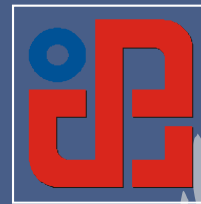




Univerzitet u Novom Sadu
FAKULTET TEHNIČKIH NAUKA
DEPARTMAN ZA PROIZVODNO MAŠINSTVO
Novi Sad, Srbija



MEĐUNARODNA NAUČNA KONFERENCIJA

INTERNATIONAL SCIENTIFIC CONFERENCE

ETIKUM 2018

ZBORNIK RADOVA
PROCEEDINGS

NOVI SAD DECEMBAR/DECEMBER 2018



University of Novi Sad
Faculty of Technical Sciences
Department of Production Engineering



ETIKUM 2018

PROCEEDINGS

Novi Sad, 06-08 December 2018

PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL SCIENTIFIC CONFERENCE
ETIKUM 2018
Novi Sad 2018

Publisher: **UNIVERSITY OF NOVI SAD, FACULTY OF TECHNICAL SCIENCES
DEPARTMENT OF PRODUCTION ENGINEERING
CHAIR OF METROLOGY, QUALITY, FIXTURES, TOOLS AND
ECOLOGICAL ENGINEERING ASPECTS
21000 NOVI SAD, Trg Dositeja Obradovica 6, SERBIA**

Organization of this Conference was approved by Educational-scientific Council of Faculty of Technical Sciences in Novi Sad

Technical treatment and design: Boris AGARSKI,
Milana ILIĆ MIĆUNOVIĆ,
Željko SANTOŠI.

CIP classification:

CIP - Каталогизacija у публикацији
Библиотека Матице српске, Нови Сад

621:658.562(082)
502.175(082)

INTERNATIONAL Scientific Conference ETIKUM (12 ; 2018 ; Novi Sad)

Proceedings [Elektronski izvor] / [Scientific Conference with International Participation]
ETIKUM 2018, Novi Sad, 06-08 December 2018. - Novi Sad : Faculty of Technical Sciences,
Department of Production Engineering, 2018

Dostupno i na: <http://www.dpm.ftn.uns.ac.rs/index.php/etikum>. - Nasl. sa naslovnog ekrana. -
Opis zasnovan na stanju na dan 28.11.2018. - Radovi na srp. i engl. jeziku. - Tekst štampan
dvostubačno. - Str. [5-6]: Predgovor / Programski i organizacioni odbor = Foreword /
Programme and Organizing Committee. - Bibliografija uz svaki rad.

ISBN 978-86-6022-123-2

a) Производно машинство - Контрола квалитета - Зборници b) Животна средина -
Контрола квалитета - Зборници
COBISS.SR-ID 326951431

Gvozdić, E., Matić Bujagić, I., Tolić Stojadinović, Lj., Grujić, S., Đurkić, T.

PRIPREMA UZORAKA VODE ZA ANALIZU VEŠTAČKIH ZASLAĐIVAČA

Rezime: Veštački zaslađivači se decenijama koriste kao aditivi u hrani, piću i farmaceutskim proizvodima. Savremena istraživanja su pokazala široku rasprostranjenost ovih supstanci u prirodnim i otpadnim vodama, zbog čega su svrstani u klasu emergentnih zagađujućih materija. U ovom radu je prikazana optimizacija metode pripreme uzoraka vode ekstrakcijom na čvrstoj fazi za određivanje tragova odabranih veštačkih zaslađivača. Ova metoda omogućava istovremeno izolovanje i koncentrovanje analita, ali i prečišćavanje ekstrakta uzorka. Prilikom razvoja metode izvršen je izbor optimalnog adsorbenta, zapremine i pH vrednosti uzorka vode, kao i rastvarača za eluiranje analita sa pakovanja kolone. Dobijeni ekstrakti su analizirani metodom tečne hromatografije–masene spektrometrije.

Ključne reči: emergentne zagađujuće materije; veštački zaslađivači; ekstrakcija na čvrstoj fazi; tečna hromatografija–masena spektrometrija.

1. UVOD

Veštački zaslađivači su supstance koje se koriste za postizanje slatkog ukusa prehrambenih i farmaceutskih proizvoda, ali za razliku od šećera odlikuje ih niska ili nulta energetska vrednost [1]. Ova jedinjenja se uglavnom ne metabolišu u ljudskom telu i izlučuju se nepromenjena. Glavni put dospevanja veštačkih zaslađivača u životnu sredinu predstavljaju komunalne otpadne vode. Posebno je zabrinjavajuće što se ove supstance ne uklanjaju u potpunosti u postrojenjima za prečišćavanje otpadnih voda, što dovodi do njihovog kontinualnog unosa u vodenu sredinu. Njihovo ponašanje u životnoj sredini i dugoročni ekotoksikološki uticaj i dalje su nepoznati, pa su iz tog razloga svrstani u klasu emergentnih zagađujućih materija [2,3]. Pored toga, prisustvo veštačkih zaslađivača u prirodnim vodama može da se koristi kao indikator zagađenja komunalnim otpadnim vodama [4].

Dosadašnja istraživanja pokazuju široku rasprostranjenost veštačkih zaslađivača u različitim matricama iz životne sredine, pri čemu su koncentracije acesulfama i sukraloze najveće (do nekoliko stotina $\mu\text{g L}^{-1}$) [5]. S obzirom na to da su veštački zaslađivači u prirodnim i otpadnim vodama prisutni u veoma niskim koncentracijama, neophodna je osetljiva i pouzdana analitička metoda za određivanje tragova ovih supstanci u vodi. Pregledom literature zaključeno je da je najčešće korišćena instrumentalna tehnika za određivanje ovih jedinjenja tečna hromatografija u sprezi sa tandem masenom spektrometrijom (eng. liquid chromatography–tandem mass spectrometry, LC–MS/MS) [5]. Takođe, ekstrakcija na

čvrstoj fazi (eng. solid-phase extraction, SPE) predstavlja vodeću analitičku metodologiju za izolovanje i predkoncentrisanje veštačkih zaslađivača iz vode, kao i za prečišćavanje ekstrakta uzorka [5–7].

U ovom radu je prikazana optimizacija metode pripreme uzoraka vode ekstrakcijom na čvrstoj fazi za određivanje tragova najčešće korišćenih veštačkih zaslađivača - acesulfama, saharina, ciklamata, sukraloze, aspartama, neohesperidin dihidrohalkona (NHDC) i neotama.

2. EKSPERIMENTALNI DEO

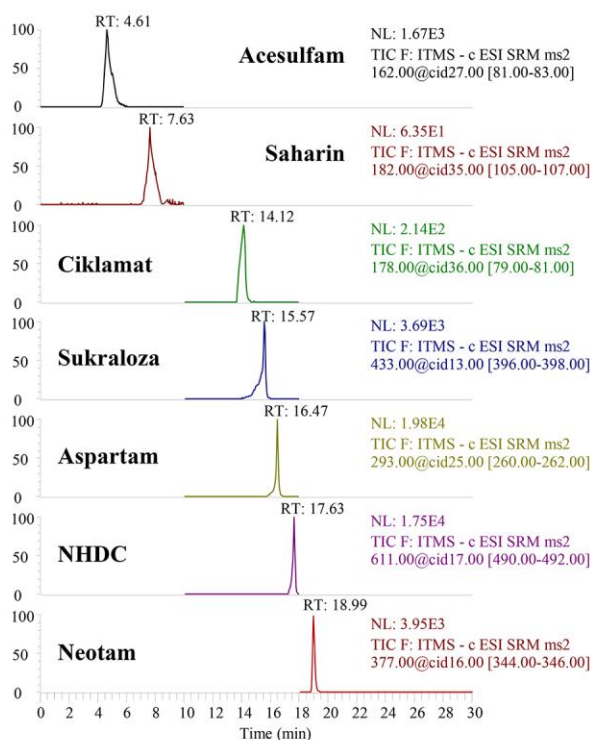
2.1 Hemikalije i reagensi

Standardne supstance pet veštačkih zaslađivača (acesulfam, saharin, ciklamat, sukraloza, aspartam) su nabavljene od proizvođača Sigma-Aldrich (Sent Luis, SAD). NHDC i neotam su kupljeni od proizvođača TCI Europe (Pariz, Francuska). Sve standardne supstance su bile visoke čistoće ($\geq 98\%$). Metanol je nabavljen od proizvođača VWR Chemicals (Brijar, Francuska), a acetonitril od proizvođača Sigma-Aldrich (Sent Luis, SAD). Amonijum-acetat je kupljen od proizvođača Fisher Chemical (Lafboro, Velika Britanija). Za podešavanje pH vrednosti uzoraka vode korišćena je koncentrovana sirćetna kiselina. Svi rastvarači su bili HPLC stepena čistoće.

2.2 LC–MS/MS analiza

LC–MS/MS analiza odabranih veštačkih zaslađivača izvršena je na Dionex UltiMate® 3000 HPLC sistemu u sprezi sa LTQ XL linearnim jonskim trapom kao masenim spektrometrom, proizvođača Thermo Fisher Scientific (Voltam,

SAD). Kao jonizacija tehnika korišćena je elektrosprej jonizacija u negativnom režimu rada. Za hromatografsko razdvajanje korišćena je reverzno-fazna kolona: Luna C8 (3,0 mm × 150 mm × 3 μm), proizvođača Phenomenex (Torans, SAD). Mobilna faza se sastojala od vode (A), metanola (B) i 1% rastvora amonijum-acetata (C). Optimalno hromatografsko razdvajanje je postignuto primenom gradijenta pri konstantnom protoku 0,33 mL min⁻¹. Gradijent se menjao na sledeći način: 0 min, A 84% B 15% C 1%; 8 min, A 84% B 15% C 1%; 13 min, A 34% B 65 % C 1%; 15 min, B 100%; 20 min, B 100%. Nakon toga, početni uslovi su ponovo uspostavljeni i držani tokom 10 min.



Sl. 1. Maseni hromatogrami odabranih veštačkih zaslađivača dobijeni LC-MS/MS analizom standardnog rastvora koncentracije 500 ng mL⁻¹

Pri uspostavljanju maseno-spektrometrijskog protokola, za svaki analit odabran je prekursor jon koji je dalje fragmentisan uz optimizaciju kolizione energije. Kao prekursor joni za sve analite odabrani su deprotonovani molekuli, osim u slučaju sukraloze, za koju je odabran adukt sa hlorom. Najintenzivniji i najstabilniji fragmenti jon je izabran za kvantifikaciju svakog analita. Na osnovu rezultata MSⁿ analize, pored reakcije fragmentacije za kvantitativno određivanje (slika 1), odabrana je i reakcija za potvrdu prisustva svakog zaslađivača.

2.3 SPE optimizacija

Prilikom optimizacije metode ekstrakcije na

čvrstoj fazi testirani su sledeći parametri: vrsta adsorbenta, pH vrednost i zapremina uzorka vode, kao i vrsta rastvarača za eluiranje. Ispitivana je pogodnost jono-izmenjivačkih, polimernih, C18 i ugljeničnih adsorbenata za ekstrakciju odabranih veštačkih zaslađivača. Testirano je osam SPE kertridža različitih proizvođača: Supelclean LC-SAX (500 mg/3 mL), Supelclean ENVI-18 (500 mg/6 mL), Supelclean LC-18 (500 mg/3 mL), Supelclean ENVI-Carb (500 mg/6 mL) od proizvođača Supelco (Belfont, SAD); Oasis MAX (30 mg/1 mL), Oasis HLB (200 mg/6 mL) od proizvođača Waters (Milford, SAD); Bakerbond SDB-1 (30 mg/1 mL) od proizvođača J.T. Baker (Filipsburg, SAD); i Strata X (200 mg/6 mL) od proizvođača Phenomenex (Torans, SAD).

U odgovarajuću zapreminu dejonizovane vode dodat je standardni rastvor smeše sedam zaslađivača tako da početna koncentracija za svaki analit u uzorku bude 5 ng mL⁻¹. SPE kolone su kondicionirane sa 5 mL metanola, a zatim sa 5 mL dejonizovane vode, bez podešavanja pH. Pripremljeni uzorci su nanošeni na kertridže, koji su potom sušeni na vakuumu 10 min. Zatim su analiti eluirani sa 10 mL metanola. Dobijeni ekstrakti su uparavani i rekonstituisani do zapremine od 1 mL pomoću metanola. Nakon toga, finalni ekstrakti su filtrirani kroz 0,45 μm poli(viniliden-fluorid) filtere (PVDF), od proizvođača Roth (Karlsruhe, Nemačka).

Nakon izbora odgovarajućeg adsorbenta, ispitivana je optimalna pH vrednost uzorka vode. Testirane su sledeće vrednosti: 2,0, 3,0 i 6,0. Navedeni eksperimenti su izvedeni na isti način kao u prethodnom ispitivanju optimalnog adsorbenta.

U cilju ispitivanja kapaciteta adsorbenta za ekstrakciju analita i sprečavanja ispiranja zaslađivača sa kolone u sledećem koraku SPE optimizacije testirane su sledeće zapremine uzorka vode koje se nanose na kertridž: 50 mL, 100 mL i 250 mL. Eksperimenti su izvedeni na isti način kao u prethodnom koraku optimizacije, uz podešavanje pH uzorka na optimalnu vrednost.

Konačno, kao rastvarači za eluiranje analita sa pakovanja kolone testirani su metanol i acetonitril. Oba navedena eksperimenta su izvedena pod istim uslovima, a za ekstrakciju zaslađivača korišćena je zapremina eluenta od 10 mL.

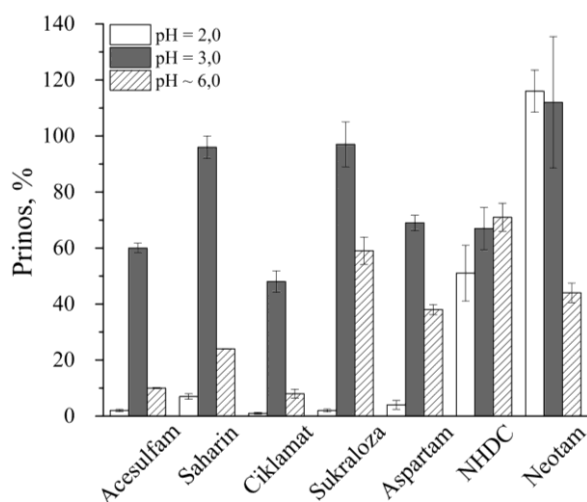
3. REZULTATI I DISKUSIJA

Na osnovu rezultata eksperimenata optimizacije adsorbenta, koji su prikazani u tabeli 1, može se zaključiti da su najveći prinosi metode za većinu zaslađivača dobijeni kada su korišćeni Oasis HLB kertridži.

Tabela 1. Prinosi metode pri korišćenju različitih adsorbenata

	Prinos, % (RSD, %)							
	Supelclean LC-SAX	Oasis MAX	Supelclean LC-18	Supelclean ENVI-18	Supelclean ENVI-Carb	Bakerbond SDB-1	Strata X	Oasis HLB
Acesulfam	0 (0)	0 (0)	2 (14)	1 (19)	0 (0)	1 (19)	2 (5)	10 (2)
Saharin	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	7 (2)	24 (1)
Ciklamat	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	8 (19)
Sukraloza	1 (17)	48 (4)	91 (13)	46 (12)	106 (5)	82 (3)	88 (7)	59 (13)
Aspartam	3 (9)	74(1)	86 (2)	82 (2)	1 (19)	3 (12)	75 (6)	38 (5)
NHDC	19 (3)	72 (4)	80 (7)	94 (3)	0 (0)	32 (18)	94 (2)	71 (7)
Neotam	5 (13)	103 (4)	75 (5)	98 (3)	0 (0)	74 (4)	87 (5)	44 (8)

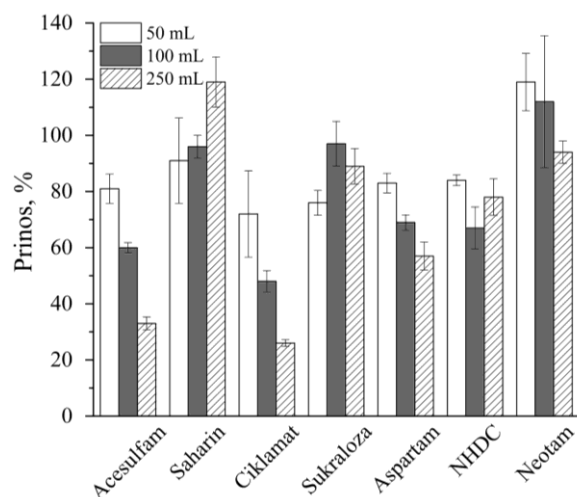
Visoki prinosi se mogu objasniti time što Oasis HLB adsorbent sadrži polimer na bazi *N*-vinilpirolidona sa divinil-benzenom i tako poseduje hidrofilna (*N*-vinil-pirolidon) i lipofilna (divinilbenzen) svojstva, što je pogodno za ekstrakciju širokog spektra analita različitih polarnosti. S druge strane, C18 (Supelclean LC-18, Supelclean Envi-18), jono-izmenjivački (Oasis MAX) i polimerni Strata X adsorbenti su pokazali visoku efikasnost ekstrakcije (46%–103%) za četiri analita (sukraloza, aspartam, NHDC i neotam). Dodatno, svi adsorbenti osim Oasis HLB su pokazali minimalnu efikasnost za ekstrakciju acesulfama, saharina i ciklamata (0%–7%). Ovi rezultati su u skladu sa drugim studijama, kod kojih su takođe dobijeni niski prinosi za tri zaslađivača u prvim koracima SPE optimizacije [5,6]. Veoma nisku efikasnost ekstrakcije su pokazali polimerni Bakerbond SDB-1, jonoizmenjivački Supelclean LC-SAX, kao i ugljenični adsorbent Supelclean ENVI-Carb. Na osnovu navedenih rezultata, Oasis HLB kertridž je izabran kao optimalan za dalji razvoj SPE metode.



Sl. 2. Optimizacija pH vrednosti uzorka vode

Utvrđeno je da je pH vrednost uzorka vode izuzetno značajan parametar za povećanje efikasnosti ekstrakcije odabranih veštačkih zaslađivača. Za većinu analita, najveći prinosi (69%–112%) su dobijeni kada je pH vrednost bila

podešena na 3,0 (slika 2). U odnosu na ekstrakciju bez podešavanja pH uzorka, značajno su bili povećani prinosi za acesulfam (za 50%), saharin (za 72%), ciklamat (za 40%) i sukralozu (38%), što se slaže sa podacima iz literature kada su vršeni slični eksperimenti [5]. Zbog toga je pH vrednost 3,0 za uzorak vode izabrana kao optimalna u daljim eksperimentima SPE optimizacije.

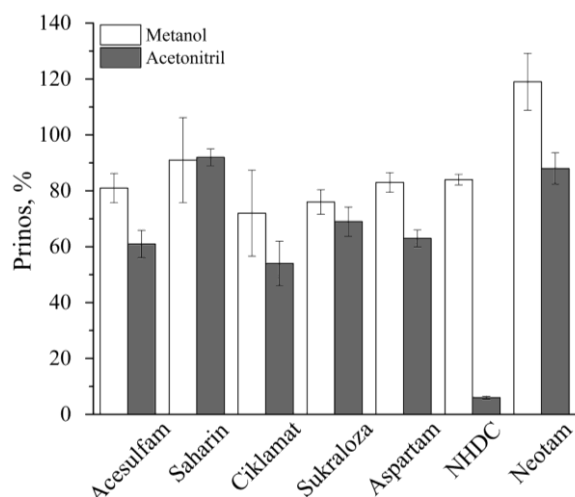


Sl. 3. Optimizacija zapremine uzorka vode

Pri odabiru optimalne zapremine uzorka vode zaključeno je da 50 mL uzorka obezbeđuje dovoljno visok faktor predkoncentrisanja uz kraće vreme eksperimenta (slika 3). S druge strane, kada su nanošene veće zapremine uzorka utvrđeno je da dolazi do ispiranja acesulfama i ciklamata sa pakovanja kolone, što je rezultovalo značajno nižim prinosisima metode za ova dva analita.

U daljim eksperimentima, prilikom testiranja metanola i acetonitrila kao rastvarača za eluiranje, primenom metanola dobijeni su zadovoljavajući prinosi metode (72–119%, slika 4), dok su sa acetonitrirom dobijeni prinosi koji nisu bili prihvatljivi za većinu veštačkih zaslađivača (<70%). Ovakvi rezultati se mogu objasniti slabom rastvorljivošću pojedinih analita u acetonitrilu, zbog čega je metanol odabran kao optimalan eluent. Takođe, utvrđeno je da je zapremina od 10 mL metanola dovoljna da se svi

analiti potpuno eluiraju sa pakovanja kolone.



Sl. 4. Optimizacija vrste rastvarača za eluiranje

4. ZAKLJUČAK

Pri optimizaciji metode ekstrakcije na čvrstoj fazi, kao metode pripreme uzorka vode za određivanje tragova veštačkih zaslađivača, odabrani su parametri koji obezbeđuju visok stepen izolovanja izabranih analita. Optimizovana SPE metoda podrazumeva nanošenje 50 mL uzorka vode, kome je prethodno podešena pH vrednost na 3,0, na Oasis HLB adsorbent, pri čemu se analiti eluiraju sa pakovanja kolone pomoću 10 mL metanola.

Razvijena SPE metoda može se koristiti kao metoda pripreme uzorka za LC-MS/MS analizu tragova veštačkih zaslađivača u podzemnim, površinskim i otpadnim vodama, kao i u vodi za piće.

5. ZAHVALNICA

Izradu ovog rada je finansiralo Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (br. projekta ON 172007).

6. REFERENCE

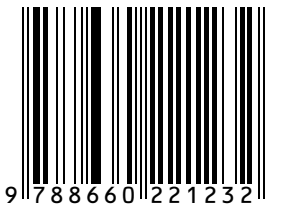
- [1] Caroch, M., Morales, P., Ferreira, I.: *Sweeteners as food additives in the XXI century: A review of what is known, and what is to come*, Food Chem. Toxicol., 107, 302–317, 2017.
- [2] Lange, F.T., Scheurer, M., Brauch, H.: *Artificial sweeteners – a recently recognized class of emerging environmental contaminants: a review*, Anal. Bioanal. Chem., 403, 2503–2518, 2012.

- [3] Houtman, C.J.: *Emerging contaminants in surface waters and their relevance for the production of drinking water in Europe*, J. Integr. Environ. Sci., 7, 271–295, 2017.
- [4] Tran, N.H., Hu, J., Li, J., Ong, S.L.: *Sustainability of artificial sweeteners as indicators of raw wastewater contamination in surface water and groundwater*, Water Res., 48, 443–456, 2014.
- [5] Kokotou, M.G., Asimakopoulos, A.G., Thomaidis, N.S.: *Artificial sweeteners as emerging pollutants in the environment: analytical methodologies and environmental impact*, Anal. Methods, 4, 3057–3070, 2012.
- [6] Zygler, A., Wasik, A., Namiesnik, J.: *Retention behaviour of some high-intensity sweeteners on different SPE sorbents*, Talanta, 82, 1742–1748, 2010.
- [7] Arbeláez, P., Borrull, F., Pocurull, E., Marcé, R.M.: *Determination of high-intensity sweeteners in river water and wastewater by solid-phase extraction and liquid-phase chromatography–tandem mass spectrometry*, J. Chrom. A, 1393, 106–114, 2015.

Autori: Eleonora Gvozdić, istraživač pripravnik, dr Ljiljana Tolić Stojadinović, istraživač saradnik, Inovacioni centar Tehnološko-metalurškog fakulteta, Karnegijeva 4, 11120 Beograd, Srbija, Tel: +381 11 3370 410, Fax: +381 11 3370 400. **Dr Ivana Matić Bujagić, naučni saradnik, prof. dr Svetlana Grujić, vanredni profesor, prof. dr Tatjana Đurkić, redovni profesor,** Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, Karnegijeva 4, 11120 Beograd, Srbija, Tel: +381 11 3370 410, Fax: +381 11 3370 387.

E mail: egvozdic@tmf.bg.ac.rs
ljtolic@tmf.bg.ac.rs
imatic@tmf.bg.ac.rs
cekili@tmf.bg.ac.rs
tanjav@tmf.bg.ac.rs

ISBN 978-86-6022-123-2



9 788660 221232