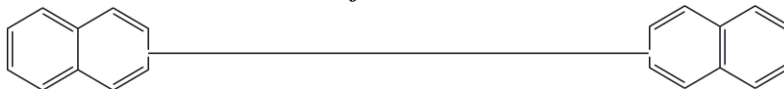
pH zemljišta je karakteristika zemljišta koja znatno utiče na njegov sastav, biološku aktivnost i procese. Ovaj parameter utiče na rastvorljivost mnogih supstanci, adsorpciju i desorpciju jona, koagulaciju i peptizaciju koloida, kao i hemijske reakcije koje se odigravaju. pH vrednost zemljišta je određena koncentracijom slobodnih H<sub>3</sub>O<sup>+</sup> i OH<sup>-</sup> jona u zemljišnom rastvoru.

Na osnovu pH vrednosti zemljište se može podeliti na način prikazan u Tabeli 3. (USDA, 1993):

Tip zemljišta	pH
Ultra kiselo	<3,5
Ekstremno kiselo	3,5-4,4
Izrazito kiselo	4,5-5,0
Jako kiselo	5,1-5,5
Umereno kiselo	5,6-6,0
Slabo kiselo	6,1-6,5
Neutralno	6,6-7,3
Slabo alkalno	7,4-7,8
Umereno alkalno	7,9-8,4
Jako alkalno	8,5-9,0
Izrazito alkalno	>9,0

**Tabela3.** Podela zemljišta u zavisnosti od pH vrednosti (USDA, 1993)





## 2.4. Analiza policikličnih aromatičnih ugljovodonika

### 2.4.1. Uvod

Analiza uzoraka životne sredine predstavlja dug i složen proces zbog kompleksne prirode samog uzorka, kao i činjenice da su željeni analiti obično prisutni u tragovima. Pre početka bilo kakve analize neophodno je sagledati sledeće:

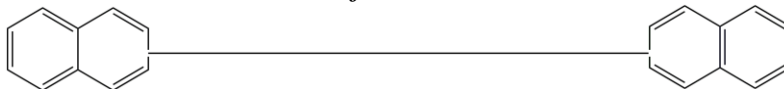
- Prirodu uzorka;
- Složenost procesa uzorkovanja, uključujući i veličinu mesta sa kog se uzorak uzima;
- Promene koje se mogu desiti na uzorku nakon uzorkovanja, a koje zahtevaju izmene u procesu uzorkovanja i skladištenja;
- Pitanja vezana za obezbeđenje i kontrolu kvaliteta celokupne analize.

Policiklični aromatični ugljovodonici predstavljaju zbog svoje toksičnosti važne indikatore zagađenosti životne sredine, pa je neophodno pratiti njihovu koncentraciju u uzorcima iz životne sredine. S obzirom na to da se PAU mogu naći u svim delovima životne sredine, različiti uzorci zahtevaju različit tretman i različite metode analize. Ipak, za svaki tip uzoraka postupci analize se mogu posmatrati kroz sledeće faze:

1. Prikupljanje i homogenizacija uzorka;
2. Ekstrakcija, kako bi se PAU izdvojili iz složenog matriksa uzorka;
3. Prečišćavanje, kako bi se uklonile ko-ekstrahovane nečistoće;
4. Analiza, kako bi se utvrdila količina PAU u uzorku.

Problem u analizi PAU predstavlja njihova mala koncentracija u uzorku, ko-ekstrakcija prisutnih organskih jedinjenja i slična struktura samih PAU jedinjenja.

Ako se u obzir uzme to da su PAU hidrofobna jedinjenja i imaju visok koeficijent raspodele oktanol-voda, vrlo lako se vezuju za organsku materiju zemljišta i na taj način se smanjuje njihava biodostupnost i mogućnost hemijske degradacije. Produženo zadržavanje PAU u zemljištu omogućava im da se jako vežu za mikropore zemljišta, otežavajući njihovu ekstrakciju, a samim tim i celokupnu analizu.



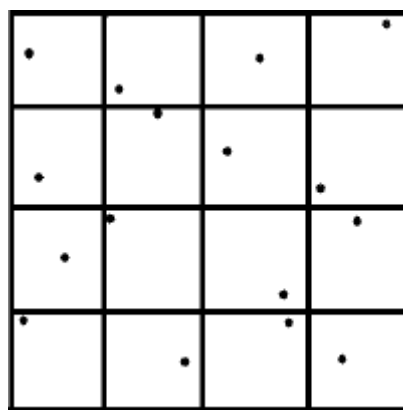
### 2.4.2. Prikupljanje i homogenizacija uzoraka zemljišta

Početni korak svake analize predstavlja uzorkovanje. Kako analizom ne može biti obuhvaćen ceo osnovni skup koji je predmet istraživanja, neophodno je uzeti deo koji će se koristiti u daljoj analizi. Da bi se dobili dobri rezultati, neophodno je da taj deo analizirane supstance tj. uzorak ima isti sastav kao celina. Postupak kojim se dobija reprezentativni deo ispitivane supstance naziva se uzimanje uzorka ili uzorkovanje. Uzorkovanjem se dobija homogeni uzorak mase nekoliko grama ili nekoliko stotina grama. Sastav tako dobijenog uzorka mora biti što je moguće sličniji prosečnom sastavu ukupne mase. Uzimanje uzorka iz velike količine neke supstance izvodi se u tri faze:

1. Identifikacija populacije iz koje se uzorak uzima;
2. Sakupljanje velikog uzorka, predstavnika cele populacije;
3. Smanjenje velikog uzorka od nekoliko stotina grama na homogeni laboratorijski uzorak pogodan za analizu.

Uzorkovanje zemljišta se može vršiti na više načina, uzevši u obzir prostorni raspored uzorkovanja (*Grubeša*, 2014):

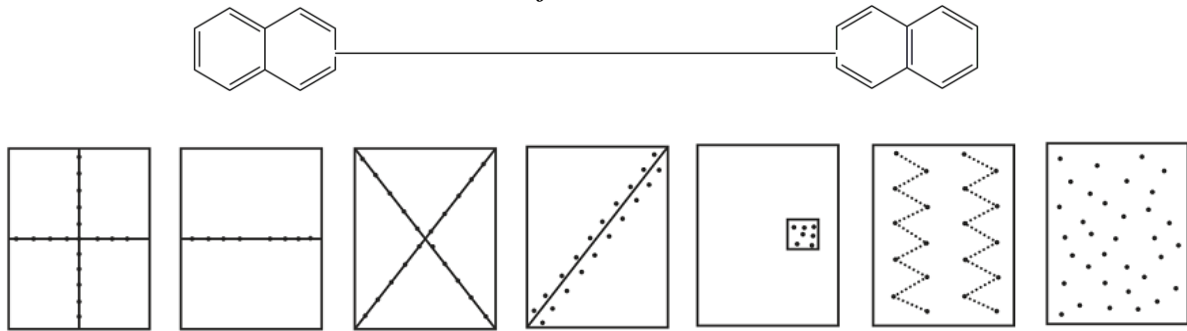
- Slučajno uzorkovanje - koristi se za manje homogene površine, kada se uzima veći broj poduzoraka kako bi dobio reprezentativni uzorak (Slika 5).



**Slika 5.** Slučajno uzorkovanje

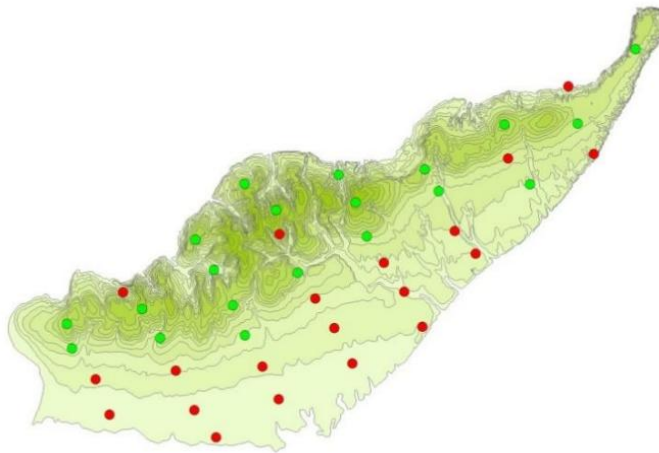
([https://www.itrcweb.org/ism1/A\\_6\\_6\\_Sampling\\_Patterns.html](https://www.itrcweb.org/ism1/A_6_6_Sampling_Patterns.html))

- Uzorkovanje po određenoj šemi - pogodan za homogene oranice, višegodišnje nasade i rasadnike. Uzorci se uzimaju u oblicima slova i znakova, i ovaj način uzorkovanja je najčešće prisutan u naučnim istraživanjima (Slika 6).



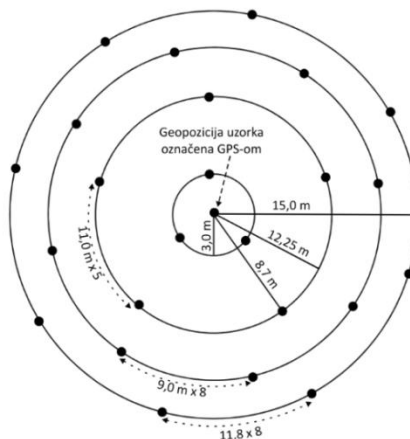
**Slika 6.** Uzorkovanje prema određenoj šemi (Grubeša, 2014)

- Sistematsko uzorkovanje - podrazumeva uzimanje uzoraka na tačnim udaljenostima između svakog uzorka, u obliku mreže (Slika 7.). Ovakav način najpogodniji je za izradu geografskih karti i GIS (geografsku informacionu sistem) analizu, na kojima su prikazane tematske karte.

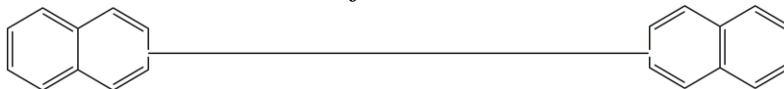


**Slika 7.** Sistematsko uzorkovanje (Grubeša, 2014)

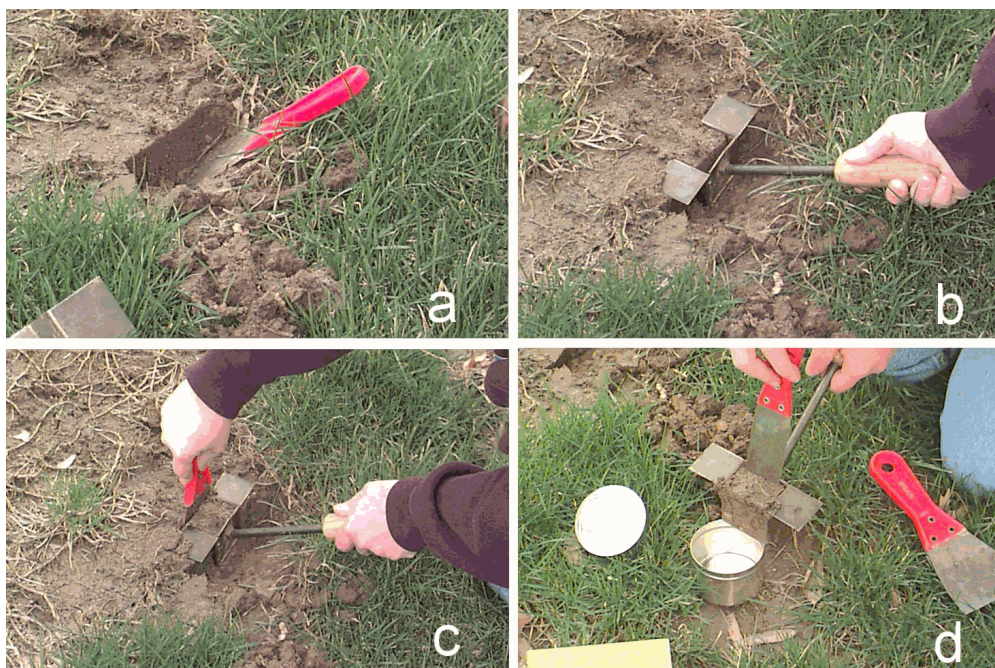
- Metoda referentnog uzorka - uzima se prosečan uzorak sa površine do 5 ha. U taj uzorak spada 20-25 dobro izmešanih uzoraka, koji se uzimaju po šemi (Slika 8).



**Slika 8.** Uzorkovanje metodom referentnog uzorkovanja (Grubeša, 2014)



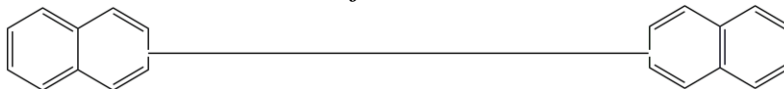
Uzorci zemljišta uzimaju se sondom ili ašovom na odgovarajućoj dubini u zavisnosti od mesta uzorkovanja (šume, obradive površine, zemljište pored puta). Alat za uzimanje uzoraka mora biti hromiran ili od nerđajućeg čelika radi sprečavanja kontaminacije uzoraka. Za alat je poželjno da lako prodire u tlo i da svaki put uzima jednaku količinu zemljišta (*Bashour i Sayegh*, 2007). Ašovom se izvadi grumen zemlje, a zatim se uz ivicu rupe ponovo zabode ašov pod uglom od  $90^\circ$  od površine do odgovarajuće dubine. Pažljivo se izvadi ašov sa zemljom, tako da ona ostane na ašovu kada se položi na tlo. Potom se po zemlji koje je na ašovu nožem napravi "kaiš", širine 3-4 cm po sredini ašova do njegovog vrha. Zemlja na ašovu levo i desno od "kaiša" se odbaci, a "kaiš" zemlje se ubaci u čistu kofu. Ukoliko se radi o većoj površini zemljišta, uzorci se uzimaju na više ravnomerno raspoređenih mesta na isti način i ubacuju u istu kofu. Zemlja u kofi se dobro izmeša, usitne se veće grudve i odstrane se kamenje i biljni delovi. Nakon ponovnog mešanja zemlje u kofi u polietilensku vrećicu se stavi oko 0,5-1 kg reprezentativnog uzorka zemlje, a višak zemlje se baci. Uzorak se obeleži i dalje tretira (Slika 9).



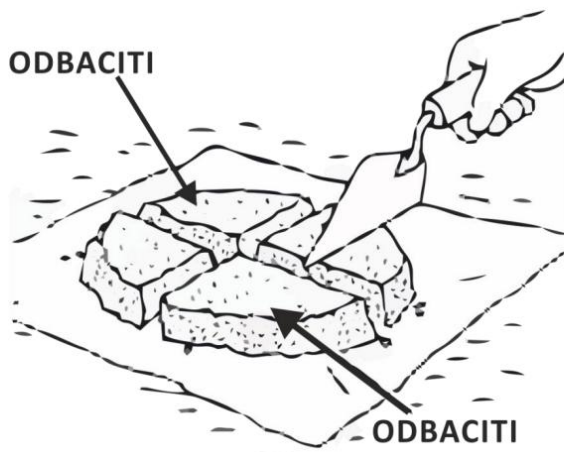
**Slika 9.** Uzorkovanje zemljišta (<https://hrsl.ba.ars.usda.gov/sgp99/chap9.htm>)

Nakon uzimanja uzorka, neophodno je dalje tretirati uzorak, kako bi se dobio uzorak reprezentativan za analizu. Postupci koji slede nakon uzorkovanja su:





**Izdvajanje srednje probe** - najčešće se koristi metoda četvrtanja (Slika 10). Uzorak tla se oblikuje u kvadrat ili krug, pa se dijagonalno podeli na 4 jednaka dela. Dva suprotna se odbace, dok se ostatak ponovo meša i postupak se ponavlja dok se ne dobije uzorak težine 0,5-1,0 kg.



**Slika 10.** Postupak četvrtanja (<http://engineeringtraining.tpub.com/14069/css/Soil-Testing-531.htm>)

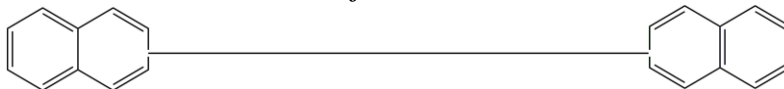
**Sušenje uzoraka** - prikupljeni uzorci se stavljaju na deblji papir ili karton i raspoređuju se na toj površini do debljine od 1-2 cm, kako bi se sušili. Sušenje uzoraka može dovesti do gubitka određenih PAU isparavanjem. Jedan od načina koji se može koristiti za sušenje uzoraka koji sadrže PAU je sušenje hemijskim putem, gde se koriste sredstva za sušenje ( $MgSO_4$  ili  $Na_2SO_4$ ) koja se mešaju sa uzorcima zemljišta.

**Sitnjenje uzoraka** - uzorak se može usitniti u avanu sa tučkom ili u specijalnim mlinovima.

**Prosejavanje uzoraka** - vrši se kroz sito otvora prečnika 1 do 2 mm, u manjim porcijama.

### 2.4.3. Ekstrakcija PAU iz uzoraka zemljišta

Nakon uzorkovanja, sledeći korak u analizi organskih zagađivača u zemljištu je **ekstrakcija**. Ekstrakcija je metoda odvajanja koja se zasniva na raspodeli supstanci između dve faze koje se međusobno ne mešaju. To je vrlo efikasna, brza i popularna tehnika razdvajanja i koncentrovanja supstanci. Vreme celokupne analize i troškovi same analize u velikoj meri zavise od tehnike ekstrakcije. U zavisnosti od toga da li je zemljište koje se analizira suvo ili vlažno zavisi i odabir rastvarača. Ekstrakcija vlažnog zemljišta obično započinje nekim polarnim rastvaračem, kao što su aceton, metanol ili acetonitril. Takođe, se može koristiti i

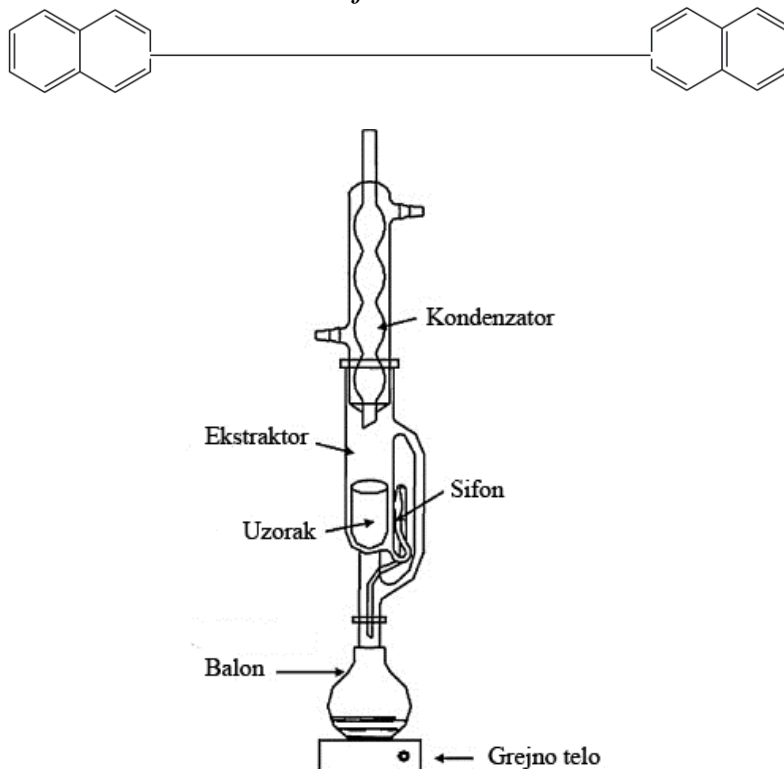


smeša aceton/heksan koja je znatno bezbednija za upotrebu od rastvarača poput toluena i benzena. S obzirom na prisustvo vode u ovakvim uzorcima, neophodno je ponoviti ekstrakciju više puta kako bi ona bila što efikasnija. Polarni rastvarač se koristi kako bi se iz zemljišta ekstrahoval polarniji PAU, a nakon toga se ekstrakcija nastavlja nekim manje polarnim rastvaračem. Nakon ekstrakcije, ovako dobijeni ekstrakti moraju da se spoje. Od rastvarača koji se koriste u ekstrakciji PAU iz zemljišta treba izdvojiti smešu dihlormetan/aceton (1:1 v/v) (*Charles i sar.*, 1998), dihlormetan/dietil etar (1:2 v/v) (*Amir i sar.*, 2004), etil - acetat/heksan (1:1 v/v), aceton/heksan (1:1 v/v) (*Juhani i sar.*, 2004), *n*-butanol (*Hans-Holger Liste i Martin Alexander*, 2002), pridin (*Disdier i sar.*, 1999), dihlormetan/metanol (1:1) (*Lindhardt i sar.*, 1997), dihlormetan/aceton (1:1) (*Guerin*, 1999). Korišćenjem dihlormetana kao rastvarača za ekstrakciju dolazi do gubitaka PAU (*Lau i sar.*, 2010). Toluen se obično izbegava u analizi PAU zbog visoke tačke ključanja, međutim, njegova upotreba se preporučuje u slučajevima kada zemljište sadrži čestice čađi. Pri odabiru rastvarača takođe treba voditi i o njegovoj toksičnosti i štetnosti po okolinu.

U cilju pripreme uzoraka zemljišta za analizu PAU koriste se različite tehnike, kao što su alkalna saponifikacija sa ekstrakcijom tečno - tečno, ultrazvučna ekstrakcija smešom rastvarača, ekstrakcija po Soksletu, mikrotalasna ekstrakcija, ekstrakcija superkritičnim fluidima, mikroekstrakcija čvrstom fazom (*Cvetkovic i sar.*, 2016).

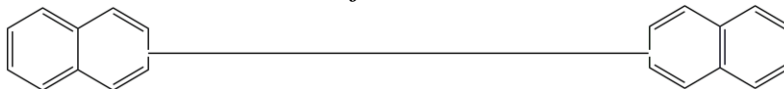
**Alkalna saponifikacija** sa ekstrakcijom tečno-tečno često se koristi u analizi PAU u zemljištu, sedimentima i biološkim uzorcima (*Nollet*, 2005). Uzorci se refluktuju sa 0,5 M KOH u smeši metanola i toluena, a zatim hlade do sobne temperature. Nakon toga, organski sloj se ekstrahuje toluenom, a dobijeni ekstrakt se ispira destilovanom vodom, suši natrijum sulfatom, filtrira i koncentruje. Alkalnom saponifikacijom se razlažu huminske supstance, a iz njih se oslobađaju zagađujuće supstance koje se nakon ekstrakcije analiziraju gasnom hromatografijom sa masenom spektrometrijom.

Jedna od najstarijih tehnika koja se upotrebljava u ekstrakciji PAU iz uzoraka zemljišta je **ekstrakcija po Soksletu**. Uzorak zemljišta stavlja se u čauru, koja se smešta u aparaturu po Soksletu i ekstrahuje odgovarajućim rastvaračem/smešom rastvarača, uz refluks. Kada se dostigne određena temperatura, rastvarač isparava, kondezujuje u kondenzatoru, kondenzovani rastvarač prolazi kroz čauru, ekstrahuje analit iz uzorka i kada se nakupi dovoljna količina vraća se u rastvor koji se nalazi u balonu sifoniranjem (Slika 11).



**Slika 11.** Aparatura za ekstrakciju po Soksletu  
(<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.027>)

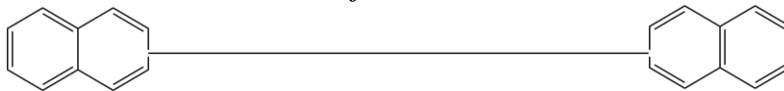
Ekstrakcija se ponavlja više puta, u nekoliko ciklusa, i na taj način PAU se kontinuirano ekstrahuju iz zemljišta. Glavna mana ekstrakcije po Soksletu je upotreba većih količina toksičnih organskih rastvarača (na 10 g uzorka obično se koristi 150 mL rastvarača). Takođe, ova tehnika ekstrakcije zahteva dugo vreme izvođenja, jer ekstrakcija može trajati i do 24 časa, kako bi se postigla zadovoljavajuća efikasnost. Ono što se još može smatrati za nedostatak ekstrakcije po Soksletu je slaba selektivnost za ekstrakciju PAU (*Hawthorne i sar.*, 2000). Pored svega navedenog, postoji mogućnost kontaminacije uzorka, gubitka određenih jedinjenja prilikom uparavanja i nemogućnost rastvaranja dobijenog suvog ostatka. I pored svega, ova tehnika se i dalje često koristi u analizi PAU u zemljištu (*Berset i sar.*, 1999) su pokazali da je ekstrakcija po Soksletu dala slične rezultate kao i neke novije tehnike ekstrakcije poput ekstrakcije sa velikom brzinom kretanja rastvarača (accelerated solvent extraction - ASE), ekstrakcije superkritičnim fluidima (supercritical fluid extraction - SFE) i mikrotalasne ekstrakcije (microwave-assisted extraction - MAE). Efikasnost ekstrakcije po Soksletu raste sa porastom molekulske mase PAU, i iznosi od 84-100% za PAU koji sadrže više od 4 prstena (*Smith i sar.*, 2006). Efikasnija verzija ekstrakcije po Soksletu je automatizovana ekstrakcija, koja podrazumeva kombinovanje ključanja i ispiranja, tako da je smanjeno ukupno vreme ekstrakcije, a brzo uparavanje rastvarača omogućilo je smanjenje



ukupne zapremine rastvarača koji se koristi. Čaura u koju se smešta uzorak se direktno uranja u rastvarač, i na taj način se pospešuje efikasnost ekstrakcije. Na ovaj način postiže se efikasnost i do 100% za analizirane PAU (*Sporring i sar.*, 2005). Vreme koje je potrebno da se ova ekstrakcija završi obično iznosi do 2 sata, što je znatno kraće u poređenju sa klasičnom ekstrakcijom po Soksletu.

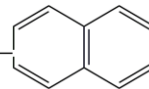
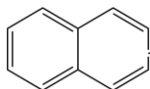
**Ultrazvučna ekstrakcija** je najjednostavnija tehnika koja se koristi za ekstrakciju i zasniva se na korišćenju ultrazvučnih talasa minimalne frekvencije 16 kHz. Analizirani uzorak se smešta u sud u koji se dodaje odgovarajući rastvarač, i tako pripremljen stavlja u ultrazvučno kupatilo. Treba napomenuti da se uzorci koji sadrže analit u tragovima ekstrahuju više puta, uvek sa svežom porcijom rastvarača. Kako se ovaj proces odigrava na sobnoj temperaturi, otežana je ekstrakcija starijih zemljišta. *Sun i saradnici* (1998) postigli su bolje rezultate koristeći ultrazvučnu ekstrakciju u analizi PAU u odnosu na ekstrakciju po Soksletu. Međutim, efikasnost ekstrakcije znatno zavisi od tipa uzorka, kao i koncentracije analita u uzorku. *Smith i saradnici* (2006) dobili su znatno nižu efikasnost koristeći ultrazvučnu ekstrakciju (44-76%), posebno za PAU manje molekulske mase.

**Ekstrakcija rastvaračima koji se kreću velikom brzinom (ASE)/ekstrakcija rastvaračem pod pritiskom (pressurised fluid extraction - PFE)** je jedna od novijih tehnika ekstrakcije u kojoj se rastvarač zagreva iznad temperature ključanja, ali se održava u tečnoj fazi povećanjem pritiska. Povišen pritisak dovodi do rastvaranja mehurića vazduha, omogućavajući na taj način veću dodirnu površinu uzorka i rastvarača. ASE se uspešno koristi u analizi PAU (*Popp i sar.*, 1997; *Saim i sar.*, 1998, *Kenny i Olesik*, 1998). Ovaj tip ekstrakcije patentirao je Dionex 1995. godine (*Richter i sar.*, 1995). Ekstrakcija se obično izvodi na temperaturama od 50-200 °C i pritisku između 10432-20864 kPa. Sistem za ASE ekstrakciju sadrži nekoliko ćelija za ekstrakciju, koje se nalaze u blizini izvora toplote. U toku ekstrakcije rastvarač se upumpava u ekstrakcione ćelije, a nakon ekstrakcije se uz pomoć struje azota zaostali rastvarač uklanja iz ćelije. Rastvarač je u kontaktu sa uzorkom najčešće 5-10 minuta. Primena ove tehnike i sedam različitih rastvarača (acetone, dihlormetan, acetone/dihlormetan (1:1, v/v), acetone/izoheksan (1:1, v/v), izoheksan, metanol i toluen) u analizi PAU dovela je do zaključka da je najbolje koristiti smešu acetone/izoheksan (*Zuloaga i sar.*, 2000). Efikasnost ASE je u odnosu na ekstrakciju po Soksletu dva puta veća (*Wang i sar.*, 2007)



Kod **mikrotalasne ekstrakcije** (MAE) se koriste mikrotalasi za zagrevanje smeše rastvarač - uzorak, ubrzavajući na taj način proces ekstrakcije. Rastvarač mora biti takav da apsorbuje mikrotalase, a istraživanja su pokazala da u slučaju korišćenja mikrotalasa ne dolazi do razgradnje uzorka (*Lopez-Avila i sar.*, 1998). U toku ekstrakcije mogu se koristiti zatvoreni sudovi sa kontrolisanim pritiskom i temperaturom, i ova tehnika se naziva **mikrotalasna ekstrakcija pod pritiskom** (PMAE) i otvoreni sudovi, na atmosferskom pritisku, koja se naziva **usmerena mikrotalasna ekstrakcija** (FMAE). Dizajn mikrotalasnih peći omogućava istovremenu ekstrakciju do 12 uzoraka. Glavna prednost ovog tipa ekstrakcije je korišćenje malih količina rastvarača i kratko vreme ekstrakcije. U poređenju sa ekstrakcijom superkritičnim fluidima, troškovi MAE su nešto manji (*Wang i sar.*, 2007). Takođe, specifičan mehanizam zagrevanja omogućava interakciju sa polarnim molekulima, što pospešuje ekstrakciju PAU (*Letellier i Budzinski*, 1999). Nedostatak ovog tipa ekstrakcije je što je neophodno potpuno ukloniti rastvarač iz uzorka nakon ekstrakcije, što vrlo često podrazumeva uparavanje, te može doći i do isparavanja željenog analita. Iako je korak prečišćavanja uglavnom neophodan nakon svakog tipa ekstrakcije, vrlo lako može doći do gubitka analita, onečišćenja uzorka i produžetka vremena analize. Takođe, masa uzorka koji se koristi za analizu ograničena je na 1g, što vrlo često nije dovoljno (*Shu i sar.*, 2000).

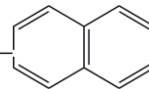
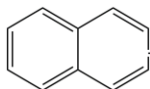
**Ekstrakcija superkritičnim fluidima** (SFE) se odvija pomoću fluida koji poseduju osobine i tečne i gasovite faze, a čiji su temperatura i pritisak iznad kritičnih. Fizičke osobine ovih fluida, kao što su gustina slična tečnosti, mala viskoznost i velika moć difuzije omogućavaju im da prodru u pore većine materijala i rastvore skoro sve njihove komponente. Najčešće se u ove svrhe koristi ugljen dioksid, koji na 31 °C i 7380 kPa postaje superkritični fluid, a ekološki je prihvatljiv (*Anitescu i Tavlarides*, 2006). Ekstrakcija po Soksletu i ekstrakcija superkritičnim fluidima upoređena je u radu *Miégea i saradnika* (1998). U ovom radu dobijene su slične vrednosti efikasnosti, za analizirane PAU, koristeći obe tehnike ekstrakcije. Iako je SFE tehnika zahtevnija za rad, dobijene su niže standardne devijacije i bolja selektivnost, pa je preporučena kao metoda za analizu PAU. Određeni sistemi za SFE ekstrakciju omogućavaju analizu PAU gasnom hromatografijom sa masenom spektrometrijom bez prečišćavanja dobijenog ekstrakta. Ipak, ova tehnika ekstrakcije je kompleksna, i može dati znatno različite rezultate u različitim laboratorijama. Pored superkritičnog CO<sub>2</sub>, kao rastvarač se može koristiti i superkritična voda, čija je superkritična temperatura veća od 374 °C, a pritisak veći od 22088 kPa, pa se ovaj rastvarač ređe koristi.



Umesto toga, voda se češće upotrebljava na temperaturama između 100 i 274 °C, pod pritiskom, i ovaj tip ekstrakcije naziva se **ekstrakcija sub-kritičnom vodom** (subcritical water extraction (SWE)). Pod ovim uslovima, vodonične veze u molekulima vode slabe, što za rezultat ima manju dielektričnu konstantu. Na taj način voda postaje manje polarna i može da ekstrahuje i nepolarna jedinjenja, poput PAU (Manahan, 2010). U poređenju sa SFE, ova tehnika daje bolje rezultate za polarnija jedinjenja, što omogućava ekstrakciju nižih PAU, bez ekstrakcije prisutnih alkana.

**Tabela 4.** Poređenje tehnika koje se upotrebljavaju u ekstrakciji PAU

Tehnika ekstrakcije	Prednosti	Nedostaci
<b>Ekstrakcija po Soksletu</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Klasična i najčešće primenjivana metoda</li> <li>• Dobra efikasnost za određene PAU</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dugo vreme analize</li> <li>• Skupa, zahteva velike količine rastvarača</li> <li>• Relativno niska efikasnost za neke PAU</li> </ul>
<b>Ultrazvučna ekstrakcija</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Jeftina</li> <li>• Brza</li> <li>• Jednostavna</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Niska selektivnost</li> <li>• Niža efikasnost u poređenju sa ekstrakcijom po Soksletu i ASE</li> </ul>
<b>Ekstrakcija velikom brzinom kretanja rastvarača</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dobra efikasnost za analizu PAU</li> <li>• Brza</li> <li>• Male količine rastvarača</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Niska selektivnost</li> </ul>
<b>Mikrotalasna ekstrakcija</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Male količine rastvarača</li> <li>• Jeftina</li> <li>• Brza</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Niska selektivnost</li> <li>• Posedovanje specifične opreme za njeno izvođenje</li> </ul>
<b>Ekstrakcija superkritičnim fluidima</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Odlična selektivnost</li> <li>• Brza</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Niska efikasnost za HMW PAU</li> <li>• Efikasnost odvajanja zavisi od matriksa uzorka</li> <li>• Posedovanje specifične opreme za njeno izvođenje</li> </ul>
<b>Mikroekstrakcija čvrstom fazom</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Upotreba vrlo malih količina rastvarača</li> <li>• Brza</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Niska selektivnost</li> <li>• Posedovanje specifične opreme za</li> </ul>



- 
- Jednostavna za izvođenje
- 

**Ekstrakcija čvrstom fazom** (solid phase extraction - SPE) je tehnika koja se najčešće koristi za prečišćavanje ekstrakata, ali se može koristiti i za brzu ekstrakciju PAU iz zemljišta. Uzorci zemljišta se ispiraju pogodnim rastvaračem, kako bi se iz uzorka uklonile neželjene komponente koje potencijalno ometaju analizu PAU. Nakon toga, uzorci zemljišta se ekstrahuju acetonom, mešaju sa vodom i prenose na C8 SPE kolonu i nakon ispiranja PAU se ekstrahuju tetrahidrofuranom (*Kootstra i sar., 1995*).

**Mikroekstrakcija čvrstom fazom** (solid phase microextraction - SPME) je slična ekstrakciji čvrstom fazom i primenjuje se u ekstrakciju PAU iz uzorka zemljišta (*Ouyang i Pawliszyn, 2006*). Glavni deo sistema za mikroekstrakciju predstavlja špric koji sadrži 1 cm dugo vlakno izrađeno od odgovarajućeg polimera. Proces se zasniva na raspodeli analita između vlakna i uzorka, odnosno na selektivnoj sorpciji analita u aktivnom sloju vlakna i direktnoj desorpciji u injektor hromatografa. S obzirom na to da se za ekstrakciju koriste izuzetno male količine uzorka, neophodno je voditi računa da ne dođe do gubitka željenog analita.

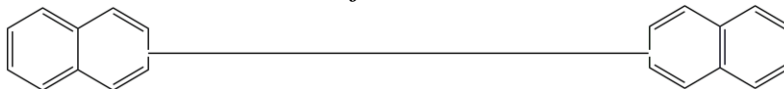
Još jedna od tehnika kojom se mogu ekstrahovati PAU iz zemljišta je **termalna desorpcija**, koja ne zahteva upotrebu rastvarača. Ova tehnika se primenjuje u kombinaciji sa gasnom hromatografijom, direktnom injekcijom čvrstog uzorka u hladan injektor. Nakon toga injektor se zagreva na temperaturi od 200 do 500 °C, što omogućava isparavanje analita. Noseći gas nakon toga prenosi analit u GC kolonu (*Banerjee i Gray, 1997*).

Kako bi bolje razumeli razlike između pojedinih tehnika ekstrakcije, u Tabeli 5. navedeni su uslovi ekstrakcije, vreme potrebno za ekstrakciju i tretman nakon ekstrakcije, kao i koncentracija PAU u uzorcima zemljišta analiziranih pomoću odgovarajućih postupaka pripreme uzorka (*Camel, 2001*).

**Tabela 5.** Uslovi različitih tipova ekstrakcije u analizi PAU (*Camel*, 2001)

Primena	Tehnika	Rastvarač	Uslovi	Vreme	Dalji tretman uzorka	Sadržaj PAU u uzorcima zemljišta (mg kg <sup>-1</sup> )
PAU/ Prirodno prisutni u zemljištu	Ekstrakcija po Soksletu	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	10 g uzorka + 10 g Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; 150 mL rastvarača	24 h	Koncentrovanje	1623
	SFE	CO <sub>2</sub> + 20% CH <sub>3</sub> OH	1 g uzorka; 24516 kPa, 70 °C, 2 mL min <sup>-1</sup> prikupljanje: CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	5 min statička + 30 min. dinamička	Koncentrovanje	1544
	PFE	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> + C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O, 1:1	7 g uzorka, 100 °C, 13789 kPa	5 min predtretman + 5min statička	Koncentrovanje	1537
	PMAE	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O	2 g uzorka; 40 mL rastvarača; 120 °C	20 min + hlađenje	Filtriranje, koncentrovanje	1578
	FMAE	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2 g uzorka; 70 mL rastvarača	20 min	Filtriranje, koncentrovanje	1492
	PAU/Zagađena zemljišta	Sokslet	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	10 g uzorka + 30 g Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + 100 mL rastvarača	6 h + hlađenje	/
SFE		CO <sub>2</sub> + 20% CH <sub>3</sub> OH	1 g uzorka, 24516 kPa, 70°C, 1 mL min <sup>-1</sup> prikupljanje: CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	5 min statička + 60 min dinamička	/	458,0
PMAE		C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O	2 g uzorka, 40 mL rastvarača, 120 °C	20 min + hlađenje	Filtriranje	422,9



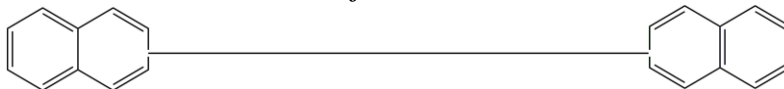


#### 2.4.4. Prečišćavanje dobijenih ekstrakata

Prečišćavanje (clean up) omogućava razdvajanje željenog analita od ostalih ko-ekstrahovanih supstanci. Selektivnost odabrane tehnike ekstrakcije umnogome utiče na odabir tehnike prečišćavanja dobijenog ekstrakta. Tehnike prečišćavanja uzoraka za analizu PAU mogu se podeliti na **tehnike prefiltriranja**, koje se koriste kako bi se uklonila veća količina biogenog materijala zaostalog posle ekstrakcije i **tehnike frakcionisanja**, koje se koriste kako bi se ciljani analit odvojio od ostalih potencijalno ekstrahovanih organskih jedinjenja.

Za uzorke koji sadrže jedinjenja u tragovima, kao što je to slučaj pri analizi PAU, ova dva postupka se često kombinuju. Uzorci koji se analiziraju osim PAU, često sadrže i alifatične ugljovodonike, monociklične aromatične ugljovodonike, lipide, proteine, rastvorene organske supstance, a sva ova jedinjenja se ekstrahuju zajedno sa željenim analitom. Za prečišćavanje uzoraka za analizu PAU mogu se primenjivati hromatografija na koloni, ekstrakcija čvrstom fazom i tečna hromatografija visoke efikasnosti (HPLC) (*Khan i sar.*, 2005).

**Hromatografija na koloni** se izvodi na koloni, koja predstavlja vertikalni stub ispunjen određenom količinom stacionarne faze. Na kolonu se nanosi uzorak i tada kontrolisanim protokom dodaje mobilna faza koja se niz stub stacionarne faze (adsorbensa) kreće pod dejstvom gravitacije. Hromatografija na koloni se obično u analizi PAU primenjuje nakon ekstrakcije po Soksletu (*EA*, 2003). Pre nanošenja uzorka, kolona se ispira pogodnim rastvaračem, najčešće pentanom, dok se PAU sa kolone eluiraju smešom dihlormetan/pentan. Kao sorbensi se najčešće koriste silika gel i aluminijum oksid. Silika gel ( $\text{SiO}_2$ ) jedan je od najčešće primenjivanih sorbenasa u hromatografiji na koloni za prečišćavanje ekstrakata u analizi PAU (*Nollet*, 2005). Najpre je potrebno da se silika gel aktivira zagrevanjem na  $150^\circ\text{C}$ , kako bi se uklonila sorbovana voda, a nakon toga se može delimično deaktivirati dodatkom vode do 10%. PAU se najčešće eluiraju smešom dihlormetan/pentan (2:3, v/v). Ukoliko bi se koristio samo dihlormetan, sa kolone bi se eluirali i alkani, dok cikloheksan omogućava razdvajanje alkana, nitro i oksid PAU (*Prycek i sar.*, 2001). Aluminijum oksid ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) se takođe koristi u prečišćavanju ekstrakata za analizu policikličnih aromatičnih ugljovodonika. Nakon nanošenja uzorka, kroz kolonu se najpre propušta heksan, kako bi se eluirali alifatični ugljovodonici, a nakon toga se dihlormetanom eluiraju aromatični ugljovodonici. Silika gel i aluminijum oksid često se koriste u smeši, kako bi se postiglo bolje odvajanje PAU od ostalih komponenti (*EA*, 2003; *Lohman i sar.*, 2001).



Jedna od tehnika koje se često upotrebljavaju u prečišćavanju ekstrakata je i **ekstrakcija čvrstom fazom** (solid phase extraction - SPE). Metoda ekstrakcije čvrstom fazom je metoda kod koje dolazi do zadržavanja analita na čvrstom nosaču koji pokazuje veliki afinitet prema datom analitu. Nakon vezivanja analita za čvrstu fazu, njegovo eluiranje sa čvrste faze se vrši primenom odgovarajućeg rastvarača. Proces ekstrakcije čvrstom fazom sastoji se iz sledećih koraka:

- Kondicioniranje sorbensa - propuštanje male zapremine rastvarača kroz sorbens kako bi se isti pripremio za vezivanje analita;
- Nanošenje uzorka - propuštanje uzorka kroz sloj sorbensa, pri čemu se analit vezuje za sorbens;
- Ispiranje kolone - propuštanje male zapremine odgovarajućeg rastvarača radi uklanjanja nečistoća;
- Eluiranje - propuštanje odgovarajućeg rastvarača u kojem se analit dobro rastvara i desorpcija analita sa sorbensa.

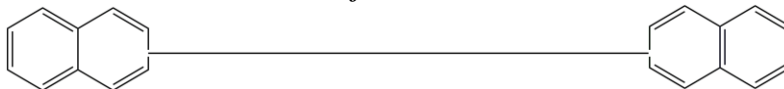
Početak upotrebe SPE vezan je za proces prečišćavanja otpadnih voda, a nakon toga ova tehnika je primenjivana u analizi insekticida, pesticida i organskih polutanata. Korišćeni sorbens može biti pakovan u obliku diska, kertridža ili šprica (Slika 12.), ali najčešće se koriste one u obliku šprica. Kretanje analita kroz stacionarnu fazu odvija se pomoću gravitacije, pritiska ili centrifuge.



**Slika 12.** Različita pakovanja sorbensa kod SPE

Primena ekstrakcije čvrstom fazom omogućava uklanjanje ometajućih komponenti iz kompleksne matrice, koncentrovanje analita i izolovanje analita.

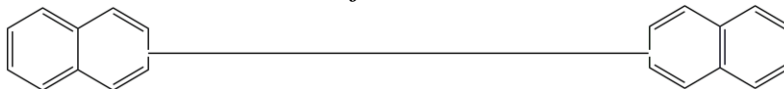
Odabir sorbensa i rastvarača zavisi od vrste analita. Kao sorbensi u SPE najčešće se koriste silikatni materijali sa polarnim i nepolarnim funkcionalnim grupama koje omogućavaju selektivne i specifične interakcije sa analitima. Na osnovu interakcija između sorbensa i



analita, ekstrakcija čvrstom fazom može biti jonoizmenjivačka, normalno-fazna i reverzno-fazna. Stacionarne faze koje se najčešće koriste su:

- Silika gel sa reverzno-faznim funkcionalnim grupama - C18 i C8 sorbensa, pakovane na sličan način kao kolone za tečnu hromatografiju (liquid chromatography - LC), ali sa većim česticama.
- Sorbensi na bazi ugljenika - Sorbensi koji su dobijeni od aktivnog uglja zagrevanjem do 3000 °C, u inertnoj atmosferi. Ovaj tip sorbenasa ima specifičnu površinu od 100 cm<sup>2</sup>g<sup>-1</sup>. Vezivanje analita za sorbens odigrava se putem hidrofobnih i elektrostatičkih interakcija. Glavna mana ovog tipa sorbensa je ireverzibilno vezivanje određenih analita.
- Sorbensi na bazi polimera - Najčešće korišćen sorbens iz ove grupe je sorbens na bazi polimera stirena i divinil benzena. Ovi sorbensi imaju određena poboljšanja u odnosu na sorbense na bazi silika gela, poput veće stabilnosti pri visokim pH. Njihova efikasnost zavisi od veličine čestica, specifične površine, dijametra pora i rasporeda čestica.
- Imunosorbensi - Njihovo delovanje se zasniva na selektivnom i reverzibilnom vezivanju antigen-antitelo, kako bi se vezali polutanti slične strukture. Ovi selektivni sorbensi lako vezuju polarne polutante. Iako postoji malo ovakvih sorbenata, njihova glavna prednost je selektivnost.

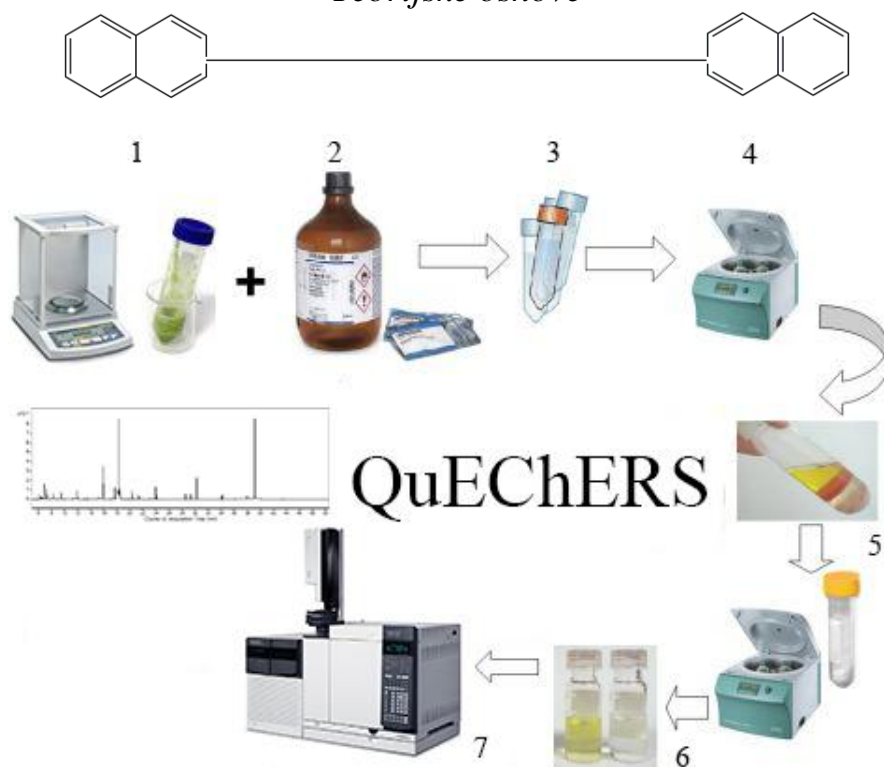
Za prečišćavanje i koncentrovanje ekstrakata u analizi PAU koriste se sorbensi na bazi oktadecil silicijum dioksida (C18) sa amino (NH<sub>2</sub>), cijano (CN) grupama (*Kicinski i sar.*, 1989), kao i oktil silicijum dioksid (C8) sorbens (*Kootstra i sar.*, 1995). Istraživanja su pokazala da i odabir hromatografske metode kojom će se analizirati PAU utiče na odabir sorbensa za postupak prečišćavanja. Sorbensi na bazi silika gela daju dovoljno čiste ekstrakte za analizu PAU tečnom hromatografijom visokih performansi sa fluorescentnim detektorom, ali ovi ekstrakti nisu dovoljno čisti za analizu gasnom hromatografijom sa masenom spektrometrijom zbog smetnji koje potiču od pojedinih alifatičnih jedinjenja (*Holoubek i sar.*, 1990). Prednost ekstrakcije čvrstom fazom u odnosu na hromatografiju na koloni je upotreba manje količine rastvarača, velika mogućnost automatizacije i dobijanje ekstrakta visoke čistoće.



#### 2.4.5. QuEChERS tehnika

Poslednjih godina javila se potreba za istovremenom analizom više komponenti metodom koja je brza, jednostavna i jeftina, ne zahteva upotrebu toksičnih rastvarača i omogućava visoku selektivnost. QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe) (Anastassiades i sar., 2003) je procedura koja kombinuje ekstrakciju tečno - tečno pomoću acetonitrila i prečišćavanje ekstrakata ekstrakcijom disperznom čvrstom fazom (dispersive solid phase extraction - dSPE). Anastassiades i saradnici (2003) su ovu tehniku primenili u analizi pesticida u voću i povrću sa visokim sadržajem vode. Nakon ekstrakcije, pesticidi su pomoću trifenil - fosfata (triphenyl phosphate - TPP) kao unutrašnjeg standarda (internal standard - IS) analizirani na GC - MS. Uloga unutrašnjeg standarda u hromatografskoj analizi je kvantifikacija željenog analita poređenjem površine pika unutrašnjeg standarda sa površinom pika analita i izračunavanje koncentracije analita na osnovu poznate koncentracije unutrašnjeg standarda. Nakon homogenizacije, uzorak se ekstrahuje pomoću acetonitrila, uz dodatak  $MgSO_4$  i  $NaCl$ , kako bi se postiglo bolje razdvajanje faza. Acetonitril ekstrahuje pesticide različite polarnosti i poseduje visoku selektivnost. Takođe, njegova prednost je i to što se meša sa vodom, pa omogućava ekstrakciju uzoraka sa visokim sadržajem vode. Upotrebom acetonitrila smanjena je i ekstrakcija nepolarnih supstanci, kao što su voskovi, masti i neki pigmenti. Potom se ekstrakt prečišćava ekstrakcijom disperznom čvrstom fazom sa PSA kao sorbensom uz dodatak  $MgSO_4$ , kako bi se uklonila voda.

## Teorijske osnove

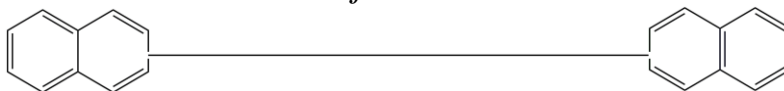


**Slika 13.** Proces pripreme uzorka QuEChERS tehnikom (<https://www.degruyter.com/view/j/chem.2015.13.issue-1/chem-2015-0109/chem-2015-0109.xml>)

1 - uzorak se odmeri i prebaci u QuEChERS kivetu; 2 - dodaju se rastvarač i soli; 3 - kiveta se mučka; 4 - uzorak u kiveti se centrifugira; 5 - alikvot ekstrakta se prebacuje u QuEChERS kivetu koja sadrži sorbens za prečišćavanje; 6 - prečišćeni ekstrakt se prebaci u vialu; 7 - analiza ekstrakta uzorka odabranom hromatografskom tehnikom

QuEChERS tehnika se uspešno primenjuje u analizi lekova, kao što su sulfonamidi (*Abdallah i sar.*, 2014), hinolini (*Lombardo-Agüi i sar.*, 2011) i benzimidazoli (*Martínez-Villalba i sar.*, 2013), mikotoksina (*Rodríguez-Carrasco i sar.*, 2014; *Koesukwiwat i sar.*, 2014; *Vaclavik i sar.*, 2010; *Liu i sar.*, 2014), lipida (*Bang i sar.*, 2014), antioksidanasa i aditiva (*Jia i sar.*, 2014), hormona i UV filtera (*Vulliet i sar.*, 2014), polihlorovanih bifenila (*Sapozhnikova i Lehotay*, 2013), ftalata (*Ma i sar.*, 2010), izoflavona (*Bustamante-Rangel i sar.*, 2013), površinski aktivnih materija (*Chen i Mullin*, 2013) i akril amida (*Omar i sar.*, 2014).

Pored ovih organskih jedinjenja, QuEChERS tehnikom analizirani su i policiklični aromatični ugljovodonici. U nekim radovima opisana je analiza svih 16 prioriternih PAU (*Kao i sar.*, 2014; *Madureira i sar.*, 2014; *Escarrone i sar.*, 2014; *Stankov Jovanovic i sar.*, 2015; *Cvetkovic i sar.*, 2016; *Smoker i sar.*, 2010), dok su u ostalim radovima analizirani samo neki PAU (*Alagic i sar.*, 2016; *Surma i sar.*, 2014; *Yoo i sar.*, 2014; *Sadowska-Rociek i sar.*, 2014; *Angioni i sar.*, 2012; *Ramalhosa i sar.*, 2009). U Tabeli 6. prikazani su parametri QuEChERS



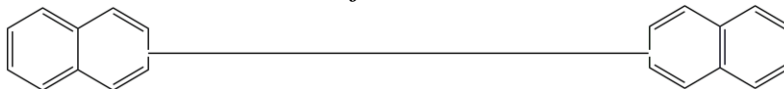
procedure korišćene za pripremu uzoraka za analizu PAU. U mnogim radovima za ekstrakciju je korišćen acetonitril u kombinaciji sa  $MgSO_4$  i  $NaCl$ , dok je u nekim umesto  $NaCl$  upotrebljavan  $NaOAc$ . Pored acetonitrila opisana je upotreba etil - acetata, kao i smeše acetona, etil - acetata i izooktana (Surma i sar., 2014; Forsberg i sar., 2011). Smeša rastvarača aceton, etil - acetat i izooktan znatno bolje ekstrahuje manje polarne PAU iz bioloških uzoraka u odnosu na acetonitril. Izooktan kao najmanje polaran rastvarač u smeši dobro ekstrahuje PAU iz masnog tkiva, dok aceton i etil - acetat kao rastvarači koji se mešaju sa vodom, omogućavaju ekstrakciju PAU iz pora uzorka bogatih vodom. Od sorbenasa korišćenih za prečišćavanje najčešće je upotrebljavan PSA u kombinaciji sa  $MgSO_4$ , ili sa dodatkom C18. PSA u kombinaciji sa anjonskim izmenjivačem predložen je za prečišćavanje u radu Sadowska-Rociek i saradnika (2014), dok je u radu Stankov Jovanovic i saradnika (2015) predložena upotreba dijatomejske zemlje kao sorbensa za dSPE u analizi PAU iz zemljišta. Dijatomejska zemlja je sorbens koji se sastoji iz 87-97%  $SiO_2$  i određene količine  $Fe_2O_3$  i  $Al_2O_3$  (Engh, 1993) i njena prednost u odnosu na preostale sorbense je činjenica da je to mineral prisutan u prirodi, te se na taj način smanjuju troškovi analize. Još jedan od sorbenasa koji potiču iz prirode, a u poslednje vreme nalazi sve širu primenu je klinoptilolit (Sekulic i sar., 2013). Klinoptilolit je zeolit koji se sastoji iz oksida slijumina, aluminijuma, gvožđa, kalcijuma, magnezijuma, natrijuma i kalijuma u promenljivom sastavu u zavisnosti od lokaliteta sa kog se prikuplja.

**Tabela 6.** Parametri QuEChERS tehnike primenjivane u analizi PAU

Analit	Uzorak	Ekstrakcija		Sorbens za dSPE	Hromatografska tehnika	Efikasnost (%)	Granica dtekcije	Komentar	Referenca
		Rastvarač	Soli						
16 PAU	Zemljište (10 g)	20 mL smeše heksan:aceton (1:1, v/v)	8 g MgSO <sub>4</sub> i 2 g NaCl	50 mg klinoptilolita i 150 mg MgSO <sub>4</sub>	GC - MS	30,61 - 86,44	-	-	<i>Stankov Jovanovic i sar., 2015</i>
16 PAU	Zemljište (10 g)	20 mL ACN	8 g MgSO <sub>4</sub> i 2 g NaCl	50 mg dijatomejske zemlje i 150 mg MgSO <sub>4</sub>	GC - MS	81,18 - 109,82	0,39 - 1,53 µg kg <sup>-1</sup>	Na početku ekstrakcije dodato 10 ml vode; upotreba unutrašnjeg standarda	<i>Cvetkovic i sar., 2016</i>
16 PAU	Crveno meso i morska hrana (5 g)	10 mL ACN	6 g MgSO <sub>4</sub> i 1,5g NaOAc	400 mg PSA i 1200 mg MgSO <sub>4</sub> ; 400 mg C18	GC - MS	71 - 104	0,1 - 2 µg L <sup>-1</sup>	Na početku ekstrakcije dodato 10 ml vode	<i>Kao i sar., 2014</i>
16 PAU	Školjke (10 g)	10 mL ACN	4 g MgSO <sub>4</sub> i 1 g NaCl	150 mg PSA i 900 mg MgSO <sub>4</sub>	GC - MS/MS	89 - 112	0,01 - 0,99 µg L <sup>-1</sup>	Upotreba unutrašnjeg standarda	<i>Madureira i sar., 2014</i>
16 PAU	Pirinač (10 g)	10 mL ACN; 1% HOAc (v/v)	6 g MgSO <sub>4</sub> i 1,5g NaOAc	50 mg PSA i 150 mg MgSO <sub>4</sub>	GC - MS	70 - 122	-	Na početku ekstrakcije dodato 10 ml vode; upotreba unutrašnjeg standarda	<i>Escarrone i sar., 2014</i>
16 PAU	Škampi (10 g)	10 mL ACN	6g MgSO <sub>4</sub> i 1,5 g NaCl	50 mg PSA i 150 mg MgSO <sub>4</sub>	LC - MS/MS	70 - 120	20 - 510 µg kg <sup>-1</sup>	Komercijalno dostupan set za QuEChERS	<i>Smoker i sar., 2010</i>
12 PAU	Šunka (8 g)	10 mL EtOAc	4 g MgSO <sub>4</sub> i 1,5 g NaCl	150 mg PSA, 300 mg C18 i 900 mg MgSO <sub>4</sub>	GC - MS	72 - 111	0,1 - 1 µg kg <sup>-1</sup>	Upotreba unutrašnjeg standarda	<i>Surma i sar., 2014</i>
14 PAU	Morski plodovi (2 g)	5 mL ACN	2 g MgSO <sub>4</sub> i 0,5 g NaCl	50 mg PSA, i 150 mg MgSO <sub>4</sub>	HPLC - FD	87 - 116	0,05 - 0,5270 µg kg <sup>-1</sup>	Ekstrakcija ponovljena dva puta	<i>Yoo i sar., 2014</i>
12 PAU	Čaj (1 g)	10 mL ACN	4 g MgSO <sub>4</sub> i 1 g NaCl	150 mg PSA, 150 mg SAX,	GC - MS	50 - 120	-	10 mL ključale vode dodato na početku,	<i>Sadowska-Rociek i</i>

				900 mg MgSO <sub>4</sub>				ekstrakcija tečno tečno nakon QuEChERS	<i>sar.</i> , 2014
17 PAU	Morski jež (1 g)	1 mL ACN	600 µg MgSO <sub>4</sub> i 150 µg NaOAc	90 mg MgSO <sub>4</sub> , 30 mg PSA i 15 mg C18	GC - MS/MS	70 - 120	0,7 -1,5 µg kg <sup>-1</sup>	-	<i>Angioni i sar.</i> , 2012
33 PAU	Losos (1 g)	2 mL smeše aceton:EtOAc:izooktan (2:2:1, v/v/v)	6 g MgSO <sub>4</sub> i 150 µg NaOAc; 4g MgSO <sub>4</sub> , 1g NaAc, 1 g tris- Na, 0,5 g di- Na	50 mg PSA, 50 mg C18, 150 mg MgSO <sub>4</sub>	GC - MS	70 - 120	2-10 µg kg <sup>-1</sup>	Komercijalno dostupan set za QuEChERS	<i>Forsberg i sar.</i> , 2011
16 PAU	Riba (5 g)	8 mČ ACN	6 g MgSO <sub>4</sub> i 1,5 g NaOAc	900 mg MgSO <sub>4</sub> , 300 mg PSA i 150 mg C18	LC - FD	70 - 120	0,09 - 1,40 µg L <sup>-1</sup>	Komercijalno dostupan set za QuEChERS	<i>Ramalhosa i sar.</i> , 2009



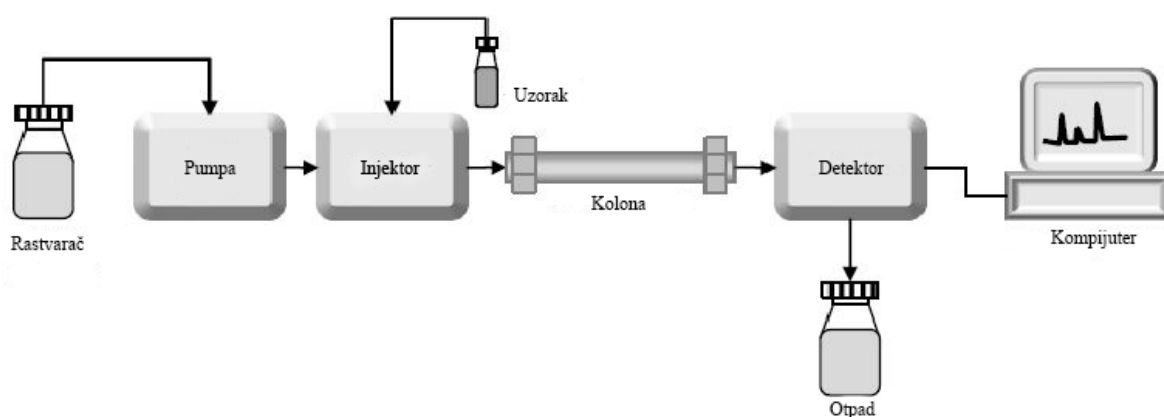


### 2.4.6. Instrumentalna analiza

Kako su količine PAU u uzorcima izuzetno niske, tehnike pripreme uzoraka i analize moraju biti veoma specifične i osjetljive. Najširu primenu u instrumentalnoj analizi PAU imaju metoda tečne hromatografije visokih performansi (HPLC) i gasna hromatografija sa masenom spektrometrijom (GC - MS) (*Khan i sar.*, 2005).

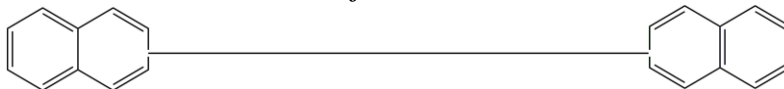
#### 2.4.6.1. Tečna hromatografija visokih performansi

**Tečna hromatografija visokih performansi (HPLC)** je analitička tehnika koja se koristi za razdvajanje, identifikaciju i kvantifikaciju komponenata iz različitih uzoraka. Princip HPLC-a je da se mala količina uzorka u struji odgovarajuće mobilne faze injektuje, a zatim se pod dejstvom pumpe uzorak i mobilna faza kreću kroz sistem i dolaze na kolonu sa stacionarnom fazom (Slika 14.). Na koloni dolazi do interakcija između komponenata uzorka i stacionarne faze i u zavisnosti od navedenih interakcija, različite komponente se različito vreme zadržavaju na koloni. Vreme za koje se neka komponenta ispere sa kolone naziva se retenciono vreme ( $R_t$ ). Komponente se identifikuju na osnovu poređenja njihovog retencionog vremena sa  $R_t$  standarda. Za svaki HPLC sistem vezan je detektor i kompjuter sa specijalnim softverskim programom pomoću kojih se dobijaju i obrađuju hromatogrami, identifikuju i kvantifikuju komponente. Izdvojene komponente sa kolone dolaze u detektor, koji ih registruje i šalje električni signal kompjuteru.



**Slika 14.** Šema HPLC sistema

([https://www.researchgate.net/publication/236146377\\_Chromatography\\_in\\_Bioactivity\\_Analysis\\_of\\_Compounds/figures?lo=1](https://www.researchgate.net/publication/236146377_Chromatography_in_Bioactivity_Analysis_of_Compounds/figures?lo=1))

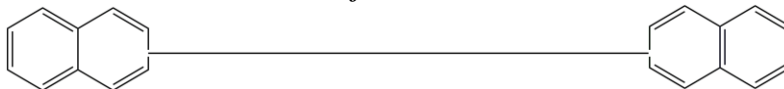


HPLC kolone koje se koriste u analizi najčešće su C18 kolone dužine 15-25 cm i unutrašnjeg prečnika do 4,6 mm. Kolone unutrašnjeg prečnika manjeg od 4,6 mm se biraju sa ciljem uštede mobilne faze, ali pri upotrebi takvih kolona neophodno je smanjenje zapremine injektovanog uzorka. U HPLC analitičkoj tehnici se koriste dva osnovna načina eluiranja. Prvi je izokratsko eluiranje, kod koga sastav mobilne faze, bilo da se radi o čistom rastvaraču ili o smeši rastvarača, ostaje isti tokom celog procesa hromatografisanja. Kako bi se postiglo što bolje razdvajanje neophodno je koristiti gradijentno eluiranje koje podrazumeva promenu sastava mobilne faze u toku eluiranja. Ovaj način je koristan za uzorke koji sadrže jedinjenja u širokom opsegu polarnosti, kada izokratsko eluiranje ne dovodi do zadovoljavajućeg razdvajanja komponenti ispitivane smeše. Za proces eluiranja često se koristi smeša metanol/voda ili acetonitril/voda. Primenjuje se program: gradijentno, smeša 50% metanol/voda ili acetonitril/voda do 100% metanola ili acetonitrila, od 0 do 40 minuta, a zatim izokratski, od 40 do 60 minuta, nakon čega se u roku od 5 minuta ponovo uspostavlja početni uslovi (*Khan i sar.*, 2005). U cilju smanjenja upotrebe toksičnih organskih rastvarača, kao mobilna faza u HPLC analizi PAU uvedena je sub-kritična voda (*Nollet*, 2005). Na povišenoj temperaturi smanjuje se viskozitet mobilne faze, a samim tim povećava efikasnost kolone. Takođe, smanjenjem dielektrične konstante smanjuje se polarnost, i na taj način omogućava analiza manje polarnih komponenti kao što su PAU.

U zavisnosti od komponenata koje se ispituju mogu se koristiti različiti detektori (*Kromidas*, 2006):

- UV detektor - komponenta koja se analizira absorbuje u UV oblasti;
- Fluorescentni detektor (FLD) - komponenta koja se analizira ima sposobnost da fluorescira;
- Detektor sa nizom dioda (diode array detector - DAD) - komponenta koja se analizira absorbuje u UV oblasti;
- ELSD detektor (evaporative light - scattering) - komponenta ne apsorbuje dovoljno u UV oblasti;
- Maseni detektor (mass spectrometer - MS).

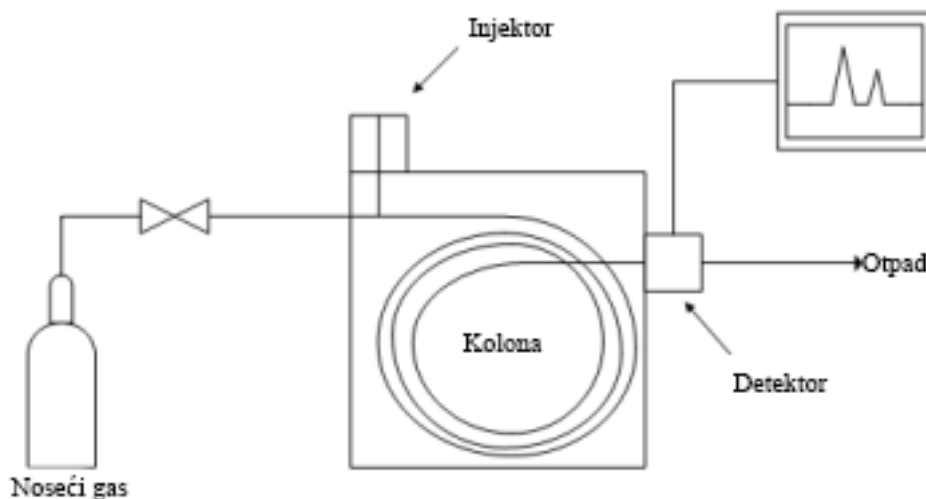
U analizi PAU najčešće se upotrebljavaju fluorescentni i UV detektori, ali prednost se daje fluorescentnom detektoru. PAU se eluiraju blizu jedni drugima, na bliskim retencionim vremenima, a njihovi UV spektri su slični, pa je u tom slučaju preporučena upotreba dva detektora. Prisustvo kiseonika u rastvaraču smanjuje signale PAU na fluorescentnom



detektoru, pa se kiseonik mora obavezno ukloniti iz rastvarača pre analize. Povećanje temperature neznatno smanjuje vreme analize, međutim, primećeno je da na temperaturama nižim od sobne (10-15 °C) dolazi do boljeg razdvajanja komponenti bliskih retencionih vremena, pa čak i nekih geometrijskih izomera (Nollet, 2005).

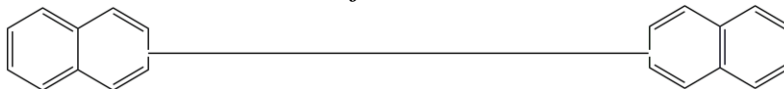
#### 2.4.6.2. Gasna hromatografija sa masenom spektrometrijom

**Gasna hromatografija** (GC) je metoda razdvajanja i detekcije lako isparljivih organskih jedinjenja. Ovaj vid hromatografije primenjuje se za analizu onih jedinjenja koja se bez degradacije mogu prevesti u gasovito stanje. Kao mobilna faza kod ovog tipa hromatografije se koristi gas, najčešće argon ili helijum. Stacionarna faza je sloj tečnosti ili polimera na inertnoj čvrstoj podlozi koji se nalazi unutar kolone. Ispitivani uzorak se meša sa mobilnom fazom, kreće se kroz stacionarnu fazu, čime se razdvaja na komponente, pa ih je moguće dalje analizirati. Različite komponente uzorka imaju različit afinitet prema stacionarnoj fazi, pa se usled različitih interakcija zadržavaju na koloni različiti vremenski period. Nakon eluiranja, analit dospeva do detektora koji je povezan sa računarom na čijem se ekranu prikazuje hromatogram. Svaki signal u hromatogramu odgovara jednom hemijskom jedinjenju i okarakterisan je retencionim vremenom i površinom. Na Slici 15. prikazana je šema gasnog hromatografa.



**Slika 15.** Šema gasnog hromatografa

([https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gas\\_chromatograph.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gas_chromatograph.png))



Prema načinu pripreme i prečniku kolone se mogu podeliti na:

- Kapilarne kolone - zidovi su obloženi nekom aktivnom materijom. Napravljene su od topljenog silika gela sa poliimidnom oblogom. Dužina im može biti i do 60 m dok je prečnik izrazito mali i iznosi 0,125-0,250 mm;
- Punjene kolone - izrađene su od nerđajućeg čelika ili stakla i inertnog punjenja, presvučenog tečnom ili čvrstom stacionarnom fazom. Dužine su od 1,5 do 10 m, prečnika od 2 do 4 mm, sadržaj tečne faze iznosi od 5 do 10%, a prosečni prečnik zrna inertnog nosača od 100 do 150  $\mu\text{m}$ .

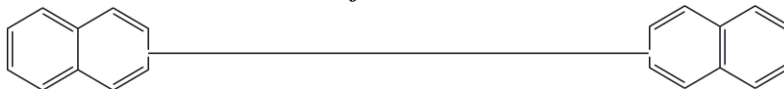
U gasnoj hromatografiji se koristi više tipova detektora. Najčešće korišćeni detektori su plameno jonizacioni detektor (flame ionization detector - FID) i termalno provodljivi detektor (thermal conductivity detector - TCD). Termalno provodljivi detektori mogu detektovati većinu komponenti čija je termalna provodljivost veća od termalne provodljivosti nosećeg gasa na zadatoj temperaturi. Plameno jonizacioni detektori su osetljiviji na ugljovodonična jedinjenja i ne detektuju vodu. Takođe, prednost TCD detektora nad FID detektorom je da ne uništava ispitivane komponente, dok ih plameno jonizacioni detektor sagoreva.

U današnje vreme najčešće se koristi maseni spektrometar kao detektor, koji je zbog svoje osetljivosti, brzine i granice detekcije zauzeo vodeće mesto u odnosu na ostale detektore. Maseni spektrometar je analitički instrument koji razdvaja naelektrisane čestice u magnetnom polju, prema odnosu mase i naelektrisanja. Sastoji se od:

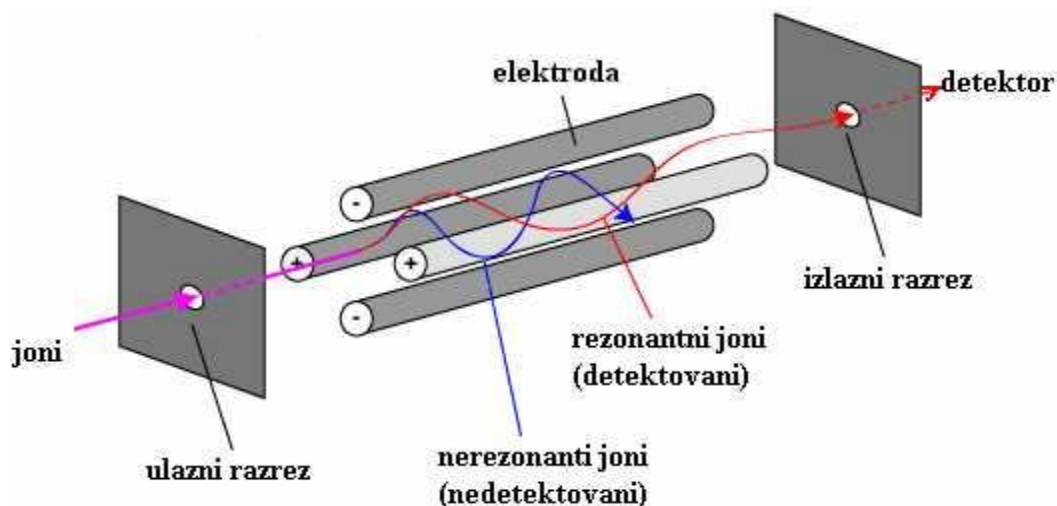
1. Sistema za uvođenje uzorka;
2. Jonskog izvora;
3. Masenog analizatora;
4. Detektora.

Jonski izvor je deo masenog spektrometra u kome nastaju joni analiziranih molekula usled izbijanja elektrona, zahvata elektrona, protonovanja, deprotonovanja ili građenja adukata. U zavisnosti od vrste izvora energije za jonizaciju razlikuju se sledeći tipovi jonizacije:

- EI (electron impact - elektronski udar);
- CI (chemical ionization - hemijska jonizacija);
- FAB (fast atom bombardment - bombardovanje brzim atomima);
- MALDI (matrix assisted laser desorption - laserska desorpcija sa matriksa);
- FD&FI (field desorption/ionization - desorpcija/jonizacija u jakom polju);
- ESI (electrospray ionization - jonizacija elektrosprejom).



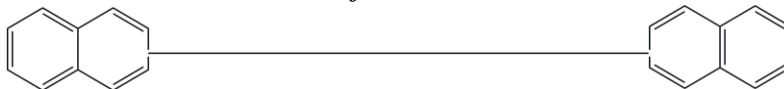
Maseni analizator je deo masenog spektrometra gde se joni razdvajaju na osnovu odnosa mase i naelektrisanja ( $m/z$ ). Postoji više vrsta masenih analizatora koji se razlikuju po tome što koriste statičko ili dinamičko, električno ili magnetno polje ili njihovu kombinaciju, a dele se na: kontinualne, kvadrupolne, magnetne, pulsne, jon trap analizatore, analizatore na bazi vremena preleta, analizatore sa dvostrukim fokusiranjem. Najčešće korišćeni analizator u analizi PAU je analizator na bazi kvadrupola (Slika 16.).



**Slika 16.** Šema masenog analizatora na bazi kvadrupola (<https://www.tehnologijahrane.com/enciklopedija/maseni-spektrometar>)

Posle ubrizgavanja, joni različitih masa se nalaze između četiri elektrode, na koje je priključen izvor naizmenične struje. Promena napona dovodi do odvajanja jona na osnovu njihovih masa. Nakon razdvajanja bivaju usmereni u detektor koji konvertuje jone u električni signal koji se može registrovati na pisaču, računaru ili na nekom drugom uređaju. Električni signali se detektuju u vidu masenih spektara.





## 2.5. Validacija analitičkih metoda

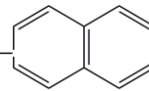
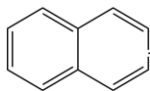
Zadatak svake analitičke laboratorije je postizanje brzih, tačnih i verodostojnih rezultata. Iz tog razloga neophodno je opisati analitičke metode na način koji omogućava dobijanje tačnih i pouzdanih rezultata. Validacija analitičke metode je postupak dokazivanja da analitička metoda ispunjava određene uslove za široku primenu (*Swartz i Krull, 1997*). Validacijom se mogu utvrditi i uzroci eventualnih problema koji nastaju prilikom izvođenja metode, čime se postiže veliki stepen pouzdanosti i pogodnosti metode. Vreme i novac uloženi u validaciju analitičke metode višestruko se isplate prilikom njene upotrebe. Validacija analitičke metode mora se izvršiti u sledećim slučajevima:

- Razvoja i uvođenja nove metode;
- Promene bilo kojeg dela već validovane analitičke metode;
  - Promena parametara koji su izvan opsega postojeće metode;
  - Poboljšanje postojeće metode;
  - Korišćenje metode u drugoj laboratoriji;
  - Korišćenje metode na drugom instrumentu.

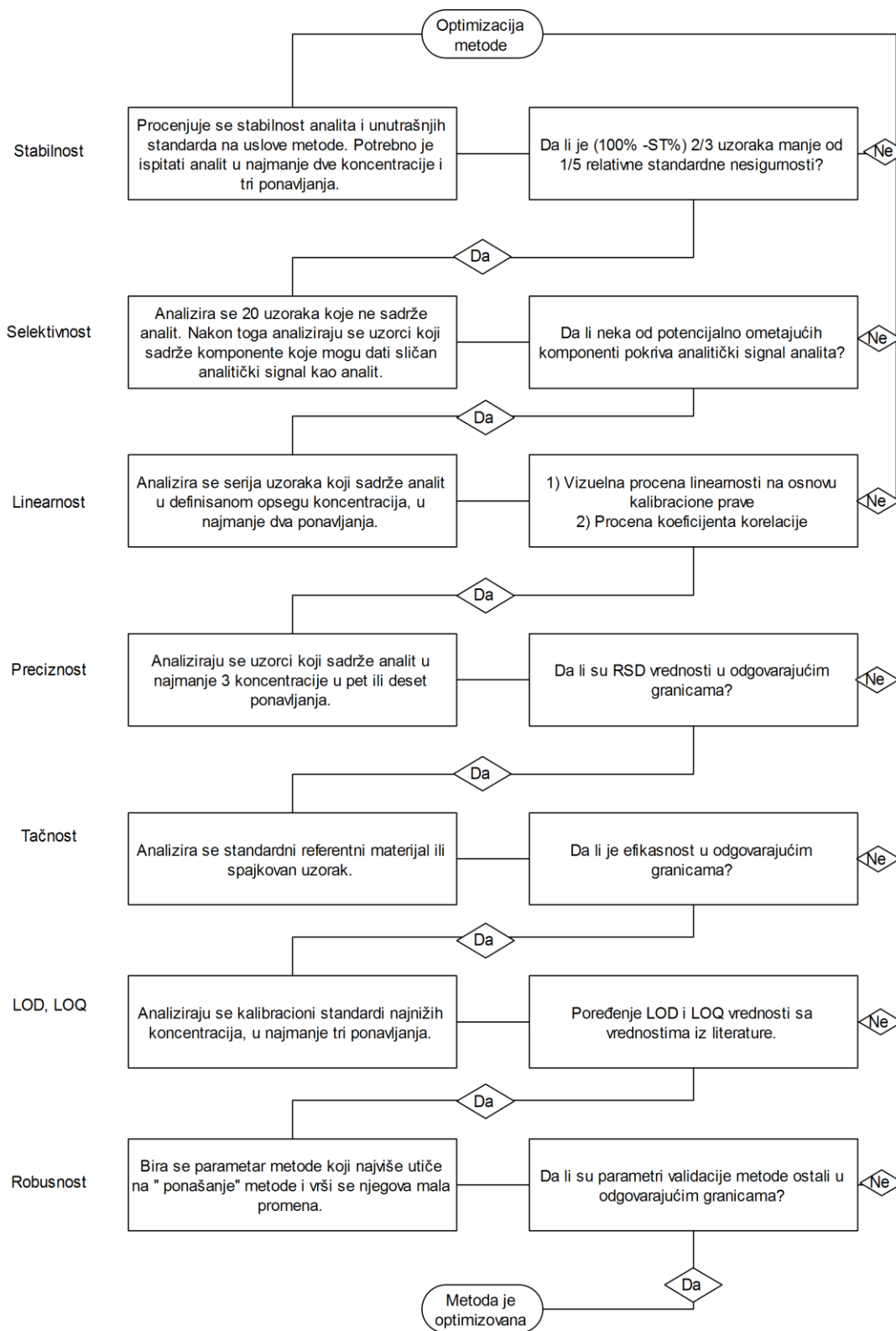
Ne postoji zvaničan protokol kako izvršiti validaciju analitičke metode, već postoje samo određene smernice i zahtevi koji se moraju ispuniti prilikom validacije. Ono što je osnova validacije bilo koje analitičke metode je izvođenje eksperimenata u kojima se koriste uzorci i/ili standardi slični uzorcima za čiju je analizu metoda namenjena (*Peters i sar., 2007*). Postupak validacije se sastoji od nekoliko različitih koraka: odabira analitičke metode, načina uzorkovanja, pripreme uzorka, provođenja eksperimenata i statističke obrade podataka (*Araujo, 2009*). Izvođenje eksperimenata se odnosi na dobijanje kvalitativnih ili kvantitativnih informacija iz uzoraka sa prihvatljivim nivoom nesigurnosti. Analiza podataka sastoji se od matematičkih i statističkih postupaka koji vode smislenim informacijama i zaključcima o eksperimentu i validaciji metode u celini (*Araujo, 2009*).

U procesu validacije neophodno je:

- Definisati svrhu i opseg korišćenja metode;
- Definisati parametre izvođenja i njihovih granica prihvatljivosti;
- Definisati validacione eksperimente;
- Definisati svojstva opreme i kvalitet hemikalija;
- Definisati detalje metode za njenu primenu;
- Dokumentovati validacione eksperimente;

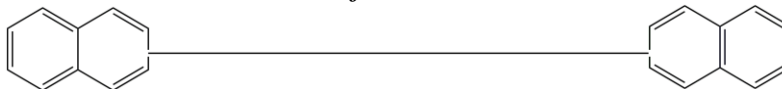


Na osnovu podataka iz literature na slici 17. prikazana je šema validacije analitičke metode:



Slika 17. Šema procesa validacije analitičke metode



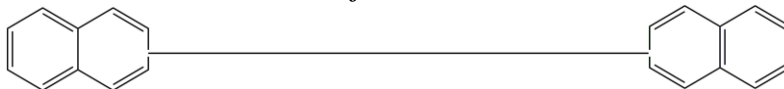


Prilikom validacije metode neophodno je odrediti sledeće parametre:

1. Specifičnost/selektivnost;
2. Linearnost;
3. Analitički opseg metode (radno područje);
4. Preciznost;
  - Ponovljivost,
  - Međupreciznost,
  - Reproductivnost,
5. Tačnost (efikasnost);
6. Granica kvantifikacije;
7. Granica detekcije;
8. Robusnost;
9. Efekat matrice;
10. Merna nesigurnost.

### 2.5.1. Specifičnost/selektivnost

Specifičnost/selektivnost je svojstvo metode da tačno i specifično odredi željeni analit u prisustvu ostalih komponenata u matriksu uzorka, pod utvrđenim uslovima ispitivanja (*Thompson i sar.*, 2002). Iako se u praksi često poistovećuju, specifičnost i selektivnost su dva različita svojstva metode. Specifična metoda je ona kojom se može odrediti samo jedan specifičan analit (analitički signal daje samo jedan analit). Prema preporukama *IUPAC-a* (1983) termin specifičnost je pogodniji za upotrebu u slučaju da se metodom može odrediti željeni analit u prisustvu ometajućih komponenti. Metoda kojom se može određivati više komponenata istovremeno, ali pod uslovom da te komponente pri određivanju ne smetaju jedna drugoj, naziva se selektivnom (*EURACHEM/WELEC*, 1993). Prilikom određivanja selektivnosti neophodno je ispitati svaku moguću komponentu koja može da daje analitički signal sličan signalu željenog analita. Za metodu koja je selektivna za jedan analit ili grupu analita može se reći da je specifična, ali metoda koja je specifična ne mora biti i selektivna. Može se reći da se selektivnost odnosi na analizu više komponenti istovremeno, bez uticaja analitičkog signala jedne komponente na analitički signal druge. Sa druge strane, specifičnost se odnosi na analizu samo jedne komponente. Kada se procenjuje selektivnost analitičke



metode u obzir treba uzeti parameter kao što su moguće hemijske reakcije, adsorpcija na površini sorbensa, biohemijski i elektrohemijski procesi u kojima učestvuje analit.

Često je selektivnost metode procenjena kvalitativno. Međutim, postoje i kvantitativna merila selektivnosti. Najčešće je u upotrebi indeks selektivnosti  $b_{an}/b_{int}$ , gde je  $b_{an}$  nagib kalibracione krive željenog analita, a  $b_{int}$  nagib komponente koja se može smatrati ometajućom.  $b_{int}$  je parametar koji se približno može odrediti analizom slepe probe spajkovane potencijalno ometajućom komponentom, u odsustvu analita. Selektivnost hromatografskih metoda može biti procenjena i na sledeći način:

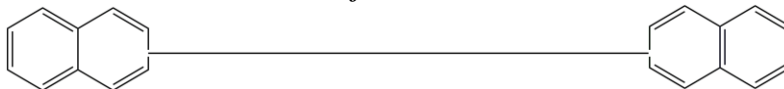
- Poređenjem hromatograma dobijenih snimanjem uzorka koji sadrži analit i slepe probe;
- Poređenjem hromatograma dobijenih snimanjem uzorka koji sadrži i uzorka koji ne sadrži potencijalno ometajuće komponente;
- Analizom standardnog referentnog materijala.

Specifičnost metode procenjuje se dodavanjem potencijalno ometajućih supstanci u uzorak koji sadrži analit i procenom da li ometajuća komponenta daje analitički signal. U slučaju hromatografskih metoda specifičnost zavisi od koncentracije i određuje se za niske koncentracije kalibracionih standarda.

### 2.5.2. Linearnost

Linearnost predstavlja mogućnost da se metodom, unutar radnog opsega koncentracije analita, dobije linearna zavisnost analitičkog signala od koncentracije analita. Opseg linearnosti zavisi od prirode analita i tipa detektora. U praksi se linearnost određuje merenjem odziva metode na različite poznate koncentracije referentnog materijala, odnosno konstruisanjem kalibracione prave.

Linearnost se procenjuje računski i grafički. Računski način procene se vrši na taj način što se primenom linearne regresije izrazi jednačina prave ( $y = ax + b$ ) i izračuna koeficijent korelacije ( $r$ ). Nagib prave ( $a$ ) ukazuje na osetljivost metode. Što je vrednost nagiba veća, metoda je osetljivija, jer će za manju promenu koncentracije da se dobija veći signal, i obrnuto. Ukoliko je vrednost nagiba prave jednaka nuli, metoda nije osetljiva na ispitivani analit. Odsečak prave ( $b$ ) može ukazati na sistematsku grešku. Ukoliko je vrednost  $b > 0$ , to znači da na signal analita utiče matriks uzorka. Ukoliko se efekat matriksa ukloni, a vrednost



odsečka je i dalje veća od 0, to znači da je metoda opterećena sistematskom greškom. Ukoliko je  $b < 0$ , to znači da je metoda opterećena greškom instrumenta. Ako je  $b = 0$  metoda nije opterećena sistematskom greškom. Za koeficijent korelacije obično se postavlja kriterijum  $r \geq 0,99$ , dok se za jako niske koncentracije prihvata se uslov  $r \geq 0,98$ .

Kod grafičkog prikaza, najčešće su u upotrebi:

- Grafički prikaz odstupanja od regresionog pravca u odnosu na koncentraciju ili logaritmu koncentracije;
- Grafički prikaz relativnih signala (odnos signala i odgovarajuće koncentracije) na osi y i odgovarajućih koncentracija na osi x log skale.

U oba slučaja, kalibraciona prava treba da bude linearna, da prolazi kroz nultu tačku i da ne zavisi od matriksa uzorka.

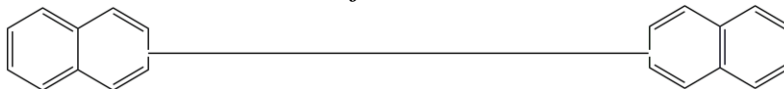
Kako bi se konstruisala kalibraciona prava, neophodno je snimiti standardnu (kalibracionu) seriju. Ne postoje posebne smernice u pogledu vrste i broja korišćenih kalibracionih standarda, ali najčešće je neophodno snimiti šest ili više standardnih rastvora različitih koncentracija u najmanje tri ponavljanja. Raspon koncentracija treba obuhvatiti najmanje 80-120 % od očekivane koncentracije analita u uzorku.

Prema preporukama Međunarodne konferencije o usklađivanju tehničkih uslova za registraciju lekova za ljudsku upotrebu (*ICH*, 1995) linearnost metode treba proceniti na osnovu statističkih testova, što se u praksi retko poštuje.

Na linearnost masenog spektrometra kao detektora utiče ponašanje uzorka u jonskom izvoru i transport jona od jonskog izvora do masenog analizatora. Ukoliko efikasnost jonizacije ne zavisi od koncentracije analita u jonskom izvoru linearnost je bolja. Takođe, linearnost je bolja u slučaju da broj jona koji dospe do detektora odgovara broju jona nastalom u jonskom izvoru.

### 2.5.3. Opseg metode (radno područje)

Opseg analitičke metode predstavlja interval između gornjeg i donjeg nivoa koncentracije merenog analita u uzorku (uključujući i te koncentracije) u kome se analiza može vršiti sa određenom tačnošću, preciznošću i linearnošću. Za određivanje ovog parametra nije potrebno izvoditi zasebne eksperimente, opseg se može odrediti ispitivanjem tačnosti i linearnosti metode. Za mnoge bioanalitičke metode rasponi koncentracija su najčešće široki, npr. 1-100,



1-1000 ili čak i širi. U širokim kalibracionim opsezima, relativno mala odstupanja od pretpostavljenog modela mogu dovesti to značajnih grešaka u predviđenim koncentracijama kod kalibracionog opsega (*Hartmann i sar.*, 1998).

#### 2.5.4. Preciznost

Preciznost podrazumeva procenu slaganja između numeričkih vrednosti dva ili više rezultata dobijenih merenjima izvedenim na isti način (*Thompson i sar.*, 2002; *ISO*, 2004). Najčešće se izražava vrednošću standardne devijacije ( $s$ ) ili relativne standardne devijacije (RSD). Ukoliko se preciznost metode izrazi preko relativne standardne devijacije, prihvatljive su vrednosti manje od 20% (*OECD*, 2013). U slučaju validacije metode neophodno je da se merenja vrše sa tri različite koncentracije analita (niska, srednja i visoka koncentracija), u najmanjen tri ponavljanja (3 nivoa koncentracije x 3 ponavljanja = 9 uzoraka).

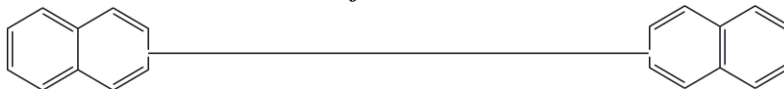
Preciznost se izražava kao:

**Ponovljivost** je parameter validacije kojim se izražava preciznost rezultata analize istog uzorka koji pod istim uslovima analizira isti analitičar, u istoj laboratoriji, na istoj opremi u kratkom vremenskom intervalu.

**Srednja preciznost** odgovara merenjima izvršenim pod promenljivim uslovima u jednoj laboratoriji. Merenje se vrši istom metodom, na istom uzorku, u istoj laboratoriji, a izvodi ga različit analitičar, na različitoj opremi u određenim vremenskim razmacima između merenja.

**Reproduktivnost** predstavlja podudaranje rezultata dobijenih uzastopnim merenjem nekoliko istih uzoraka istom metodom u različitim laboratorijama (različit analitičar, različiti radni uslovi unutar specifičnih parametara metode).

Razlika između ponovljivosti, srednje preciznosti i reproduktivnosti prema smernicama *ISO* (2004) prikazana je u Tabeli 7:

**Tabela 7.** Razlika između ponovljivosti, srednje preciznosti i reproduktivnosti

	Uslovi	Ponovljivost	Srednja preciznost	Reproduktivnost*
<b>Isti uslovi</b>	Analitičar	Da	Da/Ne	Da/Ne
	Postupak (metoda)	Da	Da	Da/Ne
	Instrument i uslovi snimanja	Da	Da	Da/Ne
	Laboratorija	Da	Da	Da/Ne
	Reagensi	Da	Da	Da/Ne
	Dan	Da	Ne	Da/Ne

\*- Jedan ili više uslova mogu biti promenjeni

Na osnovu Tabele 7. mogu se izvesti sledeći zaključci:

- U procesu validacije metode pogrešno je koristiti termin dnevna preciznost, jer se on podrazumeva pod pojmom srednja preciznost;
- Ponovljivost omogućava da ne dolazi do promene rezultata pri identičnim uslovima, kao što su uslovi aparata, koji analitičar izvodi analizu, u kojoj se laboratoriji analiza izvodi i slično;
- Reproductivnost rezultata ukazuje na to da je promena rezultata konstantna pri različitim uslovima analize.

Preciznost se izražava standardnom devijacijom  $S$  (Jednačina 1), relativnom standardnom devijacijom (RSD) (Jednačina 2), varijansom  $S^2$  (Jednačina 3).

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad \text{Jednačina (1)}$$

$S$  - standardna devijacija

$x_i$  - pojedinačni sadržaj svake probe, dobijen određivanjem

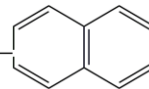
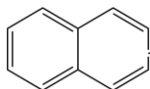
$\bar{x}$  - srednja vrednost određivanja

$$RSD (\%) = \frac{S}{\bar{x}} * 100 \quad \text{Jednačina (2)}$$

RSD - relativna standardna devijacija

$S$  - standardna devijacija

$\bar{x}$  - srednja vrednost određivanja



$$S^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1} \quad \text{Jednačina (3)}$$

$S^2$  - varijansa

$x_i$  - pojedinačni sadržaj svake probe, dobijen određivanjem

$n$  - broj određivanja

$\bar{x}$  - srednja vrednost određivanja

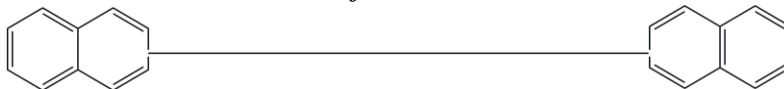
### 2.5.5. Tačnost (efikasnost)

Tačnost analitičke metode je stepen saglasnosti između stvarne i vrednosti dobijene primenom analitičkog postupka određeni broj puta (*Thompson i sar.*, 2002; *Miller i Miller*, 2000). Smatra se da je tačnost metode najvažniji parametar koji se proverava prilikom validacije analitičke metode. Određivanje ovog parametra omogućava procenu uticaja sistematske greške metode na krajnji rezultat. Zvanične preporuke IUPAC-a su da se određivanje tačnosti vrši za tri različite koncentracije (niska, srednja i visoka), u najmanje tri ponavljanja. Na tačnost metode u velikoj meri utiču način pripreme uzorka i koncentracija analita u uzorku. U praksi se tačnost analitičke metode proverava:

- Analizom standardnih referentnih materijala (SRM) - materijali koje sadrže analit u tačno definisanoj koncentraciji, u matriksu koji odgovara matriksu uzorka.
- Određivanjem efikasnosti - U slučaju da ne postoji odgovarajući SRM, u uzorak koji ne sadrži analit se dodaje tačno određena koncentracija analita, i na osnovu očekivane vrednosti koncentracije određuje se efikasnost (metoda standardnog dodatka). Prema preporukama IUPAC ovaj način provere tačnosti koristi se u slučaju tečnih uzoraka ili uzoraka koji podležu potpunom razgradnji prilikom rada.
- Upoređivanjem sa drugom (referentnom) metodom, koja je potvrđena kao tačna - Određeni broj uzoraka analizira se referentnom i metodom koja se validuje, i vrši se poređenje dobijenih rezultata.

Dobijena tačnost u velikoj meri zavisi od načina pripreme uzorka, matriksa i koncentracije uzorka. Za određivanje tačnosti treba koristiti najmanje tri različite koncentracije analita u uzorcima i svaku pojedinačnu analizu ponoviti tri puta. Za svaku probu efikasnost se izračunava na osnovu sledećeg izraza (Jednačina 4):

$$\text{efikasnost (\%)} = \frac{\text{signal (uzorak + dodatak)}}{\text{signal (dodatak)}} * 100 \quad \text{Jednačina (4)}$$



Prema preporukama OECD (2013) prihvatljive vrednosti za efikasnost zavise od količine analita u uzorku. Prihvatljive vrednosti za efikasnost prikazane su u Tabeli 8.

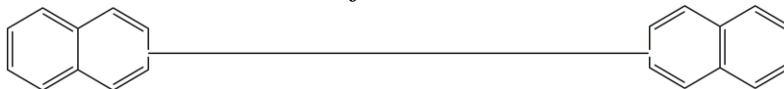
**Tabela 8.** Prihvatljive vrednosti za tačnost i ponovljivost metode u odnosu na koncentraciju analita

Udeo analita u uzorku (%)	Prihvatljiva efikasnost (%)	Prihvatljiva RSD vrednost (%)
100	98 - 102	1,3
10	98 - 102	1,9
1	97 - 103	2,7
0,1	95 - 105	3,7
0,01	90 - 107	5,3
0,001	80 - 110	7,3
0,0001	80 - 110	11
0,00001	80 - 110	15
0,000001	60 - 115	21
0,0000010	40 - 120	30

### 2.5.6. Granica detekcije

Najniža koncentracija analita koja se može detektovati u uzorku, ali ne i kvantitativno odrediti, naziva se granicom detekcije (limit of detection - LOD). Granica detekcije se još naziva i limit detekcije. Postoji nekoliko pristupa određivanju LOD:

- grafički - zasniva se na određivanju analita tačno poznate koncentracije. Nakon određivanja analita poznate koncentracije vrši se razblaživanje uzorka i postupak određivanja se ponavlja sve dok analit u uzorku više nije moguće detektovati. Poslednja koncentracija pri kojoj je bilo moguće detektovati analit predstavlja granicu detekcije. Određivanje granice detekcije na ovaj način može se primeniti i kod neinstrumentalnih metoda.
- na osnovu odnosa signal/šum bazne linije (S/N) - za granicu detekcije obično se uzima vrednost koncentracija koje daju  $S/N = 3$  ili  $S/N = 2$ . Primenjuje se samo na metode kod kojih postoji bazna linija.



- na osnovu standardne devijacije odgovora detektora i nagiba kalibracione prave (S/N) - izračunava se po formuli (Jednačina 5):

$$LOD = \frac{3,3 S}{a} \quad \text{Jednačina (5)}$$

LOD - granica detekcije;

S - standardna devijacija odgovora detektora dobijena višestrukim merenjem slepe probe;

a - nagib kalibracionog grafika.

S se dobija kao standardna devijacija serije merenja signala uzorka bez analita, ili kao standardna devijacija odsečka na ordinati dobijenog iz kalibracione prave sa koncentracijama bliskim LOD.

### 2.5.7. Granica kvantifikacije

Granica kvantifikacije, odnosno limit kvantifikacije (limit of quantification - LOQ), definiše se kao najmanja količina analita u uzorku koja se može kvantitativno odrediti sa prihvatljivom preciznošću i tačnošću (Swartz i Krull, 1997). Određuje se na sličan način kao i granica detekcije:

- grafički - analizom uzorka u kome analit ima tačno poznatu koncentraciju, pa njegovim razblaživanjem i ponovnom analizom do momenta kada sa dovoljnom tačnošću nije moguće kvantifikovati analit u uzorku;
- upotrebom odnosa S/N - za granicu kvantifikacije uzima se odnos S/N = 10;
- korišćenjem jednačine:

$$LOQ = \frac{10 S}{a} \quad \text{Jednačina (6)}$$

LOQ - granica kvantifikacija;

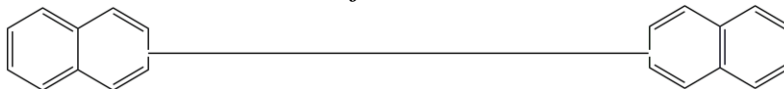
S - standardna devijacija odgovora detektora dobijena višestrukim merenjem slepe probe;

a - nagib kalibracionog grafika.

### 2.5.8. Robusnost

Robusnost se definiše kao mera otpornosti analitičkog postupka na male, namerne promene radnih uslova metode (Thompson i sar., 2002). Prilikom ispitivanja robusnosti hromatografskih metoda, uslovi koji se ispituju su temperatura kolone, zapremina uzorka koja se injektuje, sastav mobilne faze. Ispitivanje robusnosti je važan deo razvoja metode jer pomaže otkrivanju optimalnih uslova za izvođenje metode i na taj način upućuje na one





parametre koje treba kontrolisati. Tokom eksperimenata menjaju se radni uslovi unutar određenih granica i prati promena rezultata. Ako promena nekog radnog uslova ne utiče bitno na rezultat, kaže se da je on u području robusnosti metode. Uslove za koje je utvrđeno da utiču na rezultat treba držati pod nadzorom i to jasno naznačiti u opisu metode. Robusnost, kao karakteristiku metode, nije neophodno određivati u svakoj laboratoriji (*Hartmann i sar.*, 1998). Robusnost analitičke metode obično se interpretira na sledeći način:

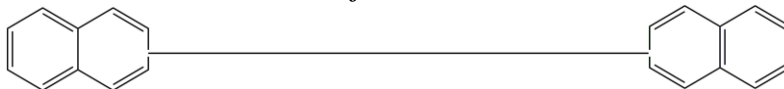
- Ne dolazi do promene koncentracije analita koja je određena sa promenom nekog od uslova rada;
- Ne dolazi do promene nekog od ključnih parametara metode (npr. granica detekcije) sa promenom nekog od uslova rada.

Prilikom testiranja robusnosti može se uvideti da li male promene uslova utiču na celokupan analitički postupak i izvode se zaključci o eventualnoj ponovnoj validaciji metode. Najbolji način za proveru robusnosti metode je hemometrijski pristup. Robusnost je parametar koji se prilikom validacije često zanemaruje, što može dovesti do smanjenja efikasnosti i tačnosti metode vremenom, a ponovna validacija zahteva dug vremenski period.

### 2.5.9. Efekat matrice

Prilikom validacije analitičke metode neophodno je definisati i tip uzorka na koji se metoda može primeniti kako bi se uzele u obzir komponente koje mogu uticati na analitičku metodu. Ukoliko ne postoje dodatni podaci o tipu uzorka koji se analizira, povećava se i merna nesigurnost celog postupka.

Prilikom validacije hromatografskih metoda preporuka je da se efekat matrice ispituje snimanjem uzorka koji sadrži analit i poređenjem tog hromatograma sa hromatogramom slepe probe odnosno rastvarača (*Rogatsky i Stein*, 2005). Još jedan od načina provere efekta matrice je snimanje hromatografa uzorka koji je pripremljen dodavanjem analita u matricu koja se analizira i hromatograma koji je dobijen snimanjem rastvarača u koji je dodat analit. Ukoliko je matrica uzorka kompleksna ili ne postoji uzorak koji ne sadrži analit, tada se prati koncentracija izotopski obeleženog unutrašnjeg standarda u uzorku i u slepoj probi. Na hromatogramu se efekat matrice obično vidi kroz smanjenje intenziteta pika analita.



### 2.5.10. Merna nesigurnost

Merna nesigurnost je parametar, pridružen rezultatu merenja, koji karakteriše disperziju vrednosti koja bi razumno mogla da se pripiše merenoj veličini. Merna nesigurnost je kvantitativni pokazatelj kvaliteta rezultata merenja. Merna nesigurnost:

- daje odgovor na pitanje koliko dobro rezultat predstavlja vrednost merene veličine, omogućava korisniku rezultata da oceni njegovu pouzdanost.
- omogućava poređenje rezultata merenja dobijenih iz različitih izvora, različitim metodama, u različitim laboratorijama i tako pomaže smanjivanju komunikacionih barijera i finansijskih troškova.
- značajna i presudna je za ocenu usaglašenosti, kada se rezultat poredi sa graničnim vrednostima definisanim specifikacijom ili propisima.

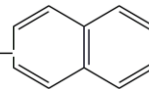
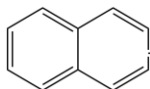
Preporuke ISO (2004) su da se merna nesigurnost procenjuje preko sledećih parametara:

- Nesigurnost tipa A - procenjuje se statističkim metodama, najčešće preko standardne devijacije;
- Nesigurnost tipa B - procenjuje se eksperimentalnim putem, korišćenjem podataka iz literature i upotrebom referentnih materijala;
- Kombinovana merna nesigurnost - kombinacija nesigurnosti tipa A i B, izražava se preko standardne devijacije.

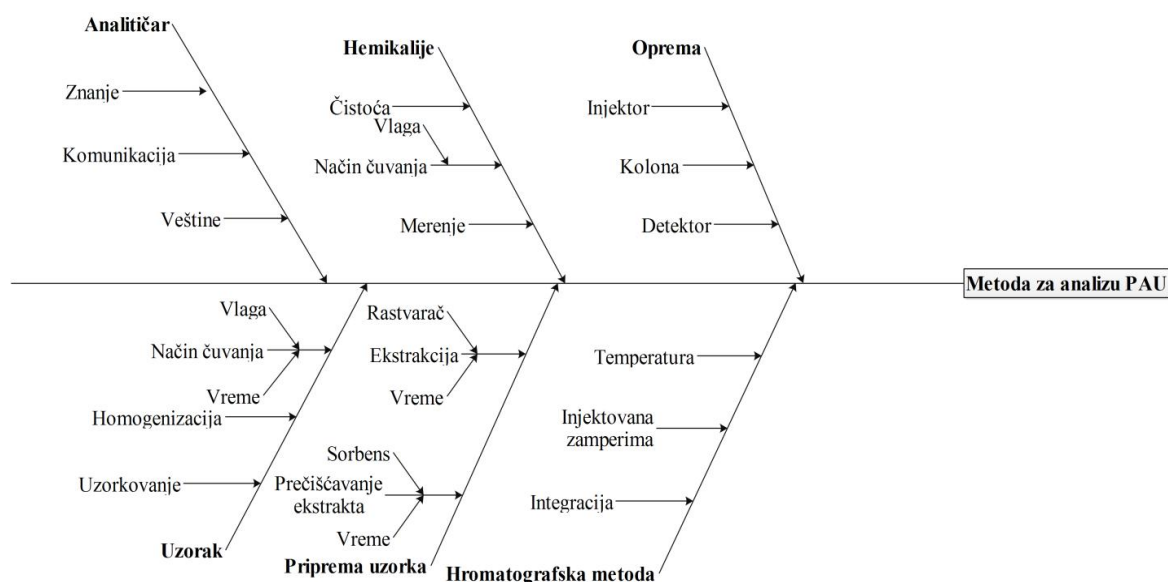
Nesigurnost merenja može biti procenjena na osnovu sledeće jednačine:

$$u[y(x_1, x_2, \dots)] = \sqrt{\sum_{i=1, n} c_i^2 u(x_i)^2} \quad \text{Jednačina (7)}$$

gde je  $y(x_1, x_2, \dots)$  funkcija nekoliko nezavisnih varijabli  $(x_1, x_2, \dots)$ ,  $c_i$  koeficijent osetljivosti, a  $u(x_i)$  standardna nesigurnost merenja koja je izražena preko standardne devijacije. Kako je  $u[y(x_1, x_2, \dots)]$  funkcija nekoliko zasebnih nesigurnih komponenti može se nazvati i kombinovana standardna nesigurnost merenja. Kako bi izračunali kombinovanu standardnu nesigurnost neophodno je najpre proceniti pojedinačne standardne nesigurnosti merenja. Pojedinačna standardna nesigurnost merenja izračunata je na osnovu standardne devijacije merenja koje je vršeno u tri ponavljanja. Nakon određivanja standardne nesigurnosti, neophodno je pomnožiti je faktorom pokrivenosti (coverage factor,  $k$ ), kako bi dobili kombinovanu standardnu nesigurnost. Ukoliko se radi o normalnoj raspodeli i broj stepeni slobode je visok, za vrednost faktora pokrivenosti obično se uzima 2. Kombinovana standardna nesigurnost obično se procenjuje za nivo poverenja 95%.

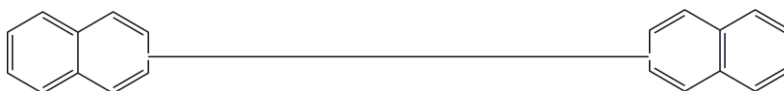


Na nesigurnost merenja utiče mnogo faktora, kao što su loša procena količine analita u uzorku, uzorak koji nije reprezentativan, nepoznavanje faktora koji utiču na proces merenja, netačne vrednosti dobijene određivanjem analita u standardnom referentnom materijalu, aproksimacije prilikom izvođenja analize itd. Ono što je sigurno je da se ni jedno merenje ne može u potpunosti interpretirati bez određivanja merne nesigurnosti. Uticaj različitih faktora na mernu nesigurnost može se predstaviti dijagramom uzrok - posledica - Išikava (Ishikawa) dijagram. Dijagram uzrok - posledica je rezultat opšte analize uticaja (uzroka) koji uslovljavaju određeni ishod posmatrane pojave (procesa) (Premović, 2005). Na Slici 18. prikazan je Išikava dijagram koji opisuje uticaj različitih parametara na proces validacije metode.



**Slika 18.** Išikava dijagram za metodu analize PAU u uzorcima zemljišta primenom GC - MS





## 2.6. Statistička analiza

Pojam statističke analize od početka njenog korišćenja do današnjih dana znatno se menjao. Prema *Kendalu* (1943) statistika predstavlja mnoštvo metoda kojima se obrađuju podaci dobijeni merenjem osobina populacije ili prirodnih fenomena. Sa druge strane *Hand* (2009) je statistiku opisao kao zabavan način interpretacije podataka, postavljanje značajnih filozofskih pitanja i mogućnost donošenja bitnih odluka u nauci, medicini, industriji, politici. Statistika se može podeliti na deskriptivnu, koja se bavi opisivanjem, sređivanjem i sažimanjem podataka dobijenih analizom, i interferencijalnu, kojom se pronalazi pravilnost u raspodeli uzoraka i razlike među njima. Skup svih elemenata na kojima se određena pojava statistički posmatra naziva se populacija ili osnovni skup. Deo populacije koji je odabran za statističku analizu naziva se uzorak. Karakteristike uzoraka koje se proučavaju nazivaju se varijable (*Babbie*, 2009).

U današnje vreme istraživanje u nauci nije moguće zamisliti bez upotrebe statističke analize koja se izvodi upotrebom statističkih programa kao što su Statistica, SPSS, PSPP, XLSTAT, NCSS i mnogi drugi.

Značajnu granu statističke analize predstavlja multivarijantna statistička analiza (MVS), koja predstavlja statistički postupak kojom se ispituje odnos više varijabli. Koristi se nakon sprovedene univarijantne i/ili bivarijantne statistike. Pre pojave MVS u statističkoj analizi koristile su se najviše dve varijable istovremeno i rezultati statističkih istraživanja bili su ograničeni na određivanje aritmetičke sredine, varijanse, standardne devijacije, interval poverenja i statističke testove. Varijabla ili promenljiva u kontekstu multivarijantne analize je bilo koja pojava koja slobodno varira na takav način da se te varijacije mogu identifikovati i izmeriti. Većina tehnika multivarijacione statistike identifikuje šablone (obrasce) podudarnosti ili odnosa između mnogo varijabli, ocenjuju relativnu važnost svake varijable i predviđa ili objašnjava moguće ishode. Multivarijantna statistička analiza omogućava razumevanje odnosa između većeg broja varijabli i određuje šablone podudarnosti među njima. Primenom tehnika multivarijantne statistike znatno su se povećale količine upotrebljivih informacija koje mogu da se izvuku iz posmatrane statističke mase.

Tehnike multivarijantne analize mogu se podeliti na tehnike zavisnosti i tehnike međuzavisnosti.



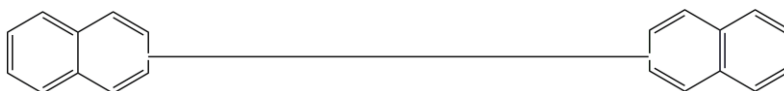
Kod tehnika koje analiziraju zavisnost cilj je da se na osnovu ostalih, nezavisnih varijabli objasni jedna zavisna varijabla i predvide njene varijacije Ovoj grupi pripadaju:

- Višestruka regresija i korelacija;
- Diskriminaciona analiza;
- Kanonička analiza;
- Logit analiza;
- Conjoint analiza;
- AID (Automatic interaction detection) i CHAID (Chi square automatic interaction detection).

Tehnike međuzavisnosti polaze od podjednake važnosti svih varijabli. U ovom slučaju cilj je utvrditi odnos između varijabli, kako bi se pronašle varijable koje su slične. U ovu grupu spadaju:

- Analiza glavnih komponenti;
- Faktorska analiza;
- Klaster analiza;
- Korespondentna analiza;
- Strukturalne jednačine;
- Multidimenzionalno skaliranje.

**Analiza glavnih komponenti** (principal component analysis - PCA) predstavlja statističku analizu koja omogućava redukciju skupa podataka, koji sadrže veliki broj međusobno povezanih promenljivih, tako da bude obuhvaćena što veća količina varijanse podataka (Jeong i sar., 2009). Prvi je ovu tehniku opisao Karl Pearson 1901. godine. Izračunavanje je vršeno sa malim brojem varijabli (dve ili tri). Razvojem i usavršavanjem statističkih programa došlo je i do razvoja PCA analize. Hromatografskim metodama dobija se veliki broj podataka koji je teško interpretirati, pa je PCA analizom omogućena redukcija podataka, njihovo grupisanje, klasifikacija i utvrđivanje odnosa između varijabli. Ova vrsta multivarijantne statističke analize varijaciju podataka opisuje glavnim komponentama (PC - principal components). Najbolji rezultati se postižu kada su originalne varijable u visokoj korelaciji, bilo pozitivnoj ili negativnoj. Ukoliko varijable nisu u međusobnoj korelaciji, PCA analizom se ne dobija nikakav rezultat.



Ciljevi PCA analize su:

- Redukcija dimenzionalnosti podataka (smanjenje broja izvornih varijabli na mali broj indeksa koji su linearna kombinacija izvornih varijabli - glavne komponente);
- Interpretacija podataka.

PCA analizom podaci se redukuju njihovom geometrijskom projekcijom dajući na taj način glavne komponente. Izvedena glavna promenljiva predstavlja prosek standardizovanih vrednosti obeležja originalnih promenljivih i može se posmatrati kao indeks. Prva glavna komponenta (PC1) smanjuje rastojanje između originalnih podataka i njihovih projekcija. Smanjenjem rastojanja povećava se varijansa između projektovanih tačaka. Druga glavna komponenta (PC2) dobija se na sličan način, ali ne sme biti u korelaciji sa PC1. Cilj PCA analize je da varijanse većine tako estrahovanih glavnih komponenata budu toliko male da su zanemarljive. U tom slučaju, veći deo varijacija originalnih podataka se može adekvatno opisati sa svega nekoliko glavnih komponenti,

Analiza glavnih komponenti izvodi se u sledećim koracima:

1. Standardizacija originalnih podataka tako da originalne varijable imaju aritmetičku sredinu jednaku nuli i varijansu jednaku jedinici. Ovaj korak je posebno važan, s obzirom na to da su varijable vrlo često različitog reda veličina, različitih jedinica i slično;
2. Izračunavanje matrice kovarijansi;
3. Izračunavanje ajgen vrednosti i odgovarajućih ajgen vektora. Glavna komponenta je tako iskazana preko koeficijenta  $a_i$  i varijanse  $\lambda_i$ ;
4. Eliminacija komponenti koje se u modelu odnose na mali deo varijacije podataka.

Suština analize glavnih komponenti je podela korelacione (kovarijansne) matrice na ajgen vrednosti (svojstvene vrednosti). Ajgen vrednost određuje količinu varijacije opisanu pomoću faktorskih koordinata, pri čemu najveći uticaj ima prva komponenta (Arfken, 1985). Ukoliko je ajgen vrednost veća od 1, to znači da PCA računa više varijanse u odnosu na originalne promenljive, i za dalje tumačenje rezultata koriste se ove koordinate. Ajgenvektori (koeficijenti glavnih komponenti) su standardizovani tako da suma njihovih kvadrata iznosi 1 za svaki ajgenvektor. Rezultati PCA analize najčešće se prikazuju kao doprinos promenljivih komponenti.



**Klaster analiza** vrši grupisanje varijabli u grupe (klustere), tako da se slične jedinice nađu u istoj grupi (*Hair i sar.*, 2010). Za razliku od ostalih statističkih tehnika, klaster analiza varijable ne procenjuje empirijski, već koristi one koje su zadate od strane istraživača (*Hair i sar.*, 2010). Grupisanje podataka se vrši na osnovu rezultata (skora) koji se izračunava na osnovu vrednosti obeležja po svim varijablama, za svaku jedinicu posmatranja posebno. Izbor varijabli je ključni korak u klaster analizi i zavisi od zadatih ciljeva. Od velikog je značaja u analizu uključiti one varijable koje najbolje predstavljaju koncept sličnosti koji se istražuje. Iako se klaster analiza pominje u nauci od početka prošlog veka, do značajnog razvoja ove statističke tehnike dolazi sa razvojem računara i softvera. Klaster analiza se može dobro iskoristiti za redukciju podataka predmda što je više varijabli uključeno u analizu i što su one više međusobno nezavisne, to je teže pronaći odgovarajući obrazac za grupisanje jedinica posmatranja.

Metodologija klaster analize uključuje sledeće korake (*Hair i sar.*, 2010):

- Određivanje ciljeva klaster analize;
- Izbor istraživačkog obrasca;
- Postavljanje pretpostavki;
- Formiranje i procena broja klastera;
- Interpretacija klastera;
- Procena klaster analize i profiliranje klastera.

Konačan rezultat klaster analize je podela objekata u klustere u skladu sa zadatim ciljevima. U klaster analizi razlikuju se dva osnovna pristupa - hijerarhijski i nehijerarhijski.

U hijerarhijskoj klaster analizi (hierarchical cluster analysis - HCA) glavni rezultat analize je dendrogram, koji je zapravo grafički prikaz klastera u obliku stabla. Kod ovog tipa analize najpre se izračunava udaljenost svih jedinica, a potom se vrši formiranje grupa tehnikom spajanja ili razdvajanja. Kod hijerarhijske klaster analize razlikuju se aglomerativni i divizionni pristup. Aglomerativni hijerarhijski metod (tehnika spajanja) polazi od toga da je svaka jedinica sama u grupi. Grupe se spajaju po sličnosti, dok se na kraju sve ne nađu u istoj grupi. Divizionni hijerarhijski pristup (tehnika razdvajanja) je suprotan u odnosu na aglomerativni - od jedne grupe stvaraju se dve, pa od te dve sledeće dve i tako sve dok svaka jedinica posmatranja ne bude posebno.





Tehnike grupisanja u hijerarhijskoj klaster analizi mogu se podeliti na sledeći način:

- Jednostruko povezivanje (tehnika najbližeg suseda) - prva dva činioca klastera su varijable sa najmanjom udaljenošću, i na ovaj način određena je i udaljenost klastera. Formiranje sledećih klastera takođe je uslovljeno najmanjom udaljenošću između članova klastera;
- Potpuno povezivanje (tehnika najdaljeg suseda) - udaljenost dva klastera računa se kao udaljenost između dva najudaljenija člana;
- Povezivanje na osnovu prosečne udaljenosti između grupa - udaljenost između dva klastera izračunava se na osnovu prosečne udaljenosti između svih parova koji se mogu formirati u dva klastera. Na primer, ako klaster 1 čine objekti a i b, a klaster 2 objekti c i d udaljenost između klastera 1 i 2 može se odrediti kao prosek udaljenosti između parova objekata: (a,c), (a,d), (b,c) i (b,d);
- Vardova (Ward) metoda - izračunaju se aritmetičke sredine za svaku varijablu, pa se za svaki objekt računa kvadrirano Euklidovo rastojanje i vrednosti se sabiraju. Spajaju se oni klasteri za koje je ukupni zbir ovih rastojanja najmanji.

Nehijerarhijski pristup je takav da se vrši raščlanjivanje, tako da jedinice mogu da se kreću iz jedne u drugu grupu u različitim fazama analize. Određuje se centralni klaster u kom se nalaze sve jedinice posmatranja. Nakon toga, određuje se drugi klaster i ukoliko su objekti posmatranja bliži njemu, raspoređuju se u drugi klaster. Postupak se ponavlja dok svi objekti ne budu grupisani.

Za izračunavanje udaljenosti između jedinica posmatranja koristi se Euklidovo rastojanje (Jednačina 8):

$$d_{ij} = \left\{ \sum_{k=1}^p (x_{ik} - x_{jk})^2 \right\}^{\frac{1}{2}} \quad \text{Jednačina (8)}$$

gde je  $x_{ik}$  vrednost jedinice posmatranja  $x_i$  za varijablu  $X_k$ , a  $x_{jk}$  vrednost jedinice posmatranja  $x_j$  za varijablu  $X_k$ .

Velika prednost klaster analize je to što omogućava jednostavnu interpretaciju istraživanja kojima se dobija veliki broj podataka. Grupisanjem dobijenih podataka pomoću klaster analize karakteristike populacije svode se na manji broj opservacija, uz minimalan gubitak informacija. Međutim, nedostatak klaster analize je taj što je procena broja i pripadnosti klasteru često subjektivna i zavisi od metode kojom se klasterovanje vrši (hijerarhijski ili nehijerarhijski pristup).



*Eksperimentalni deo*





### **3. Eksperimentalni deo**

#### **3.1. Aparati**

Za analizu pripremljenih ekstrakata korišćen je 7890/7000B GC - MS/MS uređaj, sa triplkvadрупolom (QqQ), proizvođača (Agilent Technologies, SAD) koji je opremljen Combi PAL uzorkivačem (semplerom).

Sadržaj metala u uzorcima zemljišta određen je na Inductively Coupled Atomic Emission Spectrometer, ICP-OES (Thermo Scientific, United Kingdom), model 6500 Duo.

Uzorci zemljišta za određivanje sadržaja teških metala pripremljeni su pomoću Milestone ETHOS One Advanced Microwave Digestion System (Soriso, Italija).

pH vrednost merena je pH metrom (Hanna Instruments, SAD)

Elektroprovodljivost uzoraka zemljišta merena je konduktometrom (Hanna Instruments, SAD).

#### **3.2. Rastvori i reagensi**

U radu su korišćeni sledeći reagensi i rastvori:

PAH Kit 601-N koji sadrži acenaften, acenaftilen, antracen, benzo[a]antracen, benzo[a]piren, benzo[b]fluoranten, benzo[g,h,i]perilen, benzo[k]fluoranten, hrizen, dibenzo[a,h]antracen, fluoranten, fluoren, indeno[1,2,3-cd]piren, naftalen, fenantren i piren kao čvrste supstance (Supelco, Bellefonte, Pensilvanija),

Unutrašnji standardi acenaften  $d_{10}$  i perilen  $d_{12}$  (Supelco, Bellefonte, Pensilvanija),

Surrogat Standard Mix  $4 \text{ mg mL}^{-1}$  koji sadrži 2-hlorfenol-3,4,5,6- $d_4$ , 1,2-dihlorbenzen- $d_4$ , 2-fluorobifenil, 2-fluorofenol, nitrobenzen- $d_5$ , fenol- $d_6$ , p-terfenil- $d_{14}$ , 2,4,6-tribromfenol (Supelco, Bellefonte, Pensilvanija),

Acetonitril, HPLC grade (Sigma Aldrich, Nemačka),

*n*-Heksan, HPLC grade (VWR International S.A.S, Francuska),

Cikloheksan, HPLC grade (Sigma Aldrich, Nemačka),

## *Ekperimentalni deo*



Etil-acetat, HPLC grade (Merck, Darmstadt, Nemačka),

Dihlormetan, HPLC grade (Sigma Aldrich, Nemačka),

Aceton, HPLC grade (Merck, Darmstadt, Nemačka),

PSA (United Chemical Technologies UCT, Horsham, Pensilvanija),

Dijatomejska zemlja (Sigma Aldrich, Nemačka),

C18 (United Chemical Technologies UCT, Horsham, Pensilvanija),

Florisil (United Chemical Technologies UCT, Horsham, Pensilvanija),

Klinoptilolit (rudnik Zlatokop, Vranjska Banja, Srbija),

Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Sigma Aldrich, Nemačka),

Silika gel (Sigma Aldrich, Nemačka),

MgSO<sub>4</sub> (Sigma Aldrich, Nemačka),

NaCl (Sigma Aldrich, Nemačka),

HCl (Merck, Darmstadt, Nemačka),

HNO<sub>3</sub> (Merck, Darmstadt, Nemačka),

KCl (Merck, Darmstadt, Nemačka),

K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (Merck, Darmstadt, Nemačka)

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Merck, Darmstadt, Nemačka),

H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (Merck, Darmstadt, Nemačka),

FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (Zdravlje, Leskovac)

Difenilamin (Sigma Aldrich, Nemačka),

Multistandard koji sadrži Al, Ca, Fe, Na, Mg, P, S, Ag, As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Ga, Hg, In, Li, Mn, Ni, Sr, Pb i Zn u koncentracijama od 1000 mg L<sup>-1</sup>, (Merck, Darmstadt, Nemačka),

Dejonizovana voda korišćena za rad imala je specifičnu provodljivost 0,05 μS cm<sup>-1</sup>.



### 3.3. Priprema standardnih rastvora policikličnih aromatičnih ugljovodonika

Standardni rastvor koji sadrži 16 policikličnih aromatičnih ugljovodonika u koncentraciji  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  za svaku komponentu, osim benzo[g,h,i]perilena ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) pripremljen je rastvaranjem čvrstih supstanci u smeši cikloheksan/acetona (1:1, v/v). Nakon toga ovaj rastvor je razblažen tako da je koncentracija svakog od PAU iznosila  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ , osim benzo[g,h,i]perilena ( $12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Ovako pripremljeni rastvori korišćeni su za konstrukciju kalibracione prave.

Standardni rastvor unutrašnjeg standarda koji sadrži perilen  $d_{12}$  ( $80 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) i acenaften  $d_{10}$  ( $80 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), i rastvor surogat standarda (*p*-terfenil- $d_{14}$  u koncentraciji  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) pripremljeni su u dihlormetanu. Unutrašnji standard u uzorke se dodaje kako bi na osnovu poređenja površina pika unutrašnjeg standarda i pika analita mogla da se odredi koncentracija analita u uzorku, dok se surogat standard u uzorke dodaje kako bi se pratila efikasnost ekstrakcije.

Svi standardni rastvori su čuvani na  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ , u tamnim bocama sa šlifovanim zaptivačem, u propisanom vremenskom periodu.

Kalibracione prave 16 analiziranih komponenti konstruisane su snimanjem serije standardnih rastvora PAU. Standardna serija pripremljena je odmeravanjem standardnog rastvora koji sadrži 16 PAU (koncentracije pojedinačnih PAU u ovom rastvoru iznosile su  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ , osim benzo[g,h,i]perilena ( $12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) i dodatkom smeše rastvarača cikloheksan/acetona do određene zapremine. Postupak pripreme serije rastvora i koncentracije PAU koji su korišćeni za konstruisanje kalibracione prave prikazan je u Tabeli 9.

## Eksperimentalni deo



**Tabela 9.** Odmerene zapremine i koncentracije PAU korišćene za konstrukciju kalibracione prave

Redni broj kalibracionog standarda	Zapremina rastvora 16 PAU (μL)	Zapremina smeše rastvarača cikloheksan/acetona (μL)	Pojedinačna koncentracija 15 PAU u viali (μg mL <sup>-1</sup> )	Koncentracija benzo[g,h,i]perilena u viali (μg mL <sup>-1</sup> )
1	10	990	0,1923	0,0962
2	25	975	0,4808	0,2404
3	50	950	0,9615	0,4808
4	100	900	1,9231	0,9616
5	200	800	3,8461	1,9231
6	500	500	9,6154	4,8077
7	750	250	14,4230	7,2115
8	1000	750	19,2307	9,6154

Pored standardnog rastvora PAU, u svaku vialu dodato je po 200 μl unutrašnjeg standarda i 100 μl surogat standarda. Sva merenja vršena su u tri ponavljanja.



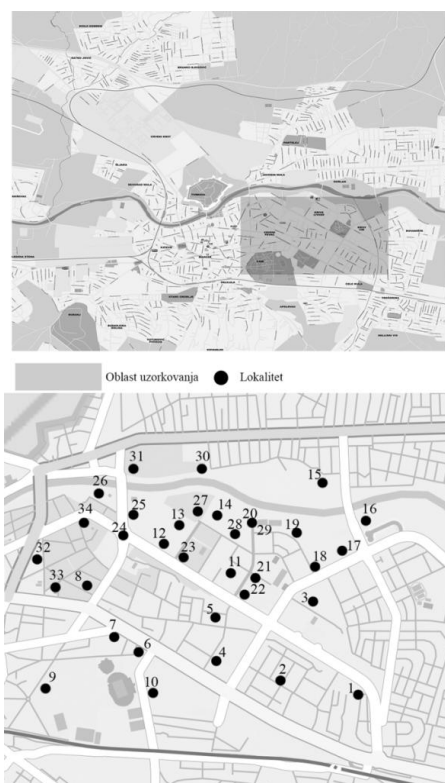


### 3.4. Priprema model uzoraka zemljišta

Model uzorci zemljišta pripremljeni su od uzoraka zemljišta prikupljenog na nezagađenom području. Pre pripreme model uzoraka utvrđeno je da uzorci zemljišta prikupljeni na nezagađenom području ne sadrže analizirane komponente po metodi EA (2003). Nakon što je potvrđeno da u ovim uzorcima ne postoje policiklični aromatični ugljovodonici, dodata je određena količina standardnog rastvora koji sadrži 16 PAU - spajkovanje uzoraka. U uzorke zemljišta dodat je standardni rastvor PAU, i na taj način su dobijeni model uzorci zemljišta, koji sadrže PAU u koncentracijama  $5,0 \text{ mg kg}^{-1}$ ;  $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$  and  $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$  ukupnih PAU. Nakon dodatka standardnog rastvora PAU, uzorci su ostavljeni da stoje 12 sati pre ekstrakcije.

### 3.5. Prikupljanje realnih uzoraka zemljišta

Realni uzorci zemljišta prikupljeni su u Nišu, u gradskom području u februaru 2015. godine (Slika 19.). Na svakom mestu određenom za uzorkovanje, uzorak je uzet iz centra i četiri ugla zamišljenog kvadrata, sa dubine 5 - 20 cm. Ovako prikupljen uzorak je homogenizovan, prosejan i sušen na vazduhu, a nakon toga čuvan na  $-18 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .



**Slika 19.** Mapa lokaliteta sa kojih su prikupljeni realni uzorci (grad Niš)



U Tabeli 10. prikazan je detaljan opis lokaliteta na kojima su prikupljeni uzorci:

**Tabela 10.** Detaljan opis lokaliteta na kojima su prikupljeni uzorci zemljišta

<b>Lokalitet</b>	<b>Opis mesta uzorkovanja</b>
1	U blizini saobraćajnice, pored reke
2	U blizini kuća, u ulici sa malim protokom saobraćaja
3	U blizini parka
4	Pored saobraćajnice
5	U blizini benzinske pumpe
6	U blizini bolnice
7	U blizini autobuske stanice
8	U blizini raskrsnice prometnih saobraćajnica
9	U blizini parka
10	U blizini stadiona
11	U blizini autobuske stanice
12	U blizini autobuske stanice
13	U blizini gradske toplane
14	Pored reke, u blizini gradske toplane
15	U blizini kuća koje za grejanje koriste fosilna goriva
16	U blizini kuća koje za grejanje koriste fosilna goriva
17	U blizini prometne saobraćajnice
18	U blizini prometne raskrsnice
19	U blizini saobraćajnice, pored reke
20	Pored reke, u blizini gradske toplane
21	Pored reke, u blizini gradske toplane
22	U blizini stambenih zgrada, pored saobraćajnice
23	Pored parka, u blizini saobraćajnice
24	U blizini autobuskog parking
25	U blizini prometne raskrsnice
26	U blizini benzinske pumpe
27	U blizini mosta, pored reke
28	Pored reke, u blizini parking za autobuse
29	Pored reke, u blizini parking za autobuse
30	U blizini fabrike
31	U blizini fabrike
32	U blizini kuća
33	U blizini dečjeg igrališta, pored puta
34	U blizini kuća



### **3.6. Optimizacija ultrazvučne ekstrakcije za analizu PAU iz uzoraka zemljišta**

Ekstrakcija model uzoraka zemljišta ultrazvukom izvršena je na sledeći način: 5 g model uzorka zemljišta odmereno je u erlenmajer i dodato je 45 mL smeše rastvarača heksan/aceton (1:1 v/v) ili cikloheksan/aceton (1:1 v/v). Ekstrakcija je trajala 30 ili 60 minuta, i nakon toga ekstrakt je filtriran i uparen do suva na rotacionom vakuum uparivaču. Suvi ostatak je rastvoren u normalnom sudu zapremine 5 mL. Alikvot od 1 mL prebačen je u QuEChERS kivetu zapremine 2 mL koja sadrži 50 mg PSA i 500 mg aktiviranog  $\text{Al}_2\text{O}_3$  i centrifugiran 10 minuta na 8000 obrtaja u minutu. Nakon centrifugiranja 0,6 mL prebačeno je u vialu i nakon dodatka 200  $\mu\text{L}$  unutrašnjeg standarda i snimljeno na GC - MS.

Uzorci zemljišta sa verifikovanim odsustvom PAU (slepa proba) tretirani su na isti način kao i model uzorci zemljišta.

Svi uzorci su pripremljeni u tri ponavljanja.

### **3.7. Optimizacija ekstrakcije po Soksletu i prečišćavanja dobijenih ekstrakata**

Model uzorci zemljišta ekstrahovani su ekstrakcijom po Soksletu, prema propisu Britanske agencije za zaštitu životne sredine (EA, 2003). Odmereno je 40 g zemljišta u čauru i smešteno u aparaturu po Soksletu. Nakon toga, u balon je dodato 300 mL dihlormetana i uzorci su ekstrahovani 8 sati. Kada je ekstrakcija završena, ekstrakt je uparen na manju zapreminu (do 5 mL), prebačen u normalni sud od 25 mL i rastvoren u heksanu.

Prečišćavanje ovako dobijenih ekstrakata vršeno je hromatografijom na koloni i ekstrakcijom disperznom čvrstom fazom.

Sorbensi korišćeni za hromatografiju na koloni su aktivirani silika gel i aluminijum oksid. Kondicioniranje kolone izvršeno je heksanom, a nakon toga je 5 mL ekstrakta naneto na kolonu, a PAU su eluirani smešom dihlormetan/heksan (2:3, v/v) u balon od 100 mL. Nakon toga je izvršeno uparavanje do zapremine od 1 mL, ekstrakt je prebačen u vialu i nakon dodatka 200  $\mu\text{L}$  unutrašnjeg standarda (perilen  $d_{12}$  (80  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) i acenaften  $d_{10}$  (80  $\mu\text{g mL}^{-1}$ )) snimljen na GC - MS.

Prečišćavanje ekstrakcijom disperznom čvrstom fazom rađeno je u QuEChERS kivetama od 2 mL koje su sadržale 150 mg sorbensa. Sorbensi koji su testirani bili su PSA, C18, silika gel,



florisil, dijatomejska zemlja i klinoptilolit. Alikvot ekstrakta (1,5 mL) dobijen nakon ekstrakcije po Soksletu, uparavanja i razblaženja u normalnom sudu, prebačen je u kivetu sa sorbensom i nakon mućkanja centrifugiran je 10 minuta na 8000 obrtaja u minutu. Nakon toga, 1 ml supernatanta prebačen je u vialu i nakon dodatka 200  $\mu\text{L}$  unutrašnjeg standarda (perilen  $\text{d}_{12}$  ( $80 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) i acenaften  $\text{d}_{10}$  ( $80 \mu\text{g mL}^{-1}$ )) snimljen na GC - MS.

Uzorci zemljišta sa verifikovanim odsustvom PAU (slepa proba) tretirani su na isti način kao i model uzorci zemljišta.

Svi uzorci su pripremljeni u tri ponavljanja.

### **3.8.Optimizacija QuEChERS tehnike za ekstrakciju PAU iz uzoraka zemljišta**

Model uzorci zemljišta (10 g) odmereni su u QuEChERS kivetu od 50 mL, pa im jedodato 30 mL smeše rastvarača. Rastvarači koji su korišćeni prilikom optimizacije metode su voda/acetronitril (1:2, v/v), voda/heksan (1:2,v/v), heksan/aceton (2:1, v/v) i etil - acetat. Uzorci su mešani 1 minut, a nakon toga su ekstrahovani na ultrazvučnom kupatilu 30 minuta. Potom je u kivete dodato 8 g  $\text{MgSO}_4$  i 2 g  $\text{NaCl}$ , kivete su promućkane i centrifugirane 10 minuta na 3500 obrtaja u minutu. Alikvot supernatanta (1,5 mL) prebačen je u QuEChERS kivetu od 2 mL sa 150 mg  $\text{MgSO}_4$  i 50 mg sorbensa. Sorbensi koji su testirani su PSA, C18, florisil, dijatomejska zemlja i klinoptilolit. Nakon mućkanja, ekstrakti su centrifugirani 10 minuta na 8000 obrtaja u minutu. Zapremina od 1 mL supernatanta prebačena je u vialu i nakon dodatka 200  $\mu\text{L}$  unutrašnjeg standarda (perilen  $\text{d}_{12}$  ( $80 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) i acenaften  $\text{d}_{10}$  ( $80 \mu\text{g mL}^{-1}$ )), vršena je GC - MS analiza.

Uzorci zemljišta sa verifikovanim odsustvom PAU (slepe probe) tretirani su na isti način kao i model uzorci zemljišta.

Svi uzorci su pripremljeni u tri ponavljanja.



### **3.9.GC - MS analiza**

Pripremljeni ekstrakti analizirani su na 7890/7000B GC - MS/MS triplkvadripol uređaju opremljenom Combi PAL autosemplerom i HP-5MS kapilarnom kolonom (5 % fenilmetilsiloksan, dimenzije 30 m x 0,25 mm, debljine filma 0,25  $\mu\text{m}$ ).

Najpre je snimanje vršeno u SCAN modu, kako bi se utvrdila retencionna vremena i karakteristični joni koji su korišćeni za analizu odgovarajućih jedinjenja. Temperaturni režim bio je sledeći: izotermalno na 75 °C prva 3 minuta, a zatim linearni porast temperature do 280 °C (gradijent 6 °C  $\text{min}^{-1}$ ), a zatim izotermalno na 280 °C poslednjih 20 minuta. Injektovana zapremina uzorka iznosila je 1  $\mu\text{L}$ , u split modu (10:1). Kao noseći gas primenjivan je helijum sa protokom od 1,0  $\text{mL min}^{-1}$ . Jonizacioni potencijal izvora bio je podešen na -70 eV sa masenim skeniranjem u rasponu 40-650 amu.

Nakon što je utvrđeno na kom retencionom vremenu se eluiraju analizirana jedinjenja i koji se joni mogu koristiti za kvantifikaciju, snimanje je nastavljeno u SIM (single ion monitoring) modu. Temperaturni režim bio je sledeći: izotermalno na 75 °C prva 3 minuta, a zatim linearni porast temperature do 300 °C (gradijent 6 °C  $\text{min}^{-1}$ ), a zatim izotermalno na 300 °C poslednjih 10 minuta. Ukupno vreme analize bilo je 50,5 minuta. Injektovana zapremina iznosila je 2,5  $\mu\text{L}$ , u splitless modu. Kao noseći gas primenjivan je helijum sa protokom od 1,0  $\text{mL min}^{-1}$ . Jonizacioni potencijal izvora bio je -70 eV. Kvantitativna analiza rađena je na osnovu odgovarajućeg jona i retencionog vremena (Tabela 11.) u programu MassHunter QQQ Quantitative Analysis software (Agilent Technologies, SAD).



**Tabela 11.** Retenciona vremena i odgovarajući joni za kvantifikaciju PAU

PAU	Rt (minut)	Kvantifikacioni jon (m/z)
Naftalen	11,792	128,0
Acenaftilen	17,721	152,0
Acenaften	18,460	153,0
Fluoren	20,380	166,0
Fenantren	24,000	178,0
Antracen	24,177	178,0
Fluoranten	28,575	202,0
Piren	29,383	202,0
Hrizen	34,072	228,0
Benzo[a]antracen	34,238	228,0
Benzo[b]fluoranten	37,937	253,0
Benzo[k]fluoranten	38,103	253,0
Benzo[a]piren	39,039	253,0
Indeno[1,2,3-cd] piren	42,760	277,0
Dibenzo[a,h]antracen	42,878	279,0
Benzo[g,h,i]perilen	43,637	276,0



### **3.10. Analiza sadržaja PAU u uzorcima zemljišta prikupljenog na teritoriji grada**

Uzorci prikupljeni na teritoriji urbanog dela grada Niša pripremljeni su optimizovanom QuEChERS tehnikom i analizirani na GC - MS. Po 10 g uzorka odmereno je u QuEChERS kivetu od 50 mL i dodato je 30 mL smeše voda/acetoneitril (1:2, v/v). Uzorci su mešani 1 minut, a nakon toga su ekstrahovani na ultrazvučnom kupatilu 30 minuta. Potom je u kivete dodato 8 g MgSO<sub>4</sub> i 2 g NaCl, kivete su promućkane i centrifugirane 10 minuta na 3500 obrtaja u minutu. Alikvot supernatanta (1,5 mL) prebačen je u QuEChERS kivetu od 2 mL sa 150 mg MgSO<sub>4</sub> i 50 mg dijatomejske zemlje. Nakon mućkanja, ekstrakti su centrifugirani 10 minuta na 8000 obrtaja u minutu. Zapremina od 1 ml supernatanta prebačena je u vialu i nakon dodatka 200 µL unutrašnjeg standarda (perilen d<sub>12</sub> (80 µg mL<sup>-1</sup>) i acenaften d<sub>10</sub> (80 µg mL<sup>-1</sup>)) vršena je GC - MS analiza.

### **3.11. Određivanje teških metala u zemljištu**

Uzorci zemljišta prikupljeni na teritoriji grada su nakon sušenja na vazduhu i usitnjavanja odmereni (0,5 g) i pomešani sa 15 mL koncentrovane HCl (36%, w/w) i 5 mL HNO<sub>3</sub> (65% w/w). Mikrotalasna digestija trajala je 5 sati, i uzorci su zagrevani na 80 °C. Nakon toga, uzorci su filtrirani kroz Whatman no. 42 filter papir i rastvoreni u normalnom sudu od 100 mL.

Snimanje je izvršeno na Inductively Coupled Atomic Emission Spectrometer, ICP-OES (Thermo Scientific, Velika Britanija), model 6500 Duo. Uslovi snimanja prikazani su u tabeli (Tabela 12).



**Tabela 12.** Parametri ICP-OES metode

<b>Parametri metode</b>	
RF snaga plazme	1150 W
Pravac posmatranja plazme	aksijalni
Protok gasa za hlađenje	12 L min <sup>-1</sup>
Protok gasa za obrazovanje plazme	0,5 L min <sup>-1</sup>
Protok raspršivačkog gasa	0,5 L min <sup>-1</sup>

Talasne dužine primenjene za kvantifikaciju određenih elemenata prikazane su u Tabeli 13.

**Tabela 13.** Talasne dužine za kvantifikaciju metala

<b>Metal</b>	<b>Talasna dužina (nm)</b>
Fe	259,8
Cd	228,8
Co	228,6
Cr	283,5
Cu	327,3
Hg	184,9
Mn	259,3
Ni	231,6
Pb	220,3
Zn	231,8





### **3.12. Određivanje karakteristika zemljišta**

#### **3.12.1. Određivanje pH**

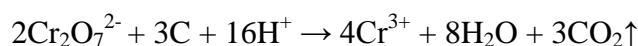
Uzorci zemljišta prikupljeni u gradskom delu Niša su nakon sušenja i usitnjavanja mešani sa vodom (10 g zemljišta i 25 mL vode) i pH vrednost ovakve suspenzije merena je pH metrom. Pored pH zemljišta u vodi određena je i pH vrednost u 1 M rastvoru KCl. Uzorci prikupljeni na teritoriji grada mešani su sa 1 M rastvorom KCl (10 g zemljišta i 25 mL 1 M KCl) i u ovako pripremljenoj suspenziji izmerena je pH vrednost.

#### **3.12.2. Određivanje elektroprovodljivosti**

Elektroprovodljivost zemljišta određena je konduktometrijski. Pripremljen je vodeni rastvor zemljišta, mešanjem 25 mL vode sa 10 g zemljišta, i nakon stajanja od 30 minuta na sobnoj temperaturi merena je provodljivost.

#### **3.12.3. Određivanje organskih supstanci**

Ukupne organske supstancea zemljišta određena je titracijom po Volki-Bleku (Walkley-Black) (*Schumacher*, 2002). Metoda se zasniva na oksidaciji organskih supstanci u zemljištu rastvorom  $K_2Cr_2O_7$  i retitracijom viška ovog rastvora, standardnim rastvorom  $FeSO_4$ .



Odmereno je 5 g zemljišta u erlenmajer i dodato 10 ml  $0,1667 \text{ mol L}^{-1}$  rastvora  $K_2Cr_2O_7$  i 20 mL koncentrovane  $H_2SO_4$  (98%, w/w). Erlenmajer je ostavljen da stoji 30 minuta kako bi došlo do oksidacije organske materije. Nakon toga dodato je 200 mL vode, 10 mL  $H_3PO_4$  (85%, w/w) i 1 mL difenilamina kao indikatora. Višak  $K_2Cr_2O_7$  titrovan je standardnim rastvorom  $FeSO_4$  do promene boje iz plave u zelenu.

### **3.13. Statistička obrada podataka**

Statistička analiza izvršena je korišćenjem softvera Statistica 8 (StatSoft, Tulsa). Kako bi se utvrdila statistički značajna razlika korišćen je Studentov t-test ( $p < 0.05$ ). Multivarijantne metode koje su primenjene su hijerarhijska klaster analiza (HCA) i analiza glavnih komponenti (PCA).



*Rezultati i diskusija*





## 4. Rezultati i diskusija

### 4.2. Optimizacija i validacija metode ultrazvučne ekstrakcije policikličnih aromatičnih ugljovodonika iz uzoraka zemljišta

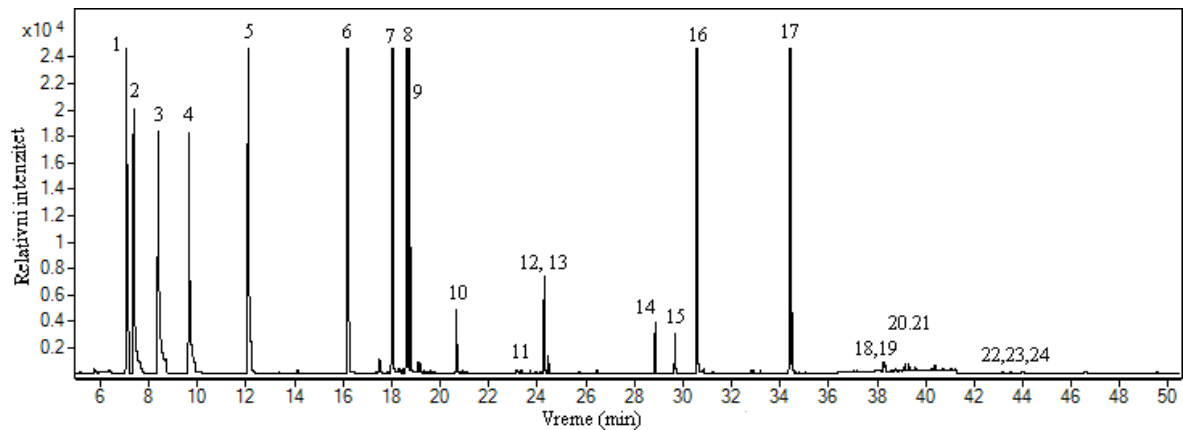
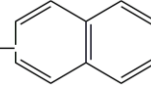
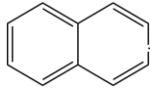
Ultrazvučna ekstrakcija policikličnih aromatičnih ugljovodonika iz uzoraka zemljišta zasnovana je na metodi koju su opisali *Banjoo i Nelson* (2005). Metoda se sastoji od ekstrakcije PAU odgovarajućim rastvaračem i prečišćavanjem dobijenih ekstrakata ekstrakcijom disperznom čvrstom fazom. U cilju optimizacije metode testirana je efikasnost ekstrakcije sa dve smeše rastvarača - heksan/aceton (1:1, v/v) i cikloheksan/aceton (1:1, v/v). Takođe, ispitan je i uticaj vremena ekstrakcije (30 i 60 minuta) na efikasnost procesa ekstrakcije. Prečišćavanje ekstrakata dobijenih ultrazvučnom ekstrakcijom izvršeno je ekstrakcijom disperznom čvrstom fazom pomoću PSA i Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Validacija metode sprovedena je određivanjem sledećih parametara - tačnost, granica detekcije i kvantifikacije, preciznost, linearnost i merna nesigurnost.

Odabir rastvarača od velikog je značaja za efikasnost ekstrakcije policikličnih aromatičnih ugljovodonika. Jedan od najčešće primenjivanih rastvarača za ekstrakciju PAU iz uzoraka zemljišta je dihlormetan (*Khan i sar.*, 2005). S obzirom na njegovu toksičnost, sve je veća težnja ka upotrebi manje toksičnih i rastvarača koji su manje štetni po životnu sredinu (*Banjoo i Nelson*, 2005; *Shu i Lai*, 2001). Kao rastvarači odabrane su smeše heksan/aceton (1:1, v/v) i cikloheksan/aceton (1:1, v/v), koje su u poređenju sa dihlormetanom znatno pogodnije za rad.

#### 4.2.1. Optimizacija i validacija metode ultrazvučne ekstrakcije policikličnih aromatičnih ugljovodonika iz zemljišta smešom rastvarača heksan/aceton

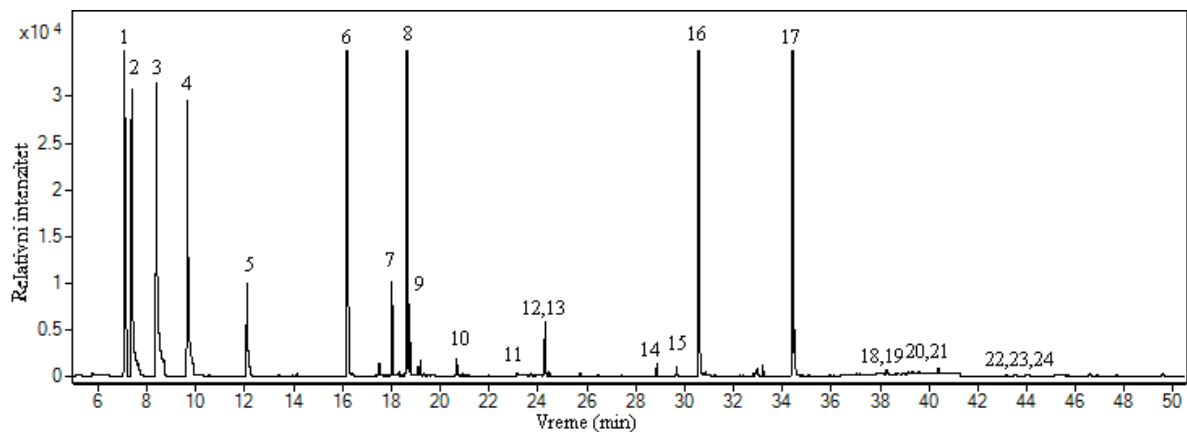
Na Slikama 20., 21. i 22. prikazani su GC - MS hromatogrami, snimljeni u SIM modu, ekstrakata koji su pripremljeni ultrazvučnom ekstrakcijom zemljišta smešom rastvarača heksan/aceton. Vreme ekstrakcije je bilo 30 minuta, za sva tri nivoa spajkovanja.

## Rezultati i diskusija



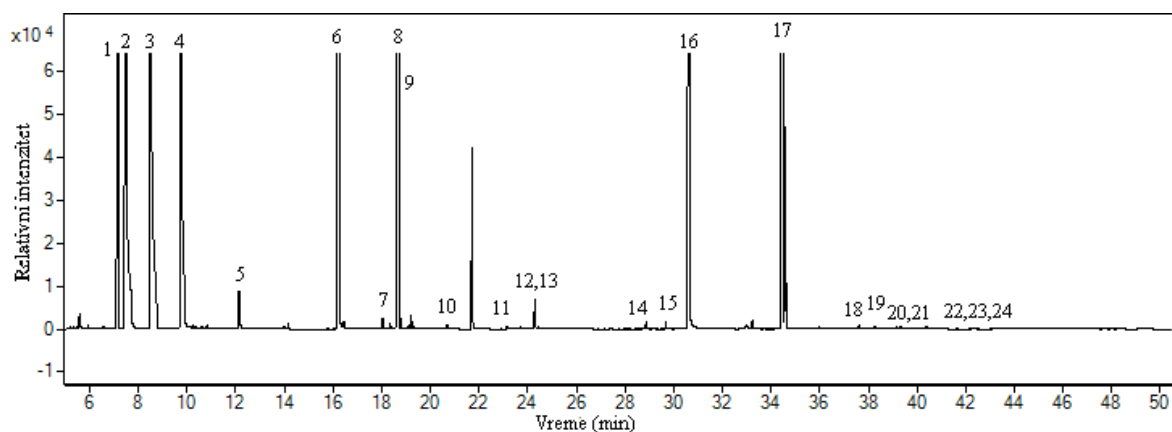
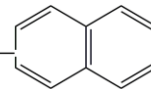
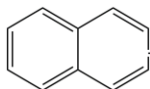
**Slika 20.** GC - MS hromatogram dobijen snimanjem ekstrakta uzorka pripremljenog smešom rastvarača heksan/acetona za vreme ekstrakcije 30 minuta za nivo spajkovanja 5 mg kg<sup>-1</sup>

1: fenol d<sub>6</sub>; 2: 2-hlorfenol-3,4,5,6-d<sub>4</sub>; 3: 1,2-dihlorbenzen-d<sub>4</sub>; 4: nitrobenzen-d<sub>5</sub>; 5: naftalen; 6: 2-fluorobifenil; 7: acenaftilen; 8: acenaften d<sub>10</sub>; 9: acenaften; 10: fluoren; 11: 2,4,6-tribromfenol; 12: fenantren; 13: antracen; 14: fluoranten; 15: piren; 16: p-terfenil-d<sub>14</sub>; 17: hrizen + benzo[a]antracen; 18: benzo[b]fluoranten; 19: benzo[k]fluoranten; 20: benzo[a]piren; 21: perilen d<sub>12</sub>; 22: indeno[1,2,3-cd]piren; 23: dibenzo[a,h]antracen; 24: benzo[g,h,i]perilen



**Slika 21.** GC - MS hromatogram dobijen snimanjem ekstrakta uzorka pripremljenog smešom rastvarača heksan/acetona za vreme ekstrakcije 30 minuta za nivo spajkovanja 0,5 mg kg<sup>-1</sup>

1: fenol d<sub>6</sub>; 2: 2-hlorfenol-3,4,5,6-d<sub>4</sub>; 3: 1,2-dihlorbenzen-d<sub>4</sub>; 4: nitrobenzen-d<sub>5</sub>; 5: naftalen; 6: 2-fluorobifenil; 7: acenaftilen; 8: acenaften d<sub>10</sub>; 9: acenaften; 10: fluoren; 11: 2,4,6-tribromfenol; 12: fenantren; 13: antracen; 14: fluoranten; 15: piren; 16: p-terfenil-d<sub>14</sub>; 17: hrizen + benzo[a]antracen; 18: benzo[b]fluoranten; 19: benzo[k]fluoranten; 20: benzo[a]piren; 21: perilen d<sub>12</sub>; 22: indeno[1,2,3-cd]piren; 23: dibenzo[a,h]antracen; 24: benzo[g,h,i]perilen

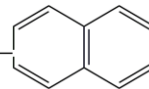
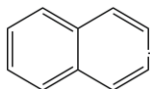


**Slika 22.** GC - MS hromatogram dobijen snimanjem ekstrakta uzorka smešom rastvarača heksan/acetona za vreme ekstrakcije 30 minuta za nivo spajkovanja  $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$

1: fenol  $d_6$ ; 2: 2-hlorfenol-3,4,5,6- $d_4$ ; 3: 1,2-dihlorbenzen- $d_4$ ; 4: nitrobenzen- $d_5$ ; 5: naftalen; 6: 2-fluorobifenil; 7: acenaftilen; 8: acenaften  $d_{10}$ ; 9: acenaften; 10: fluoren; 11: 2,4,6-tribromfenol; 12: fenantren; 13: antracen; 14: fluoranten; 15: piren; 16: p-terfenil- $d_{14}$ ; 17: hrizen + benzo[a]antracen; 18: benzo[b]fluoranten; 19: benzo[k]fluoranten; 20: benzo[a]piren; 21: perilen  $d_{12}$ ; 22: indeno[1,2,3-cd]piren; 23: dibenzo[a,h]antracen; 24: benzo[g,h,i]perilen

Pri datim uslovima snimanja postignuto je optimalno razdvajanje svih komponenti osim hrizena i benzo[a]antracena. Ova dva jedinjenja su prilikom optimizacije i validacije metode posmatrana kao smeša. U oblasti gde se nalaze pikovi analiziranih jedinjenja ne postoji značajan šum koji potiče od nečistoća.

Rezultati dobijeni ispitivanjem efikasnosti metode ekstrakcije upotrebom smeše heksan/acetona (1:1, v/v) za dva vremena trajanja ekstrakcije (30 i 60 minuta) prikazani kao efikasnost  $\pm$  standardna devijacija dati su u Tabeli 14.

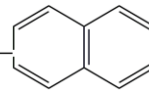
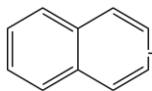


**Tabela 14.** Efikasnost određivanja 16 prioriternih policikličnih aromatičnih ugljovodonika (PAU niske molekulske mase - LMW PAU; PAU visoke molekulske mase - HMW PAU) dobijene GC MS analizom u ekstraktima dobijenim ultrazvučnom ekstrakcijom model uzoraka zemljišta u vremenskom intervalu od 30 i 60 minuta upotrebom smeše rastvarača heksan/acetona

PAU	Konzentracija ukupnih PAU (mg kg <sup>-1</sup> )	Efikasnost ekstrakcije u sistemu heksan/acetona (%)		
		Vreme ekstrakcije 30 min	Vreme ekstrakcije 60 min	
LMW PAU	Naftalen	5	93±4	73±3
		0,5	114±7	79±2
		0,05	100±9	82±3
	Acenaftilen	5	58±2	82±1
		0,5	95±6	93±7
		0,05	96±3	89,4±0,9
	Acenaften	5	54±2	69±1
		0,5	99±7	73±5
		0,05	109±5	71±7
	Fluoren	5	69±2	73±5
		0,5	74±2	59,4±0,3
		0,05	91±4	68±8
	Fenantren	5	101±10	95±3
		0,5	112±12	92±9
		0,05	98±6	88±5
	Antracen	5	57±3	76 ±9
		0,5	98±8	74±8
		0,05	110±9	82±6



Rezultati i diskusija



HMW PAU	Fluoranten	5	118±9	91±7
		0,5	67±3	92±6
		0,05	54±6	85±9
	Piren	5	108±8	86±8
		0,5	87±5	75±6
		0,05	68±6	72±8
	Hrizen+ Benzo[a]antracen	5	94±7	70±4
		0,5	85±8	75±7
		0,05	116±11	71±8
	Benzo[b]fluoranten	5	75±5	74±9
		0,5	99±7	91±6
		0,05	70±6	82±7
	Benzo[k]fluoranten	5	96±8	90±8
		0,5	98±6	79±8
		0,05	75±6	82±5
	Benzo[a]piren	5	86±5	92±7
		0,5	45±2	87±8
		0,05	44±5	79±6
	Indeno[1,2,3-cd]piren	5	103±9	89±4
		0,5	89±8	91±8
		0,05	107±7	94±7
Dibenzo[a,h]antracen	5	112±11	100±9	
	0,5	107±7	91±10	
	0,05	92±9	94±7	
Benzo[g,h,i]perilen	5	72±7	58±2	
	0,5	67±8	62±2	
	0,05	65±5	67±3	

## Rezultati i diskusija



Za smešu rastvarača heksan/aceton i vreme ekstrakcije od 30 minuta najbolja efikasnost ekstrakcije zapažena je za fluoranten (118%), a vrednosti veće od 70% zabeležene su za naftalen, fenantren, hrizen+benzo[a]antracen, benzo[k]fluoranten, benzo[b]fluoranten, indeno[1,2,3-cd]piren i dibenzo[a,h]antracen. Za PAU niže molekulske mase (LMW PAU) zapaženo je da u slučaju ekstrakcije od 30 minuta tačnost određivanja je veća za uzorke zemljišta spajkovane manjim količinama PAU (nivo spajkovanja 0,5 i 0,05 mg kg<sup>-1</sup>) nego za uzorke koji sadrže veće količine tih jedinjenja (nivo spajkovanja 5 mg kg<sup>-1</sup>). Dobijeni rezultati ukazuju na to da je za zemljišta koja sadrže niže koncentracije policikličnih aromatičnih ugljovodonika pogodno kraće vreme ekstrakcije. Efikasnosti ekstrakcije u trajanju od 60 minuta i smešu rastvarača heksan/aceton kretale su se u intervalu od 58% (benzo[g,h,i]perilen) do 100% (dibenzo[a,h]antracen). Od 16 analiziranih PAU za njih 11 (naftalen, acenaftilen, fenanthren, antracen, fluoranten, piren, benzo[b]fluoranten, benzo[k]fluoranten, benzo[a]piren, indeno[1,2,3-cd]piren i dibenzo[a,h]antracen) zabeležene su efikasnosti u granicama od 70-120%, za sva tri nivoa spajkovanja (*Thompson i sar.*, 2002). U većem broju slučajeva došlo je do smanjenja efikasnosti sa produženjem vremena ekstrakcije.

Nakon određivanja tačnosti metode, izražene preko efikasnosti, određeni su i ostali parametri validacije metode, kao što su granica detekcije i kvantifikacije, preciznost izražena preko relativne standardne devijacije, linearnost izražena kao jednačina kalibracione prave i merna nesigurnost, za smešu rastvarača heksan/aceton i oba vremena reakcije (Tabela 15).

Granica detekcije (LOD) izračunata je kao trostruka vrednost odnosa signal/šum kalibracionog standarda najmanje koncentracije, dok je granica kvantifikacije (LOQ) jednaka desetostrukoj vrednosti ovog parametra. Najniža granica detekcije i granica kvantifikacije za smešu rastvarača heksan/aceton zabeležena je za antracen - 1,92 µg kg<sup>-1</sup> i 6,40 µg kg<sup>-1</sup>. Najviše vrednosti ova dva parametra zabeležene su za naftalen. Granica detekcije za naftalen iznosila je 18,12 µg kg<sup>-1</sup>, dok je granica kvantifikacije iznosila 60,40 µg kg<sup>-1</sup>.

Linearnost analitičke metode predstavlja mogućnost da se unutar određenog opsega koncentracije analita dobije linearna zavisnost analitičkog signala od koncentracije analita. Kalibracione krive pojedinačnih PAU konstruisane su snimanjem standardnih rastvora različitih koncentracija. Linearnost je prikazana preko jednačine kalibracione prave za analizirana jedinjenja i preko koeficijenta korelacije (r) i određena je snimanjem serije

## Rezultati i diskusija



standardnih rastvora u kome su se PAU nalazili u opsegu od 0,1923 do 19,2307  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Kalibracione krive pokazale su linearnu zavisnost između površine pika i koncentracije. Za smešu rastvarača heksan/acetone koeficijent korelacije bio je u rasponu od 0,95 do 0,98.

Preciznost merenja iskazana je preko vrednosti relativne standardne devijacije (RSD (%)). Nezagađeni uzorci zemljišta spajkovani su u tri različite koncentracije (5, 0,5 i 0,05  $\text{mg kg}^{-1}$ ) i merenja su vršena u tri ponavljanja. Kako bi se odredila RSD, svaki uzorak je analiziran istog dana, na istom aparatu, od strane istog istraživača, pod istim uslovima. Vrednosti dobijene za smešu rastvarača heksan/acetone ekstrakciju u trajanju od 30 minuta bile su u intervalu od 5,19% (benzo[g,h,i]perilen) do 63,30% (antracen). Ovako velike greške (kao u slučaju antracena) ukazuju da za ispitivani sistem rastvarača vreme ekstrakcije nije odgovarajuće za analizu PAU. Znatno bolji rezultati dobijeni su za isti sistem rastvarača, ali pri dužem vremenu ekstrakcije (60 minuta). Pri ovim uslovima, RSD vrednosti su bile u granicama od 3,00 (indeno[1,2,3-cd]piren) do 9,69% (benzo[b]fluoranten). Može se zaključiti da je preciznost metode veća ukoliko je vreme ekstrakcije duže.

Merena nesigurnost je određena identifikacijom nesigurnih parametara koji utiču na analitičku metodu. Proširena relativna nesigurnost za svako jedinjenje izračunata je množenjem standardne merne nesigurnosti faktorom pokrivenosti k (*Serpe i sar.*, 2010). Vrednosti proširene nesigurnosti ( $U_c$ ), za smešu rastvarača heksan/acetone i vreme ekstrakcije od 30 minuta, kretale su se od 4,05% za benzo[ghi]perilen do 38,78 % za fluoranten. Za istu smešu rastvarača, ali duže vreme ekstrakcije merena nesigurnost bila je manja (od 2,73% za acenaften do 10,52% za fluoren).

U Tabeli 15. prikazane su vrednosti parametara validacije metode određivanja 16 prioriternih PAU dobijeni GC - MS analizom u ekstraktima dobijenim ultrazvučnom ekstrakcijom model uzoraka zemljišta u vremeskom intervalu od 30 i 60 minuta upotrebom smeše rastvarača heksan/acetone

**Tabela 15.** Parametri validacije metode analize 16 prioriternih PAU dobijene GS - MS analizom u ekstraktima dobijenim ultrazvučnom ekstrakcijom model uzoraka zemljišta u vremenskom intervalu od 30 i 60 minuta upotrebom smeše rastvarača heksan/acetone - Rt (retenciono vreme); LOD (granica detekcije); LOQ (granica kvantifikacije); RSD (relativna standardna devijacija (ponovljivost)); Uc (merna nesigurnost) - za ultrazvučnu ekstrakciju smešom rastvarača heksan/acetone

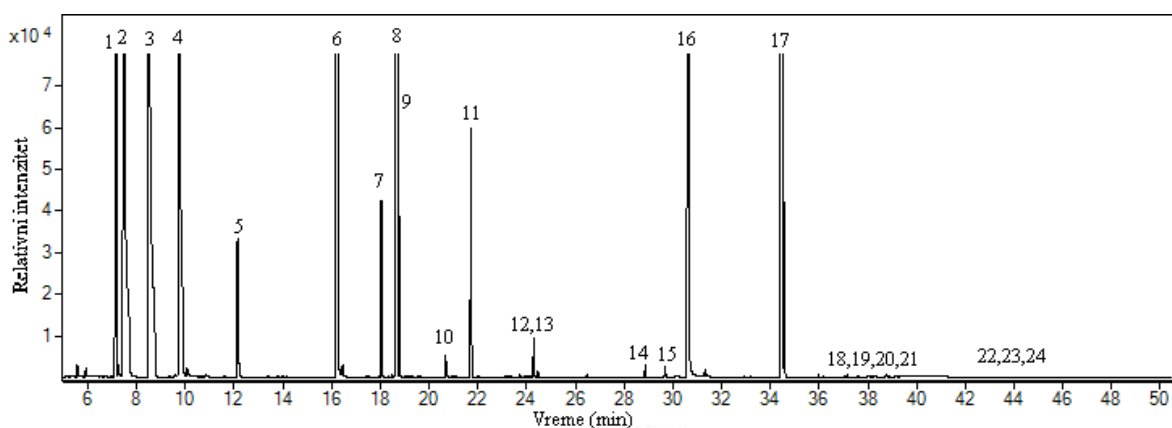
PAU	Rt (minut)	Kvantifikacioni jon (m/z)	LOD ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Jednačina kalibracione krive	Koeficijent korelacije	Vreme ekstrakcije			
							30 min	60 min	30 min	60 min
							RSD (%)	RSD (%)	Uc (%)	Uc (%)
Naftalen	12,084	128,0	18,12	60,40	$y=1,635*x$	0,96	10,10	5,24	11,95	5,79
Acenaftilen	18,094	152,0	7,44	24,80	$y=1,766*x$	0,96	25,90	6,50	24,72	6,37
Acenaften	18,784	152,0	12,18	40,60	$y=1,171*x$	0,96	33,92	2,25	34,21	2,73
Fluoren	20,670	165,0	9,96	33,20	$y=1,872*x$	0,95	14,33	8,14	12,90	10,52
Fenantren	24,282	178,0	6,24	20,80	$y=1,751*x$	0,95	13,64	4,17	8,16	7,91
Antracen	24,450	178,0	1,92	6,40	$y=1,069*x$	0,95	63,30	4,53	32,22	10,15
Fluoranten	28,855	202,0	4,05	13,50	$y=1,014*x$	0,95	41,91	4,36	38,78	4,21
Piren	29,670	202,0	2,94	9,80	$y=1,014*x$	0,98	22,63	8,56	23,00	9,56
Hrizen+ Benzo[a]antracen	34,533	228,0	11,51	38,40	$y=1,429*x$	0,97	15,98	3,36	18,15	4,06
Benzo[b]fluoranten	38,256	252,0	3,87	12,90	$y=0,987*x$	0,97	19,36	9,69	18,20	10,22
Benzo[k]fluoranten	38,339	252,0	2,34	7,80	$y=1,040*x$	0,97	14,42	6,64	14,95	6,89
Benzo[a]piren	39,301	252,0	11,13	37,10	$y=0,611*x$	0,97	41,24	7,35	27,71	7,39
Indeno[1,2,3-cd]piren	43,041	276,0	9,69	32,30	$y=0,181*x$	0,97	9,67	3,00	11,11	2,84
Dibenzo[a,h]antracen	43,176	278,0	15,99	53,30	$y=0,353*x$	0,97	9,61	4,87	11,49	4,44
Benzo[g,h,i]perilen	43,992	276,0	8,37	27,90	$y=0,271*x$	0,97	5,19	5,21	4,05	7,19

x - relativni intenzitet signala; y - koncentracija analita; m/z - odnos mase i naelektrisanja jona



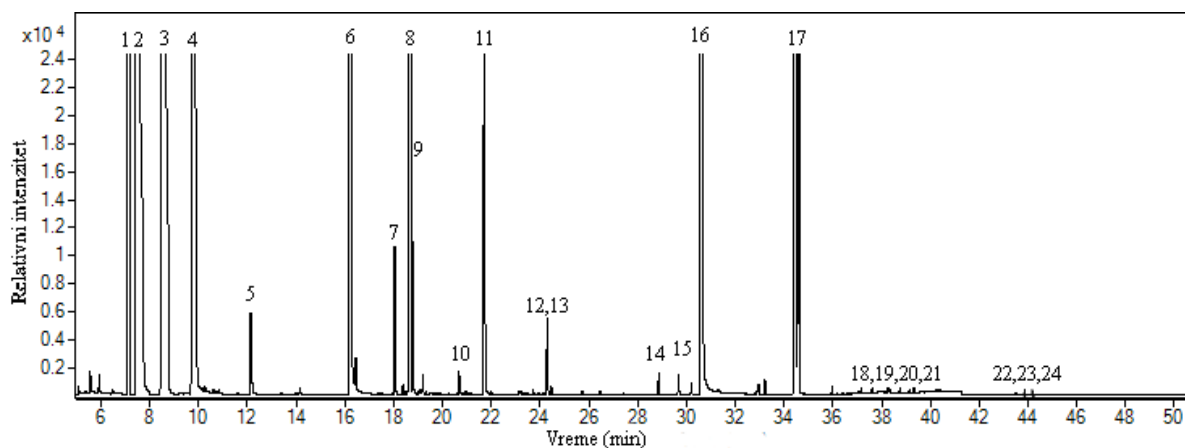
#### 4.2.2. Optimizacija i validacija metode ultrazvučne ekstrakcije policikličnih aromatičnih ugljovodonika iz zemljišta smešom rastvarača cikloheksan/acetona

Na Slikama 23., 24. i 25. prikazani su GC - MS hromatogrami, snimljeni u SIM modu, ekstrakata pripremljenih ultrazvučnom ekstrakcijom smešom rastvarača cikloheksan/acetona. Vreme ekstrakcije je iznosilo 30 minuta za sva tri nivoa spajkovanja.



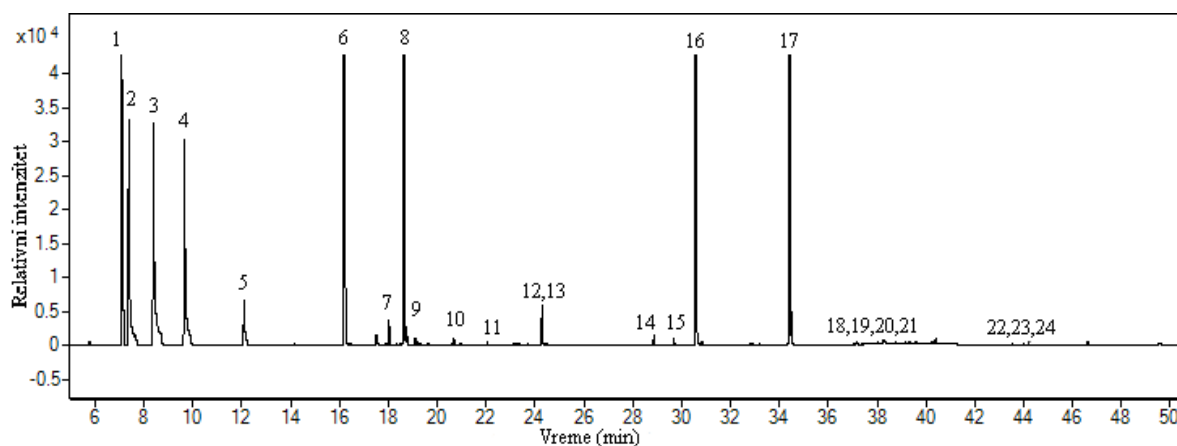
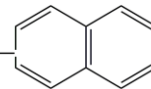
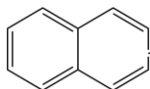
**Slika 23.** GC - MS hromatogram dobijen snimanjem ekstrakta uzorka pripremljenog smešom rastvarača cikloheksan/acetona za vreme ekstrakcije 30 minuta za nivo spajkovanja  $5 \text{ mg kg}^{-1}$

1: fenol  $d_6$ ; 2: 2-hlorfenol-3,4,5,6- $d_4$ ; 3: 1,2-dihlorbenzen- $d_4$ ; 4: nitrobenzen- $d_5$ ; 5: naftalen; 6: 2-fluorobifenil; 7: acenaftilen; 8: acenaften  $d_{10}$ ; 9: acenaften; 10: fluoren; 11: 2,4,6-tribromfenol; 12: fenantren; 13: antracen; 14: fluoranten; 15: piren; 16: p-terfenil- $d_{14}$ ; 17: hrizen + benzo[a]antracen; 18: benzo[b]fluoranten; 19: benzo[k]fluoranten; 20: benzo[a]piren; 21: perilen  $d_{12}$ ; 22: indeno[1,2,3-cd]piren; 23: dibenzo[a,h]antracen; 24: benzo[g,h,i]perilen



**Slika 24.** GC-MS hromatogram dobijen snimanjem ekstrakta uzorka pripremljenog smešom rastvarača cikloheksan/acetona za vreme ekstrakcije 30 minuta za nivo spajkovanja  $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$

1: fenol  $d_6$ ; 2: 2-hlorfenol-3,4,5,6- $d_4$ ; 3: 1,2-dihlorbenzen- $d_4$ ; 4: nitrobenzen- $d_5$ ; 5: naftalen; 6: 2-fluorobifenil; 7: acenaftilen; 8: acenaften  $d_{10}$ ; 9: acenaften; 10: fluoren; 11: 2,4,6-tribromfenol; 12: fenantren; 13: antracen; 14: fluoranten; 15: piren; 16: p-terfenil- $d_{14}$ ; 17: hrizen + benzo[a]antracen; 18: benzo[b]fluoranten; 19: benzo[k]fluoranten; 20: benzo[a]piren; 21: perilen  $d_{12}$ ; 22: indeno[1,2,3-cd]piren; 23: dibenzo[a,h]antracen; 24: benzo[g,h,i]perilen

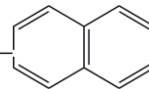
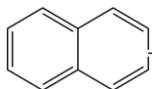


**Slika 25.** GC - MS hromatogram dobijen snimanjem ekstrakta uzorka pripremljenog smešom rastvarača cikloheksan/acetona za vreme ekstrakcije 30 minuta za nivo spajkovanja  $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$

1: fenol  $d_6$ ; 2: 2-hlorfenol-3,4,5,6- $d_4$ ; 3: 1,2-dihlorbenzen- $d_4$ ; 4: nitrobenzen- $d_5$ ; 5: naftalen; 6: 2-fluorobifenil; 7: acenaftilen; 8: acenaften  $d_{10}$ ; 9: acenaften; 10: fluoren; 11: 2,4,6-tribromfenol; 12: fenantren; 13: antracen; 14: fluoranten; 15: piren; 16: p-terfenil- $d_{14}$ ; 17: hrizen + benzo[a]antracen; 18: benzo[b]fluoranten; 19: benzo[k]fluoranten; 20: benzo[a]piren; 21: perilen  $d_{12}$ ; 22: indeno[1,2,3-cd]piren; 23: dibenzo[a,h]antracen; 24: benzo[g,h,i]perilen

Pri datim uslovima postignuto je optimalno razdvajanje za sve komponente osim hrizena i benzo[a]antracena. Ova dva jedinjenja su prilikom optimizacije i validacije metode posmatrana kao smeša.

Rezultati dobijeni ispitivanjem tačnosti metode upotrebom smeše cikloheksan/acetona (1:1, v/v) i dva različita vremena ekstrakcije (30 i 60 minuta) prikazani kao efikasnost  $\pm$  standardna devijacija dati su u Tabeli 16.

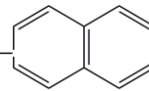
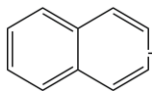


**Tabela 16.** Efikasnost određivanja 16 prioriternih policikličnih aromatičnih ugljovodonika (PAU niskih molekulskih masa - LMW PAU, PAU visokih molekulskih masa - HMW PAU) dobijene GC - MS analizom u ekstraktima dobijenim ultrazvučnom ekstrakcijom model uzoraka zemljišta u vremenskom intervalu od 30 i 60 minuta upotrebom smeše rastvarača cikloheksan/acetona

PAU	Koncentracija ukupnih PAU (mg kg <sup>-1</sup> )	Efikasnost ekstrakcije u sistemu cikloheksan/acetona (%)	
		Vreme ekstrakcije 30 min	Vreme ekstrakcije 60 min
Naftalen	5	97±9	101±4
	0,5	101±7	71±3
	0,05	96±5	102±9
Acenaftilen	5	96±2	117±9
	0,5	117±11	119±13
	0,05	113±7	84±5
Acenaften	5	99±9	119±12
	0,5	119±13	109±7
	0,05	114±9	104±10
Fluoren	5	50±2	111±10
	0,5	118±12	102±10
	0,05	76±6	15±1
Fenantren	5	106±10	106±11
	0,5	120±10	103±8
	0,05	92±8	106±8
Antracen	5	105±10	105±11
	0,5	108±7	103±8
	0,05	120±12	104±8

LMW PAU

Rezultati i diskusija



<b>HMW PAU</b>		5	101±11	104±10
	Fluoranten	0,5	106±7	51±5
		0,05	121±10	62±4
		5	107±8	93±11
	Piren	0,5	101±10	64±4
		0,05	110±9	51±3
		5	91±10	77±9
	Hrizen+ Be bnzo[a]antracen	0,5	85±7	83±8
		0,05	94±6	80±9
		5	71±5	17,6±0,2
	Benzo[b]fluoranten	0,5	63±3	78±4
		0,05	115±7	102±8
		5	69±3	99±8
	Benzo[k]fluoranten	0,5	103±11	73±3
		0,05	109±9	116±11
		5	106±9	44±6
	Benzo[a]piren	0,5	109±7	25±1
		0,05	102±9	23,8±0,5
		5	57±8	105±8
	Indeno[1,2,3-cd]piren	0,5	76±5	73±5
	0,05	73±6	67±7	
	5	99±8	90±9	
Dibenzo[a,h]antracen	0,5	95±9	38,5±0,4	
	0,05	106±6	34±1	
	5	94±7	94±9	
Benzo[g,h,i]perilen	0,5	69±4	63±7	
	0,05	58±1	93±5	





Korišćenjem smeše rastvarača cikloheksan/aceton, koja se može smatrati manje toksičnom i jeftinijom varijantom u odnosu na smešu heksan/aceton, za vreme ekstrakcije od 30 minuta zabeležene su efikasnosti određivanja od 50% (fluoren) do 121% (fluoranten). Efikasnosti veće od 70% upotrebom ove smeše rastvarača zabeležene su za naftalen, acenaftilen, fenantren, antracen, fluoranten, hrizen+benzo[a]antracen, benzo[a]piren i dibenzo[a,h]antracen, za sva tri nivoa spajkovanja. Za nivo spajkovanja od 5 mg kg<sup>-1</sup> samo za indeno[1,2,3-cd]piren, benzo[k]fluoranten i fluoren efikasnosti nisu bile veće od 70%, što znači da se ovom smešom rastvarača i vremenom ekstrakcije od 30 minuta uspešno mogu analizirati 13 od 16 PAU koji su prioritetni za analizu, a u zemljištu su sadržani u većoj koncentraciji. Najbolje efikasnosti za ovu kombinaciju rastvarača i vremena ekstrakcije zabeležene su za nivo spajkovanja 0,05 mg kg<sup>-1</sup>, gde samo za benzo[g,h,i]perilen nije dobijena zadovoljavajuća vrednost (58%). Povećanje vremena ekstrakcije sa 30 na 60 minuta ni u ovom slučaju nije uticalo na tačnost analize u velikoj meri. Efikasnosti za vreme ekstrakcije od 60 minuta iznosile su od 17,6% (benzo[b]fluoranten) do 119% (acenaftilen). Po kriterijumima koje su postavili *Thompson i saradnici* (2002) za naftalen, acenaftilen, acenaften, fluoren, fenantren, antracen, hrizen+benzo[a]antracen i benzo[k]fluoranten dobijene su zadovoljavajuće vrednosti za efikasnost ekstrakcije.

Nakon određivanja tačnosti metode izražene preko efikasnosti određeni su i ostali parametri validacije metode, kao što su granica detekcije i kvantifikacije, preciznost izražena preko relativne standardne devijacije, linearnost izražena preko jednačine kalibracione krive i nesigurnost merenja, za smešu rastvarača heksan/aceton i oba vremena reakcije.

U Tabeli 17. prikazane su vrednosti parametara validacije metode određivanja 16 prioritetnih PAU dobijene GC - MS analizom u ekstraktima dobijenim ultrazvučnom ekstrakcijom model uzoraka zemljišta u vremenskom intervalu od 30 i 60 minuta upotrebom smeše rastvarača cikloheksan/aceton.

Granica detekcije izračunata je kao trostruka vrednost odnosa signal/šum kalibracionog standarda najmanje koncentracije, dok je granica kvantifikacije jednaka desetostruko vrednosti ovog parametra. Najniže LOD i LOQ vrednosti za smešu rastvarača cikloheksan/aceton zabeležene su za antracen i iznosile su 1,02 µg kg<sup>-1</sup> i 3,40 µg kg<sup>-1</sup>. Niske vrednosti za granice detekcije i kvantifikacije zabeležene su takođe i za acenaften, piren, benzo[k]fluoranten i dibenzo[a,h]antracen.

**Tabela 17.** Parametri validacije metode analize 16 prioriternih policikličnih aromatičnih ugljovodonika dobijene GS - MS analizom u ekstraktima dobijenim ultrazvučnom ekstrakcijom model uzoraka zemljišta u vremenskom intervalu od 30 i 60 minuta upotrebom smeše rastvarača cikloheksan/acetone - Rt (retenciono vreme); LOD (granica detekcije); LOQ (granica kvantifikacije); RSD (relativna standardna devijacija (ponovljivost)); Uc (merna nesigurnost)

PAU	Rt (minut)	Kvantifikacioni jon (m/z)	LOD ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Jednačina kalibracione krive	Koeficijent korelacije	Vreme ekstrakcije			
							30 min RSD (%)	60 min RSD (%)	30 min Uc (%)	60 min Uc (%)
Naftalen	12,138	128,0	15,69	52,30	$y=0,352*x$	0,97	2,58	20,34	2,92	19,25
Acenaftilen	18,038	152,0	4,32	14,40	$y=0,386*x$	0,97	10,01	22,77	12,57	18,47
Acenaften	18,801	152,0	1,68	5,60	$y=0,257*x$	0,97	9,84	8,99	12,59	7,01
Fluoren	20,678	165,0	13,62	45,40	$y=0,430*x$	0,97	41,93	61,26	39,41	69,86
Fenantren	24,288	178,0	11,79	39,30	$y=0,411*x$	0,98	13,30	2,31	16,33	1,91
Antracen	24,458	178,0	1,02	3,40	$y=0,244*x$	0,97	7,28	1,49	9,33	1,24
Fluoranten	28,861	202,0	2,22	7,40	$y=0,235*x$	0,97	9,37	32,05	11,82	38,34
Piren	29,676	202,0	1,83	6,10	$y=1,905*x$	0,99	4,01	24,90	4,90	30,93
Hrizen+ Benzo[a]antracen	34,601	228,0	23,67	78,90	$y=0,449*x$	0,94	4,96	3,86	5,17	4,18
Benzo[b]fluoranten	38,265	252,0	2,76	9,20	$y=0,722*x$	0,99	34,15	50,45	32,70	66,15
Benzo[k]fluoranten	38,342	252,0	1,41	4,70	$y=0,763*x$	0,99	23,42	24,68	25,34	22,23
Benzo[a]piren	39,317	252,0	5,28	17,60	$y=0,429*x$	0,99	3,06	13,03	3,74	36,74
Indeno[1,2,3-cd]piren	43,048	276,0	3,09	10,30	$y=0,941*x$	0,98	15,12	23,63	12,01	25,14
Dibenzo[a,h]antracen	43,179	278,0	1,95	6,50	$y=0,331*x$	0,99	5,40	35,52	6,24	56,87
Benzo[g,h,i]perilen	44,001	276,0	2,64	8,80	$y=1,230*x$	0,99	24,88	20,64	21,21	21,48

x - relativni intenzitet signala; y - koncentracija analita; m/z - odnos mase i naelektrisanja jona

## Rezultati i diskusija



Linearnost je izražena preko jednačine kalibracione prave i koeficijenta korelacije i određena je snimanjem serije standardnih rastvora u kom su se PAU nalazili u opsegu od 0,1923 do 19,2307  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . U slučaju ekstrakcije smešom rastvarača cikloheksan/aceton koeficijenti korelacije bili su u rasponu od 0,94 za hrizen+benzo[a]antracen do 0,99 za piren, benzo[b]fluoranten, benzo[k]fluoranten, benzo[a]piren, dibenzo[a,h]antracen i benzo[g,h,i]perilen.

Preciznost merenja, izražena preko relativne standardne devijacije (%), bila je u intervalu od 2,58% za naftalen do 41,93% za fluoren, za smešu rastvarača cikloheksan/aceton i vreme ekstrakcije od 30 minuta. Za vreme ekstrakcije od 60 minuta i istu smešu rastvarača RSD vrednosti su bile u intervalu od 1,49% za antracen do 61,26 % za fluoren. Ukoliko se uporede RSD vrednosti određivanja PAU u ekstraktima pripremljenim procesom ekstrakcije u trajanju od 30 i 60 minuta, može se zaključiti da su niže vrednosti relativne standardne devijacije, odnosno veća preciznost dobijena za uzorke pripremljene kraćim vremenom ekstrakcije, pa se može smatrati da produženje vremena ekstrakcije smanjuje preciznost postupka.

Merna nesigurnost, izražena preko proširene relativne nesigurnosti, za vreme ekstrakcije od 30 minuta, bila je u intervalu od 2,92% za naftalen do 39,41% za fluoren. Za vreme ekstrakcije od 60 minuta  $U_c$  vrednosti varirale su od 1,24% za antracen do 69,86% za fluoren. Ukoliko se uporede merne nesigurnosti određivanja PAU u uzorcima dobijenim ultrazvučnom ekstrakcijom u trajanju od 30 i 60 minuta, može se uočiti da je nesigurnost merenja u većini slučajeva veća u izorcima ekstrahovanim 60 minuta, pa se može smatrati da se produžetkom vremena ekstrakcije povećava nesigurnost merenja.

Poređenjem izračunatih analitičkih parametara validacija metoda, uočava se da je najbolja kombinacija za ultrazvučnu ekstrakciju policikličnih aromatičnih ugljovodonika iz uzoraka zemljišta, smeša rastvarača cikloheksan/aceton i vreme ekstrakcije od 30 minuta. Duže vreme ekstrakcije (60 minuta) u većini slučajeva dovelo je do smanjenja preciznosti i povećanja merne nesigurnosti. Takođe, u prilog odabiru smeše cikloheksan/aceton ide i manji šum koji se primećuje na dobijenim hromatogramima. Ultrazvučnom ekstrakcijom dobijeni su dobri rezultati efikasnosti za pojedina jedinjenja, ali zadovoljavajuća efikasnost nije postignuta za sve analizirane PAU. Iz tog razloga pristupilo se optimizaciji drugih tehnika ekstrakcije za analizu PAU u uzorcima zemljišta.

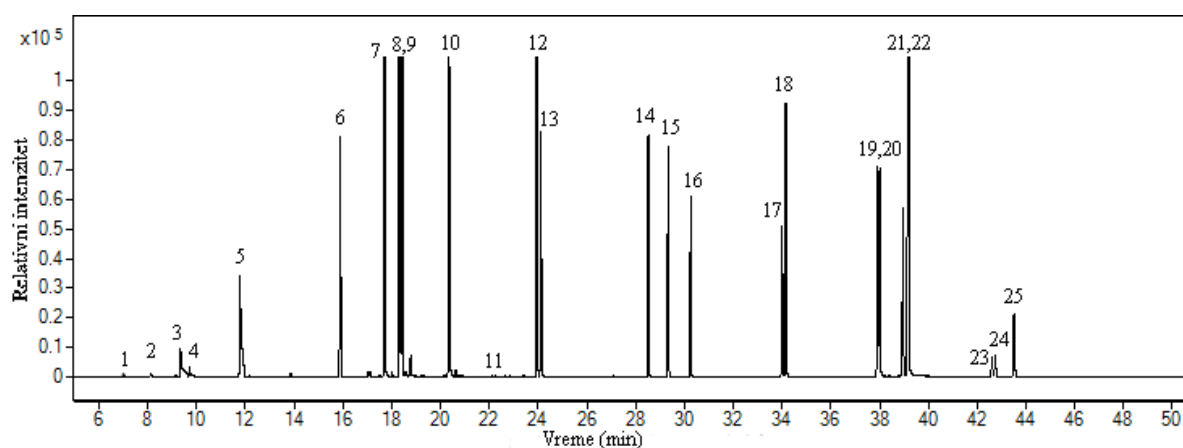
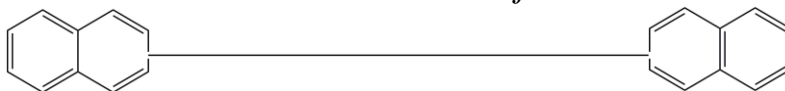


### 4.3. Optimizacija i validacija metode ekstrakcije po Soksletu policikličnih aromatičnih ugljovodonika iz uzoraka zemljišta

Ekstrakcija po Soksletu jedna je od najčešće primenjivanih tehnika za ekstrakciju policikličnih aromatičnih ugljovodonika iz različitih tipova uzoraka (*Zelinkova i Wenzl, 2015; Gubler i sar., 2015*). Uprkos brojnim nedostacima, ova tehnika za ekstrakciju PAU iz zemljišta je i dalje zvanična tehnika pripreme uzoraka Britanske agencije za zaštitu životne sredine (*EA, 2003*). Najveći nedostatak ove tehnike ekstrakcije je dugo vreme koje je potrebno da bi se ekstrakcija završila. S obzirom na to da je, i pored toga što zahteva dug vremenski period, ova tehnika često primenjivana, cilj je bio da se skрати vreme prečišćavanja ekstrakata dobijenih ekstrakcijom po Soksletu. Kako se prilikom ekstrakcije pored željenog analita ekstrahuju i nečistoće, jako bitan deo celog postupka je prečišćavanje dobijenog ekstrakta. Deo zvanične metode Britanske agencije za zaštitu životne sredine je prečišćavanje dobijenih ekstrakata hromatografijom na koloni u kojoj je stacionarna faza smeša  $\text{SiO}_2$  i  $\text{Al}_2\text{O}_3$ . Ova tehnika zahteva dugo vreme rada iz razloga što uključuje pripremu i kondicioniranje kolone, nanošenje uzorka na kolonu, eluiranje, uparavanje ekstrakta i ponovno rastvaranje. Postupak je vremenski veoma zahtevan, a takođe i izuzetno skup usled velikog učešća rastvarača. Cilj je bio modifikovati metodu Britanske agencije za zaštitu životne sredine u delu prečišćavanja ekstrakata, kako bi se na taj način skratilo ukupno vreme trajanja metode i postigla ušteda u pogledu količine upotrebljenih rastvarača. Umesto hromatografije na koloni za prečišćavanje ekstrakata dobijenih ekstrakcijom po Soksletu primenjena je ekstrakcija disperznom čvrstom fazom i ispitana je mogućnost korišćenja šest različitih sorbenasa (silika gel, PSA, C18, florisil, diatomеjska zemlja i klinoptilolit) u te svrhe. Nakon prečišćavanja uzorci su analizirani na gasnom hromatografu sa masenim detektorom.

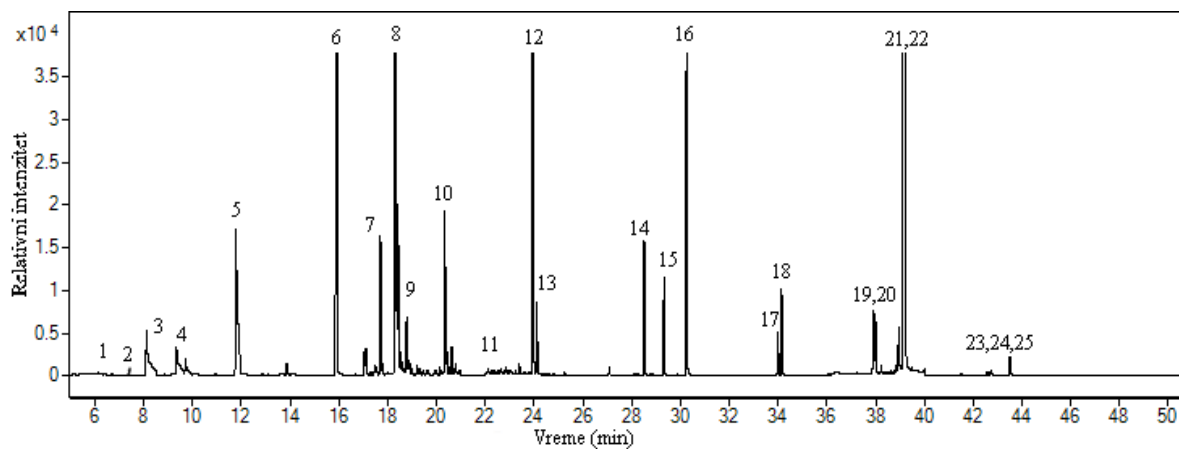
Na Slikama 26. - 28. prikazani su GC - MS hromatogrami dobijeni snimanjem u SIM modu ekstrakata uzoraka pripremljenih ekstrakcijom policikličnih aromatičnih ugljovodonika po Soksletu iz model uzoraka zemljišta i prečišćavanjem dobijenih ekstrakata hromatografijom na koloni čija je stacionarna faza smeša  $\text{SiO}_2$  i  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (zvaničnom metodom Britanske agencije za zaštitu životne sredine).

## Rezultati i diskusija



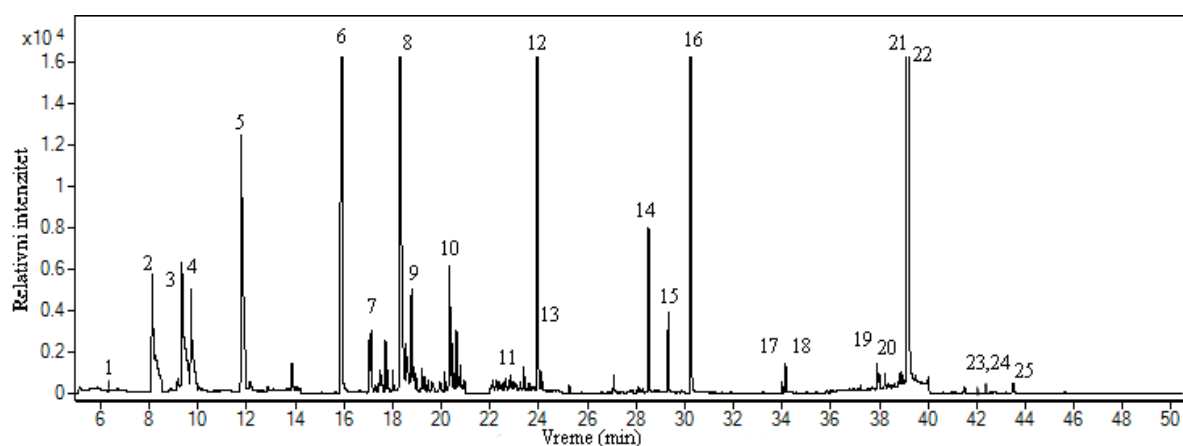
**Slika 26.** GC - MS hromatogram dobijen snimanjem ekstrakta uzorka pripremljenog ekstrakcijom policikličnih aromatičnih ugljovodonika po Soksletu iz uzorka zemljišta i prečišćavanjem dobijenih ekstrakata hromatografijom na koloni  $\text{SiO}_2$  i  $\text{Al}_2\text{O}_3$  za nivo spajkovanja  $5 \text{ mg kg}^{-1}$

1: fenol  $d_6$ ; 2: 2-hlorfenol-3,4,5,6- $d_4$ ; 3: 1,2-dihlorbenzen- $d_4$ ; 4: nitrobenzen- $d_5$ ; 5: naftalen; 6: 2-fluorobifenil; 7: acenaftilen; 8: acenaften  $d_{10}$ ; 9: acenaften; 10: fluoren; 11: 2,4,6-tribromfenol; 12: fenantren; 13 antracen; 14: fluoranten; 15: piren; 16: p-terfenil- $d_{14}$ ; 17: hrizen; 18: benzo[a]antracen; 19: benzo[b]fluoranten; 20: benzo[k]fluoranten; 21: benzo[a]piren; 22: perilen  $d_{12}$ ; 23: indeno[1,2,3-cd]piren; 24: dibenzo[a,h]antracen; 25: benzo[g,h,i]perilen



**Slika 27.** GC - MS hromatogram dobijen snimanjem ekstrakta uzorka pripremljenog ekstrakcijom policikličnih aromatičnih ugljovodonika po Soksletu iz uzorka zemljišta i prečišćavanjem dobijenih ekstrakata hromatografijom na koloni  $\text{SiO}_2$  i  $\text{Al}_2\text{O}_3$  za nivo spajkovanja  $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$

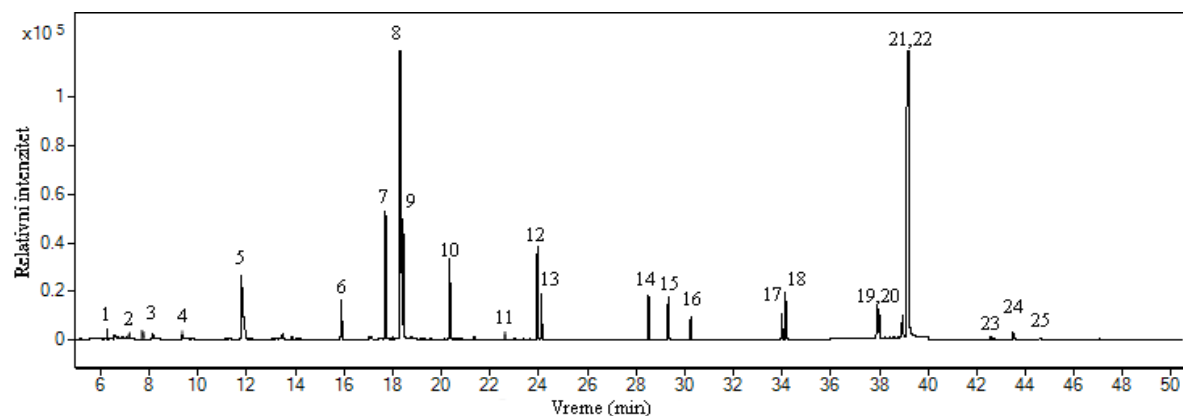
1: fenol  $d_6$ ; 2: 2-hlorfenol-3,4,5,6- $d_4$ ; 3: 1,2-dihlorbenzen- $d_4$ ; 4: nitrobenzen- $d_5$ ; 5: naftalen; 6: 2-fluorobifenil; 7: acenaftilen; 8: acenaften  $d_{10}$ ; 9: acenaften; 10: fluoren; 11: 2,4,6-tribromfenol; 12: fenantren; 13 antracen; 14: fluoranten; 15: piren; 16: p-terfenil- $d_{14}$ ; 17: hrizen; 18: benzo[a]antracen; 19: benzo[b]fluoranten; 20: benzo[k]fluoranten; 21: benzo[a]piren; 22: perilen  $d_{12}$ ; 23: indeno[1,2,3-cd]piren; 24: dibenzo[a,h]antracen; 25: benzo[g,h,i]perilen



**Slika 28.** GC - MS hromatogram dobijen snimanjem ekstrakta uzorka pripremljeog ekstrakcijom policikličnih aromatičnih ugljovodonika po Soksletu iz uzorka zemljišta i prečišćavanjem dobijenih ekstrakata hromatografijom na koloni  $\text{SiO}_2$  i  $\text{Al}_2\text{O}_3$  za nivo spajkovanja  $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$

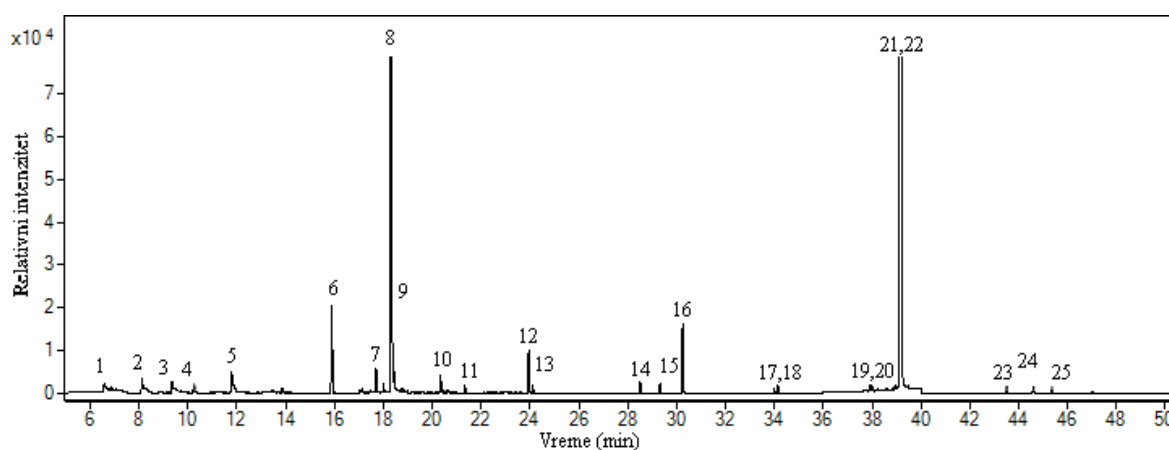
1: fenol  $d_6$ ; 2: 2-hlorfenol-3,4,5,6- $d_4$ ; 3: 1,2-dihlorbenzen- $d_4$ ; 4: nitrobenzen- $d_5$ ; 5: naftalen; 6: 2-fluorobifenil; 7: acenaftilen; 8: acenaften  $d_{10}$ ; 9: acenaften; 10: fluoren; 11: 2,4,6-tribromfenol; 12: fenantren; 13 antracen; 14: fluoranten; 15: piren; 16: p-terfenil- $d_{14}$ ; 17: hrizen; 18: benzo[a]antracen; 19: benzo[b]fluoranten; 20: benzo[k]fluoranten; 21: benzo[a]piren; 22: perilen  $d_{12}$ ; 23: indeno[1,2,3-cd]piren; 24: dibenzo[a,h]antracen; 25: benzo[g,h,i]perilen

Na Slikama 29. - 31. prikazani su GC - MS hromatogrami dobijeni snimanjem u SIM modu uzorka pripremljenih ekstrakcijom policikličnih aromatičnih ugljovodonika po Soksletu iz model uzorka zemljišta i prečišćavanjem dobijenih ekstrakata ekstrakciom disperznom čvrstom fazom uz dijatomejsku zemlju kao sorbens.



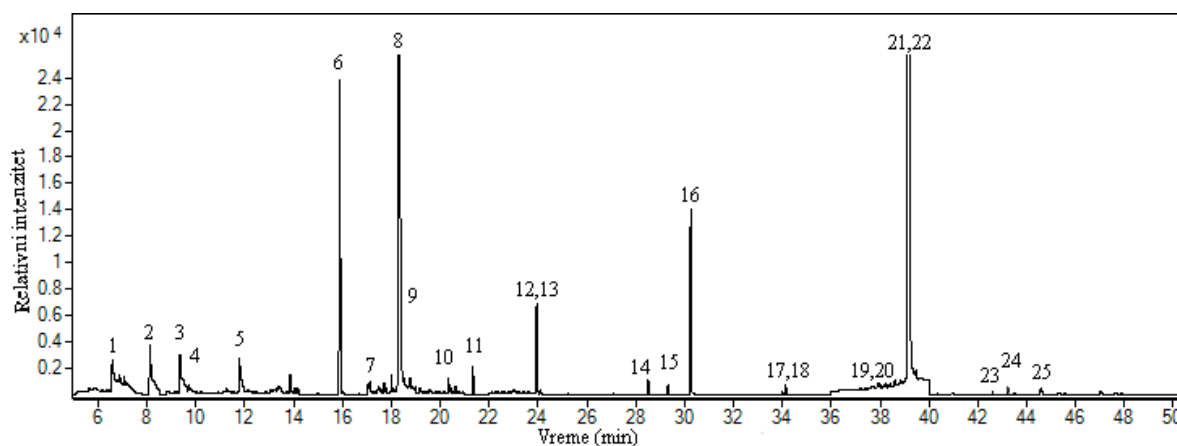
**Slika 29.** GC - MS hromatogram dobijen snimanjem ekstrakta uzorka pripremljenog ekstrakcijom po Soksletu i prečišćavanjem ekstrakcijom disperznom čvrstom fazom uz dijatomejsku zemlju kao sorbens za nivo spajkovanja  $5 \text{ mg kg}^{-1}$

1: fenol  $d_6$ ; 2: 2-hlorfenol-3,4,5,6- $d_4$ ; 3: 1,2-dihlorbenzen- $d_4$ ; 4: nitrobenzen- $d_5$ ; 5: naftalen; 6: 2-fluorobifenil; 7: acenaftilen; 8: acenaften  $d_{10}$ ; 9: acenaften; 10: fluoren; 11: 2,4,6-tribromfenol; 12: fenantren; 13 antracen; 14: fluoranten; 15: piren; 16: p-terfenil- $d_{14}$ ; 17: hrizen; 18: benzo[a]antracen; 19: benzo[b]fluoranten; 20: benzo[k]fluoranten; 21: benzo[a]piren; 22: perilen  $d_{12}$ ; 23: indeno[1,2,3-cd]piren; 24: dibenzo[a,h]antracen; 25: benzo[g,h,i]perilen



**Slika 30.** GC - MS hromatogram dobijen snimanjem ekstrakta uzorka pripremljenog ekstrakcijom po Sokslet-u i prečišćavanjem ekstrakcijom disperznom čvrstom fazom uz dijatomejsku zemlju kao sorbens za nivo spajkovanja  $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$

1: fenol  $d_6$ ; 2: 2-hlorfenol-3,4,5,6- $d_4$ ; 3: 1,2-dihlorbenzen- $d_4$ ; 4: nitrobenzen- $d_5$ ; 5: naftalen; 6: 2-fluorobifenil; 7: acenaftilen; 8: acenaften  $d_{10}$ ; 9: acenaften; 10: fluoren; 11: 2,4,6-tribromfenol; 12: fenantren; 13: antracen; 14: fluoranten; 15: piren; 16: p-terfenil- $d_{14}$ ; 17: hrizen; 18: benzo[a]antracen; 19: benzo[b]fluoranten; 20: benzo[k]fluoranten; 21: benzo[a]piren; 22: perilen  $d_{12}$ ; 23: indeno[1,2,3-cd]piren; 24: dibenzo[a,h]antracen; 25: benzo[g,h,i]perilen



**Slika 31.** GC - MS hromatogram dobijen snimanjem ekstrakta uzorka pripremljenog ekstrakcijom po Sokslet-u i prečišćavanjem ekstrakcijom disperznom čvrstom fazom uz dijatomejsku zemlju kao sorbens za nivo spajkovanja  $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$

1: fenol  $d_6$ ; 2: 2-hlorfenol-3,4,5,6- $d_4$ ; 3: 1,2-dihlorbenzen- $d_4$ ; 4: nitrobenzen- $d_5$ ; 5: naftalen; 6: 2-fluorobifenil; 7: acenaftilen; 8: acenaften  $d_{10}$ ; 9: acenaften; 10: fluoren; 11: 2,4,6-tribromfenol; 12: fenantren; 13: antracen; 14: fluoranten; 15: piren; 16: p-terfenil- $d_{14}$ ; 17: hrizen; 18: benzo[a]antracen; 19: benzo[b]fluoranten; 20: benzo[k]fluoranten; 21: benzo[a]piren; 22: perilen  $d_{12}$ ; 23: indeno[1,2,3-cd]piren; 24: dibenzo[a,h]antracen; 25: benzo[g,h,i]perilen

Ukoliko se uporede GC - MS hromatogrami dobijeni snimanjem ekstrakata pripremljenih prema propisu Britanske agencije za zaštitu životne sredine i hromatogrami dobijeni snimanjem ekstrakata pripremljenih modifikovanom metodom, može se videti velika sličnost dobijenih hromatograma. U oba slučaja ne postoji značajan šum bazne linije na retencionim



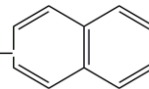
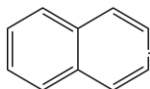
vremenima gde se očekuju analizirane komponente. Jedini izuzetak je retenciono vreme od 38 do 40 minuta, gde se javlja šum u slučaju oba tipa pripreme uzoraka i prečišćavanja dobijenih ekstrakata, te su pikovi koji se javljaju u ovoj oblasti ručno integraljeni u programu MassHunter. Tačnost metode je izražena preko efikasnosti i određena je snimanjem ekstrakata model uzoraka zemljišta pripremljenih ekstrakcijom po Soksletu i različitim tehnikama prečišćavanja na GC - MS. Model uzorci zemljišta pripremljeni su dodavanjem standardnog rastvora 16 PAU, tako da je njihova ukupna koncentracija u zemljištu iznosila 5, 0,5 i 0,05 mg kg<sup>-1</sup>. Ovi uzorci ekstrahovani su dihlormetanom ekstrakcijom po Soksletu. Dobijeni ekstrakti prečišćeni su na dva načina:

1. Prečišćavanje hromatografijom na koloni prema preporukama Britanske agencije za zaštitu životne sredine (EA, 2003);
2. Prečišćavanje ekstrakcijom disperznom čvrstom fazom upotrebom različitih sorbenasa - PSA, SiO<sub>2</sub>, C18, Florisil, dijatomejska zemlja i klinoptilolit.

Efikasnost određivanja 16 prioriternih policikličnih aromatičnih ugljovodonika dobijene GC - MS analizom u ekstraktima dobijenim ekstrakcijom po Soksletu i različitim tehnikama prečišćavanja model uzoraka zemljišta prikazane su u Tabeli 18.



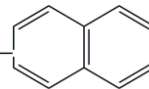
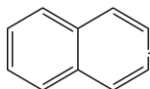
Rezultati i diskusija



**Tabela 18.** Efikasnosti određivanja 16 prioriternih policikličnih aromatičnih ugljovodonika (LMW PAU - PAU niskih molekularnih masa, HMW PAU - PAU visokih molekularnih masa) u model uzorcima zemljišta dobijene GC - MS analizom ekstrakata pripremljenih ekstrakcijom po Soksletu i različitim tehnikama prečišćavanja ekstrakata model uzoraka zemljišta

		Efikasnost±SD (%)							
PAU	Konzentracija ukupnih PAU (mg kg <sup>-1</sup> )	Tehnika prečišćavanja							
		Kolona (sSiO <sub>2</sub> +Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	dSPE (C18)	dSPE (Florisil)	dSPE (Dijatomska zemlja)	dSPE (Kinoptilolit)	dSPE (PSA)	dSPE(SiO <sub>2</sub> )	
LMW PAU	Naftalen	5	102±7	89±3	81±5	85±4	89±9	90±7	86±6
		0,5	111±5	95±3	88±5	88±3	83±5	107±9	119 ±12
		0,05	90±3	112±9	106±10	102±9	113±10	96±3	91±5
	Acenaftilen	5	75±4	94±3	88±7	92±1	99±9	91±9	90±3
		0,5	80±1	87,2±0,4	101±8	92±3	106±8	77,6±0,8	83±6
		0,05	100±2	80±3	85±5	98±5	92±5	108±5	106±8
	Acenaften	5	87±2	79±1	94±5	96±9	102±8	78±4	99±5
		0,5	98±5	105±7	102±6	99±6	100±7	99±9	92±4
		0,05	102±4	88±3	106±8	100±7	92,6±0,9	98±9	106±9
Fluoren	5	103±1	83±1	106±9	83±6	78±5	85±6	108±5	
	0,5	99,9±0,9	111±9	103±10	104±4	87±2	107±11	94±6	
	0,05	99±5	76±2	101±5	112±11	97±5	100±8	83±6	
Fenantren	5	101±7	75±4	101±7	105±6	71±3	107±5	103±6	
	0,5	107±3	91±1	94±6	85±5	83±4	103±4	80±8	
	0,05	87±1	87±5	98±6	111±9	79±8	101 ±10	100 ±10	
Antracen	5	100±3	70±3	81±1	78±4	76±7	76±8	72±4	
	0,5	103,0±0,5	70±1	79±6	77±5	79±6	79±4	87±7	
	0,05	99±3	77±1	108±9	79±3	102±11	102±8	101±9	

## Rezultati i diskusija



<b>HMW PAU</b>	Fluoranten	5	100±6	88±3	77±8	85±4	92±6	79±4	77±8
		0,5	94±3	107±8	107±5	101±10	102±9	109±9	100±7
		0,05	101±8	90±5	94±3	78±8	82±4	73±4	86±7
	Piren	5	81,1±0,3	88±1	84±1	87±7	87±8	91±4	96±8
		0,5	95±3	103±9	93±6	93±4	106±10	107±6	103±10
		0,05	96±5	105±6	69±3	95±9	101±4	99±4	104±6
	Hrizen	5	102±2	100±3	43±6	78±5	59±1	44±8	46±7
		0,5	101±5	81±5	62±3	76±5	77±5	50±3	44±6
	Benzo[a]antracen	5	109±9	78±2	59±2	80±3	65±2	56±1	63±2
		0,5	104±5	73±4	66±1	82±7	62±4	41±1	70±4
		0,05	89±2	72±1	76±6	82±5	59±6	48±4	55±1
	Benzo[b]fluoranten	5	102±6	40±1	33±2	89±6	46±4	31,1±0,5	34±4
		0,5	87±4	37,5±0,3	29,0±0,7	75±4	39±2	26±2	31±2
		0,05	100±7	62±2	57±3	106±9	60±4	61±4	67±4
	Benzo[k]fluoranten	5	107±6	45±2	31±2	75±5	60±2	31±3	39±5
		0,5	93±2	39,2±0,4	41±3	80±8	52±2	31±1	36±1
		0,05	107±7	64±3	54±2	79±5	45±3	29±2	31,1±0,8
	Benzo[a]piren	5	103±4	36±4	26±3	77±4	43±3	24±1	28±2
		0,5	87±1	61±1	39±1	80±3	44±2	31,8±0,5	30,7±0,7
		0,05	102±2	42±3	28,8±0,4	81±4	41±3	34,6±0,9	32±2
Indeno[1,2,3-cd]pren	5	109±5	11,5±0,3	34±1	13±1	64±6	47±2	57±3	
	0,5	101±6	13±1	42±2	19±2	54±3	35,0±0,8	39,1±0,3	
	0,05	100±3	27±2	43±3	17±1	31,7±0,5	30±1	25,5±0,3	
Dibenzo[a,h]antracen	5	102±4	26±3	13,0±0,5	18,1±0,4	23±2	13,9±0,1	13,4±0,4	
	0,5	87±1	20,2±0,9	9,4±0,1	21,0±0,5	20,1±0,7	11,1±0,6	7,6±0,9	
	0,05	88±2	25±1	9,5±0,9	26±2	22±2	35±1	8,7±0,3	
Benzo[g,h,i]perilen	5	102±3	43±3	23,9±0,6	38,8±0,5	43±2	28,2±0,5	30±2	
	0,5	93±4	66±2	39±2	59±3	53,9±0,9	71±5	26,2±0,3	
	0,05	98±5	66±3	29±2	65±5	39±2	28±3	24,1±0,6	



Prema preporukama *Thompsona i saradnika* (2002) efikasnosti koje su prihvatljive prilikom validacije metode su između 70 i 120%. U slučaju kada je korišćena hromatografija na koloni, kao deo zvanične metode Britanske agencije za zaštitu životne sredine, efikasnosti su bile u intervalu od 75% za acenaftilen do 111% za naftalen, za sva tri nivoa spajkovanja. Najniže efikasnosti za ovaj vid prečišćavanja ekstrakata zabeležene su za acenaftilen (75-100%, za tri nivoa spajkovanja). Acenaftilen je komponenta čiji logaritam koeficijenta raspodele oktanol/voda ( $\log K_{ow}$ ) iznosi 3,92, što je jedna od najnižih vrednosti u poređenju sa ostalim analiziranim komponentama. Kada komponenta ima nisku vrednost  $\log K_{ow}$  to znači da je njegova koncentracija u organskoj fazi niska. U slučaju prečišćavanja hromatografijom na koloni, kolona je najpre isprana heksanom, a potom su PAU eluirani smešom dihlormetan/hexsan (2:3, v/v). Ova smeša rastvarača je nepolarna, pa je moguće da acenaftilen nije u dovoljnoj meri eluiran sa kolone, već je zadržan na stacionarnoj fazi.

S obzirom na to da se silika gel jako često koristi u prečišćavanju ekstrakata u analizi policikličnih aromatičnih ugljovodonika, ovaj sorbens upotrebljen je i kao sorbens prilikom prečišćavanja ekstrakcijom disperznom čvrstom fazom. Efikasnosti, u slučaju kada je silika gel korišćen kao sorbens u dSPE, bile su u skladu sa utvrđenim normama (70-120%) za 8 od 16 analiziranih jedinjenja. Komponente za koje su dobijene zadovoljavajuće efikasnosti bile su naftalen, acenaftilen, acenaften, fluoren, fenantren, antracen, fluoranten i piren. To znači da bi kombinacija ekstrakcije po Soksletu sa dihlormetanom i prečišćavanja pomoću dSPE uz silika gel kao sorbens mogla da se koristi u analizi ovih jedinjenja. Za ostale analizirane komponente dobijene su vrednosti manje od 70%, što se može objasniti njihovim čvršćim vezivanjem za sorbens.

PSA je prvi i najčešće korišćen sorbens u ekstrakciji disperznom čvrstom fazom (*González-Curbelo i sar.*, 2015). Ovaj sorbens ima visoku efikasnost pri uklanjanju različitih nečistoća iz ekstrakta, kao što su organske i masne kiseline, i na taj način utiče na smanjenje šuma u hromatogramima. Efikasnosti u slučaju upotrebe PSA kao sorbensa su bile u intervalu od 11,1% za dibenzo[a,h]antracen do 108% za acenaftilen. Kao i u slučaju upotrebe silika gela u dSPE, i upotrebom PSA za naftalen, acenaftilen, acenaften, fluoren, fenantren, antracen, fluoranten i piren dobijene su efikasnosti veće od 70%. Za ostale analizirane komponente dobijene su vrednosti niže od 70%, što znači da kombinacija ekstrakcije po Soksletu i dSPE ekstrakcije sa PSA kao sorbensa nije odgovarajuća za analizu ovih komponenti.



Još jedan od sorbenasa koji se često koristi u dSPE je oktadecil silika (C18), čijom primenom u postupku pripreme uzoraka PAU je za 10 (naftalen, acenaftilen, acenaften, fluoren, fenantren, antracen, fluoranten, piren, hrizen i benzo[a]antracen) od 16 analiziranih komponenti dobijena efikasnost veća od 70%. Najniže efikasnosti prilikom upotrebe C18 kao sorbensa u dSPE zabeležene su za indeno[1,2,3-cd]piren (11,5 - 27%, za tri nivoa spajkovanja). Može se smatrati da ovaj sorbens nije pogodan za prečišćavanje ekstrakata dobijenih ekstrakcijom po Soksletu za analizu PAU viših molekulskih masa.

Florisil je magnezijum silikat i sličnih je karakteristika kao silika gel (*Osman i Saim, 2013*). Efikasnosti dobijene upotrebom ovog sorbensa varirale su od 9,4% za dibenzo[a,h]antracen do 108% za antracen. Kao i prilikom upotrebe silika gela, niže efikasnosti zabeležene su za PAU viših molekulskih masa. Slično kao prilikom upotrebe silika gela, i prilikom korišćenja florisila zabeležene su veoma niske vrednosti (ispod 10%) za dibenzo[a,h]antracen, Florisil je i ranije korišćen za prečišćavanje ekstrakata u analizi PAU u zemljištu (*Osman i Saim, 2013*), ali ovo je prvi put da je florisil korišćen kao sorbens u dSPE pri analizi PAU.

Klinoptilolit je zeolit formule  $(\text{Na,K,Ca})_{2-3}\text{Al}_3(\text{Al,Si})_2\text{Si}_3\text{O}_{36}\cdot 12\text{H}_2\text{O}$  i njegova upotreba u prečišćavanju ekstrakata u analizi PAU prvi put je opisana radu *Stankov Jovanovic i saradnika (2015)*. Najveća efikasnost prilikom upotrebe ovog sorbensa zabeležena je za naftalen (113%). Od svih ispitivanih PAU, naftalen je jedinjenje koje se može određivati sa najboljom efikasnošću u svim vrstama uzoraka zemljišta pripremljenim ekstrakcijom po Soklsetu i prečišćenim primenom svih šest ispitivanih sorbenasa primenom ekstrakcije čvrstom fazom. Prilikom upotrebe dijatomejske zemlje kao sorbensa za prečišćavanje, za sve PAU, osim indeno[1,2,3-cd]pirena, dibenzo[a,h]antracena i benzo[g,h,i]perilena, efikasnost određivanja je bila između 75% (benzo[b]fluoranten) i 112% (fluoren). Prednost klinoptilolita i dijatomejske zemlje kao sorbenasa je ta što su oni minerali široko rasprostranjeni u prirodi, pa na taj način utiču na smanjenje cene analize.

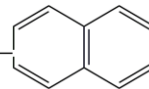
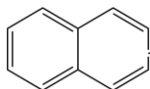
Ukoliko se uporede sorbensi korišćeni u ekstrakciji disperznom čvrstom fazom, može se zaključiti da je najbolje rezultate dala dijatomejska zemlja. U slučaju korišćenja ovog sorbensa za samo 3 od 16 analiziranih komponenti dobijene efikasnosti su bile manje od 70%, pa se kombinacija ekstrakcije po Soksletu pomoću dihlrometana i ekstrakcije disperznom čvrstom fazom sa dijatomejskom zemljom kao sorbensom može koristiti u analizi 13 PAU prioriternih za analizu.



Nakon što je utvrđeno da je najveća tačnost (poređenjem efikasnosti) postignuta za metodu koja predstavlja kombinaciju ekstrakcije po Soksletu i dSPE sa dijatomejskom zemljom kao sorbentom, prešlo se na određivanje ostalih parametara validacije metode, kao što su linearnost, preciznost, merna nesigurnost, LOD i LOQ. U Tabeli 19. prikazani su rezultati validacije ove kombinacije tehnike ekstrakcije i prečišćavanja.

Vrednosti granice detekcije i granice kvantifikacije određene su na osnovu odnosa signal/šum. LOD vrednosti za analizirane komponente bile su u granicama od  $0,24 \mu\text{g kg}^{-1}$  za benzo[a]antracen do  $5,76 \mu\text{g kg}^{-1}$  za acenaftilen. Niske vrednosti granice detekcije zabeležene su i za hrizen ( $0,63 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), antracen ( $0,72 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) i piren ( $0,75 \mu\text{g kg}^{-1}$ ). Najniža LOQ vrednost zabeležena je za benzo[a]antracen i iznosila je  $0,80 \mu\text{g kg}^{-1}$ , dok je najveća granica kvantifikacije zabeležena za acenaftilen ( $19,20 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), što je u saglasnosti sa rezultatima drugih autora (Yamada i sar., 2009).

## Rezultati i diskusija



**Tabela 19.** Parametri validacije metode ekstrakcije po Soksletu i dSPE prečišćavanja pomoću dijatomejske zemlje na osnovu GC - MS analize - Rt (retenciono vreme); LOD (granica detekcije); LOQ (granica kvantifikacije); RSD (relativna standardna devijacija (ponovljivost)); Uc (merna nesigurnost)

PAU	Rt (minut)	Kvantifikacioni jon	LOD ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Jednačina kalibracione krive	Koefcijent korelacije	RSD (%)	U <sub>c</sub> (%)
Naftalen	12,065	128,0	3,30	11,00	$y=1,690*x$	0,99	10,19	10,79
Acenaftilen	17,920	152,0	5,76	19,20	$y=1,847*x$	0,99	3,72	4,03
Acenaften	18,639	153,0	1,98	6,60	$y=0,782*x$	0,99	2,44	2,78
Fluoren	20,568	166,0	1,11	3,70	$y=0,622*x$	0,99	15,24	17,48
Fenantren	24,190	178,0	2,46	8,20	$y=1,051*x$	0,99	13,78	15,96
Antracen	24,360	178,0	0,72	2,40	$y=0,955*x$	0,99	1,46	1,32
Fluoranten	28,779	202,0	4,5	15,00	$y=0,895*x$	0,99	13,75	13,97
Piren	29,596	202,0	0,75	2,50	$y=2,072*x$	0,98	4,40	4,68
Hrizen	35,029	228,0	0,63	2,10	$y=0,907*x$	0,98	7,76	7,19
Benzo[a]antracen	35,227	228,0	0,24	0,80	$y=1,951*x$	0,99	1,78	1,67
Benzo[b]fluoranten	41,122	252,0	3,30	11,00	$y=0,607*x$	0,98	17,59	18,27
Benzo[k]fluoranten	41,292	252,0	3,63	11,20	$y=1,220*x$	0,99	3,19	2,87
Benzo[a]piren	43,287	252,0	1,86	6,20	$y=0,537*x$	0,99	2,36	2,41
Indeno[1,2,3-cd]piren	50,629	277,0	3,51	11,70	$y=1,009*x$	0,99	18,61	3,50
Dibenzo[a,h]antracen	50,931	279,0	4,44	14,80	$y=0,378*x$	0,98	19,19	4,83
Benzo[g,h,i]perilen	52,011	276,0	4,29	14,30	$y=0,464*x$	0,99	25,14	15,73

x - relativni intenzitet signala; y - koncentracija analita; m/z - odnos mase i naelektrisanja jona

## Rezultati i diskusija



Kako bi se odredila linearnost, pripremljena je serija kalibracionih rastvora različitih koncentracija (0,1923 do 19,2307  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) i snimljeni su na GC - MS aparatu. Konstruisane su kalibracione prave za svih 16 analiziranih komponenti i vrednosti koeficijenta korelacije iznosile su 0.99 za sva analizirana jedinjenja osim piren, hrizen, benzo[b]fluoranten i dibenzo[a,h]antracen, za koja je koeficijent korelacije iznosio 0.98.

Preciznost metode iskazana je preko relativne standardne devijacije. Preciznost (ponovljivost) eksperimenta je određena izvođenjem istog eksperimenta pod istim uslovima analize istog uzorka. RSD vrednosti za većinu analiziranih komponenti bile su niže od 10%. Najniža RSD vrednost zabeležena je za antracen (1,46%), dok su slične vrednosti i za benzo[a]antracen (1,78%), benzo[a]piren (2,36%) i acenaften (2,44%). Najveća RSD vrednost zabeležena je za benzo[g,h,i]perilen i iznosila je 25,14%.

Merna nesigurnost izražena je preko proširene relativne nesigurnosti, koja se izračunava kao proizvod standardne nesigurnosti i faktora pokrivenosti ( $k = 2$ ) i rezultati su prikazani u Tabeli 14. Najniža vrednost proširene nesigurnosti zabeležena je za antracen i iznosila je 1,32%. Znatno više vrednosti merne nesigurnosti zabeležene su za benzo[g,h,i]perilen (15,73%), fenantren (15,96 %), fluoren (17,48 %) i benzo[b]fluoranten (18,27 %).

Ispitivanje tačnosti ukazuje da je kombinacija ekstrakcije PAU iz uzoraka zemljišta po Soksletu i prečišćavanje dobijenih ekstrakata ekstrakcijom disperznom čvrstom fazom upotrebom dijatomejske zemlje kao sorbensa optimalan način pripreme uzoraka zemljišta za analizu PAU. U poređenju sa zvaničnom metodom Britanske agencije za zaštitu životne sredine, dobijene su slične vrednosti efikasnosti. Efikasnosti između 70 i 120% dobijene su za 13 od 16 analiziranih komponenti, pa je nakon optimizacije izvršena i validacija ove metode. Pored jako dobrih analitičkih karakteristika metode, njene prednosti u odnosu na metodu pripreme uzoraka zemljišta primenom ekstrakcije po Soksletu PAU iz zemljišta i prečišćavanje dobijenih ekstrakata primenom hromatografije na koloni su znatno kraće vreme potrebno za prečišćavanje uzorka, upotreba manjih količina toksičnih rastvarača i manji troškovi analize.



### **4.3. Optimizacija i validacija QuEChERS tehnike za analizu policikličnih aromatičnih ugljovodonika**

QuEChERS tehnika je relativno nova tehnika u pripremi uzoraka, ali ima jako široku primenu (*González-Curbelo i sar.*, 2015). S obzirom na to da u velikoj meri skraćuje vreme analize i znatno smanjuje troškove, cilj je bio optimizovati ovu tehniku za analizu policikličnih aromatičnih ugljovodonika u uzorcima zemljišta. Ispitana je kombinacija četiri različita rastvarača (heksan/acetone, etil - acetat, acetonitril/voda i heksan/voda) sa pet različitih sorbenasa za prečišćavanje dobijenih ekstrakata (PSA, C18, florisil, dijatomejska zemlja i klinoptilolit). Model uzorci zemljišta, napravljeni dodavanjem standardnog rastvora 16 PAU, tako da njihova koncentracija u uzorcima zemljišta iznosi 5, 0,5 i 0,05 mg kg<sup>-1</sup> ukupnih PAU, pripremljeni su QuEChERS tehnikom sa različitim kombinacijama rastvarača i sorbenasa i analizirani su na GC - MS. Izvršeno je određivanje osnovnih parametara validacije metode - tačnost, preciznost, LOD, LOQ, linearnost i nesigurnost.

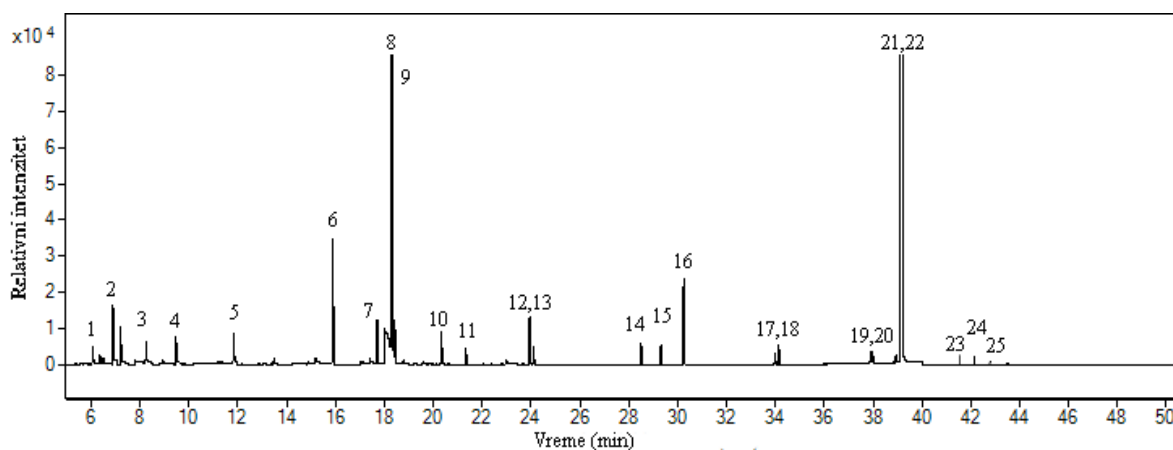
#### **4.3.1. Optimizacija QuEChERS tehnike pripreme uzoraka zemljišta za GC - MS analizu policikličnih aromatičnih ugljovodonika upotrebom smeše rastvarača acetonitril/voda**

Smeša acetonitrila i vode je prva upotrebljena u QuEChERS tehnici, u studiji koju su objavili *Anastassiades i saradnici* (2003), pa je iz tog razloga uzeta u razmatranje kao potencijalni rastvarač za ekstrakciju PAU iz uzoraka zemljišta. Model uzorci zemljišta koji sadrže 16 PAU u koncentracijama 5, 0,5 i 0,05 mg kg<sup>-1</sup> ekstrahovani su QuEChERS tehnikom i analizirani na GC - MS.

Na Slikama 32. - 34. prikazani su GC - MS hromatogrami, snimljeni u SIM modu, dobijeni snimanjem model uzoraka zemljišta pripremljenih QuEChERS tehnikom smešom rastvarača acetonitril/voda i dijatomejskom zemljom kao sorbensom za prečišćavanje.

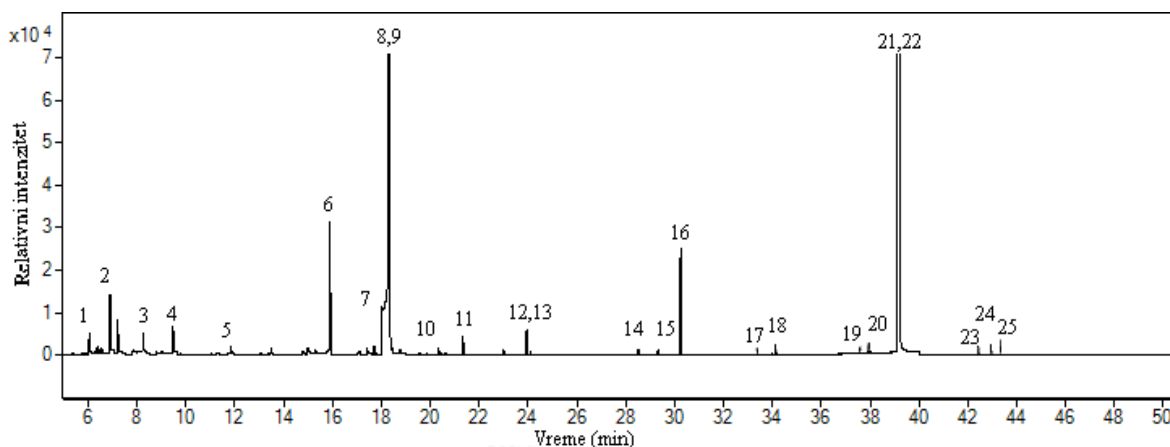


## Rezultati i diskusija



**Slika 32.** GC - MS hromatogram dobijen snimanjem ekstrakta uzorka pripremljenog QuEChERS tehnikom smešom rastvarača acetonitril/voda i ekstrakcijom disperznom čvrstom fazom uz dijatomejsku zemlju kao sorbens za nivo spajkovanja  $5 \text{ mg kg}^{-1}$

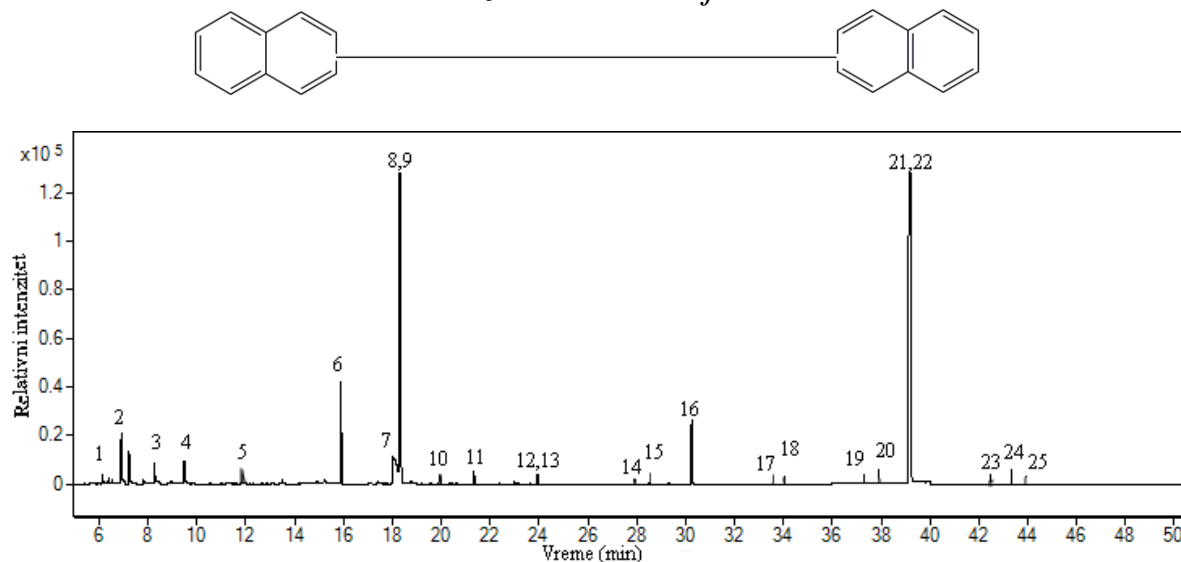
1: fenol  $d_6$ ; 2: 2-hlorfenol-3,4,5,6- $d_4$ ; 3: 1,2-dihlorbenzen- $d_4$ ; 4: nitrobenzen- $d_5$ ; 5: naftalen; 6: 2-fluorobifenil; 7: acenaftilen; 8: acenaften  $d_{10}$ ; 9: acenaften; 10: fluoren; 11: 2,4,6-tribromfenol; 12: fenantren; 13: antracen; 14: fluoranten; 15: piren; 16: p-terfenil- $d_{14}$ ; 17: hrizen; 18: benzo[a]antracen; 19: benzo[b]fluoranten; 20: benzo[k]fluoranten; 21: benzo[a]piren; 22: perilen  $d_{12}$ ; 23: indeno[1,2,3-cd]piren; 24: dibenzo[a,h]antracen; 25: benzo[g,h,i]perilen



**Slika 33.** GC - MS hromatogram dobijen snimanjem ekstrakta uzorka pripremljenog QuEChERS tehnikom smešom rastvarača acetonitril/voda i ekstrakcijom disperznom čvrstom fazom uz dijatomejsku zemlju kao sorbens za nivo spajkovanja  $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$

1: fenol  $d_6$ ; 2: 2-hlorfenol-3,4,5,6- $d_4$ ; 3: 1,2-dihlorbenzen- $d_4$ ; 4: nitrobenzen- $d_5$ ; 5: naftalen; 6: 2-fluorobifenil; 7: acenaftilen; 8: acenaften  $d_{10}$ ; 9: acenaften; 10: fluoren; 11: 2,4,6-tribromfenol; 12: fenantren; 13: antracen; 14: fluoranten; 15: piren; 16: p-terfenil- $d_{14}$ ; 17: hrizen; 18: benzo[a]antracen; 19: benzo[b]fluoranten; 20: benzo[k]fluoranten; 21: benzo[a]piren; 22: perilen  $d_{12}$ ; 23: indeno[1,2,3-cd]piren; 24: dibenzo[a,h]antracen; 25: benzo[g,h,i]perilen

## Rezultati i diskusija



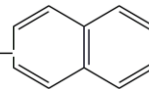
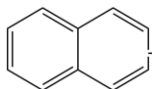
**Slika 34.** GC - MS hromatogram dobijen snimanjem ekstrakta uzorka pripremljenog QuEChERS tehnikom smešom rastvarača acetonitril/voda i ekstrakcijom disperznom čvrstom fazom uz dijatomejsku zemlju kao sorbens za nivo spajkovanja  $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$

1: fenol  $d_6$ ; 2: 2-hlorfenol-3,4,5,6- $d_4$ ; 3: 1,2-dihlorbenzen- $d_4$ ; 4: nitrobenzen- $d_5$ ; 5: naftalen; 6: 2-fluorobifenil; 7: acenaftilen; 8: acenaften  $d_{10}$ ; 9: acenaften; 10: fluoren; 11: 2,4,6-tribromfenol; 12: fenantren; 13: antracen; 14: fluoranten; 15: piren; 16: p-terfenil- $d_{14}$ ; 17: hrizen; 18: benzo[a]antracen; 19: benzo[b]fluoranten; 20: benzo[k]fluoranten; 21: benzo[a]piren; 22: perilen  $d_{12}$ ; 23: indeno[1,2,3-cd]piren; 24: dibenzo[a,h]antracen; 25: benzo[g,h,i]perilen

Kao što se može videti na slikama, postignuto je zadovoljavajuće razdvajanje analiziranih komponenti bez značajnih pikova koji potiču od eventualnih nečistoća.

Rezultati ispitivanja efikasnosti QuEChERS tehnike pripreme uzoraka zemljišta za analizu policikličnih aromatičnih ugljovodonika upotrebom smeše acetonitril/voda kao ekstrakcionog rastvarača i PSA, C18, florisil, dijatomejske zemlje i klinoptilolita kao sorbenata u ekstrakciji disperznom čvrstom fazom prikazane su u Tabeli 20.

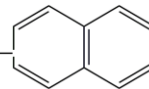
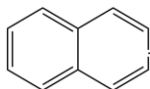
Rezultati i diskusija



**Tabela 20.** Efikasnosti određivanja 16 prioriternih policikličnih aromatičnih ugljovodonika (PAU niskih molekulskih masa - LMW PAU, PAU visokih molekulskih masa - HMW PAU) dobijene GS - MS analizom model uzoraka zemljišta pripremljenih QuEChERS tehnikom upotrebom smeše acetonitril/voda i različitih sorbenasa

		Efikasnost±SD (%)					
		Sorbens					
PAU	Koncentracija ukupnih PAU (mg kg <sup>-1</sup> )	PSA	C18	Florisil	Dijatomejska zemlja	Klinoptilolit	
LMW PAU	Naftalen	5	95±2	104±3	101±4	110±3	101±2
		0,5	90±2	102±4	102±3	102±2	98±2
		0,05	76±1	102±3	98±3	109±4	70±1
	Acenaftilen	5	100±2	97±4	88±2	100±4	101±4
		0,5	80±3	98±2	103±4	92±4	96±3
		0,05	100±4	87±2	92±3	83±2	77±4
	Acenaften	5	88±2	93±3	102±4	100±2	104±5
		0,5	100±3	109±4	100±3	87±3	104±5
		0,05	54±1	94±2	67±2	85±2	101±3
	Fluoren	5	100±3	108±5	93±2	100±3	92±4
		0,5	95±3	100±5	99±3	99±3	101±5
		0,05	90±2	81±2	108±5	94±2	97±2
	Fenantren	5	100±4	98±3	92±2	110±4	103±5
		0,5	96±3	84±3	90±3	94±2	111±5
		0,05	95±3	101±4	84±2	87±3	95±4
	Antracen	5	104±5	90±2	100±4	98±2	103±4
		0,5	87±2	100±3	96±3	92±1	97±4
		0,05	104±3	74±2	89±3	89±2	105±4
HMW PAU	Fluoranten	5	97±3	80±1	95±3	105±4	101±4
		0,5	80±2	98±3	90±3	91±3	102±4
		0,05	103±5	95±3	104±4	88±4	103±2
	Piren	5	75±3	64±2	60±1	97±2	75±2
		0,5	94±3	87±2	84±2	95±3	102±4
		0,05	85±2	72±2	77±3	87±5	84±3
	Hrizen	5	86±2	76±2	68±2	101±4	84±4
		0,5	88±2	74±2	69±2	100±3	90±2
		0,05	82±2	101±4	94±3	94±2	106±4
	Benzo[a]antracen	5	96±2	82±3	76±2	100±3	93±4
		0,5	105±5	99±3	99±3	93±3	110±2
		0,05	109±4	80±2	108±4	82±3	68±1

## Rezultati i diskusija



Benzo[b]fluoranten	5	95±4	101±4	98±3	103±4	101±3
	0,5	80±3	104±5	105±5	91±2	80±2
	0,05	68±3	75±2	93±3	81±4	99±5
Benzo[k]fluoranten	5	79±2	64±1	58±1	106±3	84±2
	0,5	92±3	82±3	62±2	108±4	90±4
	0,05	105±4	104±4	111±4	104±4	110±5
Benzo[a]piren	5	99±4	101±4	101±2	109±2	107±2
	0,5	99±3	107±4	74±2	106±4	79±3
	0,05	68±1	98±3	99±2	101±3	99±3
Indeno[1,2,3-cd]piren	5	86±2	93±2	73±1	90±1	99±4
	0,5	86±2	67±1	64±2	91±2	100±2
	0,05	100±5	69±2	77±2	98±4	93±3
Dibenzo[a,h]antracen	5	92±2	71±2	65±1	106±5	78±2
	0,5	93±2	51±2	96±2	104±3	101±4
	0,05	72±2	60±2	96±2	85±3	88±4
Benzo[g,h,i]perilen	5	74±2	52±2	41±1	95±2	50±2
	0,5	62±2	106±4	41±1	81±3	66±2
	0,05	104±5	98±2	84±2	105±4	95±2

U slučaju kombinacije acetonitrila i vode kao ekstrakcionog rastvarača i PSA kao sorbensa, dobijene su efikasnosti koje su bili u intervalu od 54% za acenaften do 109% za benzo[a]antracen. Većina rezultata imala je vrednosti preko 70% što je prihvatljiva vrednost za efikasnost metode. Samo četiri vrednosti bile su niže od ove granice, pa se smatra da se kombinacija smeše acetonitril/voda kao ekstrakcionog rastvarača i PSA kao sorbensa, koja je i prva kombinacija opisana u QuEChERS tehnici, može koristiti za analizu svih 16 PAU u uzorcima zemljišta. Dalja istraživanja biće usmerena ka menjanju odnosa uzorak/rastvarač/sorbens, kako bi se povećala efikasnost metode.

Kombinacija acetonitrila i vode kao ekstrakcionog rastvarača i C18 kao sorbensa takođe je dala dobre rezultate za analizirana jedinjenja. Najniža efikasnost iznosila je 51% za srednji nivo spajkovanja dibenzo[a,h]antracena. Najveća efikasnost zabeležena je za acenaften i iznosila je 109%. Odlične vrednosti dobijene su za LMW PAU, pa se ova kombinacija rastvarača i sorbensa može koristiti u njihovoj analizi. Sa samo 7 vrednosti nižih od 70% ova kombinacija se, uz određene izmene, može predložiti za analizu PAU u uzorcima zemljišta, u kombinaciji sa GC - MS.

S obzirom na to da je florisil sorbens za koji se smatra da vezuje polarne komponente, očekivane su i više vrednosti efikasnosti. Međutim, kombinacijom acetonitrila i vode kao rastvarača i florisila kao sorbensa dobijene su niže vrednosti u poređenju sa prethodna dva



sorbensa i smeše rastvarača acetonitril/voda. Vrednosti dobijene za ovu kombinaciju bile su u intervalu od 41% za benzo[g,h,i]perilen do 111% za benzo[k]fluoranten. Za neka od analiziranih jedinjenja dobijene su odlične efikasnosti (naftalen, acenaftilen, fluoren, antracen, fluoranten i benzo[b]fluoranten), pa se ova kombinacija rastvarač/sorbens može koristiti u analizi ovih jedinjenja.

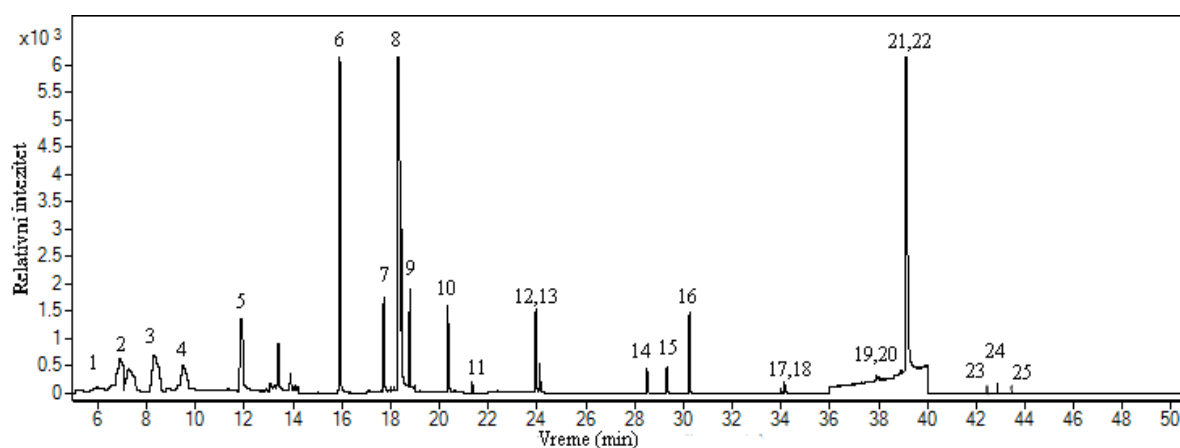
Kombinacija acetonitrila i vode kao ekstrakcionog rastvarača i dijatomejske zemlje kao sorbensa dala je odlične rezultate za sva analizirana jedinjenja i sva tri nivoa spajkovanja. Vrednosti za ovu kombinaciju bile su u intervalu od 81% benzo[b]fluoranten do 109% za benzo[a]piren. Sve vrednosti dobijene ovom kombinacijom bile su u opsegu između 70% i 120%. Čak su i za jedinjenje za koje je u prethodno opisanim kombinacijama rastvarača i sorbenasa (benzo[g,h,i]perilen) dobijene odlične efikasnosti (81 - 105%), za sva tri nivoa spajkovanja.

U kombinaciji sa acetonitrilom i vodom kao ekstrakcionim rastvaračem, klinoptilolit je kao sorbens dao rezultate koji su u rangu rezultata dobijenih upotrebom sorbenasa PSA i C18, ali nešto slabije u odnosu na dijatomejsku zemlju kao sorbens. Najveća efikasnost za ovu kombinaciju zabeležena je za fenantren i iznosila je 110%. Najniža vrednost bila je 50% i određena je za benzo[g,h,i]perilen.

#### **4.3.2. Optimizacija QuEChERS tehnike pripreme uzoraka zemljišta za analizu policikličnih aromatičnih ugljovodonika upotrebom smeše rastvarača heksan/voda.**

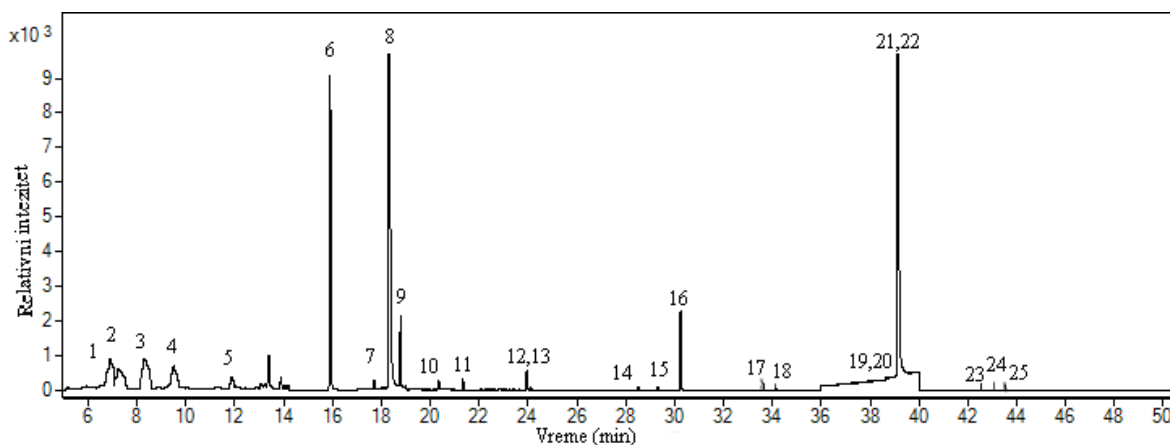
Heksan je odabran kao rastvarač zato što pripada grupi nepolarnih rastvarača i ranije je korišćen u ekstrakciji PAU iz zemljišta (*Shu i Lai*, 2001). Kako bi se pospešila ekstrakcija PAU nižih molekulskih masa, u zemljište je najpre dodata voda, s obzirom na to da se PAU nižih molekulskih masa delimično rastvaraju u vodi, a nakon toga heksan. Nakon ekstrakcije, alikvot ekstrakta prebačen je u kivetu sa odgovarajućim sorbensom. Ekstrakti su snimljeni na GC - MS u SIM modu i dobijeni hromatogrami prikazani su na Slikama 35. - 37.

## Rezultati i diskusija



**Slika 35.** GC - MS hromatogram dobijen snimanjem ekstrakta uzorka pripremljenog QuEChERS tehnikom smešom rastvarača heksan/voda i ekstrakcijom disperznom čvrstom fazom uz dijatomejsku zemlju kao sorbens za nivo spajkovanja  $5 \text{ mg kg}^{-1}$

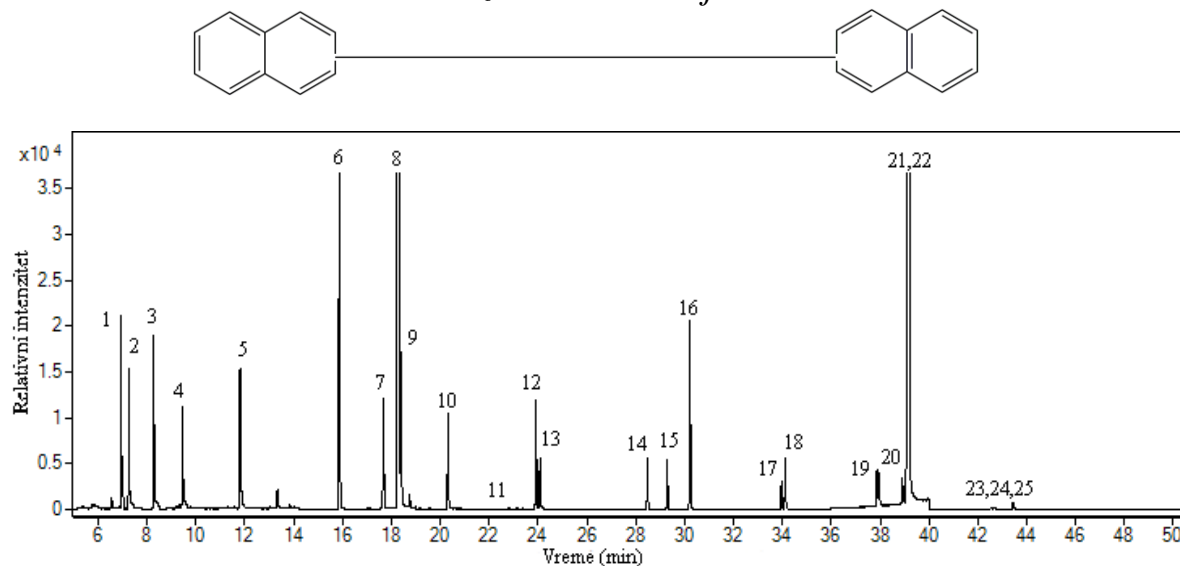
1: fenol  $d_6$ ; 2: 2-hlorfenol-3,4,5,6- $d_4$ ; 3: 1,2-dihlorbenzen- $d_4$ ; 4: nitrobenzen- $d_5$ ; 5: naftalen; 6: 2-fluorobifenil; 7: acenaftilen; 8: acenaften  $d_{10}$ ; 9: acenaften; 10: fluoren; 11: 2,4,6-tribromfenol; 12: fenantren; 13: antracen; 14: fluoranten; 15: piren; 16: p-terfenil- $d_{14}$ ; 17: hrizen; 18: benzo[a]antracen; 19: benzo[b]fluoranten; 20: benzo[k]fluoranten; 21: benzo[a]piren; 22: perilen  $d_{12}$ ; 23: indeno[1,2,3-cd]piren; 24: dibenzo[a,h]antracen; 25: benzo[g,h,i]perilen



**Slika 36.** GC - MS hromatogram dobijen snimanjem ekstrakta uzorka pripremljenog QuEChERS tehnikom smešom rastvarača heksan/voda i ekstrakcijom disperznom čvrstom fazom uz dijatomejsku zemlju kao sorbens za nivo spajkovanja  $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$

1: fenol  $d_6$ ; 2: 2-hlorfenol-3,4,5,6- $d_4$ ; 3: 1,2-dihlorbenzen- $d_4$ ; 4: nitrobenzen- $d_5$ ; 5: naftalen; 6: 2-fluorobifenil; 7: acenaftilen; 8: acenaften  $d_{10}$ ; 9: acenaften; 10: fluoren; 11: 2,4,6-tribromfenol; 12: fenantren; 13: antracen; 14: fluoranten; 15: piren; 16: p-terfenil- $d_{14}$ ; 17: hrizen; 18: benzo[a]antracen; 19: benzo[b]fluoranten; 20: benzo[k]fluoranten; 21: benzo[a]piren; 22: perilen  $d_{12}$ ; 23: indeno[1,2,3-cd]piren; 24: dibenzo[a,h]antracen; 25: benzo[g,h,i]perilen

## Rezultati i diskusija



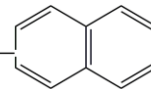
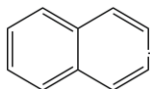
**Slika 37.** GC - MS hromatogram dobijen snimanjem ekstrakta uzorka pripremljenog QuEChERS tehnikom smešom rastvarača heksan/voda i ekstrakcijom disperznom čvrstom fazom uz dijatomejsku zemlju kao sorbens za nivo spajkovanja  $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$

1: fenol  $d_6$ ; 2: 2-hlorfenol-3,4,5,6- $d_4$ ; 3: 1,2-dihlorbenzen- $d_4$ ; 4: nitrobenzen- $d_5$ ; 5: naftalen; 6: 2-fluorobifenil; 7: acenaftilen; 8: acenaften  $d_{10}$ ; 9: acenaften; 10: fluoren; 11: 2,4,6-tribromfenol; 12: fenantren; 13: antracen; 14: fluoranten; 15: piren; 16: p-terfenil- $d_{14}$ ; 17: hrizen; 18: benzo[a]antracen; 19: benzo[b]fluoranten; 20: benzo[k]fluoranten; 21: benzo[a]piren; 22: perilen  $d_{12}$ ; 23: indeno[1,2,3-cd]piren; 24: dibenzo[a,h]antracen; 25: benzo[g,h,i]perilen

Optimalno razdvajanje postignuto je za svih 16 komponenata. Povećani šum javlja se na retencionom vremenu između 36 i 40 minuta, pa su pikovi koji se javljaju na ovom retencionom vremenu ručno integraljeni. Hromatogrami dobijeni snimanjem ekstrakata koji su pripremljeni smešom rastvarača heksan/voda i preostalim sorbensima nisu prikazani u radu zbog znatnijeg šuma koji je uočen na hromatogramima.

Rezultati ispitivanja efikasnosti QuEChERS tehnike pripreme uzoraka zemljišta za analizu policikličnih aromatičnih ugljovodonika upotrebom smeše heksan/voda kao ekstrakcionog rastvarača i PSA, C18, florisila, dijatomejske zemlje i klinoptilolita kao sorbenasa u ekstrakciji disperznom čvrstom fazom prikazane su u Tabeli 21.

Rezultati i diskusija

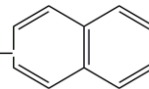
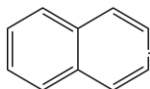


**Tabela 21.** Efikasnosti određivanja 16 prioritetnih policikličnih aromatičnih ugljovodonika (LMW PAU - PAU niskih molekulskih masa; HMW PAU - PAU visokih molekulskih masa) dobijene GS - MS analizom model uzoraka zemljišta pripremljenih QuEChERS tehnikom upotrebom smeše heksan/voda i različitih sorbenasa

PAU	Konzentracija ukupnih PAU (mg kg <sup>-1</sup> )	Efikasnost±SD (%)					
		PSA	C18	Florisil	Dijatomejska zemlja	Klinoptilolit	
LMW PAU	Naftalen	5	99±1	105±4	80±1	102±4	87±2
		0,5	109±2	101±3	95±2	32,3±0,9	100±4
		0,05	98±2	67±2	32,2±0,4	82±1	106±4
	Acenaftilen	5	63±1	68±1	49,7±0,7	54±2	54±2
		0,5	95±2	76±2	65±1	19,4±0,4	18,6±0,8
		0,05	107±3	114±4	97±3	52±2	103±4
	Acenaften	5	86±1	93±3	88±3	88±3	104±4
		0,5	98±2	67±2	109±4	96±2	112±5
		0,05	105±4	85±2	77±2	116±5	51±2
	Fluoren	5	91±3	77±2	63±1	56±1	51±1
		0,5	95±2	99±4	93±3	84±2	88±2
		0,05	88±3	110±4	60±2	87±2	66±1
	Fenantren	5	85±2	73±1	70±1	57±2	78±2
		0,5	88±2	92±3	43±2	93±4	80±2
		0,05	100±4	55±1	83±2	103±5	81±2
Antracen	5	82±1	62±2	65±2	29,7±0,7	32±1	
	0,5	79±2	72±2	52±1	51±2	46±1	
	0,05	83±2	87±3	95±2	88±2	73±2	
HMW PAU	Fluoranten	5	70±1	57±2	52±1	29±1	82±3
		0,5	86±3	87±2	65±1	55±2	65±2
		0,05	82±3	84±2	70±2	53±1	84±2
	Piren	5	102±4	102±3	54±1	102±5	85±1
		0,5	103±3	107±4	98±2	84±2	93±3
		0,05	102±4	105±3	109±4	64±2	90±3
	Hrizen	5	79±1	85±2	59±1	51±2	53±2
		0,5	85±3	98±2	68±2	66±2	62±2
		0,05	107±4	79±1	82±2	99±4	88±3
	Benzo[a]antracen	5	79±2	101±3	61±1	87±1	92±3
		0,5	90±5	107±4	103±4	98±2	85±3
		0,05	62±3	100±1	103±4	54±2	79±1
	Benzo[b]fluoranten	5	93±4	99±2	89±2	89±2	83±3
		0,5	91±2	100±4	82±1	75±2	65±2
		0,05	111±4	66±2	56±1	82±2	91±3



Rezultati i diskusija



Benzo[k]fluoranten	5	70±1	78±1	53±2	82±2	99±3
	0,5	87±5	94±2	52±2	79±2	93±2
	0,05	84±2	63±2	59±2	67±1	79±2
Benzo[a]piren	5	86±3	101±3	100±2	25±1	79±2
	0,5	101±4	100±2	103±4	27±1	82±2
	0,05	97±1	102±3	95±3	20±1	26±1
Indeno[1,2,3-cd]piren	5	36,3±0,4	94±1	42±2	103±3	74±2
	0,5	62±1	54±2	35±1	102±4	32±1
	0,05	55±2	108±4	87±3	104±5	37,6±0,9
Dibenzo[a,h]antracen	5	102±4	42±1	63±2	76±2	52±1
	0,5	99±3	41±1	49±2	63±1	62±2
	0,05	64±1	90±3	71±2	47±1	50±1
Benzo[g,h,i]perilen	5	10,0±0,9	17,1±0,9	31,3±0,8	15,0±0,9	19,2±0,7
	0,5	3,7±0,2	9±1	36±1	3,3±0,6	8±1
	0,05	2,5±0,4	5,2±0,3	1,92±0,09	1,8±0,2	7,5±0,6

## Rezultati i diskusija



U slučaju kombinacije heksan/voda kao ekstrakcionog rastvarača i PSA kao sorbensa za prečišćavanje, efikasnosti su bile u intervalu od 2,5% za benzo[g,h,i]perilen do 111% za benzo[b]fluoranten. Bolje efikasnosti dobijene su za PAU nižih molekulskih masa, u odnosu na PAU visokih molekulskih masa. Odlične vrednosti dobijene su za naftalen (98 - 109%) i piren (102 - 103%), za sva tri nivoa spajkovanja.

Slične vrednosti efikasnosti dobijene su za kombinaciju heksan/voda kao ekstrakcionog rastvarača i C18 kao sorbensa. U ovom slučaju najniža efikasnost zabeležena je za benzo[g,h,i]perilen i iznosila je 5,2%, za najniži nivo spajkovanja. I za preostala dva nivoa spajkovanja za ovo jedinjenje dobijene su izuzetno niske efikasnosti (9 i 17,1%), što se može objasniti činjenicom da benzo[g,h,i]perilen ima jak afinitet vezivanja za čvrstu fazu, zemljište, pa postoji mogućnost da nije ekstrahovan u odgovarajućoj meri, ili sorbens, pa je prilikom prečišćavanja zaostao na sorbensu. Kao i prilikom upotrebe PSA kao sorbensa, tako su i uz C18 bolje efikasnosti dobijene za LMW nego za HMW PAU. U slučaju upotrebe C18 kao sorbensa za prečišćavanje, odlične vrednosti dobijene su za benzo[a]piren (100 - 102%), za sva tri nivoa spajkovanja. Ovo jedinjenje je po klasifikaciji IARC svrstano u grupu dokazanih kancerogena za ljude, pa je njegova analiza od velikog značaja. Ako se uzmu u obzir odlične efikasnosti dobijene kombinacijom heksan/voda kao ekstrakcionog rastvarača i C18 kao sorbens, može se zaključiti da se na ovaj način može analizirati benzo[a]piren.

Florisil je sorbens koji je ranije korišćen u analizi PAU pomoću ekstrakcije pod pritiskom (PLE - pressurized liquid extraction) (*Shu i Lai*, 2001), ali do sada nije korišćen kao sorbens u QuEChERS tehnici za analizu PAU. Najviša efikasnost za ovu kombinaciju rastvarač/sorbens zabeležena je za acenaften (109%), dok je najniža vrednost kao i u slučaju prethodna dva sorbensa, zabeležena za benzo[g,h,i]perilen (1,92%). Ova kombinacija je u poređenju sa kombinacijama heksan/voda/PSA i heksan/voda/C18 dala nešto niže vrednosti, i većina njih je bila u rasponu 50 - 60%. Za benzo[a]piren dobijene su vrednosti u rasponu od 95 - 103%, pa se smeša heksan/voda kao rastvarač u kombinaciji sa C18 kao sorbensom može koristiti u QuEChERS tehnici za analizu ovog jedinjenja u uzorcima zemljišta.

Efikasnosti dobijene prilikom upotrebe smeše heksana i voda kao ekstrakcionog rastvarača i dijatomejske zemlje kao sorbensa za prečišćavanje bile su u intervalu od 1,8% za benzo[g,h,i]perilen do 116% za acenaften. U poređenju sa prethodno pomenutim sorbensima u kombinaciji sa smešom rastvarača heksan/voda, ova kombinacija dala je niže efikasnosti.



Takođe, uočava se i razlika između efikasnosti za različite nivoe spajkovanja kod istih jedinjenja. Tako, prilikom analize naftalena u uzorku sa srednjim nivoom spajkovanja postignuta je efikasnost od 32,3%, dok za najviši nivo spajkovanja efikasnost dostiže 102%. Jedinjenje koje je kombinacijom heksan/voda kao ekstrakcioni rastvarač i dijatomejska zemlja kao sorbens dalo odlične rezultate je indeno[1,2,3-cd]piren (102 - 104%), za sva tri nivoa spajkovanja.

Vrednosti efikasnosti dobijene kombinacijom heksan/voda kao ekstrakcioni rastvarač i klinoptilolit kao sorbens iznosile su od 7,5% za benzo[g,h,i]perilen do 112% za acenaften. Vrednosti dobijene za ovu kombinaciju bile su nešto bolje u odnosu na one dobijene kada je kao sorbens korišćena dijatomejska zemlja, ali malo lošije u odnosu na ostale testirane sorbense u kombinaciji sa smešom rastvarača heksan/voda.

Ni jedna od kombinacija heksana i vode kao ekstrakcionih rastvarača i pet testiranih sorbenasa nije dala zadovoljavajuće vrednosti efikasnosti za analizu svih 16 policikličnih aromatičnih ugljovodonika.

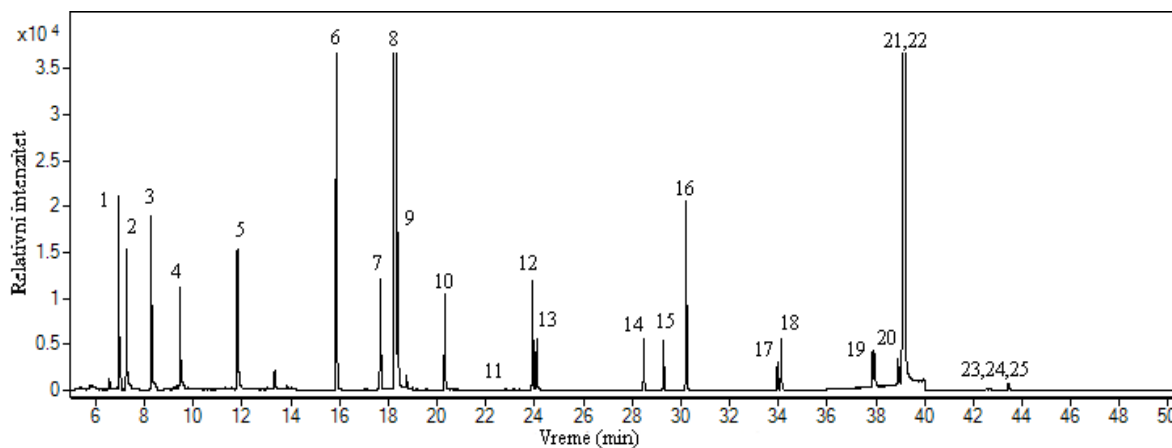
#### **4.3.3. Optimizacija QuEChERS tehnike pripreme uzoraka zemljišta za analizu policikličnih aromatičnih ugljovodonika upotrebom etil - acetata**

Etil - acetat je odabran kao rastvarač na osnovu njegove uspešne upotrebe za ekstrakciju policikličnih aromatičnih ugljovodonika iz uzoraka čaja (*Sadowska-Rociak i sar.*, 2014).

Model uzorci zemljišta koji sadrže 16 PAU pripremljeni su QuEChERS tehnikom sa etil - acetatom kao rastvaračem, u kombinaciji sa 5 različitih sorbenasa i analizirani na GC - MS.

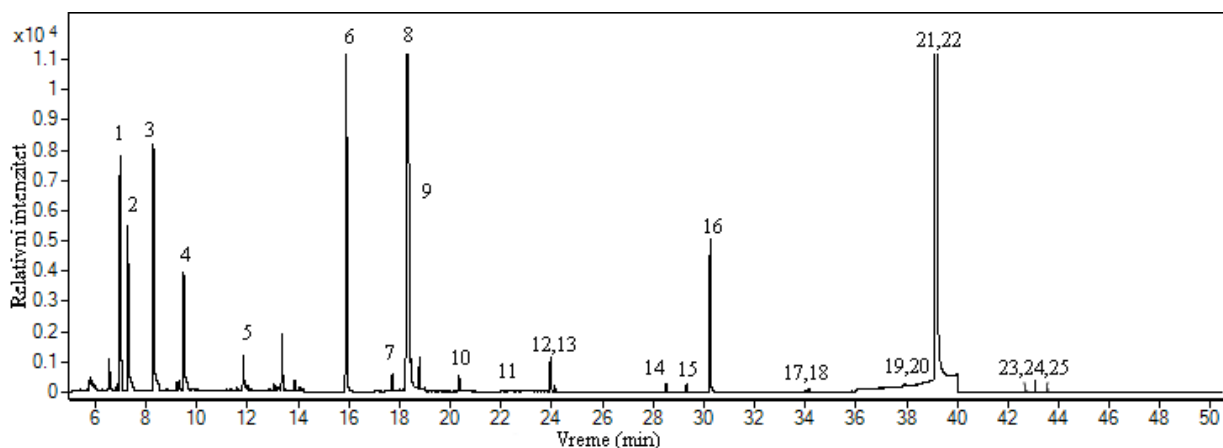


Na Slikama 38. - 40. prikazani su hromatogrami dobijeni snimanjem u SIM modu spajkovanih uzoraka pripremljenih QuEChERS tehnikom uz upotrebu etil - acetata kao rastvarača i PSA kao sorbensa za prečišćavanje.



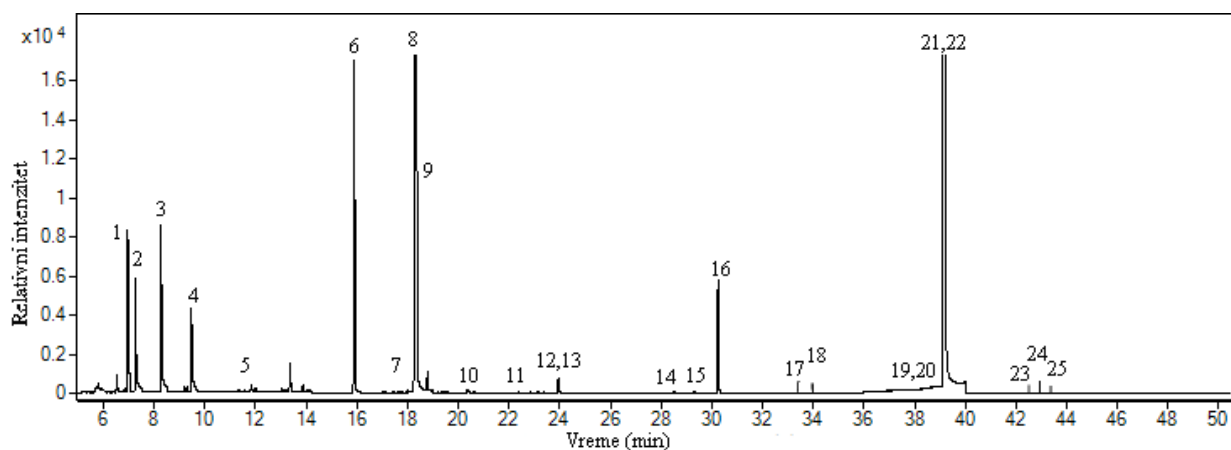
**Slika 38.** GC - MS hromatogram dobijen snimanjem ekstrakta uzorka pripremljenog QuEChERS tehnikom etil - acetatom i ekstrakcijom disperznom čvrstom fazom uz PSA kao sorbens za nivo spajkovanja  $5 \text{ mg kg}^{-1}$

1: fenol  $d_6$ ; 2: 2-hlorfenol-3,4,5,6- $d_4$ ; 3: 1,2-dihlorbenzen- $d_4$ ; 4: nitrobenzen- $d_5$ ; 5: naftalen; 6: 2-fluorobifenil; 7: acenaftilen; 8: acenaften  $d_{10}$ ; 9: acenaften; 10: fluoren; 11: 2,4,6-tribromfenol; 12: fenantren; 13: antracen; 14: fluoranten; 15: piren; 16: p-terfenil- $d_{14}$ ; 17: hrizen; 18: benzo[a]antracen; 19: benzo[b]fluoranten; 20: benzo[k]fluoranten; 21: benzo[a]piren; 22: perilen  $d_{12}$ ; 23: indeno[1,2,3-cd]piren; 24: dibenzo[a,h]antracen; 25: benzo[g,h,i]perilen



**Slika 39.** GC - MS hromatogram dobijen snimanjem ekstrakta uzorka pripremljenog QuEChERS tehnikom etil - acetatom i ekstrakcijom disperznom čvrstom fazom uz PSA kao sorbens za nivo spajkovanja  $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$

1: fenol  $d_6$ ; 2: 2-hlorfenol-3,4,5,6- $d_4$ ; 3: 1,2-dihlorbenzen- $d_4$ ; 4: nitrobenzen- $d_5$ ; 5: naftalen; 6: 2-fluorobifenil; 7: acenaftilen; 8: acenaften  $d_{10}$ ; 9: acenaften; 10: fluoren; 11: 2,4,6-tribromfenol; 12: fenantren; 13: antracen; 14: fluoranten; 15: piren; 16: p-terfenil- $d_{14}$ ; 17: hrizen; 18: benzo[a]antracen; 19: benzo[b]fluoranten; 20: benzo[k]fluoranten; 21: benzo[a]piren; 22: perilen  $d_{12}$ ; 23: indeno[1,2,3-cd]piren; 24: dibenzo[a,h]antracen; 25: benzo[g,h,i]perilen



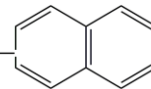
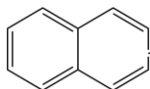
**Slika 40.** GC - MS hromatogram dobijen snimanjem ekstrakta uzorka pripremljenog QuEChERS tehnikom etil - acetatom i ekstrakcijom disperznom čvrstom fazom uz PSA kao sorbens za nivo spajkovanja  $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$

1: fenol  $d_6$ ; 2: 2-hlorfenol-3,4,5,6- $d_4$ ; 3: 1,2-dihlorbenzen- $d_4$ ; 4: nitrobenzen- $d_5$ ; 5: naftalen; 6: 2-fluorobifenil; 7: acenaftilen; 8: acenaften  $d_{10}$ ; 9: acenaften; 10: fluoren; 11: 2,4,6-tribromfenol; 12: fenantren; 13: antracen; 14: fluoranten; 15: piren; 16: p-terfenil- $d_{14}$ ; 17: hrizen; 18: benzo[a]antracen; 19: benzo[b]fluoranten; 20: benzo[k]fluoranten; 21: benzo[a]piren; 22: perilen  $d_{12}$ ; 23: indeno[1,2,3-cd]piren; 24: dibenzo[a,h]antracen; 25: benzo[g,h,i]perilen

Dobijeni hromatogrami ukazuju na to da je postignuto optimalno razdvajanje za sva analizirana jedinjenja. Manji šum zapažen je za opseg retencionih vremena od 36 - 40 minuta.

U Tabeli 22. prikazane su efikasnosti QuEChERS tehnike pripreme uzoraka zemljišta za određivanje 16 prioriternih policikličnih aromatičnih ugljovodonika upotrebom etil - acetata kao ekstrakcionog rastvarača i PSA, C18, florisila, dijatomejske zemlje i klinoptilolita kao sorbenasa u ekstrakciji disperznom čvrstom fazom.

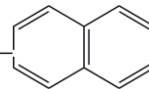
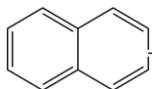
Rezultati i diskusija



**Tabela 22.** Efikasnosti određivanja 16 prioritetnih policikličnih aromatičnih ugljovodonika (PAU niskih molekulskih masa - LMW PAU, PAU visokih molekulskih masa - HMW PAU) dobijene GS - MS analizom model uzoraka zemljišta pripremljenih QuEChERS tehnikom upotrebom etil - acetata i različitih sorbenasa

PAU	Konzentracija ukupnih PAU (mg kg <sup>-1</sup> )	PSA	Efikasnost ± SD (%)				
			Sorbens				
			C18	Florisil	Dijatomejska zemlja	Klinoptilolit	
LMW PAU	Naftalen	5	101±2	93±3	92±4	63±1	64±1
		0,5	95±3	98±2	101±2	83±1	77±2
		0,05	87±2	75±3	100±2	76±1	73±2
	Acenaftilen	5	59±1	43,2±0,8	53±1	54,8±0,7	52±1
		0,5	69±3	98±2	70±2	59,0±0,3	65±1
		0,05	85±1	80±3	76±2	56±2	54±1
	Acenaften	5	96±3	97±3	93±3	64,0±0,7	70±2
		0,5	116±4	98±5	77±2	86±2	80±2
		0,05	103±5	81±2	93±4	73±2	80±2
	Fluoren	5	94±3	69±1	71±2	52,3±0,6	52±1
		0,5	100±4	88±2	89±2	56,0±0,9	62,3±0,5
		0,05	85±4	84±2	81±3	61,6±0,7	53,1±0,7
	Fenantren	5	93±3	94±2	66±1	62±2	61,2±0,9
		0,5	95±3	90±3	75±2	78±2	67,7±0,6
		0,05	96±3	83±1	73±2	75±2	74±1
	Antracen	5	96±3	74±2	60,4±0,9	84±2	52,7±0,7
		0,5	69±2	78±3	64±3	76±2	53,6±0,7
		0,05	98±3	102±3	63±1	78±2	55,0±0,7
HMW PAU	Fluoranten	5	81±2	56±2	56±2	48,4±0,8	52±2
		0,5	96±3	82±2	77±2	52±1	58±1
		0,05	81±2	79±2	63,6±0,9	44,8±0,9	47±2
	Piren	5	73±2	84±3	78±2	43,9±0,7	53,3±0,7
		0,5	76±2	102±5	96±4	58±1	62,2±0,6
		0,05	77±3	77±3	83±1	41±1	77±1
	Hrizen	5	73±1	55±2	57±2	27,0±0,9	34,3±0,5
		0,5	72±2	58,0±0,9	62±1	32,3±0,8	41,1±0,8
		0,05	62±2	64±2	54,9±0,6	35,5±0,4	43,9±0,6
	Benzo[a]antracen	5	82±3	73±3	71±1	51±1	57±1
		0,5	95±2	97±4	91±3	52,5±0,6	65±2
		0,05	88±2	77±1	67±3	75±1	95,8±0,7
	Benzo[b]fluoranten	5	83±2	91±2	94±2	62±2	53,9±0,5
		0,5	96±3	96±3	88±2	74±2	64±1
		0,05	75±3	77±2	73±2	72±2	54,3±0,8
	Benzo[k]fluoranten	5	82±3	62±1	55±1	35,0±0,6	51,3±0,6
		0,5	95±3	70±2	70±2	40±1	63,4±0,7
		0,05	108±4	69±2	80±4	48,3±0,6	64,9±0,8

*Rezultati i diskusija*



Benzo[a]piren	5	95±5	97±3	100±4	99±3	78±4
	0,5	79±2	87±3	105±2	83±3	93±2
	0,05	102±5	89±2	106±4	98±4	64±2
Indeno[1,2,3-cd]piren	5	62±1	42±1	78±2	32±1	81±2
	0,5	100±4	61±2	84±2	53,6±0,6	85±3
	0,05	86±2	68±2	83±3	38,0±0,6	89±2
Dibenzo[a,h]antracen	5	94±2	67±2	64±1	64±1	32,3±0,7
	0,5	87±3	61±1	78±2	59±2	49,4±0,4
	0,05	87±4	61±1	52±1	61±2	39,6±0,5
Benzo[g,h,i]perilen	5	70±2	41±1	30,3±0,7	43,3±0,7	37,3±0,7
	0,5	70±3	36,2±0,8	30,6±0,2	38±1	24,3±0,5,
	0,05	58±2	30±1	21,8±0,7	37±1	23±1

## Rezultati i diskusija



PSA je sorbens od koga se očekuje da iz ekstrakta ukloni polarne supstance, kao što su huminske kiseline, koje su prisutne u zemljištu. U kombinaciji sa etil - acetatom kao rastvaračem, PSA je kao sorbens dao dobre rezultate. Najniža efikasnost zabeležena je za benzo[g,h,i]perilen i iznosila je 58%. Najveća efikasnost iznosila je 116% i zabeležena je za acenaften. Kao i kod ostalih kombinacija rastvarač/sorbens, bolje efikasnosti zabeležene su za LMW PAU i bile su u rasponu od 80-100%, pa se ova kombinacija rastvarač/sorbens može koristiti u analizi LMW PAU.

C18 je sorbens nepolarne prirode. Efikasnosti dobijene kombinacijom etil - acetata kao ekstrakcionog rastvarača i C18 kao sorbensa bile su nešto niže u poređenju sa onima dobijenim kombinacijom etil - acetat i PSA. Najviša vrednost dobijena je za antracen i iznosila je 102%, dok je najniža vrednost dobijena za benzo[g,h,i]perilen i iznosila je 30%. Niske efikasnosti mogu se objasniti nepolarnom prirodom C18 kao sorbensa i njegovom osobinom da na svojoj površini vezuje nepolarna jedinjenja. Jako mali broj efikasnosti iznosio je blizu 100%, pa se ova kombinacija rastvarača za ekstrakciju i sorbensa za prečišćavanje dobijenog ekstrakta disperznom čvrstom fazom ne preporučuje za analizu 16 prioriternih PAU.

Florisil kao sorbens je u kombinaciji sa etil - acetatom kao rastvaračem dao efikasnosti od 21,8 % za benzo[g,h,i]perilen do 106 % za benzo[a]piren. Odlične vrednosti za ovu kombinaciju rastvarač/sorbens zabeležene su za naftalen i benzo[a]piren. Vrednosti za naftalen bile su u intervalu od 92-101%, a za benzo[a]piren od 100-106%, što ukazuje na to da se ova kombinacija rastvarač/sorbens može koristiti za analizu ove dve komponente. U kombinaciji sa preostala dva sorbensa (klinoptilolitom i dijatomejskom zemljom) etil - acetat je dao lošije rezultate. U kombinaciji etil - acetata i dijatomejske zemlje treba izdvojiti rezultate za benzo[a]piren, koji su bili u rasponu od 83 do 99%, za sva tri nivoa spajkovanja. Za ostala analizirana jedinjenja dobijene su znatno niže efikasnosti.



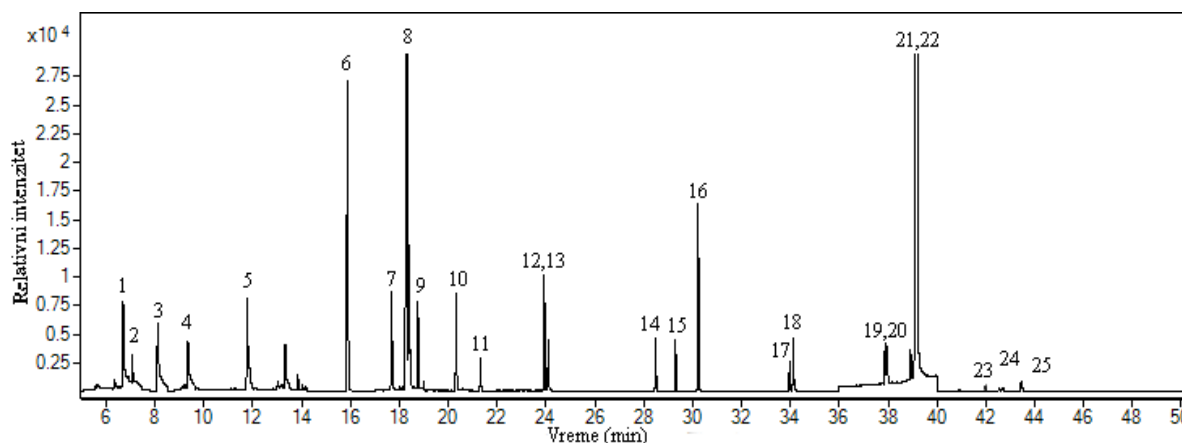


#### 4.3.4. Optimizacija QuEChERS tehnike pripreme uzoraka zemljišta za analizu policikličnih aromatičnih ugljovodonika upotrebom smeše rastvarača heksan/aceton

Smeša heksana i acetona odabrana je za ekstrakciju na osnovu ranije publikovanih radova (*Pena i sar.*, 2007; *Shu i Lai*, 2001). Heksan se kao nepolaran rastvarač ne meša sa vodom, pa bi u tom slučaju postojao problem pri ekstrakciji PAU iz vlažnih zemljišta. Aceton rešava ovaj problem, pošto se meša i sa nepolarnim rastvaračima, kao što je heksan, i sa vodom i na taj način omogućava efikasnu ekstrakciju PAU kako iz suvih, tako i iz vlažnih zemljišta.

Uzorci zemljišta spajkovani standardnim rastvorom koji sadrži 16 PAU pripremljeni su QuEChERS tehnikom sa smešom rastvarača heksan/aceton, u kombinaciji sa 5 različitih sorbenasa i analizirani na GC - MS.

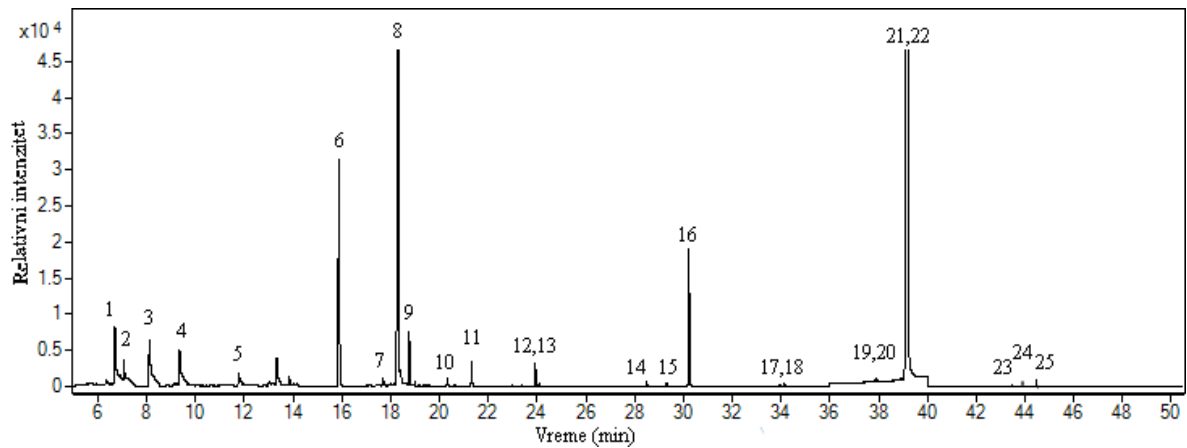
Na Slikama 41. - 43. prikazani su hromatogrami, snimljeni u SIM modu, dobijeni snimanjem ekstrakata model uzoraka zemljišta pripremljenih QuEChERS tehnikom uz upotrebu smeše heksan/aceton kao rastvarača i klinoptilolitom kao sorbensom za prečišćavanje. Ovi hromatogrami odabrani su za prikaz iz razloga što je šum na hromatogramima najmanji za ovu kombinaciju rastvarač/sorbens.



**Slika 41.** GC - MS hromatogram dobijen snimanjem ekstrakta uzorka pripremljenog QuEChERS tehnikom smešom rastvarača heksan/aceton i ekstrakcijom disperznom čvrstom fazom uz klinoptilolit kao sorbens za nivo spajkovanja  $5 \text{ mg kg}^{-1}$

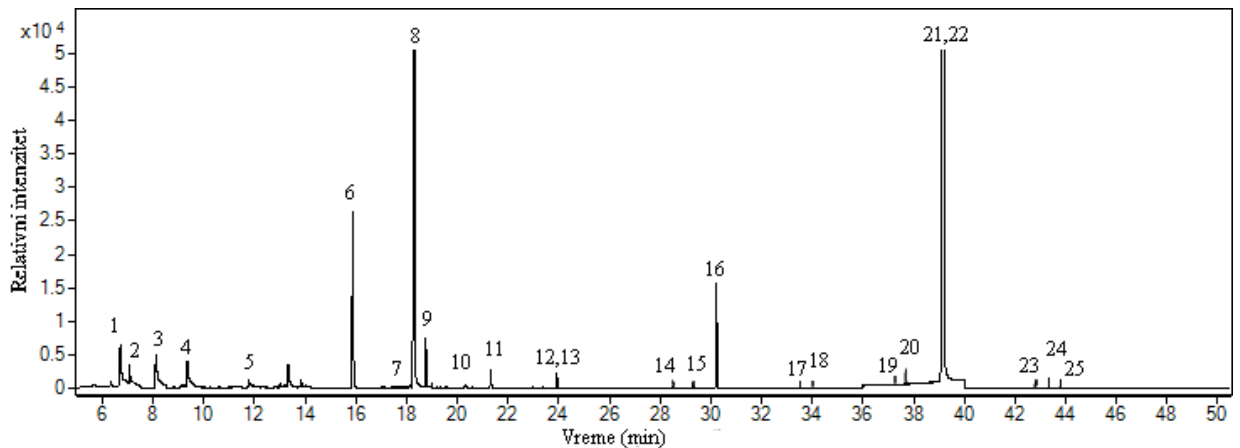
1: fenol  $d_6$ ; 2: 2-hlorfenol-3,4,5,6- $d_4$ ; 3: 1,2-dihlorbenzen- $d_4$ ; 4: nitrobenzen- $d_5$ ; 5: naftalen; 6: 2-fluorobifenil; 7: acenaftilen; 8: acenaften  $d_{10}$ ; 9: acenaften; 10: fluoren; 11: 2,4,6-tribromfenol; 12: fenantren; 13: antracen; 14: fluoranten; 15: piren; 16: p-terfenil- $d_{14}$ ; 17: hrizen; 18: benzo[a]antracen; 19: benzo[b]fluoranten; 20: benzo[k]fluoranten; 21: benzo[a]piren; 22: perilen  $d_{12}$ ; 23: indeno[1,2,3-cd]piren; 24: dibenzo[a,h]antracen; 25: benzo[g,h,i]perilen

## Rezultati i diskusija



**Slika 42.** GC - MS hromatogram dobijen snimanjem ekstrakta uzorka pripremljenog QuEChERS tehnikom smešom rastvarača heksan/acetona i ekstrakcijom disperznom čvrstom fazom uz klinoptilolit kao adsorbens za nivo spajkovanja  $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$

1: fenol  $d_6$ ; 2: 2-hlorfenol-3,4,5,6- $d_4$ ; 3: 1,2-dihlorbenzen- $d_4$ ; 4: nitrobenzen- $d_5$ ; 5: naftalen; 6: 2-fluorobifenil; 7: acenaftilen; 8: acenaften  $d_{10}$ ; 9: acenaften; 10: fluoren; 11: 2,4,6-tribromfenol; 12: fenantren; 13: antracen; 14: fluoranten; 15: piren; 16: p-terfenil- $d_{14}$ ; 17: hrizen; 18: benzo[a]antracen; 19: benzo[b]fluoranten; 20: benzo[k]fluoranten; 21: benzo[a]piren; 22: perilen  $d_{12}$ ; 23: indeno[1,2,3-cd]piren; 24: dibenzo[a,h]antracen; 25: benzo[g,h,i]perilen



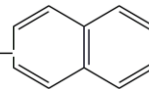
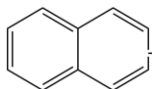
**Slika 43.** GC - MS hromatogram dobijen snimanjem ekstrakta uzorka pripremljenog QuEChERS tehnikom smešom rastvarača heksan/acetona i ekstrakcijom disperznom čvrstom fazom uz klinoptilolit kao adsorbens za nivo spajkovanja  $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$

1: fenol  $d_6$ ; 2: 2-hlorfenol-3,4,5,6- $d_4$ ; 3: 1,2-dihlorbenzen- $d_4$ ; 4: nitrobenzen- $d_5$ ; 5: naftalen; 6: 2-fluorobifenil; 7: acenaftilen; 8: acenaften  $d_{10}$ ; 9: acenaften; 10: fluoren; 11: 2,4,6-tribromfenol; 12: fenantren; 13: antracen; 14: fluoranten; 15: piren; 16: p-terfenil- $d_{14}$ ; 17: hrizen; 18: benzo[a]antracen; 19: benzo[b]fluoranten; 20: benzo[k]fluoranten; 21: benzo[a]piren; 22: perilen  $d_{12}$ ; 23: indeno[1,2,3-cd]piren; 24: dibenzo[a,h]antracen; 25: benzo[g,h,i]perilen

Dobijeni hromatogrami ukazuju na to da je postignuto optimalno razdvajanje za sva analizirana jedinjenja. Manji šum zapažen je pri retencionom vremenu od 36 - 40 minuta.

U Tabeli 23. prikazane su efikasnosti određivanja 16 policikličnih aromatičnih ugljovodonika iz zemljišta pripremljenih QuEChERS tehnikom smešom heksan/acetona kao

## Rezultati i diskusija

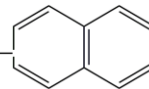
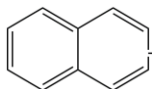


rastvarača, u kombinaciji sa PSA, C18, florisilom, dijatomejskom zemljom i klinoptilolitom kao dSPE sorbensima.

**Tabela 23.** Efikasnost određivanja 16 prioriternih policikličnih aromatičnih ugljovodonika (PAU niskih molekulskih masa - LMW PAU, PAU visokih molekulskih masa - HMW PAU) dobijene GC - MS analizom u ekstraktima pripremljenim QuEChERS tehnikom upotrebom smeše heksan/acetona i različitih sorbenasa

PAU	Konzentracija ukupnih PAU (mg kg <sup>-1</sup> )	Efikasnost ± SD (%)					
		PSA	C18	Sorbens			
				Florisil	Dijatomejska zemlja	Klinoptilolit	
LMW PAU	Naftalen	5	101±4	101±4	98±2	98±3	95±2
		0,5	85±2	93±2	93±2	94±2	83±2
		0,05	95±3	81±2	95±3	86±2	71±2
	Acenaftilen	5	85±2	92±2	91±2	97±3	91±3
		0,5	89±3	92±2	87±2	84±2	84±3
		0,05	90±3	87±2	78±2	95±3	98±3
	Acenaften	5	100±5	100±4	85±3	91±2	93±2
		0,5	73±2	93±2	106±4	108±4	87±2
		0,05	73±2	70±1	98±4	78±2	101±3
	Fluoren	5	74±3	73±2	89±3	83±3	87±1
		0,5	101±5	99±3	93±3	87±3	99±3
		0,05	99±3	110±4	101±4	70±1	95±3
	Fenantren	5	97±4	77±2	93±2	90±2	96±2
		0,5	98±3	96±3	101±4	92±2	100±3
		0,05	93±2	101±4	77±2	105±4	108±4
	Antracen	5	72±4	93±3	82±3	80±1	84±2
		0,5	84±4	95±2	75±1	73±2	86±2
		0,05	88±3	89±2	94±2	99±4	89±1
HMW PAU	Fluoranten	5	93±4	54,8±0,8	75±2	73±1	78±1
		0,5	75±3	58±2	91±4	85±2	97±3
		0,05	75±2	51,4±0,8	89±3	73±2	91±2
	Piren	5	104±4	105±4	57±1	54±1	86±1
		0,5	90±2	84±2	55±1	64±2	87±3
		0,05	101±4	76±1	55±1	76±2	89±3
	Hrizen	5	68±2	72±3	65±2	64±1	86±2
		0,5	61±2	75±2	60±1	53±2	84±2
		0,05	84±2	73±2	71±2	70±1	83±2
	Benzo[a]antracen	5	96±4	96±3	75±2	71±2	74±2
		0,5	99±3	86±1	72±2	68±2	88±2
		0,05	93±3	88±4	72±2	80±2	72±1
	Benzo[b]fluoranten	5	98±2	105±5	107±4	107±4	96±4
		0,5	104±5	81±3	99±2	98±2	106±4
		0,05	89±2	87±2	89±2	80±2	91±2

Rezultati i diskusija



Benzo[k]fluoranten	5	68±1	76±1	73±1	76±2	75±1
	0,5	91±4	74±2	71±1	80±2	96±2
	0,05	67±2	76±2	72±1	83±3	103±4
Benzo[a]piren	5	101±4	101±5	104±4	102±4	102±4
	0,5	102±4	88±2	71±1	93±3	88±2
	0,05	74±2	97±4	109±4	79±2	94±4
Indeno[1,2,3-cd]piren	5	90±3	96±4	85±3	98±3	93±3
	0,5	88±2	94±2	99±4	94±4	103±3
	0,05	90±3	101±5	92±3	90±2	90±3
Dibenzo[a,h]antracen	5	97±3	75±1	95±2	109±4	109±4
	0,5	81±1	73±2	73±2	94±2	105±4
	0,05	92±2	68±2	98±3	71±2	91±2
Benzo[g,h,i]perilen	5	92±3	62±2	88±2	72±2	77±1
	0,5	92±4	82±3	82±2	72±2	92±3
	0,05	62±2	81±2	81±3	99±3	82±2

## Rezultati i diskusija



U kombinaciji smeše rastvarača heksan/aceton kao ekstrakcionog rastvarača i PSA kao sorbensa dobijene su zadovoljavajuće vrednosti efikasnosti određivanja za većinu analiziranih komponenti. Kao i u većini slučajeva, najniža efikasnost zabeležena je za benzo[g,h,i]perilen i iznosila je 62%. Ovo jedinjenje ima veliku sposobnost vezivanja za organsku materiju zemljišta, te postoji mogućnost da nije ekstrahovano iz zemljišta u odgovarajućoj meri pri ovim uslovima. Znatno bolje vrednosti zabeležene su za LMW PAU, pa se smatra da ova kombinacija može biti korišćena u analizi policikličnih aromatičnih ugljovodonika niskih molekulskih masa. Najviša efikasnost iznosila je 104% i određena je za benzo[b]fluoranten.

Vrednosti efikasnosti za kombinaciju smeše rastvarača heksan/aceton i C18 kao sorbensa bile su u intervalu od 51,4% za fluoranten do 110% za fluoren. U poređenju sa vrednostima dobijenim za istu smešu rastvarača i PSA kao sorbens, dobijene su slične vrednosti. Odlične vrednosti dobijene su za benzo[a]piren upotrebom smeše rastvarača heksan/aceton i C18. Vrednosti za ovo jedinjenje bile su u intervalu od 88-101%, za sva tri nivoa spajkovanja. Ako se uzme u obzir činjenica da je analiza ovog jedinjenja, zbog njegovog kancerogenog potencijala, od velikog značaja, ovi podaci ukazuju na to da i ova kombinacija rastvarač/sorbens može biti korišćena za analizu benzo[a]pirena.

Florisil je sorbens koji je u kombinaciji sa svim predloženim rastvaračima pokazao efikasnosti koje su uglavnom veće od 70%, ali u kombinaciji sa smešom heksan/aceton dobijene su niže efikasnosti za analizirana jedinjenja. Najveća efikasnost za ovu kombinaciju rastvarač/sorbens zabeležena je za benzo[a]piren i iznosila je 109%, za najniži nivo spajkovanja.

Preostala dva testirana sorbensa dala su nešto bolje vrednosti u kombinaciji sa smešom rastvarača heksan/aceton. Za dijatomejsku zemlju kao sorbens korišćen za prečišćavanje ekstrakata, dobijene su efikasnosti od 53% za hrizen do 109% za dibenzo[a,h]antracen. Vrednosti veće od 70% dobijene su upotrebom smeše heksan/aceton kao rastvarača i dijatomejske zemlje kao sorbensa za sve analizirane komponente pa se smatra da i ova kombinacija može biti upotrebljena u analizi 16 PAU prioritetnih za analizu.

Klinoptilolit je u poređenju sa ostalim sorbensima u kombinaciji sa smešom rastvarača heksan/aceton dao najbolje efikasnosti. Najniža vrednost zabeležena je za naftalen i iznosila je 71%, dok je najviša vrednost zabeležena za indeno[1,2,3-cd]piren i iznosila je 109%.



Ukoliko se uporede efikasnosti za sve testirane rastvarače i sorbense, predložene za ekstrakciju i prečišćavanje policikličnih aromatičnih ugljovodonika iz uzoraka zemljišta QuEChERS tehnikom, može se zaključiti da su najbolje vrednosti dobijene za kombinaciju acetonitril/voda kao rastvarača za ekstrakciju i dijatomejske zemlje kao sorbensa za prečišćavanje ekstrakata.

**4.3.5 Parametri validacije metode GS MS analize ekstrakta model uzoraka zemljišta pripremljenih QuEChERS tehnikom upotrebom smeše acetonitril/voda i dijatomejske zemlje kao sorbensa**

Nakon optimizacije izvršena je validacija QuEChERS tehnike upotrebom smeše rastvarača acetonitril/voda za ekstrakciju i dijatomejske zemlje kao sorbensa za prečišćavanje ekstrakcijom disperznom čvrstom fazom, koja je dala najbolje efikasnosti za 16 analiziranih PAU.

Rezultati validacije metode predstavljeni su u Tabeli 24.

**Tabela 24.** Parametri validacije metode analize 16 prioritetnih policikličnih aromatičnih ugljovodonika dobijene GS - MS analizom u ekstraktima pripremljenim QuEChESR tehnikom sa kombinacijom acetonitril/voda i dijatomejske zemlje kao sorbensa - Rt (retenciono vreme); LOD (granica detekcije); LOQ (granica kvantifikacije); RSD (relativna standardna devijacija (ponovljivost)); Uc (merna nesigurnost)

PAU	Rt (minut)	Kvantifikacioni jon (m/z)	LOD ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Jednačina kalibracione prave	Koeficijent korelacije	RSD (%)	U <sub>c</sub> (%)
Naftalen	11,792	128,0	1,08	3,60	$y=1,2065*x$	0,99	8,61	5,02
Acenaftilen	17,721	152,0	0,96	3,20	$y=2,0982*x$	0,99	7,38	9,98
Acenaften	18,460	153,0	0,96	3,20	$y=1,4690*x$	0,99	8,09	9,37
Fluoren	20,380	166,0	0,48	1,69	$y=0,8661*x$	0,99	5,17	3,41
Fenantren	24,000	178,0	1,53	5,10	$y=1,0413*x$	0,99	8,99	13,77
Antracen	24,177	178,0	0,39	1,30	$y=0,6336*x$	0,97	14,35	5,56
Fluoranten	28,575	202,0	0,69	2,30	$y=0,5583*x$	0,98	14,09	10,20
Piren	29,383	202,0	0,78	2,60	$y=0,7462*x$	0,98	17,76	6,23
Hrizen	34,072	228,0	1,02	3,40	$y=0,5407*x$	0,99	18,95	4,25
Benzo[a]antracen	34,238	228,0	0,51	1,70	$y=0,9333*x$	0,99	17,42	10,07
Benzo[b]fluoranten	37,937	253,0	0,81	2,70	$y=0,4197*x$	0,98	16,76	12,66
Benzo[k]fluoranten	38,103	253,0	0,72	2,40	$y=0,7569*x$	0,99	6,59	2,64
Benzo[a]piren	39,039	253,0	0,60	2,00	$y=0,6135*x$	0,99	0,97	4,80
Indeno[1,2,3-cd] piren	42,760	277,0	0,96	3,20	$y=0,3030*x$	0,99	8,10	5,19
Dibenz[a,h]antracen	42,878	279,0	1,14	3,80	$y=0,0879*x$	0,99	17,22	13,75
Benzo[g,h,i]perilen	43,637	276,0	0,90	2,00	$y=0,6264*x$	0,99	7,86	13,59

x - intenzitet signala y - koncentracija analita; m/z - odnos mase i naelektrisanja jona

## Rezultati i diskusija



Granice detekcije i kvantifikacije određene su na osnovu odnosa signal/šum. LOD vrednosti bile su u rasponu od  $0,39 \mu\text{g kg}^{-1}$  za antracen i  $1,53 \mu\text{g kg}^{-1}$  za fenantren, dok su LOQ vrednosti bile u granicama  $1,30\text{-}5,10 \mu\text{g kg}^{-1}$  za antracen i fenantren.

Kalibracione prave konstruisane su snimanjem serije standardnih rastvora koncentracija  $0,0962\text{-}9,6154 \mu\text{g ml}^{-1}$  za benzo[g,h,i]perilen i  $0,1923\text{-}19,2307 \mu\text{g ml}^{-1}$  za preostale analizirane komponente. Vrednosti koeficijenata korelacije bile su veće od 0,98 za sva analizirana jedinjenja, osim za antracen (0,97).

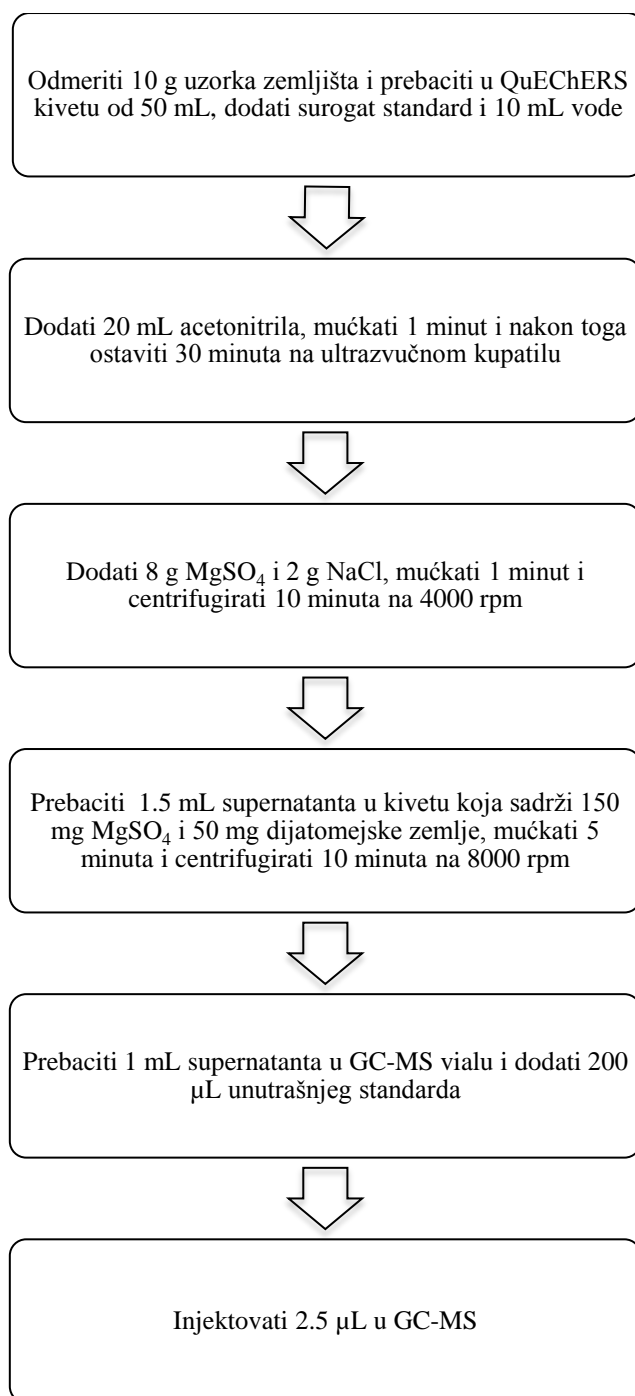
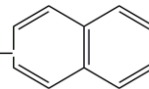
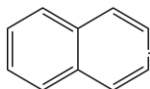
Preciznost je određena izračunavanjem ponovljivosti, koja je određena tretiranjem pet spajkovanih uzoraka uzoraka istog dana, na istom aparatu od strane istog analitičara i rezultati su prikazani preko relativne standardne devijacije (RSD). RSD vrednosti bile su u rasponu 0,97 do 18,95%.

Merna nesigurnost, izražena kao proširena relativna nesigurnost ( $U_c$ ) izračunata je kao proizvod standardne nesigurnosti i faktora pokrivenosti ( $k = 2$ ). Vrednosti proširene nesigurnosti kretale su se od 2,64% za benzo[k]fluoranten do 13,77% za fenantren.

Na osnovu sprovedenih eksperimenata optimizacije i validacije metoda za analizu policikličnih aromatičnih ugljovodonika na Slici 44. prikazana je šema predložene metode za određivanje policikličnih aromatičnih ugljovodonika u uzorcima zemljišta.



## Rezultati i diskusija



**Slika 44.** Šema izvođenja metode predložene za analizu policikličnih aromatičnih ugljovodonika u uzorcima zemljišta



#### 4.4. Analiza sadržaja PAU u realnim uzorcima zemljišta

Nakon optimizacije i validacije metode analizirani su realni uzorci zemljišta iz gradskog dela Niša. Uzorci su prikupljeni u blizini prometnih saobraćajnica, gradske toplane i kuća koje za ogrev pretežno koriste drva i ugalj, u cilju određivanja zagađenosti zemljišta. Prikupljeni uzorci pripremljeni su QuEChERS tehnikom uz upotrebu smeše rastvarača acetonitril/voda i dijatomejske zemlje kao sorbensa i analizirani na GC - MS. Rezultati analize prikazani su u Tabeli 25.

Najveći sadržaj ukupnih PAU zabeležen je na lokalitetu 22 i iznosio je  $48,7 \text{ mg kg}^{-1}$ . Ovaj lokalitet nalazi se u blizini prometne saobraćajnice, pa je visoka koncentracija policikličnih aromatičnih ugljovodonika u zemljištu očekivana, s obzirom da je značajna količina PAU poreklom iz motora sa unutrašnjim sagorevanjem (*Shen i sar.*, 2011). Takođe, na dan kad je vršeno uzorkovanje u neposrednoj blizini mesta odakle je uzorak uzet vršeno je asfaltiranje puta, što takođe može biti jedan od razloga za ovako visoku koncentraciju PAU (*Mahler i sar.*, 2014). Visoke koncentracije ukupnih PAU zabeležene su i u uzorcima 14 i 18 ( $27,3$  i  $40 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Lokalitet 14 nalazi se u blizini autobuske stanice sa visokom frekvencijom saobraćaja i gradske toplane, dok se lokalitet 18 nalazi u blizini prometne raskrsnice, što objašnjava visoku koncentraciju ukupnih PAU u ovim uzorcima. Najniža koncentracija ukupnih PAU određena je u uzorku 2 i iznosila je  $0,346 \text{ mg kg}^{-1}$ . Ovaj uzorak prikupljen je u blizini kuća koje se greju na centralno grejanje, u ulici sa malim protokom saobraćaja, pa se nizak sadržaj PAU može objasniti time da je na ovom lokalitetu nizak procenat PAU koji potiču iz motora sa unutrašnjim sagorevanjem. Ukoliko se uporede koncentracije ukupnih PAU u analiziranim uzorcima iz urbanog dela grada Niša, može se videti slaganje ovih vrednosti sa vrednostima koje su objavljene u dosadašnjim studijama (*Morillo i sar.*, 2007). U ovom radu određene su koncentracije PAU u zemljištu prikupljenom u urbanom delu Glazgova (UK), Torina (Italija) i Ljubljane (Slovenija). Jedino su u zemljištu iz Glazgova zabeležene povećane koncentracije PAU ( $1,487$ - $51,822 \text{ mg kg}^{-1}$ ), dok je u druga dva grada sadržaj ukupnih PAU bio do deset puta niži u odnosu na sadržaj PAU u zemljištima iz Glazgova. *Vane i saradnici* (2014) ispitali su sadržaj ukupnih PAU i polihlorovanih bifenila (PCB) u zemljištu prikupljenom u urbanom delu Londona. Koncentracije ukupnih PAU u ovim uzorcima bile su u intervalu od  $4$  do  $67 \text{ mg kg}^{-1}$ , što je takođe u saglasnosti sa vrednostima dobijenim ispitivanjem zemljišta iz urbanog dela Niša. U dva odvojena



istraživanja sprovedena u Srbiji (*Agencija za zaštitu životne sredine*, 2009; *Institut za ratarstvo i povrtarstvo*, 2008) prikupljani su uzorci iz urbanog dela Novog Sada. U studiji koju je sprovela *Agencija za zaštitu životne sredine* (2009), u kojoj su analizirani uzorci zemljišta iz urbanog dela Novog Sada dobijene su vrednosti koncentracija ukupnih PAU koje su veće od  $1 \text{ mg kg}^{-1}$ . Analiza uzoraka iz urbanog dela Niša pokazala je da 15 od 34 uzoraka zemljišta ima koncentraciju ukupnih PAU veću od  $1 \text{ mg kg}^{-1}$ . U drugoj studiji u kojoj su analizirani uzorci iz urbanog dela Novog Sada (*Institut za ratarstvo i povrtarstvo*, 2008) dobijene su vrednosti 0,1699 do 0,4275  $\text{mg kg}^{-1}$ , što je manje u odnosu na rezultate dobijene analizom zemljišta iz urbanog dela Niša.

Zakonska regulativa u Srbiji ne propisuje maksimalno dozvoljenu koncentraciju 16 PAU u zemljištu. Uredbom o programu sistemskog praćenja kvaliteta zemljišta, indikatorima za ocenu rizika od degradacije zemljišta i metodologiji za izradu remedijacionih programa (*Ministarstvo zaštite životne sredine*, 2010) definisana je granična vrednost sume 10 PAU ( $\Sigma_{10}\text{PAU}$ ) (antracen, benzo[a]antracen, benzo[k]fluoranten, benzo[a]piren, hrizen, fenantren, fluoranten, indeno[1,2,3-cd]piren, naftalen i benzo[g,h,i]perilen) i vrednost koja može ukazati na značajnu kontaminaciju. Kao granična vrednost postavljena je koncentracija od  $1 \text{ mg } \Sigma_{10}\text{PAU}$  na  $1 \text{ kg}$  apsolutno suvog zemljišta, dok je vrednost koja ukazuje na značajnu koncentraciju ona koja je veća od  $40 \text{ mg kg}^{-1}$ . Ni jedan od analiziranih uzoraka nije prešao vrednost od  $40 \text{ mg kg}^{-1} \Sigma_{10}\text{PAU}$ , dok je devet uzoraka premašilo vrednost od  $1 \text{ mg kg}^{-1}$ , pa se može zaključiti da prema zakonskoj regulativi Srbije zemljište u urbanom delu grada Niša nije značajno zagađeno.

**Tabela 25.** Koncentracije policikličnih aromatičnih ugljovodonika u analiziranim uzorcima zemljišta izražene kao srednja vrednost ± standardna devijacija (mg jedinjenja na kg suvog zemljišta)

<i>Uzorak</i>	<i>Nap</i>	<i>Acl</i>	<i>Acn</i>	<i>Flu</i>	<i>Phe</i>	<i>Ant</i>	<i>Flr</i>	<i>Pyr</i>	<i>Chr</i>	<i>BaA</i>	<i>BbF</i>	<i>BkF</i>	<i>IcdP</i>	<i>BaP</i>	<i>DahA</i>	<i>BghiP</i>	$\Sigma_{10}PA_U$	$\Sigma_{16}PA_U$
1	0,0057 ±0,0002 <sup>a</sup>	0,0005 ±0,0000 <sup>a</sup>	0,261 ±0,004 <sup>a</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	0,0120 ±0,007 <sup>c</sup>	0,0316 ±0,0005 <sup>d</sup>	0,0084 ±0,0004 <sup>a</sup>	0,015 ±0,001 <sup>b</sup>	0,020 ±0,001 <sup>b</sup>	0,0094 ±0,0006 <sup>b</sup>	0,0081 ±0,0006 <sup>a</sup>	n.d.	n.d.	0,0067 ±0,0008 <sup>a</sup>	0,0533 ±0,0009 <sup>a</sup>	0,379 ±0,009 <sup>a</sup>
2	0,0086 ±0,0005 <sup>a</sup>	0,0005 ±0,0000 <sup>a</sup>	0,299 ±0,002 <sup>b</sup>	n.d.	0,0065 ±0,0003 <sup>b</sup>	n.d.	0,0056 ±0,0002 <sup>bc</sup>	0,0129 ±0,0005 <sup>b</sup>	n.d.	n.d.	0,0092 ±0,0008 <sup>a</sup>	0,0039 ±0,0007 <sup>a</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,0254 ±0,0008 <sup>a</sup>	0,346 ±0,001 <sup>a</sup>
3	0,0070 ±0,0003 <sup>a</sup>	n.d.	0,321 ±0,003 <sup>c</sup>	n.d.	0,00465 ±0,0003 <sup>ab</sup>	n.d.	0,4760 ±0,0002 <sup>bc</sup>	0,0110 ±0,0007 <sup>ab</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,0161 ±0,0006 <sup>a</sup>	0,3484 ±0,0005 <sup>a</sup>
4	0,0070 ±0,0002 <sup>a</sup>	n.d.	0,340 ±0,002 <sup>c</sup>	n.d.	0,0047 ±0,0000 <sup>ab</sup>	n.d.	0,0033 ±0,0005 <sup>abc</sup>	0,0086 ±0,0002 <sup>a</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,0164 ±0,0005 <sup>a</sup>	0,3641 ±0,0002 <sup>a</sup>
5	0,0059 ±0,0003 <sup>a</sup>	n.d.	0,373 ±0,002 <sup>d</sup>	n.d.	0,0034 ±0,0001 <sup>ab</sup>	n.d.	0,0026 ±0,0002 <sup>ab</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,0126 ±0,0003 <sup>a</sup>	0,385 ±0,002 <sup>a</sup>
6	0,0121 ±0,0001 <sup>b</sup>	0,0050 ±0,0001 <sup>c</sup>	0,459 ±0,002 <sup>f</sup>	n.d.	0,0037 ±0,0002 <sup>ab</sup>	n.d.	0,0013 ±0,0002 <sup>a</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,0194 ±0,0004 <sup>a</sup>	0,481 ±0,002 <sup>b</sup>
7	0,0091 ±0,0003 <sup>a</sup>	n.d.	0,444 ±0,003 <sup>e</sup>	n.d.	0,0050 ±0,0003 <sup>ab</sup>	n.d.	0,0058 ±0,0002 <sup>c</sup>	0,020 ±0,001 <sup>c</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,0192 ±0,0005 <sup>a</sup>	0,485 ±0,003 <sup>b</sup>
8	0,0109 ±0,0008 <sup>ab</sup>	n.d.	0,446 ±0,001 <sup>ef</sup>	n.d.	0,0055 ±0,0001 <sup>ab</sup>	n.d.	0,0035 ±0,0007 <sup>abc</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,0219 ±0,0008 <sup>a</sup>	0,466 ±0,001 <sup>ab</sup>

9	0,0052 ±0,0003 <sup>a</sup>	n.d.	0,4428 ±0,0006 <sup>c</sup>	n.d.	0,0026 ±0,0002 <sup>a</sup>	n.d.	0,0012 ±0,0001 <sup>a</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,0104 ±0,0006 <sup>a</sup>	0,452 ±0,003 <sup>ab</sup>
10	0,0214 ±0,0002 <sup>c</sup>	0,0018 ±0,0002 <sup>b</sup>	0,727 ±0,004 <sup>h</sup>	n.d.	0,0269 ±0,0002 <sup>d</sup>	0,0196 ±0,0007 <sup>c</sup>	0,032 ±0,001 <sup>d</sup>	0,139 ±0,002 <sup>f</sup>	0,0127 ±0,0006 <sup>a</sup>	0,037 ±0,001 <sup>c</sup>	0,038 ±0,002 <sup>b</sup>	0,0021 ±0,0006 <sup>c</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,165 ±0,006 <sup>c</sup>	1,08 ±0,02 <sup>c</sup>
11	0,0780 ±0,0007 <sup>d</sup>	0,066 ±0,001 <sup>d</sup>	0,681 ±0,0062 <sup>g</sup>	0,0228 ±0,0004 <sup>a</sup>	0,0155 ±0,004 <sup>c</sup>	0,0049 ±0,0005 <sup>a</sup>	0,0084 ±0,0003 <sup>c</sup>	0,0307 ±0,0009 <sup>cd</sup>	n.d.	0,011 ±0,002 <sup>ab</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,125 ±0,005 <sup>c</sup>	0,918 ±0,005 <sup>c</sup>
12	2,09 ±0,02 <sup>f</sup>	1,460 ±0,001 <sup>f</sup>	4,400 ±0,001 <sup>j</sup>	0,309 ±0,001 <sup>c</sup>	0,140 ±0,002 <sup>f</sup>	0,042 ±0,002 <sup>c</sup>	0,077 ±0,001 <sup>e</sup>	0,273 ±0,004 <sup>g</sup>	n.d.	0,086 ±0,002 <sup>d</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2,49 ±0,06 <sup>d</sup>	8,87 ±0,08 <sup>e</sup>
13	0,305 ±0,005 <sup>e</sup>	0,195 ±0,004 <sup>a</sup>	1,104 ±0,005 <sup>i</sup>	0,063 ±0,002 <sup>b</sup>	0,0313 ±0,0005 <sup>e</sup>	0,0089 ±0,0006 <sup>b</sup>	0,0154 ±0,0004 <sup>d</sup>	0,0496 ±0,0005 <sup>e</sup>	n.d.	0,0107 ±0,0008 <sup>a</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,387 ±0,006 <sup>c</sup>	1,783 ±0,007 <sup>d</sup>
14	7,871 ±0,002 <sup>h</sup>	5,03 ±0,03 <sup>g</sup>	11,94 ±0,06 <sup>l</sup>	0,87 ±0,02 <sup>d</sup>	0,361 ±0,007 <sup>g</sup>	0,116 ±0,002 <sup>d</sup>	0,179 ±0,002 <sup>f</sup>	0,744 ±0,004 <sup>h</sup>	nd.	0,202 ±0,002 <sup>e</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	8,9 ±0,1 <sup>d</sup>	27,3 ±0,2 <sup>f</sup>
15	3,463 ±0,005 <sup>g</sup>	1,8 ±0,1 <sup>f</sup>	4,69 ±0,01 <sup>k</sup>	0,360 ±0,002 <sup>c</sup>	0,159 ±0,003 <sup>f</sup>	0,047 ±0,003 <sup>c</sup>	0,0840 ±0,0008 <sup>e</sup>	0,300 ±0,001 <sup>g</sup>	n.d.	0,0827 ±0,0006 <sup>d</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3,9 ±0,1 <sup>d</sup>	11,0 ±0,2 <sup>e</sup>
16	0,895 ±0,003 <sup>j</sup>	0,467 ±0,009 <sup>f</sup>	1,81 ±0,06 <sup>d</sup>	0,101 ±0,001 <sup>de</sup>	0,041 ±0,001 <sup>b</sup>	0,0103 ±0,0006 <sup>ab</sup>	0,0192 ±0,0002 <sup>b</sup>	0,062 ±0,001 <sup>d</sup>	0,017 ±0,001 <sup>cd</sup>	0,0183 ±0,0006 <sup>bc</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,01 ±0,08 <sup>d</sup>	3,44 ±0,09 <sup>f</sup>
17	0,0726 ±0,0005 <sup>e</sup>	0,070 ±0,002 <sup>bc</sup>	0,59 ±0,01 <sup>b</sup>	0,029 ±0,004 <sup>abc</sup>	0,025 ±0,001 <sup>ab</sup>	0,0063 ±0,0007 <sup>ab</sup>	0,0199 ±0,0005 <sup>b</sup>	0,026 ±0,002 <sup>bc</sup>	0,0036 ±0,0001 <sup>ab</sup>	0,0127 ±0,0002 <sup>a</sup>	0,0062 ±0,0007 <sup>bc</sup>	0,0020 ±0,0006 <sup>a</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,144 ±0,005 <sup>c</sup>	0,86 ±0,03 <sup>c</sup>
18	12,64 ±0,01 <sup>o</sup>	10,2 ±0,3 <sup>j</sup>	13,9 ±0,9 <sup>g</sup>	1,38 ±0,08 <sup>i</sup>	0,557 ±0,005 <sup>e</sup>	0,206 ±0,005 <sup>f</sup>	0,34 ±0,02 <sup>d</sup>	0,649 ±0,004 <sup>g</sup>	0,0025 ±0,0001 <sup>a</sup>	0,165 ±0,002 <sup>f</sup>	0,0057 ±0,0003 <sup>ab</sup>	0,0035 ±0,0008 <sup>a</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	14 ±1 <sup>e</sup>	40 ±4 <sup>h</sup>

19	0,0048 ±0,0003 <sup>d</sup>	0,060 ±0,001 <sup>b</sup>	0,383 ±0,003 <sup>a</sup>	0,021 ±0,004 <sup>ab</sup>	0,014 ±0,002 <sup>ab</sup>	0,0035 ±0,0005 <sup>a</sup>	0,0074 ±0,0001 <sup>a</sup>	0,014 ±0,002 <sup>ab</sup>	nd.	0,0032 ±0,0005 <sup>a</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,0789 ±0,0004 <sup>b</sup> <sub>c</sub>	0,55 ±0,05 <sup>b</sup>	
20	2,913 ±0,005 <sup>m</sup>	1,86 ±0,03 <sup>i</sup>	4,2 ±0,1 <sup>ef</sup>	0,32 ±0,02 <sup>fgh</sup>	0,126 ±0,003 <sup>c</sup>	0,042 ±0,002 <sup>de</sup>	0,066 ±0,003 <sup>c</sup>	0,141 ±0,006 <sup>f</sup>	0,033 ±0,001 <sup>d</sup>	0,035 ±0,002 <sup>e</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3,24 ±0,06 <sup>d</sup>	9,7 ±0,1 <sup>e</sup>	
21	0,1093 ±0,0007 <sup>g</sup>	0,155,29 ±3,58 <sup>e</sup>	0,87 ±0,01 <sup>c</sup>	0,065 ±0,004 <sup>cd</sup>	0,048 ±0,002 <sup>b</sup>	0,013 ±0,002 <sup>abc</sup>	0,0305 ±0,0009 <sup>bc</sup>	0,076 ±0,002 <sup>d</sup>	0,0030 ±0,0005 <sup>ab</sup>	0,025 ±0,001 <sup>c</sup>	nd.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,243 ±0,004 <sup>c</sup>	1,4 ±0,07 <sup>e</sup>	
22	15,97 ±0,03 <sup>p</sup>	11,09 ±0,01 <sup>j</sup>	17,6 ±0,2 <sup>s</sup>	1,50 ±0,02 <sup>i</sup>	0,598 ±0,004 <sup>e</sup>	0,217 ±0,006 <sup>g</sup>	0,331 ±0,004 <sup>d</sup>	0,87 ±0,03 <sup>g</sup>	0,22 ±0,02 <sup>f</sup>	0,232 ±0,006 <sup>f</sup>	0,009 ±0,001 <sup>c</sup>	0,0034 ±0,0008 <sup>a</sup>	0,012 ±0,002 <sup>a</sup>	n.d.	n.d.	0,016 ±0,002 <sup>a</sup>	17,6 ±0,4 <sup>d</sup>	48,7 ±0,6 <sup>h</sup>	
23	0,0140 ±0,0009 <sup>b</sup> <sub>c</sub>	0,0011 ±0,0001 <sup>a</sup>	0,39 ±0,02 <sup>ab</sup>	n.d.	0,012 ±0,002 <sup>ab</sup>	0,0091 ±0,0009 <sup>ab</sup> <sub>c</sub>	0,014 ±0,003 <sup>ab</sup>	0,039 ±0,003 <sup>bc</sup>	0,0109 ±0,0002 <sup>bc</sup>	n.d.	0,0095 ±0,0007 <sup>c</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,0480 ±0,0007 <sup>b</sup>	0,50 ±0,03 <sup>ab</sup>	
24	0,0813 ±0,0008 <sup>f</sup>	0,0082 ±0,0001 <sup>c</sup>	0,685 ±0,002 <sup>bc</sup>	0,0287 ±0,0005 <sup>b</sup> <sub>c</sub>	0,026 ±0,003 <sup>ab</sup>	0,00498 ±0,0004 <sup>ab</sup>	0,0156 ±0,0009 <sup>b</sup>	0,051 ±0,003 <sup>c</sup>	0,013 ±0,001 <sup>bc</sup>	0,0133 ±0,0007 <sup>ab</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,139 ±0,008 <sup>c</sup>	1,0 ±0,1 <sup>cd</sup>	
25	1,76 ±0,03 <sup>k</sup>	1,05 ±0,02 <sup>g</sup>	3,30 ±0,09 <sup>de</sup>	0,253 ±0,003 <sup>fg</sup>	0,119 ±0,0004 <sup>c</sup>	0,035 ±0,003 <sup>cde</sup>	0,066 ±0,003 <sup>c</sup>	0,253 ±0,006 <sup>f</sup>	0,071 ±0,002 <sup>e</sup>	0,007 ±0,0023 <sup>d</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2,1 ±0,1 <sup>d</sup>	7,0 ±0,1 <sup>f</sup>	
26	0,0057 ±0,0003 <sup>a</sup> <sub>b</sub>	n.d.	0,39 ±0,02 <sup>ab</sup>	n.d.	0,0018 ±0,0003 <sup>a</sup>	0,0017 ±0,0004 <sup>a</sup>	0,0009 ±0,0000 <sup>a</sup>	0,0048 ±0,0001 <sup>a</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,0057 ±0,00016 <sup>a</sup>	0,40 ±0,04 <sup>a</sup>
27	0,0051 ±0,0006 <sup>a</sup>	n.d.	0,428 ±0,006 <sup>b</sup>	n.d.	0,0023 ±0,0004 <sup>a</sup>	0,0011 ±0,0006 <sup>a</sup>	0,0010 ±0,0000 <sup>a</sup>	0,0042 ±0,0006 <sup>a</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,0051 ±0,0006 <sup>a</sup>	0,44 ±0,07 <sup>a</sup>
28	0,084 ±0,001 <sup>f</sup>	0,099 ±0,002 <sup>c</sup>	0,74 ±0,03 <sup>bc</sup>	0,021 ±0,003 <sup>ab</sup>	0,0105 ±0,0009 <sup>a</sup>	0,0022 ±0,0005 <sup>a</sup>	0,0062 ±0,0002 <sup>a</sup>	0,023 ±0,002 <sup>bc</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,107 ±0,009 <sup>c</sup>	0,99 ±0,03 <sup>c</sup>

29	0,205 ±0,007 <sup>h</sup>	0,115 ±0,009 <sup>d</sup>	0,806 ±0,005 <sup>c</sup>	0,028 ±0,003 <sup>abc</sup>	0,0140 ±0,0003 <sup>ab</sup>	0,0032 ±0,0002 <sup>a</sup>	0,0057 ±0,0001 <sup>a</sup>	0,018 ±0,002 <sup>abc</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,237 ±0,009 <sup>c</sup>	1,2 ±0,1 <sup>d</sup>	
30	0,602 ±0,008 <sup>i</sup>	0,417 ±0,003 <sup>f</sup>	1,82 ±0,07 <sup>d</sup>	0,1201 ±0,004 <sup>ef</sup>	0,069 ±0,005 <sup>bc</sup>	0,020 ±0,002 <sup>bcd</sup>	0,036 ±0,003 <sup>bc</sup>	0,113 ±0,003 <sup>e</sup>	0,025 ±0,002 <sup>cd</sup>	0,0230 ±0,0009 <sup>bc</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	22,54 ±3,04 <sup>a</sup>	0,81 ±0,01 <sup>c</sup>	3,3 ±0,2 <sup>e</sup>	
31	0,073 ±0,002 <sup>e</sup>	0,048 ±0,002 <sup>b</sup>	0,59 ±0,01 <sup>b</sup>	0,0166 ±0,0009 <sup>a</sup>	17,61 ±1,57 <sup>ab</sup>	0,0027 ±0,0002 <sup>a</sup>	0,0120 ±0,0003 <sup>ab</sup>	0,0337 ±0,0009 <sup>bc</sup>	0,0207 ±0,0008 <sup>cd</sup>	0,0215 ±0,0006 <sup>bc</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	8,15 ±0,74 <sup>a</sup>	0,141 ±0,009 <sup>c</sup>	0,85 ±0,08 <sup>c</sup>	
32	0,040 ±0,002 <sup>cd</sup>	0,040 ±0,001 <sup>b</sup>	0,60 ±0,02 <sup>bc</sup>	0,015 ±0,002 <sup>a</sup>	0,0169 ±0,0003 <sup>ab</sup>	0,0032 ±0,0003 <sup>a</sup>	0,029 ±0,002 <sup>bc</sup>	0,101 ±0,003 <sup>d</sup>	0,017 ±0,001 <sup>cd</sup>	0,030 ±0,001 <sup>c</sup>	0,031 ±0,004 <sup>d</sup>	0,013 ±0,002 <sup>a</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,120 ±0,008 <sup>c</sup>	0,9 ±0,1 <sup>c</sup>	
33	2,468 ±0,004 <sup>l</sup>	1,270 ±0,002 <sup>h</sup>	3,8 ±0,2 <sup>def</sup>	0,35 ±0,01 <sup>gh</sup>	0,220 ±0,008 <sup>d</sup>	0,061 ±0,003 <sup>e</sup>	0,150 ±0,001 <sup>cd</sup>	0,501 ±0,009 <sup>g</sup>	0,0004 ±0,0000 <sup>a</sup>	0,147 ±0,007 <sup>ef</sup>	0,0026 ±0,0004 <sup>a</sup>	0,0093 ±0,0008 <sup>a</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3,1 ±0,6 <sup>d</sup>	9,0 ±0,7 <sup>g</sup>	
34	0,0076 ±0,0006 <sup>ab</sup>	n.d.	0,42 ±0,02 <sup>b</sup>	n.d.	0,0030 ±0,0001 <sup>bc</sup>	n.d.	0,0029 ±0,0001 <sup>bc</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,0135 ±0,0006 <sup>b</sup>	0,43± 0,08 <sup>e</sup>

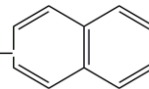
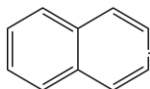
n.d. - nije detektovano (ispod granice detekcije); vrednosti označene različitim slovima statistički se značajno razlikuju pri  $P < 0.05$ ; Nap - naftalen; Acl- acenaftilen; Acn - acenaften; Flu - fluoren; Phe - fenantren; Ant - antracen; Flr - fluoranten; Pyr - piren; Chr - hrizen; BaA - benzo[a]antracen; BbF - benzo[b]fluoranten; BkF - benzo[k]fluoranten; IcdP - indeno[1,2,3-cd]piren; BaP - benzo[a]piren; DahA - dibenzo[a,h]antracen; BghiP - benzo[g,h,i]perilen



Koncentracije benzo[a]pirena, jadinjenja koje je prema klasifikaciji IARC svrstano u Grupu 1 dokazanih kancerogena za ljude, i dibenzo[a,h]antracena bile su ispod granice detekcije opisane metode. Jedinjenje koje je u analiziranim uzorcima pronađeno u najvećoj koncentraciji u poređenju sa ostalim jedinjenjima je acenaften. Koncentracije ovog jedinjenja bile su u granicama od 0,261 mg kg<sup>-1</sup> (1) do 17,6 mg kg<sup>-1</sup> (22). Osim acenaftena, u svim analiziranim uzorcima pronađeni su još i naftalen i fluoranten. Koncentracije naftalena kretale su se u rasponu od 0,0051 mg kg<sup>-1</sup> (27) do 15,97 mg kg<sup>-1</sup> (22). Koncentracije fluorantena bile su nešto niže i iznosile su od 0,0009 mg kg<sup>-1</sup> (26) do 0,343 mg kg<sup>-1</sup> (18).

Poreklo PAU u zemljištu može se proceniti preko odnosa koncentracija pojedinačnih jedinjenja. Proces koji se odigravaju na niskim temperaturama kao rezultat imaju nastajanje PAU nižih molekularnih masa, dok se pri visokotemperaturnim procesima formiraju PAU visokih molekularnih masa (*Mostert i sar.*, 2010). Razlog za to je sam mehanizam nastanka PAU: na visokim temperaturama dolazi do raskidanja veza u organskim molekulima i formiranja radikala koji teže da se stabilizuju i na taj način formiraju PAU. PAU nastali na ovaj način sadrže veći broj aromatičnih prstena od PAU koji nastaju na nižim temperaturama (*Hwang i sar.*, 2003b). Korišćenje odnosa PAU zasniva se na različitoj stabilnosti izomernih jedinjenja. Izomeri nastali procesima na visokim temperaturama odlikuju se manjom stabilnošću, dok se izomeri nastali pri nižim temperaturama i sporijim procesima odlikuju većom stabilnošću (*Yunker i sar.*, 2002). U određenim slučajevima ne postoji poklapanje tumačenja odnosa PAU, pa ovom problem treba posvetiti veliku pažnju. U Tabeli 26. dat je pregled najčešće korišćenih odnosa za procenu porekla PAU.





**Tabela 26.** Pregled literature u kojoj su korišćeni odnosi pojedinih policikličnih aromatičnih ugljovodonika za procenu njihovog porekla u zemljištu

Odnos	Vrednost	Poreklo	Referenca
LMW/HMW	>1	Petrogeno	<i>Zhang i sar., 2008</i>
	<1	Pirogeno	
Flu/(Flu + Pyr)	<0,5	Benzin	<i>Ravindra i sar., 2008b</i>
	>0,5	Dizel gorivo	
Ant/(Ant + Phe)	<0,1	Petrogeno	<i>Pies i sar., 2008</i>
	>0,1	Pirogeno	
Flr/(Flr + Pyr)	<0,4	Petrogeno	<i>De La Torre-Roche i sar., 2009</i>
	0,4-0,5	Sagorevanje fosilnih goriva	
	>0,5	Sagorevanje uglja, trave i drveta	
BaA/(BaA + Chr)	0,2-0,35	Sagorevanje uglja	<i>Akyüz i Çabuk, 2010</i>
	>0,35	Izduvni gasovi vozila	
	<0,2	Petrogeno	
	>0,35	Sagorevanje	
IcdP/(IcdP + BghiP)	<0,2	Petrogeno	<i>Yunker i sar., 2002</i>
	0,2-0,5	Sagorevanje goriva	
	>0,5	Sagorevanje trave, drva i uglja	
BaP/BghiP	<0,6	Gasovi koji ne potiču od saobraćaja	<i>Katsoyiannis i sar, 2007</i>
	>0,6	Izduvni gasovi automobila	
Phe/Ant	<10	Pirogeno	<i>Yunker i sar., 2002</i>
	>10	Petrogeno	
Flr/Pyr	<1	Pirogeno	<i>Yunker i sar., 2002</i>
	>1	Petrogeno	

LMW -PAU niskih molekulskih masa; HMW - PAU visokih molekulskih masa; Flu - fluoren; Pyr - piren; Ant - antracen; Phe - fenatren; Flr - fluoranten; BaA - benzo[a]antracen; Chr - hrizen; IcdP - indeno[1,2,3-cd]piren; BghiP - benzo[g,h,i]perilen; BaP - benzo[a]piren



Odnos LMW i HMW PAU može ukazati na poreklo zagađenja zemljišta. Prema *Zhang i saradnicima* (2008) ukoliko je LMW/HMW manji od 1 zagađenje je pirogenog porekla, a ukoliko je ovaj odnos veći od 1 zagađenje je petrogenog porekla. Najpre su izračunati zbrojevi koncentracija LMW i HMW PAU, a potom određeni i njihovi odnosi. U Tabeli 27. prikazane su vrednosti odnosa LMW i HMW PAU.

**Tabela 27.** Odnos koncentracija policikličnih aromatičnih ugljovodonika niskih molekulskih masa (LMW PAU) prema koncentracijama policikličnih aromatičnih ugljovodonika visokih molekulskih masa (HMW PAU) u analiziranim uzorcima zemljišta

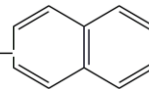
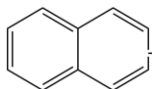
Uzorak	LMW/HMW	Uzorak	LMW/HMW	Uzorak	LMW/HMW
1	2,68	13	18,65	25	14,59
2	9,72	14	20,04	26	/
3	21,35	15	19,48	27	/
4	26,42	16	27,49	28	28,44
5	113,46	17	10,98	29	36,37
6	131,07	18	28,07	30	13,41
7	18,13	19	18,92	31	9,28
8	84,14	20	31,35	32	3,74
9	172,41	21	8,44	33	9,31
10	2,91	22	26,96	34	146,11
11	15,25	23	7,02		
12	16,91	24	11,83		

LMW/HMW - Odnos koncentracija PAU niskih i visokih molekulskih masa

U analiziranim uzorcima odnos LMW i HMW veći je od 1, pa se može smatrati da je zagađenje petrogenog porekla.

Odnos LMW i HMW PAU nije naišao na široku primenu iz razloga što ovakvo određivanje porekla PAU nije dovoljno precizno. Radi preciznijeg određivanja porekla PAU, koristi se i određivanje

## Rezultati i diskusija



odnosa pojedinačnih PAU. Jedan od najčešće primenjivanih odnosa je odnos fluoranten/(fluoranten+piren), koji su predložili *De La Torre-Roche i saradnici* (2009). Odnos koncentracija fluoranten/(fluoranten+piren) za realne uzorke iz gradskog dela Niša prikazan je u Tabeli 28.

**Tabela 28.** Odnosi koncentracija fluorantena i sume koncentracije fluorantena i pirena (Flr/(Flr+Pyr)) za analizirane uzorke zemljišta

Uzorak	Flr/(Flr+Pyr)	Uzorak	Flr/(Flr+Pyr)	Uzorak	Flr/(Flr+Pyr)
1	0,00	13	0,39	25	0,32
2	0,34	14	0,33	26	/
3	0,29	15	0,35	27	/
4	0,35	16	0,40	28	0,31
5	1,00	17	0,49	29	0,44
6	1,00	18	0,46	30	0,38
7	0,20	19	0,49	31	0,34
8	1,00	20	0,47	32	0,14
9	1,00	21	0,39	33	0,30
10	0,16	22	0,41	34	1,00
11	0,34	23	0,24		
12	0,34	24	0,34		

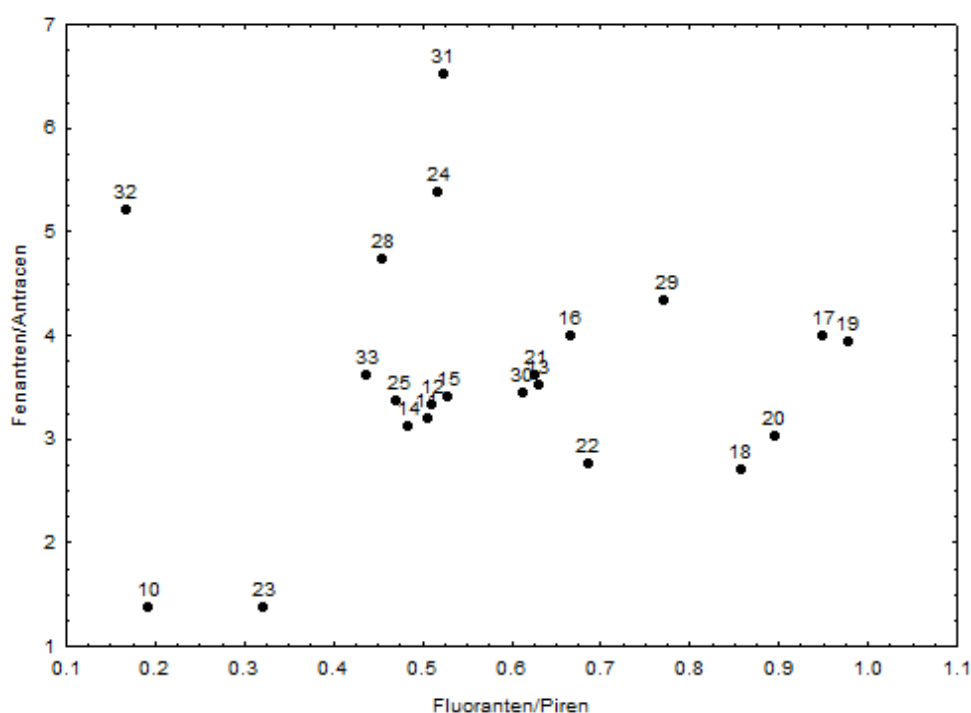
Flr - fluoranten; Pyr - piren

U uzorcima u kojima je odnos Flr/(Flr+Pyr) manji od 0,4 PAU su petrogenog porekla. Broj uzoraka u kojima je ovaj odnos manji od 0,4 je 18. Kada je odnos ovih jedinjenja između 0,4 i 0,5, smatra se da PAU potiču od sagorevanja fosilnih goriva. Takvi su uzorci 16, 17, 18, 19, 20, 22 i 29. Uzorak 16 nalazi se u blizini kuća koje za ogrev koriste fosilna goriva, dok se uzorci 17, 18, 19, 22 i 29 nalaze u blizini prometnih saobraćajnica. Uzorak 20 nalazi se u blizini gradske toplane, koja takođe predstavlja značajan izvor PAU pirogenog porekla. Najmanji broj uzoraka ima odnos Flr/(Flr+Pyr)



veći od 0,5, i smatra se da u tim uzorcima zagađenje potiče od sagorevanja drveta i trave. Uzorci 5,6, 8, 9 i 34 su uzorci kod kojih je odnos Flr/(Flr+Pyr) veći od 0.5.

Često je u upotrebi i odnos koncentracija fenantrena i antracena, kao i fluorantena i pirena. Na Slici 45. grafički je prikazan odnos koncentracija fenantrena i antracena, kao i koncentracija fluorantena i pirena za analizirane uzorke. Grafik je konstruisan nakon određivanja odnosa koncentracija fenantrena i antracena, kao i fluorantena i pirena. Na apscisi su predstavljene vrednosti odnosa koncentracija fluoranten/piren, dok su na ordinati dati odnosi koncentracija fenantren/antracen u analiziranim uzorcima.



**Slika 45.** Odnosi koncentracija fenantren/antracen i fluoranten/piren za analizirane uzorke zemljišta *Yunker i saradnici* (2002) predložili su upotrebu odnosa koncentracija fenantrena i antracena, kao i koncentracija fluorantena i pirena, kako bi se utvrdilo da li su policiklični aromatični ugljovodonici pirogenog ili petrogenog porekla. Fenantren je termodinamički najstabilnije jedinjenje sa tri prstena, a antracen i fluoranten su termodinamički manje stabilni od fenantrena i pirena. Odnos koncentracija antracena i fenantrena, kao i fluorantena i pirena, zavisi od temperature, pa tako procesi koji se odigravaju na višim temperaturama (proces sagorevanja) daju manji procenat fenantrena, odnosno manji odnos koncentracija fenantren/antracen, dok su procesi koji se odigravaju na nižim temperaturama (pirogeni procesi) karakterisani većim vrednostima odnosa

## Rezultati i diskusija



koncentracija fenantren/antracen (*Budzinski i sar.*, 1997). Sa Slike 45. može se zaključiti da je odnos koncentracija fenantrena i antracena u svim analiziranim uzorcima niži od 10, što ukazuje na to da je zagađenje pirogenog porekla, odnosno PAU potiču iz procesa sagorevanja organske materije. Odnos koncentracija fluorantena i pirena za analizirane uzorke niži je od 1, što takođe ukazuje da je zagađenje pirolitičkog porekla.

Najveća količina PAU u zemljište dospe putem atmosfere, pa tako na odnos PAU u velikoj meri utiče i nadmorska visina zemljišta (*Brändli i sar.*, 2008). Takođe, različiti PAU desorbuju različitom brzinom - fluoranten i piren se desorbuju sličnom brzinom, dok se fenantren brže desorbuje iz zemljišta u odnosu na antracen (*Enell i sar.*, 2005), što može biti jedan od razloga za različito tumačenje porekla PAU na osnovu analize odnosa pojedinih PAU. Ipak, smatra se da pouzdanije rezultate o poreklu PAU u zemljištu daju odnosi koncentracija pojedinačnih PAU nego odnos koncentracija HMW i LMW PAU. Na osnovu određenih odnosa koncentracijs pojedinih PAU, kao i teških i lakih PAU, može se smatrati da je poreklo ovih jedinjenja u uzorcima zemljišta iz gradskog dela Niša posledica procesa sagorevanja fosilnih goriva.

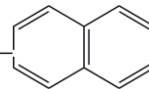
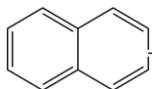


#### 4.5. Osnovne hemijske karakteristike analiziranog zemljišta

Hemijske karakteristike zemljišta kao što su sadržaj organske supstance, pH i provodljivost, utiču na ponašanje policikličnih aromatičnih ugljovodonika u zemljištu. Organske supstance prisutne u zemljištu povećavaju adsorpciju PAU za zemljište (*Wilke, 2000*). Međutim, i zemljišta sa niskim sadržajem organske supstance mogu sadržati velike količine PAU, što može biti posledica vezivanja PAU za minerale gline (*Hwang i Cutright, 2003*). pH i provodljivost zemljišta utiču na procese enzimske i biodegradacije PAU (*Moretto i sar., 2005*).

U Tabeli 29. prikazani su osnovne karakteristike analiziranog zemljišta - pH u vodi, pH u rastvoru KCl, provodljivost i procenat organske materije.

Rezultati i diskusija



**Tabela 29.** Osnovne karakteristike analiziranih uzoraka zemljišta (pH (H<sub>2</sub>O) - pH zemljišta u vodenom rastvoru; pH (KCl) - pH zemljišta u 1M rastvoru KCl; provodljivost zemljišta izražena u mS cm<sup>-1</sup>; OM (%) - sadržaj organskih supstanci u zemljištu izražen u %)

Uzorak	pH (H <sub>2</sub> O)	pH (KCl)	provodljivost (mS cm <sup>-1</sup> )	OM (%)
1	7,7	5,41	0,32	1,78
2	7,5	6,71	0,23	2,93
3	7,84	7,06	0,18	1,32
4	7,83	7,08	0,31	2,23
5	8,03	7,06	0,19	1,08
6	7,74	7,18	0,18	0,74
7	8,11	7,17	0,23	1,94
8	7,79	7,04	0,23	2,33
9	7,83	7,05	0,23	2,04
10	7,71	6,67	0,23	0,94
11	7,76	7,11	0,17	2,97
12	7,65	7,06	0,32	4,27
13	7,68	7,08	0,46	3,31
14	7,67	6,93	0,13	2,78
15	7,57	7,17	0,21	3,55
16	7,27	7,3	0,2	1,88
17	8,12	7,19	0,88	6,77
18	7,72	7,24	0,12	1,13
19	7,78	7,34	0,14	0,41
20	7,75	7,15	0,28	3,93
21	7,6	7,22	0,22	4,89
22	7,85	7,08	0,34	2,77
23	7,84	7,16	0,34	3,60
24	7,59	7,21	0,67	2,57
25	7,75	7,14	0,14	2,23
26	7,7	7,15	0,14	1,15
27	7,66	7,17	0,2	0,94
28	10,94	10,52	10,1	1,54
29	7,82	7,37	0,19	0,67
30	7,39	6,8	0,31	2,56
31	7,76	7,05	0,19	3,91
32	7,26	6,9	0,67	1,74
33	7,5	7,25	0,18	5,84
34	7,7	5,41	0,32	1,66

## Rezultati i diskusija



pH vrednosti vodenih rastvora analiziranih zemljišta bile su u intervalu od 7,26 za uzorak 32 do 10,94 za uzorak 28. pH vrednosti analiziranih zemljišta u rastvotu KCl bile su niže u odnosu na one određene u vodenom rastvoru i bile su u rasponu od 5,41 za uzorak 34 do 10,52 za uzorak 28. Prema klasifikaciji *USDA* (1993) većina uzoraka analiziranog zemljišta pripada neutralnim i slabo alkalnim tipovima zemljišta. Vrednosti provodljivosti zemljišta kretale su se u granicama od 0,12 mS cm<sup>-1</sup> za uzorak 18 do 10,1 mS cm<sup>-1</sup> za uzorak 28. Provodljivost zemljišta ukazuje na dostupnost nutrijenata biljkama, pa tako što je veća provodljivost, dostupnost mineralnih materija zemljišta biljkama je veća. Organske supstance zemljišta bile su prisutne u analiziranim uzorcima u granicama od 0,41-6,77%. Uzorci u kojima su pronađene najveće koncentracije ukupnih PAU (uzorci 22, 14 i 18) se po karakteristikama zemljišta ne izdvajaju u odnosu na ostale uzorke. Takođe, i uzorak u kome je određen najmanji sadržaj PAU (uzorak 2) ne pokazuje ekstermne vrednosti ni za jedan od analiziranih parametara.





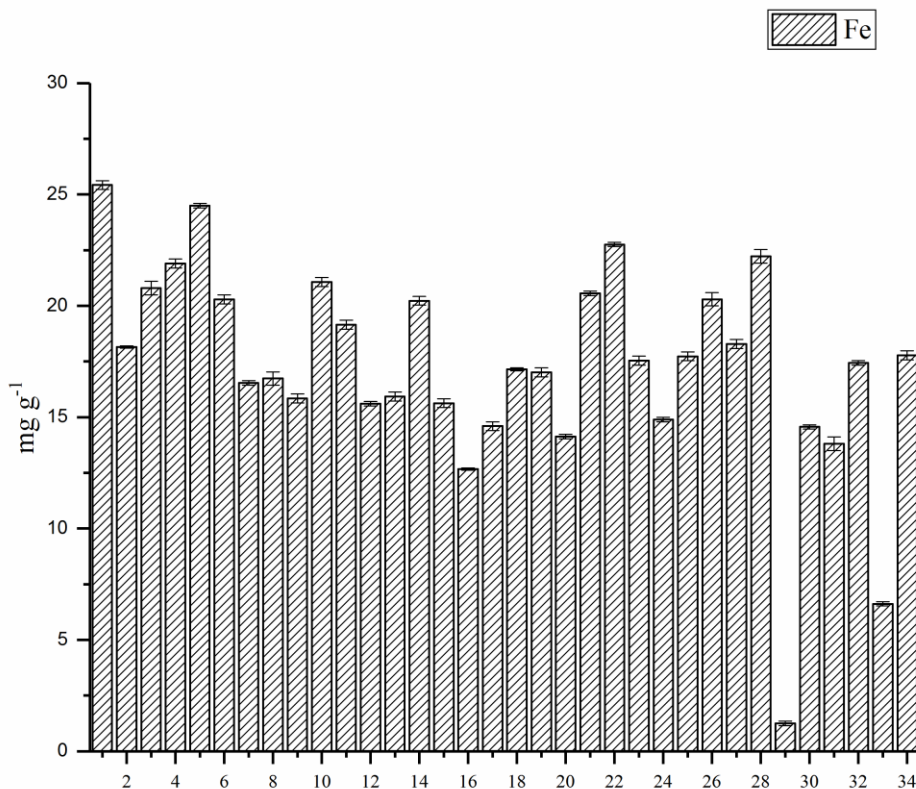


#### 4.6. Sadržaj metala u uzorcima zemljišta

Elementi prisutni u zemljištu mogu se podeliti na makroelemente, čija koncentracija prelazi  $100 \text{ mg kg}^{-1}$ , i elemente u tragovima, čija je koncentracija manja od ove vrednosti (Sposito, 2008). U makroelemente se ubrajaju O, Si, Al, Fe, C, K, Ca, Na, Mg, Ti, N, S, Ba, Mn i P. Sa stanovišta hemije životne sredine značajnu ulogu imaju teški metali. Oni su definisani kao metali koji imaju gustinu veću od  $5 \text{ g cm}^{-3}$ . Teški metali mogu imati značajnu ulogu za biljni i životinjski svet, ali u visokim koncentracijama mogu biti toksični (Christensen, 1995).

U analiziranim uzorcima zemljišta određen je sadržaj teških metala - Cd, Cr, Co, Cu, Hg, Fe, Ni, Mn i Pb. Sadržaj ovih metala u uzorcima zemljišta određen je kako bi pored koncentracije PAU dodatno ukazao na potencijalno zagađenje zemljišta.

Na Slici 46. prikazan je sadržaj gvožđa u analiziranim uzorcima.

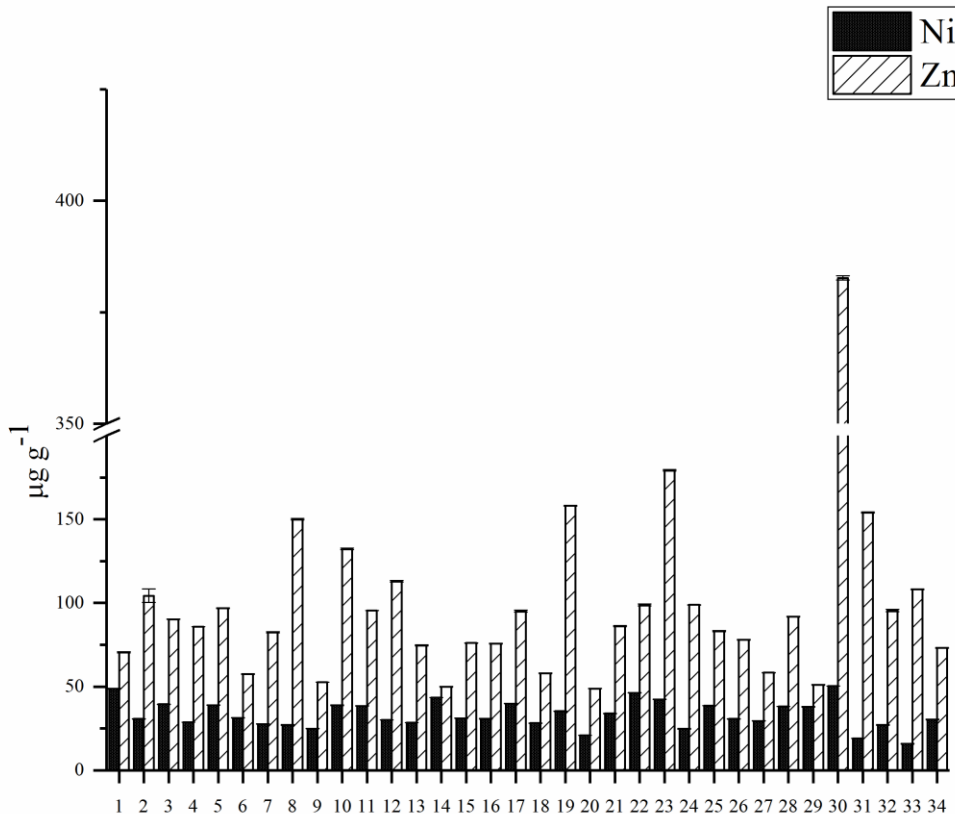


Slika 46. Koncentracija Fe u analiziranim uzorcima zemljišta ( $\text{mg g}^{-1}$ )



Koncentracija gvožđa u analiziranim uzorcima zemljišta bila je u intervalu od 1,3 mg g<sup>-1</sup> za uzorak 29 do 25,4 mg g<sup>-1</sup> za uzorak 1. *Naučni institut za ratarstvo i povrtarstvo* (2006) analizirao je sadržaj gvožđa u uzorcima iz urbanog dela Novog Sada i dobijene vrednosti slične su vrednostima dobijenim u ovom istraživanju.

Na Slici 47. prikazan je sadržaj nikla i cinka u analiziranim uzorcima zemljišta.

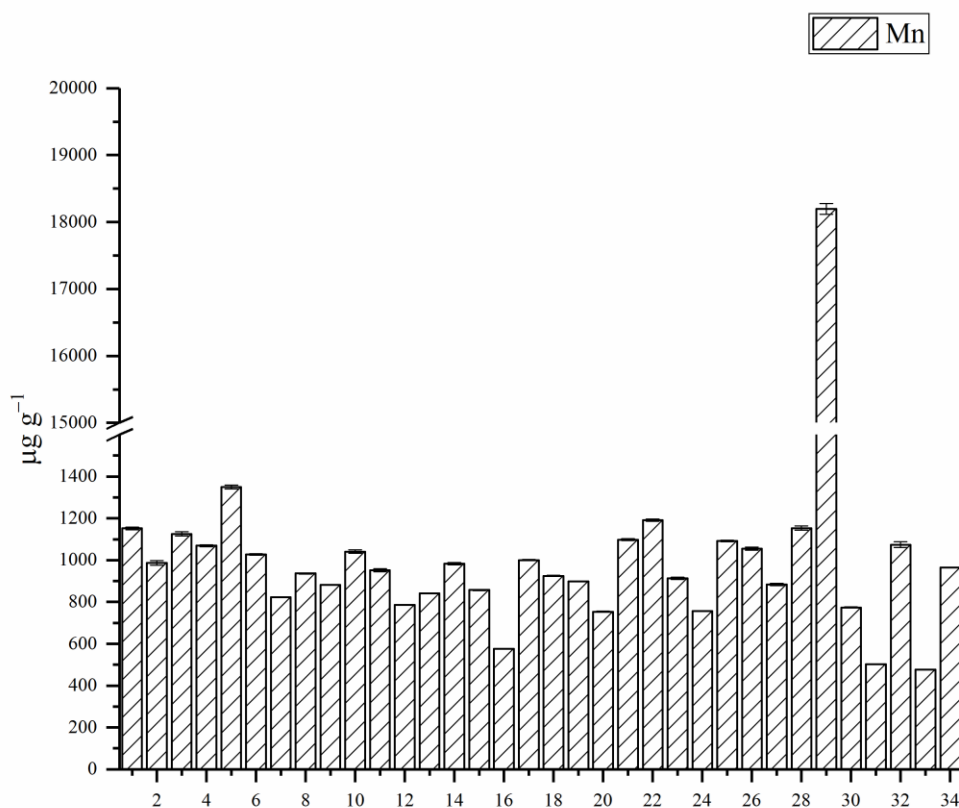


**Slika 47.** Koncentracija Ni i Zn u analiziranim uzorcima zemljišta (mg g<sup>-1</sup>)

Granična vrednost za sadržaj Ni u zemljištu propisana Uredbom o programu sistemskog praćenja kvaliteta zemljišta, indikatorima za ocenu rizika od degradacije zemljišta i metodologiji za izradu remedijacionih programa (*Ministarstvo zaštite životne sredine*, 2010) iznosi 35 mg kg<sup>-1</sup>. U analiziranim uzorcima zemljišta četrnaest uzoraka ima veću vrednost od zakonom propisane granice. Granična vrednost za sadržaj Zn u zemljištu iznosi 140 mg kg<sup>-1</sup> i pet, od trideset četiri analizirana uzorka, ima vrednost sadržaja cinka veću od 140 mg kg<sup>-1</sup>.



Na Slici 48. prikazan je sadržaj mangana u analiziranim uzorcima.

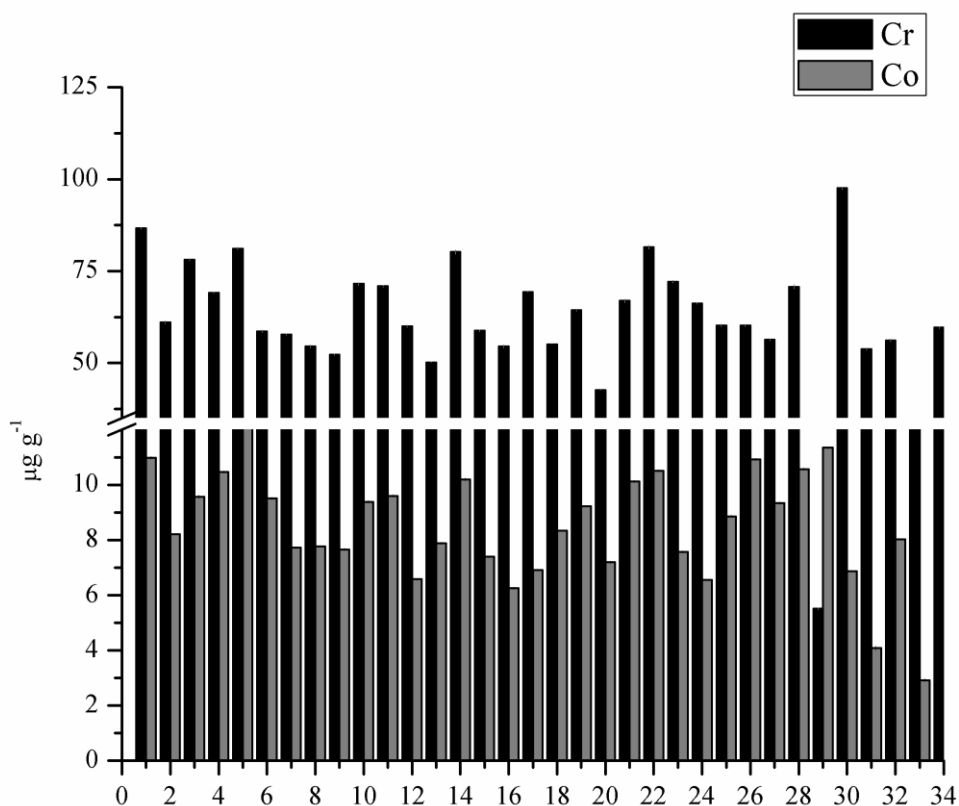


**Slika 48.** Koncentracija Mn u analiziranim uzorcima zemljišta ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )

Srednja vrednost sadržaja Mn u određivanim uzorcima iznosila je  $1444,08 \mu\text{g g}^{-1}$ . Najveća vrednost sadržaja mangana zabeležena je za uzorak 29 i iznosila je  $18196,8 \mu\text{g g}^{-1}$ . U poređenju sa vrednostima *Naučnog instituta za ratarstvo i povrtarstvo Novi Sad* (2006) dobijene su nešto više vrednosti sadržaja Mn u uzorcima iz gradskog dela Niša u odnosu na vrednosti koje su dobijene za gradski deo Novog Sada.



Na Slici 49. prikazan je sadržaj hroma i kobalta u analiziranim uzorcima zemljišta.



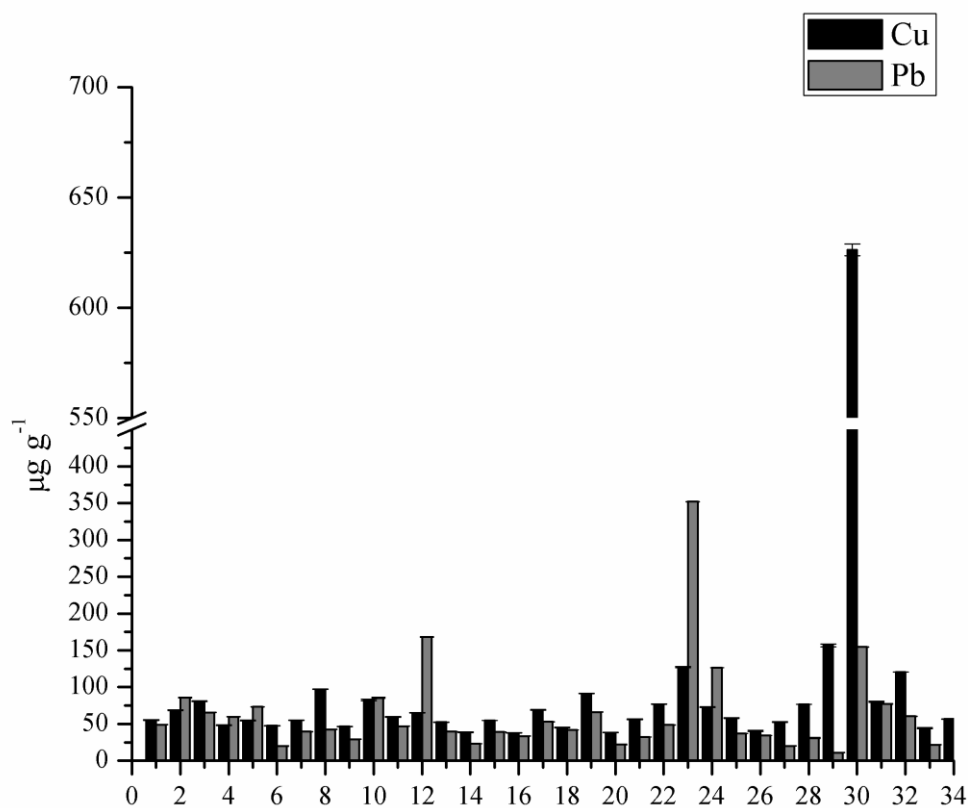
**Slika**

**49.** Koncentracije Cr i Co u analiziranim uzorcima zemljišta ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )

Koncentracije Cr u analiziranim uzorcima zemljišta bile su u intervalu od  $5,5 \mu\text{g g}^{-1}$  (uzorak 29) do  $97,5 \mu\text{g g}^{-1}$  (uzorak 30). Ni jedan od analiziranih uzoraka ne sadrži hrom u koncentracijama većim od graničnih vrednosti koncentracija propisanih Uredbom o programu sistemskog praćenja kvaliteta zemljišta, indikatorima za ocenu rizika od degradacije zemljišta i metodologiji za izradu remedijacionih programa (*Ministarstvo zaštite životne sredine*, 2010). Koncentracija Co u analiziranim uzorcima zemljišta bila je u intervalu od  $2,92$  (uzorak 34) –  $12,46$  (uzorak 5)  $\mu\text{g g}^{-1}$ .



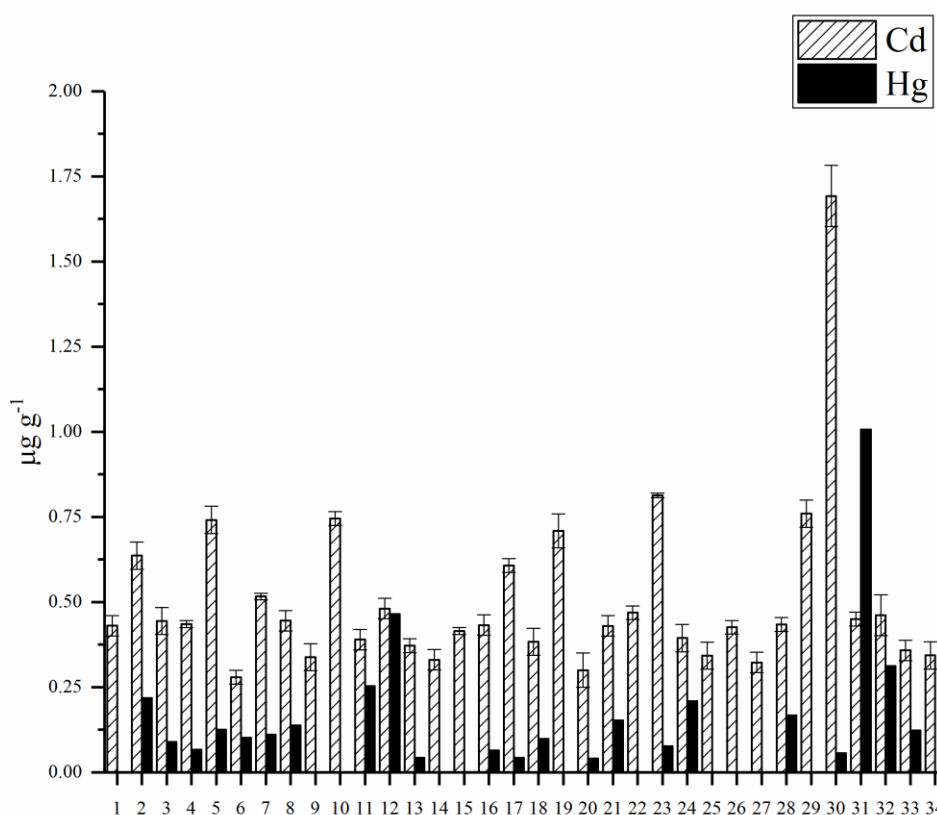
Na Slici 50. prikazan je sadržaj Cu i Pb u analiziranim uzorcima zemljišta.



Sadržaj Cu u analiziranim uzorcima premašuje graničnu vrednost propisanu Uredbom ( $36 \text{ mg kg}^{-1}$ ) (*Ministarstvo zaštite životne sredine*, 2010). Olovo u zemljištu je najčešće antropogenog porekla i potiče od izduvnih gasova automobila. U analiziranim uzorcima prosečna vrednost koncentracije olova iznosila je  $62,48 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$  i samo šest od trideset četiri analiziranih uzoraka imalo je veću koncentraciju od Uredbom propisane granične vrednosti.



Na slici 51. prikazan je sadržaj kadmijuma i žive u analiziranim uzorcima zemljišta.



**Slika 51.** Koncentracija Cd i Hg u analiziranim uzorcima zemljišta ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )

Koncentracija kadmijuma u analiziranim uzorcima bila je u intervalu od 0,28 do 1,69  $\mu\text{g g}^{-1}$ . Jedino je na lokalitetima 23 i 30 koncentracija kadmijuma bila veća od granične vrednosti propisane Uredbom o programu sistemskog praćenja kvaliteta zemljišta, indikatorima za ocenu rizika od degradacije zemljišta i metodologiji za izradu remedijacionih programa (*Ministarstvo zaštite životne sredine*, 2010). Uredbom je propisana i granična vrednost za sadržaj žive u zemljištu, koja iznosi 0,3  $\text{mg kg}^{-1}$  i samo tri uzorka imaju veću vrednost ovog metala u odnosu na graničnu vrednost, dok u nekim uzorcima živa nije ni detektovana.



#### 4.7. Statistička analiza podataka dobijenih analizom sadržaja PAU, teških metala i osnovnih karakteristika u realnim uzorcima zemljišta

Multivarijantne statističke tehnike (PCA i klaster analiza) primenjene su na podatke dobijene analizom sadržaja PAU, teških metala i osnovnih karakteristika zemljišta prikupljenog na teritoriji gradskog područja grada Niša sa ciljem određivanja međusobnih odnosa između lokaliteta na kojima su uzorci prikupljeni kao i razumevanja međusobnih odnosa između analiziranih parametara.

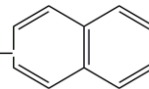
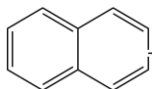
Pre primene multivarijantne statističke analize napravljena je korelaciona matrica između analiziranih policikličnih aromatičnih ugljovodonika (Tabela 30).

**Tabela 30.** Korelaciona matrica za koncentracije analiziranih policikličnih aromatičnih ugljovodonika u uzorcima zemljišta prikupljenih na teritoriji urbanog dela grada Niša

	Nap	Acnl	Anth	BaA	BbF	BkF	BghiP	Chry	Flnth	Flu	I123cdP	Phen	Pyr	Acnph
Nap	1,00	0,99*	0,99*	0,90*	0,03	0,04	0,32	-0,01	0,98*	0,99*	0,56	0,98*	0,92*	0,99*
Acnl		1,00	0,99*	0,87	0,04	0,05	0,31	0,00	0,98*	0,99*	0,54	0,98*	0,89	0,98*
Anth			1,00	0,92*	0,06	0,10	0,30	0,04	1,00	1,00	0,49	1,00	0,94*	0,98*
BaA				1,00	0,08	0,19	0,26	0,04	0,94*	0,92*	0,44	0,94*	1,00	0,94*
BbF					1,00	0,92*	0,06	0,75	0,02	0,01	0,28	0,02	0,08	0,01
BkF						1,00	0,02	0,79	0,08	0,04	0,21	0,08	0,17	0,03
BghiP							1,00	0,04	0,30	0,30	0,55	0,30	0,27	0,31
Chry								1,00	-0,01	-0,02	0,25	-0,01	0,03	-0,03
Flnth									1,00	1,00*	0,47	1,00*	0,96*	0,99*
Flu										1,00	0,50	1,00*	0,94	0,99*
I123cdP											1,00	0,47	0,44	0,51
Phen												1,00	0,96*	0,99*
Pyr													1,00	0,95*
Acnph														1,00

Varijable benzo[a]piren i dibenzo[a,h]antracen nisu pronađene ni u jednom analiziranih uzoraka i zato nisu uzete u obzir pri statističkoj obradi podataka. Korelacije označene zvezdicom su značajne pri  $p \leq 0,05$ .





Nakon određivanja korelacije između varijabli, pristupilo se analizi glavnih komponenti. Primenom analize glavnih komponenti (PCA) na sadržaj PAU u zemljištu dobijene su ajgen vrednosti (eigenvalues) prikazane u Tabeli 31.

**Tabela 31.** Ajgen vrednosti varijabli ispitivanja sadržaja policikličnih aromatičnih ugljovodonika u uzorcima zemljišta prikupljenih na teritoriji gradskog dela grada Niša

	<b>Ajgen vrednost</b>	<b>% ukupne varijanse</b>	<b>Suma ajgen vrednosti</b>	<b>Suma ukupne varijanse</b>
<b>1</b>	31,29963	92,05773	31,29963	92,0577
<b>2</b>	2,57551	7,57502	33,87514	99,6328
<b>3</b>	0,06206	0,18252	33,93720	99,8153
<b>4</b>	0,04205	0,12367	33,97924	99,9390
<b>5</b>	0,01419	0,04174	33,99344	99,9807
<b>6</b>	0,00344	0,01013	33,99688	99,9908
<b>7</b>	0,00133	0,00392	33,99821	99,9947
<b>8</b>	0,00096	0,00281	33,99917	99,9976
<b>9</b>	0,00043	0,00128	33,99960	99,9988
<b>10</b>	0,00023	0,00068	33,99983	99,9995
<b>11</b>	0,00012	0,00036	33,99995	99,9999
<b>12</b>	0,00005	0,00013	34,00000	100,0000

Prema kriterijumu koji je postavio Kaiser (*Kaiser*, 1960), značajne komponente su one čija ajgen vrednost prelazi 1.

Cilj PCA analize je redukcija broja podataka na manji broj promenljivih (glavnih komponenti) koje će međusobno opisivati varijaciju podataka. Teorijski, glavna komponenta (PC) je linearna kombinacija originalnih promenljivih. Od dobijenih glavnih komponenti obično se zadržavaju samo one čiji zbir obuhvata veliki procenat ukupne promenljive (*Otto*, 1999). Od 12 komponenti



dobijenih PCA analizom samo 2 imaju ajgen vrednost veću od 1 i one čine 99,63% ukupne varijanse. Najveći doprinos ukupnoj varijansi ima prva komponenta (PC1) i on iznosi 92,06% ukupne varijanse. Ova komponenta ima negativno opterećenje za tri analizirane komponente - acenaftilen (-0,6133), naftalen (-2,0989) i acenaften (-18,9294) (Tabela 32). Najveće negativno opterećenje ima za acenaften, što je i očekivano, ako se uzme u obzir da je ovo jedinjenje nađeno u svim uzorcima, u najvećoj koncentraciji u odnosu na ostala jedinjenja. Preostala jedinjenja grupisana su u istom kvadrantu, što je i očekivano, ako se u obzir uzmu njihove koncentracije i zastupljenost u analiziranim uzorcima.

U Tabeli 32. prikazane su faktorske koordinate dobijene PCA analizom PAU u uzorcima zemljišta prikupljenog sa teritorije gradskog dela grada Niša.

**Tabela 32.** Faktorske koordinate policikličnih aromatičnih ugljovodonika u uzorcima zemljišta

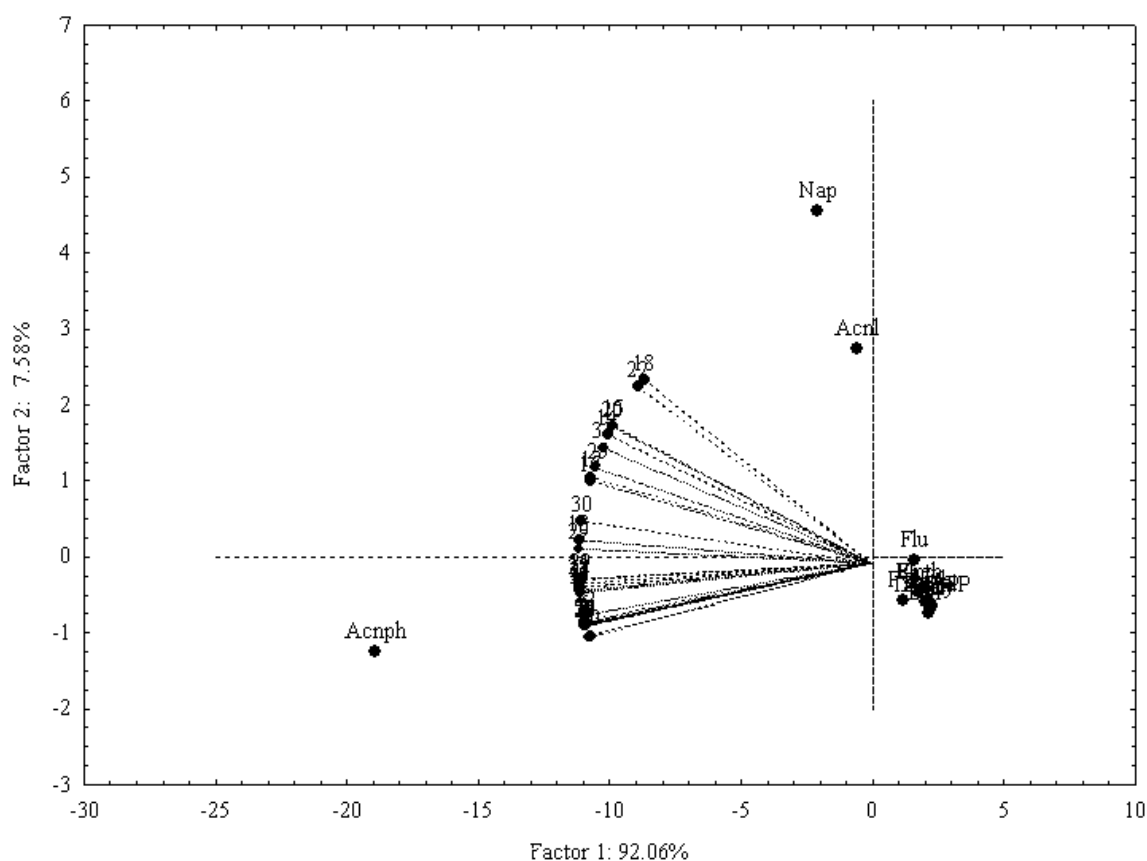
	PC 1	PC 2
<b>Naftalen</b>	-2,0989	4,54912
<b>Acenaftilen</b>	-0,6133	2,74916
<b>Antracen</b>	2,1507	-0,56854
<b>Benzo[a]antracen</b>	2,0180	-0,58936
<b>Benzo[b]fluoranten</b>	2,1269	-0,74784
<b>Benzo[k]fluoranten</b>	2,2221	-0,67191
<b>Benzo[ghi]perilen</b>	2,2563	-0,63333
<b>Hrizen</b>	2,2581	-0,64919
<b>Fluoranten</b>	1,7800	-0,47400
<b>Fluoren</b>	1,6022	-0,03923
<b>Indeno[123cd]piren</b>	2,2703	-0,63756
<b>Fenantren</b>	1,7800	-0,47400
<b>Piren</b>	1,1770	-0,57209
<b>Acenaften</b>	-18,9294	-1,24124

PC – glavna komponenta



Druga komponenta (PC2) objašnjava 7,58% ukupne varijanse. Najveće pozitivno opterećenje pokazuje za varijable naftalen i acenaftilen (4,54912 i 2,74916, respektivno), između kojih je zabeležena i značajna korelacija ( $r^2 = 0,99$ ,  $p \leq 0,05$ ).

Na Slici 52. prikazan je PCA dijagram za analizirane uzorke zemljišta za PC1 i PC2.



**Slika 52.** PCA dijagram analiziranih policikličnih aromatičnih ugljovodonika u uzorcima zemljišta prikupljenog na teritoriji gradskog dela Niša

Najveće negativno opterećenje za PC1 i najveće pozitivno opterećenje za PC2 pokazuje uzorak 22 (-0,996442 i 0,603634) (Tabela 33.), koji se odlikuje najvećim sadržajem ukupnih policikličnih aromatičnih ugljovodonika. Ovaj uzorak odlikuje se i najvećim koncentracijama acenaftena, naftalena i acenaftilena, koje su se izdvojile na loading plot-u u odnosu na ostale analizirane PAU i imaju negativno opterećenje za PC1. Preostala analizirana jedinjenja izdvojila su se u donjem levom kvadrantu, suprotno od analiziranih uzoraka. Ovakva pozicija preostalih PAU je očekivana, ako se u obzir uzme činjenica da su u pojedinim uzorcima oni bili ispod granice detekcije ili su nađeni u niskim koncentracijama.

## Rezultati i diskusija



U Tabeli 33. prikazane su faktorske koordinate analiziranih uzoraka na PCA dijagramu.

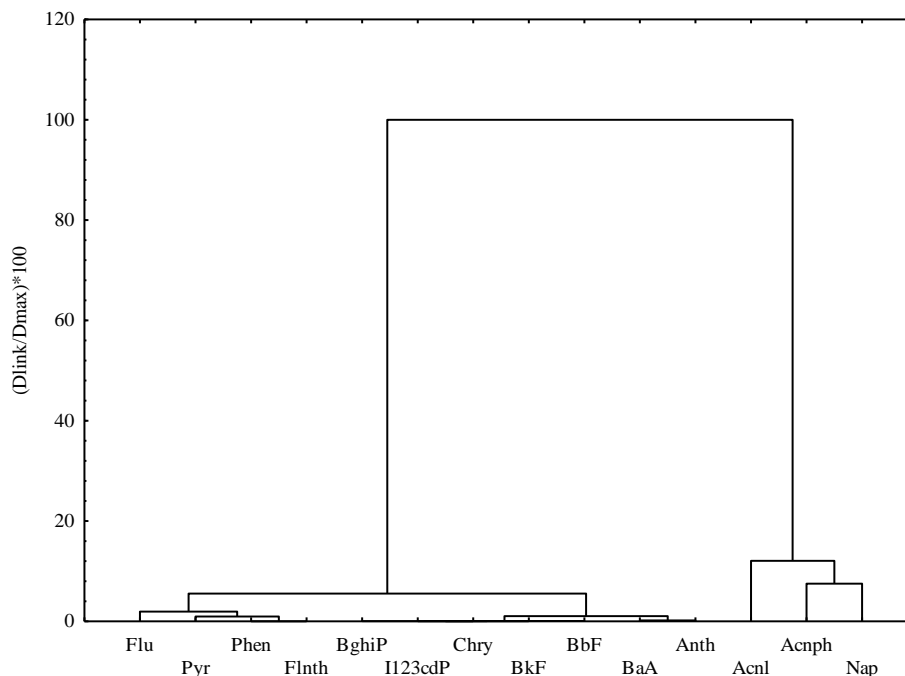
**Tabela 33.** Faktorske koordinate varijabli ispitivanja sadržaja policikličnih aromatičnih ugljovodonika u uzorcima zemljišta prikupljenih u gradskom delu Niša

Uzorak	PC1	PC2	Uzorak	PC1	PC2
<b>1</b>	-0,961437	-0,253206	<b>18</b>	-0,774808	0,625899
<b>2</b>	-0,976180	-0,214342	<b>19</b>	-0,995412	-0,055428
<b>3</b>	-0,977070	-0,211964	<b>20</b>	-0,884680	0,465539
<b>4</b>	-0,976996	-0,211771	<b>21</b>	-0,992868	-0,056654
<b>5</b>	-0,976256	-0,211803	<b>22</b>	-0,996442	0,603634
<b>6</b>	-0,979173	-0,197921	<b>23</b>	-0,974326	-0,216076
<b>7</b>	-0,976747	-0,213703	<b>24</b>	-0,995089	-0,083388
<b>8</b>	-0,977543	-0,205417	<b>25</b>	-0,944797	0,326098
<b>9</b>	-0,975708	-0,214396	<b>26</b>	-0,976426	-0,210829
<b>10</b>	-0,958411	-0,248704	<b>27</b>	-0,975941	-0,213117
<b>11</b>	-0,995253	-0,093884	<b>28</b>	-0,995818	-0,071643
<b>12</b>	-0,955772	0,293511	<b>29</b>	-0,998167	0,049434
<b>13</b>	-0,996676	0,078469	<b>30</b>	-0,989430	0,142656
<b>14</b>	-0,898440	0,438837	<b>31</b>	-0,994367	-0,101323
<b>15</b>	-0,880668	0,468859	<b>32</b>	-0,976653	-0,178207
<b>16</b>	-0,958261	0,280269	<b>33</b>	-0,914448	0,392710
<b>17</b>	-0,995424	-0,082878	<b>34</b>	-0,976760	-0,209421

Cilj klaster analize bilo je grupisanje posataka dobijenih analizom sadržaja policikličnih aromatičnih ugljovodonika u uzorcima zemljišta. PCA analizom dobija se grafički prikaz koji je zbog preklapanja varijabli nezgodan za tumačenje, pa je klaster analizom omogućeno lakše uočavanje veza između podataka dobijenih analizom sadržaja PAU u uzorcima zemljišta. Podaci koji su korišćeni za PCA analizu podvrgnuti su hijerarhijskoj klaster analizi i rezultati ove analize prikazani su na Slici 53. u vidu dendrograma. Klaster analiza izvršena je Vardovom metodom, upotrebom standardizovanih varijabli, a Euklidova rastojanja prikazana su kao odnos  $(D_{link}/D_{max}) \times$



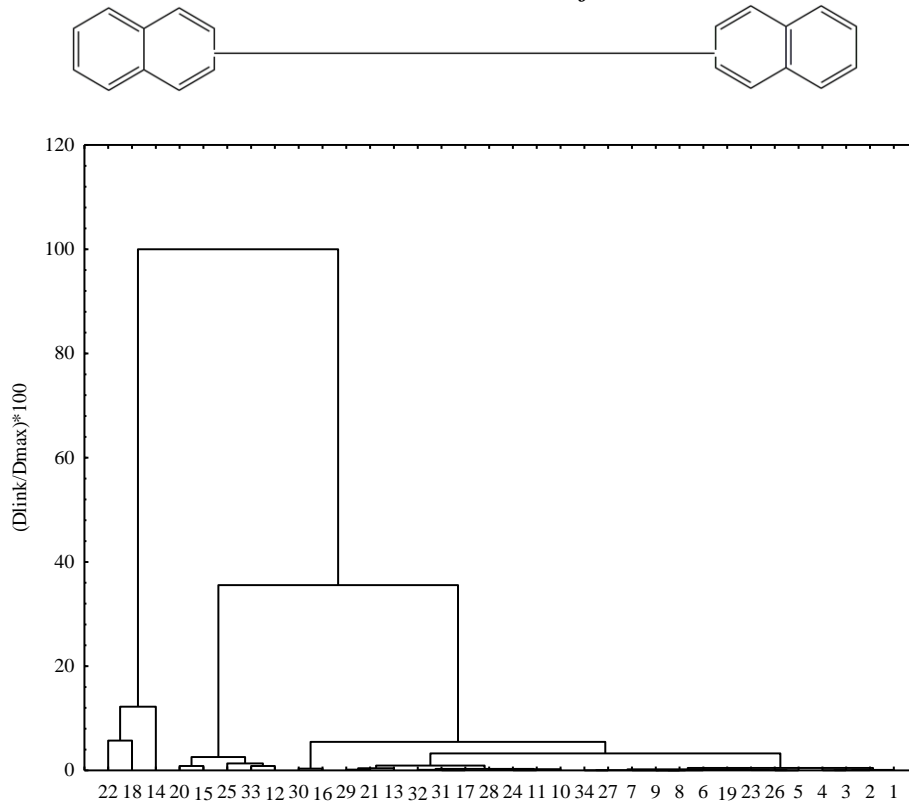
100, gde je  $D_{\text{link}}$  rastojanje između varijabli koje se grupišu, a  $D_{\text{max}}$  maksimalno rastojanje između varijabli.



**Slika 53.** Dendrogram ispitivanih policikličnih aromatičnih ugljovodonika u uzorcima zemljišta prikupljenog na teritoriji gradskog dela grada Niša

Na dendrogramu se mogu videti dva statistički značajna klastera na  $(D_{\text{link}}/D_{\text{max}}) \times 100 = 50$ . Prvi klaster čine acenaftilen, acenaften i naftalen. Ova tri jedinjenja pronađena su u svim uzorcima, u znatno većim koncentracijama u odnosu na ostale analizirane komponente. U ovom klasteru uočava se i potklaster koji čine acenaften i naftalen, koji su u uzorcima nađeni u manjoj koncentraciji u odnosu na acenaftilen. Preostala analizirana jedinjenja čine drugi klaster. U ovom klasteru uočava se više potklastera, u kojima su PAU grupisani prema zastupljenosti u analiziranim uzorcima. Fluoren, piren i fenantren čine jedan potklaster, jer je njihova zastupljenost u uzorcima veća u odnosu na ostala jedinjenja koja su grupisana u ovom klasteru. Rezultati klaster analize podudaraju se sa rezultatima PCA analize, gde su acenaftilen, acenaften i naftalen takođe izdvojena u odnosu na ostale analizirane komponente.

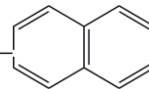
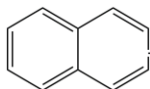
Klaster analizom grupisani su i lokaliteti na kojima je uzorkovano zemljište, na osnovu koncentracije PAU u njima. Rezultati analize prikazani su u vidu dendrograma (Slika 54).



**Slika 54.** Dendrogram grupisanja uzoraka zemljišta prikupljenog na teritoriji urbanog dela Niša na osnovu sadržaja policikličnih aromatičnih ugljovodonika

Na dendrogramu koji pokazuje grupisanje uzoraka zemljišta na osnovu sadržaja PAU mogu se uočiti dva statistički značajna klastera. Jedan klaster čine uzorci 22, 18 i 14. Uzorak 22 odlikuje se najvećim sadržajem PAU, a nakon njega najveće koncentracije PAU pronađene su u uzorcima 18 i 14, pa je i očekivano grupisanje ova tri uzorka u jedan klaster. Uzorci 22 i 18 nalaze se u blizini prometnih saobraćajnica, dok se uzorak 14 nalazi u blizini gradske toplane. Preostali uzorci grupisani su u drugi klaster, koji sadrži dva veća potklastera. U jednom od potklastera grupisani su uzorci 20, 15, 25, 33 i 12, koji se odlikuju sličnim sadržajem PAU. Uzorak 20 nalazi se u blizini gradske toplane, dok se uzorak 15 nalazi u blizini kuća koje za grejanje koriste uglavnom fosilna goriva, pa razlog grupisanja ova dva uzorka može biti to što PAU u njima potiču u najvećoj meri od sagorevanja fosilnih goriva. Uzorci 25, 33 i 12 nalaze se u blizini saobraćajnica sa velikim protokom saobraćaja i pretpostavka je da PAU u ovim uzorcima potiču od sagorevanja goriva u motorima sa unutrašnjim sagorevanjem. Uzorci 1, 2, 3, 4 i 5 su uzorci koji se nalaze u manje prometnim ulicama i imaju najmanji sadržaj PAU, pa je i očekivano njihovo međusobno grupisanje u potklaster.

Sadržaj teških metala takođe može ukazati na potencijalno zagađenje zemljišta. U cilju razumevanja odnosa između sadržaja teških metala i lokaliteta na kojima su uzorci prikupljeni, statističkoj analizi



podvrgnut je i sadržaj teških metala u uzorcima. Najpre je urađena korelaciona analiza i dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 34.

**Tabela 34.** Korelaciona matrica za analizirane teške metale

	Fe	Cd	Co	Cr	Cu	Hg	Mn	Ni	Pb	Zn
Fe	1,00	-0,13	0,57	0,79*	-0,19	-0,11	-0,57	0,41	0,05	-0,07
Cd		1,00	-0,00	0,34	0,90*	-0,05	0,18	0,51	0,50	0,87
Co			1,00	0,30	-0,11	-0,45	0,30	0,58	-0,20	-0,28
Cr				1,00	0,30	-0,07	-0,58	0,65	0,34	0,42
Cu					1,00	-0,01	0,12	0,42	0,36	0,88*
Hg						1,00	-0,13	-0,39	0,19	0,18
Mn							1,00	0,14	-0,15	-0,16
Ni								1,00	0,26	0,32
Pb									1,00	0,56
Zn										1,00

Korelacije označene zvezdicom su značajne pri  $p \leq 0,05$ .

Nakon određivanja korelacije između varijabli, pristupilo se analizi glavnih komponenti. PCA analizom određene su ajgen vrednosti (eigenvalues) za sadržaj metala u uzorcima zemljišta (Tabela 35).

**Tabela 35.** Ajgen vrednosti varijabli ispitivanja sadržaja teških metala u uzorcima zemljišta prikupljenog na teritoriji gradskog dela Niša

	Ajgen vrednost	% ukupne varijanse	Suma ajgen vrednosti	Suma ukupne varijanse
1	32,99655	97,04868	32,99655	97,0487
2	1,00128	2,94495	33,99784	99,9936
3	0,00168	0,00494	33,99952	99,9986
4	0,00036	0,00105	33,99987	99,9996
5	0,00012	0,00035	33,99999	100,0000

PCA analizom sadržaja teških metala izdvojeno je pet faktora, ali samo prva dva imaju ajgen vrednost veću od 1 i čine 99,99% ukupne varijanse.



PC1 ima najveće negativno opterećenje za varijablu Fe (-16,3271), što je i očekivano, ako se u obzir uzme koncentracija ovog metala u odnosu na ostale (Tabela 36). Za sve ostale elemente PC1 ima pozitivno opterećenje. Najveće pozitivno opterećenje PC2 ima za Hg (0,34303), koja je element koji se u analiziranim uzorcima nalazi u najmanjoj koncentraciji. Jedino negativno opterećenje za PC2 pokazao je Mn (-2,84225), koji nakon Fe ima najveću koncentraciju među analiziranim elementima.

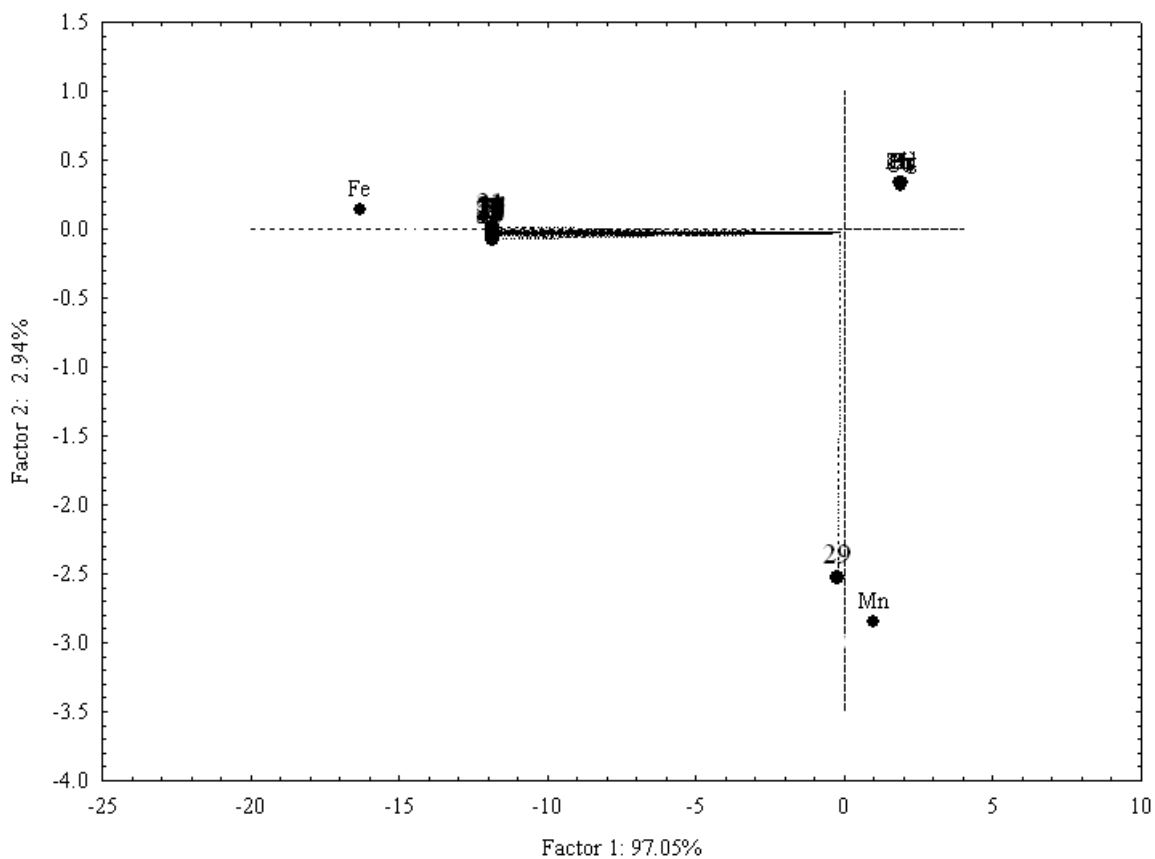
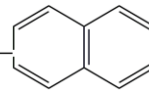
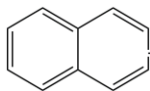
**Tabela 36.** Faktorske koordinate sadržaja teških metala u uzorcima zemljišta

	PC1	PC2
<b>Fe</b>	-16,3271	0,14427
<b>Cd</b>	1,9643	0,34290
<b>Co</b>	1,9562	0,34105
<b>Cr</b>	1,8982	0,34219
<b>Cu</b>	1,8745	0,31650
<b>Hg</b>	1,9647	0,34303
<b>Mn</b>	0,9916	-2,84255
<b>Ni</b>	1,9304	0,33640
<b>Pb</b>	1,8959	0,34177
<b>Zn</b>	1,8513	0,33444

PC – glavna komponenta

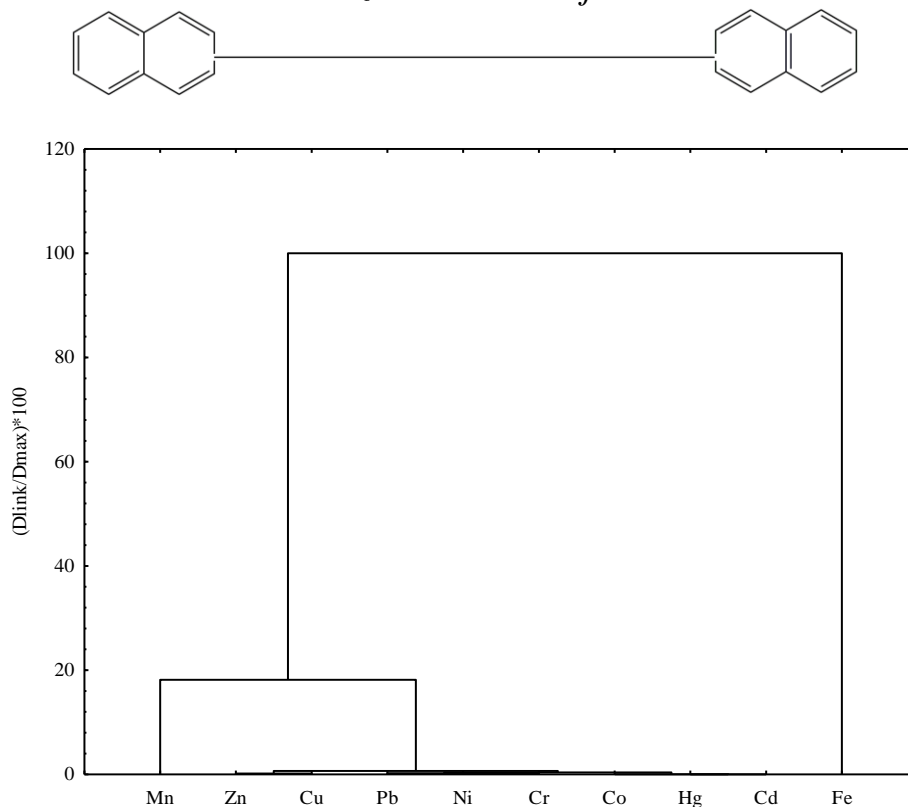
Na Slici 55. prikazan je PCA dijagram za analizirane metale u uzorcima zemljišta. Može se videti da se uzorak 29 izdvojio u odnosu na ostale. Ovaj uzorak odlikuje se najmanjim sadržajem Fe, elementom koji se izdvojio na PC1. Ostali uzorci grupisani su zajedno na score plot-u, u istom kvadrantu u kom se nalazi i Fe, metal koji je u analiziranim uzorcima prisutan u najvećoj koncentraciji.





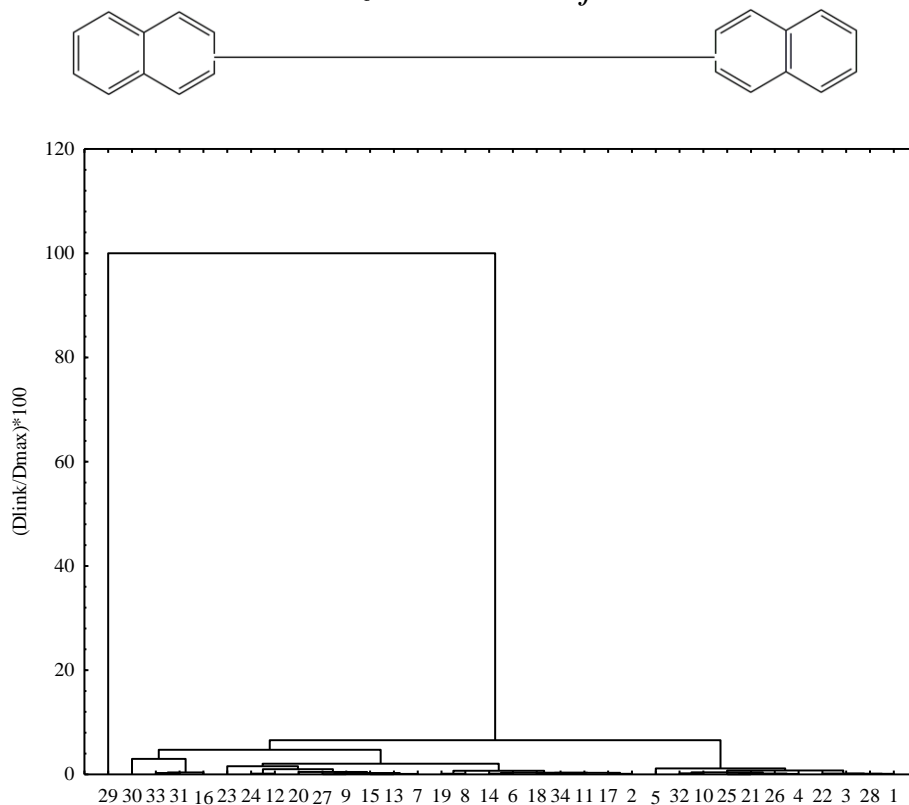
**Slika 55.** PCA dijagram grupisanja uzoraka zemljišta na osnovu sadržaja teških metala

Primenom klaster analize izvršeno je grupisanje teških metala (Slika 56) i uzoraka zemljišta (Slika 57). Kao osnov grupisanja primenjena je Vardova metoda, a udaljenost između varijabli određena je Euklidovim rastojanjem. Pre primene klaster analize varijable su standardizovane



**Slika 56.** Dendrogram ispitivanih teških metala u uzorcima zemljišta

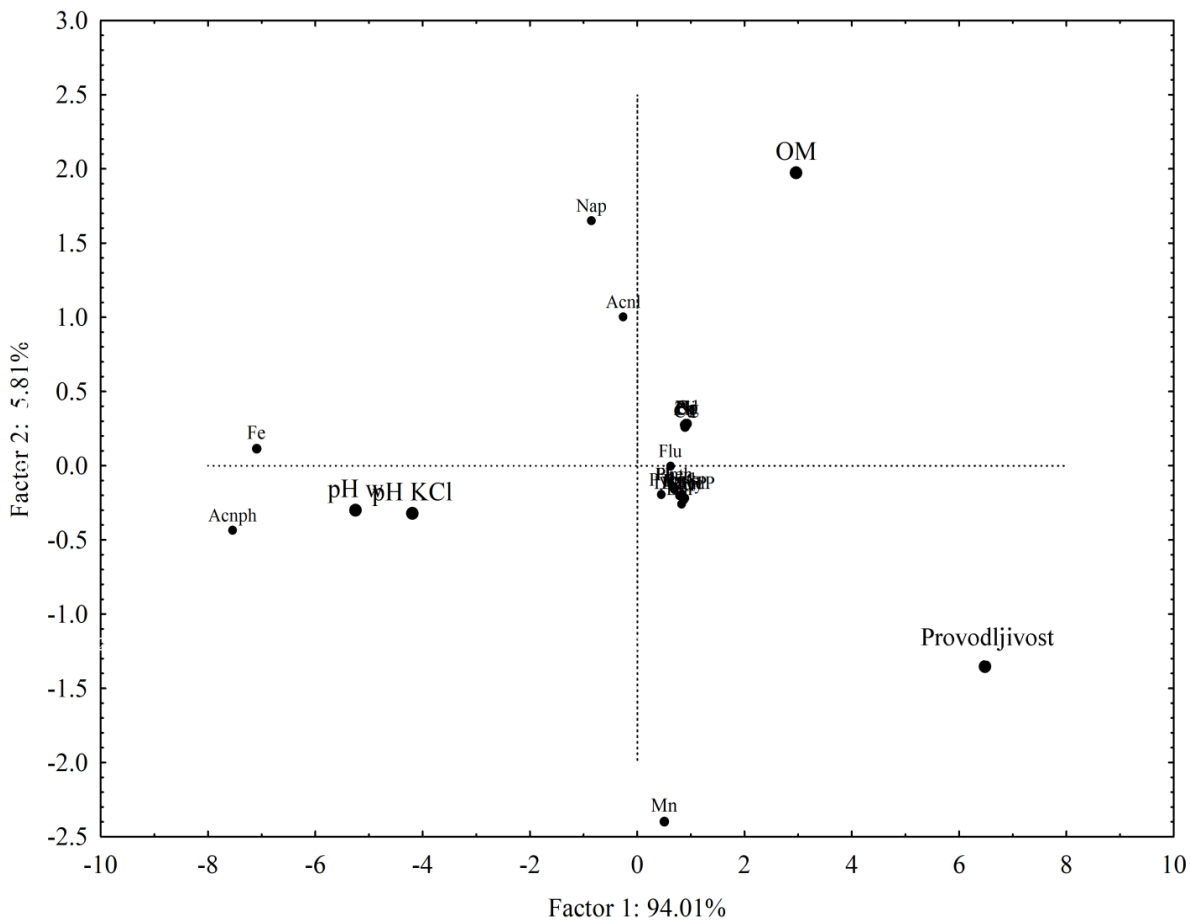
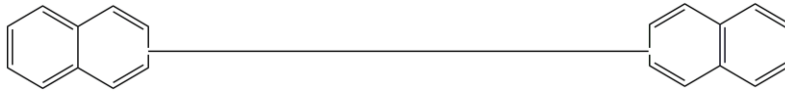
Na osnovu rastojanja  $D_{\text{link}}/D_{\text{max}} < 50$  zaključeno je da su teški metali u zemljištu grupisani u dva klastera. U jednom klasteru izdvojilo se gvožđe, koje je u analiziranim uzorcima zastupljeno u najvećoj koncentraciji, dok drugi klaster čine preostali teški metali. Euklidovo rastojanje između Fe i ostalih teških metala veće je od 100 000. U drugom klasteru primećeno je postojanje potklastera, i izdvajanje Mn u odnosu na ostale metale. Najmanje Euklidovo rastojanje (3) zabeleženo je između Cd i Hg. Ova dva metala pripadaju grupi elemenata bez dokazane funkcije u živim organizmima i najmanje su zastupljeni u analiziranim uzorcima.



**Slika 57.** Dendrogram grupisanja uzoraka zemljišta na osnovu sadržaja teških metala

Analizirani uzorci su na osnovu sadržaja teških metala grupisani u dva klastera ( $D_{\text{link}}/D_{\text{max}} < 50$ ). U jednom klasteru izdvojio se uzorak 29, dok su ostali uzorci grupisani u drugom klasteru. U drugom klasteru uočavaju se četiri veća potklastera. Najmanje Euklidovo rastojanje (39) zabeleženo je između uzoraka 6 i 26, pa se može smatrati da su ova dva uzorka najbližnja po sadržaju teških metala.

U cilju razumevanja odnosa između sadržaja policikličnih aromatičnih ugljovodonika, teških metala i osnovnih karakteristika zemljišta, PCA analiza primenjena je na ove varijable i rezultati su prikazani na Slici 58.



**Slika 58.** PCA dijagram sadržaja teških metala, policikličnih aromatičnih ugljovodonika i osnovnih parametarakarakteristika zemljišta

Sa Slike 58. može se videti da se u gornjem desnom kvadrantu nalazi organska materija zemljišta i većina analiziranih teških metala. Istraživanja (*Brümmer i Herms, 1983*) su pokazala uticaj organske supstance na dostupnost i ponašanje pojedinih metala. Biodostupnost metala kao što su Cd, Zn, Cu i Pb znatno je smanjena u prisustvu organske supstance zemljišta, i to u većoj meri nego u prisustvu mineralne supstance. Sadržaj organske supstance u analiziranim uzorcima bio je od 0,41% do 6,77%. Metali se za organske supstance zemljišta vezuju gradeći komplekse sa organskim ligandima, i na taj način je njihova biodostupnost smanjena (*Impellitteri i sar., 2002*). Faktor koji takođe utiče na ponašanje metala u zemljištu je pH vrednost zemljišta (*Rieuwerts i sar., 1998*). pH vrednost takođe utiče i na sposobnost organske supstance za vezivanje metala. Pri pH vrednostima većim od 5 raste sposobnost organske supstance za vezivanje teških metala (*Rieuwerts i sar., 1998*). Razlog ovome je jonizacija funkcionalnih grupa organskih supstanci prisutnih u zemljištu, koje na taj način lakše stupaju u reakcije sa metalnim katjonima. Većina PAU našla se u donjem desnom

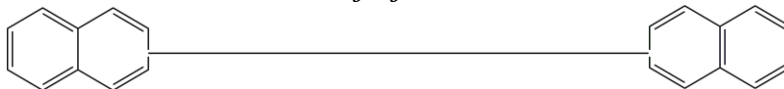
## Rezultati i diskusija



kvadrantu zajedno sa provodljivošću. *Abdel-Shafy i Mansour* (2016) uočili su vezu između provodljivosti zemljišta i mobilnosti PAU. Smatra se da je povezanost PAU sa provodljivošću zemljišta posledica prisustva proizvoda sagorevanja organske supstance u zemljišnom rastvoru. Naftalen i acenaftilen našli su se u kvadrantu suprotnom od onog u kome se nalazi provodljivost zemljišta, pa se može reći da su ova dva jedinjenja u negativnoj korelaciji sa provodljivošću zemljišta. *Blakely i saradnici* (2002) ispitivali su odnos PAU i karakteristika zemljišta i došli do zaključka da su PAU koji sadrže 5 prstenova u negativnoj korelaciji sa provodljivošću. Sa druge strane, acenaften je u suprotnom kvadrantu u odnosu na organsku supstancu zemljišta, te je ovo jedinjenje u negativnoj korelaciji sa organskom supstancom prisutnom u zemljištu. Došlo je do grupisanja gvožđa sa acenaftenom, što se može smatrati očekivanim, ako se u obzir uzme to da ovaj metal i PAU imaju najveće koncentracije u uzorcima zemljišta.

***Zaključak***





## 5. Zaključak

Cilj ove doktorske disertacije bio je optimizovati i validovati metode pripreme uzoraka zemljišta za efikasnu, brzu i jednostavnu analizu policikličnih aromatičnih ugljovodonika kao prioriternih polutanata. Analiza ovih jedinjenja u uzorcima zemljišta od velikog je značaja. Postojeće metode analize zahtevaju dugo vreme celokupnog postupka, velike količine toksičnih rastvarača i skupu opremu. Cilj je ostvaren realizovanjem sledećih zadataka:

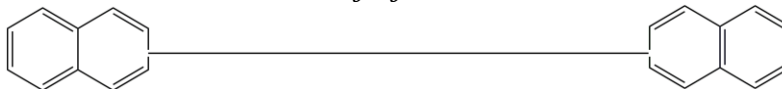
- Optimizacija ultrazvučne ekstrakcije testiranjem dve različite smeše rastvarača i dva različita vremena ekstrakcije za analizu PAU u uzorcima zemljišta;
- Ekstrakcija PAU po Soksletu iz uzoraka zemljišta i optimizacija prečišćavanja dobijenih ekstrakata za analizu PAU ekstrakcijom disperznom čvrstom fazom;
- Optimizacija QuEChERS tehnike primenom različitih kombinacija rastvarača i adsorbenasa za analizu PAU u uzorcima zemljišta;
- Validacija optimizovanih tehnika.

Nakon što se došlo do podataka o tome koja metoda daje najbolje rezultate uz najjednostavniji postupak i najkraće vreme ekstrakcije urađena je i analiza sadržaja PAU u realnim uzorcima prikupljenim na teritoriji gradskog područja Niša. Takođe su određene osnovne karakteristike zemljišta i sadržaj teških metala. Dobijeni rezultati su statistički analizirani da bi se utvrdila međusobna zavisnost ispitivanih parametara.

Ultrazvučna ekstrakcija je metoda koja je prva optimizovana u radu. Nakon ispitivanja dve različite smeše rastvarača (heksan/aceton (1:1) i cikloheksan/aceton (1:1)) i dva vremena ekstrakcije (30 i 60 minuta) zaključeno je da smeša rastvarača cikloheksan/aceton daje bolje efikasnosti u odnosu na smešu heksan/aceton. Takođe, zapaženo je da su dobijene veće efikasnosti u slučaju kraćeg vremena ekstrakcije. Efikasnosti za smešu rastvarača cikloheksan/aceton, za vreme ekstrakcije od 30 minuta, bile su u intervalu od 50% za fluoren do 121% fluoranten. Ostali parametri validacije metode takođe su pokazali da je ultrazvučna ekstrakcija smešom rastvarača cikloheksan/aceton pogodnija za ekstrakciju PAU iz uzoraka zemljišta za analizu na GC - MS u odnosu na ultrazvučnu ekstrakciju smešom rastvarača heksan/aceton. Vrednosti granice detekcije za smešu rastvarača cikloheksan/aceton i vreme ekstrakcije 30 minuta bile su u intervalu od 1,02 do 23,67  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Utvrđeno je da sa produženjem vremena ekstrakcije dolazi do smanjenja tačnosti i preciznosti metode, pa je tako preciznost određena za smešu rastvarača cikloheksan/aceton i vreme ekstrakcije od 30 minuta bila u intervalu od 2,58% za naftalen do 41,93% za fluoren.



## Zajključak

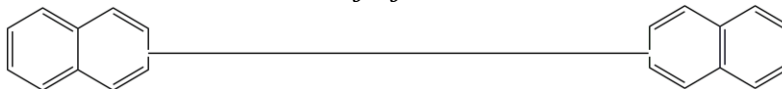


Nakon što je utvrđeno da ultrazvučna ekstrakcija ne daje optimalne rezultate za ekstrakciju svih 16 prioriternih PAU iz uzoraka zemljišta primenjena je ekstrakcije po Soksletu. Za prečišćavanje ekstrakata predložena je ekstrakcija disperznom čvrstom fazom. Rezultati dobijeni na ovaj način, za dijatomejsku zemlju kao sorbens, podudaraju se sa rezultatima dobijenim zvaničnom metodom Britanske agencije za zaštitu životne sredine. Efikasnosti za 16 analiziranih jedinjenja, kada je kao metoda korišćena metoda Britanske agencije za zaštitu životne sredine, bile su u intervalu od 75% za acenaftilen do 111% za naftalen. Vrednosti dobijene kombinacijom ekstrakcije po Soksletu i ekstrakcijom disperznom čvrstom fazom sa dijatomejskom zemljom kao sorbensom bile su slične ovim vrednostima. Jedino su za indeno[1,2,3-cd]piren, dibenzo[a,h]antracen i benzo[g,h,i]perilen prilikom upotrebe dijatomejske zemlje kao sorbensa efikasnosti bile niže od 70%. Ova činjenica ukazuje na mogućnost primene nove metode u analizi policikličnih aromatičnih ugljovodonika u uzorcima zemljišta i zamenu hromatografije na koloni tehnikom koja je brža, jeftinija i jednostavnija za rad. Izvršena je validacija predložene metode, gde se umesto hromatografije na koloni kao tehnika prečišćavanja koristi ekstrakcija disperznom čvrstom fazom. Vrednosti granice detekcije bile su u intervalu od 0,24  $\mu\text{g kg}^{-1}$  do 5,76  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , dok su RSD vrednosti za većinu komponenti bile niže od 10%. Predloženim modifikacijama u delu prečišćavanja ekstrakata znatno je skraćeno vreme pripreme uzorka i smanjena upotreba velikih količina toksičnih organskih rastvarača.

Jedna od metoda koja u poslednje vreme nailazi na široku primenu je QuEChERS. Nakon testiranja četiri različite smeše ekstrakcionih rastvarača (acetonitril/voda, heksan/voda, heksan/aceton i etil - acetat) i pet sorbenasa (PSA, C18, florisil, dijatomejska zemlja i klinoptilolit) za prečišćavanje dobijenih ekstrakata QuEChERS tehnikom došlo se do zaključka da najbolje rezultate daje kombinacija acetonitril/voda kao rastvarač i dijatomejska zemlja kao sorbens za prečišćavanje ekstrakata. Efikasnosti dobijene za ovu kombinaciju rastvarač/sorbens bile su u interval od 81% za benzo[b]fluoranten do 109% za benzo[a]piren. Zapaženo je i sledeće:

- Za sve kombinacije rastvarač/sorbens dobijene su bolje vrednosti za LMW PAU u poređenju sa vrednostima za HMW PAU;
- Smeša rastvarača heksan/voda u kombinaciji sa C18 i florisilom kao sorbensima, kao i etil - acetat u kombinaciji sa florisilom i dijatomejskom zemljom dali su odlične vrednosti efikasnosti za benzo[a]piren, jedinjenje koje je po klasifikaciji IARC svrstano u Grupu 1 dokazanih kancerogena. Efikasnosti za benzo[a]piren kada je kao rastvarač korišćena smeša heksan/voda i C18, odnosno florisil kao sorbens bile su u intervalima od 100-102% i 95-103%, za sva tri nivoa spajkovanja. U slučaju upotrebe etil - acetata i florisila odnosno

## Zajključak

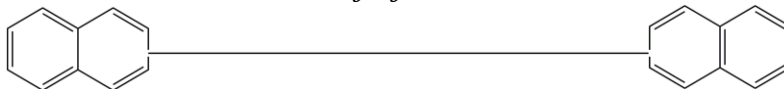


dijatomejske zemlje efikasnosti za benzo[a]piren bile su u intervalima 100-106 i 83-99%, za sva tri nivoa spajkovanja;

- Upotrebom smeše rastvarača acetonitril/voda dobijene su zadovoljavajuće efikasnosti (70-120%) korišćenjem svih testiranih sorbenasa za većinu analiziranih jedinjenja, što implicira da je ova smeša rastvarača pogodnija za ekstrakciju PAU iz zemljišta u odnosu na ostale testirane rastvarače;
- Kombinacija smeše rastvarača heksan/acetona i klinoptilolita kao sorbena za prečišćavanje ekstrakata omogućava postizanje efikasnosti određivanja većih od 70% i kretale su se u intervalu od 72% za benzo[a]antracen do 109% za dibenzo[a, h]antracen;
- U većini slučajeva najniže efikasnosti dobijene su za benzo[g,h,i]perilen. Najveća efikasnost dobijena za ovo jedinjenje postignuta je pomoću smeše rastvarača acetonitril/voda i dijatomejske zemlje kao sorbena za prečišćavanje i bila je u intervalu 81-105%, za sva tri nivoa spajkovanja .

Nakon što je utvrđeno da su najbolje efikasnosti (81% za benzo[b]fluoranten do 109% za benzo[a]piren) dobijene za kombinaciju acetonitril/voda i dijatomejsku zemlju, izvršena je validacije ove metode. Granica detekcije bila je u intervalu od  $0,39 \mu\text{g kg}^{-1}$  do  $1,53 \mu\text{g kg}^{-1}$ , što je niže u odnosu na vrednosti dobijene predloženom ekstrakcijom po Soksletu i ultrazvučnom ekstrakcijom. U odnosu na granicu kvantifikacije ekstrakcije po Soksletu i ultrazvučne ekstrakcije, vrednosti dobijene snimanjem ekstrakata pripremljenih QuEChERS tehnikom smešom rastvarača acetonitril/voda i dijatomejskom zemljom kao sorbensom su takođe niže ( $1,30 \mu\text{g kg}^{-1}$  za antracen do  $5,10 \mu\text{g kg}^{-1}$  za fenantren). Predložena QuEChERS tehnika takođe ima i bolju preciznost u odnosu na ekstrakciju po Soksletu i ultrazvučnu ekstrakciju (0,97% za benzo[a]piren do 18,95% za hrizen). Prednost predložene QuEChERS tehnike u odnosu na ekstrakciju po Soksletu i ultrazvučnu ekstrakciju je pored bolje tačnosti i preciznosti i nižih vrednosti granica detekcije i kvantifikacije, znatno kraće vreme pripreme uzoraka, manje količine rastvarača koji se koristi za ekstrakciju i smanjenje cene analize. Vreme koje je potrebno za pripremu pet uzoraka ekstrakcijom po Soksletu iznosi 8 sati za ekstrakciju i 2 sata za prečišćavanje dobijenih ekstrakata. QuEChERS tehnika zahteva znatno kraće vreme i za pet uzoraka ono iznosi 1 sat. Još jedna prednost predložene metode je ta što se kao sorbens za prečišćavanje predlaže dijatomejska zemlja, koja je mineral široko rasprostranjen u prirodi, čime se dodatno smanjuje cena analize. Predložena QuEChERS tehnika u potpunosti ispunjava uslove u pogledu tačnosti, preciznosti i jednostavnosti i kao takva može biti korišćena u većini analitičkih laboratorija za analizu policikličnih aromatičnih ugljovodonika, s obzirom na to da ne zahteva komplikovanu i skupu opremu.

## Zajključak



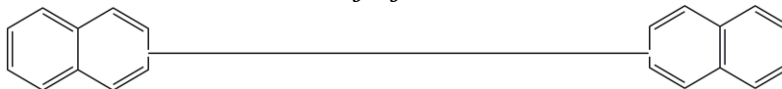
Nakon optimizacije i validacije, predložena QuEChERS tehnika korišćena je za analizu realnih uzoraka sa gradskog područja Niša. Acenaften, naftalen i acenaften su jedina tri jedinjenja koja su pronađena u svim uzorcima. U svim uzorcima najzastupljeniji PAU bio je acenaften, njegova koncentracija se nalazi u granicama 0,261 mg kg<sup>-1</sup> do 17,6 mg kg<sup>-1</sup>. Koncentracije ukupnih PAU varirale su u zavisnosti od mesta uzorkovanja, bile su u rasponu 0,346-48,7 mg kg<sup>-1</sup>, i bile su niže od maksimalno dozvoljene vrednosti propisane zakonskom regulativom Srbije.

Odnosi fluorantena i pirena i fenantrena i antracena ukazali su na pirolitičko poreklo PAU u analiziranim uzorcima, što je potvrdio i odnos fluoranten/(fluoranten+piren).

U uzorcima zemljišta prikupljenog na teritoriji urbanog dela grada Niša analiziran je i sadržaj teških metala, kako bi se dodatno ispitaio kvalitet zemljišta i ukazalo na eventualno zagađenje. Od analiziranih teških metala gvožđe je element koji ima najveću koncentraciju u uzorcima zemljišta (od 1,3 mg g<sup>-1</sup> za uzorak 29 do 25,4 mg g<sup>-1</sup> za uzorak 1). Sadržaj pojedinih metala, Ni, Zn, Cu, Pb, Cd i Hg, prelazi maksimalno dozvoljene koncentracije propisane u zakonskoj regulative Srbije na nekim od lokaliteta. Jedina dva elementa koja ne prelaze granične vrednosti koncentracija su Fe i Cr. Lokaliteti u kojima je sadržaj policikličnih aromatičnih ugljovodonika najveći (22, 18 i 14) ne izdvajaju se po sadržaju ni jednog od analiziranih teških metala. Jedino je sadržaj hroma, cinka i mangana u ovim uzorcima nešto veći u odnosu na većinu ostalih analiziranih uzoraka. Uzorci 14 i 22 sadrže 80,2 i 81,5 µg g<sup>-1</sup> Cr, dok sadržaj Zn u uzorku 22 iznosi 98,22 µg g<sup>-1</sup>.

Multivarijantnom statističkom analizom izvršeno je grupisanje uzoraka na osnovu sadržaja PAU i teških metala i utvrđeni su odnosi između analiziranih komponenti. PCA analizom sadržaja PAU ekstrahovana su dva faktora, koja čine 99,63% ukupne varijanse. PCA analiza omogućila je izdvajanje PAU po njihovoj zastupljenosti u uzorcima, kao i izdvajanje uzoraka prema rastućim vrednostima koncentracije, što implicira da se ovaj vid statističke analize može koristiti za jednostavniji prikaz i tumačenje rezultata dobijenih analizom velikog broja polutanata u uzorcima. Hijerarhijska klaster analiza potvrdila je rezultate dobijene PCA analizom. Statističkoj analizi podvrgnut je i sadržaj teških metala u uzorcima zemljišta. Gvožđe se izdvojilo na PCA dijagramu kao element koji se u uzorcima nalazi u najvećoj koncentraciji, dok se uzorak sa najmanjom koncentracijom ovog elementa izdvojio na PCA dijagramu u odnosu na ostale uzorke. Klaster analizom uzorci su grupisani u dva klastera, u kom je kao i u slučaju PCA analize, došlo do izdvajanja uzorka sa najmanjim sadržajem Fe u jedan klaster, dok su svi drugi uzorci grupisani u drugom klasteru, u kom se uočava niz podklastera.

## Zajključak



PCA analizom sadržaja policikličnih aromatičnih ugljovodonika, teških metala i osnovnih karakteristika zemljišta došlo je do grupisanja sledećih varijabli:

- Organska supstanca i većina teških metala - Cu, Cr, Cd, Co, Hg, Ni, Pb i Zn, što pokazuje da sadržaj organske supstance u zemljištu utiče na ponašanje teških metala;
- Elektroprovodljivost zemljišta i većina policikličnih aromatičnih ugljovodonika (svi osim acenaftena, naftalena i fluorena);
- pH u vodi, pH u KCl, Fe i acenaften. Acenaften je PAU koji se u analiziranim uzorcima nalazi u najvećoj koncentraciji, dok je gvožđe metal koji se u uzorcima nalazi u najvećoj koncentraciji, pa njihovo međusobno povezivanje može biti posledica visokih koncentracija. Ponašanje Fe u zemljištu zavisi od pH, dok je ranije dokazano da su PAU koji sadrže 5 prstena u negativnoj korelaciji sa provodljivošću;
- Naftalen i acenaften, dva PAU koja su zastupljena u svim uzorcima, u koncentracijama nižim od acenaftena, ali višim od preostalih jedinjenja.



*Literatura*





## 6. Literatura

Abdallah H., Arnaudguilhem C., Jaber F., Lobinski R., (2014). Multiresidue analysis of 22 sulfonamides and their metabolites in animal tissues using quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe extraction and high resolution mass spectrometry (hybrid linear iontrap-Orbitrap). *J. Chromatogr. A* 1355: 61 - 72.

Abdel-Shafy H. I., Mansour M. S. M., (2016). A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egypt. J. Pet.* 25: 107 - 123.

Adriano D. C., (2003). *Trace Elements in Terrestrial Environments: Biogeochemistry, Bioavailability and Risks of Metals*. Springer, New York, USA.

Agencija za zaštitu životne sredine, (2009). *Izveštaj o stanju zemljišta u Republici Srbiji*.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), (1995). *Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons*. U.S. Department of Health and Human Services.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), (2009). *Toxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Case Studies in Environmental Medicine (PAHs)*.

Akyüz M., Çabuk H., (2010). Gaseparticle partitioning and seasonal variation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the atmosphere of Zonguldak, Turkey. *Sci. Total Environ.* 408: 5550 - 5558.

Alagic S., Stankov Jovanovic V., Mitic V., Cvetkovic J., Petrovic G., Stojanovic G., (2016). Bioaccumulation of HMW PAHs in the roots of wild blackberry from the Bor region (Serbia), Phytoremediation and biomonitoring aspects. *Sci. Total Environ.* 562: 561 - 570.

Alagic S., Stankov Jovanovic V., Mitic V., Nikolic J., Petrovic G., Tosic S, Stojanovic G., (2017). The effect of multiple contamination of soil on LMW and MMW PAHs accumulation in the roots of *Rubus fruticosus* L. naturally growing near The Copper Mining and Smelting Complex Bor (East Serbia). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24: 15609 - 15621.

Alexander M., (1994). *Biodegradation and Bioremediation*. Academic Press, San Diego, California, USA.

Alloway B. J., (2008). *Zinc in Soils and Crop Nutrition*. IZA and IFA Brussels, Belgium and Paris, France.





Amir S., Hafidi M., Merlina G., Hamdi H., Revel J. C., (2004). Fate of polycyclic aromatic hydrocarbons during composting of lagooning sewage sludge. *Chemosphere* 58: 449-458.

Anastassiades M., Lehotay S. J., Štajnbaher D., Schenck F. J., (2003). Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *J. AOAC Int.* 86: 412 - 431.

Anderson R. A., (1981). Nutritional role of chromium. *Sci. Total Environ.* 17: 13 - 29.

Angioni A., Porcu L., Secci M., Addis P., (2012). QuEChERS method for the determination of PAH compounds in Sardinia Sea Urchin (*Paracentrotus lividus*) Roe, using gas chromatography ITMS-MS analysis. *Food Anal. Methods* 5: 1131 - 1136.

Anitescu G., Tavlarides L. L., (2006). Supercritical extraction of contaminants from soils and sediments. *J. Supercrit. Fluids* 38: 167 - 180.

Araujo P., (2009). Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. *J. Chromatogr. B.* 877: 2224 - 2234.

Arfken G., (1985). Eigenvectors, Eigenvalues. In: Arfken G., Weber H., (Eds.) *Mathematical Methods for Physicists*. Academic Press, Orlando, Florida, USA. pp: 229 - 237.

Babbie E., (2009). *The Practice of Social Research*. Wadsworth Publishing, Belmont, California, USA.

Baek S., Goldstone M., Kirk P., Lester J., Perry R., (1991). Phase distribution and particle size dependency of polycyclic aromatic hydrocarbons in the urban atmosphere. *Chemosphere* 22: 503 - 520.

Baldwin D. R., Marshall W. J., (1999). Heavy metal poisoning and its laboratory investigation. *Ann. Clin. Biochem.* 36: 267 - 300.

Bandowe B. A. M., Sobocka J., Wilcke W., (2011). Oxy gencontaining polycyclic aromatic hydrocarbons (OPAHs) in urban soils of Bratislava, Slovakia: patterns, relation to PAHs and vertical distribution. *Environ. Pollut.* 159: 539 - 549.

Banerjee D. K., Gray M. R., (1997). Analysis of hydrocarbon-contaminated soil by thermal extraction-gas chromatography. *Environ. Sci. Technol.* 31: 646 - 650.



Bang D. Y., Byeon S. K., Moon M. H., (2014). Rapid and simple extraction of lipids from blood plasma and urine for liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1331: 19 - 26.

Banjoo D. R., Nelson P. K., (2015). Improved ultrasonic extraction procedure for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments. *J. Chrom. A* 1066: 9 - 18.

Bashour I., Sayegh A., (2007.). *Methods of analysis for soils of arid and semi - arid regions*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.

Berset J. D., Ejem M., Holzer R., Lischer P., (1999). Comparison of different drying, extraction and detection techniques for the determination of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in background contaminated soil samples. *Anal. Chim. Acta* 383: 263 - 275.

Blakely J. K., Neher D. A., Spongberg A. L., (2002). Soil invertebrate and microbial communities, and decomposition as indicators of polycyclic aromatic hydrocarbon contamination. *Appl. Soil Ecol.* 21: 71 - 88.

Boström C. E., Gerde P., Hanberg A., Jernström B., Johansson C., Kyrklund T., Rannug A., Törnqvist M., Victorin K., Westerholm R., (2002). Cancer risk assessment, indicators, and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air. *Environ. Health Perspect.* 110: 451 - 488.

Brändli R. C., Bucheli T. D., Ammann S., Desaulles A., Keller A., Blum F., Stahel W. A., (2008). Critical evaluation of PAH source apportionment tools using data from the Swiss soil monitoring network. *J. Environ. Monitor.* 10: 1278 - 1286.

Brenner R. C., Magar V. S., Ickes J. A., Abbott J. E., Stout S. A., Crecelius E. A., Bingler L. S., (2002). Characterization and fate of PAH-contaminated sediments at the Wyckoff/Eagle Harbor Superfund Site. *Environ. Sci. Technol.* 36: 2605 - 2613.

Brümmer G., Herms U., (1983). Influence of soil reaction and organic matter on the solubility of heavy metals in soils. In: Ulrich B. (Ed.) *Effects of accumulation of air pollutants in forest ecosystems*. Reidel Publishing Company. Dordrecht, Netherlands. pp: 233 - 243.

Budzinski H., Jones I., Bellocq J., Piérard C., Garrigues P., (1997). Evaluation of sediment contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons in the Gironde estuary. *Mar. Chem.* 58: 85 - 97.



Bustamante-Rangel M., Delgado-Zamarreño M.M., Pérez-Martín L., Carabias-Martínez R., (2013). QuEChERS method for the extraction of isoflavones from soy-based foods before determination by capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry, *Microchem. J.* 108: 203 - 209.

Camel V., (2001). Recent extraction techniques for solid matrices-supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave assisted extraction: their potential and pitfalls. *Analyst* 126: 1182 - 1193.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC), (2005). Third National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals. Atlanta, Georgia, USA.

Charles O. N., Gauthreaux K., Sneddon J., Beck J. N., (1998). Determination of semivolatile organic compounds by gas chromatography-mass spectrometry in reclaimed marsh sediments in southwest Louisiana. *Microchem. J.* 60: 167 - 174.

Chen J., Mullin C. A., (2013). Quantitative determination of trisiloxane surfactants in beehive environments based on liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Environ. Sci. Technol.* 47: 9317 - 9323.

Christensen J. M., (1995). Human exposure to toxic metals: factors influencing interpretation of biomonitoring results. *Sci. Total Environ.* 166: 89 - 135

Cincinelli A., Del Bubba M., Martellini T., Gambaro A., Lepri L., (2007). Gas-particle concentration and distribution of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in the atmosphere of Prato (Italy). *Chemosphere* 68: 472 - 478.

Cvetkovic J., Mitic V., Stankov Jovanovic V., Dimitrijevic M., Petrovic G., Nikolic Mandic S., Stojanovic G., (2016). Optimization of the QuEChERS extraction procedure for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by gas chromatography-mass spectrometry *Anal. Methods* 8: 1711 - 1720.

Dasgupta P. S., Lahiri T., (1992). Alteration of brain catecholamines during growth of benzo[a]pyrene induced murine fibrosarcoma. *Neoplasms*. 39: 163 - 165.

De La Torre-Roche R. J., Lee W.-Y., Campos-Díaz S. I., (2009). Soil-borne polycyclic aromatic hydrocarbons in El Paso, Texas: analysis of a potential problem in the United States/Mexico border region. *J. Hazard. Mater.* 163: 946 - 958.



den Boef G., Hulanicki A., (1983). Recommendations for the usage of selective, selectivity and related terms in analytical chemistry. *Pure Appl. Chem.* 55: 553 - 556.

Disdier B., Arfi C., Pastor J., Pauli A. M., Portugal H., (1999). Analysis by GC-MS of monocyclic and polycyclic aromatic hydrocarbons in thermolysed waste products. *Analisis*, 27: 235 - 241.

Dybing E., Schwarze P. E., Nafstad P., Victorin K., Penning T. M., (2013). Polycyclic aromatic hydrocarbons in ambient air and cancer. In: Straif K., Cohen A., Samet J. (Eds.), *Air Pollution and Cancer*. IARC Scientific Publications, vol. 161 (Chap. 7).

Enell A., Reichenberg F., Ewald G., Warfvinge P., (2005). Desorption kinetics studies on PAH-contaminated soil under varying temperatures. *Chemosphere* 61: 1529 - 1538.

Environment agency (EA), (2003). The determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by dichloromethane extraction using gas chromatography with mass spectrometric detection, Bristol, England.

Environmental Protection Agency (EPA), (1996). Test Method 3611B, Alumina Column Cleanup and Separation of Petroleum Wastes, U.S. Government Printing Office, Washington, USA.

Ehrenhauser F. S., (2015). PAH and IUPAC Nomenclature. *Polycycl. Aromat. Compd.* 35: 161 - 176.

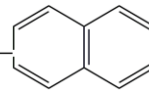
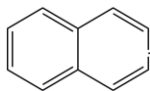
Engh K. R., (1993). In: Howe Grant M. (Ed.), *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, Wiley, New York, USA, 108.

Escarrone A. L. V., Caldas S. S., Furlong E. B., Meneghetti V. L., Fagundes C. A. A., Arias J. L. O., Primel E. G., (2014). Polycyclic aromatic hydrocarbons in rice grain dried by different processes: evaluation of a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction method. *Food Chem.* 146: 597 - 602.

EURACHEM/WELEC, (1993). Accreditation for chemical laboratories: Guidance on the interpretation of the EN 45000 series of standards and ISO Guide 25. Laboratory of the Government Chemist, Teddington, United Kingdom.

European commission (EC), (2006). *Soil - The story behind the strategy*, Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities.

Farhadian A., Jinap S., Abas F., Sakar I. Z., (2010). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in grilled meat. *Food Control* 21: 606 - 610.



Fasnacht P. M., Blough N. V., (2003). Mechanisms of the Aqueous Photodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Environ. Sci. Technol.* 37: 5767 - 5772.

Forsberg N. D., Wilson G. R., Anderson K. A., (2011). Determination of parent and substituted polycyclic aromatic hydrocarbons in high-fat salmon using a modified QuEChERS extraction, dispersive SPE and GC MS. *J. Agric. Food Chem.* 59: 8108 - 8116.

Frank V., Tölgyessy J., (1993). The Chemistry of Soil In J. Tölgyessy (Ed.) *Chemistry and Biology of Water, Air and Soil*, Elsevier Science, New York, USA, pp: 621 - 697.

Fu P. P., Xia Q., Sun X., Yu H., (2012). Phototoxicity and environmental transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-light-induced reactive oxygen species, lipid peroxidation, and DNA damage. *J. Environ. Sci. Health C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* 30: 1 - 41.

Ghosal D., Ghosh S., Dutta T. K., Ahn Y., (2016). Current State of Knowledge in Microbial Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A Review. *Front. Microbiol.* 31: 1 - 27.

Glatt H. R., Oesch F., (1987). Species differences in enzymes controlling reactive epoxides. *Arch. Toxicol.* 10: 111 - 124.

González-Curbelo M. Á., Socas-Rodríguez B., Herrera-Herrera A. V., González-Sálamo J., Hernández-Borges J., Rodríguez-Delgado M. Á., (2015). Evolution and applications of the QuEChERS method. *Trends Anal. Chem.* 71: 169 - 185.

González-Curbelo M.Á., Herrera-Herrera A.V., Ravelo-Pérez L.M., Hernández-Borges J., (2012). Sample-preparation methods for pesticide-residue analysis in cereals and derivatives. *Trends Anal. Chem.* 38: 32 - 51.

Ground-Water Remediation Technologies Analysis Center (GWRTAC), (1997). Remediation of metals-contaminated soils and groundwater. Pittsburgh, Pennsylvania, USA.

Grubeša D., (2014). Metode uzorkovanja tla i biljke, Poljoprivredni Fakultet u Osijeku.

Gubler A., Wächter D., Blum F., Bucheli T. D., (2015). Remarkably constant PAH concentrations in Swiss soils over the last 30 years. *Environ. Sci.: Processes Impacts* 17: 1816 - 1828.

Guerin T. F., (1999). The extraction of aged polycyclic aromatic hydrocarbon(PAHS) residues from a clay soil using sonication and a Soxhlet procedure : A comparative study, *J. Environ. Monit.* 1: 63 - 67.



Gupta P., Banerjee D. K., Bhargava S. K., Kaul R., Shanker V. R., (1991). Prevalence of impaired lung function in rubber manufacturing factory workers exposed to benzo[a]pyrene and respirable particulate matter. *Indoor Environ.* 2: 26 - 31.

Gustafsson Ö., Haghseta F., Chan C., Macfarlane J., Gschwend P.M., (1997). Quantification of the dilute sedimentary soot phase: implications for PAH speciation and bioavailability. *Environ. Sci. Technol.* 31: 203 - 209.

Hair J. F., Black W. C., Babin B. J., Anderson R. E., (2010). *Multivariate Data Analysis-A Global Perspective*. Pearson Education, Upper Saddle River New Jersey, USA.

Hajizadeh Y., Onwudili J. A., Williams P. T., (2011). PCDD/F Formation from oxy-PAH Precursors in Waste Incinerator Flyash. *Chemosphere* 85: 1672 - 1681.

Hand D., (2009) President of the Royal Statistical Society (RSS), RSS Conference Presentation.

Hans-Holger L., Alexander M., (2002). Butanol extraction to predict bioavailability of PAHs in soil. *Chemosphere* 46: 1011 - 1017.

Hartmann C., Smeyers-Verbeke J., Massart D. L., McDowall R. D., (1998). Validation of bioanalytical chromatographic methods. *J. Pharmaceut. Biomed.* 17: 193 - 218.

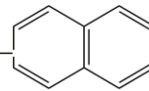
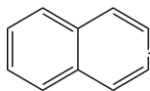
Hawkes H. E., Webb, J.S., (1962). *Geochemistry in Mineral Exploration*, Harper and Row Publishers, New York, USA.

Hawthorne S. B., Grabanski C. B., Martin E., Miller D. J., (2000). Comparisons of Soxlet extraction, pressurized liquid extraction, supercritical fluid extraction and subcritical water extraction for environmental solids: recovery, selectivity and effects on sample matrix. *J. Chrom. A* 892: 421 - 433.

Haynes B. S., (1991). Soot and hydrocarbons in combustion. In: Bartock W., Sarofim A.F. (Eds.) *Fossil Fuel Combustion: a Source Book*. Wiley, New York, USA, pp. 261 - 326.

Holoubek I., Paasivirta J., Maatela P., Lahtiperä M., Holoubková I., Korínek P., Boháček Z., Čáslavský J., (1990). Comparison of extraction methods for polycyclic aromatic hydrocarbon determination in sediments. *Toxicol. Environ. Chem.* 25: 137 - 154.

Höner A., (2001). Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) metabolites. In W. Kleiböhmer (Ed.) *Environmental Analysis*. Elsevier, New York, USA. pp: 9 - 121.



Hotelling H., (1933). Analysis of a complex of statistical variables into principal components. *J. Edu. Psychol.* 24: 417 - 441.

[https://www.itrcweb.org/ism1/A\\_6\\_6\\_Sampling\\_Patterns.html](https://www.itrcweb.org/ism1/A_6_6_Sampling_Patterns.html)

<https://hrsl.ba.ars.usda.gov/sgp99/chap9.htm>

<http://engineeringtraining.tpub.com/14069/css/Soil-Testing-531.htm>

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.027>

<https://www.degruyter.com/view/j/chem.2015.13.issue-1/chem-2015-0109/chem-2015-0109.xml>

[https://www.researchgate.net/publication/236146377\\_Chromatography\\_in\\_Bioactivity\\_Analysis\\_of\\_Compounds/figures?lo=1](https://www.researchgate.net/publication/236146377_Chromatography_in_Bioactivity_Analysis_of_Compounds/figures?lo=1)

[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gas\\_chromatograph.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gas_chromatograph.png)

<https://www.tehnologijahrane.com/enciklopedija/maseni-spektrometar>

Hwang H.-M., Wade T. L., Sericano J. L., (2003). Concentrations and source characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons in pine needles from Korea, Mexico, and United States. *Atmos. Environ.* 37: 2259 - 2267.

Hwang S., Cutright T. J., (2003). Effect of expandable clays and cometabolism on PAH biodegradability. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 10: 277 - 280.

Hwang S., Ramirez N., Cutright T. J., Ju L. K., (2003). The role of soil properties in pyrene sorption and desorption. *Water Air Soil Pollut.* 143: 65 - 80.

Impellitteri C. A., Lu Y., Saxe J. K., Allen H. E., Peijnenburg W. J. G. M., (2002). Correlation of the partitioning of dissolved organic matter fractions with the desorption of Cd, Cu, Ni, Pb and Zn from 18 Dutch soils. *Environ. Int.* 28: 401 - 410.

Institut Za Ratarstvo i Povrtarstvo, (2008). Program praćenja kvaliteta poljoprivrednog i nepoljoprivrednog zemljišta na teritoriji Grada Novog Sada.

International Agency for Research on Cancer (IARC), (1983). Polynuclear aromatic compounds, Part 1. Chemical, environmental and experimental data.

International Agency for Research on Cancer (IARC), (2010). Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans.



International Conference on Harmonization. Guideline for Industry (ICH), (1995). Q2A: Text on Validation of Analytical Procedures. ICH, 1995.

International Organization for Standardization (ISO), (2004). International Vocabulary of basic and General Terms in Metrology (VIM).

Iqbal J., Metosh Dickey C., Portier R., (2007). Temperature effects on bioremediation of PAHs and PCP contaminated South Louisiana Soils: a laboratory mesocosm study. *J. Soils Sediments* 7: 153 - 158.

Jeong D., Ziemkiewicz C., Ribarsky W., Chang R., (2009). Understanding Principal Component Analysis Using a Visual Analytics Tool. Charlotte, North Carolina, USA.

Jia W., Ling Y., Lin Y., Chang J., Chu X., (2014). Analysis of additives in dairy products by liquid chromatography coupled to quadrupole-orbitrap mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1336: 67 - 75.

Johnsen A., Karlson U., (2007). Diffuse PAH contamination of surface soils: environmental occurrence bioavailability, and microbial degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76: 533 - 543.

Juhani K., Kettunen J., Hartonen K., Marja-Lissa R., (2004). Pressurised hot water extraction of n-Alkanes and PAHs in soil and sediment from the oil shale industry district in Estonia. *J. Soils Sediments* 4: 1 - 8.

Kabata-Pendias A., Pendias H., (2001). Trace Metals in Soils and Plants. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.

Kaiser H.F., (1960). The Application of Electronic Computers to Factor Analysis. *Educ. Psychol. Measur.* 20:141 - 151.

Kao T. H., Chen S., Huang C. W., Chen C. J., Chen B. H., (2014). Occurrence and exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in kindling-free-charcoal grilled meat products in Taiwan. *Food Chem. Toxicol.* 71: 149 - 158.

Karavalakis G., Boutsika V., Stournas S., Bakeas E., (2011). Biodiesel Emissions Profile in Modern Diesel Vehicles. Part 2: Effect of Biodiesel Origin on Carbonyl, PAH, Nitro-PAH and Oxy-PAH Emissions. *Sci. Total Environ.* 409: 738 - 747.





Katsoyiannis A., Terzi E., Cai Q.-Y., (2007). On the use of PAH molecular diagnostic ratios in sewage sludge for the understanding of the PAH sources. Is this use appropriate? *Chemosphere* 69: 1337 - 1339.

Keith L. H., Telliard W. A., (1979). Priority Pollutants: I-a Perspective View. *Environ. Sci. Technol.* 13: 416 - 423.

Kendall M. G., Stuart A., (1943). *The Advanced Theory of Statistics*. Charles Griffin & Company, London United Kingdom.

Kenny D. V., Olesik S. V., (1998). Extraction of Lignite Coal Fly Ash for Polynuclear Aromatic Hydrocarbons: Modified and Unmodified Supercritical Fluid Extraction, Enhanced-Fluidity Solvents, and Accelerated Solvent Extraction. *J. Chrom. Sci.* 36: 59 - 65.

Khan Z., Troquet J., Vachelard C., (2005). Sample preparation and analytical techniques for determination of polyaromatic hydrocarbons in soils. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 2: 275 - 286.

Kicinski H. G., Adamek S., Kettrup A., (1989). Trace enrichment and HPLC analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental samples, using solid phase extraction in connection with UV/VIS diode-array and fluorescence detection. *Chromatographia* 28: 203 - 208.

Kirpichtchikova T. A., Manceau A., Spadini L., Panfili F., Marcus M. A., Jacquet T., (2006). Speciation and solubility of heavy metals in contaminated soil using X-ray microfluorescence, EXAFS spectroscopy, chemical extraction, and thermodynamic modeling. *Geochim. Cosmochim. Acta* 70: 2163 - 2190.

Koesukwiwat U., Sanguankaew K., Leepipatpiboon N., (2014). Evaluation of a modified QuEChERS method for analysis of mycotoxins in rice. *Food Chem.* 153: 44 - 51.

Kootstra P. R., Straub M. H. C., Stil G. H., van der Velde E. G., Hesselink W., Land C. C. J., (1995). Solid-phase extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil samples. *J. Chrom. A* 697: 123 - 129.

Kristensen P., Eilertsen E., Einarsdottir E., Haugen A., Skaug V., Ovrebo S., (1995). Fertility in mice after prenatal exposure to benzo[a]pyrene and inorganic lead. *Environ. Health Perspect.* 103: 588 - 590.

Kromidas S., (2006). *HPLC Made to Measure, A Practical Handbook for Optimization*, Wiley WCH, Weinheim, Germany.



Labana S., Kapur M., Malik D. K., Prakash D., Jain R., (2007). Diversity, biodegradation and bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. In Singh S.N., Tripathi R.D. (Eds) Environmental Bioremediation Technologies. Springer, Berlin, Germany, pp: 409 - 443.

Lau E. V., Gan S., Ng H. K., Extraction techniques for polycyclic aromatic hydrocarbons in soils. Int. J. Anal. Chem. 2010: 1 - 9.

Lee B. K., Vu V. T., (2010). Sources, distribution and toxicity of polyaromatic hydrocarbons (PAHs) in particulate matter. In Villanyi V. (Ed.) Air Pollution. Sciyo, Shanghai, China.

Lee M. L., Novotny M. V., Bartle K. D., (1981). Analytical Chemistry of Polycyclic Aromatic Compounds. Academic Press, New York, USA.

Letellier M., Budzinski H., (1999). Microwave assisted extraction of organic compounds. Analisis 27: 259 - 271.

Lindhardt B., Holst H., Christensen T. H., (1997). Comparison of soxhlet and shake extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from coal tar polluted soils sampled in the field. Int. J. Environ. Anal. Chem. 69: 2171.

Liu Y., Han S., Lu M., Wang P., Han J., Wang J., (2014). Modified QuEChERS method combined with ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for the simultaneous determination of 26 mycotoxins in sesame butter. J. Chromatogr. B 970: 68 - 76.

Lohmann R., Corrigan B. P., Howsam M., Jones K. C., Ockenden W. A., (2001). Further developments in the use of semipermeable membrane devices (SPDMs) as passive air samplers for persistent organic pollutants: field application in a spatial survey of PCDD/Fs and PAHs, Environ. Sci. Technol. 35: 2576 - 2582.

Lombardo-Agüí M., Gámiz-Gracia L., Cruces-Blanco C., García-Campaña A. M., (2011). Comparison of different sample treatments for the analysis of quinolones in milk by capillary-liquid chromatography with laser induced fluorescence detection. J. Chromatogr. A 1218: 4966 - 4971.

Lopez-Avila V., Benedicto J. and Bauer K. M., (1998). Stability of organochlorine and organophosphorous pesticides when extracted from solid matrixes with microwave energy. J. AOAC. Int. 81: 1224 - 1232.

Lundstedt S., (2003). Analysis of PAHs and their transformation products in contaminated soil and remedial processes. Umeå University, Sweden.



Ma Y., Hashi Y., Ji F., Li J. M., (2010). Determination of phthalates in fruit jellies by dispersive SPE coupled with HPLC-MS. *J. Sep. Sci.* 33: 251 - 257.

Mac Kay D., Shiu W. Y., Ma K. C., (1992). *Illustrated Handbook of Physical–Chemical Properties and Environmental Fate for Organic*. Lewis, Boca Raton, Florida, USA, pp. 246 - 252.

Madureira T.V., Velhote S., Santos C., Cruzeiro C., Rocha E., Rocha M.J., (2014). A step forward using QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe) based extraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry – levels of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in wild and commercial mussels. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 21: 6089 - 6098.

Mahler J., Van Metre P. C., Foreman W. T., (2014). Concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and azaarenes in runoff from coal-tar- and asphalt-sealcoated pavement. *Environ. Pollut.* 188: 81 - 87.

Manahan S. E., (2010). *Environmental Chemistry*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.

Manahan S., (2002). *Toxicological Chemistry and Biochemistry*, Third Edition, CRC Press, Boca Raton, Florida, United States.

Manzetti S., (2013). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Environment: Environmental Fate and Transformation. *Polycyclic Aromat. Compd.* 33: 311 - 330.

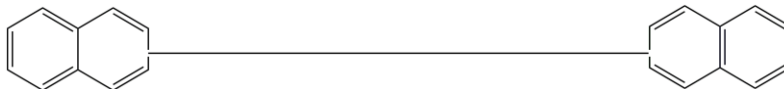
Martínez C. E., Motto H. L., (2000). Solubility of lead, zinc and copper added to mineral soils. *Environ Pollut.* 107: 153 - 158.

Martínez-Villalba A., Moyano E., Galcerán M.T., (2013). Ultra-high performance liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization–tandem mass spectrometry for the analysis of benzimidazole compounds in milk samples. *J. Chromatogr. A* 1313: 119 - 131.

Maslin P., Maier R. M., (2000). Rhamnolipid-enhanced mineralization of phenanthrene in organic-metal co-contaminated soils. *Bioremediat. J.* 4: 295 - 308.

Menzie C. A., Potocki B. B., Santodonato J., (1992). Exposure to carcinogenic PAHs in environment. *Environ. Sci. Tech.* 26: 1278 - 1284.

Miège C., Dugay J., Hennion M.-C., (1998). Optimization and validation of solvent and supercritical-fluid extractions for the trace-determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludges by liquid chromatography coupled to diode-array and fluorescence detection. *J. Chrom. A* 823: 219 - 230.



Miller J. N., Miller J. C., (2000). *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry* Prentice-Hall, Harlow, United Kingdom.

Miller M. L., Vasunia K., Talaska G., Andringa A., de Boer J., Dixon K., (2000). The tumor promoter TPA enhances benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene diolepoxide mutagenesis in Big Blue mouse skin. *Environ. Mol. Mutagen.* 35: 19 - 27.

Ministarstvo zaštite životne sredine, (2010). Uredba o programu sistemskog praćenja kvaliteta zemljišta, indikatorima za ocenu rizika od degradacije zemljišta i metodologiji za izradu remedijacionih programa, ("Sl. glasnik RS", br. 88/2010).

Moretto L.M., Silvestri S., Ugo P., Zorzi G., Abbondanzi F., Baiocchi C., Iacondini A., (2005). Polycyclic aromatic hydrocarbons degradation by composting in a soot-contaminated alkaline soil. *J. Hazard. Mater.* 126: 141–148.

Morillo E., Romero A. S., Maqueda C., Madrid L., Ajmone-Marsan F., Grcman H., Davidson C. M., Hursthouse A. S., Villaverde J., (2007). Soil pollution by PAHs in urban soils: a comparison of three European cities. *J. Environ. Monit.* 9: 1001 - 1008.

Mostert M.M.R., Ayoko G.A., Kokot S., (2010). Application of chemometrics to analysis of soil pollutants. *Trends Anal. Chem.* 29: 430 - 435.

Nagpal N. K., (1993), *Ambient Water Quality Criteria For Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)*. Ministry of Environment, Lands and Parks Province of British Columbia, Canada.

Nakagawa R., Kitamori S., Horikawa K., Nakashima K., Tokiwa H., (1983). Identification of Dinitropyrenes in Diesel-Exhaust Particles. Their Probable Presence as the Major Mutagens. *Mutat. Res.* 124: 201 - 211.

Naučni institut za ratarstvo i povrtarstvo Novi Sad, (2006). Kontrola kvaliteta životne sredine na teritoriji AP Vojvodine - zemljište industrijskih zona - broj: 08-100/526 27.02.2006.

Neff J.M., (1979). *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment: Sources, Fates and Biological Effects*. Applied Science Publishers Ltd., Essex, England, pp. 1 - 262.

Nollet L., (2005). *Chromatographic Analysis of the Environment*. CRC Press; Boca Raton, Florida, USA.



Notar M., Leskovšek H., Faganeli J., (2001). Composition, distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments of the Gulf of Trieste, Northern Adriatic Sea. *Mar. Pollut. Bull.* 42: 36 - 44.

Omar M. M. A., Ibrahim W. A. W., Elbashir A. A., (2014). Sol-gel hybrid methyltrimethoxysilane-tetraethoxysilane as a new dispersive solid-phase extraction material for acrylamide determination in food with direct gas chromatography-mass spectrometry analysis. *Food Chem.* 158: 302 - 309.

Osman R., Saim N., (2013). Selective Extraction of Organic Contaminants from Soil Using Pressurised Liquid Extraction. *J. Chem.* 2013: 1 - 8.

Otto M., (1999). *Chemometrics Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry.* Wiley-VCH, Weinheim, Germany.

Ouyang G., Pawliszyn J., (2006). Recent developments in SPME for on-site analysis and monitoring. *Trends Anal. Chem.* 25: 692 - 703.

Pena M. T., Casais M. C., Mejuto M. C., Cela R., (2007). Optimization of the matrix solid-phase dispersion sample preparation procedure for analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils: comparison with microwave-assisted extraction. *J. Chrom. A* 1165: 32 - 38.

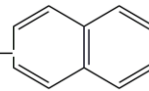
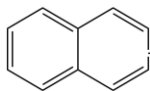
Peters F. T., Drummer O. H., Musshoff F., (2007). Validation of new methods. *Forensic Sci. Int.* 165: 216 - 224.

Pies C., Hoffmann B., Petrowsky J., Yang Y., Ternes T. A., Hofmann T., (2008). Characterization and source identification of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in river bank soils. *Chemosphere* 72: 1594 - 1601.

Popp P., Keil P., Moder M., Paschke A., Thuss U., (1997). Application of accelerated solvent extraction followed by gas chromatography, high-performance liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons, chlorinated pesticides and polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in solid wastes. *J. Chrom. A* 774: 203 - 211.

Popp W., (1997). DNA single strand breakage, DNA adducts, and sister chromatid exchange in lymphocytes and phenanthrene and pyrene metabolites in urine of coke oven workers. *Occup. Environ. Med.* 54:176 - 183.

## Literatura



- Premovic Dj., (2005). Primena Ishikawa metode u cilju unapređenja kvaliteta. 32. nacionalna konferencija o kvalitetu, Kragujevac, Srbija.
- Prycek J., Ciganek M., Simek Z., (2004). Development of an analytical method for polycyclic aromatic hydrocarbons and their derivatives. *J. Chromatogr. A* 1030: 103 – 107.
- Pysh E. S., Yang N. C., (1963). Polarographic Oxidation Potentials of Aromatic Compounds, *J. Am. Chem. Soc.* 85: 2124 - 2130.
- Ramalhosa M. J., Paíga P., Morais S., Delerue-Matos C., Oliveira M. B. P. P., (2009). Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in fish: evaluation of a quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe extraction method. *J. Sep. Sci.* 32: 3529 - 3538.
- Randall E. L., (1974). Improved method for fat and oil analysis by a new process of extraction. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 57: 1165 - 1168.
- Ravindra K., Sokhi R., Grieken R. V., (2008). Atmospheric Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Source Attribution, Emission Factors and Regulation. *Atmos. Environ.* 42: 2895 - 2921.
- Ravindra K., Wauters E., Van Grieken R., (2008b). Variation in particulate PAHs levels and their relation with the transboundary movement of the air masses. *Sci. Total Environ.* 396: 100 - 110.
- Richter B. E., Ezzell J. L., Felix D., Roberts K. A., Later D. W., (1995). An Accelerated Solvent Extraction System for the Rapid Preparation of Environmental Organic Compounds in Soil. *Am. Lab.* 27: 24 - 28.
- Rieuwerts J. S., Thornton I., Farago M. E., Ashmore M. R., (1998). Factors influencing metal bioavailability in soils: preliminary investigations for the development of a critical loads approach for metals. *Chem. Speciation Bioavailability* 10: 61 - 75.
- Rodríguez-Carrasco Y., Font G., Moltó J. C., Berrada H., (2014). Quantitative determination of trichothecenes in breadsticks by gas chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry. *Food Addit. Contam. Part A. Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* 31: 1422 - 1430.
- Rogatsky E., Stein D., (2005). Evaluation of Matrix Effect and Chromatography Efficiency: New Parameters for Validation of Method Development, American Society for Mass Spectrometry, Elsevier, New York.



Sadowska-Rociak A., Surma M., Cieslik E., (2014). Comparison of different modifications on QuEChERS sample preparation method for PAHs determination in black, green, red and white tea. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21: 1326 - 1338.

Saim N., Dean J. R., Abdullah M. P., Zakaria Z., (1998). An Experimental Design Approach for the Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Highly Contaminated Soil Using Accelerated Solvent Extraction. *Anal. Chem.* 70: 420 - 424.

Santella R. M., Hemminki K., Tang D.-L., Paik M., Ottman R., Young T. L., Savela K., Vodickova L., Dickey C., Whyatt R., (1993). Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in white blood cells and urinary 1-hydroxypyrene in foundry workers. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2: 59 - 62.

Sapozhnikova Y., Lehotay S. J., (2013). Multi-class, multiresidue analysis of pesticides, polychlorinated biphenyls, polycyclic aromatic hydrocarbons, PBDEs and novel flame retardants in fish using fast, low-pressure gas chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 758: 80 - 92.

Schumacher B., (2002). Methods for the determination of total organic carbon (toc) in soils and sediments.

Scragg A., (2005). *Environmental Biotechnology*. Oxford University Press; Oxford, United Kingdom.

Sekulic Z., Dakovic A., Kragovic M., Markovic M., Ivosevic B., Kolonja B., (2013). Quality of zeolit from Vranjska banja deposit according to size classes. *Hem. Ind.* 67: 663 - 669.

Serpe F. P., Esposito M., Gallo P., Serpe L., (2010). Optimisation and validation of an HPLC method for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mussels. *Food Chem.* 122: 920 - 925.

Shacklette H. T., Boerngen J. G., (1984). *Element Concentrations in Soils and Other Surficial Materials of the Conterminous United States*. U.S. Geological Survey Professional Paper, Washington DC, USA.

Shen H., Tao S., Wang R., Wang B., Shen G., Li W., Su S., Huang Y., Wang X., Liu W., Li B., Sun K., (2011). Global time trends in PAH emissions from motor vehicles. *Atmos. Environ.* 45: 2067 - 2073.



Shu Y. Y., Lai T. L., (2001). Effect of moisture on the extraction efficiency of polycyclic aromatic hydrocarbons from soils under atmospheric pressure by focused microwave-assisted extraction. *J. Chrom. A* 927: 131 - 141.

Shu Y. Y., Lao R. C., Chiu C. H., Turle R., (2000). Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediment reference materials by microwave-assisted extraction. *Chemosphere* 41: 1709 - 1716.

Skupinska K., Misiewicz I., Kasprzycka-Guttman, T., (2004). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Physicochemical Properties, Environmental Appearance and Impact on Living Organisms. *Acta Pol. Pharm.* 61: 233 - 240.

Smith K. E. C., Northcott G. L., Jones K. C., (2006). Influence of the extraction methodology on the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in pasture vegetation. *J. Chrom. A* 1116: 20 - 30.

Smoker M., Tran K., Smith R. E., (2010). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in shrimp. *J. Agric. Food Chem.* 58: 12101 - 12104.

Soderland P., Lovekar S., Weiner D. E., Brooks D. R., Kaufman J. S., (2010). Chronic kidney disease associated with environmental toxins and exposures. *Adv. Chronic Kidney Dis.* 17: 254 - 264.

Sporring S., Bøwadt S., Svensmark B., Björklund E., (2005). Comprehensive comparison of classic Soxhlet extraction with Soxtec extraction, ultrasonication extraction, supercritical fluid extraction, microwave assisted extraction and accelerated solvent extraction for the determination of polychlorinated biphenyls in soil. *J. Chrom. A* 1090: 1 - 9.

Sposito G., (2008). *The Chemistry of Soils*. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom.

Stankov-Jovanovic V., Mitic V., Cvetkovic J., Ilic M., Ciric S., Nikolic-Mandic S., Stojanovic G., (2015). Inovativni pristup pripremi uzoraka iz životne sredine za određivanje policikličnih aromatičnih ugljovodonika metodom GC-MS korišćenjem novih sorbenasa u QuEChERS tehnici. *Saf. Eng.* 5:1 - 7.

Sun F., Littlejohn D., Gibson M. D., (1998). Ultrasonication extraction and solid phase extraction clean-up for determination of US EPA 16 priority pollutant polycyclic aromatic hydrocarbons in soils by reversed-phase liquid chromatography with ultraviolet absorption detection. *Anal. Chim. Acta* 364: 1 - 11.





Surh Y. J., Shlyankevich M., Lee J. W., Yoo J. K., (1996). Inhibition of covalent DNA binding and mutagenicity of benzo[a]pyrene by isopropyl-2-(1,3-dithietane-2-ylidene)-2-[N-(4-methylthiazol-2-yl) carbamoyl]acetate (YH439), a novel hepatoprotective agent. *Mut. Res.* 367: 233 - 240.

Surma M., Sadowska-Rociek A., Cieslik E., (2014). The application of d-SPE in the QuEChERS method for the determination of PAHs in food of animal origin with GC-MS detection. *Eur. Food Res. Technol.* 238: 1029 - 1036.

Swartz M. E., Krull I. S., (1997). *Analytical method development and validation*, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.

Szczeklik A., Szczeklik J., Galuszcka Z., Musial J., Kolarzyk E., Tarqosz D., (1994). Humoral immunosuppression in men exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons and related carcinogens in polluted environments. *Environ. Health Perspect.* 102: 302 - 304.

Tarantini A., Maitre A., Lefebvre E., Marques M., Marie C., Ravanat J. L., Douki T., (2009). Relative contribution of DNA strand breaks and DNA adducts to the genotoxicity of benzo[a]pyrene as a pure compound and in complex mixtures. *Mutat. Res.* 671: 67 - 75.

Teranishi K., Kokichi H., Watanabe, H., (1975). Quantitative relationship between carcinogenicity and mutagenicity of polyaromatic hydrocarbons in *Salmonella typh. mutant*. *Mutat. Res.* 31: 97 - 102.

The Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), (2013). Draft guidance document on single laboratory validation of quantitative analytical methods in support of pre- and postregistration data requirements for plant protection and biocidal products.

The United States Department of Health and Human Services (USDHHS), (1999). Toxicological profile for lead. United States Department of Health and Human Services, Atlanta, Georgia, USA.

Thompson M., Ellison S. L., Wood R., (2002). Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). *Pure App. Chem.* 74: 835 - 855.

United States Department of Agriculture (USDA), (1993). Soil Survey Division Staff. Soil survey manual. Soil Conservation Service. U.S. Department of Agriculture Handbook.

Vaclavik L., Zachariasova M., Hrbek V., Hajslova J., (2010). Analysis of multiple mycotoxins in cereals under ambient conditions using direct analysis in real time (DART) ionization coupled to high resolution mass spectrometry. *Talanta* 82: 1950 - 1957.



Vane C. H., Kim A. W., Beriro D. J., Cave M. R., Knights K., Moss-Hayes V., Nathanail P. C., (2014). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and polychlorinated biphenyls (PCB) in urban soils of Greater London, UK. *Appl. Geochem.* 51: 303 - 314.

Vasilkonov E. S., Zavgorodnyaya Yu. A., Demin V. V., Trofimov S. Ya., (2008). Interaction of naphthalene and naphthol with organic matrix of soils. *Moscow Univ. Soil Sci. Bull.* 1: 19 - 24.

Vulliet E., Berloiz-Barbier A., Lafay F., Baudot R., Wiest L., Vauchez A., Lestremau F., Botta F., Cren-Olivé C., (2014). A national reconnaissance for selected organic micropollutants in sediments on French territory. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 21: 11370 - 11379.

Wang W., Meng B., Lu X., Liu Y., Tao S., (2007). Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides from soils: a comparison between Soxlet extraction, microwave-assisted extraction and accelerated solvent extraction techniques. *Anal. Chim. Acta* 602: 211 - 222.

Wassenberg D.M., Di Giulio R.T., (2004). Synergistic embryotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbon aryl hydrocarbon receptor agonists with cytochrome P4501A inhibitors in *Fundulus heteroclitus*. *Environ. Health Perspect.* 112: 1658 - 1664.

Watts A., Ballesteros T., Gardner K., (2008). Soil and atmospheric inputs to PAH concentrations in salt marsh plants. *Water Air Soil. Pollut.* 189: 253 - 263.

Weekes V., Brusick D. (1975). In vitro metabolic activation of chemical mutagens. II. The relationships among mutagen formation, metabolism and carcinogenicity for dimethylnitrosamine and diethylnitrosamine in the livers, kidneys and lungs of Balb/Cj, C57Bj6j, and RF/J mice. *Mutat. Res.* 31: 175 - 183.

Whitehead D. C., Tinsley J., (1963). The biochemistry of humus formation. *J. Sci. Food Ag.* 14: 849 - 857.

Wilke W., (2000). Synopsis, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soil - a review. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 163: 229 - 248.

World Health Organization (WHO), (2003). Polynuclear aromatic hydrocarbons in drinking-water. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality.

Yamada T. M., Souza D. A., Morais C. R., Mozeto A. A., (2009). Validation of a Method for the Analysis of PAHs in Bulk Lake Sediments Using GC-MS. *J. Chrom. Sci.* 47: 794 - 799.



Yang H., Mazur-Melnyk M., de Boer J. G., Glickman B.W., (1999). A comparison of mutational specificity of mutations induced by S9-activated B[a]P and benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide at the endogenous aprt gene in CHO cells. *Mutat. Res.* 423: 23 - 32.

Yoo M., Lee S., Kim S., Kim S., Seo H., Shin D., (2014). A comparative study of the analytical methods for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in seafood by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Int. J. Food Sci. Technol.* 49: 1480 - 1489.

Yunker M. B., Macdonald R. W., Vingarzan R., Mitchell R. H., Goyette D., Sylvestre S., (2002). PAHs in the Fraser River basin: a critical appraisal of PAH ratios as indicators of PAH source and composition. *Organic Geochem.* 33: 489 - 515.

Zelinkova Z., Wenzl T., (2015). The Occurrence of 16 EPA PAHs in Food - A Review. *Polycyclic Aromat. Compd.* 35: 248 - 284.

Zhang W., Zhang S., Wan C., Yue D., Ye Y., Wang X., (2008). Source diagnostics of polycyclic aromatic hydrocarbons in urban road runoff, dust, rain and canopy throughfall. *Environ. Pollut.* 153: 594 - 601.

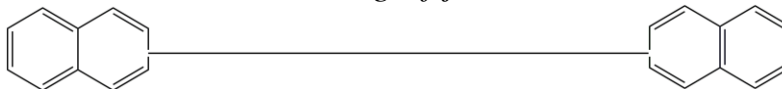
Zhao X. L., (1990). Effects of benzo[a]pyrene on the humoral immunity of mice exposed by single intraperitoneal injection. *Chin. J. Prevent. Med.* 24: 220 - 222.

Zhu L., Lu H., Chen S., Amagai T., (2009). Pollution level, phase distribution and source analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in residential air in Hangzhou, China. *J. Hazard. Mater.* 162: 1165 - 1170.

Zuloaga O., Fitzpatrick L. J., Etxebarria N., Dean J. R., (2000). Influence of solvent and soil type on the pressurised fluid extracts of PAHs. 2: 634 - 638.

*Biografija sa bibliografijom*





## 7. Biografija

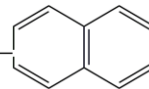
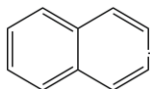
Jelena S. Nikolić (rođeno Cvetković) je rođena 1.11.1988. godine u Nišu, gde je završila osnovnu školu Vožd Karađorđe i gimnaziju 9. maj.

Osnovne akademske studije na Departmanu za hemiju upisala je školske 2007/08. na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Nišu. Studije je završila školske 2009/10. sa prosečnom ocenom 9,59. Master studije primenjene hemije na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Nišu završila sa prosečnom ocenom 9,95 i 2.10.2012. godine odbranila master rad na temu "Antioksidacione osobine vrste *Allium scorodoprasum*" sa ocenom 10. Doktorske akademske studije na Departmanu za hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu upisala je školske 2012/13. godine. Položila je sve ispite predviđene studijskim programom sa ocenom 10. U toku studiranja bila je stipendista Fonda za mlade talente za studente završnih godina fakulteta Ministarstva omladine i sporta (školske 2009/10. i 2011/12. godine), Fondacije „Sveta Petka“ Gradske opštine Medijana (školske 2008/09. i 2009/10. godine), Ministarstva prosvete (školske 2008/09. godine) i Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja (školske 2012/13. godine).

Novembra 2013. godine je zasnovala radni odnos na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Nišu kao asistent za užu naučnu oblast Analitička i fizička hemija i angažovana je u izvođenju vežbi na predmetima Analitička hemija 2, Analitička hemija 3 i Odabrana poglavlja volumetrijske analize. Angažovana je kao istraživač na projektima Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije („Prirodni proizvodi biljaka i lišajeva: izolovanje, identifikacija, biološka aktivnost i primena“, evidencioni broj 172047 i „Razvoj novih i poboljšanje postojećih elektrohemijskih, spektroskopskih i protočnih (FIA) metoda za praćenje kvaliteta životne sredine“, evidencioni broj 172051).

Učestvovala je na naučnim skupovima u zemlji i inostranstvu i kao autor i koautor je publikovala rezultate istraživanja u međunarodnim i nacionalnim časopisima - 3 rada u vrhunskom međunarodnom časopisu, 5 radova u istaknutom međunarodnom časopisu, 10 radova u međunarodnom časopisu, 7 radova u časopisima van SCI liste i 9 saopštenja na konferencijama.





## 8. Bibliografija

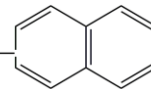
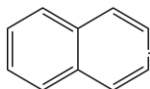
### 1) Radovi u vrhunskom međunarodnom časopisu M21

1. S. Alagic, V. Stankov Jovanovic, V. Mitic, J. Cvetkovic, G. Petrovic, G. Stojanovic, Bioaccumulation of HMW PAHs in the roots of wild blackberry from the Bor region (Serbia): Phytoremediation and biomonitoring aspects, *Science of The Total Environment*, 2016, 562, 561 - 570.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969716307446>
2. V. Mitic, M. Ilic, M. Dimitrijevic, J. Cvetkovic, S. Ciric, V. Stankov Jovanovic, Chemometric characterization of peach, nectarine and plum cultivars according to fruit phenolic content and antioxidant activity, *Fruits*, 2016, 71 (1), 57 - 66.  
<http://www.pubhort.org/fruits/2016/1/fruits150093.htm>
3. V. Mitic, V. Stankov Jovanovic, M. Dimitrijevic, J. Cvetkovic, S. Simonovic, S. Nikolic Mandic, Chemometric analysis of antioxidant activity and anthocyanin content of selected wild and cultivated small fruit from Serbia, *Fruits*, 2014, 69, 413 - 422.  
<http://www.pubhort.org/fruits/2014/5/fruits140026.htm>

### 2) Radovi u istaknutom međunarodnom časopisu M22

1. M. Dimitrijevic, V. Mitic, O. Jovanovic, V. Stankov Jovanovic, J. Nikolic, G. Petrovic, G. Stojanovic, Comparative Study of Fatty Acids Profile in Eleven Wild Mushrooms of Boletacea and Russulaceae Families, *Chemistry & Biodiversity*, 2018, 15 (1), 1 - 9.  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/cbdv.201700434>
2. S. Alagic, V. Stankov Jovanovic, V. Mitic, J. Nikolic, G. Petrovic, S. Tosic, G. Stojanovic, The effect of multiple contamination of soil on LMW and MMW PAHs accumulation in the roots of *Rubus fruticosus* L. naturally growing near The Copper Mining and Smelting Complex Bor (East Serbia), *Environmental Science and Pollution Research*, 2017, 24 (18), 15609 - 15621.  
<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11356-017-9181-4>
3. J. Cvetkovic, V. Mitic, V. Stankov Jovanovic, M. Dimitrijevic, G. Petrovic, S. Nikolic-Mandic, G. Stojanovic, Optimization of the QuEChERS extraction procedure for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by gas chromatography-mass spectrometry, *Analytical Methods*, 2016, 8 (7), 1711 - 1720.





<http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2016/ay/c5ay03248b#!divAbstract>

4. M. Dimitrijevic, V. Stankov Jovanovic, J. Cvetkovic, T. Mihajilov - Krstev, G. Stojanovic, V. Mitic, Screening of antioxidant, antimicrobial and antiradical activities of twelve selected Serbian wild mushrooms, *Analytical Methods*, 2015, 7 (10), 4181 - 4191

<http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2015/ay/c4ay03011g#!divAbstract>

5. M. Dimitrijevic, V. Mitic, J. Cvetkovic, V. Stankov Jovanovic, J. Mutic, S. Nikolic - Mandic, Update on element content profiles in eleven wild edible mushrooms from family *Boletaceae*, *European Food And Research Technology*, 2016, 242 (1), 1 - 10.

<https://link.springer.com/article/10.1007/s00217-015-2512-0>

### 3) Radovi u međunarodnom časopisu M23

1. J. Nikolic, V. Mitic, V. Stankov Jovanovic, M. Dimitrijevic, M. Ilic, S. Simonovic, G. Stojanovic, Novel sorbent and solvent combination for QuEChERS soil sample preparation for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons by gas chromatography - mass spectrometry, *Analytical Letters*, 2017, 51 (7), 1087-1107.

<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00032719.2017.1367007?journalCode=lanl20>

2. J. Nikolic, V. Stankov Jovanovic, M. Dimitrijevic, D. Cvetkovic, Lj. Stanojevic, Lj. Nikolic, V. Mitic, Dispersive solid-phase extraction clean up combined with Soxhlet extraction for the determination of 16 PAHs in soil samples by GC-MS, *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 2017, 97 (2), 1-12.

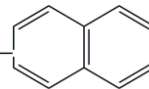
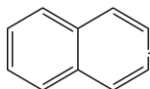
<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/03067319.2017.1290801>

3. V. Stankov Jovanovic, V. Mitic, S. Ciric, M. Ilic, J. Nikolic, M. Dimitrijevic, G. Stojanovic, Optimized ultrasonic extraction for the determination of polyaromatic hydrocarbons by gas chromatography-mass spectrometry, *Analytical Letters*, 2017, 50 (15), 2491-2504.

<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00032719.2017.1293677?journalCode=lanl20>

4. V. Mitic, M. Dimitrijevic, J. Pavlovic, J. Nikolic, S. Simonovic, V. Stankov Jovanovic, G. Stojanovic, Comprehensive Evaluation of Antioxidant Activity of Ribes berry Fruit Species: A Chemometric Approach, *Analytical Letters*, (2018), 51 (6), 908-920.

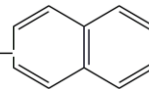
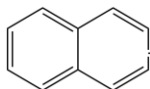
<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00032719.2017.1362646?journalCode=lanl20>



5. V. Mitic, J. Cvetkovic, V. Stankov Jovanovic, M. Dimitrijevic, G. Stojanovic, Characterization of Pepper Genotypes from Serbia as a Function of Maturity by Antioxidant Activity with Chemometric Analysis, *Analytical Letters*, 2016, 49(14), 2234-2245.  
<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00032719.2016.1140176>
6. M. Dimitrijević, V. Stankov Jovanović, J. Cvetković, M. Mitić, G. Petrović, A. Đorđević, V. Mitić, Phenolics, Antioxidant Potentials, and Antimicrobial Activities of Six Wild *Boletaceae* Mushrooms, *Analytical Letters*, 2017, 50 (10), 1691-1709.  
<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00032719.2016.1242133>
7. V. Mitic, V. Stankov Jovanovic, S. Tosic, A. Pavlovic, J. Cvetkovic, M. Dimitrijevic, S. Nikolic Mandic, Chemometric approach to evaluate heavy metals' content in *Daucus Carota* from different localities in Serbia, *Hemijska Industrija*, 2015, 69 (6), 643-650.  
<http://www.doiserbia.nb.rs/Article.aspx?id=0367-598X1400070M>
8. V. Mitic, V. Stankov Jovanovic, J. Cvetkovic, M. Dimitrijevic, M. Ilic, S. Nikolic-Mandic, Application of multivariate statistical approach to identify element sources in parsley (*Petroselinum crispum*), *Toxicological And Environmental Chemistry*, 2015, 97 (6), 754-765.  
<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/02772248.2015.1068315>
9. V. Mitic, V. Stankov Jovanovic, M. Ilic, J. Cvetkovic, M. Dimitrijevic, G. Stojanovic, *In vitro* Antioxidant Activity of Methanol Extract of *Allium scorodoprasum*, *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 2014, 20, 1130-1136.  
<http://www.agrojournal.org/20/05-18.pdf>
10. J. Cvetkovic, V. Mitic, V. Stankov Jovanovic, M. Dimitrijevic, S. Nikolic-Mandic, Elemental Composition of Wild Edible Mushrooms from Serbia, *Analytical Letters*, 2015, 48 (13), 2107-2121.  
<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00032719.2015.1010118>

#### 4) Radovi objavljeni u časopisima van SCI liste M53

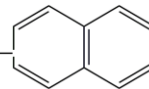
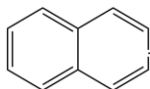
1. J. Cvetkovic, V. Mitic, V. Stankov Jovanovic, M. Dimitrijevic, G. Stojanovic, The evaluation of different sorbents and solvent mixtures in PAH sample preparation for GC/GC-MS analysis, 2016, 5(1), 31-38.  
<http://www.tf.ni.ac.rs/casopis-arhiva/sveska5/c5.pdf>



2. M. Dimitrijevic, V. Mitic, V. Stankov Jovanovic, J. Nikolic, G. Stojanovic, Comprehensive evaluation of the antioxidant activity of six wild edible mushroom species, 2016, 5(2), 53-59.  
<http://www.tf.ni.ac.rs/casopis-arhiva/sveska52/c8.pdf>
3. J. Cvetkovic, M. Dimitrijevic, V. Stankov Jovanovic, V. Mitic, Analiza policikličnih aromatičnih ugljovodonika u hrani i uzorcima iz životne sredine, Hemijski pregled, 2013, 54, 13 - 16.
4. M. Dimitrijevic, J. Cvetkovic, V. Stankov Jovanovic, V. Mitic, In vitro metode određivanja antioksidativnih sobina u uzorcima hrane, Hemijski pregled, 2014, 55, 7-12.
5. V. Mitic, V. Stankov Jovanovic, M. Dimitrijevic, J. Cvetkovic, G. Stojanovic, Effect of Food Preparation Technique on Antioxidant and Plant Pigment Content in Some Vegetables Species, Journal Of Food And Nutrition Research, 2013, 1(6):121 - 127.  
<http://pubs.sciepub.com/jfnr/1/6/2/jfnr-1-6-2.pdf>
6. V. Stankov Jovanović, V. Mitić, J. Cvetković, M. Ilić, S. Cirić, S. Nikolic - Mandić, G., Stojanovic, An innovative approach to environmental sample preparation for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons by GC-MS using new sorbents in QUECHERS technique, Safety Engineering, 2015, 5 (1), 1 - 7  
<http://www.znrfak.ni.ac.rs/SE-Journal/Archive/SE-WEB%20Journal%20-%20Vol15-1/index.html>
7. M. Ilic, V. Stankov Jovanovic, V. Mitic, M. Dimitrijevic, J. Cvetkovic, S. Tomic, Toxic metals content and safe use of *Seseli pallasii* herb, 2016, 6(1), 1 - 5.  
<http://www.znrfak.ni.ac.rs/se-journal/Archive/SE-WEB%20Journal%20-%20Vol16-1/radovi/PDF/01%20Marija%20Ilic.pdf>

##### **5) Radovi na skupovima međunarodnog značaja štampani u izvodu M34**

1. M. Dimitrijevic, V. Mitic, V. Stankov Jovanovic, J. Cvetkovic, G. Stojanovic, *Boletus impolitus* as a natural source of phenolic acids and antioxidants, 12<sup>th</sup> Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighbouring regions, Kopaonik Mt., 2016, Book of Abstract page 106
2. M. Dimitrijevic, V. Mitic, V. Stankov Jovanovic, J. Cvetkovic, A. Djordjevic, G. Stojanovic, ICP-MS assessment of toxic elements in *Lactarius volemus* collected from

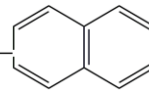
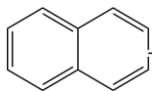


- Southeastern Serbia, 12<sup>th</sup> Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighbouring regions, Kopaonik Mt., 2016, Book of Abstract page 107
3. M. Ilic, S. Simonovic, J. Cvetkovic, M. Dimitrijevic, V. Mitic, V. Stankov Jovanovic, G. Stojanovic, Essential oil composition of *Laserpitium latifolium* L., Congress of Chemists and Chemical Engineers of Bosnia and Herzegovina with international participation, Sarajevo October 10th-12th, 2014 , PP-BC-04 Bulletin of the Chemists and Technologists of Bosnia and Herzegovina special issue page 124 Print ISSN: 0367-4444 Online ISSN: 2232-726
  4. J. Cvetkovic, M. Dimitrijevic, M. Ilic, S. Simonovic, V. Stankov Jovanovic, V. Mitic, G. Stojanovic, Antioxidant Activity of *Achillea clypeolata* Sm, Congress of Chemists and Chemical Engineers of Bosnia and Herzegovina with international participation Sarajevo October 10th-12th, 2014 PP-BC-04 Bulletin of the Chemists and Technologists of Bosnia and Herzegovina special issue page 99 Print ISSN: 0367-4444 Online ISSN: 2232- 726
  5. M. Dimitrijevic, J. Cvetkovic, M. Ilic, S. Simonovic, V. Stankov Jovanovic, V. Mitic, S. Nikolić-Mandic, Content of As, Cd, Pb and Sn in parsley (*Petroselinum crispum*) from different districts in Serbia Congress of Chemists and Chemical Engineers of Bosnia and Herzegovina with international participation, Sarajevo October 10th-12th, 2014, PP-AEC-19 Bulletin of the Chemists and Technologists of Bosnia and Herzegovina special issue page 45 Print ISSN: 0367-4444 Online ISSN: 2232-726
  6. J. Cvetkovic, M. Dimitrijevic, M. Ilic, V. Mitic, V. Stankov Jovanovic, G. Petrovic, Antioksidaciona aktivnost metanolnih ekstrakata maline, kupine, višnje i ribizle, 10th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighbouring regions, Vlasina 17 to 20 June 2010 Book of Abstract page 92
  7. M. Dimitrijevic, J. Cvetkovic, V. Mitic, M. Markovic, M. Ilic, V. Stankov Jovanovic, Antioksidativne osobine nekih biljnih vrsta sa požarišta na planini Vidlič, 10th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighbouring regions, Vlasina 17 to 20 June 2010 Book of Abstract page 93

**6) Radovi saopšteni na skupovima nacionalnog značaja štampani u izvodu M64**

1. J. Cvetkovic, M. Dimitrijevic, V. Mitic, V. Stankov Jovanovic, M. Ilic, G. Petrovic, G. Stojanovic, Uticaj termičke obrade na sadržaj pigmenata u zelenom lisnatom povrću, “11. Simpozijum o flori jugoistočne Srbije i susednih regiona”, Vlasinsko jezero, Srbija, (Jun 2013)

## *Bibliografija*



2. M. Dimitrijevic, J. Cvetkovic, V. Mitic, V. Stankov Jovanovic, M. Ilic, S. Simonovic, G. Stojanovic, Korelacija različitih metoda za određivanje antioksidacione aktivnosti odabranih vrsta voća, “11. Simpozijum o flori jugoistočne Srbije i susednih regiona”, Vlasinsko jezero, Srbija, (Jun 2013).

*Proratraa dokurmentacija*



## ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

**Оптимизација поступака припреме узорака земљишта за квантитативну анализу полицикличних ароматичних угљоводоника применом методе гасна хроматографија-масена спектрометрија**

која је одбрањена на Природно - математичком факултету Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивао/ла на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, \_\_\_\_\_.

Потпис аутора дисертације:

---

Јелена С. Николић





**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНОГ И ЕЛЕКТРОНСКОГ ОБЛИКА  
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Наслов дисертације:

**Оптимизација поступака припреме узорака земљишта за квантитативну анализу  
полицикличних ароматичних угљоводоника применом методе гасна хроматографија-  
масена спектрометрија**

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам предао/ла за  
уношење у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу**, истоветан штампаном  
облику.

У Нишу, \_\_\_\_\_.

Потпис аутора дисертације:

---

Јелена С. Николић



## ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

**Оптимизација поступака припреме узорка земљишта за квантитативну анализу полицикличних ароматичних угљоводоника применом методе гасна хроматографија-масена спектрометрија**

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

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити 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 прераде (CC BY-NC-ND)**

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

У Нишу, \_\_\_\_\_.

Потпис аутора дисертације:

---

Јелена С. Николић