



*Tehnološko-metalurški fakultet Univerziteta u Beogradu
Katedra za opštu i neorgansku hemiju*

HEMIJA ŽIVOTNE SREDINE

Laboratorijske vežbe

Prof. Svetlana Grujić

Dr Ljiljana Tolić Stojadinović

2023. god.

1. PRIPREMA UZORAKA VODE ZA ANALIZU

Uzorci iz životne sredine su veoma kompleksni po sastavu i sadrže analite u niskim koncentracijama, tako da nije moguće direktno injektovanje ovakvih uzoraka u hromatografski sistem. Priprema uzoraka je neophodan korak da bi se analiti od interesa identifikovali i kvantifikovali primenom odgovarajuće instrumentalne metode. Priprema uzorka podrazumeva izolovanje i koncentrovanje analita, kao i prečišćavanje dobijenog ekstrakta od nečistoća. Izbor metode pripreme uzorka zavisi od fizičko-hemijskih svojstava analita (rastvorljivost, isparljivost...), prirode uzorka (tečan, čvrst...) i instrumentalne metode analize uzorka (tečna hromatografija, gasna hromatografija...).

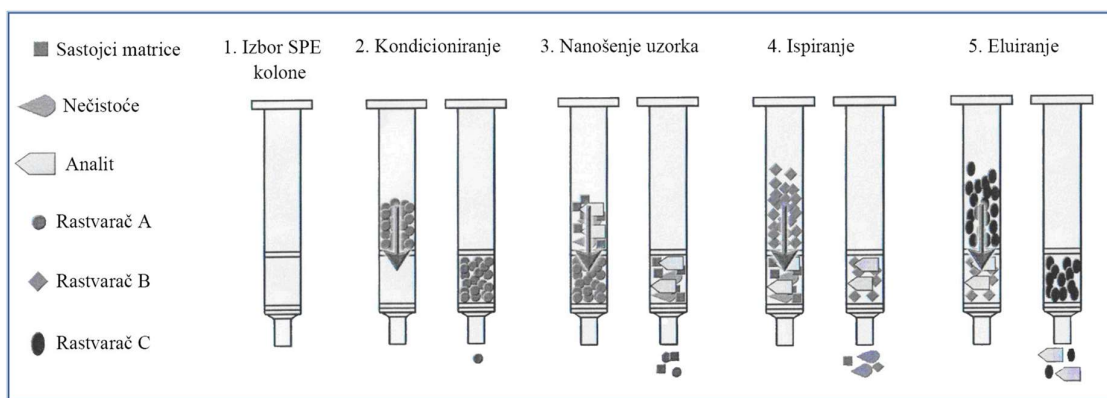
Za predkoncentrisanje tragova lekova, pesticida i sličnih analita iz vode mogu se koristiti tečno-tečna i tečno-čvrsta ekstrakcija. Tečno-tečna ekstrakcija se zasniva na raspodeli analita između dva rastvarača u kojima je njegova rastvorljivost različita. Ograničenja tečno-tečne ekstrakcije su lako stvaranje emulzija i upotreba velikih količina organskih rastvarača za ekstrakciju analita. Kod tečno-čvrste ekstrakcije analit se raspodeljuje između tečnog uzorka i čvrstog adsorbensa.

Jedna od najčešće korišćenih tečno-čvrstih ekstrakcija je *ekstrakcija na čvrstoj fazi* (**SPE**, eng. solid-phase extraction). SPE se koristi za izolovanje i predkoncentrisanje analita iz tečnih uzoraka, kao što su uzorci prirodnih i otpadnih voda. Do zadržavanja analita dolazi tako što se uzorak vode propušta kroz poroznu čvrstu fazu sa velikim afinitetom prema analitu. Analit se nakon toga eluiše sa čvrste faze pogodnim rastvaračem. Zahvaljujući jednostavnosti, brzini, efikasnosti i manjoj potrošnji organskih rastvarača, ova tehnika je uzela primat nad klasičnom tečno-tečnom ekstrakcijom.

Ekstrakcija na čvrstoj fazi izvodi se na kolonama (kertridžima, špricovima) određene zapremine koji su napunjeni adsorbensom. Postoje različiti adsorbensi, pa je potrebno izabrati odgovarajući u zavisnosti od svojstava analita. Kao adsorbensi se najčešće koriste silikatni materijali sa polarnim i nepolarnim funkcionalnim grupama koje omogućavaju selektivne i specifične interakcije sa analitima. Reverzno-fazna ekstrakcija na čvrstoj fazi se odvija između nepolarnog ili slabo polarnog analita (kakvi su pesticidi, lekovi, itd.) i nepolarnog adsorbensa uz polarnu matricu uzorka (kao što je uzorak vode). Adsorbensi koji se najčešće koriste za reverzno-faznu ekstrakciju su silikatni materijali sa alkil (C_{18} i C_8) ili aril grupama. Poslednjih godina većina metoda pripreme uzoraka vode se zasniva na upotrebi polimernih adsorbensa, kao što je Oasis HLB (Waters, Milford, SAD). Upotreba **HLB** (eng. hydrophilic-lipophilic balance) kertridža, sa uravnoteženim hidrofilnim i lipofilnim karakteristikama, omogućava ekstrakciju kiselih, neutralnih i baznih analita u širokom opsegu pH vrednosti.

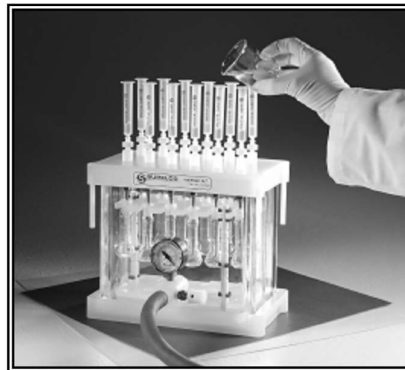
Nakon izbora odgovarajuće SPE kolone prelazi se na proceduru ekstrakcije na čvrstoj fazi (slika 1) koja obuhvata četiri koraka:

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



Slika 1. Procedura ekstrakcije na čvrstoj fazi.

Na slici 2 je prikazana aparatura potrebna za izvođenje ekstrakcije na čvrstoj fazi koja omogućava istovremenu ekstrakciju većeg broja uzoraka. Aparatura se sastoji od staklene kade na kojoj se nalazi izvod sa manometrom za vezivanje vakuum pumpe (koja obezbeđuje kontinualan protok uzorka). Staklena kada se zatvara perforiranim poklopcem na koji se postavljaju kertridži, tj. SPE kolone sa adsorbensom. Prilikom eluiranja kolona rastvaračem, u kadu se stavlja stalak sa kivetama koje se postavljaju neposredno ispod svakog kertridža i služe za sakupljanje ekstrakta.



Slika 2. Aparatura za ekstrakciju na čvrstoj fazi.

2. PRIPREMA UZORAKA SEDIMENATA ZA ANALIZU

Procedura pripreme uzorka sedimenta se sastoji od sledećih stupnjeva:

1. homogenizacija uzorka
2. ekstrakcija analita iz uzorka pomoću odgovarajućeg rastvarača
3. koncentrovanje analita (najčešće uparavanjem rastvarača)
4. prečišćavanje dobijenog ekstrakta

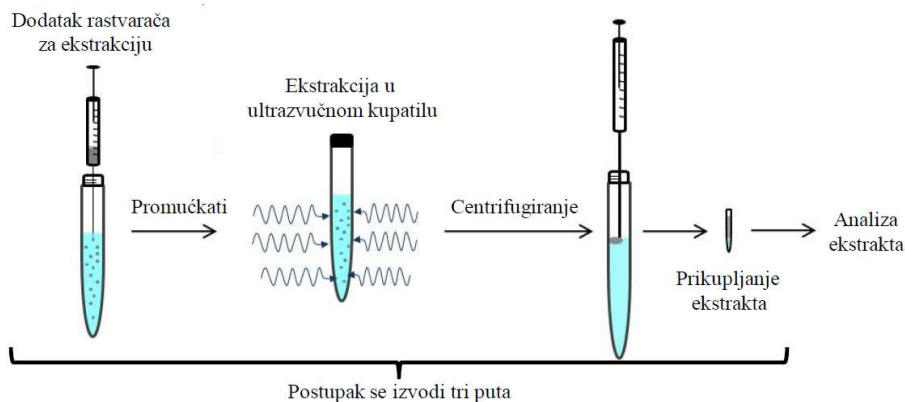
Najvažniji stupnjevi u procesu pripreme čvrstih uzoraka su ekstrakcija analita iz matrice i prečišćavanje dobijenog ekstrakta. Prečišćavanje dobijenog ekstrakta je veoma važno prilikom pripreme kompleksnih matrica za analizu, jer je analit prisutan u znatno nižim koncentracijama od nečistoća, pa je njih potrebno ukloniti.

Pre ekstrakcije potrebno je izvršiti odgovarajući predtretman uzorka koji uključuje sušenje i usitnjavanje uzorka. Uklanjanje vlage se može vršiti sušenjem na sobnoj temperaturi tokom određenog vremenskog perioda, sušenjem u sušnici ili liofilizacijom. Prilikom usitnjavanja i prosejavanjem kroz odgovarajuća sita smanjuje se veličina čestica i povećava kontaktna površina prilikom ekstrakcije rastvaračem. Za ekstrakciju analita iz uzoraka sedimenata se najčešće koriste sledeće metode:

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

Kod *ultrazvučne ekstrakcije* (sonikacije) za ekstrakciju analita iz čvrstih uzoraka koriste se ultrazvučni talasi. Prednosti ove metode u odnosu na ostale su trajanje i upotreba malih zapremina organskih rastvarača. Ova metoda ekstrakcije se odvija na sobnoj temperaturi i atmosferskom pritisku. Najčešće se izvodi u ultrazvučnom kupatilu napunjenom vodom koja služi za prenos energije ultrazvučnih talasa. Ultrazvučni talasi dovode do erozije matrice uzorka i pospešuju kontakt matrice sa rastvaračem.

Ultrazvučna ekstrakcija (slika 3) se obično izvodi tako što se u ultrazvučno kupatilo postavi sud u kome se nalazi čvrst uzorak sa dovoljno organskog rastvarača i ekstrakcija se vrši tokom kratkog vremena. Nakon ekstrakcije, rastvarač sa analitima se odvaja centrifugiranjem i dekantovanjem, ili filtracijom. Da bi se pospešila ekstrakcija obično se na preostali čvrsti ostatak dodaje svež rastvarač i ceo postupak se ponavlja još dva puta, a zatim se svi ekstrakti pomešaju.



Slika 3. Prikaz postupka ultrazvučne ekstrakcije.

Da bi se smanjio uticaj matrice, tj. uticaj sastojaka matrice uzorka i nečistoća na rezultate analize, neophodno je prečistiti ekstrakte uzoraka, naročito kompleksnih matrica kao što su sedimenti. Sastojci matrice koji se koekstrahuju sa analitima utiču na smanjenje, a u ređim slučajevima i povećanje jonizacije i intenziteta signala analita, što nepovoljno utiče na reproduktivnost i preciznost analize. Prečišćavanje dobijenih ekstrakata se obično izvodi na kolonama (kertridžima) koje su napunjene adsorbensom. Potrebno je da odabrani adsorbens

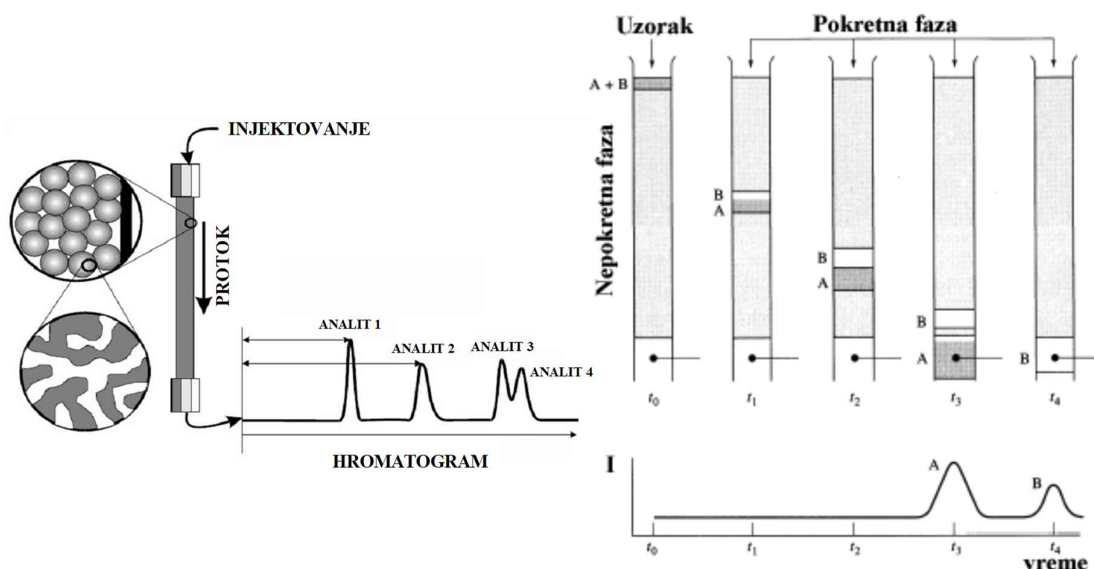
efikasno adsorbuje nečistoće, dok odabrani eluent treba da bude efikasniji u rastvaranju analita. Kao pakovanje kolone obično se koriste silikatni materijali sa polarnim i nepolarnim funkcionalnim grupama. Kao eluent obično se koriste metanol, acetonitril, dihlormetan, etil-acetat, aceton i heksan, kao i smeše ovih rastvarača u različitim odnosima.

3. ANALIZA EKSTRAKATA METODOM TEČNE HROMATOGRAFIJE VISOKIH PERFORMANSI U SPREZI SA MASENOM SPEKTROMETRIJOM

3.1. Tečna hromatografija

Hromatografija je fizička metoda razdvajanja supstanci iz smeša koja se zasniva na različitoj raspodeli analita između dve faze, od kojih je jedna nepokretna (stacionarna), a druga pokretna (mobilna) faza. Kod tečne hromatografije, mobilna faza je tečna, a stacionarna faza je čvrsta ili tečna i predstavlja pakovanje hromatografske kolone. Do hromatografskog razdvajanja dolazi usled različitog stepena interakcije analita sa mobilnom i/ili stacionarnom fazom, zbog čega je različito vreme prolaska analita od mesta unošenja uzorka do mesta detekcije. Analiti koji formiraju jače veze sa stacionarnom nego sa mobilnom fazom sporije se eluiraju sa kolone i imaju duže vreme zadržavanja na koloni. Vreme zadržavanja analita u hromatografskom sistemu predstavlja retenciono vreme.

Tečna hromatografija visokih performansi (HPLC, eng. high performance liquid chromatography) koristi se, pre svega, za analizu neisparljivih i termički nestabilnih polarnih i slabo polarnih analita. Kod ove metode mobilna faza je pod visokim pritiskom da bi se ostvario neprekidan protok mobilne faze i reproduktivna hromatografija. Mobilna faza mora biti visoke čistoće, male viskoznosti, hemijski inertna i kompatibilna sa detektorom i u njoj analit mora biti rastvoran. Pakovanje hromatografske kolone se sastoji od čestica veoma malih dimenzija čime se obezbeđuje velika kontaktna površina, a time i visoka rezolucija, tj. visoki stepen razdvajanja po čemu je metoda i dobila naziv. Efikasnost hromatografskog razdvajanja analita zavisi od izbora stacionarne i mobilne faze. Optimalnim hromatografskim razdvajanjem smatra se ono kod kojeg su komponente smeše jasno razdvojene tokom što kraćeg vremena. Na slici 4 prikazani su osnovni principi tečne hromatografije.

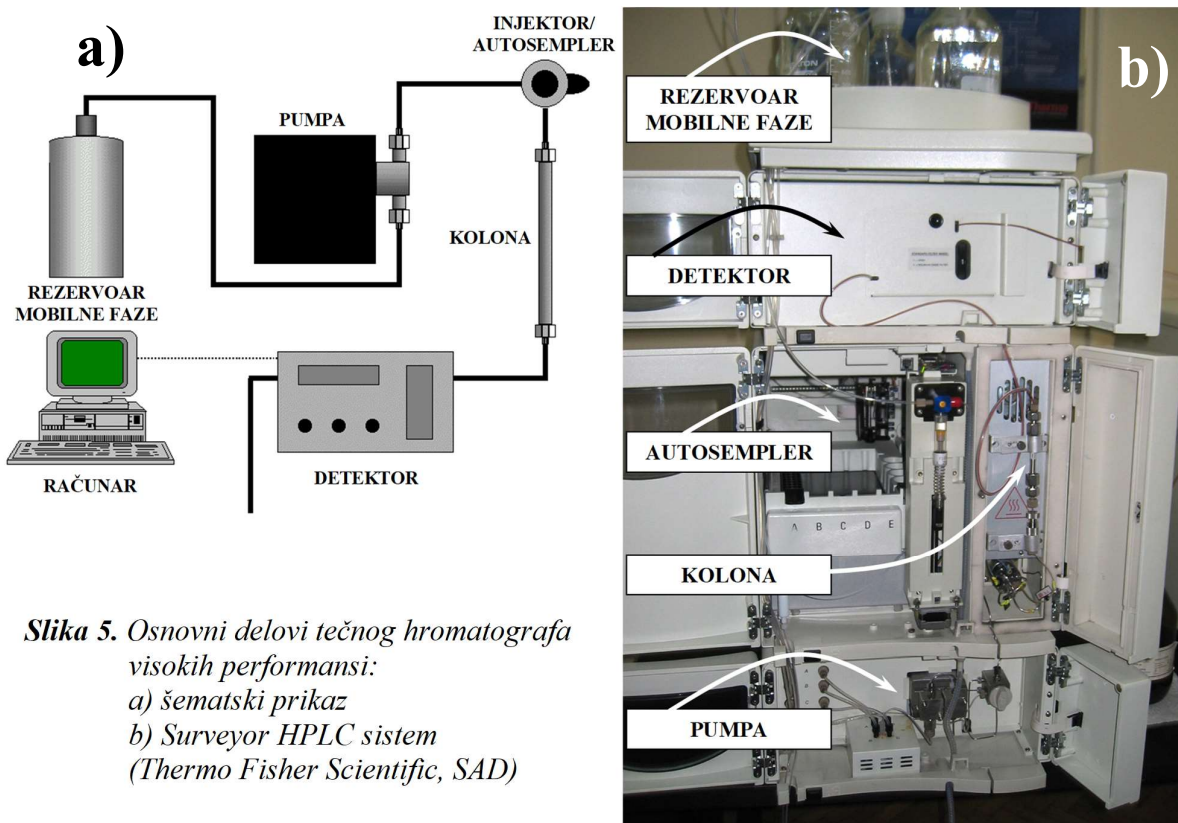


Slika 4. Osnovni principi tečne hromatografije.

Prema polarosti hromatografskog sistema razlikuju se normalno-fazna i reverzno-fazna tečna hromatografija. Kod normalno-fazne hromatografije stacionarna faza je polarna, a mobilna faza je nepolarna, pa se polarni analiti duže zadržavaju na koloni i eluiraju sa većim retencionim vremenom. Reverzno-fazna hromatografija podrazumeva nepolarnu stacionarnu fazu i pretežno polarnu mobilnu fazu, pa se na koloni duže zadržavaju manje polarni analiti i eluiraju sa kolone sa većim retencionim vremenom. Protok mobilne faze može biti izokratski ili gradijentan. Pri izokratskom protoku, kroz hromatografsku kolonu protiče mobilna faza konstantnog sastava, dok se kod gradijentnog protoka sastav mobilne faze postepeno menja tokom analize.

Tečni hromatograf visokih performansi sastoji se iz sledećih delova (slika 5):

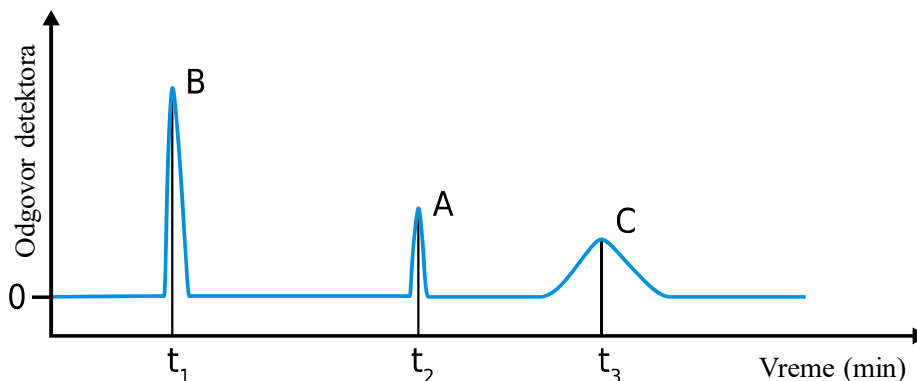
1. rezervoar mobilne faze (staklene boce sa rastvaračima koji sačinjavaju mobilnu fazu)
2. pumpa (za postizanje visokih pritisaka i stabilnog protoka mobilne faze)
3. sistem za unošenje uzorka (injektor i/ili autosempler)
4. kolona (dužine 10–25 cm, unutrašnjeg prečnika 3–5 mm, veličine čestica 3–10 μm)
5. detektor (UV, fluorescentni, maseni i dr.)
6. računar (za sakupljanje i obradu rezultata)



Slika 5. Osnovni delovi tečnog hromatografa visokih performansi:
a) šematski prikaz
b) Surveyor HPLC sistem
(Thermo Fisher Scientific, SAD)

Tečna hromatografija je hromatografska metoda koja je danas metoda izbora za razdvajanje velikog broja organskih jedinjenja, od lekova i njihovih metabolita i pesticida, malih molekulskih masa, do peptida i proteina, velikih molekulskih masa. Gasna hromatografija, kao odlična alternativna hromatografska metoda, pogodna je za isparljive i termički stabilne analite.

U tečnoj hromatografiji se koriste različite vrste detektora, kao što su ultraljubičasti (eng. ultraviolet, UV), PDA (eng. photodiode array), elektrohemijski, fluorescentni, maseni, itd. Praćenjem odgovora detektora u toku vremena dobija se hromatogram (slika 6). Pomoću hromatograma može se vršiti kvalitativna analiza (na osnovu retencinog vremena t_1 , t_2 , t_3 koje zavisi od hemijske prirode analita) i kvantitativna analiza (na osnovu površine hromatografskog pika koja je srazmerna koncentraciji analita).

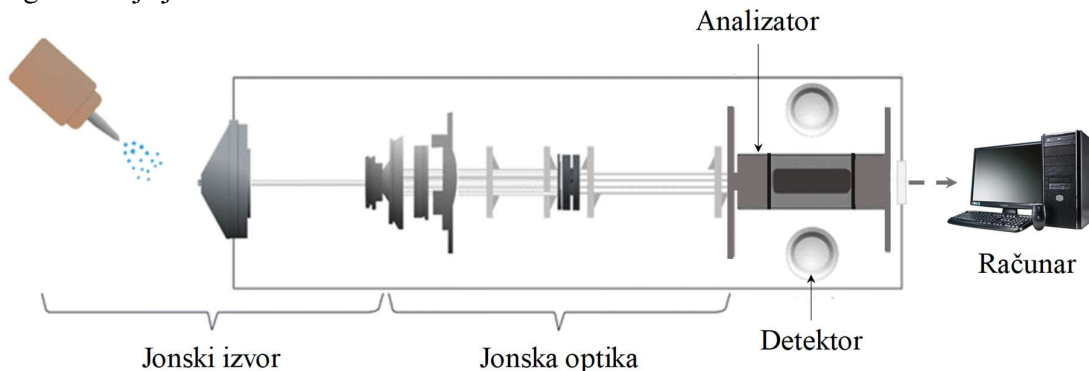


Slika 6. Hromatogram.

3.2. Masena spektrometrija

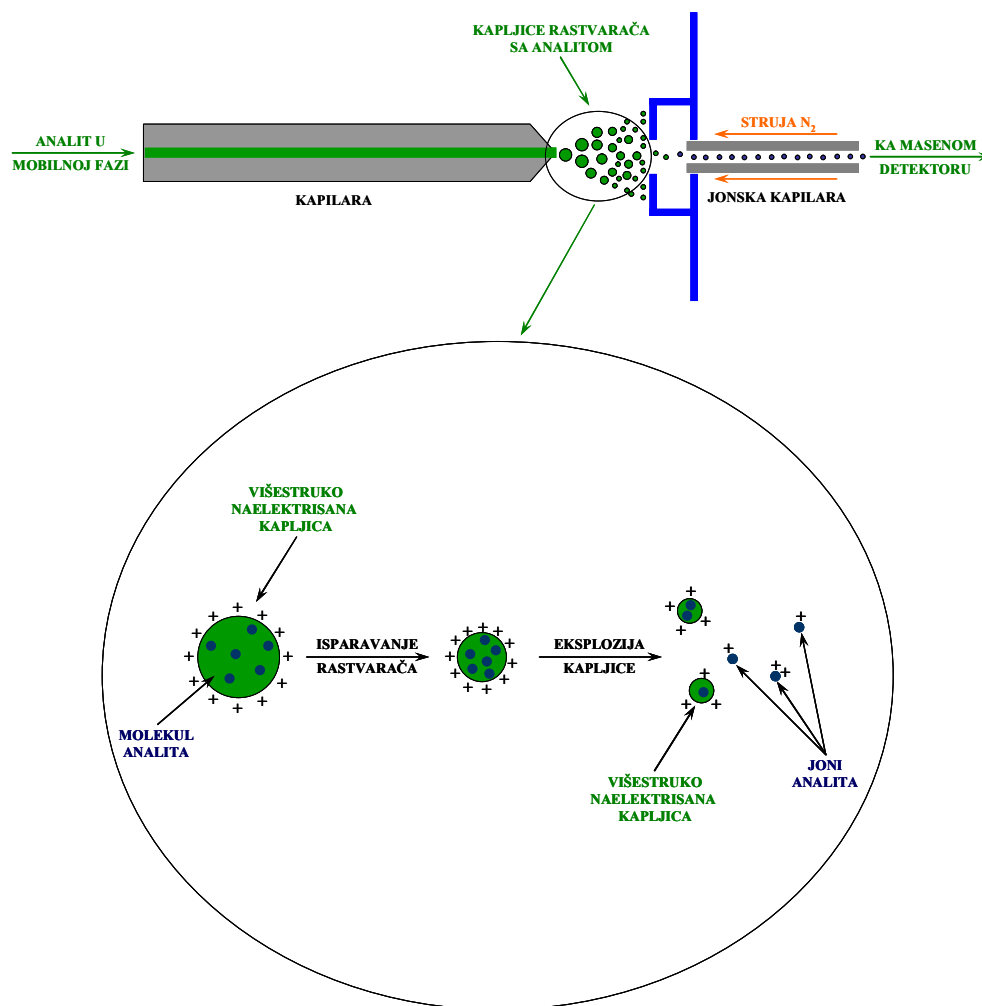
Masena spektrometrija (MS, eng. mass spectrometry) je analitička metoda koja se zasniva na jonizovanju uzorka i razdvajanju nastalih jona prema odnosu mase i naelektrisanja (m/z). Kao rezultat analize dobija se maseni spektar koji predstavlja grafik zavisnosti relativne količine jona od m/z vrednosti. U masenom spektru se nalazi molekulski jon koji daje podatak o masi molekula analita i fragmentni joni koji daju podatak o strukturi molekula analita. Prednost metode je izuzetna osetljivost jer se potrebne informacije mogu dobiti analizom svega 1 pg analita.

Maseni spektrometar se sastoji iz jonskog izvora, jonske optike, analizatora, detektora, vakuum sistema i sistema za obradu podataka (slika 7). U jonskom izvoru dolazi do jonizacije molekula analita. Nastali joni se zatim putem jonske optike sprovode do analizatora gde se razdvajaju prema m/z odnosu. Nakon razdvajanja, joni se šalju do detektora koji registruje signale svih jona. Analizator i maseni detektor nalaze se pod vakuumom da bi se međusobna interakcija jona svela na minimum, tj. da bi se sprečili sudari, neutralizacija, rasejanje ili fragmentacija jona.



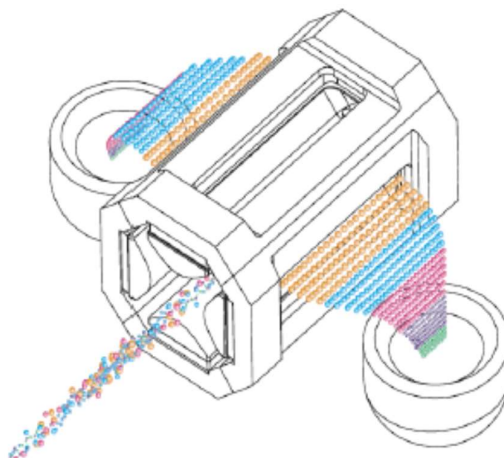
Slika 7. Prikaz masenog spektrometra.

U jonskom izvoru, jonizacija uzorka se može izvesti na više načina, a u poslednjoj deceniji najčešće korišćene tehnike jonizacije prilikom HPLC-MS analize zagađujućih materija životne sredine postale su elektrosprej jonizacija (ESI, eng. electrospray ionization) i hemijska jonizacija na atmosferskom pritisku (APCI, eng. atmospheric pressure chemical ionization). ESI se pretežno koristi za analizu polarnijih analita, dok se APCI koristi za analizu manje polarnih jedinjenja. Nastanak jona elektrosprej jonizacijom (slika 8) opisan je nastankom finog spreja tečnosti u prisustvu jakog električnog polja, pri čemu dolazi do desolvatacije jona analita na atmosferskom pritisku. Naime, analit rastvoren u polarnom i isparljivom rastvaraču se raspršuje u struji azota kroz kapilaru čiji je vrh pod visokim naponom. Pod dejstvom električnog polja, na atmosferskom pritisku, aerosol sastavljen od višestruko naelektrisanih kapljica napušta kapilaru u obliku finog spreja. Kapljice se polako smanjuju usled isparavanja rastvarača i kada gustina naelektrisanja prevaziđe površinski napon dolazi do eksplozije kapljica, pri čemu nastaje veliki broj malih kapljica. Proces se ponavlja i kao rezultat nastaju desolvatisani joni analita koji kroz jonsku kapilaru stižu do masenog analizatora pod vakuumom. ESI je „meká“ jonizaciona tehnika kojom se dobijaju protonovani ($[M+H]^+$) ili deprotonovani ($[M-H]^-$) molekuli analita, što zavisi od polarosti električnog polja. Često dolazi do pojave višestruko naelektrisanih jona ($[M+nH]^{n+}$), kao i adukata molekula analita sa rastvaračem ($[M+R+H]^+$, odnosno $[M+R-H]^-$).



Slika 8. Prikaz elektrosprej jonizacije.

Jedan od najčešće korišćenih masenih analizatora u HPLC-MS analizi zagađujućih materija životne sredine je jonski trap (eng. ion trap). Posедуje mogućnost da izvodi više stupnjeva masene analize (MS^n), zbog čega je veoma selektivan, što može poboljšati odnos signala i šuma tako da granica detekcije jonskog trapa bude prihvatljiva za kvantifikaciju niskih koncentracija analita u kompleksnim uzorcima iz životne sredine. Dvodimenzionalni (linearni) jonski trap (slika 9) se sastoji od dva para elektroda na čijim se krajevima nalaze sočiva koja usmeravaju jone ka unutrašnjosti trapa. Joni se zadržavaju u trapu primenom napona. Da bi se dobio maseni spektar jona zadržanih u trapu napon se povećava i joni se prema m/z odnosu izbacuju iz trapa ka detektoru kroz proreze koji se nalaze na centralnim delovima dve naspramno postavljene elektrode. U trap se uvodi inertan gas, kao što je helijum, da bi se smanjila kinetička energija jona i obezbedile njihove stabilne putanje. Kod MS^n analize, izolovanje jona analita koji treba dalje da se fragmentiše postiže se povećanjem napona, pri čemu se iz trapa izbacuju svi ostali joni osim onih sa traženim m/z odnosom. Nakon fragmentacije, joni dospevaju do detektora koji registruje njihovo prisustvo i relativnu koncentraciju.

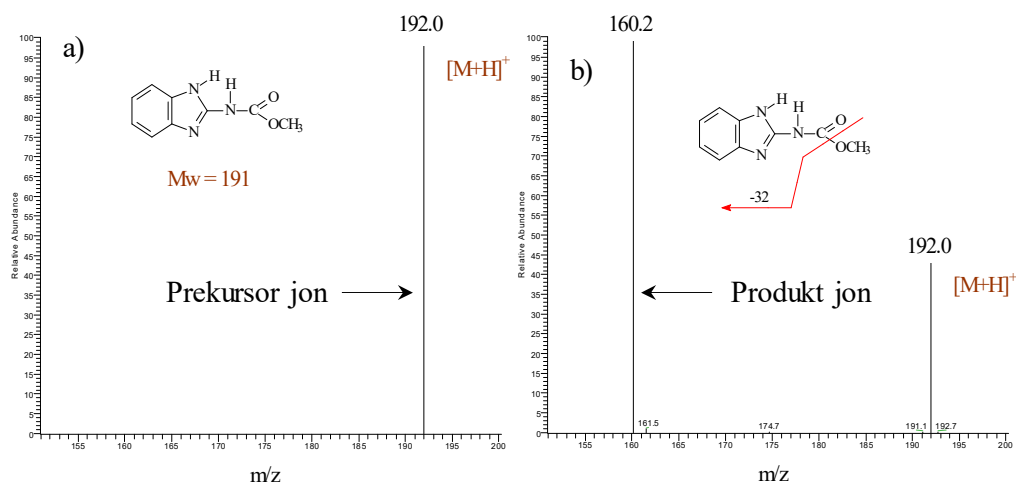


Slika 9. Prikaz linearnog jonskog trapa.

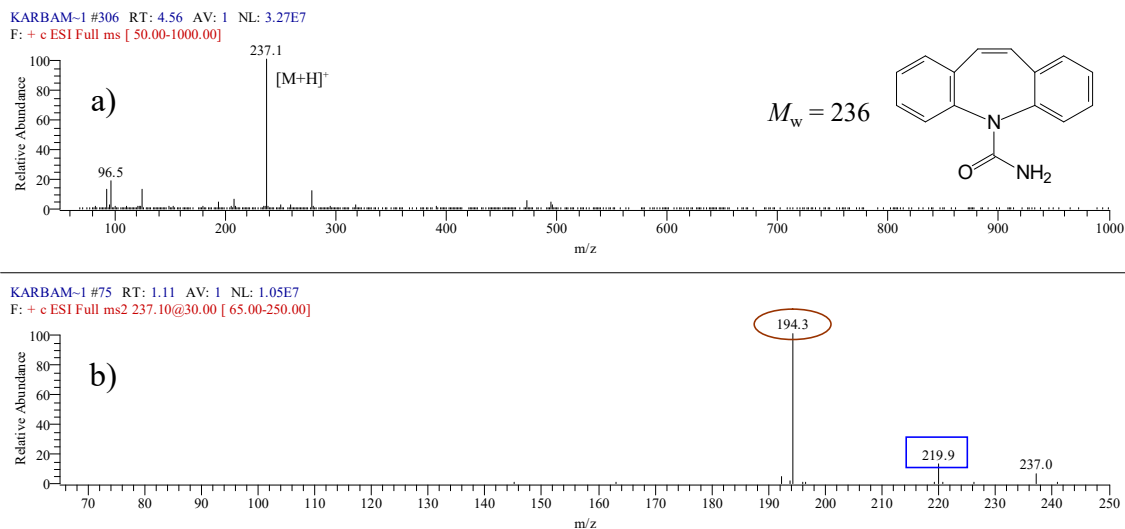
3.3. HPLC-MS

Veliko ograničenje hromatografije je nemogućnost precizne identifikacije analita u smeši, čak i kada su potpuno hromatografski razdvojeni. Identifikacija se zasniva na poređenju retencionih vremena nepoznatih analita i standardnih supstanci pod istim eksperimentalnim uslovima. Međutim, čak i kada su retencionna vremena identična, to ne mora biti siguran pokazatelj da je u pitanju isto jedinjenje. S druge strane, maseni spektri većine supstanci su dovoljno specifični da omoguće njihovu identifikaciju sa visokim stepenom sigurnosti. Kombinovanjem ove dve metode nastala je hibridna tehnika: tečna hromatografija visokih performansi-masena spektrometrija (HPLC-MS). Kombinovanje separacionih mogućnosti hromatografije sa identifikacionim mogućnostima masenog spektrometra omogućava razlikovanje supstanci sa istim ili sličnim retencionim vremenima na osnovu njihovih različitih masenih spektara. Razvojem tandem masene spektrometrije (MS/MS ili MS^2) polovinom devedesetih godina postala je moguća precizna i pouzdana detekcija veoma niskih koncentracija analita, reda veličine $ng\ dm^{-3}$, u kompleksnim matricama iz životne sredine. U

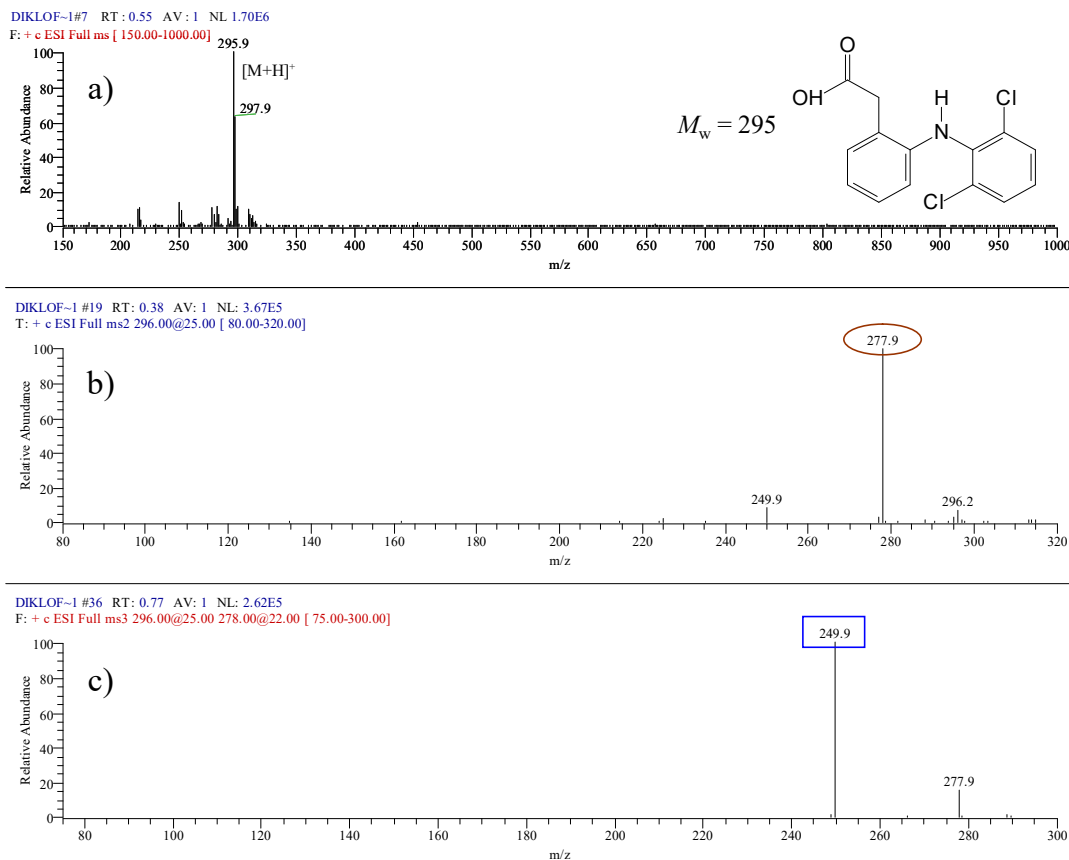
tandem masenoj spektrometriji prvo se izoluju prekursor joni analita (slike 10a, 11a i 12a), a zatim se izaziva njihova fragmentacija sudarima sa inertnim gasom, obično argonom ili helijumom, i analiza nastalih fragmentnih (produkt) jona (slike 10b, 11b i 12b). Ukoliko se radi dalja fragmentacija nastalih jona, onda je u pitanju MS³ analiza (slika 12c). Tandem masena spektrometrija omogućava identifikaciju i kvantifikaciju analita koji imaju istu molekulsku masu, ali različite fragmentne jone, kao i onih jedinjenja koja nisu potpuno hromatografski razdvojena.



Slika 10. Maseni spektri pesticida karbendazima: a) MS spektar sa prekursor jonom, b) MS² spektar sa produkt jonom.



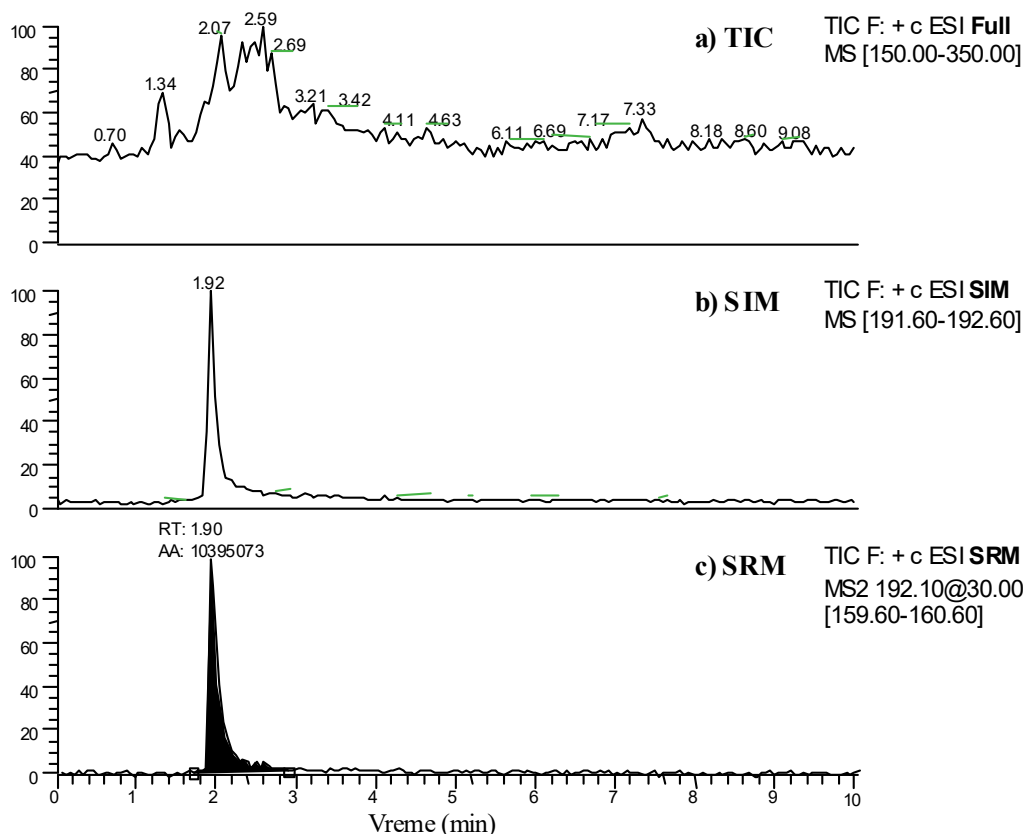
Slika 11. Maseni spektri leka karbamazepina: a) MS spektar, b) MS² spektar.



Slika 12. Maseni spektri leka diklofenaka: a) MS spektar, b) MS² spektar, c) MS³ spektar.

U toku rada može se izabrati snimanje celog masenog spektra i na taj način se dobija ukupni jonski hromatogram (TIC, eng. total ion chromatogram). Ukoliko se odabere registrovanje određenog jona dobija se hromatogram odabranog jona (SIM, eng. selected ion monitoring). Može se odabrati detektovanje jona nastalog fragmentacijom određenog jona i kao rezultat se dobija hromatogram odabrane reakcije (SRM, eng. selected reaction monitoring) (slika 13).

RT: 0.00 - 10.02



Slika 13. Maseni hromatogrami karbendazima u uzorku rečne vode:

a) TIC – ukupni jonski hromatogram (m/z 150–350)

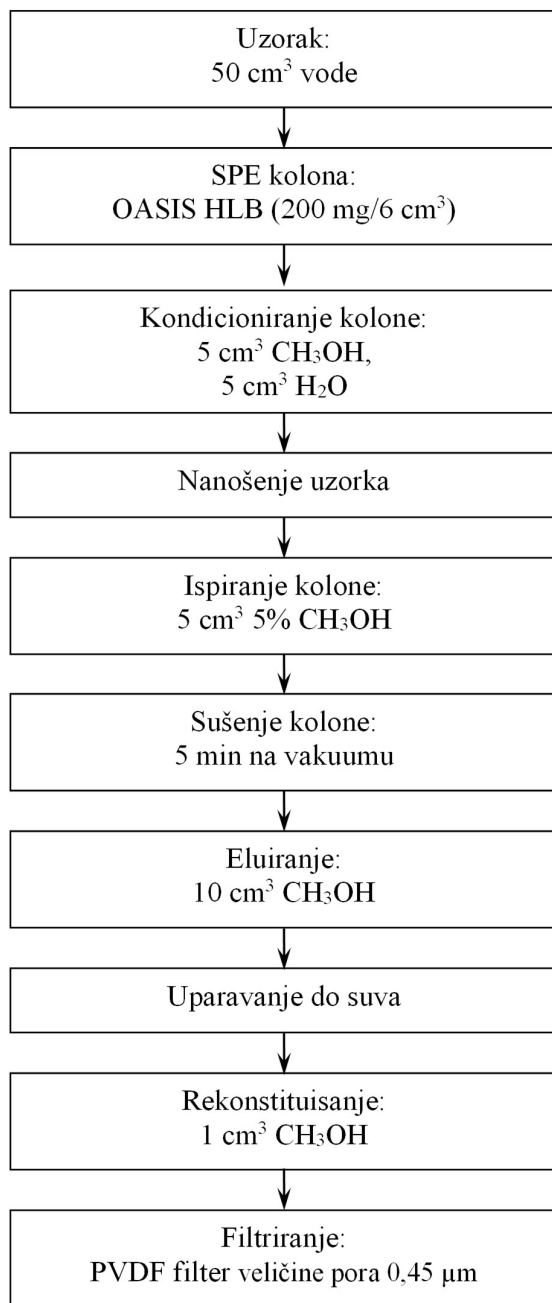
b) SIM – hromatogram odabranog jona (m/z 192 – protonovani molekul karbendazima)

c) SRM – hromatogram odabrane reakcije fragmentacije (m/z 192 → m/z 160)

Prilikom detektovanja analita u realnim uzorcima pomoću HPLC-MS tehnike mogu se dobiti lažni pozitivni rezultati. Nesigurnost je posebno velika kada se veći broj analita detektuje sa ograničenim hromatografskim razdvajanjem, kao i kada je matrica uzorka kompleksna. Radi izbegavanja lažnih pozitivnih rezultata potrebna je potvrda prisustva analita u uzorku. Potvrдна analiza se izvodi ponovljenim injektovanjem pozitivnog uzorka uz korišćenje proširene MS metode sa dodatnim SRM prelazima (slika 11b). U slučajevima kada prekursor jon fragmentacijom daje samo jedan produkt jon, potvrda se može postići daljom fragmentacijom fragmentnog jona, tj. MS^3 analizom (slika 12c). Na spektrima su elipsom označeni fragmentni joni odabrani za kvantifikaciju svakog analita, dok su pravougaonikom označeni joni odabrani za potvrdu prisustva analita.

VEŽBA BR. 1 Analiza uzorka rečne vode na prisustvo lekova i pesticida

Za ekstrakciju odabranih analita iz uzorka rečne vode koristi se SPE procedura prikazana na slici 14. U cilju kvantifikacije detektovanih lekova i pesticida, uporedo sa uzorkom vode, po istoj SPE proceduri, priprema se i uzorak vode u kome se dodaje 1 cm^3 standardnog rastvora odabranih analita koncentracije 100 ng cm^{-3} .

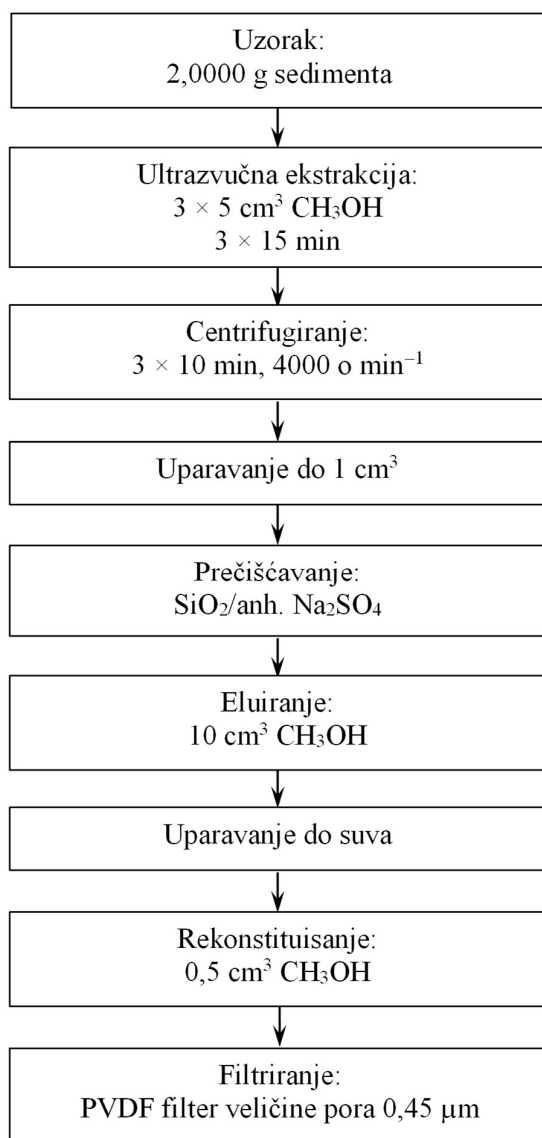


Slika 14. SPE procedura za pripremu uzorka vode.

Nakon filtriranja u bočice za autosempler, dobijeni ekstrakti se analiziraju HPLC-MS tehnikom, primenom prethodno razvijene metode za analizu 13 lekova i 12 pesticida koji su najčešće korišćeni i detektovani u Republici Srbiji.

VEŽBA BR. 2 Analiza uzorka rečnog sedimenta na prisustvo lekova i pesticida

Uzorak rečnog sedimenta je prethodno sušen na sobnoj temperaturi u mraku tokom sedam dana. Nakon sušenja, određen je sadržaj vlage u sedimentu. Na sahatnom staklu je odmereno oko 2,0000 g sedimenta koji je zatim sušen u sušnici na 105 °C. Iz razlike u masi pre i posle sušenja, određen je sadržaj vlage u sedimentu, koji je bio manji od 0,05%. Osušeni uzorak sedimenta je zatim prosejan kroz sito veličine pora 500 μm , da bi se uklonile mehaničke nečistoće koje bi mogle ometati analizu. Za ekstrakciju odabranih analita iz uzorka sedimenta koristi se USE procedura prikazana na slici 15. U cilju kvantifikacije detektovanih lekova i pesticida, uporedo sa uzorkom sedimenta, po istoj USE proceduri, priprema se i uzorak sedimenta u kome se dodaje 1 cm^3 standardnog rastvora analita koncentracije 100 ng cm^{-3} .



Slika 15. USE procedura za pripremu uzorka sedimenta.

Kao i kod analize uzoraka vode, nakon filtriranja u bočice za autosempler, dobijeni ekstrakti se analiziraju HPLC-MS tehnikom, primenom prethodno razvijene metode za analizu odabranih lekova i pesticida.