

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ  
ТЕХНОЛОШКО-МЕТАЛУРШКИ ФАКУЛТЕТ

Елеонора Ж. Гвоздић

**Развој и примена HPLC–MS/MS методе за  
испитивање присуства вештачких  
заслађивача као индикатора комуналног  
загађења воде и седимената**

докторска дисертација

Београд, 2023

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Eleonora Ž. Gvozdić

**Development and application of the HPLC–  
MS/MS method for determination of the  
presence of artificial sweeteners as indicators  
of municipal pollution of water and sediments**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2023

Ментор:

---

Др Светлана Грујић, ванредни професор  
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

Чланови комисије:

---

Др Татјана Ђуркић, редовни професор  
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

---

Др Дубравка Релић, ванредни професор  
Универзитет у Београду, Хемијски факултет

Датум одбране: \_\_\_\_\_

## Захвалница

*Ова докторска дисертација је урађена на Катедри за аналитичку хемију и контролу квалитета Технолошко-металуришког факултета Универзитета у Београду.*

*Велику захвалност дугујем својој менторки проф. др Светлани Грујић, ванредном професору Технолошко-металуришког факултета, на указаном поверењу, као и стручном и свеобухватном залагању током израде ове докторске дисертације.*

*Посебно, изражавам велику захвалност др Ивани Матић Бујагић на подршци и издвојеном времену у експерименталном раду, као и несебичној стручној помоћи коју ми је пружала у мом почетном научном истраживању.*

*Најтоплије се захваљујем свим колегиницама и колегама са Катедре за аналитичку хемију и контролу квалитета и Катедре за инжењерство заштите животне средине на стручној и безрезервној подршци у свим фазама израде ове докторске дисертације.*

*Посебно се захваљујем проф. др Татјани Ђуркић, редовном професору Технолошко-металуришког факултета, на веома корисним сугестијама и подршци током целокупног научно-истраживачког рада.*

*Најсрдачније се захваљујем проф. др Дубравки Релић, ванредном професору Хемијског факултета Универзитета у Београду, на лепој сарадњи и издвојеном времену приликом анализе моје докторске дисертације.*

*Захваљујем се Институту за водопривреду Јарослав Черни на помоћи приликом прикупљања узорака за анализу.*

*Захваљујем се Марији, Данијели и Ивану на заједничком раду, потпори и креативним тренуцима које смо делили током читавог времена.*

*Посебну захвалност дугујем проф. др Борису Лончару, бившем редовном професору Технолошко-металуришког факултета, који ми је пружио велику подршку и поверење и омогућио да ушетам у поље научних истраживања.*

*Такође, велику захвалност изражавам мојим теткама Мири, Дари и Милки које су ми биле искрени и несебични ослонац на свим пољима.*

*Највећу захвалност дугујем мојој мајци Јасни чија је подршка и вера осветљавала пут мог напретка током израде ове дисертације и читавог школовања.*

*Ову докторску дисертацију посвећујем оцу Жељку и брату Вуку.*

## **Сажетак**

Вештачки заслађивачи се широко користе у прехранбеним и фармацеутским производима, а као већином метаболички инертна једињења путем комуналних отпадних вода непромењени доспевају у животну средину. Ова једињења припадају новој класи емергентних загађујућих материја чије присуство у акватичним екосистемима може негативно утицати на осетљиве организме. За одређивање трагова вештачких заслађивача у комплексним матрицама из животне средине не постоји референтна метода, због чега развој брзе и прецизне аналитичке методе која може да пружи поуздане информације о загађености акватичних екосистема овим супстанцама представља изазов. У овој докторској дисертацији су приказани развој, оптимизација, валидација и примена нове, селективне и осетљиве мултирезидуалне методе течне хроматографије високих перформанси у спрези са тандем масеном спектрометријом за истовремено одређивање осам вештачких заслађивача у узорцима површинске, подземне и отпадне воде, као и речних седимената. За ефикасно изоловање и предконцентрисање заслађивача из узорака воде развијена је и оптимизована метода екстракције на чврстој фази, док је за анализу ових једињења у седиментима развијена метода ултразвучне екстракције. Узимајући у обзир значај Дунавског екосистема, извршена је свеобухватна процена загађења вештачким заслађивачима реке Дунав и њених главних притока у Републици Србији – Тисе, Саве и Мораве, као последица испуштања нетретираних комуналних отпадних вода, као и интегрисана процена екотоксиколошког утицаја на водене и бентосне организме. Резултати су показали широку распрострањеност ових једињења у сливу Дунава у Републици Србији, указујући на значајно канализационо загађење, при чему је утврђен висок екотоксиколошки ризик за бентосне организме што захтева увођење вештачких заслађивача у редовне мониторинг програме и унапређење третмана канализационих вода.

**Кључне речи:** вештачки заслађивачи, емергентне загађујуће материје, комунална отпадна вода, течна хроматографија–тандем масена спектрометрија, речна вода, речни седименти, процена екотоксиколошког ризика, слив Дунава

**Научна област:** Инжењерство заштите животне средине

**Abstract**

Artificial sweeteners are widely used in food and pharmaceutical products, and as mostly metabolically inert compounds, they reach the environment in an unchanged form through municipal wastewater. These compounds belong to a new class of emerging contaminants whose presence in aquatic ecosystems can adversely affect sensitive organisms. There is no reference method for the determination of traces of artificial sweeteners in complex environmental matrices, which is why the development of a fast and precise analytical method that can provide reliable information on the pollution of aquatic ecosystems by these substances is a challenge. This doctoral dissertation shows the development, optimization, validation, and application of a new, selective, and sensitive multiresidue method of high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the simultaneous determination of eight artificial sweeteners in surface, ground, and wastewater samples, as well as in river sediments. An optimized solid-phase extraction method was developed for efficient isolation and preconcentration of sweeteners from water samples, while an ultrasonic extraction method was developed for the analysis of these compounds in sediments. Taking into account the importance of the Danube ecosystem, a comprehensive assessment of the pollution by artificial sweeteners of the Danube River and its main tributaries in the Republic of Serbia - Tisa, Sava, and Morava, as a consequence of the untreated municipal wastewater discharge was carried out, as well as an integrated assessment of the ecotoxicological impact on aquatic and benthic organisms. The results showed a wide distribution of these compounds in the Danube River Basin in the Republic of Serbia, indicating a significant sewage pollution, with a high ecotoxicological risk for benthic organisms, which requires the introduction of artificial sweeteners in regular monitoring programs and the improvement of sewage treatment.

**Keywords:** artificial sweeteners, emerging contaminants, municipal wastewater, liquid chromatography–tandem mass spectrometry, river water, river sediments, environmental risk assessment, Danube River Basin

**Scientific field:** Environmental Protection Engineering

**Садржај**

1. УВОД.....	1
2. ТЕОРИЈСКИ ДЕО .....	3
2.1. Вештачки заслађивачи – основни појмови и својства.....	3
2.2. Извори вештачких заслађивача у животној средини .....	7
2.3. Присуство и стабилност вештачких заслађивача у животној средини.....	8
2.4. Проблем присуства вештачких заслађивача у животној средини и екотоксичност .....	13
2.5. Вештачки заслађивачи као индикатори загађења комуналним отпадним водама.....	14
2.6. Уклањање вештачких заслађивача у постројењима за пречишћавање отпадних вода..	16
2.7. Законска регулатива везана за вештачке заслађиваче .....	17
2.8. Аналитичко одређивање вештачких заслађивача у узорцима воде и седимената .....	17
2.8.1. Припрема узорака воде за одређивање трагова вештачких заслађивача .....	18
2.8.2. Припрема узорака седимената за одређивање трагова вештачких заслађивача.....	19
2.8.3. Течна хроматографија високих перформанси.....	20
2.8.4. Масена спектрометрија .....	22
2.8.4.1. Технике јонизације .....	22
2.8.4.2. Масени анализатори .....	24
2.8.4.3. Тандем масена спектрометрија .....	25
2.8.5. HPLC–MS/MS анализа .....	25
3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО .....	26
3.1. Припрема раствора вештачких заслађивача и коришћени реагенси .....	26
3.2. Снимање масених спектра вештачких заслађивача.....	26
3.3. Оптимизација хроматографског раздвајања вештачких заслађивача.....	28
3.4. Оптимизација HPLC–MS/MS параметара.....	28
3.5. Припрема узорака .....	28
3.5.1. Оптимизација екстракције на чврстој фази узорака воде.....	28
3.5.1.1. Избор SPE сорбента.....	28
3.5.1.2. Избор рН вредности узорака .....	30
3.5.1.3. Избор запремине узорака.....	30
3.5.1.4. Избор растварача за елуирање.....	30
3.5.2. Оптимизација ултразвучне екстракције узорака седимената.....	30
3.6. Калибрација .....	31
3.7. Валидација метода.....	31

## Садржај

3.8. Процена екотоксиколошког ризика .....	32
3.9. Узорковање природних и отпадних вода и речних седимената .....	33
4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА .....	37
4.1. Масени спектри одабраних вештачких заслађивача .....	37
4.2. Оптимизација хроматографског раздвајања вештачких заслађивача.....	43
4.3. Оптимизација HPLC–MS/MS параметара.....	45
4.4. Припрема узорака .....	47
4.4.1. Оптимизација екстракције на чврстој фази узорака воде.....	47
4.4.1.1. Избор SPE сорбента .....	47
4.4.1.2. Избор рН вредности узорака .....	48
4.4.1.3. Избор запремине узорака.....	49
4.4.1.4. Избор растварача за елуирање.....	50
4.4.2. Оптимизација ултразвучне екстракције узорака седимената .....	51
4.5. Валидација метода.....	51
4.6. Анализа узорака површинске, подземне и отпадне воде .....	54
4.7. Анализа узорака седимената .....	59
4.8. Потврда присуства вештачких заслађивача у реалним узорцима .....	60
4.9. Процена екотоксиколошког ризика .....	63
5. ЗАКЉУЧАК .....	67
ЛИТЕРАТУРА .....	70
ПРИЛОГ .....	80
ОБЈАВЉЕНИ НАУЧНИ РАДОВИ ИЗ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ .....	89
БИОГРАФИЈА АУТОРА .....	90



## 1. УВОД

Након вишедеценијске примене вештачких заслађивача у прехранбеној и фармацеутској индустрији, истраживања у последњој деценији су показала да се ове супстанце могу детектовати у акватичним екосистемима широм света због чега све више привлаче пажњу светске научне јавности. Због њихове свеprisутности у животној средини и недостатка података о понашању у природном окружењу, као и потенцијалне екотоксичности, ова једињења су препозната као нова класа емергентних загађујућих материја (енг. *emerging contaminants*). Посебно је забрињавајуће да су неки од њих, попут ацесулфама и сукралозе, детектовани у подземним водама и води за пиће. С друге стране, све је већи фокус научних истраживања на откривању идеалних маркера загађења пореклом од комуналних отпадних вода, које са собом носи велики здравствени и еколошки ризик. Вештачки заслађивачи представљају веома погодне хемијске индикаторе за откривање канализационог загађења у акватичним екосистемима због њихове високе специфичности и распрострањености у комуналним водама, са много већим концентрацијама од других показатеља контаминације (лекова, производа за личну хигијену, кофеина, итд.), као и велике стабилности у животној средини. Процена загађења животне средине вештачким заслађивачима у Републици Србији је знатно олакшана, јер су постројења за пречишћавање комуналних отпадних вода малобројна, због чега се нетретирани воде из домаћинства испуштају директно у реке нарушавајући квалитет водених ресурса.

Вештачки заслађивачи, као емергентне загађујуће материје, нису укључени у редовне програме мониторинга вода и не постоји референтна метода за њихово одређивање у животној средини. Иако у научној литератури постоје радови који се баве овом проблематиком, поуздана, прецизна и селективна метода за одређивање ових материја у траговима у различитим матрицама из животне средине и даље представља аналитички изазов. Водећа аналитичка методологија за одређивање вештачких заслађивача у узорцима воде подразумева употребу течне хроматографије високих перформанси у спрези са тандем масеном спектрометријом (енг. *high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry*, HPLC–MS/MS). Међутим, до сада развијене методе се углавном односе на анализу појединачних заслађивача или мањег броја у специфичној воденој матрици. С друге стране, постоји само неколико студија које се баве анализом присуства вештачких заслађивача у седиментима, при чему не постоји развијена и валидирана метода за ову врсту матрице. С обзиром на различита физичко-хемијска својства разних вештачких заслађивача, као и њихово очекивано присуство у свим матрицама из животне средине, постоји потреба за мултирезидуалном методом за одређивање трагова најчешће коришћених вештачких заслађивача у различитим воденим матрицама (површинска, подземна, отпадна), као и у седиментима.

Циљ ове докторске дисертације је развој и примена нове, селективне и осетљиве мултирезидуалне HPLC–MS/MS методе за истовремено одређивање осам најчешће коришћених вештачких заслађивача у узорцима воде и речних седимената. За ефикасну екстракцију узорака воде биће развијена метода екстракције на чврстој фази (енг. *solid-phase extraction*, SPE), док ће за припрему речних седимената бити развијена метода ултразвучне екстракције (енг. *ultrasonic solvent extraction*, USE). Оптимизована и валидирана метода ће бити примењена у анализи већег броју узорака речне, подземне и отпадне воде, као и речних седимената, сакупљених из реке Дунав и главних притока у Републици Србији – Тисе, Саве и Мораве, као и из канализационих испуста. Постоји ограничен број европских студија о загађењу река вештачким заслађивачима, а само неколико се бави реком Дунав и њеним притокама (Loos et al. 2009; Scheurer et al. 2009; Moldovan et al., 2018). С обзиром на значај

## *Увод*

ове реке, циљ дисертације је и да се процени потенцијална опасност за екосистем Дунава од испуштања непречишћених комуналних отпадних вода дуж целог тока у Републици Србији, тј. да се процени еколошки ризик за слатководне и бентосне организме. Свеобухватна процена загађења акватичног екосистема вештачким заслађивачима која укључује и водену средину и седименте још увек није забележена у литератури. Поред тога, по први пут ће бити извршена интегрисана процена ризика по животну средину која укључује и водене и бентосне организме.

## 2. ТЕОРИЈСКИ ДЕО

### 2.1. Вештачки заслађивачи – основни појмови и својства

Вештачки заслађивачи представљају синтетичке супстанце различитих хемијских структура које се користе као замене за шећер и као појачивачи укуса у прехранбеним производима, а могу се наћи и у лековима и средствима за оралну хигијену (O'Brien Nabors 2001; Carocho et al. 2017). Ове супстанце поседују велику моћ заслађивања која је од неколико стотина до неколико хиљада пута већа од обичног шећера (Chattopadhyay et al. 2014). Одликује их нулта енергетска вредност, па се често због тога називају и нутритивни или нискокалорични заслађивачи (Shankar et al. 2013). Немају кариогени потенцијал и не изазивају гликемијски одговор, тако да се интензивно примењују у нискокалоричним дијетама код пацијената са дијабетесом и другим специфичним обољењима где се унос калорија мора контролисати (Carocho et al. 2017).

Молекули вештачких заслађивача при интеракцији са рецепторима на језику генеришу слadak укус који опонаша сензорна својства сахарозе. Међутим, код ингестије ових супстанци често се јавља и метални, горак или кисео укус, који се може маскирати употребом других заслађивача (Mora и Dando 2021; Wang et al. 2022). Најважнија одлика заслађивача је његова слаткоћа која се одређује у односу на сахарозу која представља референтни шећер. Тако раствор сахарозе концентрације  $30 \text{ g L}^{-1}$  на  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  има степен заслађивања 1, при чему је минимална концентрација детектовања слаткоће 1–4 mM. Да би се слadak укус осетио, супстанца се прво мора растворити у пљувачки и мора доћи у контакт са рецепторима на језику, с тим што на сензорна својства утичу и параметри као што су температура, рН вредност, као и присуство других молекула (Carocho et al. 2017). Поређења ради, узимајући сахарозу као референтну вредност (степен заслађивања 1), прости шећери имају мању моћ заслађивања, попут глукозе (0,5) и галактозе (0,3), као и шећерни алкохоли као што су еритрол (0,7) и малтитол (0,9), док неки други природни шећери попут фруктозе имају више вредности (1,8) (Chattopadhyay et al. 2014). С друге стране, синтетички заслађивачи имају далеко већу моћ заслађивања, па је тако сахарин 300 пута, а неотам 13000 пута слађи, док заслађивач најновије генерације адвантам има 37000 пута већу моћ заслађивања од сахарозе (Mora и Dando 2021).

Најчешће коришћени вештачки заслађивачи у прехранбеној и фармацеутској индустрији су ацесулфам, сахарин, цикламат, сукралоза, аспартам, неохесперидин дихидрохалкон (НХДЦ) и неотам (Luo et al. 2019b; Mora и Dando 2021). Прва генерација заслађивача, попут сахарина, цикламата и аспартама, уведена је у употребу педесетих година 20. века (Li et al. 2022). Касније је у употребу ушла нова генерација заслађивача, као што су ацесулфам, сукралоза, алитам, НХДЦ, неотам и адвантам (Weihrauch и Diehl 2004; Berset и Ochsenbein 2012; Mora и Dando 2021). Примена вештачких заслађивача је све већа због ниских трошкова производње, прераде и употребе у односу на коришћење сахарозе, али и других заслађивача природног порекла. У свету се преко 250000 тона вештачких заслађивача конзумира сваке године, а Кина је водећа земља по производњи и потрошњи ових супстанци (Li et al. 2022).

Поред широко заступљених синтетичких заслађивача, због све веће забринутости потрошача у вези са здравственим ризиком расте потражња за природним заменама, као што је стевија, један од најпопуларнијих природних заслађивача, мешавина стевиол гликозида који се екстрахују из листова биљке *Stevia Rebaudiana* (Ciriminna et al. 2019). Иако се генерално вештачки заслађивачи сматрају безбедним за употребу, постоји стална контроверза око предности ових замена за шећер (Tandel 2011; Harpaz et al. 2018). Бројне студије су показале

да редовна конзумација вештачких заслађивача може да има негативне ефекте и да изазове метаболичке поремећаје и повећан ризик за добијање прекомерне тежине, метаболичког синдрома, дијабетеса типа 2 и кардиоваскуларних болести (Swithers 2013; Pepino 2015).

У табели 2.1 је наведена листа вештачких заслађивача који су дозвољени за примену у прехранбеним производима у Републици Србији, заједно са Е кодовима који представљају бројну ознаку емулгатора која је јединствена за цео свет (Правилник о прехранбеним адитивима, 2018). Сви прехранбени производи који садрже заслађиваче морају на декларацији имати ознаку „са заслађивачем“ или „са заслађивачима“. Поред тога, сви заслађивачи се, пре него што добију дозволу за примену у храни и пићу, испитују у погледу потенцијалних штетних ефеката на здравље људи. На основу тога, Светска здравствена организација (енг. World Health Organization, WHO) и Заједнички стручни одбор за прехранбене адитиве (енг. Joint Expert Committee on Food Additives, JECFA) су успоставили прихватљив дневни унос за природне и вештачке заслађиваче (енг. acceptable daily intake, ADI) који не представља опасност по здравље потрошача. Максимална количина заслађивача која може да се конзумира дневно се изражава у  $\text{mg kg}^{-1}$  телесне масе. ADI вредности одабраних вештачких заслађивача су такође приказане у табели 2.1.

Табела 2.1. Вештачки заслађивачи дозвољени у Републици Србији, њихова калоријска вредност, моћ заслађивања у односу на сахарозу, прихватљив дневни унос и време почетка примене у Европској унији (ЕУ) (Kroger et al. 2006; Mortensen 2006; Carcho et al. 2017)

Е код	Заслађивач	Енергетска вредност, (kcal/g)	Моћ заслађивања	ADI вредност (mg/kg/дан)	Дозвољен за употребу у ЕУ
E950	Ацесулфам	0	150–200	9	1984
E951	Аспартам	4	200	40	1984
E952	Цикламат	0	30–80	11	1984
E954	Сахарин	0	240–300	5	1977
E955	Сукралоза	0	400–800	5	2000
E959	Неохесперидин дихидрохалкон	2	1500	35	1988
E960	Стевиол гликозиди	0	300	4	2011
E961	Неотам	0	7000–13000	2	2009

**Ацесулфам (E950)** је вештачки заслађивач синтетисан у Немачкој 1967. године. Често се обележава и као ацесулфам К јер представља калијумову со ацесулфама (Shankar et al. 2013). Један је од најчешће коришћених вештачких заслађивача због одсуства позадинског укуса. Ацесулфам је око 200 пута слађи од обичног шећера и нема калоријску вредност (табела 2.1). Због сличности хемијске структуре ацесулфама са структуром сахарина (за кога се сумњало да доводи до канцера бешике код мужјака пацова) његова безбедна примена у прехранбеној индустрији је дуго била под знаком питања. Међутим, америчка Агенција за храну и лекове (енг. Food and Drug Administration, FDA) је 1988. године одобрила његово коришћење у прехранбеним производима после многобројних студија процене безбедности. Може се користити у комбинацији са другим заслађивачима, као што је аспартам, цикламат и сукралоза, за даље побољшање заслађивања и укуса. Пошто је термостабилан, може се употребљавати при кувању и печењу (Kroger et al. 2006). Ацесулфам се не метаболише у

људском телу, тако да се излучује у непромењеном облику (Renwick 1986). Користи се у пецивима, житарицама, слаткишима, кондиторским производима, мармеладама, конзервираној храни и воћу, жвакаћим гумама, али и као стони заслађивач (O'Brien Nabors 2001; Carocho et al. 2017).

**Аспартам (E951)** је синтетисан 1965. године. Сличног је укуса као сахароза, али је око 200 пута слађи и има калоријску вредност од  $4 \text{ kcal g}^{-1}$  (табела 2.1). Састоји се од две компоненте, аспартамске киселине и фенилаланина. Има ниску растворљивост у води и врло је нестабилан на нижим рН вредностима (Kroger et al. 2006). Приликом дуготрајног складиштења долази до разлагања аспартама и формирања деградационог продукта дикетопиперзина који је канцероген, па се сматра да би требало размотрити даљу употребу овог заслађивача (Berset и Ochsenbein 2012; Carocho et al. 2017). Аспартам се у људском телу разлаже на метанол, фенилаланин и аспарагинску киселину (Renwick 1986; O'Brien Nabors 2001). Превелика конзумација овог заслађивача изазива главобољу, вртоглавицу, нервозу, промене расположења, менструалне проблеме и реакције на кожи (Sardesai и Waldshan 1991). Такође је доказано да аспартам утиче на изазивање глукозне интолеранције (Suez et al. 2014). Термонестабилан је ако се подвргне дуготрајном загревању, због чега није погодан за кување и печење (Mortensen 2006). Користи се у многим прехранбеним производима: жвакаћим гумама, освежавајућим пићима, јогурту, млечним производима, десертима, пекарским производима и инстант напицима. На производу који садржи аспартам мора да стоји да садржи извор фенилаланина који је опасан за оболеле од фенилкетонурије (Shankar et al. 2013; Carocho et al. 2017).

**Цикламат (E952)** је вештачки заслађивач откривен 1937. године и представља натријумову или калијумову со цикламинске киселине (калијум-цикламат или натријум-цикламат) (Chattopadhyay et al. 2014). Термички је стабилнији од сахарина и добро је растворљив у води. Иако му је интензитет слаткоће најмањи у односу на друге вештачке заслађиваче (табела 2.1), користи се у комбинацији са другим заслађивачима за маскирање непријатног укуса (Mortensen 2006; Mora и Dando 2021). Не метаболише се у људском телу, а код малог процента популације може да се претвори у циклохексиламин које је токсично једињење. Због сумње да је канцероген, америчка Агенција за храну и лекове га је потпуно забранила 1970. године. Кина, Индонезија, Тајван и Шпанија су највећи произвођачи овог заслађивача који је уз сахарин најјефтинији за производњу (O'Brien Nabors 2001). У Европској унији се користи у десертима, печеној и прерађеној храни, безалкохолним пићима, желатинима, конзервираном воћу и као стони заслађивач (Carocho et al. 2017).

**Сахарин (E954)** је први откривени вештачки заслађивач, синтетисан још 1878. године. Око 300 пута је слађи од сахарозе и нема калоријску вредност (табела 2.1). Слабо је растворљив у води, а добро растворљив у етанолу и врло је отпоран на високе температуре (Mortensen 2006). Не метаболише се у људском телу и излучује се путем урина (O'Brien Nabors 2001). Сахарин има горак, метални укус који се у производу појављује накнадно, а може се осетити и при малим концентрацијама. Из тог разлога се готово никада не користи сам, већ у комбинацији са другим заслађивачима, најчешће цикламатом и аспартамом (Carocho et al. 2017). Иако је раније постојала сумња да сахарин може да изазове рак бешике код пацова, због чега је био забрањен у многим земљама, каснијим истраживањима је утврђено да није канцероген, па је дозвољена његова употреба у прехранбеним производима (Mortensen 2006; Chattopadhyay et al. 2014). Користи се у безалкохолним пићима, конзервираном воћу, мармеладама, слаткишима, жвакаћим гумама и као стони заслађивач (Shankar et al. 2013). Такође, има велику употребу у сточној храни, при чему максимални дневни унос за животиње износи  $150 \text{ mg kg}^{-1}$  телесне масе (Rychen et al. 2018).

**Сукралоза (E955)** је синтетисана 1976. године и широко се користи у различитим прехранбеним и фармацеутским производима. Индустијски се добија супституцијом три хидроксилне групе на молекулу сахарозе са три атома хлора (Shankar et al. 2013). Сличног је укуса као обични шећер, али јој је интензитет слаткоће до 800 пута већи (табела 2.1). Растворљива је у води и етанолу, не метаболише се у људском телу и излучује се у непромењеном облику (O'Brien Nabors 2001; Chattopadhyay et al. 2014). Употребљава се у слаткишима, жвакаћим гумама, млечним и пекарским производима, конзервираном воћу, као и у безалкохолним пићима. Иако се сматра безбедном за људску употребу, постоје студије у којима је код деце са повећаном запремином крви и смањеном телесном тежином пронађена повећана концентрација сукралозе у крви (Park et al. 2017; Sylvetsky et al. 2017). Такође, доказано је да конзумација сукралозе у већим количинама може да изазове мигрену, нервозу црева и инхибицију бактерија колоне (Roberts et al. 2000; Carocho et al. 2017). Сукралоза је деведесетих година 20. века дозвољена за употребу у Канади, Аустралији и САД-у, док се од 2000. године користи у Европској унији (Kroger et al. 2006).

**Неохесперидин дихидрохалкон (E959)** је полусинтетички вештачки заслађивач који се добија хидрогеновањем неохесперидина и наргинина, екстрахованих из коре незрелих плодова цитруса (O'Brien Nabors 2001; Mortensen 2006). Одобрен је за употребу у ЕУ 1988. године. Стабилан је на високим температурама и слабо растворљив у води на собној температури, док у врелој води има високу растворљивост (O'Brien Nabors 2001). Слаткоћа му је 1500 пута већа од сахарозе (табела 2.1), али поседује метални позадински укус. Често се користи у комбинацији са полиолима и глукозним сирупом. Не акумулира се у ткивима због брзог метаболизма и екскреције (Braune et al. 2005). Овај вештачки заслађивач се употребљава као згушњивач хране и чест је састојак сладоледа, жвака, пецива, безалкохолних пића, млечних производа, кондиторских намирница, супа, а користи се и као стони заслађивач (Carocho et al. 2017).

**Стевиол гликозиди (E960)** су хемијска једињења велике слаткоће која се природно налазе као дитерпени у листу биљке *Stevia Rebaudiana* Bertoni која расте у Парагвају и јужном Бразилу, где се лишће ове биљке вековима користило као природни заслађивач (Periche et al. 2015; Lobete et al. 2017). Смеша стевиол гликозида, добијена екстракцијом из лишћа биљке, користи се у прехранбеној и фармацеутској индустрији широм света као природни заслађивач стевија. Има занемарљиву енергетску вредност, а моћ заслађивања му је и до 300 пута већа од обичног шећера. Препоручена дневна доза износи до  $4 \text{ mg kg}^{-1}$  (табела 2.1). Листови биљке садрже смешу различитих стевиол гликозида: 5–10% стевиозида, 2–5%, ребаудиозида А, 1% ребаудиозида С, 0,5% дулкозида А и 0,2% ребаудиозида Д, Е, Ф. Међу овим једињењима најслађи је ребаудиозид А (González et al. 2014). Ова једињења имају и диуретско и антиинфламаторно дејство, а у људском организму се метаболишу у стевиол глукуроноиде који се излучују путем урина (Gu et al. 2019). Стабилни су на вишим температурама и у широком опсегу рН вредности, и генерално имају чист укус, иако неке од компоненти могу бити горке. Истраживања су показала да су стевиол гликозиди безбедни за људску употребу (González et al. 2014; Carocho et al. 2017). Утврђено је и да стевиозид има стимулишући ефекат на лучење инсулина у панкреасу, што може бити корисно у лечењу дијабетеса и других метаболичких поремећаја (Montoro et al. 2013). Стевија се употребљава као стони заслађивач, у сладоледима, јогуртима, колачима, сосовима, пићима, пекарским и млечним производима, зачинима, али и лековима и средствима за оралну хигијену (O'Brien Nabors 2001; González et al. 2014; Carocho et al. 2017). Пошто је стевиозид најзаступљенији стевиол гликозид, најчешће се његово присуство разматра у екотоксиколошким студијама (Stolte et al. 2013; Kobetičová et al. 2018) и анализи трагова загађујућих материја у животној средини.

**Неотам (Е961)** припада најновијој генерацији вештачких заслађивача веома високог степена слаткоће (7000–13000 пута већа од обичног шећера, табела 2.1). Представља N-супституисани дериват аспартама, а због недостатка фенилаланина у својој структури, безбедан је за особе са фенилкетонуријом и за дијабетичаре. Слабо је растворљив у води, а веома добро у етанолу (Chattopadhyay et al. 2014). Има чист укус, без позадинског металног или киселог укуса, и стабилан је у широком опсегу вредности рН и температуре (Nofre и Tinti 2000). Најчешће се користи у комбинацији са другим заслађивачима (изузев ацесулфама и сахарина) и чест је састојак безалкохолних пића, млечних производа, слаткиша, пецива и жвакаћих гума. Такође се употребљава као стони заслађивач и појачивач укуса (Mortensen 2006). Током метаболизма, половина неотам се излучује у непромењеном облику, док се друга половина излучује као деестерификовано једињење.

## 2.2. Извори вештачких заслађивача у животној средини

У протеклим деценијама бројне студије су документовале присуство вештачких заслађивача у различитим воденим матрицама, укључујући површинску (Buerge et al. 2009; Loos et al. 2009; Scheurer et al. 2009; Berset и Ochsenbein 2012; Gan et al. 2013; Perkola и Sainio 2014; Moldovan et al. 2018; Liu et al. 2022), морску (Baena-Nogueras et al. 2018; Guo et al. 2021; Brumovský et al. 2022), подземну (Buerge et al. 2009; Gan et al. 2013; Wu et al. 2014) и пијаћу воду (Gan et al. 2013), као и отпадне воде (Kokotou и Thomaidis 2013; Ribbers et al. 2019; Guo et al. 2021). Ове супстанце су такође откривене у земљишту (Gan et al. 2014; Li et al. 2021a) и седиментима (Bernot et al. 2016; Fu et al. 2020). Ефлуенти из постројења за пречишћавање отпадних вода (ППОВ) и нетретиране комуналне отпадне воде сматрају се главним изворима вештачких заслађивача у животној средини (Gan et al. 2013; Tran et al. 2014; Lim et al. 2017). Наиме, највећи део конзумираног ацесулфама, сахарина, цикламата и сукралозе излучује се у непромењеном облику (Renwick 1986; Roberts et al. 2000) и доспева у околину у великим количинама кроз канализациони систем. С друге стране, аспартам, НХДЦ, неотам и стевиозид метаболишу се у већем степену, са значајно мањим концентрацијама у отпадној води (O'Brien Nabors 2001; Carocho et al. 2017). Веома је важно познавање путева и судбине вештачких заслађивача у природном окружењу, пошто неки од њих, попут ацесулфама и сукралозе, могу да буду присутни у воденој средини годинама (Scheurer et al. 2009; Robertson et al. 2013; Perkola et al. 2016).

Извори вештачких заслађивача се могу поделити на тачкасте и дифузне (нетачкасте). У тачкасте се убрајају постројења за пречишћавање отпадних вода, испусти нетретиране комуналне отпадне воде и индустријских отпадних вода, као и отпад са животињских фарми (Li et al. 2021b; Naik et al. 2021). Додатно, тачкасти извори контаминације животне средине заслађивачима укључују и процедурне воде са депонија (Roy et al. 2014), као и цурење и преливање канализације након интензивнијих падавина (Wolf et al. 2012; Tran et al. 2014; Lim et al. 2017). У руралним подручјима, септички системи представљају тачкасте изворе загађења пошто пропуштају отпадну воду у околну земљиште и подземне воде често контаминирајући и бунаре са пијаћом водом (Wu et al. 2014; Spoelstra et al. 2020). Најзначајнији нетачкасти извор загађења вештачким заслађивачима је пољопривредно земљиште, због широке примене заслађивача у животињској исхрани (Ma et al. 2017; Li et al. 2021a; Naik et al. 2021). Наиме, наводњавањем земљишта отпадном водом или употребом стајњака ова једињења контаминирају површинске слојеве, а затим спирањем доспевају у дубље слојеве земљишта и подземне воде (Buerge et al. 2011; Ma et al. 2017). Тако су детектоване веома високе концентрације заслађивача у земљишту поред животињских фарми, при чему су најзаступљенији били сахарин, неотам и цикламат, сразмерно њиховој

употреби у сточној храни (Li et al. 2020). Поред тога, сахарин се може наћи у земљишту као деградациони продукт одређених хербицида (Roberts et al. 1998). На мобилност вештачких заслађивача кроз земљиште до подземних вода утичу састав земљишта и физичко-хемијска својства заслађивача, попут растворљивости и поларности. Велика количина падавина значајно утиче на брз транспорт и спирање ових једињења кроз земљиште, док је у сушним периодима овај процес ограничен (Buerge et al. 2009; Biel-Maeso et al. 2021). Утврђено је и да се ова једињења могу транспортовати са земљишта помоћу ветра у атмосферу, у облику прашине или аеросола, а затим вратити на тло путем падавина или сувим таложењем уколико су адсорбована на чврстим честицама (Gan et al. 2013; Li et al. 2021a).



Слика 2.1. Главни путеви доспевања вештачких заслађивача у животну средину

### 2.3. Присуство и стабилност вештачких заслађивача у животној средини

У табели 2.2 су приказане концентрације вештачких заслађивача детектованих у природним водама и води за пиће, као и у отпадним водама широм света. На основу прегледа литературе може се закључити да су ацесулфам, сукралоза, сахарин и цикламат најчешће детектовани вештачки заслађивачи у широком опсегу концентрација у површинској (речној, језерској и морској), подземној и отпадној води (нетретираној и инфлуентима и ефлуентима ППОВ).



Табела 2.2. Преглед детектованих концентрација вештачких заслађивача у различитим воденим матрицама

Вештачки заслађивач	Тип водене матрице	Концентрација (ng L <sup>-1</sup> )	Литература
Ацесулфам	Речна вода	28–9600	Perkola и Sainio 2014
		2800–6900	Buerge et al. 2009
		10–7346	Berset и Ochsenbein 2012
		379–3044	Ruff et al. 2015
		270–2700	Scheurer et al. 2009
		120–1620	Arbeláez et al. 2015
		220–1410	Cárdenas-Soracá et al. 2020
		120–750	Moldovan et al. 2018
		102–512	Nagy-Kovács et al. 2018
		0,5–1,5	Liu et al. 2022
	Морска вода	0,2–1,9	Brumovský et al. 2022
	Подземна вода	20–33600	Van Stempvoort et al. 2011
		до 4700	Buerge et al. 2009
		до 2870	Wolf et al. 2012
		0,9–1534	Wu et al. 2014
		180–524	Ens et al. 2014
		92–144	Ens et al. 2014
	Пијаћа вода	10–69	Berset и Ochsenbein 2012
		1200–43000	Buerge et al. 2009
	Инфлуент	25000–26700	Ordóñez et al. 2012
11900–25300		Kokotou и Thomaidis 2013	
Ефлуент	14000–46000	Buerge et al. 2009	
	30700–32700	Ordóñez et al. 2012	
	12100–27200	Kokotou и Thomaidis 2013	
Сукралоза	Речна вода	1600–20300	Cárdenas-Soracá et al. 2020
		40–3600	Arbeláez et al. 2015
		до 1000	Perkola и Sainio 2014
		10–949	Berset и Ochsenbein 2012
		16–924	Loos et al. 2009
		18–175	Ruff et al. 2015
		10–110	Scheurer et al. 2009
		15–22	Moldovan et al. 2018
		0,1–14	Brumovský et al. 2022
		Морска вода	11000–24000
	65–541		Wu et al. 2014
	Подземна вода	130–2400	Mawhinney et al. 2011
		18000–45000	Arbeláez et al. 2015
	Пијаћа вода	6250–25400	Kokotou и Thomaidis 2013
		2000–9100	Buerge et al. 2009
	Инфлуент	3000–5300	Ordóñez et al. 2012
		12000–60000	Arbeláez et al. 2015
		6350–26700	Kokotou и Thomaidis 2013
		15400–18100	Ordóñez et al. 2012
		2000–8800	Buerge et al. 2009
Ефлуент			

Табела 2.2. (наставак)

Вештачки заслађивач	Тип водене матрице	Концентрација (ng L <sup>-1</sup> )	Литература	
Сахарин	Речна вода	до 490	Perkola и Sainio 2014	
		10–350	Scheurer et al. 2009	
		280–310	Cárdenas-Soracá et al. 2020	
		10–310	Berset и Ochsenbein 2012	
		14–241	Ruff et al. 2015	
		36–46	Moldovan et al. 2018	
	Морска вода	3,0–285	Brumovský et al. 2022	
	Подземна вода	28–10300	Van Stempvoort et al. 2011	
	Инфлуент	Инфлуент	10–15	Berset и Ochsenbein 2012
			15000–46000	Kokotou и Thomaidis 2013
			18400–22300	Ordóñez et al. 2012
	Ефлуент	Ефлуент	3900–18000	Buerge et al. 2009
6400–9100			Ordóñez et al. 2012	
до 3200			Buerge et al. 2009	
		до 270	Kokotou и Thomaidis 2013	
Цикламат	Речна вода	10–1959	Berset и Ochsenbein 2012	
		30–320	Scheurer et al. 2009	
		до 210	Perkola и Sainio 2014	
		14–106	Ruff et al. 2015	
		до 80	Arbeláez et al. 2015	
		30–50	Cárdenas-Soracá et al. 2020	
	15–27	Moldovan et al. 2018		
	Подземна вода	23–980	Van Stempvoort et al. 2011	
	Инфлуент	Инфлуент	10000–65000	Buerge et al. 2009
			до 57800	Kokotou и Thomaidis 2013
	Ефлуент	Ефлуент	25900–36400	Ordóñez et al. 2012
			17200–20000	Ordóñez et al. 2012
1300–4480			Kokotou и Thomaidis 2013	
		до 820	Buerge et al. 2009	
Аспартам	Речна вода	до 40	Gan et al. 2013	
		до 40	Cárdenas-Soracá et al. 2020	
	Подземна вода	10–13	Berset и Ochsenbein 2012	
	Инфлуент	до 70	Arbeláez et al. 2015	
		до 53	Gan et al. 2013	
Неохесперидин дихидрохалкон	Речна вода	до 220	Gan et al. 2013	
	Инфлуент	85–110	Gan et al. 2013	
Неотам	Речна вода	до 9,3	Gan et al. 2013	
	Инфлуент	до 11	Gan et al. 2013	

Најчешће детектовани вештачки заслађивачи у животној средини су ацесулфам и сукралоза. У природним водама присутни су у значајно већим концентрацијама од других заслађивача због изузетне постојаности у воденим екосистемима (Buerge et al. 2009; Fu et al. 2020). Највећа концентрација ацесулфама у речној води је забележена у Финској (9600 ng L<sup>-1</sup>, Perkola и Sainio 2014), док је у истој студији, као и при анализи 120 узорак површинских вода из 27 европских земаља (Loos et al. 2009), показано да се сукралоза детектује у концентрацијама до 1000 ng L<sup>-1</sup>. Сукралоза је најчешће детектована у узорцима из Велике Британије, Холандије, Француске, Швајцарске, Шпаније, Италије, Норвешке и Шведске, што указује на већу примену у западној Европи. У другим деловима света, попут Канаде, забележени су изузетно високи нивои сукралозе у речној води (до 20300 ng L<sup>-1</sup>, Cárdenas-Soracá et al. 2020), што упућује на другачији обрасац потрошње овог заслађивача и велику заступљеност у исхрани.

У подземним водама у Европи, највиши ниво ацесулфама је детектован у Швајцарској у подручју са значајном инфилтрацијом речне воде под утицајем ефлуената из ППОВ (до 4700 ng L<sup>-1</sup>, Buerge et al. 2009), као и у Немачкој (до 2900 ng L<sup>-1</sup>, Wolf et al. 2012). У наведеним европским студијама, сукралоза није пронађена. Међутим, високе концентрације сукралозе су забележене у подземним водама у Канади (до 24000 ng L<sup>-1</sup>, Van Stempvoort et al. 2011) и Кини (до 541 ng L<sup>-1</sup>, Wu et al. 2014), као последица велике потрошње заслађивача у овим земљама. Ацесулфам и сукралоза су детектовани и у пијаћој води, при концентрацијама до 144 ng L<sup>-1</sup> у Немачкој (Ens et al. 2014) и до 2400 ng L<sup>-1</sup> у САД-у (Mawhinney et al. 2011), респективно, што указује на то да се ова једињења не елиминишу у процесима пречишћавања и прераде воде за пиће.

У отпадним водама пре третмана у ППОВ, ацесулфам је забележен у концентрацији од 43 µg L<sup>-1</sup> у Швајцарској (Buerge et al. 2009), док је сукралоза детектована при високом нивоу од 45 µg L<sup>-1</sup> у Шпанији (Arbeláez et al. 2015). Анализа одговарајућих ефлуената из ППОВ у Швајцарској и Шпанији је показала да приликом третмана отпадне воде не долази до смањења концентрација два заслађивача. Као резултат велике стабилности и отпорности на процесе пречишћавања у постројењима, ови заслађивачи су детектовани у речној води низводно од ППОВ у концентрацијама до чак 6,9 µg L<sup>-1</sup> за ацесулфам (Buerge et al. 2009) и 3,6 µg L<sup>-1</sup> за сукралозу (Arbeláez et al. 2015).

Додатно, због изузетне постојаности у воденој средини (Luo et al. 2019a; Van Stempvoort et al. 2020), ацесулфам и сукралоза могу да опстану у септичким системима и до 15 година, што их чини идеалним маркерима за лоцирање и праћења цурења септичких јама, као и процедурних вода са депонија (Robertson et al. 2013, 2016; Roy et al. 2014; Zirlewagen et al. 2016).

Сахарин и цикламат су често детектовани вештачки заслађивачи у површинским водама, али ређе и у нижим концентрацијама од ацесулфама и сукралозе, због изражене биодеградабилности у животној средини (Tran et al. 2014; Zirlewagen et al. 2016). У европским студијама, највећа концентрација сахарина у речној води је пронађена у Финској (до 490 ng L<sup>-1</sup>, Perkola и Sainio 2014), док је у случају цикламата забележено до 1959 ng L<sup>-1</sup> у Швајцарској (Berset и Ochsenbein 2012). Ови заслађивачи се ретко детектују у подземним водама у Европи, чак и у подручјима са великим комуналним оптерећењем околних река, због биоразградљивости у воденој средини (Buerge et al. 2009; Scheurer et al. 2009; Berset и Ochsenbein 2012). С друге стране, високе концентрације сахарина и цикламата су пронађене у подземној води у Канади, као последица инфилтрације пречишћене комуналне воде у подземно окружење и цурења старих депонија и септичких система у близини места узорковања (Van Stempvoort et al. 2011). У инфлуентима су детектоване изузетно високе

концентрације сахарина (у Грчкој, до  $46 \mu\text{g L}^{-1}$ , Kokotou и Thomaidis 2013) и цикламата (у Шварцарској, до  $65 \mu\text{g L}^{-1}$ , Buerge et al. 2009) што указује на велику заступљеност у прехранбеним производима, али и метаболичку инертност у људском организму (Luo et al. 2019a). Два заслађивача се делимично уклањају у процесима пречишћавања отпадне воде (Buerge et al. 2009; Arbeláez et al. 2015).

Аспартам, неохесперидин дихидрохалкон и неотам се веома ретко детектују у површинској води. Аспартам је пронађен у речној води у Кини (Gan et al. 2013) и Канади (Cárdenas-Soracá et al. 2020), при концентрацији до  $40 \text{ ng L}^{-1}$ , док су НХДЦ и неотам забележени само у речној води у Кини (до  $220 \text{ ng L}^{-1}$  и до  $9,3 \text{ ng L}^{-1}$ , респективно, Gan et al. 2013). У подземној води, аспартам је детектован у Швајцарској ( $10\text{--}13 \text{ ng L}^{-1}$ , Berset и Ochsenbein 2012), док трагови НХДЦ-а и неотама нису забележени у литератури. Ова три вештачка заслађивача се налазе у ниским концентрацијама у отпадним водама, као последица израженог метаболизма у људском организму (Braune et al. 2005; Carocho et al. 2017). У инфлуентима у Европи детектовано је до  $70 \text{ ng L}^{-1}$  аспартама у Шпанији (Arbeláez et al. 2015), док у ефлуентима није пронађен. НХДЦ и неотам су забележени само у отпадној води на улазу у ППОВ у Кини ( $85\text{--}110 \text{ ng L}^{-1}$  и до  $11 \text{ ng L}^{-1}$ , респективно, Gan et al. 2013), али су потпуно уклоњени у процесима пречишћавања, па нису детектовани у ефлуенту.

Већина научних истраживања везана за трагове вештачких заслађивача у природи је фокусирана на водену средину као примарни реципијент (Luo et al. 2019b; Praveena et al. 2019). У овим студијама истраживани су могући извори заслађивача, њихова сорпција, разградња, као и биодеградација у природним водама (Sang et al. 2014; Tran et al. 2015; Luo et al. 2019a). Само неколико студија се бавило вештачким заслађивачима у седиментима (Најј-Мохамад et al. 2014; Bernot et al. 2016; Fu et al. 2020), и то заједно са другим загађујућим материјама. Тако су ацесулфам, сахарин, цикламат и сукралоза детектовани у језерским седиментима у Кини, при максималним концентрацијама од  $4,2 \text{ ng g}^{-1}$  за сахарин и  $2,2 \text{ ng g}^{-1}$  за цикламат (Fu et al. 2020). Такође, у лотичким екосистемима у САД-у, сукралоза је детектована у концентрацији до  $16 \text{ ng g}^{-1}$  у речним седиментима (Bernot et al. 2016). За одређени број вештачких заслађивача, на основу њихових физичко-хемијских својстава, може се очекивати акумулација у седиментима приликом расподеле у систему вода/седимент. Наиме, иако већина ових супстанци има високу растворљивост у води и хидрофилан карактер, поједина истраживања су показала да могу да буду везани и за земљиште или седименте (Gan et al. 2013, 2014; Fu et al. 2020). Због тога је неопходно да свеобухватна истраживања о вештачким заслађивачима у животној средини укључују и речне седименте, као станишта различитих бентосних заједница и резервоаре органске материје, који могу постати извор контаминираних честица у случају ресуспензије.

Иако се ацесулфам и сукралоза сматрају изузетно постојаним заслађивачима у животној средини, а сахарин и цикламат изразито деградабилним, неколико истраживања је показало да стабилност вештачких заслађивача веома зависи од услова средине. Тако су чак и ацесулфам и сукралоза показали знакове деградације након инкубације у земљишту од три месеца, што указује на то да и најстабилнији заслађивачи нису потпуно инертни (Buerge et al. 2011; Soh et al. 2011). Такође је утврђено да под дејством интензивног УВ зрачења долази до значајне деградације ацесулфама и сукралозе, посебно на вишим температурама у летњим месецима када је знатно повећана активност микроорганизама (Soh et al. 2011; Sang et al. 2014).

Поред стабилности, на присуство вештачких заслађивача у животној средини утичу различити фактори. Тако је утврђена корелација између броја становника у густо насељеним

подручјима и високих нивоа ацесулфама, сахарина и цикламата (Buerge et al. 2009). Нивои заслађивача у природним водотоковима се могу променити у складу са променама у ефикасности пречишћавања и саставу ефлуената из ППОВ, као и због присуства инфраструктурних оштећења (Yue et al. 2023). Показано је и да постоје сезонске варијације у просечним детектованим концентрацијама заслађивача у природним водама, па су тако виши нивои ацесулфама и сукралозе забележени у летњем периоду, док су сахарин и цикламат претежно доминантни зими, што је објашњено већом разградњом сахарина и цикламата на вишим температурама (Sang et al. 2014). Такође, у сушном, летњем периоду, због значајног испаравања и нижих водостаја, долази до повећања нивоа ових супстанци у рекама, посебно ако је велики утицај отпадних вода, док у кишним периодима велика количина падавина доводи до разблажења и смањења концентрације заслађивача (Yue et al. 2023).

#### 2.4. Проблем присуства вештачких заслађивача у животној средини и екотоксичност

Претходних деценија, истраживања везана за загађујуће материје у животној средини су углавном подразумевала праћење класа микрополутаната попут лекова, пестицида и стероидних хормона, док су вештачки заслађивачи постали предмет истраживања у скорије време. Дуги низ година било је заступљено уверење да је примена вештачких заслађивача у људској исхрани безбедна по живи свет у природи где трагови ових супстанци доспевају путем отпадних вода. Међутим, њихов екотоксиколошки утицај, као и утицај њихових метаболита и производа деградације на живи свет није довољно описан. Дугорочни ризици као резултат континуиране изложености ниским нивоима ових једињења су и даље нејасни. Због широке распрострањености у животној средини и ограничених података о понашању у природном окружењу, као и потенцијалне екотоксичности, вештачки заслађивачи се убрајају у нову класу емергентних загађујућих материја (Luo et al. 2019a; Praveena et al. 2019). Иако су концентрације забележене у животној средини веома ниске, оне могу бити довољне да изазову токсичне ефекте. С обзиром на то да се у Републици Србији само 8,1% отпадних вода из пољопривреде, домаћинства и индустрије третира пре испуштања (Статистички годишњак Републике Србије, 2022), проблем штетног утицаја по акватичне екосистеме у нашој земљи је далеко озбиљнији.

Значајан број екотоксиколошких студија акутног и хроничног утицаја трагова вештачких загађивача на живи свет у животној средини је показао да постаје ризици по организме који живе у води и седиментима. Тако је утврђена повећана екотоксичност ацесулфама након третмана UV зрачењем изазивајући јак оксидативни стрес акумулацијом ОН-радикала у јетри златне рибице *Carassius auratus* (Ren et al. 2016). Током фототретмана ацесулфама долази до формирања деградационих продуката који су више од 500 пута токсичнији од полазне супстанце, што је одређено на основу изражене инхибиције биолуминисценције бактерије *V. Fischeri* (Sang et al. 2014). За сукралозу је показано да смањује фотосинтетички капацитет код водених биљака (Amy-Sagers et al. 2017). Наиме, сукралоза има посебан утицај на водене екосистеме јер имитира сахарозу, па је биохемијски повезана са различитим биолошким функцијама, укључујући фотосинтезу и исхрану зоопланктона (Kessler 2009; Van Stempvoort et al. 2011). Присуство сукралозе у водама у животној средини утиче на промену понашања код водених организама (Hjorth et al. 2010), посебно у начину пливања и проналажењу склоништа. Резултати утицаја различитих концентрацијама сукралозе на планктонске ракове *Daphnia magna*, *Gammarus oceanicus* и *Gammarus zaddachi* су јасно показали да присуство сукралозе у води мења начин и брзину пливања код *Daphnia magna*, док је код *Gammarus oceanicus* и *Gammarus zaddachi* време проналажења склоништа и хране продужено (Wiklund et al. 2012). Такође, испитивана је токсичност сукралозе код шарана

*Cyprinus carpio* излагајући га концентрацијама које су сличне оним детектованим у животној средини. Вредности параметара оксидативног стреса су биле значајно повећане, посебно у ткиву жлезда, мозгу и мишићима (Saucedo-Vence et al. 2017). Пошто ацесулфам и сукралоза имају могућност хелатирања са тешким металима, повећање нивоа ових заслађивача у животној средини може да доведе до повећања мобилности и токсичности тешких метала што изазива инхибицију раста алги *Scenedesmus obliquus* (Liu et al. 2020). Такође, показано је да, након дужег излагања, сукралоза и аспартам ометају развој листова водене биљке сочивице *Lemna Minor*, док сахарин доводи до хиперпродукције хлорофила изазивајући биохемијски стрес (Kobetičová et al. 2016, 2018). Међутим, у студији у којој је процењена екотоксичност ацесулфама, сахарина, цикламата, сукралозе и стевозида, при концентрацијама до  $1000 \text{ mg L}^{-1}$ , на три групе водених организама (зелена алга *Scenedesmus vacuolatus*, као и *Daphnia magna* и *Lemna Minor*), није утврђен екотоксиколошки ризик (Stolte et al. 2013). У случају заслађивача неотама, код три различита генетски модификована биолуминисцентна соја бактерије *Escherichia coli* дошло је извесне инхибиције биолуминисцентног сигнала у присуству неотама, што указује на појаву токсичности (Harpaz et al. 2018). Екотоксиколошке студије везане за заслађивач НХДЦ нису пронађене у научној литератури.

Иако су многе екотоксиколошке студије показале да вештачки заслађивачи могу изазвати штетне ефекте по водене организме, у литератури се не може наћи много студија у којима се одређује ниво екотоксиколошког ризика на основу детектованих концентрација ових једињења у животној средини. Већина европских студија је фокусирана на ацесулфам и сукралозу у површинским водама (Tollefsen et al. 2012; Mijangos et al. 2018; Söregård et al. 2019). Екотоксиколошки ризик у акватичним екосистемима је очекивано повећан у густо насељеним подручјима, са великим комуналним оптерећењем (Sharma et al. 2019). Такође, вештачки заслађивачи се у животној средини налазе у смеси са другим загађујућим материјама, па је потребно узети у обзир њихов кумулативни ефекат (тзв. „коктел ефекат“) приликом процене ризика по људе и животну средину (Gosset et al. 2020; Kondor et al. 2022).

## 2.5. Вештачки заслађивачи као индикатори загађења комуналним отпадним водама

Велике количине третиране и нетретиране комуналне отпадне воде, које се континуално ослобађају у природне водотокове, садрже трагове различитих загађујућих материја, патогене микроорганизме, као и повећану количину хранљивих материја које доводе до еутрофикације и цветања алги (Van Stempvoort et al. 2020). Нарочито је опасно доспевање загађујућих материја, као и бактерија и вируса, у подземне воде и бунаре за пиће пошто су они главни извор снабдевања водом за пиће у многим регионима. Подземна вода може да буде контаминирана и цурењем септичких јама, канализационих одвода и складишних лагуна отпадних вода (Musolff et al. 2009; Van Stempvoort et al. 2011). Такође, наводњавањем пољопривредног земљишта третираном отпадном водом долази до инфилтрације загађујућих материја и загађења подземних вода.

У окружењима где постоје разноврсни извори загађења, за ефикасну контролу квалитета вода веома су важни поуздани маркери фекалног загађења пореклом од ефлуената из ППОВ и нетретираних комуналних вода. Бактеријски маркери се најчешће користе за детекцију загађења комуналним отпадним водама, али мана им је неспецифичност, кратак животни век у природним водама и време потребно за анализу (Benfenati et al. 1994). С друге стране, последњих година су развијени различити хемијски маркери за идентификацију контаминације комуналним отпадним водама (Oppenheimer et al. 2011; Lim et al. 2017;

Ribbers et al. 2019; Liu et al. 2022). Употреба ових индикатора има бројне предности, попут брже и поузданије детекције, специфичности за извор загађења и веће стабилности у односу на микробиолошке маркере (Lim et al. 2017). У најчешће коришћене хемијске маркере загађења комуналним отпадним водама убрајају се фармацеутски производи и њихови метаболити, стероли, производи за личну хигијену, хемикалије за домаћинство и прехранбени адитиви, у које спадају и вештачки заслађивачи (Lim et al. 2017; Yang et al. 2017; Liu et al. 2022).

Вештачки заслађивачи се сматрају веома поузданим и високо специфичним индикаторима загађења комуналним отпадним водама, због изузетне распрострањености и већих концентрацијама у отпадним водама од других хемијских маркера, као што су лекови, производи за личну хигијену, кофеин, итд. (Wu et al. 2014; Fu et al. 2020; Spoelstra et al. 2020). Многи заслађивачи су отпорни на трансформацију и разградњу, имају високу растворљивост у води и низак капацитет адсорпције на седименте (Lim et al. 2017). Ацесулфам и сукралоза су најчешће коришћени маркери фекалног загађења због стабилности током процеса пречишћавања отпадних вода у постројењима и перзистентности у воденим екосистемима (Buerge et al. 2009; Oppenheimer et al. 2011; Fu et al. 2020; Van Stempvoort et al. 2020). Међутим, у неким студијама је показано да при одређеним условима ацесулфам може да се разгради у постројењима за прераду отпадних вода (Castronovo et al. 2017), док је највећи недостатак сукралозе као маркера загађења, висока граница детекције (Van Stempvoort et al. 2020). Из тог разлога, пожељно је користити више хемијских маркера ради поузданости анализе. Комбиновање различитих перзистентних индикатора загађења попут лекова сулфаметоксазола, карбамазепина, примидона и атенолола, као и стабилних и радиоактивних изотопа, даје много боље резултате и сигурнију процену у идентификацији различитих извора контаминације канализационим водама (Wolf et al. 2012; Van Stempvoort et al. 2020).

С друге стране, сахарин и цикламат, због својства биоразградљивости, могу да буду поуздани индикатори свежег загађења (Tran et al. 2014; Zirlewagen et al. 2016), као и загађења пореклом од нетретираних отпадних вода, пошто се готово потпуно елиминишу у постројењима за пречишћавање (Scheurer et al. 2009; Gan et al. 2013; Tran et al. 2014). Присуство сахарина у подземним водама може да указује и на загађење пореклом са животињских фарми или на инфилтрацију вода са пољопривредних површина. Наиме, сахарин се у великој мери излучује у непромењеном облику и може се наћи у високим концентрацијама у стајњаку (до  $12 \text{ mg L}^{-1}$ ) где може да буде стабилан и до два месеца (Buerge et al. 2011). Такође, сахарин је деградациони продукт одређених хербицида из групе сулфонил-уреа (Roberts et al. 1998; Spoelstra et al. 2020). За разлику од сахарина, ацесулфам и цикламат нису одобрени за употребу у животињској храни у ЕУ (Zirlewagen et al. 2016), па је њихов унос у животну средину путем стајњака мало вероватан. Сва три заслађивача се широко користе у сточној храни у Кини и многим другим земљама света (Ma et al. 2017; Li et al. 2020).

Вештачки заслађивачи се могу користити и као индикатори загађења подземних вода процедурним водама депонија (Roy et al. 2014; Clarke et al. 2015). Због различитог времена употребе заслађивача током прошлог века, могуће је лоцирати извор цурења на депонији, пошто старији делови депоније често садрже сахарин, а новији ацесулфам као заслађивач новије генерације (Roy et al. 2014). Тако је у студији у Канади сахарин био доминант у узорцима вода поред старе депоније у Онтарију (Van Stempvoort et al. 2011).

Поред присуства вештачких заслађивача у природним водама, веома је важан и однос перзистентних и биоразградљивих заслађивача да би се проценило време контаминације и

удаљеност извора загађења. Тако се ацесулфам и цикламат користе као сет индикатора који пружа информације о пореклу и/или старости контаминације. Ниска вредност односа цикламат/ацесулфам указује на старије загађење третираним или нетретираним отпадним водама, са минималним временом од неколико недеља од изливања загађене отпадне воде. С друге стране, висока вредност односа цикламат/ацесулфам недвосмислено указује на свежу контаминацију непречишћеном отпадном водом (Zirlewagen et al. 2016).

## **2.6. Уклањање вештачких заслађивача у постројењима за пречишћавање отпадних вода**

Главни извор вештачких заслађивача у животној средини су ефлуенти из ППОВ и непречишћене комуналне отпадне воде (Tran et al. 2014; Praveena et al. 2019). У постројењима за пречишћавање, из отпадних вода могу да се уклоне различите органске и неорганске материје, попут уља, масти и нутријената, у већем или мањем обиму. Конвенционални третман отпадних вода представља комбинацију физичких и биолошких процеса, први чему је кључан секундарни, биолошки третман уз коришћење више врста микроорганизама, од којих се највише користи процес са активним муљем (Jasim 2020). Многе студије су показале да је уклањање емергентних загађујућих материја у ППОВ ограничено, те стога путем ефлуената ове загађујуће супстанце доспевају у животну средину, обично у ниским концентрацијама, реда величине  $\mu\text{g L}^{-1}$  и  $\text{ng L}^{-1}$  (Ferreiro et al. 2020). Због отпорности приликом третмана отпадних вода и примене различитих технологија пречишћавања које нису дизајниране за уклањање емергентних загађујућих материја, овим путем се и вештачки заслађивачи континуално уносе у животну средину (Guo et al. 2021).

Сматра се да ацесулфам и сукралоза пролазе третман у ППОВ углавном без промене (Buerge et al. 2009; Subedi и Kannan 2014), док други заслађивачи показују различите степене уклањања (Gan et al. 2013; Kokotou и Thomaidis 2013; Subedi и Kannan 2014). Слабо уклањање ацесулфама и сукралозе се може приписати њиховим физичко-хемијским својствима, тј. њиховом хидрофилном природом и хемијским структурама које садрже специфичне функционалне групе у хетероцикличним прстеновима (Tran et al. 2015). С друге стране, други заслађивачи се уклањају у великом проценту у процесу пречишћавања са активним муљем, а такође су биоразградиви у различитом степену и у природном окружењу (Gan et al. 2013; Luo et al. 2019a). Ефикасност уклањања сахарина и цикламата у процесима пречишћавања је чак већа од 90% (Buerge et al. 2009; Scheurer et al. 2009; Subedi и Kannan 2014; Tran et al. 2015; Guo et al. 2021), а биодеградација током биолошког третмана је кључни механизам за њихово елиминисање (Tran et al. 2015). Такође, аспартам, неотам и НХДЦ се потпуно уклањају приликом третмана отпадних вода (Gan et al. 2013; Kokotou и Thomaidis 2013), док стевиозид никада није детектован у отпадним водама ППОВ (Arbeláez et al. 2015; Alves et al. 2021).

Супротно резултатима већине објављених студија, ацесулфам и сукралоза су ефикасно елиминисани (> 82,3% и > 80,3%) у четири ППОВ у Кини, коришћењем третмана са активним муљем уз уклањање фосфора и денитрификацију, где бактерије у анаеробним условима користе нитрате као извор кисеоника, док аспартам и неотам нису били значајно уклоњени (Guo et al. 2021). У другој студији је утврђено да се ацесулфам може разградити у процесу са активним муљем у условима денитрификације, али је стабилан уколико су и растворени кисеоник и нитрати одсутни (Castronovo et al. 2017). У још једној студији у Кини, показано је да се ацесулфам уклања са високом ефикасношћу у секундарном третману у ППОВ (93,1%), заједно са цикламатом (98,4%), док је сукралоза показала најмању



ефикасност уклањања (38,7%) (Yue et al. 2023). Процеси терцијарног третмана отпадних вода, базирани на УВ зрацима, постигли су високе ефикасности уклањања за ацесулфам, сукралозу и неотам (Sang et al. 2014; Yue et al. 2023).

Слично природним водама, сезонске промене могу значајно да утичу на нивое вештачких заслађивача у отпадним водама. Високе летње температуре могу повећати микробиолошку активност и разградњу ових супстанци у постројењима за пречишћавање. У кишним периодима, падавине могу разблажити концентрацију заслађивача у инфлуенти, али због повећања запремине воде смањује се време хидрауличног задржавања у ППОВ, што може смањити ефикасност уклањања (Yue et al. 2023).

## 2.7. Законска регулатива везана за вештачке заслађиваче

Вештачки заслађивачи представљају прехранбене адитиве чија је употреба одобрена смерницама Европског парламента који је донео низ директива о употреби и обележавању прехранбених производа који садрже вештачке заслађиваче. У Европској унији заслађивачи су регулисани као прехранбени адитиви регулативама 1333/2008 (Regulation 1333/2008) и 1129/2011 (Regulation 1129/2011), док су стевиол гликозиди одобрени за употребу регулативом 1131/2011 (Regulation 1131/2011). У прилозима ових регулатива дате су детаљне информације о заслађивачима који су дозвољени у одређеним намирницама или групама прехранбених производа, као и максимално дозвољени дневни унос. Примена вештачких заслађивача у Републици Србији је усаглашена са регулативом Европске уније. На основу члана 26. става 5. Закона о безбедности хране, Министарство здравља Републике Србије је донело Правилник о прехранбеним адитивима помоћу кога се дефинише употреба заслађивача у прехранбеним производима (Правилник о прехранбеним адитивима 2018). Иако се вештачки заслађивачи детектују у акватичним екосистемима широм света и постоје студије о њиховој екотоксичности, тренутно не постоји ниједна законска регулатива у свету у области заштите животне средине која захтева праћење вештачких заслађивача у природном окружењу.

## 2.8. Аналитичко одређивање вештачких заслађивача у узорцима воде и седимената

Не постоји стандардна референтна метода за одређивање вештачких заслађивача у узорцима воде и седимената, али је у научној литератури описано неколико метода везаних за водену матрицу. Већина ових метода подразумева припрему узорака воде екстракцијом на чврстој фази (енг. solid-phase extraction, SPE) уз анализу добијених екстраката течном хроматографијом високих перформанси у спрези са тандем масеном спектрометријом (енг. high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry, HPLC–MS/MS) коришћењем електроспреј јонизације (енг. electrospray ionization, ESI) (Buerge et al. 2009; Loos et al. 2009; Scheurer et al. 2009; Mawhinney et al. 2011; Tran et al. 2013; Wu et al. 2014). Описана је и метода јонске хроматографије у спрези са тандем масеном спектрометријом (Gui et al. 2016), као и анализа методом гасне хроматографије са тандем масеном спектрометријом која је укључивала процес дериватизације анализата (Mead et al. 2009; Voss et al. 2019). Због веома ниских концентрација вештачких заслађивача у животној средини, њихова анализа је веома захтевна, а HPLC–MS/MS има низ предности у односу на остале методе, као што су брзина, осетљивост и ниске границе детекције. У литератури је забележен веома мали број метода за истовремено одређивање већег броја заслађивача у узорцима из животне средине. Из тог разлога, постоји потреба за развојем мултирезидуалне методе за

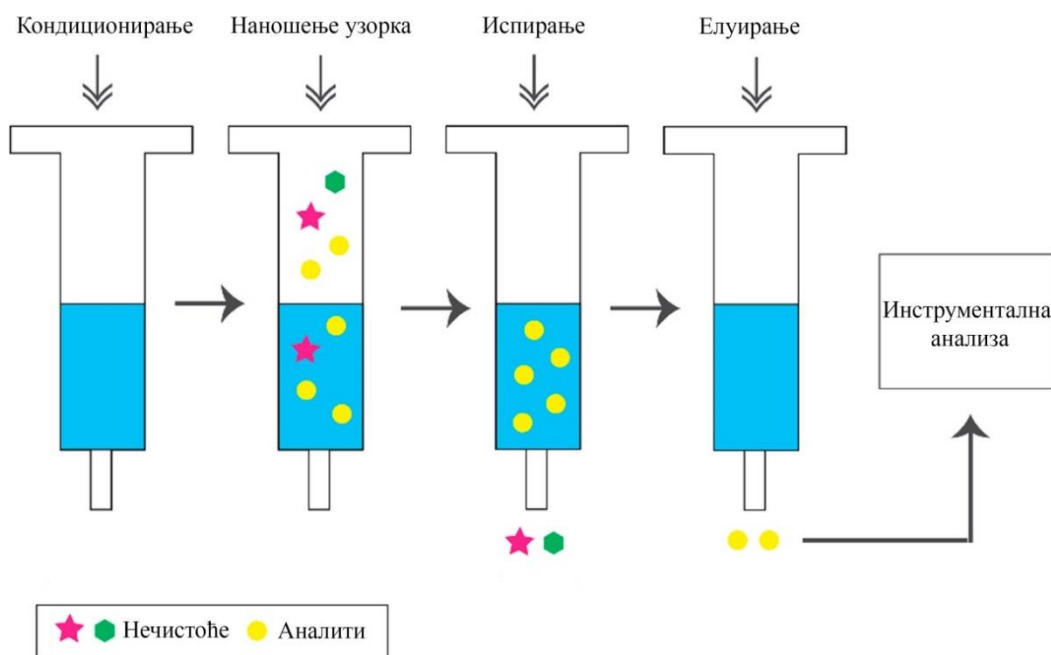
идентификацију и квантификацију трагова вештачких заслађивача у различитим матрицама из природног окружења, попут природних вода и седимената.

### 2.8.1. Припрема узорка воде за одређивање трагова вештачких заслађивача

Припрема узорка је важан корак у сваком аналитичком поступку. С обзиром на то да су вештачки заслађивачи у узорцима воде присутни у ниским концентрацијама, а различите органске и неорганске материје водене матрице могу да утичу на резултате анализе, припрема узорка воде је неопходна да би се изоловали и концентровали аналити, а добијени екстракти пречистили. На самом почетку потребно је урадити предтретман узорка који подразумева филтрацију. Затим се аналити изолују и предконцентришу методом екстракције на чврстој фази, која је најчешће коришћена метода припреме узорка воде за анализу супстанци присутних у траговима (Andrade-Eiroa et al. 2016). SPE методологија се заснива на пропуштању узорка воде кроз сорбент, при чему се аналити везују за чврсту фазу према којој имају велики афинитет, док се већина других компонената матрице узорка не задржава. Након тога, аналити се елуирају са чврсте фазе одговарајућим растварачем (Badawy et al. 2022).

Уобичајена процедура екстракције на чврстој фази се састоји из четири корака (слика 2.2) (Li et al. 2017):

- кондиционирање колоне – пропуштање растварача кроз паковање колоне ради припреме сорбента за ефикасну адсорпцију аналита
- наношење узорка – пропуштање узорка воде кроз колону, при чему се аналити везују за чврсту фазу
- испирање колоне – пропуштање мале запремине растварача (најчешће дејонизоване воде са малим уделом органског растварача) кроз колону ради уклањања нечистоћа и соли из водене матрице који су се везали за сорбент
- елуирање аналита – пропуштање одабраног растварача кроз колону ради растварања аналита и њихове десорпције са чврсте фазе



Слика 2.2. Приказ екстракције на чврстој фази (Maranata et al. 2021)

Данас је доступан велики број сорбената, од којих су најпознатији и најчешће коришћени полимерни сорбенти, хемијски модификовани силика-гел, као и угљенични сорбенти. За припрему узорака воде за анализу трагова вештачких заслађивача најчешће се користе полимерни сорбенти, као што је HLB (енг. hydrophilic-lipophilic balance) (Oasis, Waters, SAD), са уравнотеженим хидрофилним и липофилним својствима који омогућава екстракцију различитих анализата у широком опсегу вредности рН (Loos et al. 2009; Ferrer и Thurman 2010; Minten et al. 2011; Oppenheimer et al. 2011; Berset и Ochsenbein 2012). Поред тога, често су у употреби и Strata X-RP (Phenomenex, САД) (Neset et al. 2010; Sang et al. 2014), Bakerbond SDB-1 (J.T.Baker, САД) (Buerge et al. 2009, 2011), као и Bio-Beads SM-2 (Bio-Rad, САД) (Scheurer et al. 2009). Савремени полимерни сорбенти су углавном кополимери стирена и дивинилбензена. HLB и Strata X-RP садрже полимере N-винилпирилодон и дивинилбензен, и поседују хидрофилна (потичу од N-винилпирилодона) и липофилна својства (потичу од дивинилбензена). С друге стране, Bakerbond SDB-1 је по саставу кополимер етилвинилбензена и дивинилбензена и има изражена хидрофобна својства (Zygler et al. 2010). Bio-Beads SM-2 је неполарни полимерни сорбент састављен од полистирена. Ради ефикаснијег изоловања анализата из узорка и већих приноса, могу се користити и комбинације сорбената (Neset et al. 2010). Поред одговарајућег сорбента, параметри који утичу на ефикасност екстракције на чврстој фази су и рН вредност и запремина узорка воде, као и одговарајући растварач за елуирање и његова запремина.

Екстракција на чврстој фази се изводи у стакленој кади са манометром за везивање вакуум пумпе, а испред пумпе се налази сигурносна боца која онемогућава доспевање течности у пумпу и њено оштећење. Када је затворена перфорираним поклопцем на који се постављају SPE колоне паковане сорбентом на које се наносе узорци воде. Приликом поступка елуирања, у стаклену каду се поставља сталак са киветама испод сваке колоне да би се сакупио добијени екстракт.

### **2.8.2. Припрема узорака седимената за одређивање трагова вештачких заслађивача**

Припрема узорака седимената за анализу укључује сушење и хомогенизацију узорка, екстракцију и концентровање одабраних анализата, као и филтрирање добијених екстраката (Mitra 2003). У првом кораку, седименте је потребно осушити да би се уклонила влага, на собној температури, у сушници или у лиофилизатору. Након тога, врши се хомогенизација узорка уситњавањем и просејавањем кроз сито одговарајућег пречника да би се добиле честице мањих димензија и механички одстраниле нечистоће. Већина метода развијених за одређивање микрополутаната у седиментима укључује ултразвучну екстракцију (енг. ultrasonic extraction, USE), течну екстракцију под притиском (енг. pressurized liquid extraction, PLE) или микроталасну екстракцију (енг. microwave-assisted extraction, MAE) (Најј-Мохамад et al. 2014). Након екстракције одабраних анализата помоћу пажљиво одабраног растварача, врши се концентровање анализата упаравањем екстракта, као и његово филтрирање пре инструменталне анализе.

Прегледом литературе може се закључити да је ултразвучна екстракција веома заступљена у припреми узорака седимената за анализу емергентних загађујућих материја, попут хормона, лекова и стерола (de Sousa et al. 2015; Al-Khazraji и Voxall 2017; Matic Bujagić et al. 2019). Међутим, постоји само неколико студија у којима су трагови вештачких заслађивача одређивани у седиментима, заједно са осталим микрополутантима, и у њима је за припрему узорака коришћена ултразвучна екстракција (Најј-Мохамад et al. 2014; Bernot et al. 2016; Fu et al. 2020). У овим студијама коришћени су различити органски растварачи (метанол, ацетонитрил, итд.), као и различити временски интервали екстракције.

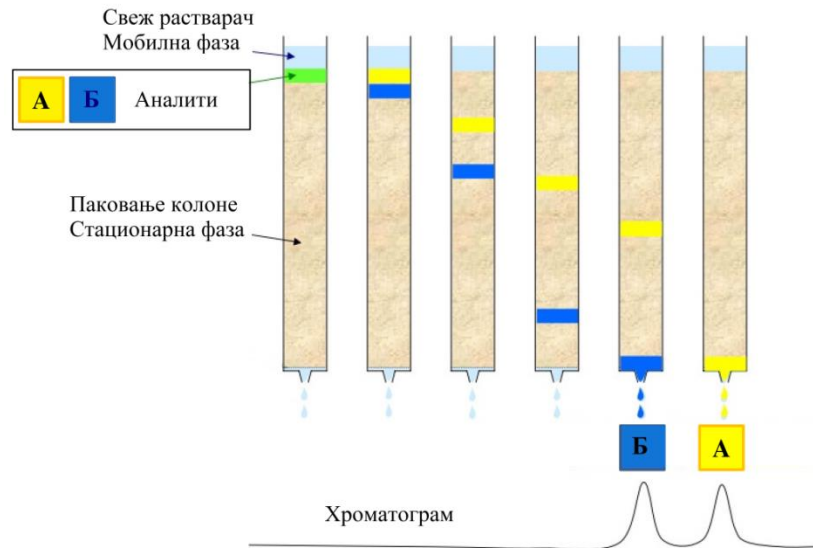
Ултразвучна екстракција представља брзу, једноставну и ефикасну методу за екстракцију органских и неорганских материја из чврстих и получврстих матрица користећи енергију ултразвучних таласа. Узорак се излаже ултразвучним таласима у кратком временском периоду, при чему долази и до загревања. Ултразвучна екстракција се изводи на собној температури и атмосферском притиску, уз употребу мањих запремина растварача за екстракцију (Најј-Мохамад et al. 2014; Syahir et al. 2020). Изводи се убацивањем суда са узорком помешаним са органским растварачем у ултразвучно купатило које је напуњено водом. Вода служи као медијум за пренос енергије ултразвучних таласа који изазивају ерозију матрице узорка и поспешују ефикаснији контакт матрице са растварачем. Укључивањем апаратуре, екстракција се одвија релативно кратко време, а на крају се узорак центрифугира и екстракт декантује. Поступак се понавља неколико пута са мањим запреминама растварача ради веће ефикасности екстракције, при чему се сви добијени екстракти једног узорка помешају (Dean 2003). Параметри који утичу на ефикасност ултразвучне екстракције су врста органског растварача за екстракцију, маса узорка и величина честица, однос запремине растварача и масе узорка, као и време ултразвучне екстракције (Syahir et al. 2020).

### 2.8.3. Течна хроматографија високих перформанси

Хроматографија представља скуп аналитичких техника чији је основни принцип раздвајање различитих једињења из смеше на основу расподеле између две фазе од којих је једна стационарна, док је друга мобилна. Мобилна фаза може бити течност, гас или суперкритични флуид, док непокретна (стационарна) фаза може бити у чврстом или течном стању, као и у облику гела. У течној хроматографији, мобилна фаза се налази у течном стању, док стационарна фаза може бити у чврстом или течном облику (Ardrey 2003). Раствор који садржи анализите од интереса ињектује се у хроматографски систем и пропушта кроз хроматографску колону. До хроматографског раздвајања (слика 2.3) долази због различите интеракције компонената смеше са мобилном и стационарном фазом, при чему различити аналити имају различито време трансфера кроз колону. Ретенционо време представља време проласка анализита од места уношења узорка у хроматографски систем до места његове детекције. Избор одговарајуће колоне, као и мобилне фазе, омогућава ефикасније раздвајање анализита. Аналити са већим афинитетом ка стационарној фази се спорије елуирају са паковања колоне и карактеришу их већа ретенциона времена, док аналити који успостављају јаче везе са мобилном фазом имају краће време задржавања. На основу добијеног хроматограма могуће је извршити квалитативну и квантитативну анализу поређењем ретенционих времена карактеристичних за одређени аналит, односно поређењем површине хроматографског пика детектованог анализита са површином пика стандардног раствора анализита познате концентрације (Gika et al. 2016).

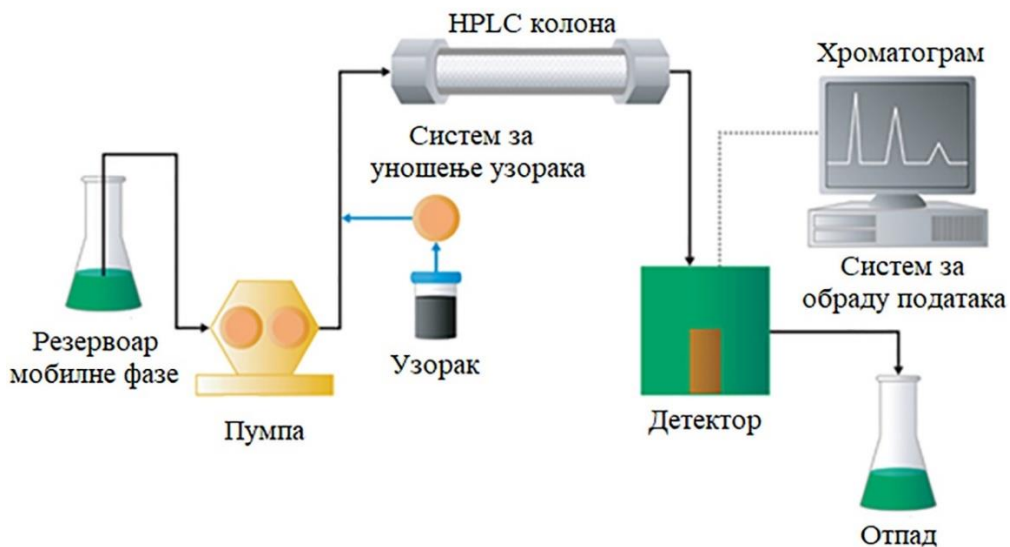
У погледу поларности хроматографског система постоји нормално-фазна и реверзно-фазна хроматографија. За нормално-фазну хроматографију је карактеристична поларна стационарна фаза и неполарна мобилна фаза (n-хексан, тетрахидрофуран, итд.), док реверзно-фазну хроматографију одликује неполарна стационарна фаза и поларна мобилна фаза (вода, метанол, ацетонитрил, итд.) (Gika et al. 2016).

## Теоријски део



Слика 2.3. Приказ хроматографског раздвајања (FSSAI, 2023)

Код течне хроматографије високих перформанси мобилна фаза се креће под високим притиском (до 400 bar). Ово је неопходно да би се обезбедио константан проток и поновљивост хроматографског раздвајања, при чему се стационарна фаза пакује у колону способну да издржи високе вредности притиска. Честице стационарне фазе у HPLC систему су веома ситне (3–10  $\mu\text{m}$ ), због чега је велика контактна површина, па је и раздвајање компонената ефикасније (виша је резолуција) него код класичне хроматографије (Gika et al. 2016). За оптималну HPLC анализу потребно је да стационарна фаза буде нерастворна у мобилној фази, као и инертна и стабилна при промени притиска, температуре и pH вредности мобилне фазе. Растварачи мобилне фазе морају бити високе чистоће и ниске вискозности, а аналити од интереса морају у њима бити растворни. Проток мобилне фазе и елуирање анализата са колоне може се вршити изократски (константан састав мобилне фазе) или градијентно (састав мобилне фазе се мења током времена). С обзиром на то да је при изократском протоку мобилне фазе ретко оптимално раздвајање свих компонената смеше у разумном временском периоду, много чешће се примењује проток мобилне фазе у градијентном облику (Mayer 2004).



Слика 2.4. Основни делови HPLC система (Waters, 2023)

Основни делови HPLC система су (слика 2.4):

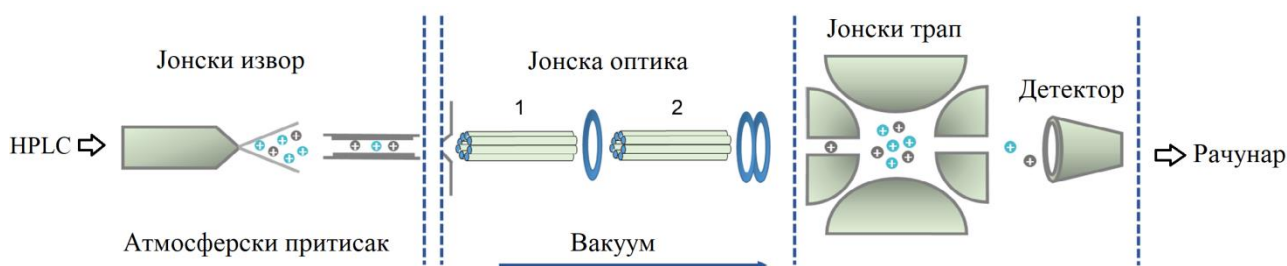
- резервоар мобилне фазе – стаклене боце са тefлонским цревом и филтером у којима се налазе различити растварачи
- пумпа – обезбеђује висок притисак и континуалан проток мобилне фазе
- систем за уношење узорка – аутосемплер или ињектор за уношење мале запремине узорка у хроматографски систем
- хроматографска колона – са густо пакованим честицама стационарне фазе у којој се врши хроматографско раздвајање анализата
- детектор – масени, флуоресцентни, рефракциони, електрохемијски, UV-VIS
- систем за обраду добијених података – рачунар

#### 2.8.4. Масена спектрометрија

Масена спектрометрија (енг. mass spectrometry, MS) је аналитичка техника којом се анализи присутни у узорку идентификују на основу односа масе и наелектрисања насталих јона ( $m/z$ ). Дијаграм зависности релативне количине јона од  $m/z$  вредности представља масени спектар. С обзиром на то да су масени спектри већине супстанци довољно специфични да омогуће њихову идентификацију са високим степеном сигурности, масена спектрометрија има широк спектар примене. Ова техника је веома селективна и осетљива, а за саму анализу је потребна мала количина анализата (do 1 pg) (Ardrey 2003).

MS анализа подразумева јонизацију узорка у јонском извору, раздвајање јона на основу  $m/z$  вредности у масеном анализатору, детекцију насталих јона и добијање масеног спектра узорка. Основни делови масеног спектрометра су (слика 2.5):

- систем за уношење узорка
- јонски извор (настајање јона коришћењем разних техника јонизације)
- јонска оптика
- масени анализатор (разврставање јона на основу  $m/z$  вредности)
- вакуум систем (обезбеђује високи вакуум)
- детектор (генерише електрични сигнал пропорционалан броју јона)
- рачунар (обрада резултата)



Слика 2.5. Приказ масеног спектрометра са јонским трапом као масеним анализатором (Schleicher et al. 2022)

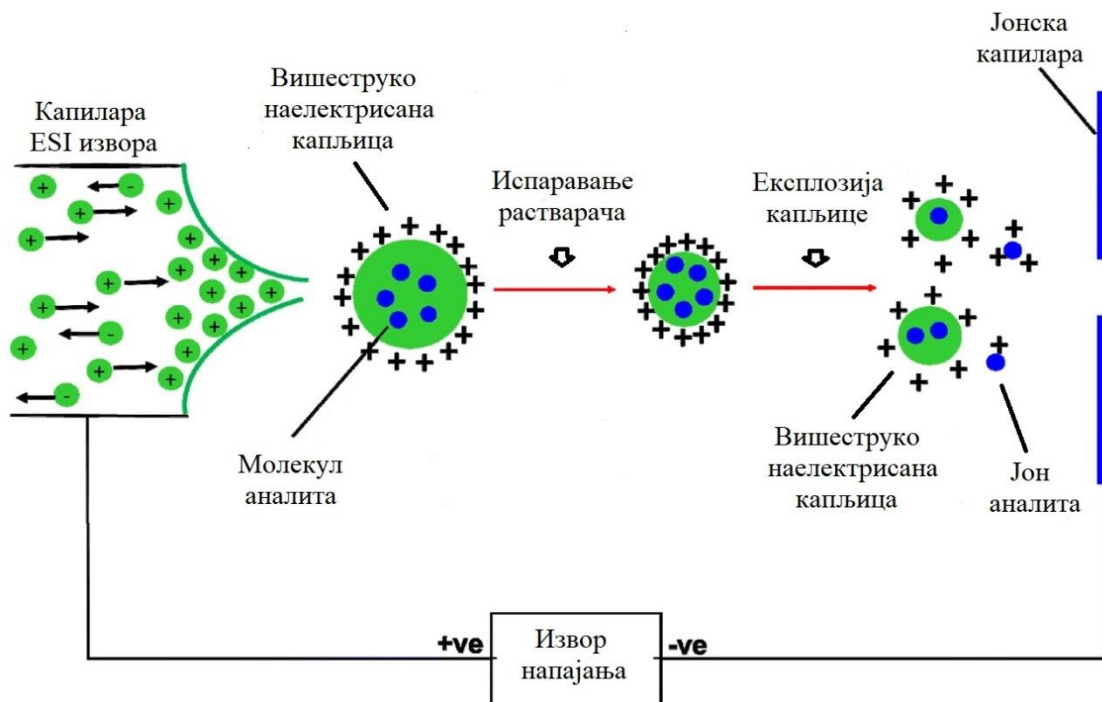
### 2.8.4.1. Технике јонизације

При избору одговарајуће технике јонизације главне одреднице су поларност анализата, термичка стабилност, као и врста узорка (Cody 2002). У масеној спектрометрији се користе многобројне технике јонизације, као што су:

- јонизација електронским ударом (енг. electron impact ionization, EI)
- хемијска јонизација (енг. chemical ionization, CI)
- јонизација бомбардовањем брзим атомима (енг. fast atom bombardment, FAB)
- јонизација потпомогнута ласерском десорпцијом из матрице (енг. matrix-assisted laser desorption ionization, MALDI)
- хемијска јонизација на атмосферском притиску (енг. atmospheric pressure chemical ionization, APCI)
- електроспреј јонизација (енг. electrospray ionization, ESI)

Две технике које се најчешће користе приликом HPLC–MS анализе загађујућих супстанци у узорцима из животне средине су APCI и ESI. APCI се обично користи за анализу једињења средње и мале поларности, при чему се јонизација одвија у гасовитој фази, док се ESI претежно користи за анализу неиспарљивих и термонестабилних поларних анализата (Ardrey 2003; Lopez de Alda et al. 2003).

Код електроспреј јонизације (слика 2.6), узорак растворен у поларном, испарљивом растварачу се распршује у облику спреја кроз челичну капилару која се налази под високим напоном, на атмосферском притиску. У струји азота, вишеструко наелектрисане капљице аеросола постају све мање због испаравања растварача, а густина истоименог наелектрисања се повећава. Када површински напон не може да издржи нагомилано истоимено наелектрисање долази до експлозије капљица. Процес испаравања и експлозије капљица се понавља све док се анализат потпуно не ослободи молекула растварача и постане јон. Кроз јонску капилару, настали јони анализата улазе у масени анализатор (Cody 2002; Niessen 2006).



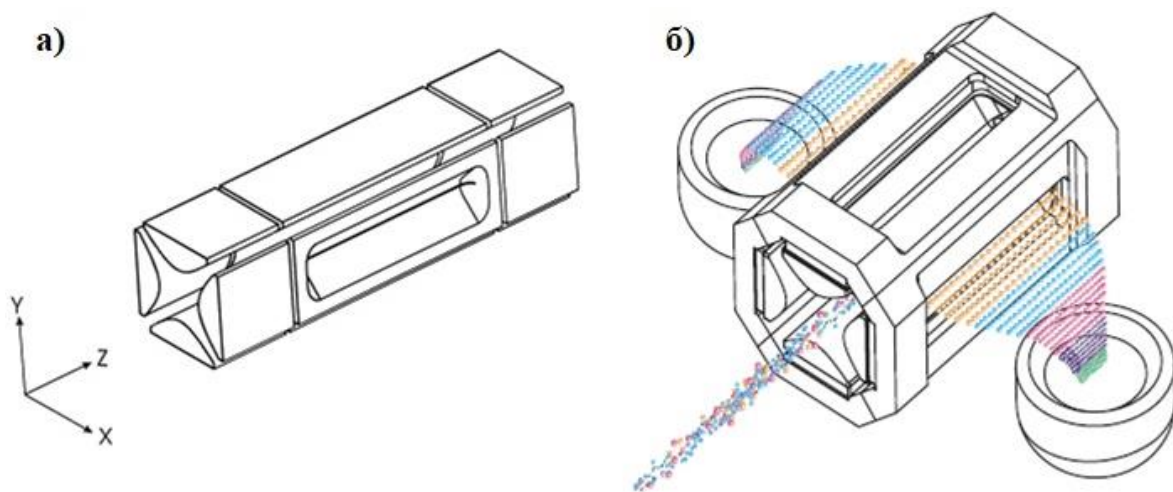
Слика 2.6. Приказ електроспреј јонизације (Microsaic, 2023)

Електроспреј јонизацијом могу се добити протоновани или депротоновани молекули анализата ( $[M+H]^+$ , односно  $[M-H]^-$ ), али се често јављају и вишеструко наелектрисани јони, типа  $[M+nH]^{n+}$ , као и адукти са растварачем ( $[M+R]^+$  или  $[M-R]^-$ ). На интензитет ESI сигнала, поред концентрације анализата, утичу и физичко-хемијска својства анализата, рН вредност раствора, састав мобилне фазе, као и инструментални параметри (проток мобилне фазе, температура и напон ESI извора) (Kostiainen и Каурпила 2009).

#### 2.8.4.2. Масени анализатори

Масени анализатор је уређај у коме се јони анализата, настали у јонском извору, раздвајају према односу масе и наелектрисања. Типови масених анализатора се разликују у зависности од тога да ли се за раздвајање јона користи електрично или магнетно поље. Код HPLC–MS анализе, најчешће се користе јонски трап, квадрупол и анализатор времена прелета јона (енг. time of flight, TOF) (Ardrey 2003). Када су вештачки заслађивачи у питању, у претходним студијама су за њихово праћење у различитим матрицама из животне средине обично коришћени троструки квадрупол (Loos et al. 2009; Oppenheimer et al. 2011; Tran et al. 2014) и TOF анализатор (Ferrer и Thurman 2010; Wu et al. 2014).

Јонски трап је масени анализатор у коме јони могу да се складиште или анализирају применом радиофреквентног електричног поља. У зависности од начина складиштења јона разликују се тродимензионални (квадруполни) и дводимензионални (линеарни) јонски трапови. Линеарни јонски трап (слика 2.7) се састоји од четири паралелне електроде чији се крајеви завршавају сочивима која усмеравају јоне ка унутрашњости трапа. Ове електроде су подељене у три сегмента, а на централним деловима две наспрамно постављене електроде се налазе прорези који служе за излаз јона из трапа. При проласку јона кроз линеарни јонски трап, сваки сегмент електрода се налази на различитим напонима. Наизменичном променом напона првог и трећег сегмента јони се задржавају у трапу. Када се повећа напон, јони се избацују из трапа кроз прорезе на електродама према  $m/z$  односу. Да би се обезбедиле стабилне путање јона у трапу и смањила њихова кинетичка енергија, у трап се уводи инертни гас хелијум (Hoffmann и Stroobant 2007). Предност коришћења линеарног јонског трапа, у односу на класични, тродимензионални јонски трап, је висока ефикасност складиштења јона без ефекта разелектрисања, што утиче на повећање осетљивости инструмента (Douglas et al. 2005).



Слика 2.7. Распоред електрода (а) и изглед линеарног јонског трапа (б) (ThermoFisher, 2023)



### 2.8.4.3. Тандем масена спектрометрија

Тандем масена спектрометрија се користи за поуздану идентификацију и квантификацију анализата, посебно оних који имају исту молекулску масу, а различите фрагментне јоне, као и оних који нису потпуно хроматографски раздвојени. Развојем тандем масене спектрометрије постала је могућа прецизна и поуздана детекција веома ниских концентрација анализата у комплексним матрицама. MS/MS анализа се врши у две фазе. У првој фази се изолује јон од интереса, затим следи фрагментација изабраног јона, након чега се у другој фази анализирају производи фрагментације (Ardrey 2003). Тандем масена анализа може бити:

- тандемска у простору – масена анализа се изводи у одвојеним просторима, у исто време (као код троструког квадруполоа): постоје два масена анализатора и колизиона ћелија, при чему се у првом анализатору врши изоловање јона од интереса, у колизионој ћелији се врши његова фрагментација, а у другом анализатору се врши анализа фрагментних јона
- тандемска у времену – масена анализа се изводи у истом простору, али у различито време (као код јонског трапа)

У јонском трапу се изолује се јон од интереса (прекурсор јон), док се сви остали јони избацују из трапа. Затим се прекурсор јони фрагментују путем судара са атомима инертног гаса. Настали фрагменти се секвенцијално избацују из трапа и детектују, при чему се добија MS/MS спектар. Процес изолације, фрагментације и масене анализе могуће је поновити неколико пута и тај процес је познат као MS<sup>n</sup> анализа. Број MS<sup>n</sup> корака које је могуће обавити зависи од испитиваног једињења и примењених инструменталних параметара (Ardrey 2003; Niessen 2006).

### 2.8.5. HPLC–MS/MS анализа

HPLC–MS/MS је селективна и веома осетљива аналитичка техника која комбинује сепарациону моћ течне хроматографије са идентификационим могућностима масене спектрометрије. Добра хроматографска раздвојеност анализата, као и поклапање ретенционих времена стандарда и супстанце у узорку, нису увек гаранција недвосмисленог присуства анализата од интереса, јер се велики број супстанци на сличан начин раздваја у хроматографском систему. Применом масене спектрометрије добија се поуздана идентификација анализата на основу молекулске масе и карактеристичне фрагментације (Ardrey 2003).

HPLC–MS/MS анализа се широко примењује у анализи различитих материја у узорцима из животне средине, биолошким узорцима, фармацеутским препаратима, храни, итд. У доступној литератури, до сада је објављен мали број мултирезидуалних метода за одређивање вештачких заслађивача у узорцима из природног окружења. Код већине забележених метода прати се само сукралоза у природним водама, због велике употребе у многим земљама, као и распрострањености у животној средини и отпорности на деградацију (Kokotou et al. 2012).

### 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

#### 3.1. Припрема раствора вештачких заслађивача и коришћени реагенси

У овом раду је одабрано осам вештачких заслађивача који су дозвољени за примену у прехранбеним производима и најчешће коришћени у Републици Србији. Хемијске структуре и физичко-хемијска својства одабраних заслађивача су приказани у табели 3.1. Аналитички стандарди већине одабраних вештачких заслађивача (ацесулфам, сахарин, цикламат, аспартам, НХДЦ, неотам и стевиозид) су набављени од произвођача Sigma-Aldrich (Бухс, Швајцарска), док је сукралоза купљена од TCI Europe (Звајдрехт, Белгија). Све стандардне супстанце биле су високе чистоће ( $\geq 98\%$ ).

Стандардни раствори сваког вештачког заслађивача су припремљени у метанолу при концентрацији од  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Стандардни раствор свих заслађивача је припремљен при концентрацији од  $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ , мешањем појединачних стандардних раствора и разблаживањем метанолом. Сви раствори су пре анализе чувани на  $-4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Коришћени растварачи су били HPLC чистоће, набављени од J.T. Baker (Гљивице, Пољска; метанол), Sigma-Aldrich (Штајнхајм, Немачка; ацетонитрил и етил-ацетат) и Carlo Erba (Вал де Реј, Француска; ацетон и дихлорметан). Амонијум-ацетат и концентрована сирћетна киселина која се користила за подешавање рН вредности узорка су били аналитичке чистоће. Дејонизована вода је припремљена коришћењем GenPure система (ТКА, Нидерелберт, Немачка) за добијање ултра чисте воде.

#### 3.2. Снимање масених спектра вештачких заслађивача

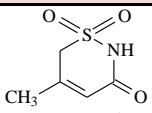
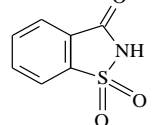
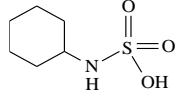
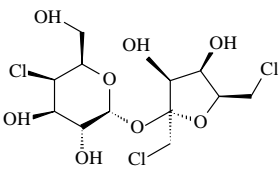
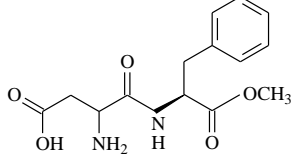
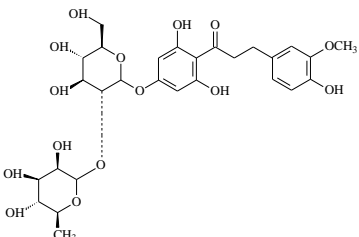
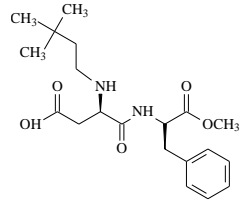
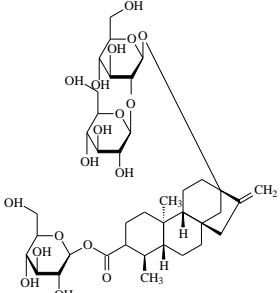
Масени спектри вештачких заслађивача су снимљени коришћењем LTQ XL (Thermo Fisher Scientific, Волтам, САД) линеарног јонског трапа као масеног анализатора. Као јонизациона техника примењена је електроспреј јонизација у негативном режиму рада јонског извора. Оптимални параметри ESI извора за детектовање свих одабраних вештачких заслађивача били су следећи: напон извора ( $5 \text{ kV}$ ), проток гаса (eng. sheath gas;  $34 \text{ au}$ , тј.  $34 \text{ arbitrary units}$ , јединица на скали у опсегу  $0\text{--}100$  дефинисаном LTQ XL системом), проток помоћног гаса (eng. auxiliary gas;  $3 \text{ au}$ ) и температура капиларе ( $300 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

Масени спектри одабраних заслађивача су снимљени уношењем стандардног раствора сваког појединачног анализатора, концентрације  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ , у масени спектрометар. За идентификацију и квантификацију сваког вештачког заслађивача одабрана је карактеристична реакција фрагментације прекурсор јона у најинтезивнији фрагментни јон. Праћење одабране реакције фрагментације (eng. selected reaction monitoring, SRM) сваког анализатора је неопходно приликом анализе узорка на присуство одабраних вештачких заслађивача. Одабрани су и додатни SRM прелазни који ће бити употребљени за потврду присуства заслађивача детектованих у узорцима воде и седимената.

Приликом снимања масених спектра заслађивача одабрана је и оптимална смеша растварача са којом је најинтезивнија јонизација анализатора, а која указује и на оптималан састав мобилне фазе. Тестиране су три смеше: метанол/вода ( $1:1, \text{ v/v}$ ), метанол/ $0,2\%$  водени раствор мравље киселине ( $1:1, \text{ v/v}$ ) и метанол/ $4 \text{ mmol L}^{-1}$  водени раствор амонијум-ацетата ( $1:1, \text{ v/v}$ ). Стандардни раствори четири заслађивача (ацесулфама, сахарина, цикламата и аспартама) припремљени су растварањем у три различите смеше растварача, при концентрацији од  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ , и анализирани.

Експериментални део

Табела 3.1. Хемијске структуре и физичко-хемијска својства одабраних вештачких заслађивача: моларна маса ( $M$ ), коефицијент расподеле између октанола и воде ( $K_{ow}$ ), коефицијент расподеле између органског угљеника и воде ( $K_{oc}$ ), константа дисоцијације киселине ( $K_a$ ) и растворљивост у води на 25 °C ( $R$ )

Вештачки заслађивач	Хемијска структура	$M$ (g mol <sup>-1</sup> )	log $K_{ow}$	log $K_{oc}$ <sup>a</sup>	p <i>K</i> <sub>a</sub>	$R^a$ (mg L <sup>-1</sup> )
Ацесулфам (C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>4</sub> S)		163,1	-1,33 <sup>a</sup>	1,3	2,0 <sup>b</sup>	9,1·10 <sup>5</sup>
Сахарин (C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>3</sub> S)		183,1	0,45 <sup>a</sup>	1,5	1,3 <sup>b</sup>	789,2
Цикламат (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>3</sub> S)		179,2	-1,61 <sup>a</sup>	1,6	1,7 <sup>b</sup>	1·10 <sup>6</sup>
Сукралоза (C <sub>12</sub> H <sub>19</sub> Cl <sub>3</sub> O <sub>8</sub> )		397,6	-1,00 <sup>a</sup>	1,0	12,5 <sup>B</sup>	2,3·10 <sup>4</sup>
Аспартам (C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )		294,3	0,07 <sup>a</sup>	1,8	2,9 <sup>b</sup> и 7,3	564,7
Неохесперидин дихидрохалкон (НХДЦ) (C <sub>28</sub> H <sub>36</sub> O <sub>15</sub> )		612,6	-0,3 <sup>b</sup>	-	6,8 <sup>B</sup>	2,0·10 <sup>3</sup>
Неотам (C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )		378,5	2,88 <sup>a</sup>	3,1	4,1 <sup>b</sup> и 7,7	14,4
Стевиозид (C <sub>38</sub> H <sub>60</sub> O <sub>18</sub> )		804,9	-1,2 <sup>b</sup>	-	12,5 <sup>B</sup>	4,5·10 <sup>3</sup>

<sup>a</sup> Извор: ChemSpider база података; <http://www.chemspider.com/>

<sup>b</sup> Извор: PubChem база података; <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

<sup>B</sup> Извор: Chemical Book; <https://www.chemicalbook.com/>

### 3.3 Оптимизација хроматографског раздвајања вештачких заслађивача

HPLC анализа одабраних вештачких заслађивача је извршена применом Dionex UltiMate 3000 HPLC система (Thermo Fisher Scientific). При оптимизацији хроматографског раздвајања анализата тестирани су метанол, ацетонитрил и водени раствор амонијум-ацетата ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) као састојци мобилне фазе. Испитивани су различити састави и градијенти мобилне фазе, са додатком адитива ради побољшавања изгледа пикова. Тестиране су и две реверзно-фазне колоне за оптимално раздвајање: Luna<sup>®</sup> C8 (3,0 mm × 150 mm, 3 μm) и Luna<sup>®</sup> C18 (4,6 mm × 150 mm, 3 μm) компаније Phenomenex (Торанс, САД). Две колоне имају различито паковање и различит унутрашњи пречник, што утиче на различито задржавање анализата. Паковање C18 колоне садржи дуже угљоводоничне ланце од C8 колоне, због чега је неполарније. За обраду добијених података коришћен је софтвер Xcalibur v. 1,3 (Thermo Fisher Scientific).

### 3.4 Оптимизација HPLC–MS/MS параметара

Након избора оптималног састава и градијента мобилне фазе, као и хроматографске колоне, поново је извршено подешавање инструменталних параметара, при чему су стандардни раствори појединачних заслађивача, концентрације  $10 \text{ μg mL}^{-1}$ , уношени у ток мобилне фазе. На основу масено-спектрометријске анализе, потврђени су карактеристични SRM прелази за идентификацију, квалитативно одређивање и потврду одабраних вештачких заслађивача у узорцима воде и седимената. SRM детекција вештачких заслађивача је подељена у три временска сегмента ради повећања осетљивости, при чему су максимално четири анализата снимана у једном сегменту.

### 3.5. Припрема узорака

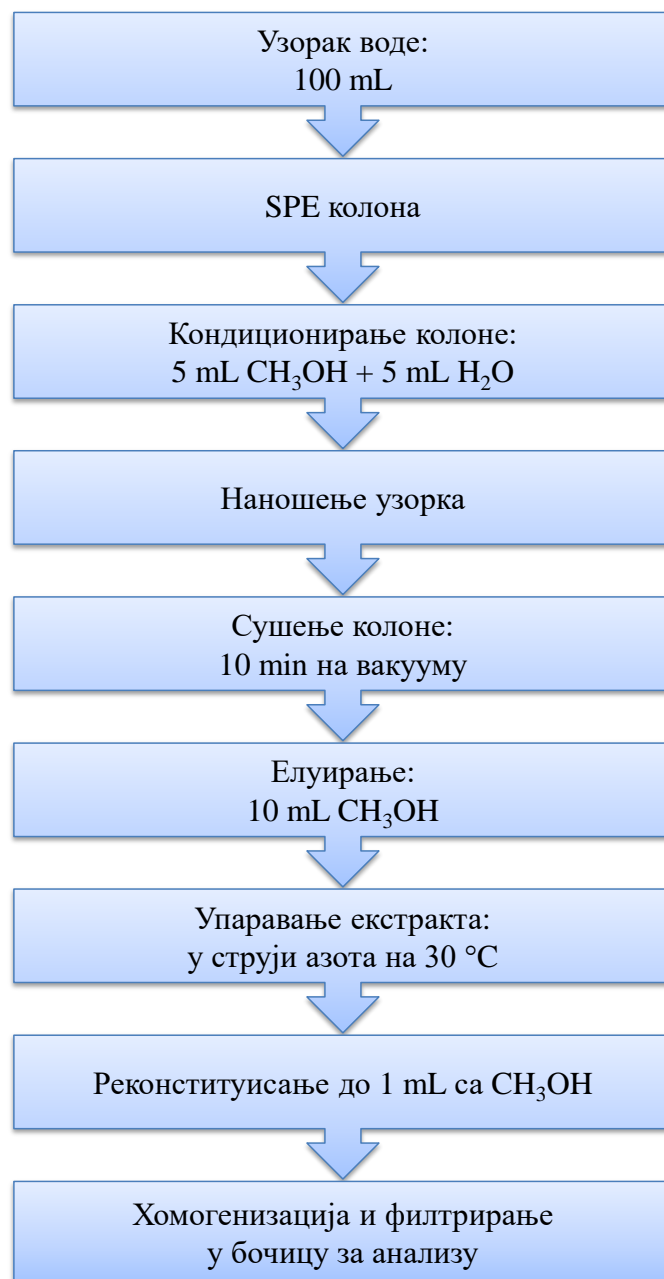
#### 3.5.1. Оптимизација екстракције на чврстој фази узорака воде

У оптимизацији поступка припреме узорака воде за анализу трагова вештачких заслађивача коришћењем екстракције на чврстој фази, тестирани су следећи параметри: врста сорбента, рН и запремина узорка воде, као и растварач за елуирање.

##### 3.5.1.1. Избор SPE сорбента

За оптималну екстракцију одабраних заслађивача испитано је четири врсте сорбента: јоноизмењивачки, C18, угљенични и полимерни. Тестирано је следећих осам SPE колоне: 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) произвођача Supelco (Белфонт, САД); Oasis MAX (30 mg/1 mL), Oasis HLB (200 mg/6 mL) произвођача Waters (Милфорд, САД); Bakerbond SDB-1 (30 mg/1 mL) произвођача J.T. Baker (Филипсбург, САД); и Strata X (200 mg/6 mL) произвођача Phenomenex (Торанс, САД). SPE поступак за сваку тестирану врсту колоне је прилагођен количини сорбента, у складу са упутствима произвођача.

Процедура екстракције на чврстој фази изведена приликом оптимизације SPE сорбента приказана је на слици 3.1. У дејонизовану воду (100 mL) је додат стандардни раствор свих заслађивача при концентрацији од  $1,0 \text{ ng mL}^{-1}$ . Претходно је паковање SPE колоне кондиционирано са 5 mL метанола, а затим са 5 mL дејонизоване воде. На колону је затим нанет узорак, а потом је паковање сушено на вакууму током 10 min. Аналити су елуирани са паковања коришћењем 10 mL метанола, а добијени екстракт је упарен у струји азота на  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  и реконституисан до запремине од 1 mL. Коначни екстракти су филтрирани помоћу  $0,45 \text{ }\mu\text{m}$  PVDF (поливинилиден-дифлуорид) филтера произвођача Roth (Карлсруе, Немачка) и анализирани.



Слика 3.1. Процедура екстракције на чврстој фази

### 3.5.1.2. Избор рН вредности узорака

Након одабира оптималног SPE сорбента, тестирана је рН вредност узорка воде при којој ће екстракција бити најефикаснија. Експеримент је изведен коришћењем узорка са рН вредношћу подешеном на: 2,0, 3,0, 4,0 или 6,0, на исти начин као у претходном кораку оптимизације. Једина разлика је у кондиционирању паковања колоне, јер се након 5 mL метанола додаје 5 mL дејонизоване воде са рН подешеном на тестирану вредност.

### 3.5.1.3. Избор запремине узорака

У циљу испитивања капацитета сорбента за екстракцију анализата и спречавања њиховог испирања са колоне, у следећем кораку SPE оптимизације тестиране су следеће запремине узорака воде: 50 mL, 100 mL и 250 mL. Експерименти су изведени на исти начин као у претходном кораку оптимизације, уз подешавање рН вредности узорка на оптималну вредност.

### 3.5.1.4. Избор растварача за елуирање

У завршном кораку оптимизације, тестирани су растварачи за ефикасно елуирање вештачких заслађивача са SPE сорбента, и то: метанол, ацетонитрил, дихлорметан, ацетон и етил-ацетат. Сваки експеримент је изведен применом параметара оптимизованих у претходним корацима, а за екстракцију заслађивача коришћена је запремина елуента од 10 mL.

## 3.5.2. Оптимизација ултразвучне екстракције узорака седимената

Пре анализе, узорци седимената, чувани у замрзивачу, су одмрзнути, а затим сушени на ваздуху, на собној температури, током недељу дана у мраку, да би се уклонила влага. Узорци су затим хомогенизовани и просејани кроз сито величине пора 500  $\mu\text{m}$  да би се уклониле нећистоће. Приликом оптимизације припреме узорака седимената, испитиван је само оптимални растварач за екстракцију. Остали параметри (маса узорака седимената и време ултразвучне екстракције) одређени су на основу претходног искуства у анализи узорака седимената (Matić et al. 2014). За оптималну екстракцију одабраних заслађивача тестирано је пет растварача различите поларности: метанол, ацетонитрил, дихлорметан, ацетон и етил-ацетат. У експериментима оптимизације, у претходно осушени и просејани седимент (2,0 g) додат је стандардни раствор свих вештачких заслађивача при концентрацији од 100 ng g<sup>-1</sup>. Припремљени узорак је екстрахован коришћењем 5 mL одабраног растварача, у ултразвучном купатилу, у трајању од 15 min. Узорак је затим центрифугиран током 10 min на 4000 обртаја/min. Иста процедура је поновљена још два пута, при чему је добијено 15 mL екстракта. Екстракти свих узорака су упарени до сува у струји азота и реконституисани до запремине од 0,5 mL. Затим су профильтрирани кроз 0,45  $\mu\text{m}$  PVDF филтере и анализирани.

### 3.6. Калибрација

Приликом оптимизације екстракције на чврстој фази узорака воде и ултразвучне екстракције узорака седимената коришћена је екстерна калибрација са стандардима који одговарају матрици узорка (енг. *matrix-matched standards*). Калибрациони стандарди су припремљени при концентрацији од  $100 \text{ ng mL}^{-1}$  за узорке воде и  $400 \text{ ng mL}^{-1}$  за узорке седимента, додавањем стандардног раствора свих заслађивача у екстракт следеће пробе добијен припремом узорка описаним поступком. У експериментима оптимизације ултразвучне екстракције, површина пика анализата детектованих у слепој проби је одузета од површине пика анализата у испитиваном узорку, као и у стандарду који одговара матрици узорка.

Приликом анализе реалних узорака, тј. узорака природних и отпадних вода, као и речних седимената, коришћена је метода стандардног додатка. Након филтрације, сваки узорак површинске, подземне и отпадне воде је подељен у шест делова по  $50 \text{ mL}$ . Четири дела су коришћена за припрему калибрационих раствора додавањем стандардног раствора у опсегу концентрација од  $10\text{--}200 \text{ ng L}^{-1}$  (за површинске и подземне воде) и  $100\text{--}15000 \text{ ng L}^{-1}$  (за отпадне воде). У преостала два дела узорка воде није додат стандардни раствор. За узорке седимената, калибрациони раствори су припремљени додавањем стандардног раствора при концентрацији од  $5, 50, 250$  и  $500 \text{ ng g}^{-1}$ . Припремљени узорци воде и седимената су екстраховани коришћењем оптимизоване SPE процедуре, односно ултразвучне екстракције.

Са сваком серијом узорака анализирани су и следеће пробе, на исти начин као и реални узорци, да би се узела у обзир могућа контаминација током припреме и анализе узорака. За узорке природних и отпадних вода, слепа проба је била дејонизована вода ( $50 \text{ mL}$ ) екстрахована применом SPE процедуре. За узорке седимената, слепа проба је припремљена применом ултразвучне екстракције без седимента. Одабрани вештачки заслађивачи нису детектовани у слепим пробама.

### 3.7. Валидација метода

Развијене и оптимизоване HPLC–MS/MS методе су валидиране коришћењем реалних узорака површинске, подземне и отпадне воде, као и узорака речних седимената. Одређивани су параметри валидације методе, као што су: принос методе за опсег испитиваних концентрација, поновљивост, линеарност, границе детекције и квантификације, као и утицај матрице (Taverniers et al. 2004). Оптимизована метода за анализу узорака воде је валидирана коришћењем одговарајуће матрице на пет нивоа концентрације:  $10\text{--}200 \text{ ng L}^{-1}$  за матрицу површинских и подземних вода и  $100\text{--}50000 \text{ ng L}^{-1}$  за матрицу отпадних вода. Валидација методе за анализу узорака седимената извршена је на четири нивоа концентрације ( $5, 50, 250$  и  $500 \text{ ng g}^{-1}$ ). Приноси оптимизованих метода су одређени коришћењем стандарда који одговарају матрици узорка. Поновљивост метода је одређена извођењем експеримената у триплекату, у три узастопна дана, и изражена је као релативна стандардна девијација (енг. *relative standard deviation, RSD*). Границе детекције (енг. *limits of detection, LODs*) и границе квантификације (енг. *limits of quantification, LOQs*) су процењене као минималне концентрације које дају однос сигнала и шума од 3 и 10, респективно (Tran et al. 2013; Gan et al. 2014). LOD и LOQ вредности су израчунате коришћењем узорака воде и седимената у које је додат стандардни раствор осам вештачких заслађивача при ниским концентрацијама. Линеарност метода је одређена из графика зависности површина пика анализата у узорцима у које је додат стандардни раствор на више нивоа концентрације од израчунате концентрације анализата у узорцима након анализе. Приказана је у облику коефицијента корелације ( $R^2$ ) за сваки анализат.

HPLC–MS/MS техника је подложна појави утицаја матрице (енг. matrix effect, ME), тј. смањењу или ређе, повећању сигнала анализата у присуству састојака и нечистоћа матрице узорка. Супресија сигнала најчешће настаје због смањене јонизације анализата, јер велика количина неиспарљивих компонената матрице може да утиче на смањење настајања и испаравања капљица електроспреја (Annesley 2003). Утицај матрице може се умањити бољим пречишћавањем екстракта приликом припреме узорка за анализу, променом и оптимизацијом инструменталних параметара, као и избором погоднијих метода калибрације (Gosseti et al. 2010). У овом раду, утицај матрице је процењен коришћењем стандарда који одговарају матрици узорка применом једначине (1):

$$ME (\%) = \frac{P_{standard\ u\ matrici} - P_{slepa\ proba}}{P_{standard\ u\ metanolu}} \times 100 - 100 \quad (1)$$

при чему је:  $P_{standard\ u\ matrici}$  – површина пика анализата стандарда који одговара матрици узорка,  $P_{slepa\ proba}$  – површина пика анализата слепог пробне и  $P_{standard\ u\ metanolu}$  – површина пика анализата стандарда у метанолу. Од добијене вредности (у %) одузета је вредност 100 да би се приказало смањење сигнала (негативна вредност) или повећање (позитивна вредност) у присуству компонената матрице (Furey et al. 2013; Matić et al. 2014).

### 3.8. Процена екотоксиколошког ризика

У овом раду је описана процена екотоксиколошког утицаја вештачких заслађивача детектованих у природним водама и седиментима на присутне водене организме, применом концентрација за које се сматра да немају утицај (енг. predicted no-effect concentration, PNEC) добијених из NORMAN-ове екотоксиколошке базе података (NORMAN 2023). Процена екотоксиколошког ризика је извршена израчунавањем коефицијента ризика (енг. risk quotient, RQ) за вештачке заслађиваче детектоване у сваком узорку воде и седимента дељењем детектоване концентрације (енг. measured environmental concentration, MEC) са одговарајућом PNEC вредношћу (Alves et al. 2021; Kondor et al. 2022), применом једначине (2):

$$RQ = \frac{MEC}{PNEC} \quad (2)$$

У екотоксиколошким студијама, PNEC вредности се најчешће израчунавају дељењем најниже краткорочне EC50 (средња ефективна концентрација, енг. median effective concentration), краткорочне LC50 (средња летална концентрација, енг. median lethal concentration) или дугорочне NOEC (концентрација без ефекта, енг. no observed effect concentration) са одговарајућим фактором процене (енг. assessment factor, AF). Фактори процене одражавају степен несигурности у екстраполацији података добијених лабораторијским тестирањем токсичности ограниченог броја врста на природно окружење (EC 2003; Sharma et al. 2019). У зависности од доступних екотоксиколошких података о различитим организмима, примењује се AF од 1000 када је најмање једна краткорочна (акутна) EC50 или LC50 доступна за сваки од три трофичка нивоа основног сета организама (рибе, дафније и алге), док се AF од 100 примењује када је једна дугорочна (хронична) NOEC (за рибе или дафније) доступна. Фактори процене који се примењују за дугорочне тестове су нижи јер је смањена несигурност екстраполације лабораторијских података на природно окружење (EC 2003).



PNEC вредности, преузете из NORMAN-ове екотоксиколошке базе података, представљају вредности које не изазивају екотоксичне ефекте код слатководних ( $PNEC_{freshwater}$  или краће  $PNEC_{fw}$ ) и бентосних ( $PNEC_{sediment}$  или краће  $PNEC_{sed}$ ) организама. Ове вредности су добијене у екотоксиколошким студијама, али и коришћењем QSAR (енг. quantitative structure-activity relationship) анализе. Најниже PNEC вредности за све испитиване вештачке заслађиваче (осим цикламата) у овој бази података су одређене применом моделовања уз коришћење LC50 вредности добијених у студији Aalizadeh и сарадника (2017) за врсту *Daphnia magna*. Пошто се овако добијене PNEC вредности односе на слатководне организме, PNEC вредности за организме који живе у седиментима су израчунате помоћу једначине (3) (NORMAN 2023):

$$PNEC_{sed} = PNEC_{fw} \times 2,6 \times (0,615 + 0,019 \times K_{oc}) \quad (3)$$

Постоје четири категорије ризика по водене или бентосне организме у животној средини, на основу израчунатих вредности коефицијента ризика: без ризика ( $RQ < 0,01$ ), низак ризик ( $0,01 < RQ < 0,1$ ), умерен/средњи ризик ( $0,1 < RQ < 1$ ) и висок ризик ( $RQ \geq 1$ ) (Sharma et al. 2019; Kondor et al. 2022).

Да би се проценио „кокшел ефекат“ смеше вештачких заслађивача детектованих у сваком узорку воде, односно седимента, израчуната је вредност  $RQ_{smeša (voda/sediment)}$  на основу збира RQ вредности добијених за појединачне концентрације детектованих заслађивача (Kondor et al. 2022), према једначини (4):

$$RQ_{smeša (voda/sediment)} = \sum_{i=1}^n RQ_i \quad (4)$$

Додатно, да би се утврдио укупан екотоксиколошки ризик на местима узорковања воде и седимента, израчуната је вредност  $RQ_{smeša suma}$ , узимајући у обзир резултате процене ризика за ове врсте узорака, према једначини (5) (Kondor et al. 2022):

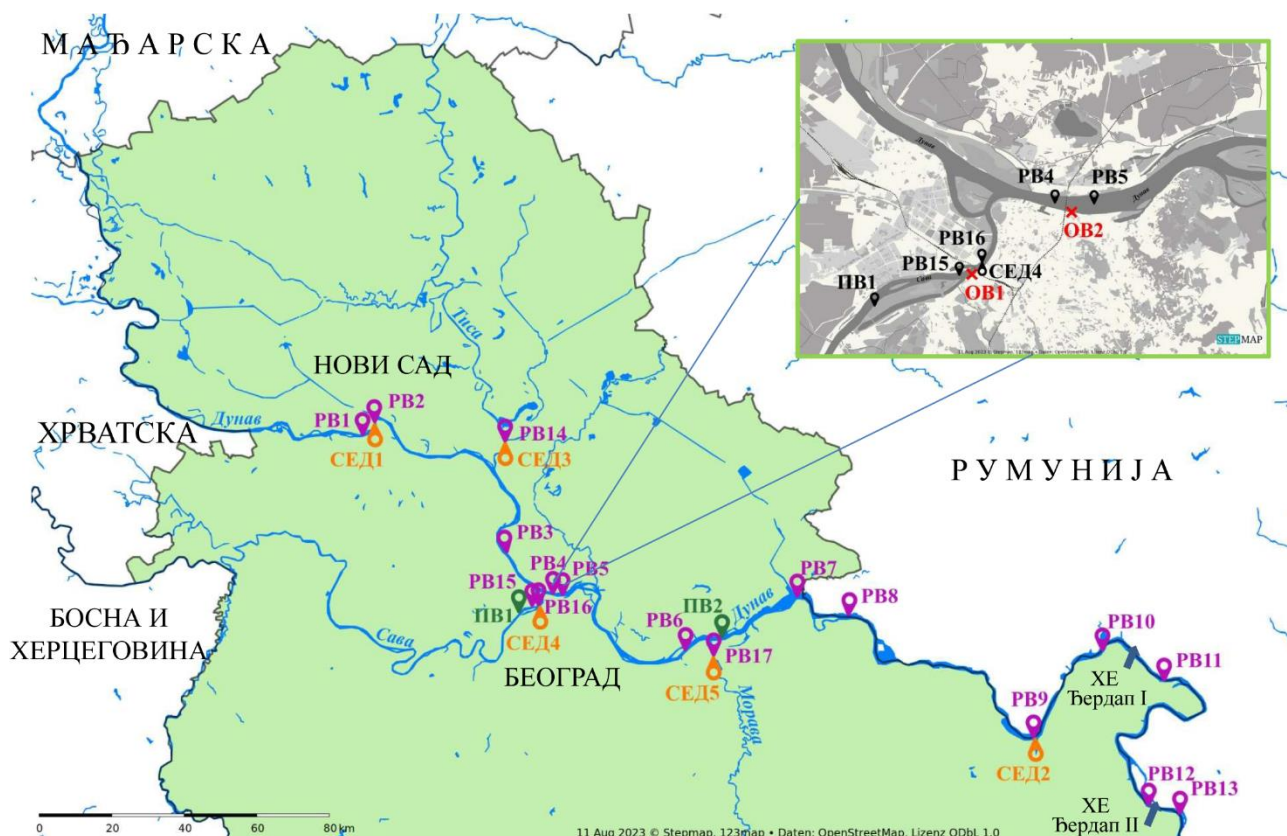
$$RQ_{smeša suma} = RQ_{smeša voda} + RQ_{smeša sediment} \quad (5)$$

### 3.9. Узорковање природних и отпадних вода и речних седимената

Развијена, оптимизована и валидирана метода је примењена у анализи реалних узорака површинских, подземних и отпадних вода, као и речних седимената на присуство осам одабраних вештачких заслађивача. Узорци су сакупљени у сливу реке Дунав у Републици Србији, у априлу 2021. године. Река Дунав и његове притоке су важан ресурс за производњу воде за пиће и пољопривредно наводњавање за око 83 милиона људи који живе у сливу ове реке. Представља јединствен речни екосистем са највећим слатководним биодиверзитетом у Европи. Присутни водени организми су веома осетљиви на повећану контаминацију пореклом од испуштања комуналних отпадних вода, пољопривреде и индустрије, и посебно су подложни биоакумулацији (Stagl и Hattermann 2016). Око 92% Републике Србије лежи у сливу реке Дунав, што чини 10% укупног слива. Кључни извор загађења вода у Републици Србији су отпадне воде које се испуштају у реципијент без икаквог третмана, јер се само 8,1% отпадних вода из пољопривреде, шумарства и рибарства, домаћинства и индустрије пречишћава (Статистички годишњак Републике Србије, 2022). За разлику од суседних

земаља, у Републици Србији није изграђено ниједно ППОВ дуж целог тока Дунава, па се очекује да ће еколошки ризик од излагања вештачким заслађивачима у воденој средини бити висок, посебно у веома насељеним подручјима са великим оптерећењем отпадним водама.

Слив реке Дунав обухвата површину од 801463 km<sup>2</sup> и 10% континенталне Европе, а простире се на територији 19 земаља. Река Дунав је најдужа река у ЕУ (2857 km) и њено сливно подручје представља један од највећих и најважнијих водних система на који се милиони људи ослањају за воду за пиће и пољопривреду (Mănoiu и Crăciun 2021). Долина реке Дунав доминира севером Републике Србије, а ток реке кроз земљу има дужину од 588 km и подељен је на горњи и доњи део (слика 3.2). Горњи део тока обухвата деоницу од границе са Мађарском до Београда, док доњи део обухвата деоницу од Београда до бугарске границе, са хидроелектранама Ђердап I и II у пограничном подручју са Румунијом. Три најважније притоке Дунава на територији Републике Србије су Тиса, Сава и Морава. Река Тиса је најдужа притока Дунава (966 km) и простире се на површини од 157186 km<sup>2</sup>, од чега само 7% слива припада Републици Србији. Сава је највећа притока Дунава по протицају тј. количини воде, и друга по величини према површини слива (97713 km<sup>2</sup>). Улива се у Дунав у Београду и доњи део њеног тока у Републици Србији чини 16% њеног слива. Ток реке Мораве има дужину од 185 km и њен слив (6126 km<sup>2</sup>) се у целини налази у Републици Србији. Протиче кроз најплодније подручје централног дела земље. У Републици Србији, пољопривредно земљиште покрива око 57% површине, док је 30% површине земље пошумљено (ICPDR 2023).



Слика 3.2. Мапа реке Дунав и њених главних притока у Републици Србији са местима узорковања речне воде (PB), подземне воде (PBV) и седимената (CED), као и отпадне воде (OB) из два канализациона испуста у Београду

Табела 3.2. Опис места узорковања речне (РВ), подземне (ПВ) и отпадне воде (ОВ), као и седимената (СЕД)

Узорак	Географска ширина	Географска дужина	Опис места узорковања		
<i>Речна вода (РВ) и одговарајући седимент (СЕД)</i>					
PВ1	45.2206	19.8164	Лединци, 1260 km тока Дунава		
PВ2	СЕД1 45.2521	19.8574	Нови Сад, 1252 km тока Дунава		
PВ3	44.9303	20.3149	Нови Бановци, 1186 km тока Дунава		
PВ4	44.8283	20.485	Београд, 1162 km тока Дунава, пре ОВ2		
PВ5	44.8279	20.5091	Београд, 1160 km тока Дунава, после ОВ2		
PВ6	44.6884	20.9467	Смедерево, 1112 km тока Дунава		
PВ7	44.8211	21.3379	Рам, 1072 km тока Дунава		
PВ8	44.7752	21.5194	Велико Градиште, 1059 km тока Дунава		
PВ9	СЕД2 44.4706	22.1648	Доњи Милановац, 991 km тока Дунава		
PВ10	44.6874	22.4063	Текија, 956 km тока Дунава		
PВ11	44.6122	22.622	Кладово, 934 km тока Дунава		
PВ12	44.3003	22.568	Кусјак, 864 km тока Дунава		
PВ13	44.28	22.6777	Радујевац, 851 km тока Дунава		
PВ14	СЕД3 45.2044	20.3152	Тиса, 8,5 km пре ушћа у Дунав		
PВ15	44.7968	20.4263	Сава, 4 km пре ушћа у Дунав, пре ОВ1		
PВ16	СЕД4 44.8024	20.4402	Сава, 2,5 km пре ушћа у Дунав, после ОВ1		
PВ17	СЕД5 44.6747	21.0452	Морава, 3 km пре ушћа у Дунав		
<i>Подземна вода (ПВ)</i>					
ПВ1	44.7823	20.2221	Београд, рени бунар 16, приобаље Саве		
ПВ2	44.4507	21.0853	Дубовац, дренажни бунар, приобаље Дунава		
<i>Нетретирана отпадна вода (ОВ)</i>				<b>Средњи годишњи проток, m<sup>3</sup>/годишње</b>	<b>Број становника повезаних на испуст</b>
ОВ1	44.7976	20.4348	Највећи канализациони испуст у Београду	48723120	518224
ОВ2	44.8245	20.4953	Други највећи канализациони испуст у Београду	19552320	164653

У циљу истраживања утицаја испуштања нетретираних отпадних вода на водену средину и живи свет у сливу реке Дунав у Републици Србији, узорци речне и подземне воде, као и речних седимената сакупљени су на 19 локација (слика 3.2, табела 3.2). Узето је 13 узорка речне воде (РВ1–РВ13) дуж целокупног тока Дунава у земљи, на којем не постоји ниједно постројење за третман отпадних вода, и на тај начин је истражено око 410 km реке. Узета су и два дунавска седимента који представљају горњи (СЕД1) и доњи (СЕД2) део реке. Локације узорковања обухватале су два највећа града у Републици Србији - Београд (са преко 1600000 становника) и Нови Сад (са преко 350000 становника), који су под великим утицајем испуштања комуналних отпадних вода због велике насељености. Узорци речне воде и седимената су такође прикупљени из притока Дунава – Тисе (РВ14, СЕД3), Саве (РВ15 и РВ16, СЕД4) и Мораве (РВ17, СЕД5), како би се проценио њихов допринос уносу вештачких заслађивача у Дунав. Узорци речне воде прикупљени су директним узорковањем, са чамца, у средини речног тока на дубини од око 50 cm, док су седименти узорковани са речног дна коришћењем „ручног багера“ тј. преклопне канте од нерђајућег челика (енг. Van Veen grab sampler). Такође, узоркована је и подземна вода из алувијалног подручја Саве и Дунава, да би се проценила контаминација водоносних слојева, пошто се око 50% воде за пиће у Војводини, односно преко 70% у Републици Србији, добија пречишћавањем подземних вода (Đimkić 2007). Узорци подземних вода сакупљени су у приобаљу реке Саве, из рени бунара београдског водоизворишта (ПВ1), и у приобаљу Дунава, из дренажног бунара система одводњавања у Дубовцу код Ковина (ПВ2). Подземна вода из пијезометра у непосредној близини Дунава је узоркована потапањем перистатичке пумпе до нивоа филтера. Поред тога, узорковане су и сирове комуналне отпадне воде из два највећа канализациона канала у Београду (ОВ1 на Сави и ОВ2 на Дунаву) на месту испуштања у реке. Да би се проценио утицај отпадних вода на ниво вештачких заслађивача у речној води, узорци речне воде су прикупљени пре и после сваког од два канализациона испуста. Сви узорци су сакупљени у PVC посудама и чувани у замрзивачу, без конзерванса. Пре припреме за анализу, узорци воде су одмрзнути и филтрирани кроз филтер од стаклених влакана пречника од 1–3  $\mu\text{m}$  (Whatman GmbH, Дасел, Немачка), док су узорци седимената одмрзнути, осушени на ваздуху и просејани.

## 4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

### 4.1. Масени спектри одабраних вештачких заслађивача

Масени спектри одабраних вештачких заслађивача добијени су помоћу LTQ XL јонског трапа као масеног анализатора коришћењем електроспреј јонизације. Снимањем масених спектра четири заслађивача (ацесулфама, сахарина, цикламата и аспартама), припремљених у три различите смеше растварача, одабран је састав са којим је јонизација анализата највећа, што би требало узети у обзир приликом избора састава мобилне фазе. У процесу електроспреј јонизације, у негативном режиму рада јонског извора, сва четири испитивана анализата формирају депротонване молекуле ( $[M-H]^-$ ) (табела 4.1, слика 4.1). У позитивном режиму рада, једино је у случају аспартама постигнута јонизација и настанак протонваног молекула ( $[M+H]^+$ ), али само у присуству мравље киселине и амонијум-ацетата, као адитива (слика 4.2). Најинтензивнији сигнали прекурсор јона добијени су када је снимање вршено из смеше метанол/вода. Изузетак је протонвани молекул аспартама ( $m/z$  295), добијен снимањем у смеси са мрављом киселином, чији је интензитет већи од депротонваног молекула овог заслађивача у све три смеше растварача. С обзиром на то да већина испитиваних заслађивача показује најинтензивнију јонизацију у смеси метанол/вода, резултати указују на то да би ова два растварача требало користити као састојке мобилне фазе, без додатка адитива.

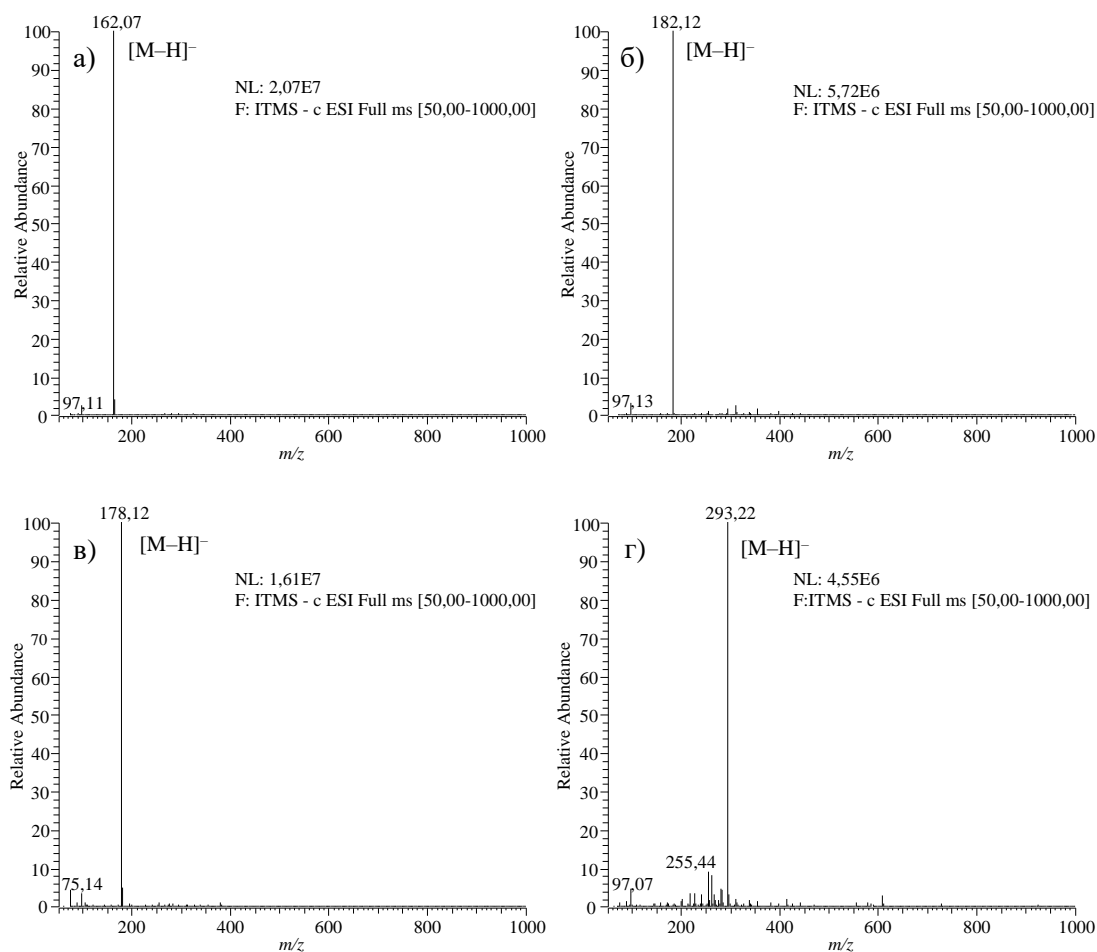
Табела 4.1. Интензитет сигнала прекурсор јона четири вештачка заслађивача у три различите смеше растварача при концентрацији од  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$

Аналит	Прекурсор јон	Метанол/вода	Метанол/0,2% раствор мравље киселине	Метанол/4 mmol L <sup>-1</sup> раствор амонијум-ацетата
Ацесулфам	162 $[M-H]^-$	$2,07 \cdot 10^7$	$5,55 \cdot 10^6$	$6,04 \cdot 10^6$
Сахарин	182 $[M-H]^-$	$5,72 \cdot 10^6$	$2,50 \cdot 10^6$	$3,39 \cdot 10^6$
Цикламат	178 $[M-H]^-$	$1,61 \cdot 10^7$	$2,90 \cdot 10^6$	$2,28 \cdot 10^6$
Аспартам	293 $[M-H]^-$	$4,55 \cdot 10^6$	$5,95 \cdot 10^6$	$1,49 \cdot 10^6$
	295 $[M+H]^+$	–	$1,17 \cdot 10^7$	$1,84 \cdot 10^6$

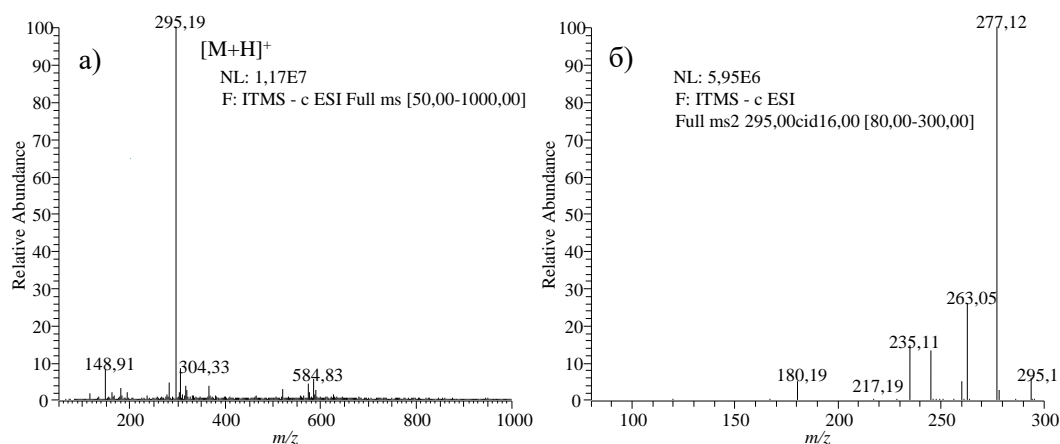
На основу масено-спектрометријске анализе свих одабраних вештачких заслађивача, у негативном режиму рада јонског извора, одабрани су прекурсор јони као најинтензивнији јони у масеном спектру сваког анализата (слике 4.3–4.10). За већину заслађивача, депротонвани молекули су изабрани као прекурсор јони, што је у складу са литературом (Buerge et al. 2009; Scheurer et al. 2009; Kokotou et al. 2012). Изузетак су били сукралоза за коју је одабран адукт са хлором ( $[M+Cl]^-$ ,  $m/z$  433, слика 4.6) и стевиозид за који је изабран јон добијен губитком глукозне јединице ( $[M-C_6H_{11}O_5-H]^-$ , тј.  $[M-Glu-H]^-$ ,  $m/z$  641, слика 4.10). И у другим истраживањима је коришћен адукт са хлором као прекурсор јон за одређивање сукралозе (Minten et al. 2011; Batchu et al. 2013), а забележена је и употреба ацетатног адукта ( $[M+CH_3COO]^-$ ,  $m/z$  455; Ordóñez et al. 2013). Затим је оптимизирана колизиона енергија за фрагментацију прекурсор јона у стабилне фрагментне јоне и одабране су карактеристичне реакције фрагментације за квантитативно одређивање и потврду присуства свих анализата. На масеним спектрима правоугаоником су означени фрагментни јони одабрани за квантификацију сваког заслађивача, док су елипсом означени јони одабрани за потврду њиховог присуства у реалним узорцима. Резултати MS<sup>n</sup> анализе су приказани у

## Резултати и дискусија

табели 4.2. У случају сукралозе, аспартама, НХДЦ-а, неотама и стевиозида било је могуће даље фрагментисати јоне добијене MS<sup>2</sup> анализом, тј. била је могућа MS<sup>3</sup>, односно MS<sup>4</sup> анализа (слике 1–5, Прилог). У случају ацесулфама, сахарина и цикламата, није било могуће добити стабилне фрагментне јоне у вишим ступњевима масено-спектрометријске анализе.

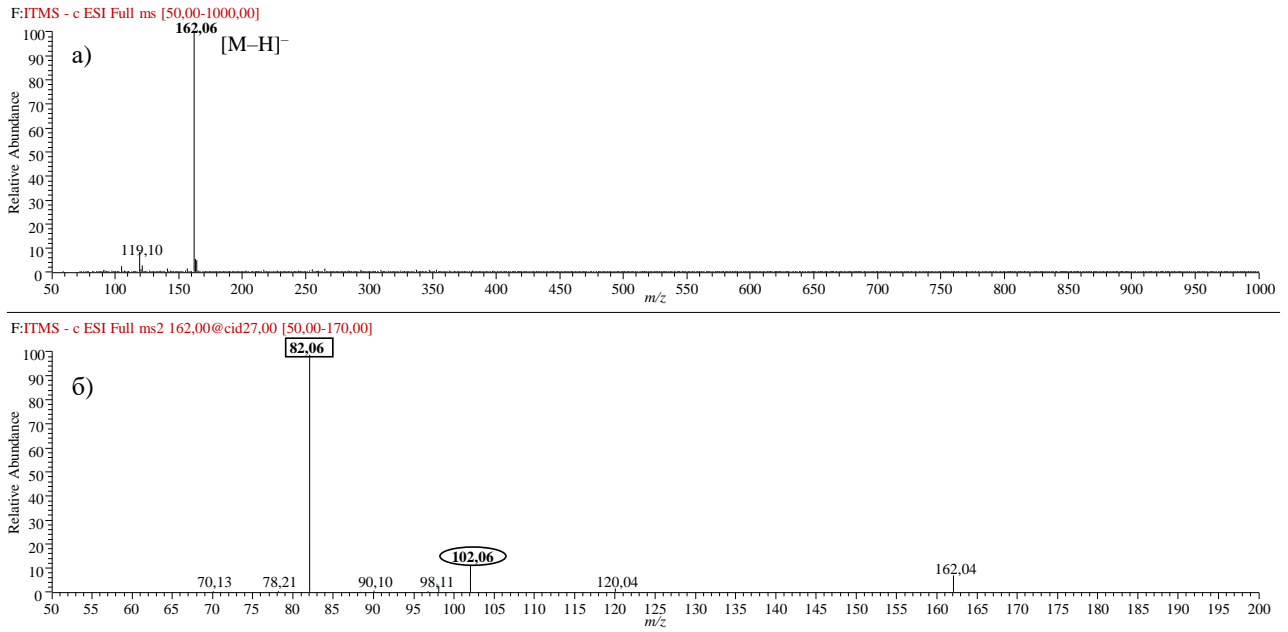


Слика 4.1. Масени спектри четири вештачка заслађивача снимљени у смеси метанол/вода у негативном режиму рада јонског извора: а) ацесулфам; б) сахарин; в) цикламат; г) аспартам

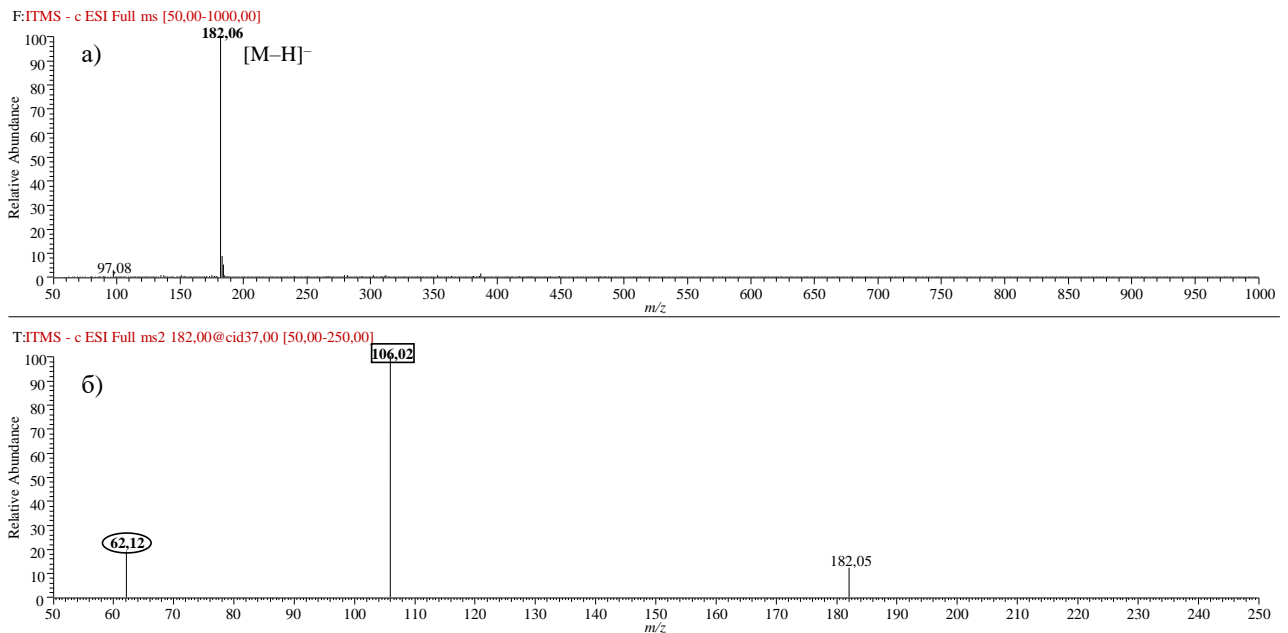


Слика 4.2. Масени спектри аспартама снимљени у смеси метанол/0,2% раствор мравље киселине: а) ESI(+)MS; б) ESI(+)MS<sup>2</sup> [M+H]<sup>+</sup>

## Резултати и дискусија

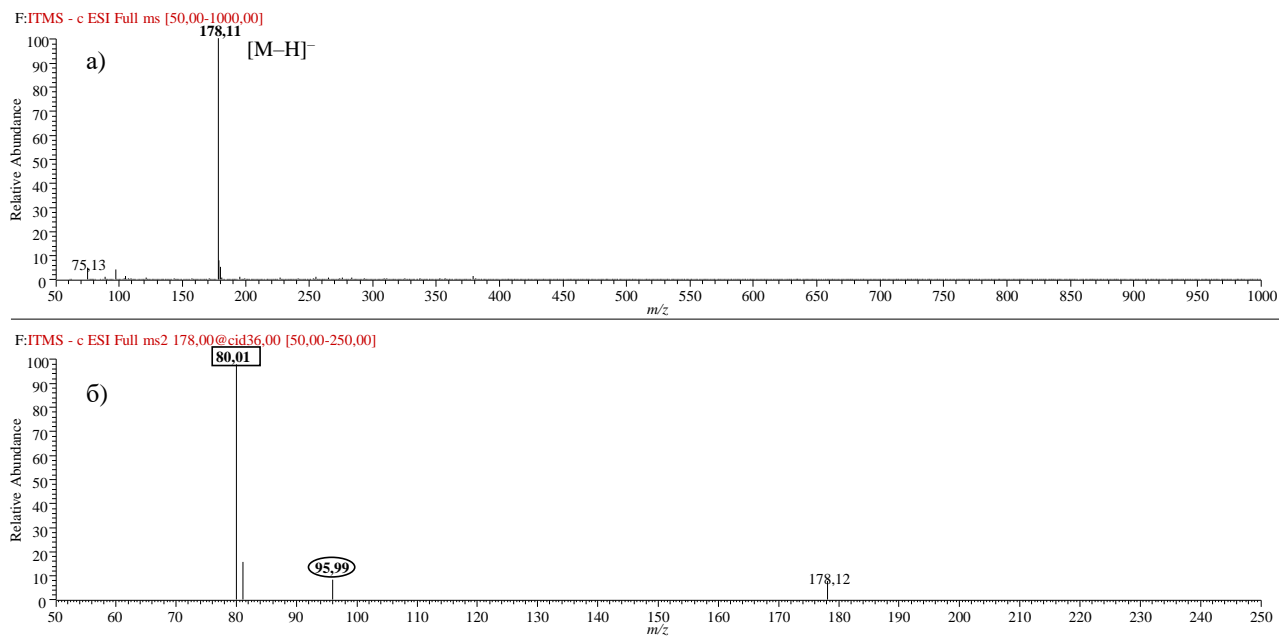


Слика 4.3. Масени спектри ацесулфама из раствора метанола концентрације  $10 \text{ ng mL}^{-1}$ :  
(а) ESI(-)MS; (б) ESI(-)MS<sup>2</sup> [M-H]<sup>-</sup>

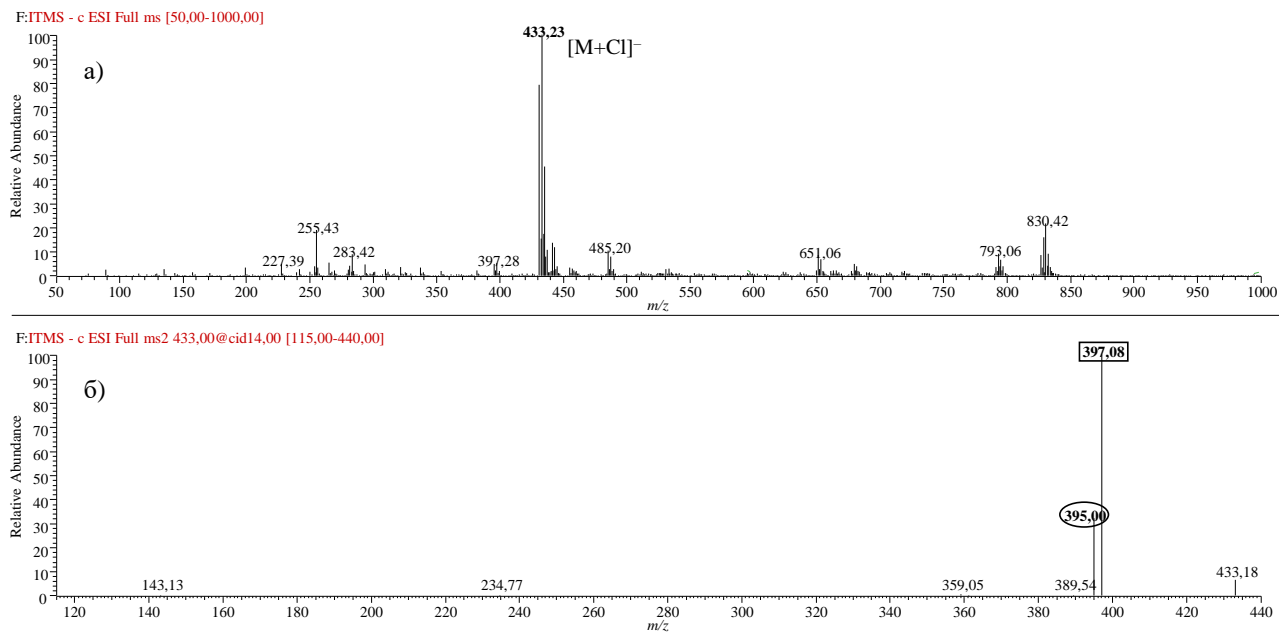


Слика 4.4. Масени спектри сахарина из раствора метанола концентрације  $10 \text{ ng mL}^{-1}$ :  
(а) ESI(-)MS; (б) ESI(-)MS<sup>2</sup> [M-H]<sup>-</sup>

## Резултати и дискусија



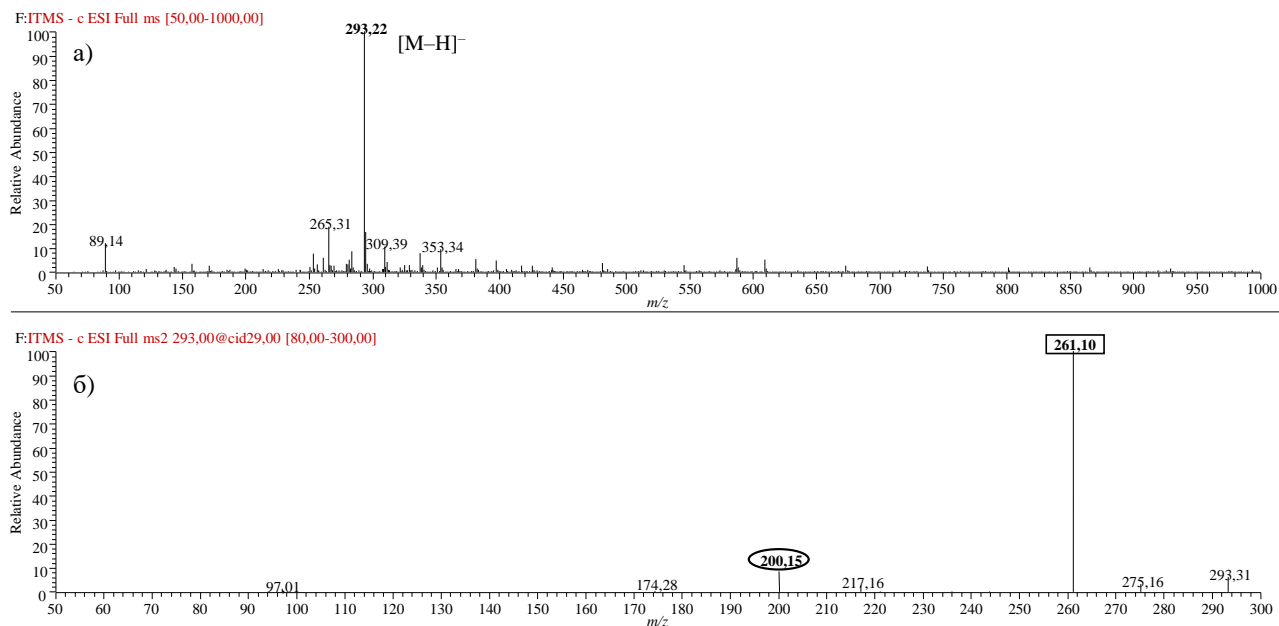
Слика 4.5. Масени спектри цикламата из раствора метанола концентрације  $10 \text{ ng mL}^{-1}$ :  
(a) ESI(-)MS; (б) ESI(-)MS<sup>2</sup> [M-H]<sup>-</sup>



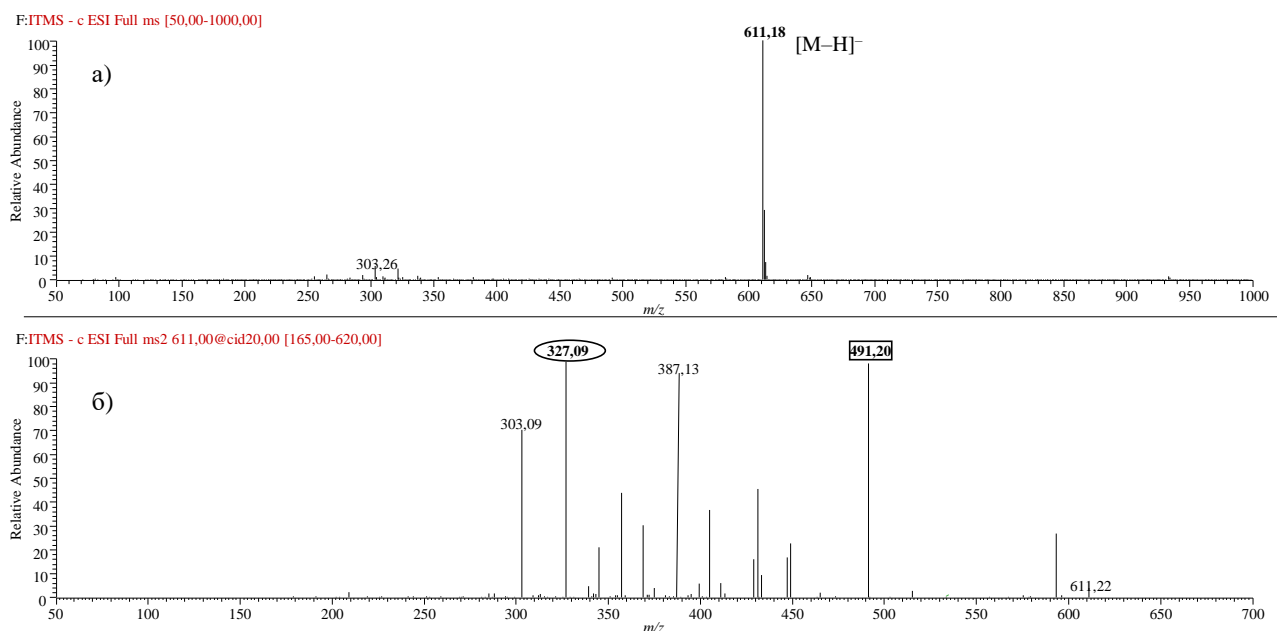
Слика 4.6. Масени спектри сукралозе из раствора метанола концентрације  $10 \text{ ng mL}^{-1}$ :  
(a) ESI(-)MS; (б) ESI(-)MS<sup>2</sup> [M+Cl]<sup>-</sup>



## Резултати и дискусија

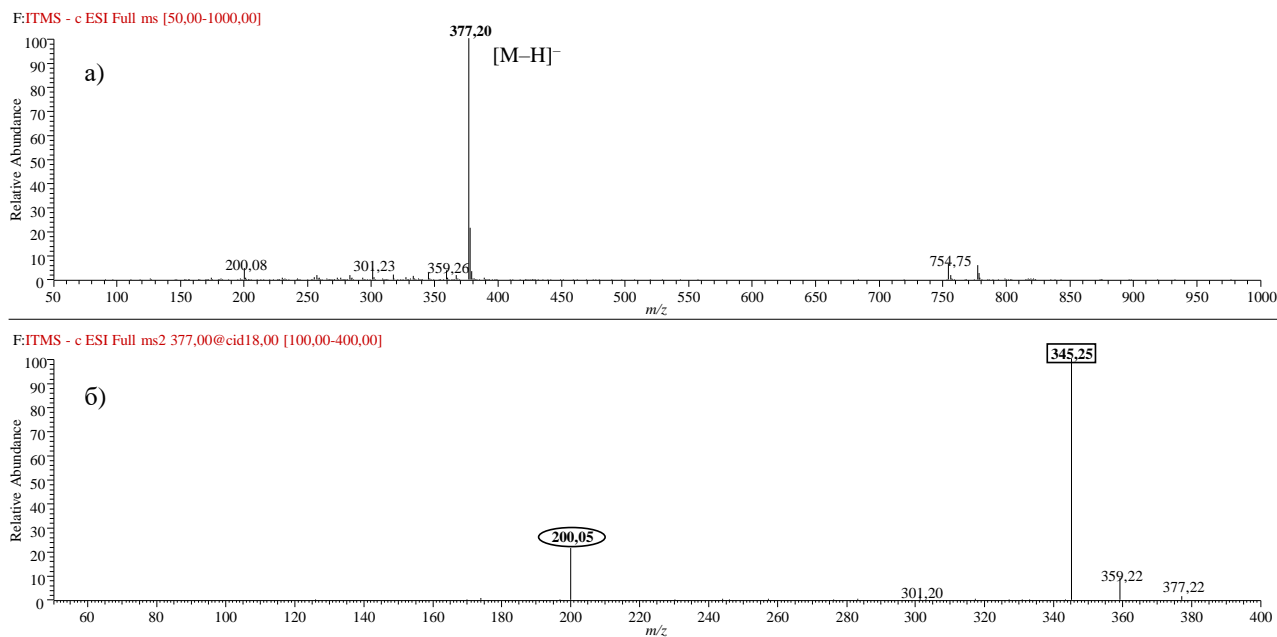


Слика 4.7. Масени спектри аспартама из раствора метанола концентрације  $10 \text{ ng mL}^{-1}$ : (a) ESI(-)MS; (б) ESI(-)MS<sup>2</sup> [M-H]<sup>-</sup>

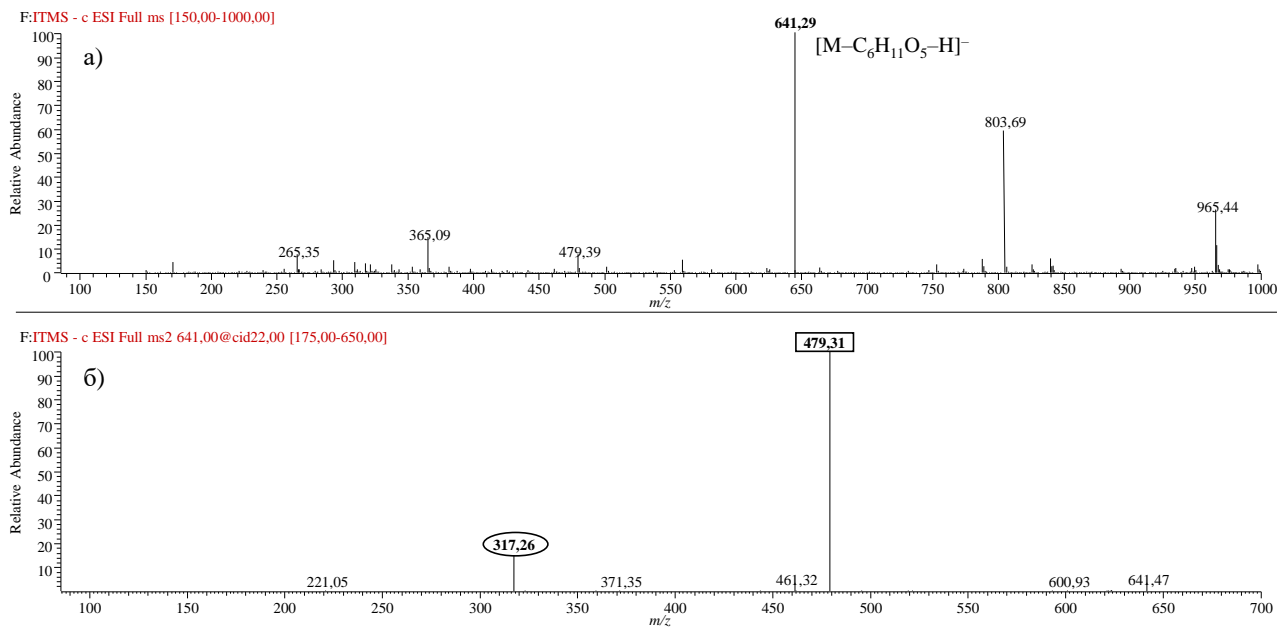


Слика 4.8. Масени спектри неохесперидин дихидрохалкона из раствора метанола концентрације  $10 \text{ ng mL}^{-1}$ : (a) ESI(-)MS; (б) ESI(-)MS<sup>2</sup> [M-H]<sup>-</sup>

## Резултати и дискусија



Слика 4.9. Масени спектри неотама из раствора метанола концентрације  $10 \text{ ng mL}^{-1}$ :  
(а) ESI(-)MS; (б) ESI(-)MS<sup>2</sup> [M-H]<sup>-</sup>



Слика 4.10. Масени спектри стевозида из раствора метанола концентрације  $10 \text{ ng mL}^{-1}$ :  
(а) ESI(-)MS; (б) ESI(-)MS<sup>2</sup> [M-C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>O<sub>5</sub>-H]<sup>-</sup>

Табела 4.2. MS<sup>n</sup> реакције фрагментације вештачких заслађивача у линеарном јонском трапу: јони за квантификацију – уоквирени пуном линијом и осенчени, и јони за потврду присуства анализата – уоквирени испрекиданом линијом

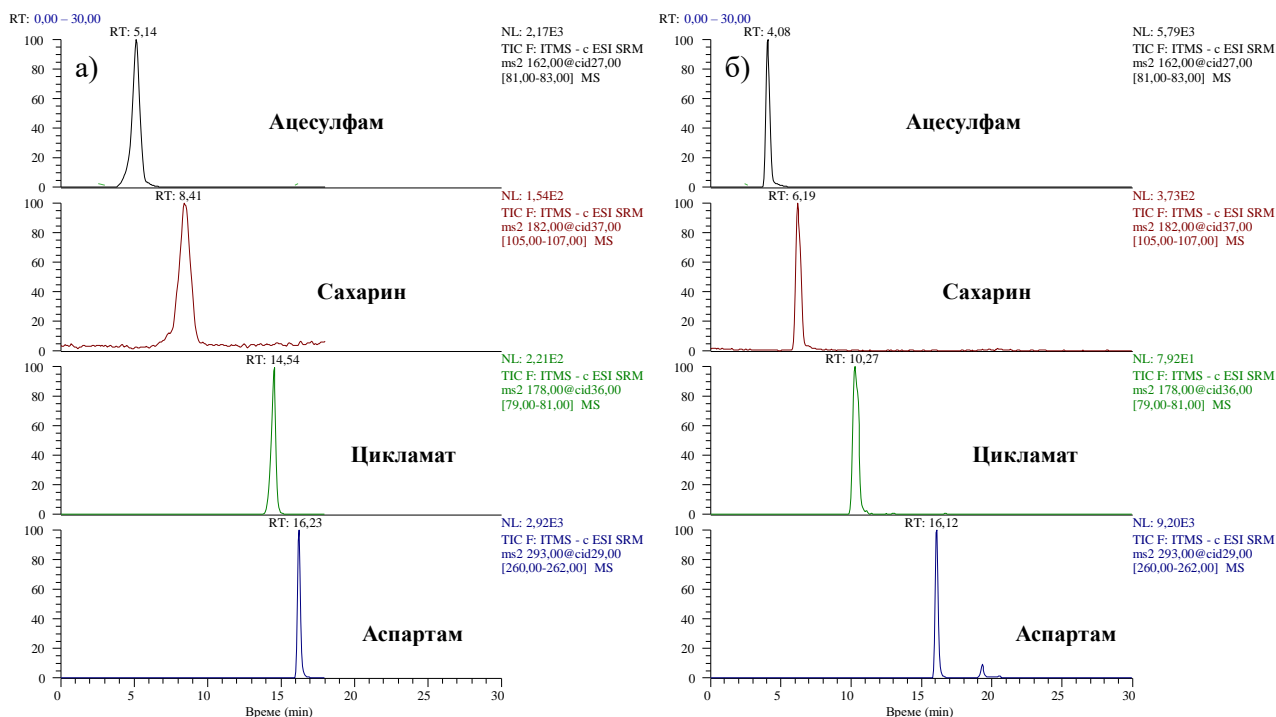
Аналит	MS	Колизиона енергија (%)	MS <sup>2</sup>	Колизиона енергија (%)	MS <sup>3</sup>	Колизиона енергија (%)	MS <sup>4</sup>
Ацесулфам	162 [M-H] <sup>-</sup>	27	82	–	–	–	–
			102	–	–	–	–
			98	–	–	–	–
Сахарин	182 [M-H] <sup>-</sup>	37	106	–	–	–	–
			62	–	–	–	–
Цикламат	178 [M-H] <sup>-</sup>	36	80	–	–	–	–
			96	–	–	–	–
Сукралоза	433 [M+Cl] <sup>-</sup>	14	397	15	361	–	–
			395	16	359	–	–
Аспартам	293 [M-H] <sup>-</sup>	29	261	30	217	30	126
			200	–	–	–	–
			491	21	303	23	125
НХДЦ	611 [M-H] <sup>-</sup>	20	327	–	–	–	–
			387	22	357	24	342
			303	–	–	–	–
			345	19	301	21	230
Неотам	377 [M-H] <sup>-</sup>	18	200	20	109	–	–
			359	–	–	–	–
			479	24	317	–	–
Стевиозид	641 [M-Glu-H] <sup>-</sup>	22	317	–	–	–	–

У већини истраживања везаних за вештачке заслађиваче, у којима се користи троструки квадрупол као масени анализатор, изабране су другачије реакције фрагментације прекурсор јона за квантификацију и потврду присуства појединих анализата. Тако је за квантитативно одређивање сахарина најчешће одабран јон  $m/z$  42 (Scheurer et al. 2009; Ordóñez et al. 2012), који у овој студији није детектован због ограничења линеарног јонског трапа. Такође, за потврду присуства цикламата често се користи фрагментни јон  $m/z$  64 (Berset и Ochsenbein 2012), који није било могуће детектовати. Ограничење јонског трапа је да је најмања маса фрагментног јона која се може детектовати дефинисана као трећина масе прекурсор јона који се фрагментираше.

#### 4.2. Оптимизација хроматографског раздвајања вештачких заслађивача

У оптимизацији хроматографског раздвајања, на почетку су тестирани метанол и ацетонитрил као органски растварачи у мобилној фази, коришћењем C8 хроматографске колоне. Уз састав мобилне фазе од 85% дејонизоване воде и 15% органског растварача, у изократском режиму, утврђено је да се са ацетонитрилом три заслађивача елуирају са колоне са сличним ретенционим временом, тј. не долази до доброг раздвајања пикова анализата. Затим је испитан утицај додатка адитива амонијум-ацетата у мобилну фазу. На слици 4.11

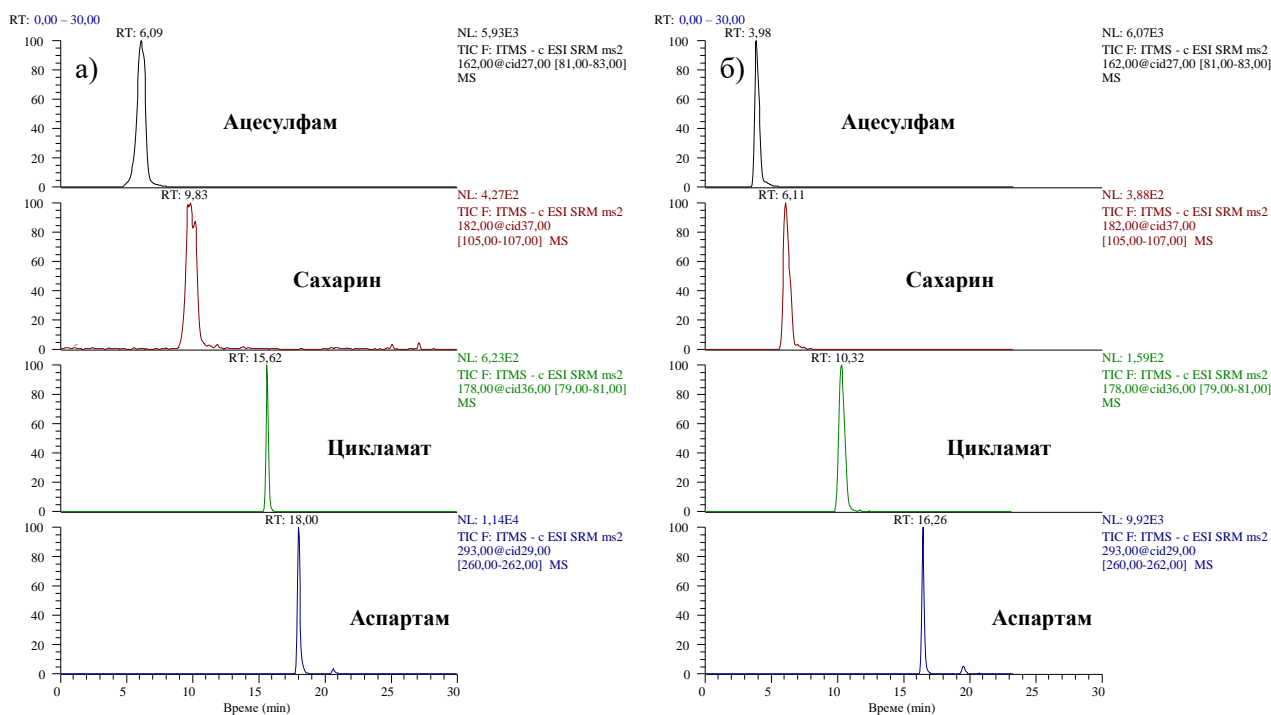
приказано је хроматографско раздвајање четири вештачка заслађивача, уз мобилну фазу састава 85% дејонизоване воде (А) и 15% метанола (Б), односно 84% А, 15% Б и 1% 0,1 mol L<sup>-1</sup> раствора амонијум-ацетата. Закључено је да се у присуству амонијум-ацетата побољшава изглед и облик хроматографских пикова анализата и скраћује њихово ретенционо време.



Слика 4.11. Приказ хроматографског раздвајања четири вештачка заслађивача уз мобилну фазу: а) без амонијум-ацетата; б) са амонијум-ацетатом

Након избора оптималног састава мобилне фазе, тестиране су и две реверзно-фазне колоне: C18 са већим унутрашњим пречником (4,6 mm) и C8 са мањим унутрашњим пречником (3,0 mm). Резултати су приказани на слици 4.12. С обзиром на то да анализи испољавају већи афинитет према C18 колони и елуирају се са дужим ретенционим временима, утврђено је да се са C8 колоном скраћује време анализе. Штавише, примећено је да се коришћењем C8 колоне добијају оштрији и ужи пикови појединих анализата. Поред тога, колоне већег унутрашњег пречника захтевају већи проток мобилне фазе. Из тог разлога, примена C8 колоне са мањим унутрашњим пречником смањује проток и потрошњу растварача. Коначно, тестирањем различитих протока и градијената изабране мобилне фазе, као и увођењем преосталих заслађивача сукралозе, неохесперидин дихидрохалкона, неотама и стевиозида извршено је оптимално хроматографско раздвајање свих осам вештачких заслађивача, на C8 колони, при развијеном градијенту мобилне фазе приказаним у табели 4.3. Уз константан проток мобилне фазе од 0,33 mL min<sup>-1</sup>, време трајања анализе је 20 min, након чега се успостављају почетни услови и одржавају током 10 min, као припрема за следећу анализу. Запремина ињектирања износи 20 µL.

## Резултати и дискусија



Слика 4.12. Приказ хроматографског раздвајања четири вештачка заслађивача уз мобилну фазу са амонијум-ацетатом на хроматографској колони: а) C18 и б) C8

Табела 4.3. Састав и градијент мобилне фазе за оптимално хроматографско раздвајање осам одабраних вештачких заслађивача

Време, min	Проток, mL min <sup>-1</sup>	H <sub>2</sub> O, %	CH <sub>3</sub> OH, %	0,1 M CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> , %
0,00	0,33	84	15	1
8,00	0,33	84	15	1
13,00	0,33	34	65	1
15,00	0,33	0	100	0
20,00	0,33	0	100	0
20,01	0,33	84	15	1
30,00	0,33	84	15	1

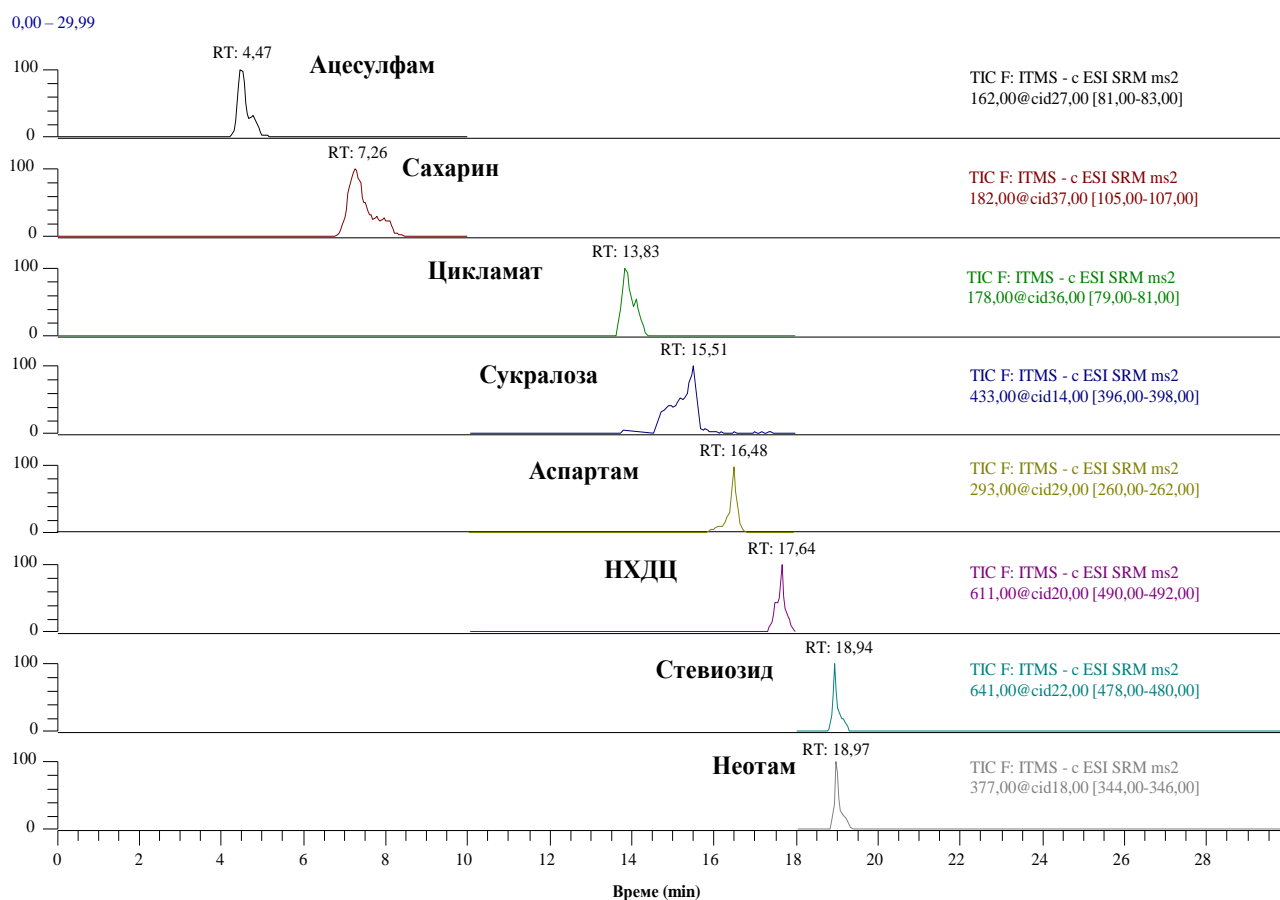
### 4.3. Оптимизација HPLC–MS/MS параметара

MS параметри за идентификацију, квантификацију и потврду присуства осам одабраних вештачких заслађивача у оптимизованој методи приказани су у табели 4.4. У циљу повећања осетљивости, SRM детекција заслађивача је подељена у три временска сегмента, са максимално четири реакције фрагментације праћене у једном сегменту.

Табела 4.4. MS параметри за одређивање одабраних вештачких заслађивача

Аналит	Временски сегмент (min)	Прекурсор јон (m/z)	Реакција квантификације (m/z)	Колизиона енергија (%)	Реакција потврде (m/z)
Ацесулфам	I	162[M-H] <sup>-</sup>	162→82	27	162→102
Сахарин	(0–10)	182[M-H] <sup>-</sup>	182→106	37	182→62
Цикламат	I и II (0–18)	178[M-H] <sup>-</sup>	178→80	36	178→96
Сукралоза	II	433[M+Cl] <sup>-</sup>	433→397	14	433→395
Аспартам	(10–18)	293[M-H] <sup>-</sup>	293→261	29	293→200
НХДЦ		611[M-H] <sup>-</sup>	611→491	20	611→327
Неотам	III	377[M-H] <sup>-</sup>	377→345	18	377→200
Стевиозид	(18–30)	641[M-Glu-H] <sup>-</sup>	641→479	22	641→317

Оптимизовани HPLC–MS/MS параметри су примењени у даљим анализама екстракта вода и седимената, при чему су добијени масени хроматограми реакција фрагментације за сваки заслађивач. Карактеристичан масени хроматограм смеше осам вештачких заслађивача, добијен при концентрацији од 100 ng L<sup>-1</sup>, приказан је на слици 4.13.



Слика 4.13. Типичан масени хроматограм смеше осам одабраних вештачких заслађивача при концентрацији од 100 ng L<sup>-1</sup>

## 4.4. Припрема узорака

### 4.4.1. Оптимизација екстракције на чврстој фази узорака воде

Приликом оптимизације методе за ефикасну екстракцију узорака речне, подземне и отпадне воде испитани су следећи параметри: врста сорбента, рН вредност и запремина узорка воде, као и растварач за елуирање анализата са паковања колоне. За екстракцију на чврстој фази одабраних заслађивача тестирано је осам комерцијално доступних SPE колоне, четири рН вредности узорка воде, три различите запремине узорка воде и пет различитих органских растварача за елуирање.

#### 4.4.1.1. Избор SPE сорбента

Први корак у оптимизацији екстракције на чврстој фази био је одабир одговарајућег сорбента (табела 4.5). Утврђено је да је екстракција ацесулфама, сахарина и цикламата најкомплекснија, јер ови заслађивачи нису могли да се екстрахују употребом већине испитаних сорбената, са изузетком Oasis HLB са којим је ефикасност екстракција била ниска (8–24%). Многи аутори су такође приметили потешкоће у екстракцији ацесулфама, сахарина и цикламата, при чему су забележени ниски приноси екстракције (Scheurer et al. 2009; Zygler et al. 2010; Kobetičová et al. 2018). У поређењу са другим заслађивачима (табела 3.1), ацесулфам, сахарин и цикламат имају изражена кисела својства ( $pK_a \leq 2,0$ ). Генерално, ефикасност задржавања на изабраном сорбенту зависи од тога да ли у узорку воде преовлађују јонске или неутралне врсте. Пошто је почетни експеримент изведен коришћењем дејонизоване воде без подешавања рН вредности, ова три заслађивача су била претежно у анјонском, поларном облику који нема афинитет да се адсорбује на хидрофобне C18 (LC-18 и Envi-18) и угљеничне (Envi-Carb) сорбенте. Међутим, нулти приноси постигнути при коришћењу анјонских јоноизмењивачких сорбената (LC-SAX и Oasis MAX), идеалних за екстракцију киселих једињења, може се повезати са јаком интеракцијом и непотпуним елуирањем са сорбента. У литератури је забележен предлог да се за елуирање ацесулфама, сахарина и цикламата са анјонских сорбената користи елуент који треба да садржи киселину (нпр. до 5% мравље киселине, Ordóñez et al. 2012). Што се тиче полимерних сорбената, према опису произвођача, задржавање анализата на SDB-1 паковању се заснива скоро искључиво на хидрофобним интеракцијама, док код Strata X и Oasis HLB постоји неколико механизма задржавања, укључујући и поларне. Ово је вероватно разлог због чега су последња два сорбента постигла веће приносе за ацесулфам, сахарин и цикламат.

Што се тиче осталих одабраних вештачких заслађивача, с обзиром на њихове  $pK_a$  вредности (табела 3.1), на рН почетног експеримента, сукралоза, НХДЦ и стевииозид би требало да буду у неутралном тј. нејонизованом молекулском облику, док су аспартам и неотам са киселим и базним групама вероватно у биполарном (zwitter) облику са молекулом са нултим наелектрисањем. Очекивано је да сорпција ових врста на анјонским сорбентима буде ниска. Међутим, Oasis MAX је показао висок адсорпциони капацитет (48–103%). За разлику од LC-SAX, Oasis MAX је анјонски јоноизмењивачки полимер са мешовитим механизмом задржавања. Поред функције јонске измене (кватернерни амин) која доприноси јонском механизму, главни полимер (поли(стирен-дивинилбензен)) доприноси хидрофобном задржавању које очигледно значајно повећава задржавање неутралних облика.

У случају С18 сорбената, постигнут је очекивано добар принос коришћењем оба хидрофобна паковања (51–94% за LC-18 и 46–100% за Envi-18). Сорбент на бази угљеника (Envi-Carb) није погодан за екстракцију одабраних вештачких заслађивача јер има изузетан афинитет према органским једињењима када се користи у реверзно-фазним условима и јако везани аналити се не могу елуирати са сорбента. Једини изузетак је била сукралоза (106%). У поређењу са другим испитиваним вештачким заслађивачима, њене вредности  $\log K_{ow}$  и  $\log K_{oc}$  су међу најнижим што указује на већу растворљивост у поларнијим растварачима и нешто нижи афинитет за сорпцију на угљеничне сорбенте, што највероватније доводи до елуирања са паковања коришћењем метанола. Што се тиче три полимерна сорбента, Strata X је показао најбоље резултате, са приносима у опсегу 75–102%, највероватније због постојања неколико ретенционих механизма. Коначно је одлучено да се за даље експерименте SPE оптимизације користе два полимерна сорбента: Strata X (који обезбеђује највеће приносе за већину заслађивача) и Oasis HLB (који показује одређени афинитет за везивање ацесулфама, сахарина и цикламата). Ови резултати су у складу са резултатима других аутора који су примењивали Strata X (Kokotou et al. 2012; Sang et al. 2014) или Oasis HLB колоне (Ordóñez et al. 2012; Arbeláez et al. 2015) за ефикасну екстракцију вештачких заслађивача из водене матрице.

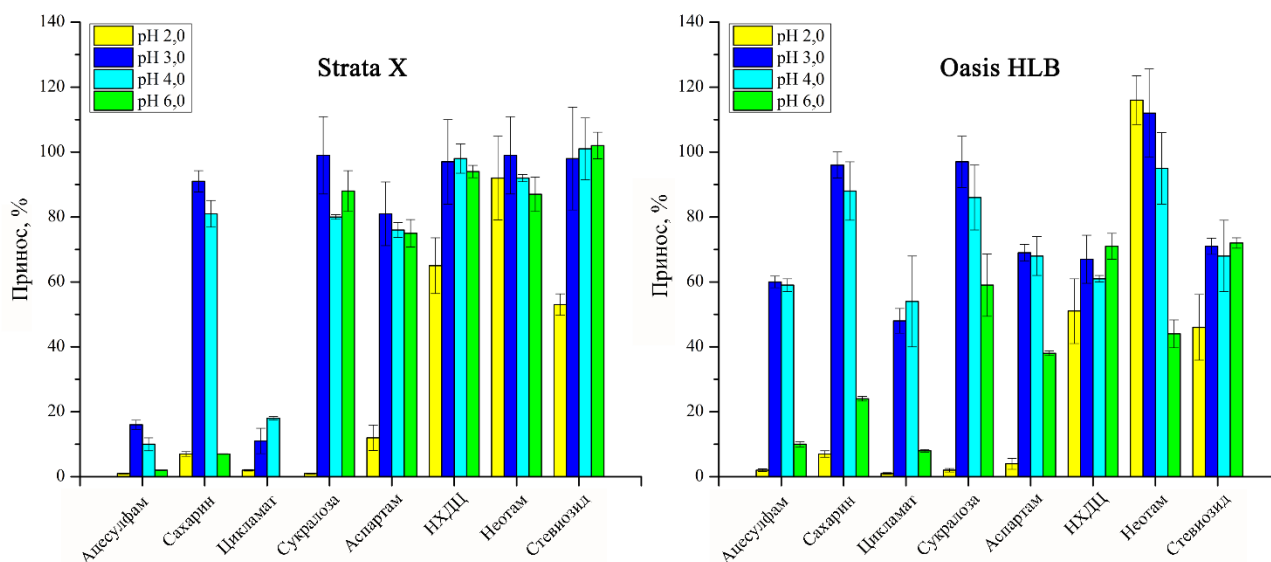
Табела 4.5. Приноси одабраних вештачких заслађивача добијени коришћењем различитих SPE колоне

Аналит	Принос, % (RSD, %)							
	Supelclean LC-SAX	Oasis MAX	Supelclean LC-18	Supelclean Envi-18	Supelclean Envi-Carb	Bakerbond SDB-1	Strata X	Oasis HLB
Ацесулфам	0(0)	0(0)	2(14)	1(19)	0(0)	1(19)	2(5)	10(2)
Сахарин	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	7(2)	24(1)
Цикламат	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	8(19)
Сукралоза	1(17)	48(4)	51(13)	46(12)	106(5)	82(3)	88(7)	59(1)
Аспартам	3(9)	74(1)	86(2)	82(2)	1(19)	3(12)	75(6)	38(5)
НХДЦ	19(3)	72(4)	80(7)	94(3)	0(0)	32(18)	94(2)	71(7)
Неотам	5(13)	103(4)	75(5)	98(3)	0(0)	74(4)	87(5)	44(8)
Стевиозид	67(1)	94(6)	94(4)	100(3)	0(0)	16(6)	102(5)	72(1)

#### 4.4.1.2. Избор рН вредности узорка

У наредним експериментима оптимизована је рН вредност узорка воде (2,0, 3,0, 4,0 и 6,0) коришћењем два полимерна сорбента, Strata X и Oasis HLB (слика 4.14). Што се тиче три кисела заслађивача (ацесулфам, сахарин и цикламат), снижавањем рН узорка воде повећавају се њихови приноси због формирања нејонизованих облика. Према опису произвођача, приноси могу бити побољшани када се потисне јонизација аналита. Међутим, при рН 2,0, када су неутрални облици сва три заслађивача веома заступљени, приноси се спуштају на веома ниске вредности. Заправо оба сорбента су показала низак ниво сорпције за већину аналита при рН 2,0. Ниски приноси добијени у јако киселим условима могу се приписати слабој сорпцији паковања из јако закишељене водене матрице. Упоредјујући приносе заслађивача на рН 3,0 и 4,0, установљено је да су добијене сличне вредности. На обе рН вредности узорка воде, за већину аналита, Strata X сорбент је показао бољу ефикасност екстракције од Oasis HLB. Међутим, Oasis HLB је изабран као оптимални сорбент пошто су приноси екстракције ацесулфама и цикламата били знатно виши од оних добијених коришћењем Strata X. Када је тестирана рН вредност 6,0, постигнути су неприхватљиво мали приноси ацесулфама, сахарина и цикламата. На крају је рН вредност 3,0 одабрана за даље експерименте јер је обезбедила нешто веће приносе свих аналита, што је у складу са резултатима већине аутора који прате вештачке заслађиваче у воденим матрицама (Ordóñez et al. 2012; Arbeláez et al. 2015; Sharma et al. 2019).

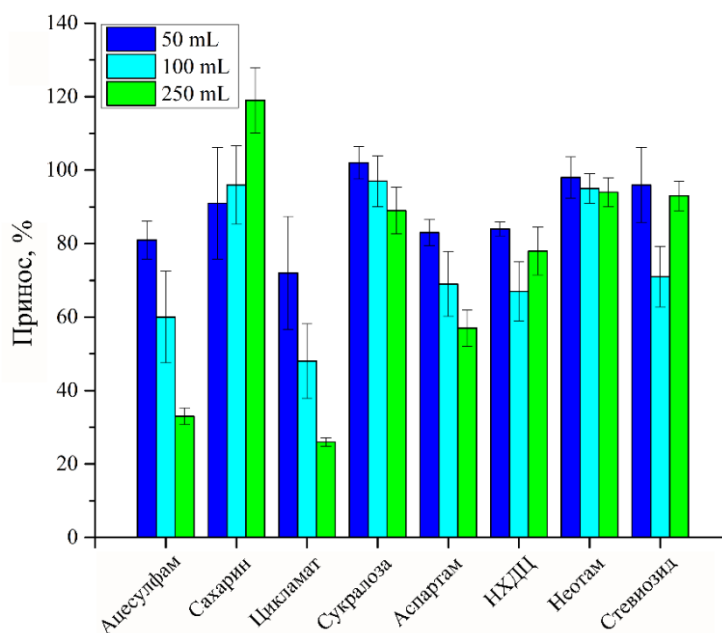




Слика 4.14. Приноси одабраних вештачких заслађивача при различитим рН вредностима узорака воде коришћењем Strata X и Oasis HLB колоне

#### 4.4.1.3. Избор запремине узорака

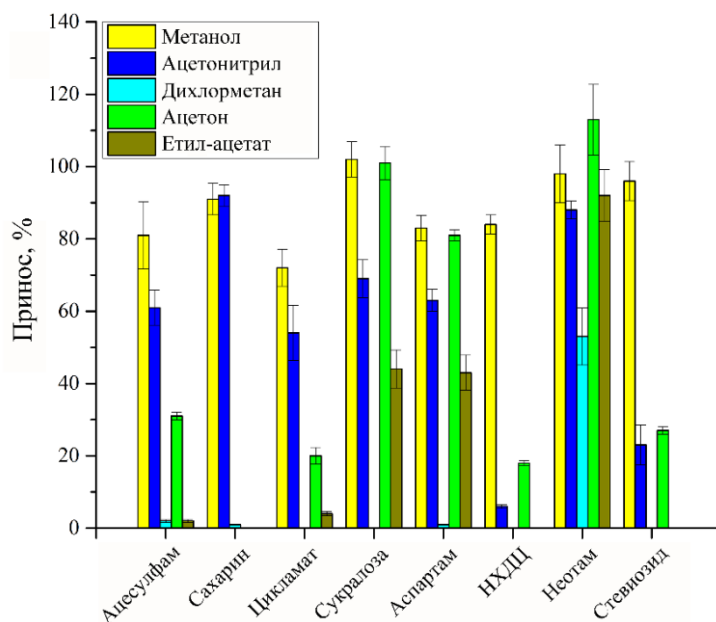
У оптимизацији запремине узорка воде утврђено је да се са запремином од 50 mL добијају најбољи приноси за све одабране заслађиваче (72–102%, слика 4.15). За ацесулфам и цикламат, због којих је изабран Oasis HLB сорбент, уочен је пробој (енг. breakthrough) капацитета сорбента са повећањем запремине узорка воде, тј. испирање анализата са паковања. Приликом повећања запремине узорка са 50 mL на 250 mL, долази до опадања приноса са 81% на 33% за ацесулфам, односно са 72% на 26% за цикламат. У мањој мери, пробој сорбента је примећен и за аспартам.



Слика 4.15. Приноси одабраних вештачких заслађивача добијени коришћењем различитих запремина узорака воде

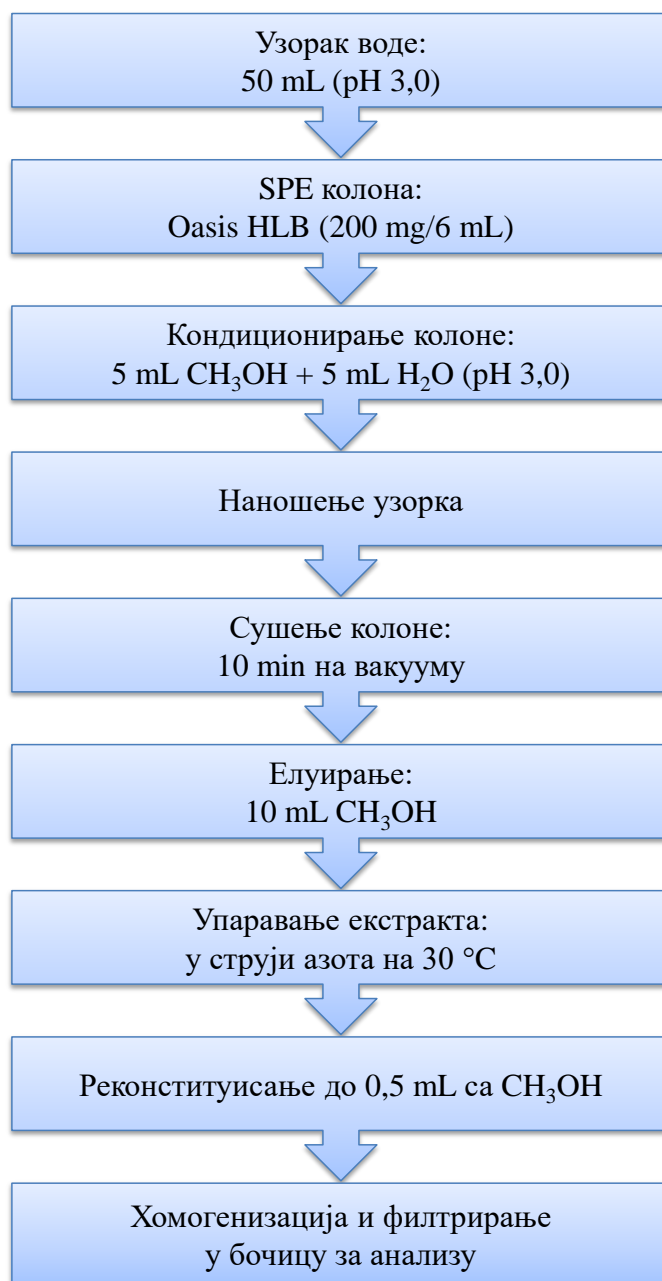
#### 4.4.1.4. Избор растварача за елуирање

У завршном кораку SPE оптимизације, испитиван је оптималан растварач за елуирање. Најбољи приноси су постигнути коришћењем најполарнијег растварача метанола (72–102%, слика 4.16), очигледно због високе растворљивости одабраних заслађивача. Када је примењен ацетонитрил као растварач мање поларности, постигнути су мањи приноси у поређењу са метанолом за већину заслађивача, са прихватљивим вредностима само за сахарин (92%) и неотам (88%). Према њиховим вишим  $\log K_{ow}$  вредностима и нижој растворљивости у води у поређењу са другим заслађивачима, ова два једињења су показала већу растворљивост у мање поларним растварачима. Показано је и да неполарни растварач дихлорметан није погодан за елуирање скоро свих анализата ( $< 2\%$ ). Само у случају неотама забележен је нешто већи принос (53%). Ови резултати су у складу са  $\log K_{ow}$  и  $\log K_{oc}$  вредностима неотама које су највеће од свих испитиваних анализата, што указује на његову високу растворљивост у неполарним растварачима. Коришћењем ацетона и етил-ацетата добијени су слични, ниски приноси за већину заслађивача. Међутим, ацетон је био нешто бољи елуент од етил-ацетата, посебно за сукралозу (101%) и аспартам (81%), што се може приписати томе да је ацетон поларнији растварач од етил-ацетата.



Слика 4.16. Приноси одабраних вештачких заслађивача добијени коришћењем различитих растварача за елуирање

У коначно развијеној и оптимизованој SPE процедури за припрему узорка воде за одређивање вештачких заслађивача (слика 4.17), 50 mL узорка са рН вредношћу подешеном на 3,0 наноси се на претходно кондиционирану Oasis HLB колону, а анализи се елуирају са 10 mL метанола. Након упаравања, екстракт се реконституише у 0,5 mL метанола, због већег фактора предконцентрације.



Слика 4.17. Коначно развијена и оптимизована SPE процедура за припрему узорка воде

#### 4.4.2. Оптимизација ултразвучне екстракције узорка седимената

Резултати испитивања пет растварача за екстракцију одабраних вештачких заслађивача из седимената су приказани у табели 4.6. Утврђено је да је екстракција заслађивача из комплексне матрице седимента веома тешка, пошто су за већину анализата добијени ниски приноси применом тестираних растварача. Само у случају сукралозе, постигнути су високи приноси коришћењем метанола (77%) и етил-ацетата (73%). Ово је вероватно разлог због којег у литератури нису забележени развој и оптимизација методе екстракције за одређивање вештачких заслађивача у седиментима. Ипак, генерално највећи приноси за већину анализата су добијени коришћењем метанола као растварача за екстракцију, чак и у случају ниских

вредности постигнутих за аспартам, НХДЦ и неотам (14–30%). По свему судећи, анализирани заслађивачи показују највећу растворљивост у метанолу као најполарнијем испитиваном органском растварачу, што је слично резултатима добијеним за елуент у оптимизацији припреме узорка воде. Међутим, показано је да неотам може бити ефикасније екстрахован коришћењем дихлорметана (50%), захваљујући већој растворљивости у неполарним растварачима, што се може закључити на основу највећих  $\log K_{ow}$  и  $\log K_{oc}$  вредности и најниже растворљивости у води од свих анализата. На основу добијених резултата, закључено је да за екстракцију свих осам одабраних заслађивача из седимената потребно користити и метанол и дихлорметан, као појединачне раствараче, уз напомену да се аспартам и НХДЦ екстрахују са мањом ефикасношћу. Приликом екстракције седимента дихлорметаном, приказују се само резултати за неотам, док се за остале заслађиваче приказују резултати екстракције метанолом.

Табела 4.6. Приноси одабраних вештачких заслађивача коришћењем различитих растварача за екстракцију из речног седимента

Аналит	Принос, % (RSD, %)				
	Метанол	Ацетонитрил	Дихлорметан	Ацетон	Етил-ацетат
Ацесулфам	68(1)	21(24)	0(0)	5(20)	1(17)
Сахарин	52(4)	1(1)	0(0)	0(0)	0(0)
Цикламат	65(4)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
Сукралоза	77(5)	29(8)	54(5)	38(17)	73(25)
Аспартам	18(32)	1(7)	15(14)	7(15)	1(0)
НХДЦ	30(11)	0(0)	3(19)	1(26)	1(0)
Неотам	14(13)	3(0)	50(26)	1(6)	3(33)
Стевиозид	43(3)	0(0)	2(14)	1(24)	0(10)

#### 4.5. Валидација метода

Развијене методе су валидиране анализом узорака површинске, подземне и отпадне воде, као и речног седимента, у које је додат стандардни раствор вештачких заслађивача на више нивоа концентрације. Резултати су приказани у табели 4.7. Добијени су високи приноси за матрицу површинских (68–114%) и подземних вода (70–114%), као и за матрицу отпадних вода

(68–105%), са RSD вредностима углавном испод 20%. Постигнуте су ниске границе детекције и квантификације за површинске ( $1,0\text{--}10,0\text{ ng L}^{-1}$  и  $3,3\text{--}33,3\text{ ng L}^{-1}$ ), подземне ( $0,9\text{--}9,0\text{ ng L}^{-1}$  и  $3,0\text{--}30,0\text{ ng L}^{-1}$ ) и отпадне воде ( $1,9\text{--}28,5\text{ ng L}^{-1}$  и  $6,3\text{--}95,0\text{ ng L}^{-1}$ ). Метода је била линеарна у испитиваном опсегу концентрација, са коефицијентима корелације у распону од 0,981 до 0,998 за матрицу површинских вода, од 0,983 до 0,994 за матрицу подземних вода и од 0,957 до 0,994 за матрицу отпадних вода (слике 6–8, Прилог). Утицај матрице је израчунат при концентрацији од  $100\text{ ng L}^{-1}$  (за површинске и подземне воде) и  $5000\text{ ng L}^{-1}$  (за отпадне воде). Утврђено је да матрица површинских и подземних вода смањује јонизацију већине заслађивача (до 61% и 42%, за цикламат), док је повећање сигнала забележено за сукралозу, аспартам и неотам. У комплексној матрици отпадних вода, сви анализи су показали значајну супресију сигнала, чак до 70%.

Резултати и дискусија

Табела 4.7. Параметри валидације методе ( $n = 3$ ): принос, поновљивост методе (релативна стандардна девијација, RSD), граница детекције (енг. limit of detection, LOD) и квантификације (енг. limit of quantification, LOQ), линеарност методе (коэффициент корелације,  $R^2$ ) и утицај матрице (енг. matrix effect, ME)

Површинска вода	Принос, % (RSD, %)					LOD, ng L <sup>-1</sup>	LOQ, ng L <sup>-1</sup>	$R^2$	ME, %
	Концентрација, ng L <sup>-1</sup>								
	10	25	50	100	200				
Ацесулфам	– <sup>a</sup>	82(10)	82(1)	82(6)	82(2)	5,0	16,7	0,998	–34
Сахарин	–	98(5)	98(10)	98(2)	99(9)	7,0	23,3	0,985	–28
Цикламаат	–	–	68(15)	73(12)	76(20)	10,0	33,3	0,983	–61
Сукралоза	112(9)	111(2)	111(12)	114(1)	112(1)	3,0	10,0	0,991	+67
Аспартам	84(20)	81(2)	81(2)	81(23)	80(1)	3,0	10,0	0,986	+6
НХДЦ	92(8)	95(6)	91(2)	96(1)	95(5)	1,0	3,3	0,981	–36
Неотам	92(11)	90(21)	91(8)	94(15)	90(2)	3,4	11,3	0,985	+38
Стевиозид	96(4)	93(10)	88(11)	94(15)	94(4)	1,1	3,7	0,993	–23
Подземна вода	Концентрација, ng L <sup>-1</sup>					LOD, ng L <sup>-1</sup>	LOQ, ng L <sup>-1</sup>	$R^2$	ME, %
	10	25	50	100	200				
Ацесулфам	–	84(11)	80(4)	81(2)	80(1)	4,3	14,3	0,983	–26
Сахарин	–	96(2)	93(17)	96(5)	97(14)	6,0	20,0	0,992	–12
Цикламаат	–	–	70(5)	71(20)	72(7)	9,0	30,0	0,986	–42
Сукралоза	106(22)	110(11)	111(8)	114(6)	110(4)	2,7	9,0	0,991	+31
Аспартам	83(1)	82(3)	85(1)	85(8)	83(5)	2,3	7,7	0,992	+12
НХДЦ	90(4)	93(7)	93(2)	96(4)	93(1)	1,1	3,7	0,988	–28
Неотам	95(9)	94(15)	96(8)	91(10)	95(11)	3,0	10,0	0,994	+20
Стевиозид	97(3)	98(2)	94(16)	96(18)	93(6)	0,9	3,0	0,990	–17
Отпадна вода	Концентрација, ng L <sup>-1</sup>					LOD, ng L <sup>-1</sup>	LOQ, ng L <sup>-1</sup>	$R^2$	ME, %
	100	1000	5000	10,000	50,000				
Ацесулфам	85(14)	80(13)	79(4)	82(7)	78(12)	18,0	60,0	0,961	–47
Сахарин	92(11)	90(16)	86(13)	91(11)	84(6)	23,3	77,7	0,990	–70
Цикламаат	78(16)	68(20)	69(5)	70(12)	71(15)	28,5	95,0	0,970	–13
Сукралоза	101(8)	95(10)	95(1)	99(8)	96(7)	6,9	23,0	0,985	–53
Аспартам	86(10)	86(4)	85(14)	91(10)	95(10)	14,1	47,0	0,994	–26
НХДЦ	104(16)	93(4)	93(16)	100(19)	105(6)	8,7	29,0	0,965	–59
Неотам	97(9)	88(4)	93(10)	94(14)	93(7)	10,8	36,0	0,957	–33
Стевиозид	103(4)	93(9)	98(11)	92(13)	94(7)	1,9	6,3	0,975	–48
Седимент	Концентрација, ng g <sup>-1</sup>					LOD, ng g <sup>-1</sup>	LOQ, ng g <sup>-1</sup>	$R^2$	ME, %
	5	50	250	500					
Ацесулфам		65(19)	61(9)	60(6)	66(11)	1,4	4,7	0,997	–56
Сахарин		56(6)	41(14)	52(13)	40(11)	0,7	2,3	0,984	–18
Цикламаат		52(17)	45(20)	54(18)	50(8)	1,4	4,7	0,973	–16
Сукралоза		72(14)	65(5)	69(10)	71(12)	0,7	2,3	0,992	+20
Аспартам		19(14)	17(6)	15(6)	15(7)	0,8	2,6	0,981	–11
НХДЦ		32(2)	43(6)	36(10)	32(5)	0,3	1,0	0,994	–19
Неотам		20(2)	18(4)	17(8)	15(10)	0,1	0,3	0,906	+23
Стевиозид		<b>55(18)<sup>б</sup></b>	<b>46(19)<sup>б</sup></b>	<b>51(20)<sup>б</sup></b>	<b>40(3)<sup>б</sup></b>	<b>0,5<sup>б</sup></b>	<b>1,7<sup>б</sup></b>	<b>0,982<sup>б</sup></b>	<b>+40<sup>б</sup></b>
		48(7)	45(5)	54(6)	46(3)	0,1	0,3	0,994	+2

<sup>a</sup> детектовано, али испод LOQ

<sup>б</sup> валидација коришћењем дихлорметана као растварача за екстракцију

Валидација методе за одређивање осам одабраних вештачких заслађивача у седиментима је извршена коришћењем и метанола и дихлорметана као појединачних растварача за екстракцију. Резултати приказани у табели 4.7 се односе на приносе добијене коришћењем метанола, јер је са овим растварачем екстракција била ефикаснија за већину анализата. Пошто је у оптимизацији екстракције заслађивача из седимената показано да се неотама може ефикасније екстраховати коришћењем дихлорметана, у табели 4.7 су додати резултати валидације уз коришћење дихлорметана само у случају неотама. У складу са резултатима добијеним током оптимизације методе екстракције, потврђено је да се аспартам и НХДЦ екстрахују са мањом ефикасношћу, јер су највећи приноси методе били 19% и 43%, респективно. Највећи остварени приноси осталих заслађивача су били у опсегу од 54% до 72%. Иако је екстракција вештачких заслађивача из матрице седимента проблематична, због чега у литератури није забележена ефикасна метода, добијени су уједначени приноси сваког анализата на тестираним концентрацијама, са високом поновљивошћу ( $RSD < 20\%$ ). Израчунате LOD и LOQ вредности за одабране анализате су биле у опсегу од  $0,1 \text{ ng g}^{-1}$  до  $1,4 \text{ ng g}^{-1}$ , односно од  $0,3 \text{ ng g}^{-1}$  до  $4,7 \text{ ng g}^{-1}$ . Што се тиче линеарности методе (слика 9, Прилог), коефицијенти корелације у испитиваном опсегу концентрација су били од 0,973 (за цикламат) до 0,997 (за ацесулфам). Утицај матрице, израчунат при концентрацији од  $500 \text{ ng g}^{-1}$ , је показао изражену супресију сигнала за ацесулфам (56%) у матрици седимента, док је сигнал неотама повећан за 40%. За остале заслађиваче, утицај матрице није био изражен.

#### 4.6. Анализа узорака површинских, подземних и отпадних вода

У циљу свеобухватне анализе контаминације вештачким заслађивачима реке Дунав и њених највећих притока у Републици Србији – Тисе, Саве и Мораве, развијена и валидирана HPLC–MS/MS метода је примењена у анализи узорака речне, подземне и отпадне воде. Вештачки заслађивачи су детектовани на свим местима узорковања на реци Дунав (PB1–PB13), као и у њеним притокама (PB14–PB17). Добијени резултати вештачких заслађивача детектованих у сливу реке Дунав у Републици Србији сумирани су у табели 4.8, а масени хроматограми детектованих заслађивача у свакој врсти матрице дати су у Прилогу (слике 10–14). Ацесулфам и сукралоза су били најчешће детектовани заслађивачи у узорцима речне воде, пронађени у свим узорцима воде, у опсезима концентрација  $41\text{--}83 \text{ ng L}^{-1}$ , односно  $42\text{--}206 \text{ ng L}^{-1}$ . Широка распрострањеност два заслађивача у воденој средини може се објаснити чињеницом да су метаболички инертни (Renwick 1986; Roberts et al. 2000), па су веома заступљени у комуналним отпадним водама које се испуштају у природне водотокове, са или без претходног пречишћавања. Штавише, ова два заслађивача су високо растворна у води (табела 3.1) и прилично стабилна у животној средини, па се стога сматрају добрим индикаторима загађења отпадним водама (Lim et al. 2017; Ribbers et al. 2019; Fu et al. 2020).

Нивои ацесулфама били су релативно уједначени дуж целог тока Дунава у Републици Србији (слика 4.18), са сличним концентрацијама забележеним у притокама. Генерално уравнотежене концентрације ацесулфама у сливу реке Дунав могу се објаснити високим капацитетом разблажења Дунава, као и евидентно мање израженим утицајем локалитета са великим комуналним оптерећењем. Наиме, концентрације овог заслађивача биле су исте пре и после ( $75 \text{ ng L}^{-1}$  и  $76 \text{ ng L}^{-1}$ , узорци PB4 и PB5;  $51 \text{ ng L}^{-1}$ , оба узорка PB15 и PB16) два главна канализациона испуста комуналних отпадних вода на Дунаву и Сави у Београду (OB1 и OB2). Што се тиче сукралозе, највећа концентрација је детектована у реци Дунав у Београду ( $206 \text{ ng L}^{-1}$ , узорак PB5), након великог испуста отпадних вода. Непречишћене канализационе воде у високо насељеним подручјима, као што су Београд и Нови Сад, очигледно имају велики утицај на нивое сукралозе у речној води. Забележене концентрације

овог вештачког заслађивача у Дунаву и Сави, низводно од канализационих испуста у Београду (206 ng L<sup>-1</sup>, узорак PB5; 111 ng L<sup>-1</sup>, узорак PB16) биле су много веће од оних детектованих узводно (89 ng L<sup>-1</sup>, узорак PB4; 68 ng L<sup>-1</sup>, узорак PB15).

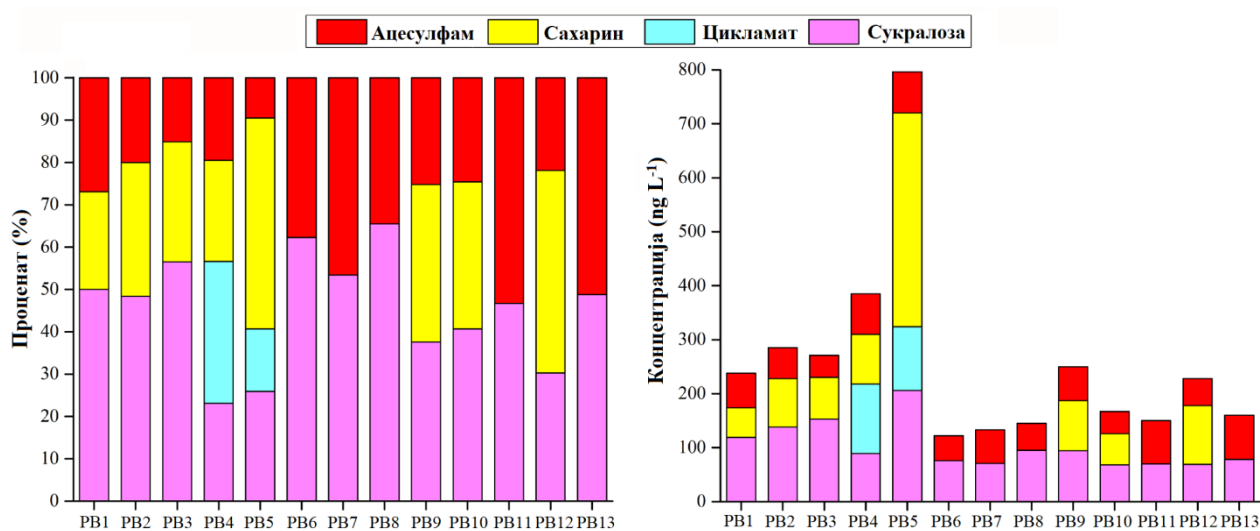
Табела 4.8. Детектоване концентрације одабраних вештачких заслађивача у узорцима површинских (PB), подземних (ПВ) и отпадних вода (ОВ), као и речних седиментата (СЕД)

		Концентрација ± SD (ng L <sup>-1</sup> )					
		Ацесулфам	Сахарин	Цикламат	Сукралоза	Аспартам	Неотам
		<i>Површинска вода</i>					
Дунав	PB1	64 ± 11	55 ± 11	– <sup>a</sup>	119 ± 15	–	–
	PB2	57 ± 5	90 ± 9	–	138 ± 35	–	–
	PB3	41 ± 3	77 ± 8	–	153 ± 11	–	–
	PB4	75 ± 13	92 ± 19	129 ± 19	89 ± 9	–	–
	PB5	76 ± 17	396 ± 37	118 ± 15	206 ± 18	–	–
	PB6	46 ± 6	–	–	76 ± 8	–	–
	PB7	62 ± 11	–	–	71 ± 3	–	–
	PB8	50 ± 10	–	–	95 ± 9	–	–
	PB9	63 ± 6	93 ± 11	–	94 ± 14	–	–
	PB10	41 ± 12	58 ± 7	–	68 ± 6	–	–
	PB11	80 ± 8	–	–	70 ± 15	–	–
	PB12	50 ± 7	109 ± 16	–	69 ± 14	–	–
	PB13	82 ± 13	–	–	78 ± 9	–	–
Тиса	PB14	50 ± 3	–	–	97 ± 4	–	–
Сава	PB15	51 ± 5	–	–	68 ± 7	–	–
	PB16	51 ± 4	104 ± 19	–	111 ± 23	–	–
Морава	PB17	83 ± 5	124 ± 20	–	42 ± 9	–	–
		<i>Подземна вода</i>					
Сава	ПВ1	20	–	–	17	–	–
Дунав	ПВ2	73	–	–	25	–	–
		<i>Отпадна вода</i>					
Сава	ОВ1	5383 ± 164	35683 ± 840	16576 ± 581	4039 ± 499	580 ± 20	170 ± 2
Дунав	ОВ2	7488 ± 57	28225 ± 544	23179 ± 930	4756 ± 503	293 ± 31	53 ± 8
		Концентрација ± SD (ng g <sup>-1</sup> )					
		<i>Седимент</i>					
Дунав	СЕД1	–	–	–	–	117 ± 20	48 ± 9
	СЕД2	–	–	–	–	139 ± 17	9 ± 3
Тиса	СЕД3	–	–	–	–	48 ± 18	–
Сава	СЕД4	–	–	–	–	292 ± 33	21 ± 5
Морава	СЕД5	–	–	–	–	134 ± 14	–

<sup>a</sup> није детектовано

У поређењу са резултатима других европских земаља, нивои ацесулфама и сукралозе у сливу реке Дунав у Републици Србији су генерално били значајно нижи. Високе концентрације ових једињења забележене су у пет река у Шпанији (120–1620 ng L<sup>-1</sup> и 40–3600 ng L<sup>-1</sup>, респективно, Arbeláez et al. 2015) и у дванаест река у Финској (28–9600 ng L<sup>-1</sup> и до 1000 ng L<sup>-1</sup>, Perkoła и Sainio 2014). Разлике у забележеним концентрацијама могу одражавати саму величину ових река са различитим протоцима и степенима разблажења вештачких заслађивача у води. Међутим, бројне студије су показале веома високе нивое ацесулфама, док је сукралоза детектована при концентрацијама сличним онима пронађеним у овој

дисертацији. На пример, у реци Прут, на румунско-молдавској граници, као другој најдужој притоци Дунава, детектоване су концентрације од 120–750 ng L<sup>-1</sup> и 15–22 ng L<sup>-1</sup>, за ацесулфам и сукралозу, респективно (Moldovan et al. 2018). У сличној студији реке Рајне и њених притока у Немачкој, забележени су високи нивои ацесулфама (379–3044 ng L<sup>-1</sup>), док је сукралоза пронађена у знатно нижем опсегу (18–175 ng L<sup>-1</sup>, Ruff et al. 2015). Раније истраживање четири реке у Немачкој показало је сличан тренд концентрација, са ацесулфамом као доминантним заслађивачем (270–2700 ng L<sup>-1</sup>, Scheurer et al. 2009), детектованим при концентрацији од 730 ng L<sup>-1</sup> у реци Дунав, док је сукралоза детектована у знатно нижим концентрацијама (10–110 ng L<sup>-1</sup> и 20 ng L<sup>-1</sup> у Дунаву). Ови резултати су у складу са подацима мониторинга 120 узорака речне воде из 27 европских земаља (Loos et al. 2009) који су показали концентрације сукралозе у опсегу од 16 до 924 ng L<sup>-1</sup>, са нижим нивоима детектованим у Немачкој и источној Европи (Мађарска, Бугарска, Грчка, итд.), што указује на мању употребу сукралозе као вештачког заслађивача у прехранбеним производима у овим земљама. У наведеној студији је јасно показано да је сукралоза широко распрострањена у површинским водама Европе и претежно доминантна у узорцима из Велике Британије, Белгије, Холандије, Француске, Швајцарске, Шпаније, Италије, Норвешке и Шведске. Пошто су ацесулфам и сукралоза метаболички отпорни и стабилни у животној средини, и ограничено се уклањају у постројењима за пречишћавање отпадних вода (Buerge et al. 2009; Subedi и Kannan 2014), више концентрације пронађене у осталим европским земљама одражавају велико оптерећење отпадним водама у високо насељеним подручјима и већу потрошњу заслађивача.



Слика 4.18. Проценти (лево) и концентрације (десно) четири вештачка заслађивача детектована у површинској води дуж целог тока реке Дунав у Републици Србији

Ацесулфам и сукралоза су били једини вештачки заслађивачи детектовани у узорцима подземне воде. Узорци прикупљени из рени бунара са Саве (ПВ1) и из дренажног бунара са Дунава (ПВ2) садржали су 20 ng L<sup>-1</sup> и 73 ng L<sup>-1</sup> ацесулфама, односно 17 ng L<sup>-1</sup> и 25 ng L<sup>-1</sup> сукралозе (табела 4.8). Присуство ова два заслађивача указује на изражену мобилност кроз водоносне слојеве, док одсуство сахарина и цикламата потврђује њихову високу разградљивост која се одиграва током транспорта кроз земљиште (Buerge et al. 2009). Виши нивои вештачких заслађивача забележени у дренажном бунару који се налази у приобаљу Дунава (ПВ2) могу се објаснити чињеницом да је алувијум аквифер веома хомоген због чега



се загађујуће материје лакше транспортују до дренажних бунара, чак и при већој удаљености од реке. С друге стране, алувијум у приобаљу реке Саве на територији београдског водоизворишта одликује велика хетерогеност аквифера, са неколико полупропусних слојева, при чему је потребно дуже време проласка материја кроз водоносне слојеве до рени бунара који се налазе у непосредној близини тока реке (Đimkić 2007). Забележене концентрације ацесулфама и сукралозе су биле знатно ниже од оних пронађених у узорцима из бунара у Швајцарској (ацесулфам до  $524 \text{ ng L}^{-1}$ , Ens et al. 2014) и Канади (ацесулфам и сукралоза, до  $1534 \text{ ng L}^{-1}$  и  $541 \text{ ng L}^{-1}$ , Wu et al. 2014). Штавише, многе студије су показале изузетно високе нивое ова два заслађивача у узроцима подземних вода: до  $4,7 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  (Buerge et al. 2009) и до  $2,9 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  (Wolf et al. 2012) за ацесулфам, као и  $3,4 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  и  $2,4 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  за ацесулфам и сукралозу, респективно (Van Stempvoort et al. 2011). Високе концентрације су детектоване у аквиферима код којих постоји значајна инфилтрација речне воде у коју се изливају ефлуенти из ППОВ. Коначно, с обзиром на континуално загађење Саве и Дунава нетретираним отпадним водама, може се закључити да постоји значајно канализационо оптерећење на водоизворишта и потенцијални утицај на исправност воде за пиће у Републици Србији.

У узорцима отпадних вода из највећих канализационих канала у Београду, ацесулфам и сукралоза су детектовани у умерено високим концентрацијама (до  $7488 \text{ ng L}^{-1}$ , односно до  $4756 \text{ ng L}^{-1}$ ). Нивои ацесулфама били су нижи од оних детектованих у инфлуентима ППОВ у Швајцарској ( $12\text{--}43 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ , Buerge et al. 2009), Шпанији (до  $26,7 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ , Ordóñez et al. 2012) и Грчкој (до  $25,3 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ , Kokotou и Thomaidis 2013). Такође, много већи нивои сукралозе забележени су у инфлуентима у Шпанији ( $12\text{--}60 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ , Arbeláez et al. 2015) и Грчкој ( $25,4 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ , Kokotou и Thomaidis 2013). Генерално ниже концентрације ацесулфама и сукралозе пронађене у свим воденим матрицама у овој дисертацији, у поређењу са другим европским земљама, одражавају мањи број становника у истраживаном подручју, али и мању конзумацију два заслађивача.

Сахарин је детектован у око 60% узорака речне воде, у опсегу концентрација  $55\text{--}396 \text{ ng L}^{-1}$ , са максималном вредношћу измереном у реци Дунав у Београду (узорак РВ5, слика 4.18), низводно од највећег канализационог испуста (ОВ2, слика 3.1). Цикламат је пронађен у само два узорка из Дунава у Београду, при концентрацијама од  $118 \text{ ng L}^{-1}$  и  $129 \text{ ng L}^{-1}$  (узорци РВ5 и РВ4). На основу највиших нивоа детектованих у непречишћеним отпадним водама (узорци ОВ1 и ОВ2), закључује се да се ова два вештачка заслађивача најчешће користе у Републици Србији. Њихове концентрације у сливу реке Дунав су у складу са густином насељености и високим антропогеним оптерећењем непречишћеним комуналним отпадним водама. Много нижа учесталост детекције ова два заслађивача у речној води, у поређењу са ацесулфамом и сукралозом, повезана је са њиховом ограниченом стабилношћу и брзом биодеградацијом у животној средини (Luo et al. 2019a). Такође, резултати неких студија указују на већу стопу разградње цикламата у поређењу са сахарином (Bergheim et al. 2015; Luo et al. 2019a). Одсуство цикламата у већини испитиваних речних узорака се стога може објаснити бржом деградацијом у животној средини, као и мањом количином утрошеног цикламата која се испушта у реципијент (узорци ОВ1 и ОВ2, табела 4.8). Поред тога, сахарин и цикламат се сматрају веома корисним за идентификацију недавне (свеже) контаминације отпадним водама (Tran et al. 2014; Zirlwagen et al. 2016). Наиме, стабилни и биоразградиви вештачки заслађивачи могу се користити за разликовање давних и скоријих загађења површинских вода комуналним отпадним водама (Tran et al. 2014). На основу забележених нивоа сахараина и цикламата може се закључити да се најзначајнији континуирани унос комуналних вода у речни екосистем Дунава у Републици Србији одвија у Београду (узорци РВ4 и РВ5). Мање изражена контаминација реке Дунав се јавља у мање насељеним местима дуж тока реке, на шта указује и одсуство оба биоразградива заслађивача. Међутим, веома висока

концентрација сахарина забележена је у ретко насељеном пољопривредном подручју поред реке Мораве ( $124 \text{ ng L}^{-1}$ , узорак PB17). Повишени нивои овог заслађивача се могу објаснити применом сточног стајњака, јер су сахарин и НХДЦ једина два вештачка заслађивача дозвољена у храни за животиње у Републици Србији (Правилник о квалитету хране за животиње 2017). Сахарин је такође производ разградње неких хербицида из групе сулфонил-уреа (Spoelstra et al. 2020), што је још један могући пут за доспевање у водену средину.

Свеже загађење непречишћеним отпадним водама у Београду такође је потврђено коришћењем односа цикламат/ацесулфам, према предлогу Zirlewagen и сарадника (2016). У наведеној студији утврђено је да је овај однос одличан индикатор за разликовање пречишћене и непречишћене отпадне воде и поузданији параметар за унос отпадне воде од концентрација два заслађивача због тога што на њега не утиче разблажење. Резултати су показали да су вредности односа за сирову нетретирану отпадну воду заиста биле исте (3,1 за узорке OB1 и OB2), без обзира на то што су концентрације два заслађивача у узорцима биле различите. За једина два узорка речне воде у којима је детектован цикламат (PB4 и PB5), вредности односа цикламат/ацесулфам (1,7 и 1,5, респективно) биле су око два пута ниже него у сировој отпадној води. С обзиром на то да је вредност односа у цитираној студији (Zirlewagen et al. 2016) била око три реда величине нижа након пречишћавања отпадне воде, резултати добијени у овом истраживању потврђују континуирани унос свеже нетретиране отпадне воде у реку Дунав у Београду.

Концентрације сахарина и цикламата у сливу реке Дунав у Републици Србији су генерално сличне онима детектованим у рекама других европских земаља. Два вештачка заслађивача су пронађена у дванаест река у Финској (до  $490 \text{ ng L}^{-1}$  и до  $210 \text{ ng L}^{-1}$ , респективно, Perkola и Sainio 2014) и у сливу реке Рајне у Немачкој ( $14\text{--}241 \text{ ng L}^{-1}$  и  $14\text{--}106 \text{ ng L}^{-1}$ , Ruff et al. 2015). У претходној студији четири реке у Немачкој (Рајна, Некар, Дунав и Мајна) уочени су слични нивои детектованих заслађивача ( $10\text{--}350 \text{ ng L}^{-1}$  за сахарин и  $30\text{--}320 \text{ ng L}^{-1}$  за цикламат, Scheurer et al. 2009), при чему је у реци Дунав детектовано по  $40 \text{ ng L}^{-1}$  оба заслађивача. Концентрације сахарина и цикламата у Дунаву у Немачкој су сличне онима пронађеним у реци Прут, притоци Дунава ( $36\text{--}46 \text{ ng L}^{-1}$ ,  $15\text{--}27 \text{ ng L}^{-1}$ , респективно, Moldovan et al. 2018). Поред тога, анализа узорака воде из пет река у Шпанији је показала да сахарин није пронађен ни у једном од испитиваних узорака, док је цикламат забележен при концентрацији до  $80 \text{ ng L}^{-1}$  (Arbeláez et al. 2015). Различити нивои детектованих заслађивача у површинским водама могу се повезати са разликама у исхрани и количинама заслађивача у прехранбеним производима, као и са различитим стопама елиминације у ППОВ.

У отпадној води из два највећа канализациона испуста у Београду, сахарин и цикламат су детектовани у концентрацијима од  $35,7 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  и  $16,6 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  у узорку OB1, односно  $28,2 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  и  $23,2 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  у узорку OB2. Сличне и више концентрације сахарина и цикламата су забележене у инфлуентима у Швајцарској ( $3,9\text{--}18,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  и  $10,0\text{--}65,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ , Vuerge et al. 2009), Шпанији (до  $22,3 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  и  $36,4 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ , Ordóñez et al. 2012) и Грчкој ( $15,0\text{--}46,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  и до  $57,8 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ , Kokotou и Thomaidis 2013). Нешто нижи нивои заслађивача детектовани у отпадној води у овој дисертацији се поново могу објаснити мањим бројем становника у Републици Србији, као и различитим образцем потрошње. Иако се сахарин и цикламат ограничено метаболишу и излучују углавном непромењени (Renwick 1986; Carochi et al. 2017), у ефлуентима се налазе у нижим концентрацијама од ацесулфама и сукралозе због високе ефикасности уклањања у ППОВ ( $> 90\%$ , Vuerge et al. 2009; Scheurer et al. 2009; Kokotou и Thomaidis 2013; Arbeláez et al. 2015). Тако се могу објаснити и нивои два заслађивача пронађени у узорцима речне и отпадне воде анализираним у овој дисертацији,

јер се генерално виши нивои пронађени у инфлуентима земаља у Европи ефикасно уклањају и значајно смањују у третманима, и доводе до ниских концентрација у речној води, сличних онима у Републици Србији.

Остала четири испитивана заслађивача (аспартам, неотам, НХДЦ и стевioзид) нису пронађена ни у једном узорку речне воде, што је у складу са литературним подацима који показују њихово веома ретко детектовање, у само неколико студија. Тако су у речној води у Кини пронађени аспартам, неотам и НХДЦ, у концентрацијама до  $40 \text{ ng L}^{-1}$ ,  $9,3 \text{ ng L}^{-1}$  и  $220 \text{ ng L}^{-1}$  (Gan et al. 2013), док је у Вијетнаму аспартам детектован у концентрацији до  $2600 \text{ ng L}^{-1}$  (Watanabe et al. 2016). Међутим, аспартам и неотам су детектовани у нетретираним комуналним отпадним водама, иако у ниским концентрацијама (до  $580 \text{ ng L}^{-1}$  и  $170 \text{ ng L}^{-1}$ , респективно, табела 4.8). Слични резултати су забележени и у другим студијама у којима су њихови нивои у инфлуентима значајно нижи од осталих вештачких заслађивача (Gan et al. 2013; Subedi и Kannan 2014). Ретко детектовање ова два заслађивача може се објаснити израженим метаболизмом (O'Brien Nabors 2001), потпуним уклањањем у ППОВ (Gan et al. 2013; Arbeláez et al. 2015) и високом деградабилношћу у животној средини (Berset и Ochsenbein 2012; Gan et al. 2013; Kobetičová et al. 2016).

#### 4.7. Анализа узорака седимената

У узорцима речних седимената Дунава и његових притока у Републици Србији (Тисе, Саве и Мораве), аспартам и неотам су били једини детектовани вештачки заслађивачи. С друге стране, ова два вештачка заслађивача нису пронађена ни у једном анализираном узорку речне, нити подземне воде. Резултати су претходно објашњени брзим метаболизмом у људском телу и високим степеном деградације у животној средини, као и високом ефикасношћу уклањања у постројењима за третман отпадних вода. С обзиром на њихове високе  $\log K_{ow}$  и  $\log K_{oc}$  вредности, као и ниску растворљивост у води (табела 3.1), аспартам и неотам имају висок афинитет за адсорпцију на честице седимената у систему вода/седимент. Поред тога, високе  $K_{oc}$  вредности указују на потенцијал за потпуну имобилизацију ових једињења у седименту, што је посебно изражено код неотама са највишом вредношћу овог параметара међу испитиваним једињењима.

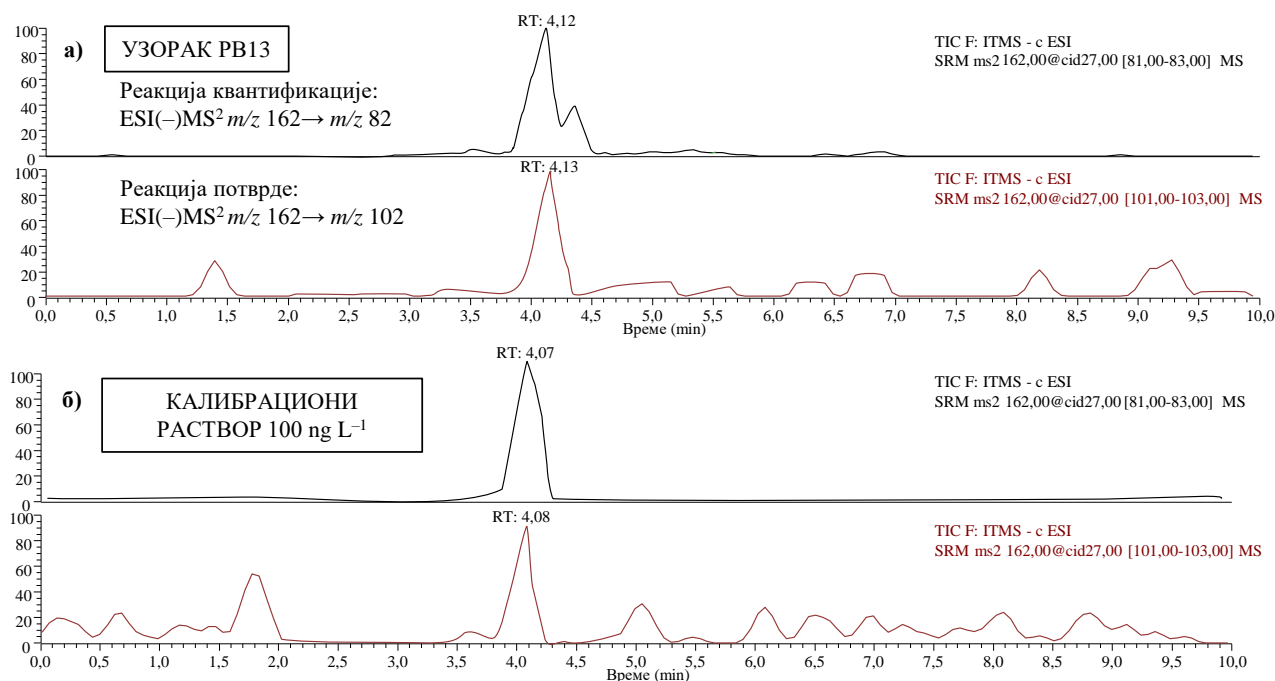
Аспартам је детектован у свим узорцима седимената, у опсегу концентрација  $48\text{--}292 \text{ ng g}^{-1}$ , док је неотам нађен у 60% узорака, у опсегу  $9\text{--}48 \text{ ng g}^{-1}$  (табела 4.8). Највећи ниво аспартама је забележен у реци Сави (узорак СЕД4) у Београду, као најнасељенијем граду у Републици Србији са великим антропогеним оптерећењем. На основу концентрација ова два заслађивача у непречишћеним отпадним водама (узорци ОВ1 и ОВ2), може се закључити да се аспартам више конзумира од неотама путем прехранбених производа и пића. Ово би могао бити разлог због чега се неотам ређе проналази у седиментима од аспартама, и то у нижим концентрацијама.

Прегледом литературе може се приметити да постоји само неколико студија које се баве праћењем вештачких заслађивача у седиментима површинских вода. У националној студији о органским једињењима у седиментима река и потока у САД, сукралоза је пронађена у 12,5% анализираних узорака, са максималном концентрацијом од  $16 \text{ ng g}^{-1}$  (Bernot et al. 2016). Истраживање канадских урбаних водених токова, који су настали мешањем атмосферске воде и прелива канализације, показало је да аспартам није откривен ни у једном анализираном узорку седимента. Одабран је као један од десет микрополутаната који могу бити потенцијални показатељи контаминације канализационим водама (Најј-Мохамад et al.

2014). С друге стране, у студији о траговима седам вештачких заслађивача у 16 језера у Вухану (Кина), ацесулфам, сахарин и цикламат су пронађени у скоро свим узорцима седимената, при чему је сахарин био најзаступљенији, са максималном концентрацијом од  $4,2 \text{ ng g}^{-1}$  (Fu et al. 2020). Сукралоза је пронађена у 12% анализираних језерских седимената, док аспартам, неотам и НХДЦ нису били детектовани. Забележени нивои ацесулфама, сахарина, цикламата и сукралозе у густо насељеним подручјима Кине били су близу границе детекције методе развијене у овој дисертацији, што би могло објаснити немогућност њихове детекције у седиментима слива реке Дунав у Републици Србији.

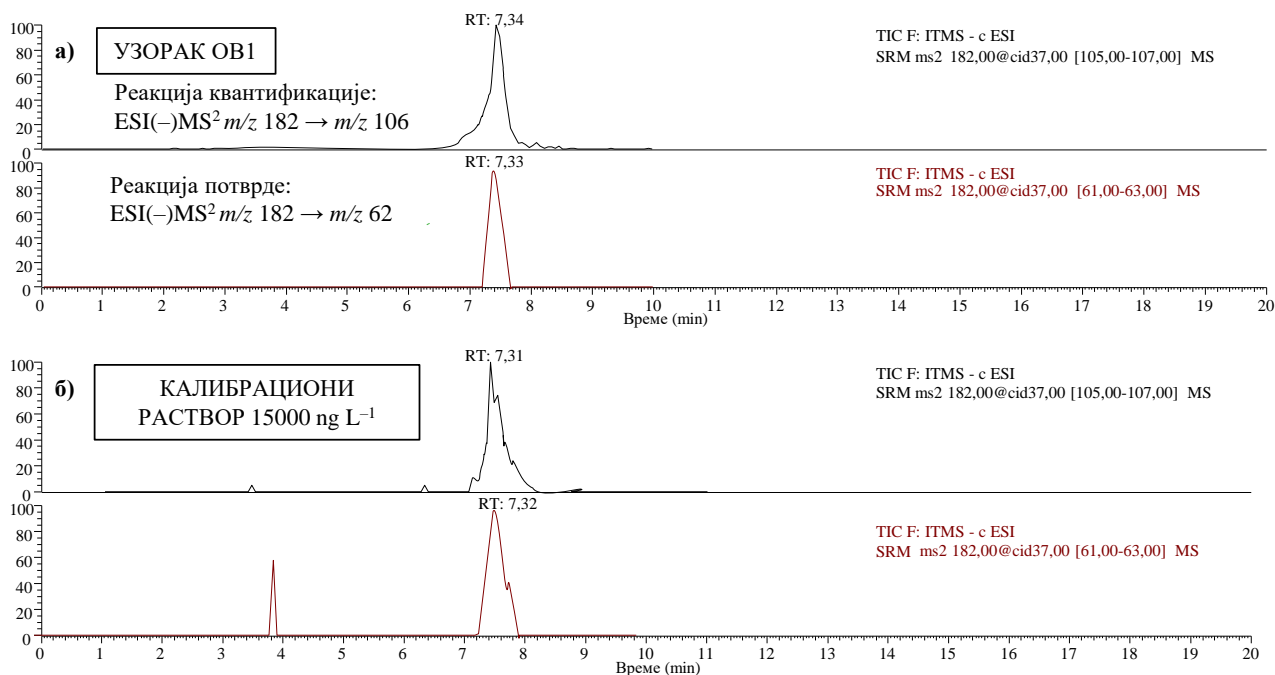
#### 4.8. Потврда присуства вештачких заслађивача у реалним узорцима

Узорци површинске, подземне и отпадне воде и речних седимената, у којима су детектовани вештачки заслађивачи, поново су анализирани ради потврде присуства анализата коришћењем додатних SRM прелаза како би се недвосмислено потврдило њихово присуство. Реакције фрагментације за потврду присуства одабраних вештачких заслађивача су приказане у табели 4.4. Примери масених хроматограма шест детектованих вештачких заслађивача са потврдом присуства приказани су на сликама 4.19–4.24. Приликом потврде сваког анализата, прате се две реакције фрагментације истог прекурсора јона у два најинтензивнија фрагментна јона, једна за квантитативно одређивање, а друга за потврду присуства анализата у узорку.

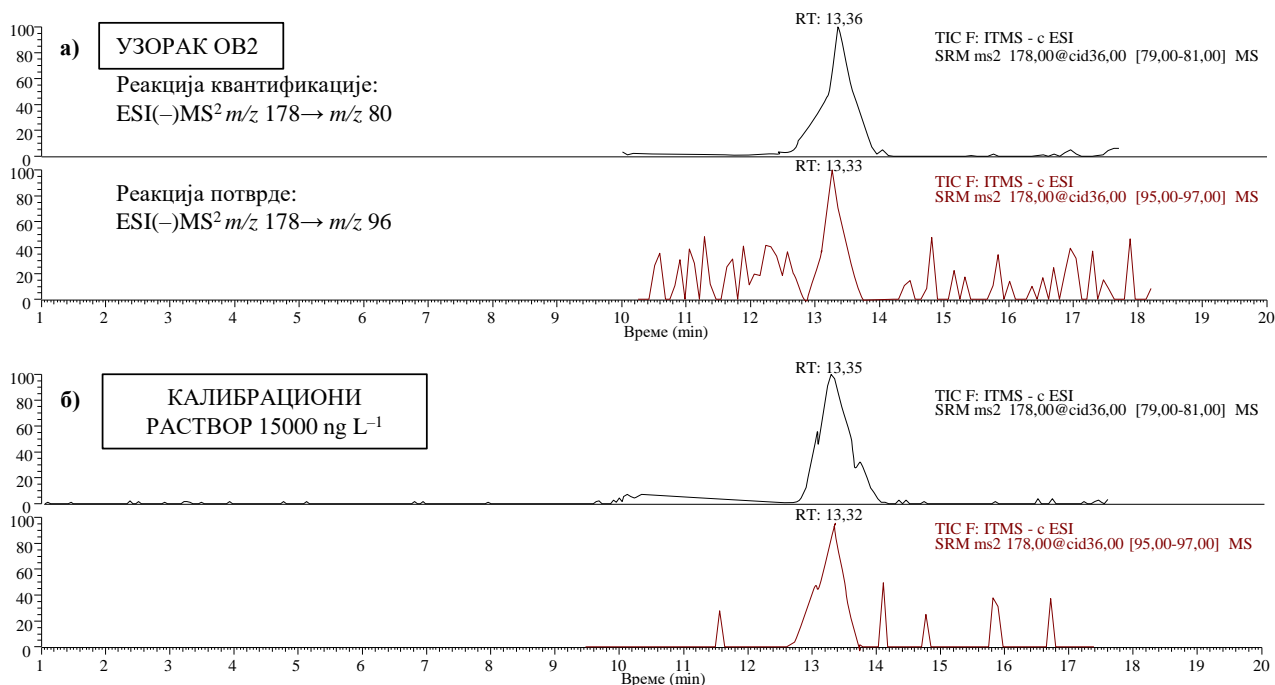


Слика 4.19. Масени хроматограми са потврдом присуства ацесулфама: (а) узорка површинске воде Дунава (PB13); (б) одговарајућег калибрационог раствора концентрације  $100 \text{ ng L}^{-1}$

## Резултати и дискусија

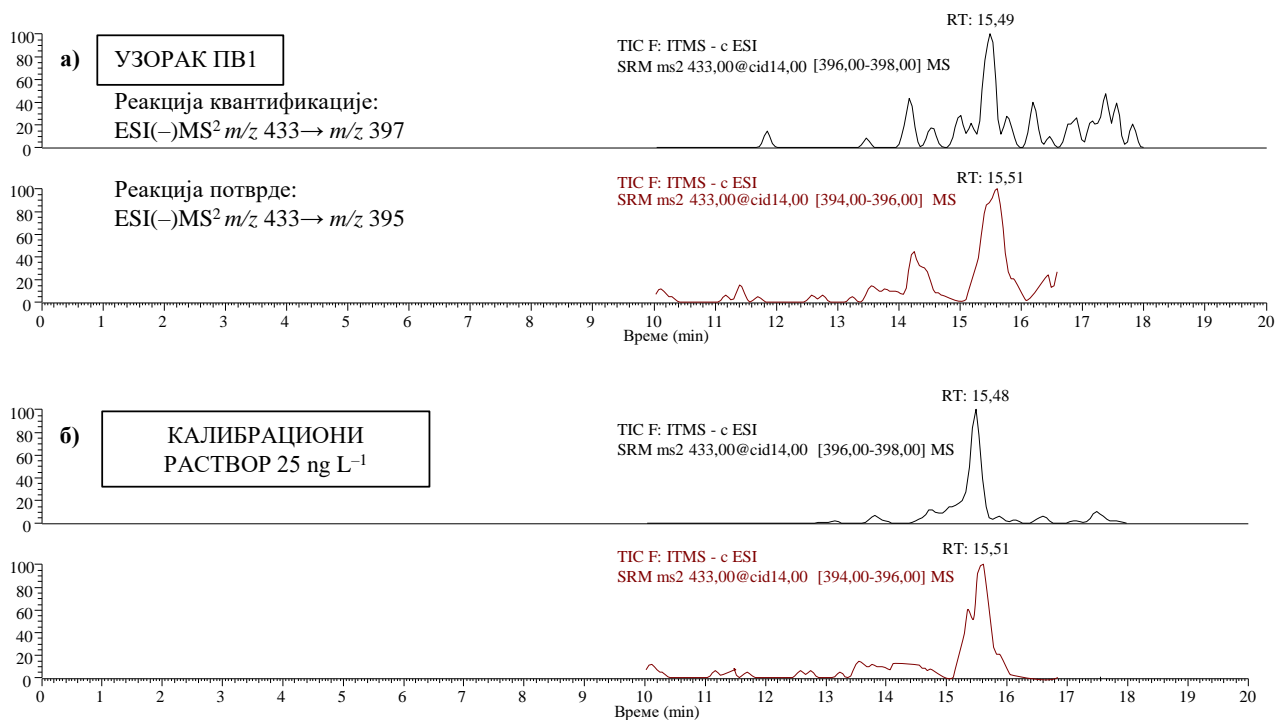


Слика 4.20. Масени хроматографи са потврдом присуства сахарина: (а) узорка отпадне воде из канализационог испуста са Саве (ОБ1); (б) одговарајућег калибрационог раствора концентрације 15000 ng L<sup>-1</sup>

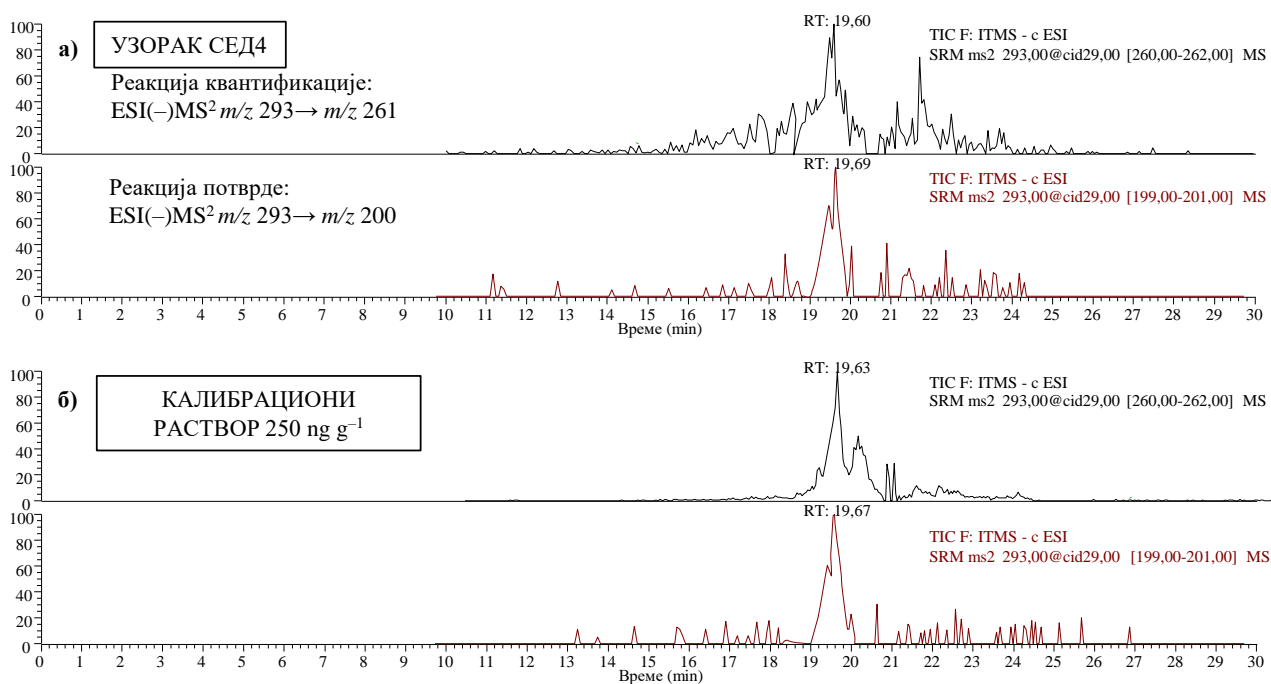


Слика 4.21. Масени хроматографи са потврдом присуства цикламата: (а) узорка отпадне воде из канализационог испуста са Дунава (ОБ2); (б) одговарајућег калибрационог раствора концентрације 15000 ng L<sup>-1</sup>

## Резултати и дискусија

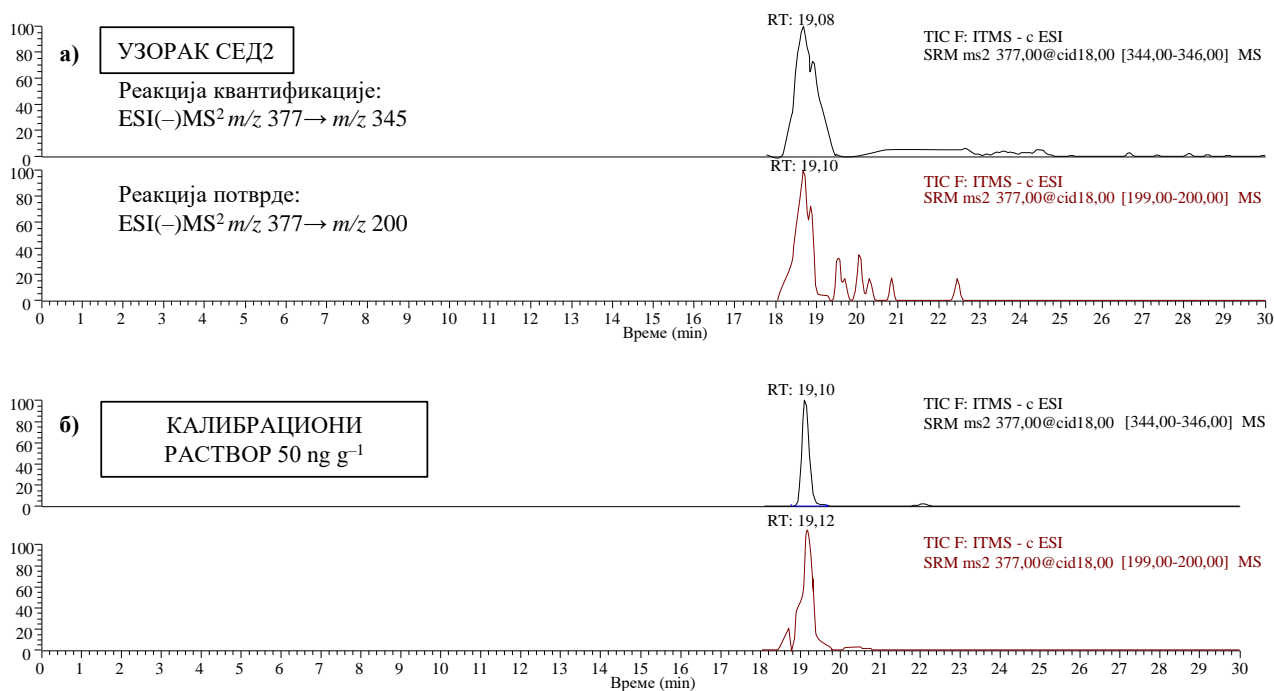


Слика 4.22. Масени хроматограми са потврдом присуства сукралозе: (а) узорка подземне воде из рени бунара поред Саве (ПВ1); (б) одговарајућег калибрационог раствора концентрације 25 ng L<sup>-1</sup>



Слика 4.23. Масени хроматограми са потврдом присуства аспартама: (а) узорка речног седимента из Саве (СЕД4); (б) одговарајућег калибрационог раствора концентрације 250 ng g<sup>-1</sup>

## Резултати и дискусија



Слика 4.24. Масени хроматограми са потврдом присуства неотама: (а) узорка речног седимента из Дунава (СЕД2); (б) одговарајућег калибрационог раствора концентрације 50 ng g<sup>-1</sup>

### 4.9. Процена екотоксиколошког ризика

Екотоксиколошки ризик је израчунат на основу PNEC вредности за слатководне организме и организме који живе у седиментима добијених из NORMAN-ове екотоксиколошке базе података. Резултати процене ризика по живи свет на основу детектованих концентрација вештачких заслађивача приказани су у табелама 4.9–4.11. Утврђено је да концентрације ацесулфаме, цикламата и сукралозе које су забележене у речној и подземној води слива реке Дунав у Републици Србији не представљају ризик ( $RQ < 0,01$ ). Једино концентрација сахарина детектованог у реци Дунав у Београду, након великог испуста непречишћених комуналних отпадних вода (узорак РВ5), може изазвати блаже токсичне ефекте код водених организама (табела 4.9). Наиме, узимајући у обзир  $PNEC_{fw}$  вредност за сахарин ( $35,9 \mu\text{g L}^{-1}$ ) утврђен је низак еколошки ризик ( $0,01 < RQ < 0,1$ ). Процена екотоксиколошког ризика на основу нивоа вештачких заслађивача у узорцима подземних вода показала је да не постоји ризик по живи свет ( $RQ < 0,01$ ). Процењен је и еколошки ризик смеше вештачких заслађивача детектованих у сваком узорку воде, као збир  $RQ$  вредности добијених за појединачне концентрације заслађивача ( $RQ_{\text{смеша вода}}$ , Табела 4.9). Резултати су показали повећан ризик због „коктејл ефекта“ за узорак РВ4 ( $0,014$ , низак ризик) узет из Дунава узводно од великог канализационог канала у Београду. Такође, треба узети у обзир чињеницу да иако детектоване концентрације појединих заслађивача представљају низак ризик по водене организме, постоји могућност повећања екотоксиколошког ризика током летњег периода када при високим дневним температурама и нижим водостајима могу бити забележене веома високе концентрације, што је примећено код већег броја европских река (Loos et al. 2009).

Резултати и дискусија

Табела 4.9. Процена екотоксиколошког ризика за вештачке заслађиваче детектоване у узорцима речне (РВ) и подземне воде (ПВ) у сливу реке Дунав у Републици Србији на основу \*PNEC<sub>fw</sub> вредности из NORMAN-ове екотоксиколошке базе података (NORMAN 2023)

Узорак	Ацесулфам RQ *72,4 µg L <sup>-1</sup>	Сахарин RQ *35,9 µg L <sup>-1</sup>	Цикламат RQ *18,5 µg L <sup>-1</sup>	Сукралоза RQ *29,7 µg L <sup>-1</sup>	RQ <sub>сmeша вода</sub>
<b>Површинска вода</b>					
PB1	0,0009 (без ризика)	0,002 (без ризика)	–	0,004 (без ризика)	0,007 (без ризика)
PB2	0,0008 (без ризика)	0,003 (без ризика)	–	0,005 (без ризика)	0,009 (без ризика)
PB3	0,0005 (без ризика)	0,002 (без ризика)	–	0,005 (без ризика)	0,008 (без ризика)
PB4	0,001 (без ризика)	0,003 (без ризика)	0,007 (без ризика)	0,003 (без ризика)	0,014 <b>(низак ризик)</b>
PB5	0,001 (без ризика)	0,011 <b>(низак ризик)</b>	0,006 (без ризика)	0,007 (без ризика)	0,025 <b>(низак ризик)</b>
PB6	0,0006 (без ризика)	–	–	0,003 (без ризика)	0,004 (без ризика)
PB7	0,0009 (без ризика)	–	–	0,002 (без ризика)	0,003 (без ризика)
PB8	0,0007 (без ризика)	–	–	0,003 (без ризика)	0,004 (без ризика)
PB9	0,0009 (без ризика)	0,003 (без ризика)	–	0,003 (без ризика)	0,007 (без ризика)
PB10	0,0006 (без ризика)	0,002 (без ризика)	–	0,002 (без ризика)	0,005 (без ризика)
PB11	0,001 (без ризика)	–	–	0,002 (без ризика)	0,003 (без ризика)
PB12	0,0007 (без ризика)	0,003 (без ризика)	–	0,002 (без ризика)	0,006 (без ризика)
PB13	0,001 (без ризика)	–	–	0,003 (без ризика)	0,003 (без ризика)
PB14	0,0007 (без ризика)	–	–	0,003 (без ризика)	0,004 (без ризика)
PB15	0,0007 (без ризика)	–	–	0,002 (без ризика)	0,003 (без ризика)
PB16	0,0007 (без ризика)	0,003 (без ризика)	–	0,004 (без ризика)	0,008 (без ризика)
PB17	0,001 (без ризика)	0,003 (без ризика)	–	0,001 (без ризика)	0,005 (без ризика)
<b>Подземна вода</b>					
ПВ1	0,0003 (без ризика)			0,0006 (без ризика)	0,0009 (без ризика)
ПВ2	0,001 (без ризика)			0,0008 (без ризика)	0,002 (без ризика)



Нивои вештачких заслађивача пронађени у пет узорака речних седимената указују на значајну екотоксичност аспартама и неотама при детектованим концентрацијама, односно средњи до висок ризик за бентосне организме (табела 4.10). Концентрације аспартама детектоване у пет седимената слива реке Дунав указују на средњи ризик за организме који живе у седиментима ( $0,1 < RQ < 1$ ), према вредности  $PNEC_{\text{sediment}}$  ( $385 \mu\text{g kg}^{-1}$ ). Међутим, на основу израчунате екотоксичности неотама ( $PNEC_{\text{sediment}} = 20,9 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), утврђен је висок ризик ( $RQ \geq 1$ ) за бентосне организме у концентрацијама забележеним у седиментима Дунава (узорак СЕД1) и Саве (узорак СЕД4). За узорак СЕД2, други анализирани седимент из реке Дунав, одређен је средњи еколошки ризик.

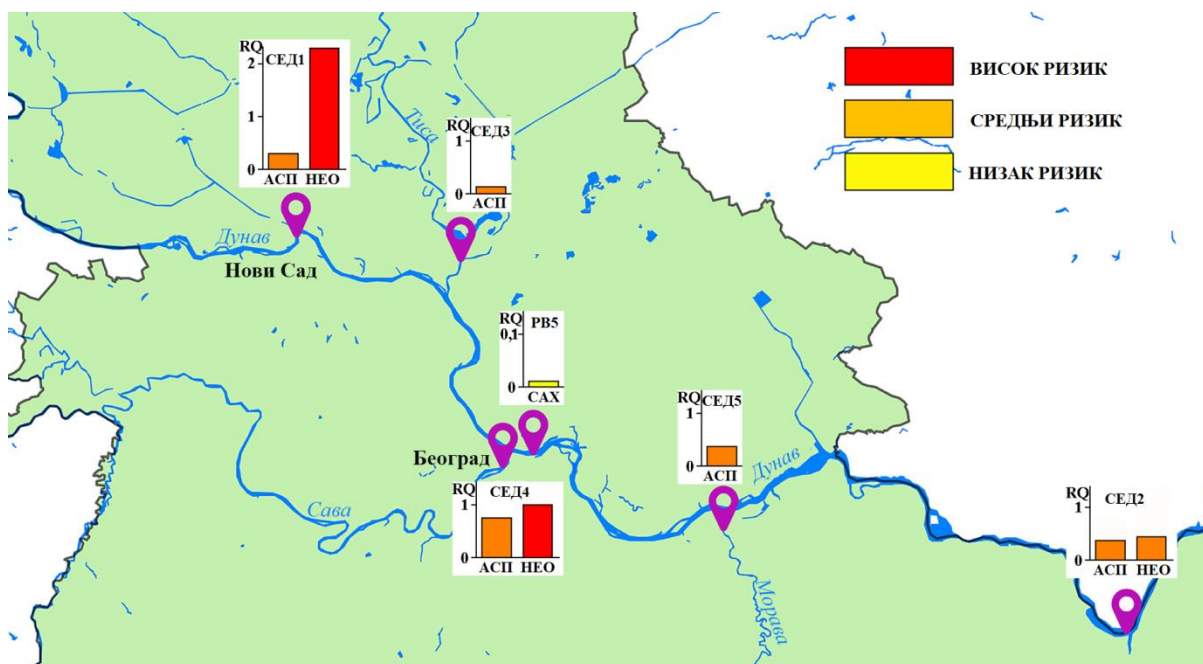
Табела 4.10. Процена екотоксиколошког ризика за вештачке заслађиваче детектоване у узорцима седимената (СЕД) у сливу реке Дунав у Републици Србији на основу  $*PNEC_{\text{sed}}$  вредности из NORMAN-ове екотоксиколошке базе података (NORMAN 2023)

Узорак	Аспартам RQ *385 $\mu\text{g kg}^{-1}$	Неотам RQ *20,9 $\mu\text{g kg}^{-1}$	RQ <sub>сmeша sediment</sub>
СЕД1	0,30 (средњи ризик)	2,30 (висок ризик)	2,60 (висок ризик)
СЕД2	0,36 (средњи ризик)	0,43 (средњи ризик)	0,79 (средњи ризик)
СЕД3	0,12 (средњи ризик)	–	0,12 (средњи ризик)
СЕД4	0,76 (средњи ризик)	1,01 (висок ризик)	1,77 (висок ризик)
СЕД5	0,35 (средњи ризик)	–	0,35 (средњи ризик)

Према процени ризика смеше заслађивача детектованих у сваком узорку седимента, израчунати  $RQ_{\text{сmeша sediment}}$  (табела 4.10, слика 4.25) је потврдио средњи или висок ризик, што указује на потенцијално штетан утицај на живи свет у седиментима. Поред тога, укупан екотоксиколошки ризик на локацијама узорковања ( $RQ_{\text{сmeша suma}}$ , табела 4.11), где су сакупљене и површинске и подземне воде, као и седименти, није значајно повећан због занемарљивог доприноса ризика за водене организме у поређењу са доминантним утицајем ризика за бентосни живи свет.

Табела 4.11. Укупан екотоксиколошки ризик на локалитетима где су сакупљени узорци и речне воде и седимената

Место узорковања	RQ <sub>сmeша sediment</sub>	RQ <sub>сmeша voda</sub>	RQ <sub>сmeша suma</sub>
Дунав (Нови Сад)	СЕД1 2,60	РВ2 0,009	2,61 (висок ризик)
Дунав (Доњи Милановац)	СЕД2 0,79	РВ9 0,007	0,80 (средњи ризик)
Тиса	СЕД3 0,12	РВ14 0,004	0,12 (средњи ризик)
Сава (Београд)	СЕД4 1,77	РВ16 0,008	1,78 (висок ризик)
Морава	СЕД5 0,35	РВ17 0,005	0,36 (средњи ризик)



Слика 4.25. Локалитети у сливу Дунава у Републици Србији са повећаним концентрацијама вештачких заслађивача (сахарина, САХ; аспартама, АСП; неотама, НЕО) у речној води (PB) или седиментима (СЕД) које представљају ризик за водене или бентосне организме

Јасно је да седименти слива реке Дунав изазивају велику забринутост у погледу нивоа детектованих вештачких заслађивача, јер је за сваки од анализираних узорака утврђен висок или средњи ризик за бентосне организме. С обзиром на то да се седименти сматрају главним резервоаром органских загађивача, они могу деловати и као секундарни извор загађења у случају ресуспендовања. Резултати студије су показали да је највећи екотоксиколошки ризик у сливу реке Дунав забележен у два највећа града, Београду и Новом Саду (слика 4.25), који су под великим утицајем непречишћених комуналних отпадних вода због велике насељености. Средњи ризик је утврђен у мањим градовима на Дунаву и његовим притокама - Морави и Тиси. Добијени резултати указују на неопходност унапређења третмана и управљања канализационим водама, као и на потребу укључивања вештачких заслађивача у рутинске мониторинг програме.

## 5. ЗАКЉУЧАК

У овој докторској дисертацији развијена је, оптимизована и валидирана нова селективна и осетљива HPLC–MS/MS метода за истовремену анализу трагова осам вештачких заслађивача у узроцима површинских, подземних и отпадних вода, као и речних седимената. Метода је примењена у анализи великог броја реалних узорака. На основу концентрација детектованих заслађивача, испитиван је утицај испуштања нетретираних комуналних отпадних вода на квалитет воде реке Дунава и њених највећих притока у Републици Србији – Тисе, Саве и Мораве. Извршена је и процена екотоксиколошког ризика за живи свет у води и седиментима, при чему су први пут добијени подаци о распрострањености и еколошком утицају вештачких заслађивача у сливу реке Дунав у Републици Србији. На основу добијених резултата могу се извести следећи закључци:

*О развоју и оптимизацији HPLC–MS/MS методе:*

- ❖ Приликом електроспреј јонизације у негативном режиму рада као прекурсор јони су одабрани депротонирани молекули ( $[M-H]^-$ ), осим у случају сукралозе, када је коришћен адукт са хлором ( $[M+Cl]^-$ ), и стевозида, када је изабран јон добијен губитком једне глукозне јединице  $[M-C_6H_{11}O_5-H]^-$ .
- ❖ За све вештачке заслађиваче одабране су карактеристичне реакције фрагментације за квантитативно одређивање и потврду присуства коришћењем фрагментних јона добијених MS<sup>2</sup> анализом, а у случају сукралозе, аспартама, НХДЦ-а, неотама и стевозида били су могући и виши ступњеви MS анализе.
- ❖ Оптимално хроматографско раздвајање је постигнуто коришћењем C8 реверзно-фазне колоне и мобилне фазе састава дејонизована вода/метанол, уз адитив 0,1 М раствор амонијум-ацетата који је утиче на побољшање изгледа и облика хроматографских пикова и скраћење ретенционог времена анализата.

*О развоју и оптимизацији метода за припрему узорака воде и седимената:*

- ❖ Највећи приноси методе за све вештачке заслађиваче добијени су коришћењем полимерног сорбента Oasis HLB уз подешавање рН вредности узорка воде на 3,0. Ово је посебно важно за ацесулфам, сахарин и цикламат који имају изражена кисела својства, па се снижавањем рН повећавају њихови приноси због формирања неполарних облика.
- ❖ Запремина од 50 mL узорка воде, уз елуирање са сорбента помоћу метанола, обезбеђује највеће приносе за све одабране заслађиваче због њихове високе растворљивости у овом растварачу.
- ❖ За екстракцију свих осам одабраних заслађивача из седимената потребно је користити и метанол и дихлорметан, као појединачне раствараче, уз напомену да се аспартам и НХДЦ екстрахују са мањом ефикасношћу. Остали параметри, као што су маса узорака седимената и време ултразвучне екстракције, одређени су на основу претходног искуства у анализи узорака седимената.

*О валидацији развијених метода:*

- ❖ Добијени су оптимални приноси методе за матрице површинске (68–114%), подземне (70–114%) и отпадне воде (68–105%), са RSD вредностима углавном испод 20%. За екстракцију вештачких заслађивача из седимената постигнути су нижи приноси, посебно у случају аспартама и НХДЦ-а (19% и 43%, респективно), али су били уједначени, са добром поновљивошћу (RSD < 20%).

## Закључак

- ❖ Развијене методе су биле линеарне у испитиваном опсегу концентрација, са коефицијентима корелације у опсегу 0,981–0,998 за матрицу површинских вода, 0,983–0,994 за матрицу подземних вода и 0,957–0,994 за матрицу отпадних вода. За матрицу седимената, коефицијенти корелације су били од 0,973 (за цикламат) до 0,997 (за ацесулфам).
- ❖ Постигнуте су ниске границе детекције и квантификације за површинске ( $1,0\text{--}10,0\text{ ng L}^{-1}$  и  $3,3\text{--}33,3\text{ ng L}^{-1}$ ), подземне ( $0,9\text{--}9,0\text{ ng L}^{-1}$  и  $3,0\text{--}30,0\text{ ng L}^{-1}$ ) и отпадне воде ( $1,9\text{--}28,5\text{ ng L}^{-1}$  и  $6,3\text{--}95,0\text{ ng L}^{-1}$ ). У валидираној методи за седименте, LOD и LOQ вредности за одабране анализе су биле у опсегу  $0,1\text{--}1,4\text{ ng g}^{-1}$ , односно  $0,3\text{--}4,7\text{ ng g}^{-1}$ .
- ❖ Утврђено је да матрица површинских и подземних вода смањује јонизацију већине заслађивача (до 61% и 42% за цикламат), док је појачање сигнала забележено за сукралозу, аспартам и неотам. У комплексној матрици отпадних вода, сви анализи су показали значајну супресију сигнала, чак до 70%. Код седимената, ацесулфам је показао изражену супресију сигнала (56%), а неотам повећање сигнала за 40%, док код осталих заслађивача утицај матрице није био изражен.

### *О загађењу вештачким заслађивачима слива реке Дунав у Републици Србији:*

- ❖ Од осам одабраних вештачких заслађивача, шест је откривено у узорцима из животне средине. НХДЦ и стевиозид нису детектовани ни у једном од испитиваних узорака воде или седимента.
- ❖ На свим испитиваним локалитетима на реци Дунав и њеним притокама Сави, Тиси и Морави пронађени су заслађивачи, чиме је потврђен велики утицај испуштања нетретираних отпадних вода у реке. Ацесулфам и сукралоза су детектовани у свим узорцима воде, што указује на дуготрајно загађење, због њихове велике стабилности у животној средини. Сахарин је детектован у око 60% узорака речне воде, док је цикламат пронађен у само два узорка из Дунава у Београду. Нижа учесталост детекције ова два заслађивача повезана је са њиховом брзом биодеградацијом у животној средини, па се сматрају веома корисним индикаторима свежег канализационог загађења.
- ❖ На основу забележених нивоа стабилних и биоразградивих вештачких заслађивача може се закључити да се најзначајнији континуирани унос комуналних вода у речни екосистем Дунава у Републици Србији одвија у Београду.
- ❖ У подземним водама, ацесулфам и сукралоза су били једини детектовани заслађивачи, што указује на изражену мобилност кроз водоносне слојеве. Одсуство сахарина и цикламата потврђује њихову високу разградљивост која се одиграва током транспорта кроз земљиште. С обзиром на континуално загађење Саве и Дунава нетретираним отпадним водама, може се закључити да постоји значајно канализационо оптерећење на водоизворишта и потенцијални утицај на исправност воде за пиће у Републици Србији.
- ❖ Генерално ниже концентрације ацесулфама и сукралозе, односно сличне концентрације сахарина и цикламата пронађене у воденим матрицама, у поређењу са другим европским земљама, одражавају мањи број становника у истраживаном подручју и разлике у исхрани и количинама заслађивача у прехранбеним производима. Такође, генерално виши нивои заслађивача пронађени у инфлуентима земаља у Европи ефикасно се смањују у третманима и доводе до нижих концентрација у речној води, сличних онима у Републици Србији.

## Закључак

- ❖ Аспартам и неотам су били једини вештачки заслађивачи пронађени у седиментима због високог афинитета да се адсорбују на честице у систему вода/седимент. Према доступној научној литератури, постоји само неколико студија које се баве праћењем заслађивача у речним седиментима, а ово је први пут да су аспартам и неотам детектовани у овој матрици.
- ❖ У погледу процене екотоксиколошког утицаја детектованих заслађивача на водени екосистем, једино је при забележеним нивоима сахараина утврђен низак ризик за слатководне организме. Међутим, еколошки ризик смеше вештачких заслађивача детектованих у сваком узорку воде указује на повећање ризика због „коктел ефекта“. С друге стране, концентрације аспартама и неотама, забележене у седиментима, су указале на значајну екотоксичност, односно средњи до висок ризик за бентосне организме.
- ❖ Резултати представљени у овој дисертацији су јасно показали да је испуштање непречишћених отпадних вода у два највећа, густо насељена града - Београду и Новом Саду, главни извор контаминације вештачким заслађивачима у сливу реке Дунав у Републици Србији, што упућује на неопходност увођења третмана комуналних отпадних вода и редовног праћења заслађивача у животној средини.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Aalizadeh, R., von der Ohe, P.C., Thomaidis, N.S., Prediction of acute toxicity of emerging contaminants on the water flea *Daphnia magna* by ant colony optimization–support vector machine QSTR models, *Environ. Sci. Proc. Imp.* 19 (2017) 438–448.
2. Al-Khazrajy O.S.A., Boxall, A.B.A., Determination of pharmaceuticals in freshwater sediments using ultrasonic-assisted extraction with SPE clean-up and HPLC-DAD or LC-ESI-MS/MS detection, *Anal. Methods* 9 (2017) 4190.
3. Alves, P.C.C., Rodrigues-Silva, C., Ribeiro, A.R., Rath, S., Removal of low-calorie sweeteners at five Brazilian wastewater treatment plants and their occurrence in surface water, *J. Environ. Manage.* 289 (2021) 112561.
4. Amy-Sagers, C., Reinhardt, K., Larson, D.M., Ecotoxicological assessments show sucralose and fluoxetine affect the aquatic plant, *Lemna minor*, *Aquat. Toxicol.* 185 (2017) 76–85.
5. Andrade-Eiroa, A., Canle, M., Leroy-Cancellieri, M., Cerdà, V., Trends in analytical chemistry – Solid-phase extraction of organic compounds: a critical review (Part I), *Trends Anal. Chem.* 80 (2016) 641–654.
6. Annesley, T.M., Ion suppression in mass spectrometry, *Clin. Chem.* 49 (2003) 1041–1044.
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 chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1393 (2015) 106–114.
8. Ardrey, E., Liquid chromatography–mass spectrometry: An introduction, John Wiley & Sons, Chichester, Engleska, 2003.
9. Badawy, M.E.I., El-Nouby, M.A.M., Kimani, P.K., Lim, L.W., Rabea, E.I., A review of the modern principles and applications of solid-phase extraction techniques in chromatographic analysis, *Anal. Sci.* 38 (2022) 1457–1487.
10. Baena-Nogueras, R.M., Traverso-Soto J.M., Biel-Maeso, M., Villar-Navarro, E., Lara-Martín, P.A., Sources and trends of artificial sweeteners in coastal waters in the bay of Cadiz, *Mar. Pollut. Bull.* 135 (2018) 607–616.
11. Batchu, S.R., Quinete, N., Panditi, V.R., Gardinali, P.R., Online solid phase extraction liquid chromatography tandem mass spectrometry (SPE–LC–MS/MS) method for the determination of sucralose in reclaimed and drinking waters and its photo degradation in natural waters from South Florida, *Chem. Cent. J.* 7 (2013) 141.
12. Benfenati, E., Cools, E., Fattore, E., Fanelli, P., A GC-MS method for the analysis of fecal and plant sterols in sediment samples, *Chemosphere* 29 (1994) 1393–1405.
13. Bergheim, M., Gminski, R., Spangenberg, B., Debiak, M., Bürkle, A., Mersch-Sundermann, V., Kümmerer, K., Gieré, R., Antibiotics and sweeteners in the aquatic environment: biodegradability, formation of phototransformation products, and in vitro toxicity, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22 (2015) 18017–18030.
14. Bernot, M.J., Becker, J.C., Doll, J., Lauer, T.E., A national reconnaissance of trace organic compounds (TOCs) in United States lotic ecosystems, *Sci. Total Environ.* 572 (2016) 422–433.
15. Berset, J.-D., Ochsenbein, N., Stability considerations of aspartame in the direct analysis of artificial sweeteners in water samples using high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry (HPLC–MS/MS), *Chemosphere* 88 (2012) 563–569.
16. Biel-Maeso, M., Burke, V., Greskowiak, J., Massmann, G., Lara-Martín, P.A., Corada-Fernández, C., Mobility of contaminants of emerging concern in soil column experiments, *Sci. Total Environ.* 762 (2021) 144102.
17. Braune, A., Engst, W., Blaut, M., Degradation of neohesperidin dihydrochalcone by human intestinal bacteria, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 1782–1790.

18. Brumovský, M., Bečanova, J., Sanka, O., Løken, K.B., Baho, D.L., Sørensen, K., Nizzetto, L., Line ferries and cargo ships for the monitoring of marine contaminants of emerging concern: Application along a Europe-Arctic transect, *J. Hazard. Mater.* 424 (2022) 127232.
19. Buerge, I.J., Buser, H.-R., Kahle, M., Müller, M.D., Poiger, T., Ubiquitous occurrence of the artificial sweetener acesulfame in the aquatic environment: An ideal chemical marker of domestic wastewater in groundwater, *Environ. Sci. Technol.* 43 (2009) 4381–4385.
20. Buerge, I.J., Keller, M., Buser, H.-R., Müller, M.D., Poiger, T., Saccharin and other artificial sweeteners in soils: Estimated inputs from agriculture and households, degradation, and leaching to groundwater, *Environ. Sci. Technol.* 45 (2011) 615–621.
21. Cárdenas-Soracá, D.M., Singh, V., Nazdrajić, E., Vasiljević, T., Grandy, J.J., Pawliszyn, J., Development of thin-film solid-phase microextraction coating and method for determination of artificial sweeteners in surface waters, *Talanta* 211 (2020) 120714.
22. Carocho, M., Morales, P., Ferreira, I.C.F.R., Sweeteners as food additives in the XXI century: A review of what is known, and what is to come, *Food Chem. Toxicol.* 107 (2017) 302–317.
23. Castronovo, S., Wick, A., Scheurer, M., Nödler, K., Schulz, M., Terens, T.A., Biodegradation of the artificial sweetener acesulfame in biological wastewater treatment and sandfilters, *Water Res.* 110 (2017) 342–353.
24. Chattopadhyay, S., Raychaudhuri, U., Chakraborty, R., Artificial sweeteners – a review, *J. Food Sci. Technol.* 51 (2014) 611–621.
25. Ciriminna, R., Meneguzzo, F., Pecoraino, M., Pagliaro, M., A bioeconomy perspective for natural sweetener Stevia, *Biofuels, Bioprod. Bioref.* 13 (2019) 445–452.
26. Clarke, B.O., Anumol, T., Barlaz, M., Snyder, S.A., Investigating landfill leachate as a source of trace organic pollutants, *Chemosphere* 127 (2015) 269–275.
27. Cody, R.B., Electrospray ionization mass spectrometry: history, theory, and instrumentation. In: Pramanik, B.N., Ganguly, A.K., Gross, M.L. (Eds.), *Applied electrospray mass spectrometry*, Marcel Dekker, New York, SAD, 2002, 1–104.
28. de Sousa, D.N.R., Grosseli, G.M., Mozeto, A.A., Carneiro, R.L., Fadini, P.S., Ultrasound-assisted extraction method for the simultaneous determination of emerging contaminants in freshwater sediments, *J. Sep. Sci.* 38 (2015) 3454–3460.
29. Dean, J.R., *Methods for environmental trace analysis*. John Wiley & Sons, Chichester, Engleska, 2003.
30. Dimkić, A.M., *Samoprečišćavajući efekti podzemnih voda*, Zadužbina Andrejević, Beograd, Srbija, 2007.
31. Douglas, D.J., Frank, A.J., Mao, D., Linear ion traps in mass spectrometry, *Mass Spectrom. Rev.* 24 (2005) 1–29.
32. EC, 2003. European Commission, Technical guidance document on risk assessment, part II. Доступно на: [https://echa.europa.eu/documents/10162/987906/tgdpart2\\_2ed\\_en.pdf](https://echa.europa.eu/documents/10162/987906/tgdpart2_2ed_en.pdf) (последњи приступ 14. септембар 2023).
33. Ens, W., Senner, F., Gygax, B., Schlotterbeck, G., Development, validation and application of a novel LC-MS/MS trace analysis method for the simultaneous quantification of seven iodinated X-ray contrast media and three artificial sweeteners in surface, ground, and drinking water, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 2789–2798.
34. Ferreira, C., Gómez-Motos, I., Lombraña, J.H., de Luis, A., Villota, N., Rs, O., Etxebarria, N., Contaminants of emerging concern removal in an effluent of wastewater treatment plant under biological and continuous mode ultrafiltration treatment, *Sustainability* 12 (2020) 725.
35. Ferrer, I., Thurman, E.M., Analysis of sucralose and other sweeteners in water and beverage samples by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 4127–4134.

36. FSSAI, 2023. Доступно на: [https://fssai.gov.in/upload/uploadfiles/files/Training\\_Manual\\_Veterinary\\_Drug\\_Residues\\_24\\_04\\_2018.pdf](https://fssai.gov.in/upload/uploadfiles/files/Training_Manual_Veterinary_Drug_Residues_24_04_2018.pdf) (последњи приступ 14. септембар 2023).
37. Fu, K., Wang, L., Wei, C., Li, J., Zhang, J., Zhou, Z., Liang, Y., Sucralose and acesulfame as an indicator of domestic wastewater contamination in Wuhan surface water, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 189 (2020) 109980.
38. Furey, A., Moriarty, M., Bane, V., Kinsella, B., Lehane, M., Ion suppression; A critical review on causes, evaluation, prevention and applications, *Talanta* 115 (2013) 104–122.
39. Gan, Z., Sun, H., Feng, B., Wang, R., Zhang, Y., Occurrence of seven artificial sweeteners in the aquatic environment and precipitation of Tianjin, China, *Water Res.* 47 (2013) 4928–4037.
40. Gan, Z., Sun, H., Yao, Y., Zhao, Y., Li, Y., Zhang, Y., Hu, H., Wang, R., Distribution of artificial sweeteners in dust and soil in China and their seasonal variations in the environment of Tianjin, *Sci. Total Environ.* 488–489 (2014) 168–175.
41. Gika, H., Kaklamanos, G., Manesiotis, P., Theodoridis, G., Chromatography: high-performance liquid chromatography. In: Caballero, B., Finglas, P.M., Toldrá, F. (Eds.), *Encyclopedia of Food and Health*, Academic Press, Cambridge, Massachusetts, SAD, 2016, 93–99.
42. González, C., Tapia, M., Pérez, E., Pallet, D., Dornier, M., Main properties of steviol glycosides and their potential in the food industry: a review, *Fruits* 69 (2014) 127–141.
43. Gosetti, F., Mazzucco, E., Zampirei, D., Gennaro, M.C., Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 3929–3937.
44. Gosset, A., Polomé, P., Perrodin, Y., Ecotoxicological risk assessment of micropollutants from treated urban wastewater effluents for watercourses at a territorial scale: Application and comparison of two approaches, *Int. J. Hyg. Environ.* 224 (2020) 113437.
45. Gu, W., Rebsdorf, A., Anker, C., Gregersen, S., Hermansen, K., Geuns, J.M.C., Jeppesen, P.B., Steviol glucuronide, a metabolite of steviol glycosides, potently stimulates insulin secretion from isolated mouse islets: Studies in vitro, *Endocrinol. Diabetes Metab.* 2 (2019) e00093.
46. Gui, J.Y., Sun, W., Zhang, C.-L., Zhang, Y.-T., Zhang, L., Liu, F., An innovative approach to sensitive artificial sweeteners analysis by ion chromatography-triple quadrupole mass spectrometry, *Chinese J. Anal. Chem.* 44 (2016) 361–366.
47. Guo, W., Li, J., Liu, Q., Shi, J., Gao, Y., Tracking the fate of artificial sweeteners within the coastal waters of Shenzhen city, China: From wastewater treatment plants to sea, *J. Hazard. Mater.* 414 (2021) 125498.
48. Hajj-Mohamad, M., Aboufadel, H., Darwano, H., Madoux-Humery, A.-S., Guérineau, H., Sauvé, S., Prévost, M., Dorner, S., Wastewater micropollutants as tracers of sewage contamination: analysis of combined sewer overflows and stream sediments, *Environ. Sci. Proc. Imp.* 16 (2014) 2442–2450.
49. Harpaz, D., Yeo, L.P., Cecchini, F., Koon, T.H.P., Kushmaro, A., Tok, A.I.Y., Marks, R.S., Eltzov, E., Measuring artificial sweeteners toxicity using a bioluminescent bacterial panel, *Molecules* 23 (2018) 2454.
50. Hjorth, M., Hansen J.H., Camus, L., Short-term effects of sucralose on *Calanus finmarchicus* and *Calanus glacialis* in Disko Bay, Greenland, *J. Chem. Ecol.* 26 (2010) 385–393.
51. Hoffmann, E., Stroobant, V., *Mass spectrometry: Principles and applications*, John Wiley & Sons, Chichester, Engleska, 2007.
52. ICPDR, 2023. International Commission for the protection of the Danube River, Danube Basin. Доступно на: <http://icpdr.org/main/danube-basin> (последњи приступ 14. септембар 2023).



53. Jasim, N.A., The design for wastewater treatment plant (WWTP) with GPS X modelling, *Cogent Eng.* 7 (2020) 1723782.
54. Kessler, R., Water treatment: Sweeteners persist in waterways, *Environ. Health Perspect.* 117 (2009) A438.
55. Kobetičová, K., Mocová, K.A., Mrhálková, L., Fryčová, Z., Kočí, V., Artificial sweeteners and the environment, *Czech J. Food Sci.* 34 (2016) 149–153.
56. Kobetičová, K., Mocová, K.A., Mrhálková, L., Petrová, Š., Effects of artificial sweeteners on *Lemna minor*, *Czech J. Food Sci.* 36 (2018) 386–391.
57. 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 (2012) 3057–3070.
58. Kokotou, M.G., Thomaidis, N.S., Determination of eight artificial sweeteners in wastewater by hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Anal. Methods* 5 (2013) 3825–3833.
59. Kondor, A.C., Molnár, E., Jakab, G., Vancsik, A., Filep, T., Szeberényi, J., Szabó, L., Maász, G., Pirger, Z., Weiperth, A., Ferincz, Á., Staszny, Á., Dobosy, P., Horváthné Kiss, K., Hatvani, I.G., Szalai, Z., Pharmaceuticals in water and sediment of small streams under the pressure of urbanization: Concentrations, interactions, and risks, *Sci. Total Environ.* 909 (2022) 152160.
60. Kostianen, R., Kauppila, T.J., Effect of eluent on the ionization process in liquid chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 685–699.
61. Kroger, M., Meister, K., Kava, R., Low-calorie sweeteners and other sugar substitutes: A review of the safety issues, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 5 (2006) 35–47.
62. Li, D., Yao, Y., Sun, H., Emission and mass load of artificial sweeteners from a pig farm to its surrounding environment: Contribution of airborne pathway and biomonitoring potential, *Environ. Sci. Technol.* 55 (2021a) 2307–2315.
63. Li, D., Yao, Y., Sun, H., Wang, Y., Pu, J., Calderón, R., Alder, A.C., Kannan, K., Artificial sweeteners in pig feed: A worldwide survey and case study in pig farms in Tianjin, China, *Environ. Sci. Technol.* 54 (2020) 4059–4067.
64. Li, D., Zheng, Q., Wang, Z., Ren, Y., Thomas, K.V., Thai, P.K., Young population consume twice as much artificial sweetener than the general population – A wastewater-based assessment in China, *Sci. Total Environ.* 839 (2022) 156200.
65. Li, Z., Yu, B., Cong, H., Yuan, H., Peng, Q., Recent development and application of solid phase extraction materials, *Red. Adv. Mater. Sci.* 48 (2017) 87–111.
66. Li, Z., Yu, X., Yu, F., Huang, X., Occurrence, sources and fate of pharmaceuticals and personal care products and artificial sweeteners in groundwater, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 28 (2021b) 20903–20920.
67. Lim, F.Y., Ong, S.L., Hu, J., Recent advances in the use of chemical markers for tracing wastewater contamination in aquatic environment: A review, *Water* 9 (2017) 143.
68. Liu, Y., Huc, H., Wang, Y., Wang, L., Feng, Y., Effects of heavy metals released from sediment accelerated by artificial sweeteners and humic acid on a green algae *Scenedesmus obliquus*, *Sci. Total Environ.* 729 (2020) 138960.
69. Liu, Y., Ptacek, C.J., Groza, L.G., Staples, R., Blowes, D.W., Occurrence and distribution of emerging contaminants in mine-impacted lake water and potential use as co-tracers of anthropogenic activity in the subarctic region, Northwest Territories, Canada, *Environ. Res.* 207 (2022) 112034.
70. Lobete, M.M., Baka, M., Noriega, E., Jookan, E., Monballiu, A., Beurme, S., Meesschaert, B., Van Impe, J., Stevia-based sweeteners as a promising alternative to table sugar: The effect on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* growth dynamics, *Int. J. Food Microbiol.* 245 (2017) 38–52.

71. Loos, R., Gawlik, B.M., Boettcher, K., Locoro, G., Contini, S., Bidoglio, G., Sucralose screening in European surface waters using a solid-phase extraction–liquid chromatography–triple quadrupole mass spectrometry method, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 1126–1131.
72. Lopez de Alda, M.J., Díaz-Cruz, S., Petrovic, M., Barceló, D., Liquid chromatography–(tandem) mass spectrometry of selected emerging pollutants (steroid sex hormones, drugs and alkylphenolic surfactants) in the aquatic environment, *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 503–526.
73. Luo, J., Wu, L., Zhang, Q., Wu, Y., Fang, F., Feng, Q., Li, C., Xue, Z., Cao, J., Review on the determination and distribution patterns of a widespread contaminant artificial sweetener in the environment, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 26 (2019b) 19078–19096.
74. Luo, J., Zhang, Q., Cao, M., Wu, L., Cao, J., Fang, F., Li, C., Xue, Z., Feng, Q., Ecotoxicity and environmental fates of newly recognized contaminants-artificial sweeteners: A review, *Sci. Total Environ.* 653 (2019a) 1149–1160.
75. Ma, L., Liu, Y., Xu, J., Sun, H., Chen, H., Yao, Y., Zhang, P., Shen, F., Alder A.C., Mass loading of typical artificial sweeteners in a pig farm and their dissipation and uptake by plants in neighboring farmland, *Sci. Total Environ.* 605–606 (2017) 735–744.
76. Mănoiu, V.-M., Crăciun, A.-I., Danube River water quality trends: A qualitative review based on the open access web of science database. *Ecohydrol. Hydrobiol.* 21 (2021) 613–628.
77. Maranata, G.J., Surya, N.O., Hasanah, A.N., Optimising factors affecting solid phase extraction performances of molecular imprinted polymer as recent sample preparation technique, *Heliyon* 7 (2021) e05934.
78. Matic Bujagic, I., Grujic, S., Laušević, M., Hofmann, T., Micić, V., Emerging contaminants in sediment core from the Iron Gate I Reservoir on the Danube River, *Sci. Total Environ.* 662 (2019) 77–87.
79. Matic, I., Grujic, S., Jauković, Z., Laušević, M., Trace analysis of selected hormones and sterols in river sediments by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization–tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1364 (2014) 117–127.
80. Mawhinney, D.B., Young, R.B., Vanderford, B.J., Borch, T., Snyder, S.A., Artificial sweetener sucralose in US drinking water systems, *Environ. Sci. Technol.* 45 (2011) 8716–8722.
81. Mayer, V.R., Practical high-performance liquid chromatography, John Wiley & Sons, West Sussex, Engleska, 2004.
82. Mead, R., Morgan, J., Avery, G., Kieber, R., Kirk, A., Skrabal, S., Willey, J., Occurrence of the artificial sweetener sucralose in coastal and marine waters of the United States, *Environ. Sci. Technol.* 116 (2009) 13–17.
83. Microsaic, 2023. Доступно на: <https://www.microsaic.com/news/straight-to-the-source-esi-vs-apci> (последњи приступ 14. септембар 2023).
84. Mijangos, L., Ziarrusta, H., Ros, O., Kortazar, L., Fernández, L.A., Olivares, M., Olatz Zuloaga, O., Prieto, A., Etxebarria, N., Occurrence of emerging pollutants in estuaries of the Basque Country: Analysis of sources and distribution, and assessment of the environmental risk, *Water Res.* 147 (2018) 152–163.
85. Minten, J., Adolfsson-Erici, M., Bjorlenius, B., Alsberg, T., A method for the analysis of sucralose with electrospray LC/MS in recipient waters and in sewage effluent subjected to tertiary treatment technologies, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 91 (2011) 357–366.
86. Mitra, S., Sample preparation techniques in analytical chemistry, John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, SAD, 2003.

87. Moldovan, Z., Marincas, O., Povar, I., Lupascu, T., Longree, P., Simović Rota, J., Singer, H., Alder, A.C., Environmental exposure of anthropogenic micropollutants in the Prut River at the Romanian-Moldavian border: a snapshot in the lower Danube river basin, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25 (2018) 31040–31050.
88. Montoro, P., Molfetta, I., Maldini, M., Ceccarini, L., Piacente, S., Pizza, C., Macchia, M., Determination of six steviol glycosides of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) from different geographical origin by LC–ESI–MS/MS, *Food Chem.* 141 (2013) 745–753.
89. Mora, M.R., Dando, R., The sensory properties and metabolic impact of natural and synthetic sweeteners, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 20 (2021) 1554–1583.
90. Mortensen, A., Sweeteners permitted in the European Union: safety aspects, *Scand. J. Food Nutr.* 50 (2006) 104–116.
91. Musolff, A., Leschik, S., Möder, M., Strauch, G., Reinstorf, F., Schirmer, M., Temporal and spatial patterns of micropollutants in urban receiving waters, *Environ. Pollut.* 157 (2009) 3069–3077.
92. Nagy-Kovács, Z., László, B., Fleit, E., Czihat-Mártonné, K., Till, G., Börnick, H., Adomat, Y., Grischek, T., Behavior of organic micropollutants during river bank filtration in Budapest, Hungary, *Water* 10 (2018) 1861.
93. Naik, A.Q., Zafar, T., Shrivastava, V.K., Environmental impact of the presence, distribution, and use of artificial sweeteners as emerging sources of pollution, *J. Environ. Public Health* 2021 (2021) 6624569.
94. Neset, T.S., Singer, H., Longrée, P., Bader, H., Scheidegger, R., Wittmer, A., Clas, J., Andersson, M., Understanding consumption-related sucralose emissions – A conceptual approach combining substance-flow analysis with sampling analysis, *Sci. Total Environ.* 408 (2010) 3261–3269.
95. Niessen, W.M.A., *Liquid chromatography–mass spectrometry*, Taylor & Francis, New York, SAD, 2006.
96. Nofre, C., Tinti, J.-M., Neotame: discovery, properties, utility, *Food Chem.* 69 (2000) 245–257.
97. NORMAN, 2023. Network of reference laboratories, research centers and related organizations for monitoring emerging environmental substances, Norman Ecotoxicology Database. Доступно на: <https://www.norman-network.com/nds/ecotox/> (последњи приступ 14. септембар 2023).
98. O'Brien Nabors, L., *Alternative sweeteners*, third ed., Marcel Dekker, New York, 2001.
99. Oppenheimer, J., Eaton, A., Badruzzaman, M., Haghani, A.W., Jacangelo, J.G., Occurrence and suitability of sucralose as an indicator compound of wastewater loading to surface waters in urbanized regions, *Water Res.* 45 (2011) 4019–4027.
100. Ordóñez, E.Y., Quintana, J.B., Rodil, R., Cela, R., Determination of artificial sweeteners in water samples by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1256 (2012) 197–205.
101. Ordóñez, E.Y., Quintana, J.B., Rodil, R., Cela, R., Determination of artificial sweeteners in sewage sludge samples using pressurised liquid extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1320 (2013) 10–16.
102. Park, J.H., Carvalho, G.B., Murphy, K.R., Ehrlich, M.R., Ja, W.W., Sucralose suppresses food intake. *Cell Metabol.* 25 (2017) 484–485.
103. Pepino, M.Y., Metabolic effects of non-nutritive sweeteners, *Physiol. Behav.* 152 (2015) 450–455.
104. Periche, A., Castelló, M.L., Heredia, A., Escriche, I., Influence of drying method on steviol glycosides and antioxidants in *Stevia rebaudiana* leaves, *Food Chem.* 172 (2015) 1–6.
105. Perkola, N., Sainio, P., Quantification of four artificial sweeteners in Finnish surface waters with isotope-dilution mass spectrometry, *Environ. Pollut.* 184 (2014) 391–396.

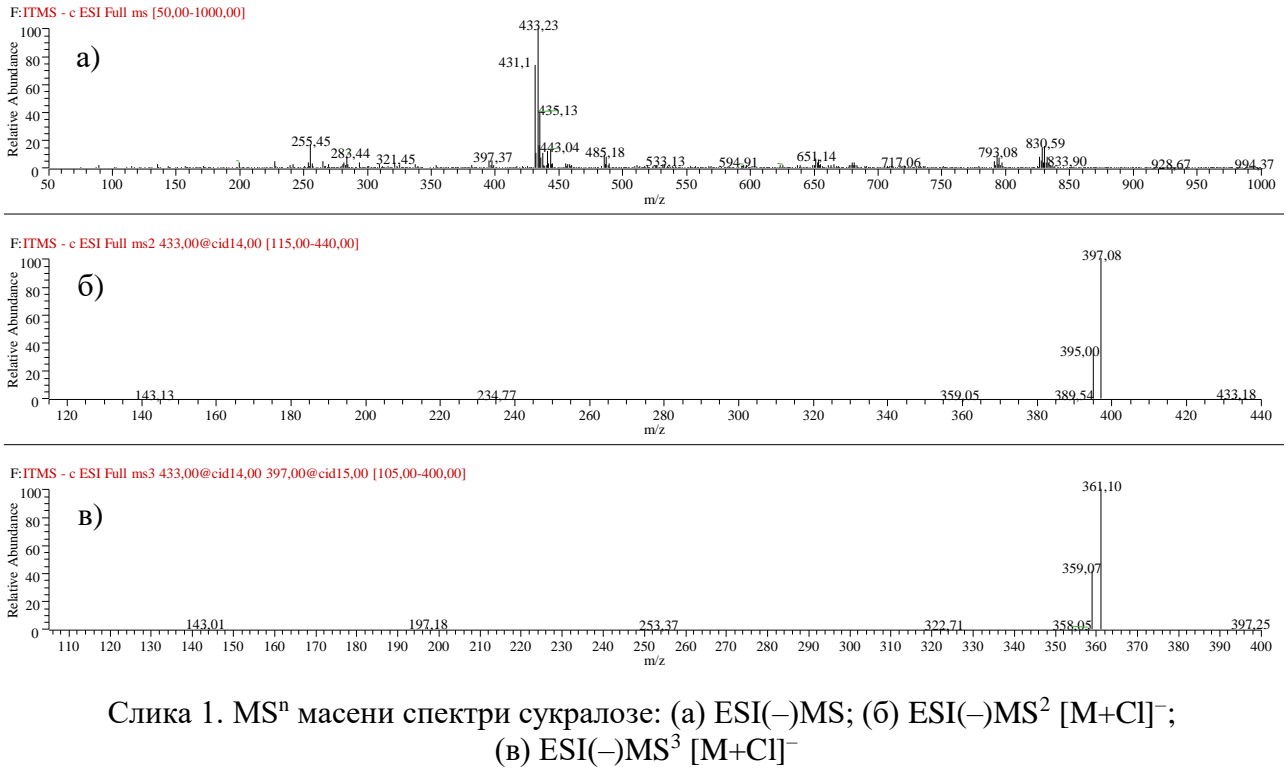
106. Perkola, N., Vaalgamaa, S., Jernberg, J., Vähätalo, A.V., Degradation of artificial sweeteners via direct and indirect photochemical reactions, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23 (2016) 13288–13297.
107. Praveena, S.M., Cheema, M.S., Guo, H.-R., Non-nutritive artificial sweeteners as an emerging contaminant in environment: A global review and risks perspectives, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 170 (2019) 699–707.
108. Правилник о квалитету хране за животиње, 2017, *Службени гласник Републике Србије* бр. 4/2010 и 113/2012, 27/2014, 25/2015, 39/2016 и 54/2017.
109. Правилник о прехранбеним адитивима, 2018, *Службени гласник Републике Србије* бр. 53/2018.
110. Regulation 1129/2011, Commission Regulation (EU) No 1129/2011 of 11 November 2011 amending Annex II to Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council by establishing a Union list of food additives, *Off. J. Eur. Union* L295 (2011) 1–177.
111. Regulation 1131/2011, Commission Regulation (EU) No 1131/2011 of 11 November 2011 amending Annex II to Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council with regard to steviol glycosides, *Off. J. Eur. Union* L295 (2011) 205–211.
112. Regulation 1333/2008, Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on food additives, *Off. J. Eur. Union* L354 (2008) 16–33.
113. Ren, Y., Geng, J., Li, F., Ren, H., Ding, L., Xu, K., The oxidative stress in the liver of *Carassius auratus* exposed to acesulfame and its UV irradiance products, *Sci. Total Environ.* 571 (2016) 755–762.
114. Renwick, A.G., The metabolism of intense sweeteners, *Xenobiotica* 16 (1986) 1057–1071.
115. Ribbers, K., Breuer, L., Düring, R.-A., Detection of artificial sweeteners and iodinated X-ray contrast media in wastewater via LC–MS/MS and their potential use as anthropogenic tracers in flowing waters, *Chemosphere* 218 (2019) 189–196.
116. Roberts, A., Renwick, A.G., Sims, J., Snodin, D.J., Sucralose metabolism and pharmacokinetics in man, *Food Chem. Toxicol.* 38 (2000) 31–41.
117. Roberts, T., Hustson, W., Philip, W., Lee, P., Plimmer, J., Metabolic pathways of agrochemicals, Part 1: Herbicides and plant growth regulators, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, Engleska, 1998.
118. Robertson, W.D., Van Stempvoort, D.R., Solomon, D.K., Homewood, J., Brown, S.J., Spoelstra, J., Schiff, S.L., Persistence of artificial sweeteners in a 15-year-old septic system plume, *J. Hydrol.* 477 (2013) 43–54.
119. Robertson, W.D., Van Stempvoort, D.R., Spoelstra, J., Brown, S.J., Schiff, S.J., Degradation of sucralose in groundwater and implications for age dating contaminated groundwater, *Water Res.* 88 (2016) 653–660.
120. Roy, J.W., Van Stempvoort, D.R., Bickerton, G., Artificial sweeteners as potential tracers of municipal landfill leachate, *Environ. Pollut.* 184 (2014) 89–93.
121. Ruff, M., Mueller, M.S., Loos, M., Singer, H.P., Quantitative target and systematic non-target analysis of polar organic micro-pollutants along the river Rhine using high-resolution mass-spectrometry – Identification of unknown sources and compounds, *Water Res.* 87 (2015) 145–154.
122. Rychen, G., Aquilina, G., Azimonti, G., Bampidis, V., de Lourdes Bastos, M., Bories, G., Cocconcelli, P.S., Flachowsky, G., Gropp, J., Kolar, B., Kouba, M., López-Alonso, M., López Puente, S., Mantovani, A., Mayo, B., Ramos, F., Saarela, M., Villa, R.E., Robert John Wallace, R.J., Wester, P., Brantom, P., Dusemund, B., Van Beelen, P., Westendorf, J., Gregoretto, L., Manini, P., Chesson, A., Safety and efficacy of sodium saccharin when used as a feed flavour for piglets, pigs for fattening, calves for rearing and calves for fattening, *EFSA Journal* 16 (2018) 5208.

123. Sang, Z., Jiang, Y., Tsoi, Y.-K., Leung, K.S.-Y., Evaluating the environmental impact of artificial sweeteners: A study of their distributions, photodegradation and toxicities, *Water Res.* 52 (2014) 260–274.
124. Sardesai, V.M., Waldshan, T.H. Natural and synthetic intense sweeteners, *J. Nutr. Biochem.* 2 (1991) 236–244.
125. Saucedo-Vence, K., Elizalde-Velázquez, A., Dublán-García, O., Galar-Martínez, M., Islas-Flores, H., SanJuan-Reyes, N., García-Medina, S., Hernández-Navarro, M.D., Gómez-Oliván, L.M., Toxicological hazard induced by sucralose to environmentally relevant concentrations in common carp (*Cyprinus carpio*), *Sci. Total Environ.* 575 (2017) 347–357.
126. Scheurer, M., Brauch, H.-J., Lange, F.T., Analysis and occurrence of seven artificial sweeteners in German waste water and surface water and in soil aquifer treatment (SAT), *Anal. Bioanal. Chem.* 394 (2009) 1585–1594.
127. Schleicher, S., Lottje, I.-R., Mischnick, P., Impact of instrumental settings in electrospray ionization ion trap mass spectrometry on the analysis of multi-CH<sub>3</sub>-/CD<sub>3</sub>-isotopologs in cellulose ether analysis: a quantitative evaluation, *Anal. Bioanal. Chem.* 414 (2022) 1279–1296.
128. Shankar, P., Ahuja, S., Sriram, K., Non-nutritive sweeteners: review and update, *Nutrition* 29 (2013) 1293–1299.
129. Sharma, B.M., Bečanová, J., Scheringer, M., Sharma, A., Bharat, G.K., Whitehead, P.G., Klánová, J., Nizzetto, L., Health and ecological risk assessment of emerging contaminants (pharmaceuticals, personal care products, and artificial sweeteners) in surface and groundwater (drinking water) in the Ganges River Basin, India, *Sci. Total Environ.* 646 (2019) 1459–1467.
130. Soh, L., Connors, K.A., Brooks, B.W., Zimmerman, J., Fate of sucralose through environmental and water treatment processes and impact on plant indicator species, *Environ. Sci. Technol.* 45 (2011) 1363–1369.
131. Söregård, M., Campos-Pereira, H., Ullberg, M., Lai, F.J., Golovko, O., Ahrens, L., Mass loads, source apportionment, and risk estimation of organic micropollutants from hospital and municipal wastewater in recipient catchments, *Chemosphere* 234 (2019) 931–941.
132. Spoelstra, J., Schiff, S.L., Brown, S.J., Septic systems contribute artificial sweeteners to streams through groundwater, *J. Hydrol. X* 7 (2020) 100050.
133. Stagl, J.C., Hattermann, F.F., Impacts of climate change on riverine ecosystems: alterations of ecologically relevant flow dynamics in the Danube River and its major tributaries, *Water* 8 (2016) 566.
134. Stolte, S., Steudte, S., Schebb, N.H., Wilenberg, I., Stepnowski, P., Ecotoxicity of artificial sweeteners and stevioside, *Environ. Int.* 60 (2013) 123–127.
135. Subedi, B., Kannan, K., Fate of artificial sweeteners in wastewater treatment plants in New York State, USA, *Environ. Sci. Technol.* 48 (2014) 13668–13674.
136. Suez, J., Korem, T., Zeevil, D., Zilberman-Schapira, G., Thaïss, C.A., Maza, O., Israeli, D., Zmora, N., Gilad, S., Weinberger, A., Kuperman, Y., Harmelin, A., Kolodkin-Gal, I., Shapiro, H., Halpern, Z., Segal, E., Elinav, E., Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota, *Nature* 514 (2014) 181–186.
137. Swithers, S.E., Artificial sweeteners produce the counterintuitive effect of inducing metabolic derangements, *Trend Endocrinol. Metab.* 24 (2013) 432–441.
138. Syahir, A., Sulaiman, S., Mel, M., Othman, M., Sulaiman, S.Z., An overview: Analysis of ultrasonic-assisted extraction's parameters and its process, *Mater. Sci. Eng.* 778 (2020) 012165.
139. Sylvestsky, A.C., Bauman, V., Blau, J.E., Garraffo, H.M., Walter, P.J., Rother, K.I., Plasma concentrations of sucralose in children and adults, *Toxicol. Environ. Chem.* 99 (2017) 535–542.

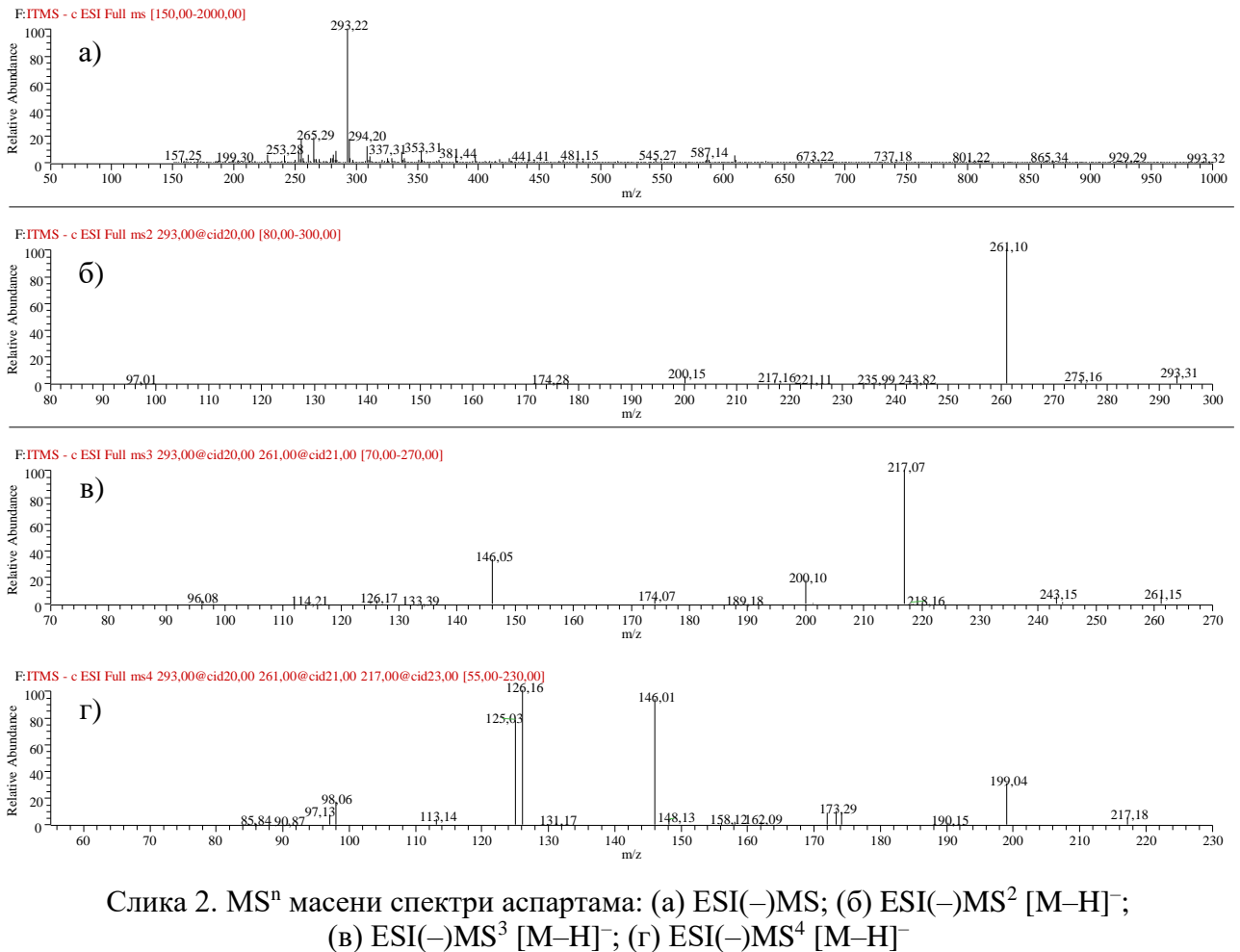
140. Tandel, K.R., Sugar substitutes: Health controversy over perceived benefits, *J. Pharmacol. Pharmacother.* 2 (2011) 236–243.
141. Taverniers, I., De Loose, M., Van Bockstaele, E., Trends in quality in the analytical laboratory, II: Analytical method validation and quality assurance, *Trends Anal. Chem.* 23 (2004) 535–552.
142. Thermofisher, 2023. Доступно на: <https://www.thermofisher.com/rs/en/home/industrial/mass-spectrometry/liquid-chromatography-mass-spectrometry-lc-ms/lc-ms-systems/ion-trap-lc-ms.html> (последњи приступ 14. септембар 2023).
143. Tollefsen, K.E., Nizzeto, L., Hugget, D.B., Presence, fate and effects of the intense sweetener sucralose in the aquatic environment, *Sci. Total Environ.* 438 (2012) 510–516.
144. Tran, N.H., Gan, J., Nguyen, V.T., Chen, H., You L., Duarah, A., Zhang L., Gin K.Y., Sorption and biodegradation of artificial sweeteners in activated sludge process, *Bioresour. Technol.* 197 (2015) 329–338.
145. Tran, N.H., Hu, J., Li, J., Ong, S.L., Simultaneous determination of PPCPs, EDCs, and artificial sweeteners in environmental water samples using a single-step SPE coupled with HPLC–MS/MS and isotope dilution, *Talanta* 113 (2013) 82–92.
146. Tran, N.H., Hu, J., Li, J., Ong, S.L., Suitability of artificial sweeteners as indicators of raw wastewater contamination in surface water and groundwater, *Water Res.* 48 (2014) 433–456.
147. Van Stempvoort, D.R., Brown, S.J., Spoelstra, J., Garda, D., Robertson, W.D., Smyth, S.A., Variable persistence of artificial sweeteners during wastewater treatment: Implications for future use as tracers, *Water Res.* 184 (2020) 116124.
148. Van Stempvoort, D.R., Roy, J.W., Brown, S.J., Bickerton, G., Artificial sweeteners as potential tracers in groundwater in urban environments, *J. Hidrol.* 401 (2011) 126–133.
149. Voss, S., Newman, E., Miller-Schulze, J.P., Quantification of sucralose in groundwater well drinking water by silylation derivatization and gas chromatography-mass spectrometry, *Anal. Methods* 11 (2019) 2790–2799.
150. Wang, C., Liu, Y., Zhao, X., Liu, B., Current advances and future aspects of sweetener synergy: properties, evaluation methods and molecular mechanisms, *Appl. Sci.* 12 (2022) 5096.
151. Watanabe, Y., Bach, L.T., Van Dinh, P., Prudente, M., Aguja, S., Phay, N., Nakata, H., Ubiquitous detection of artificial sweeteners and iodinated X-ray contrast media in aquatic environmental and wastewater treatment plant samples from Vietnam, the Philippines and Myanmar, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 70 (2016) 671–681.
152. Waters, 2023. Доступно на: <https://www.waters.com/nextgen/us/en/education/primers/beginner-s-guide-to-liquid-chromatography/how-does-high-performance-liquid-chromatography-work.html> (последњи приступ 14. септембар 2023).
153. Weihrauch, M.R., Diehl, V., Artificial sweeteners – do they bear a carcinogenic risk?, *Ann. Oncol.* 15 (2004) 1460–1465.
154. Wiklund, A.-K.E., Breitholtz, M., Bengtsson, B.-E., Adolfsson-Erici, M., Sucralose – an ecotoxicological challenger?, *Chemosphere* 86 (2012) 50–55.
155. Wolf, L., Zwiener, C., Zemann, M., Tracking artificial sweeteners and pharmaceuticals introduced into urban groundwater by leaking sewer networks, *Sci. Total Environ.* 430 (2012) 8–19.
156. Wu, M., Qian, Y., Boyd, J.M., Hrudey, S.E., Le, X.C., Li, X.-F., Direct large volume injection ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination of artificial sweeteners sucralose and acesulfame in well water, *J. Chromatogr. A* 1359 (2014) 156–161.

157. Yang, Y.-Y., Liu, W.R., Liu, Y.S., Zhao, J.L., Zhang, Q.-Q., Zhang, M., Zhang, J.-N., Jiang, J.-X., Zhang, L.-J., Ying, G.-G., Suitability of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and artificial sweeteners (ASs) as wastewater indicators in the Pearl River Delta, South China, *Sci. Total Environ.* 590–591 (2017) 611–619.
158. Yue, J., Guo, W., Li, D., Zhu, Y., Zhao, Q., Wang, A., Li, J., Seasonal occurrence, removal and mass loads of artificial sweeteners in the largest water reclamation plant in China, *Sci. Total Environ.* 856 (2023) 159133.
159. Zirlewagen, J., Licha, T., Schiperski, F., Nödler, K., Scheytt, T., Use of two artificial sweeteners, cyclamate and acesulfame, to identify and quantify wastewater contributions in a karst spring, *Sci. Total Environ.* 547 (2016) 356–365.
160. Zygler, A., Wasik, A., Namieśnik, J., Retention behavior of some high-intensity sweeteners on different SPE sorbents, *Talanta* 82 (2010) 1742–1748.

ПРИЛОГ



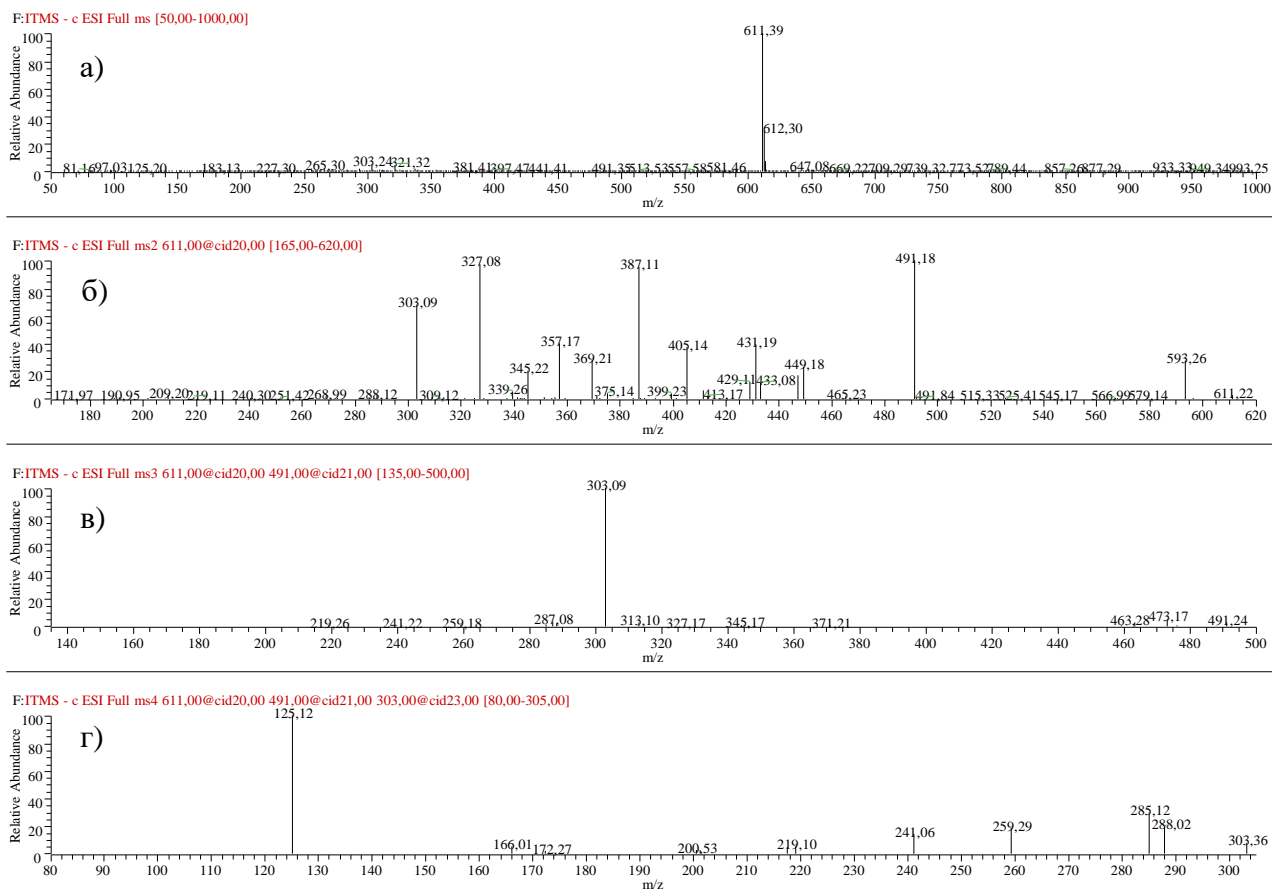
Слика 1. MS<sup>n</sup> масени спектри сукралозе: (а) ESI(-)MS; (б) ESI(-)MS<sup>2</sup> [M+Cl]<sup>-</sup>; (в) ESI(-)MS<sup>3</sup> [M+Cl]<sup>-</sup>



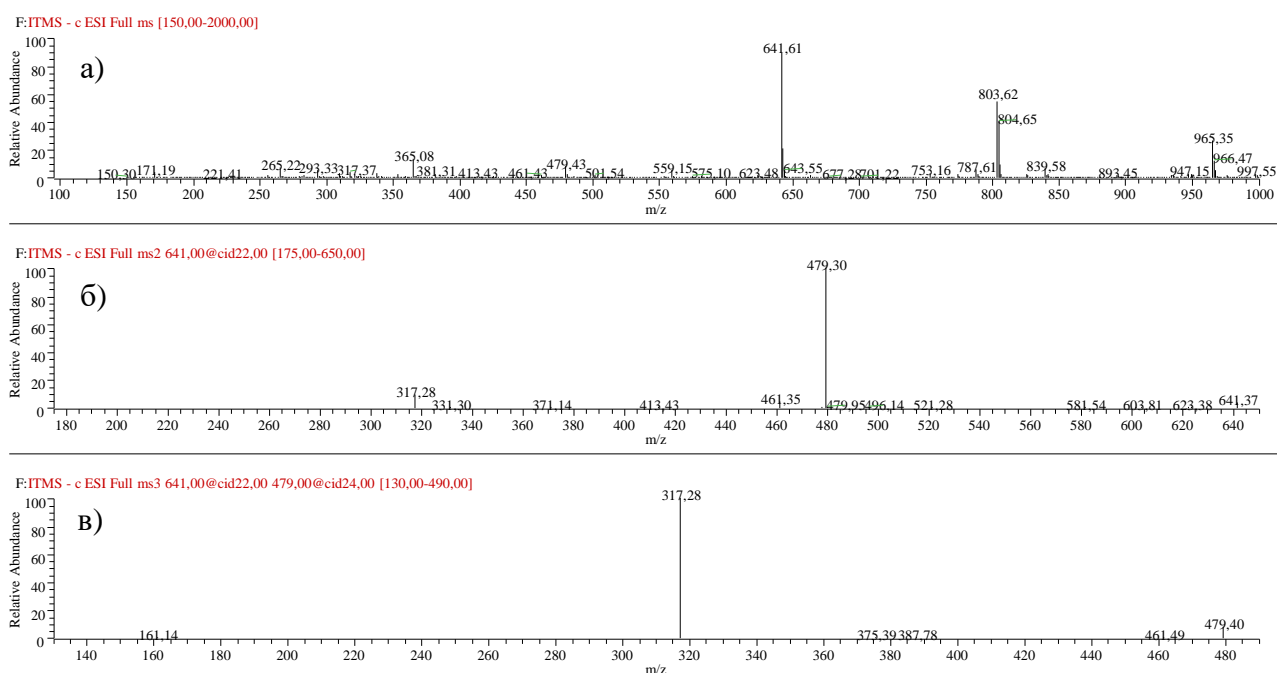
Слика 2. MS<sup>n</sup> масени спектри аспартама: (а) ESI(-)MS; (б) ESI(-)MS<sup>2</sup> [M-H]<sup>-</sup>; (в) ESI(-)MS<sup>3</sup> [M-H]<sup>-</sup>; (г) ESI(-)MS<sup>4</sup> [M-H]<sup>-</sup>



## Прилог

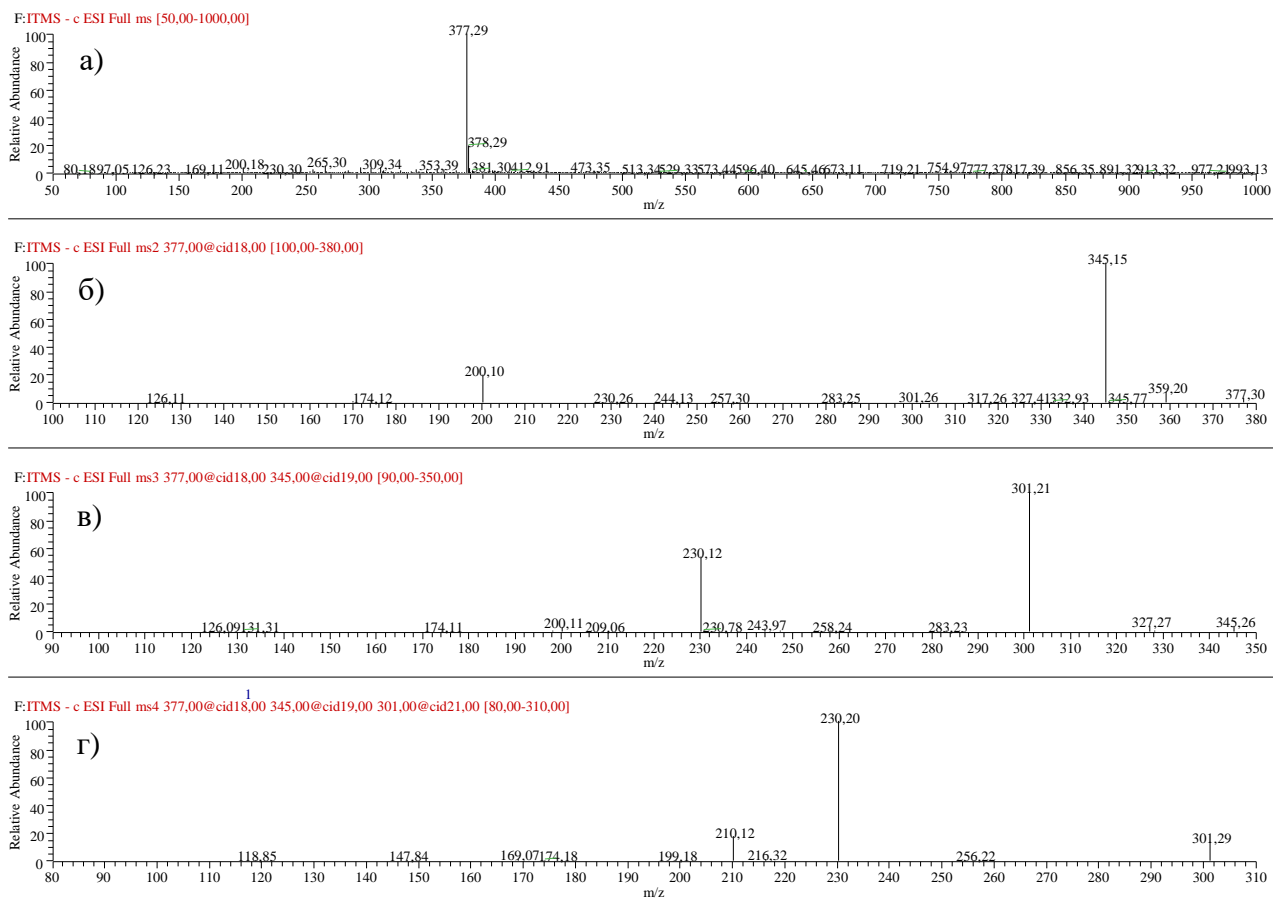


Слика 3. MS<sup>n</sup> масени спектри НХДЦ-а: (а) ESI(-)MS; (б) ESI(-)MS<sup>2</sup> [M-H]<sup>-</sup>; (в) ESI(-)MS<sup>3</sup> [M-H]<sup>-</sup>; (г) ESI(-)MS<sup>4</sup> [M-H]<sup>-</sup>

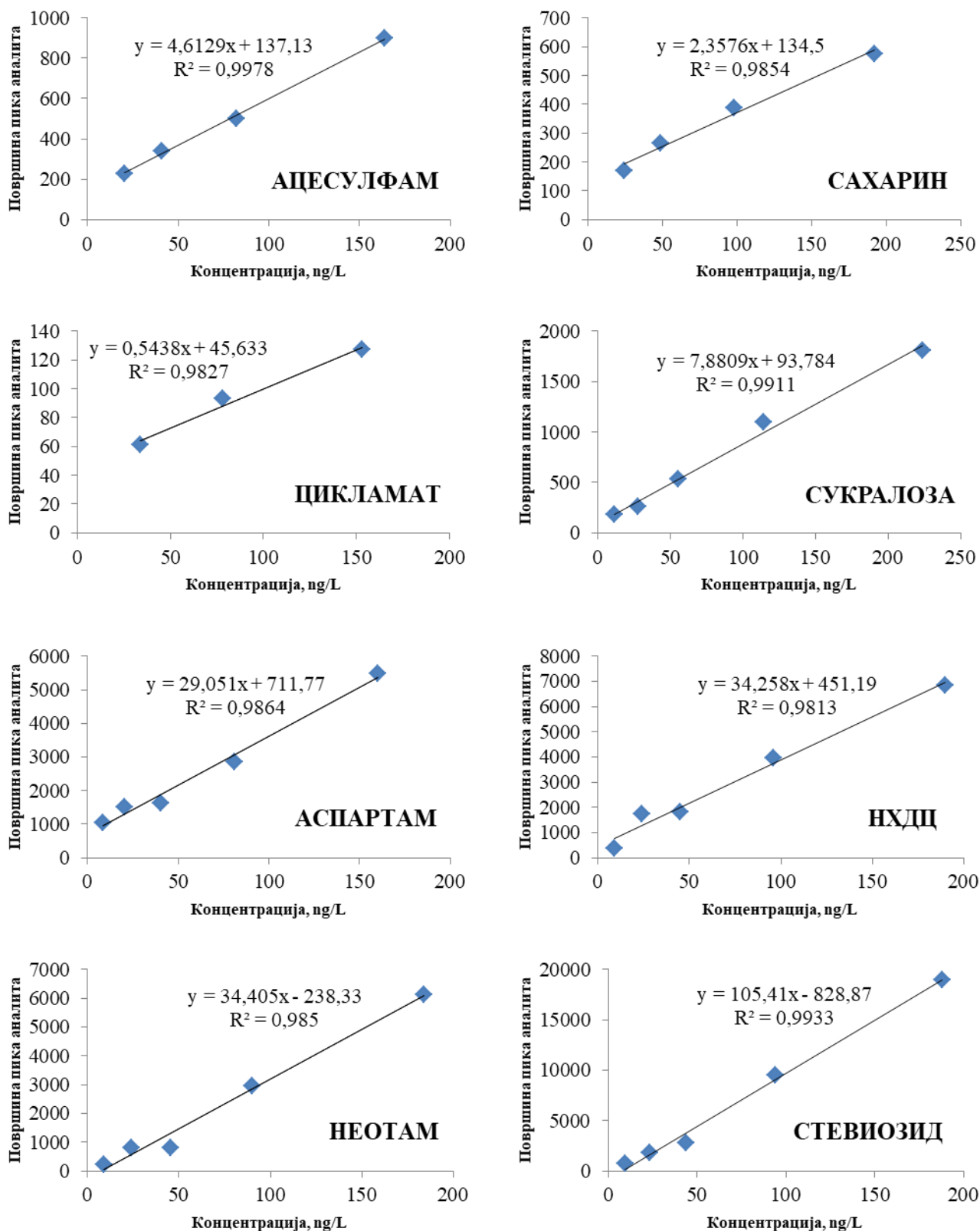


Слика 4. MS<sup>n</sup> масени спектри стевииозида: (а) ESI(-)MS; (б) ESI(-)MS<sup>2</sup> [M-C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>O<sub>5</sub>-H]<sup>-</sup>; (в) ESI(-)MS<sup>3</sup> [M-C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>O<sub>5</sub>-H]<sup>-</sup>

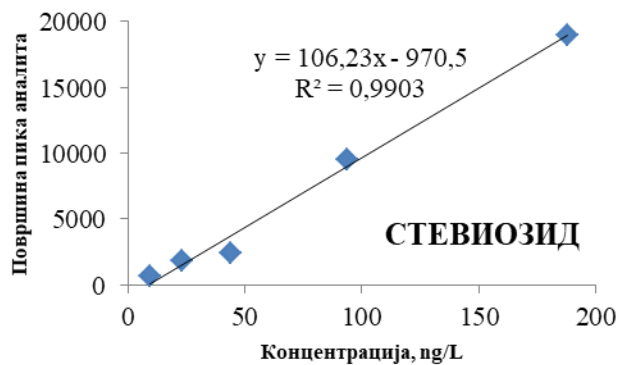
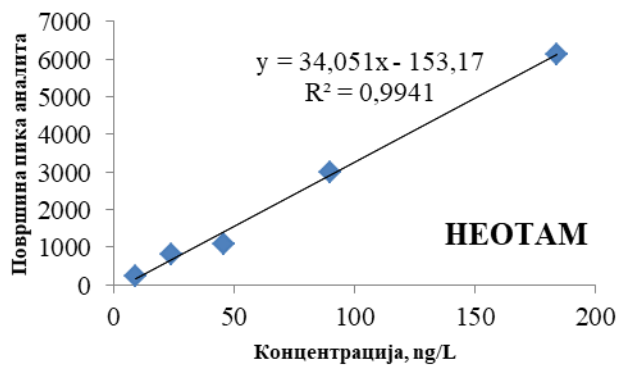
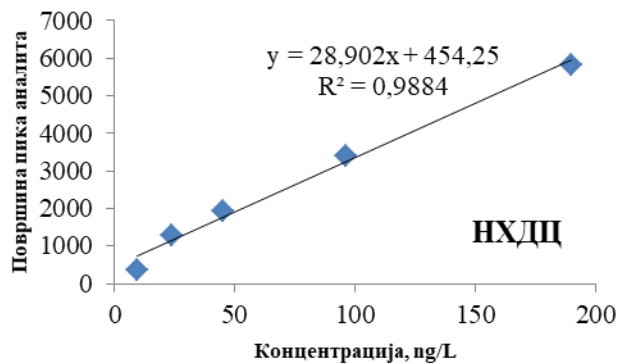
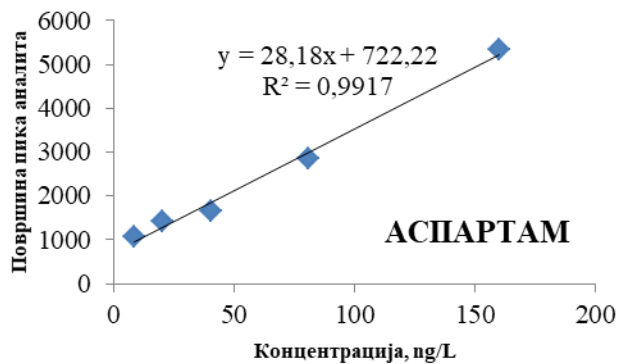
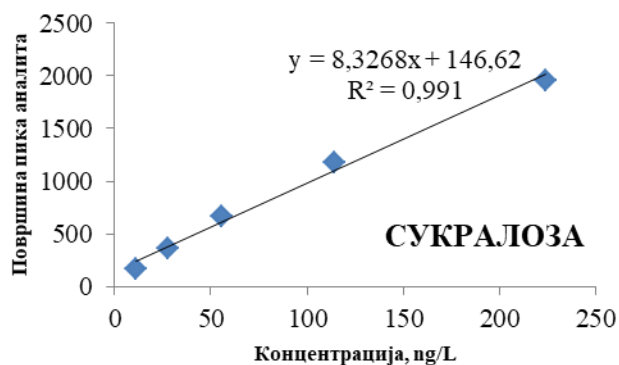
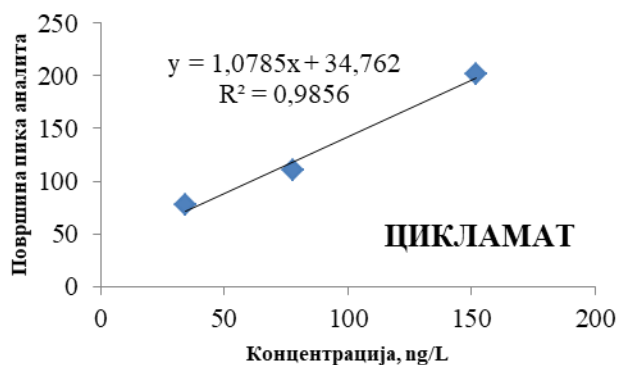
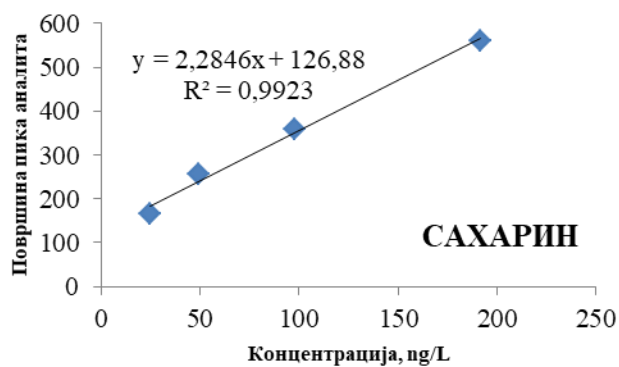
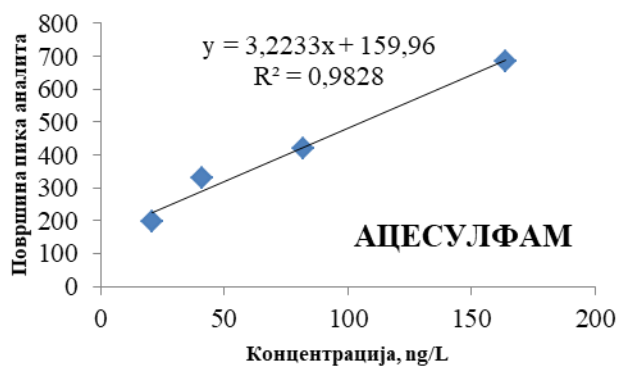
## Прилог



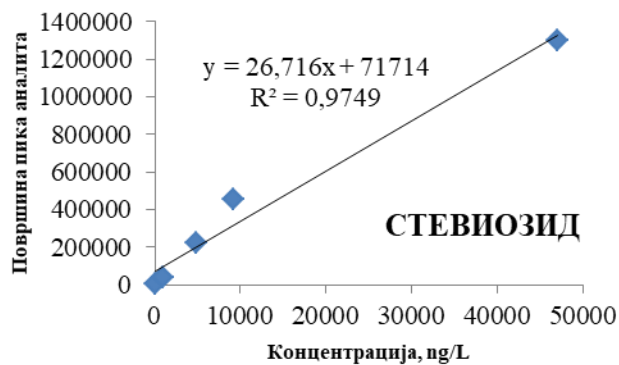
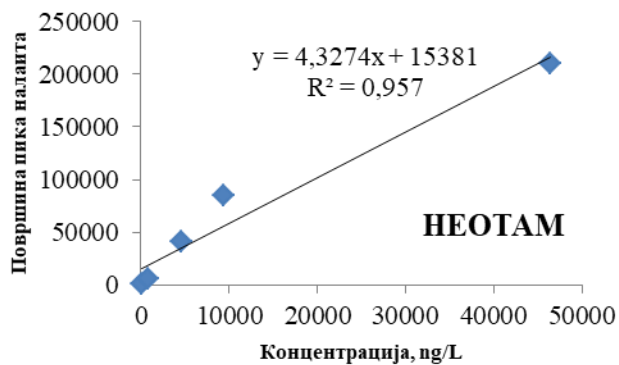
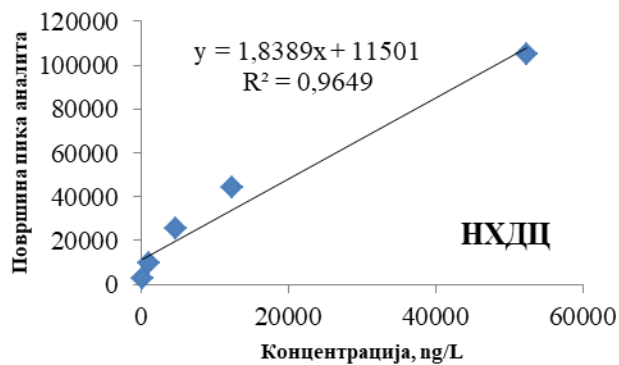
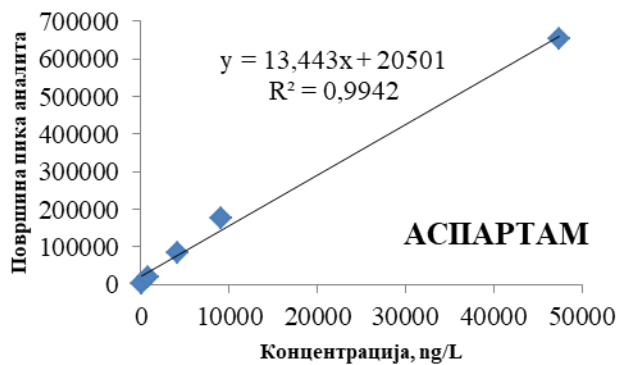
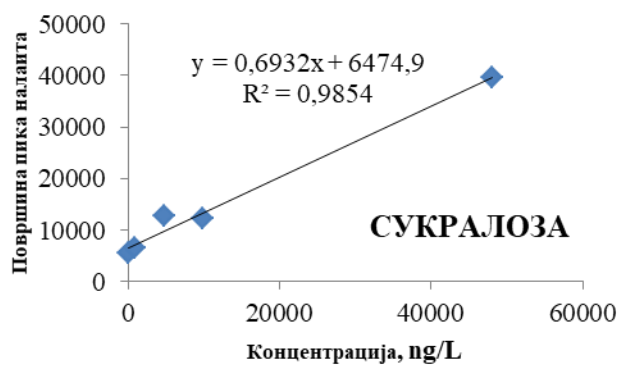
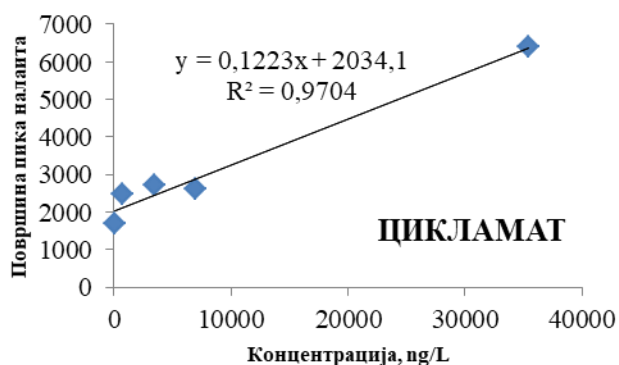
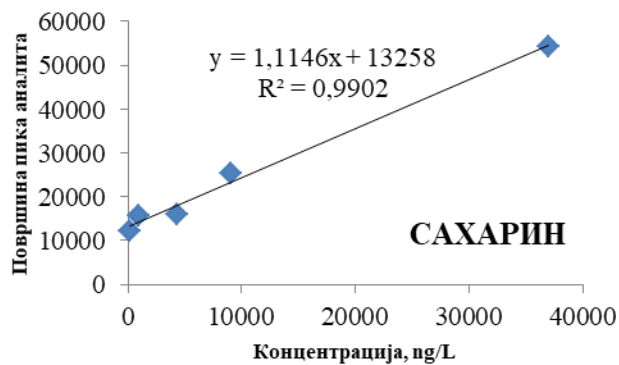
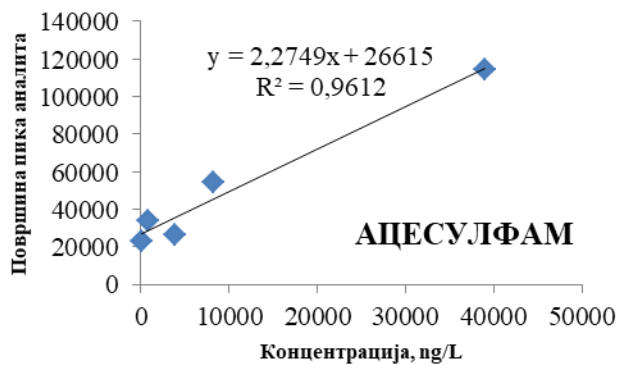
Слика 5.  $MS^n$  масени спектри неотама: (а) ESI(-)MS; (б) ESI(-)MS<sup>2</sup> [M-H]<sup>-</sup>; (в) ESI(-)MS<sup>3</sup> [M-H]<sup>-</sup>; (г) ESI(-)MS<sup>4</sup> [M-H]<sup>-</sup>



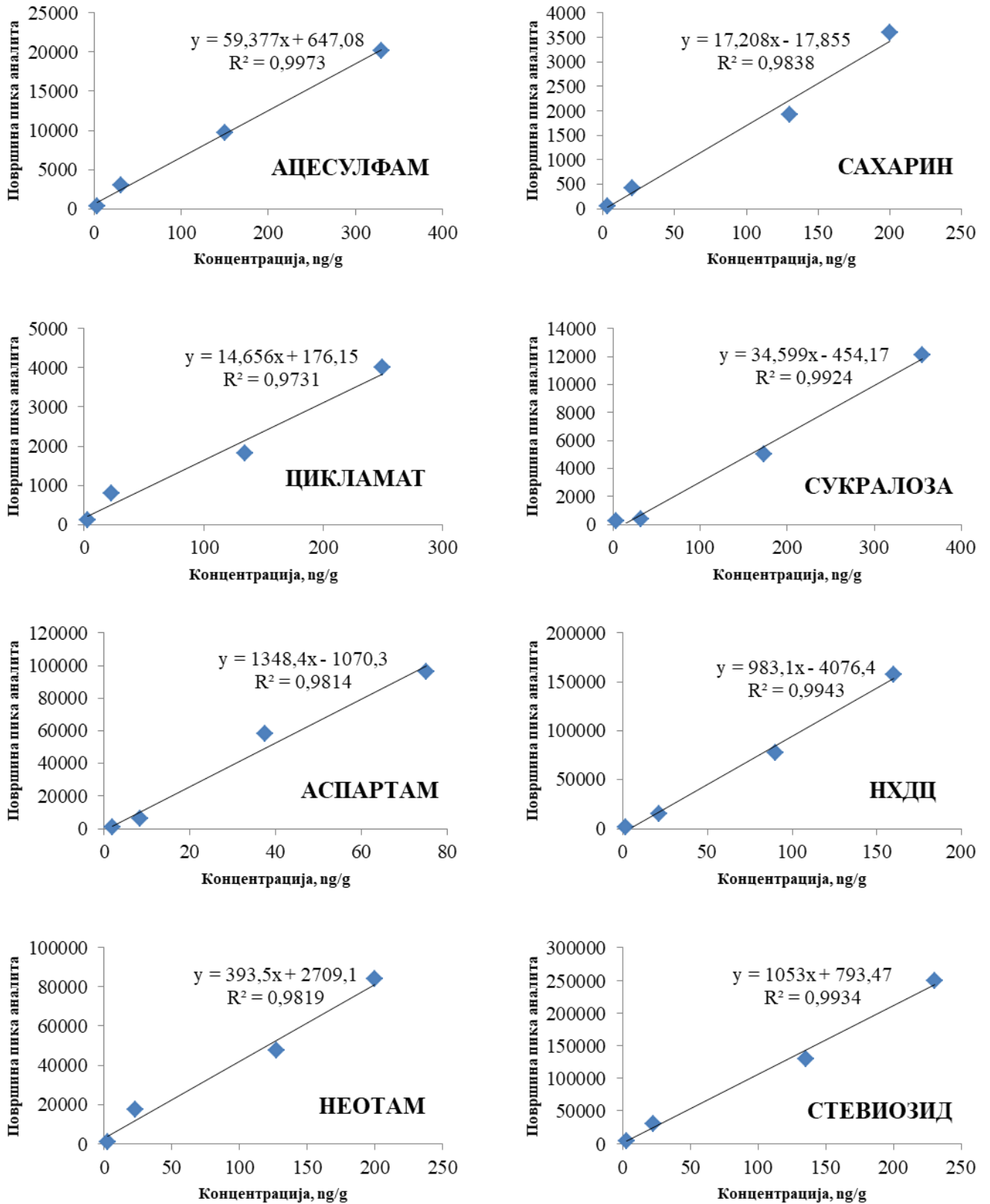
Слика 6. Линеарност методе за одабране вештачке заслађиваче у матрици површинске воде



Слика 7. Линеарност методе за одабране вештачке заслађиваче у матрици подземне воде



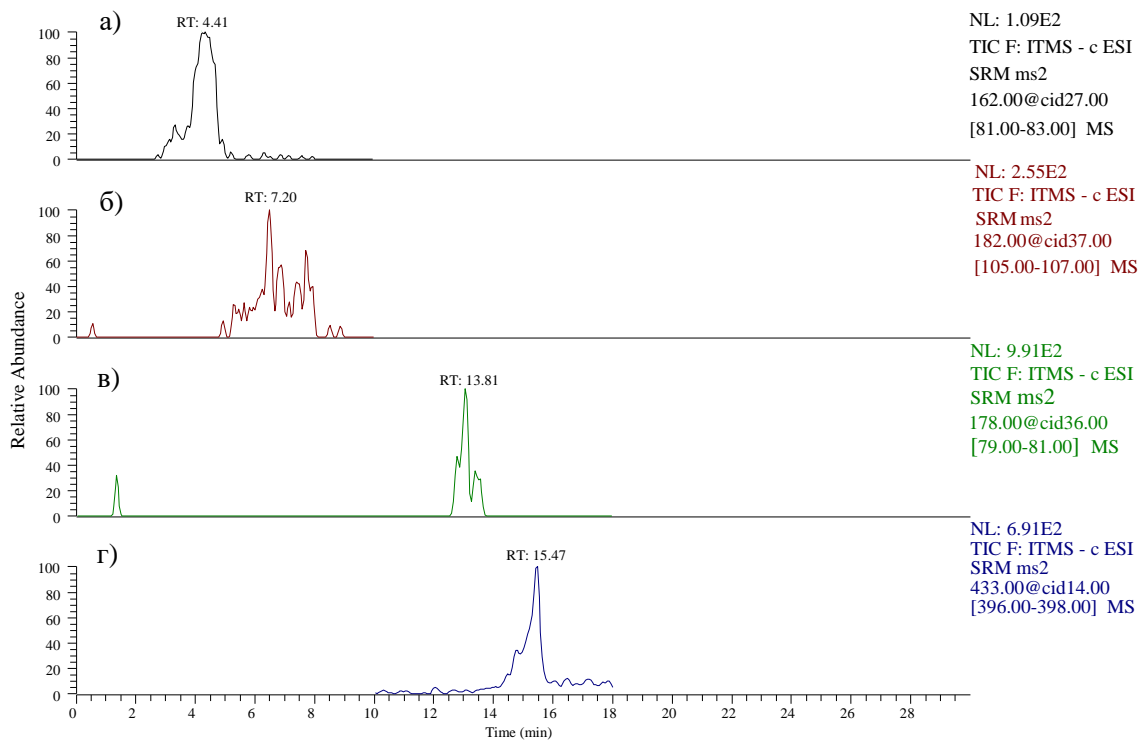
Слика 8. Линеарност методе за одабране вештачке заслађиваче у матрици отпадне воде



Слика 9. Линеарност методе за одабране вештачке заслађиваче у матрици седимента

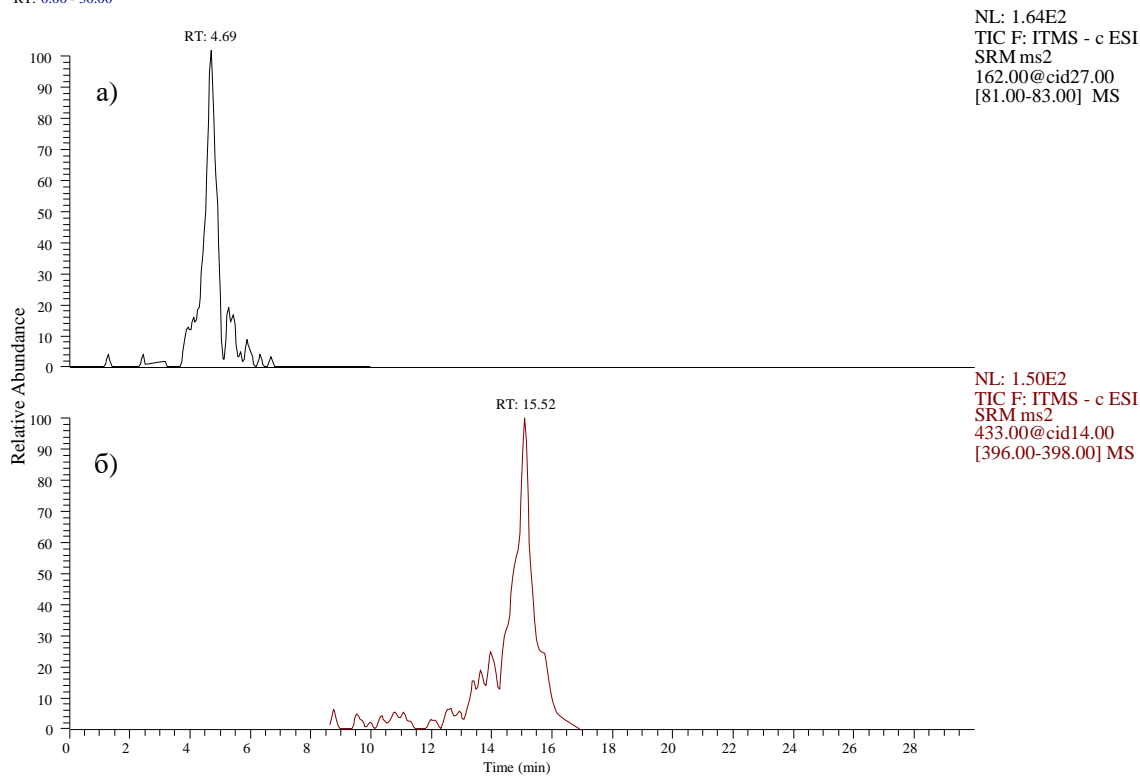
## Прилог

RT: 0.00 - 29.99



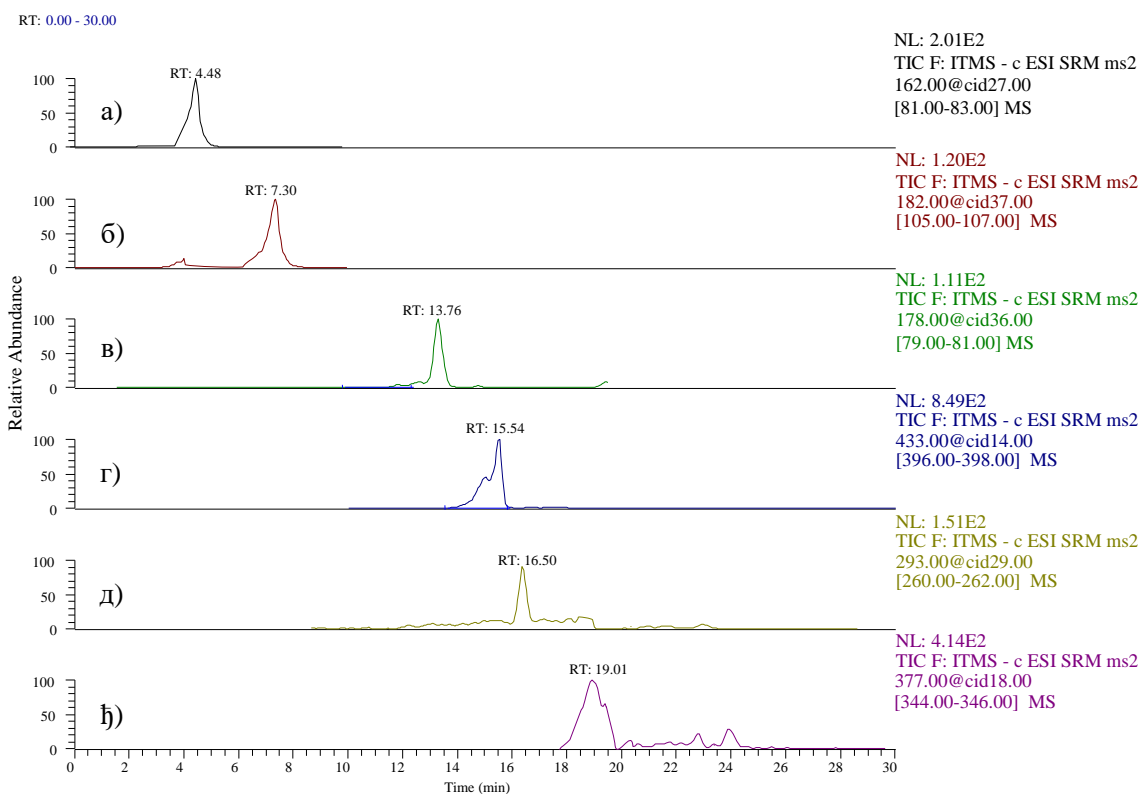
Слика 10. Масени хроматограми вештачких заслађивача (а) ацесулфама, (б) сахарина, (в) цикламата и (г) сукралозе детектованих у узорку речне воде РВ4

RT: 0.00 - 30.00

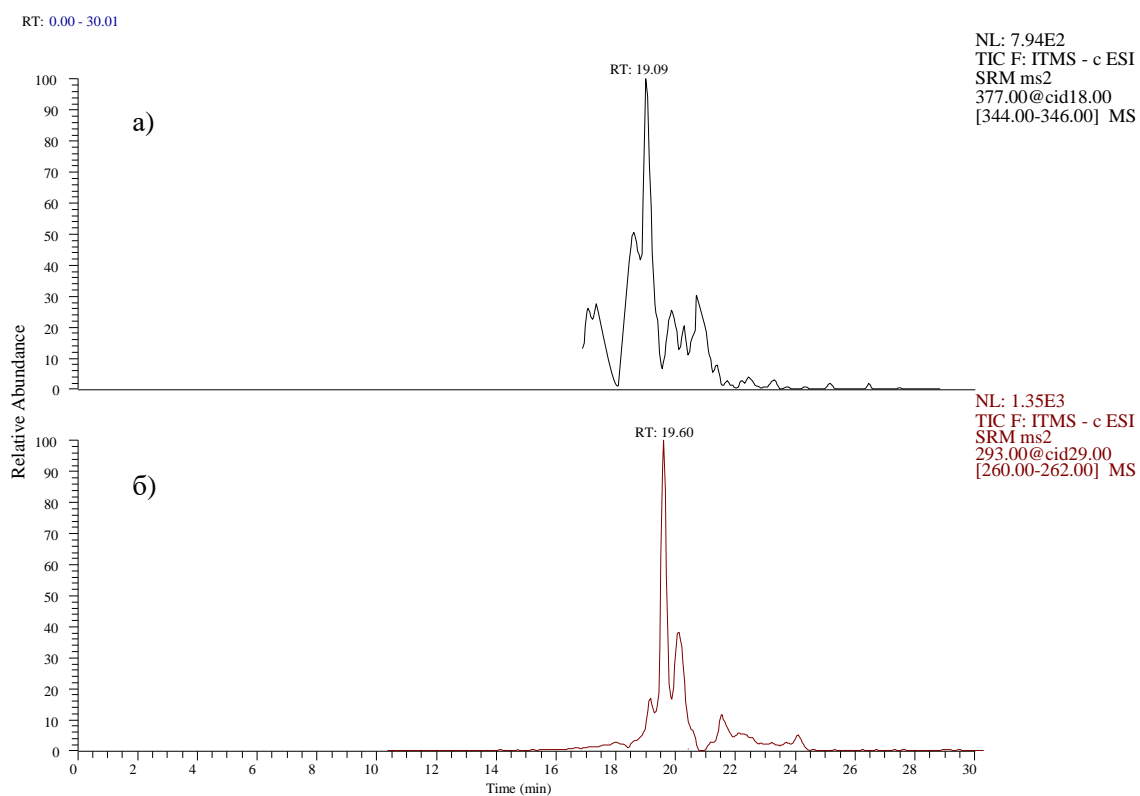


Слика 11. Масени хроматограми вештачких заслађивача (а) ацесулфама и (б) сукралозе детектованих у узорку подземне воде ПВ1

## Прилог



Слика 12. Масени хроматограми вештачких заслађивача (а) ацесулфама, (б) сахарина, (в) цикламата, (г) сукралозе, (д) аспартама и (е) неотама детектованих у узорку отпадне воде ОВ2



Слика 13. Масени хроматограми вештачких заслађивача (а) неотама и (б) аспартама детектованих у узорку речног седимента СЕД4



ОБЈАВЉЕНИ НАУЧНИ РАДОВИ ИЗ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

**Радови у врхунским међународним часописима– категорија М21**

1. Gvozdić E., Matić Bujagić I., Đurkić T., Grujić S.: Trace analysis of artificial sweeteners in environmental waters, wastewater and river sediments by liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Microchemical Journal*, 157 (2020) 105071. ISSN: 0026-265X; DOI: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105071>.
2. Gvozdić E., Matić Bujagić I., Đurkić T., Grujić S.: Untreated wastewater impact and environmental risk assessment of artificial sweeteners in river water and sediments of the Danube River Basin in Serbia, *Environmental Science and Pollution Research*, 30 (2023) 84583-84594. ISSN: 0944-1344; DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-023-28348-5>.

## БИОГРАФИЈА АУТОРА

Елеонора Гвоздић је рођена 8. фебруара 1987. у Карловцу, у Републици Хрватској. Основну школу „Јосиф Панчић“ у Београду је завршила 2001. године као носилац Вукове дипломе, након чега је уписала XIII београдску гимназију, природно-математички смер, у којој је матурирала 2005. са одличним успехом. Биолошки факултет Универзитета у Београду уписала је школске 2005/06. године, студијски програм Екологија и заштита животне средине. Дипломирала је 2012. године, са просечном оценом 8,69 у току студија, и одбранила је дипломски рад на Катедри за екологију и географију биљака са оценом 10 стекавши звање дипломирани биолог заштите животне средине.

Докторске академске студије уписала је школске 2015/2016. године на Технолошко-металуршком факултету Универзитета у Београду, на студијском програму Инжењерство заштите животне средине. Положила је све испите предвиђене планом и програмом докторских студија са просечном оценом 9,17 и одбранила је са оценом 10 завршни испит са темом „Одређивање трагова вештачких заслађивача у узорцима воде методом течне хроматографије са тандем масеном спектрометријом“ под менторством проф. др Светлане Грујић. Запослена је у Иновационом центру Технолошко-металуршког факултета као истраживач сарадник. Од маја 2017. до децембра 2019. године била је ангажована на пројекту Министарства просвете, науке и технолошког развоја под називом „Развој и примена метода и материјала за мониторинг нових загађујућих и токсичних органских материја и тешких метала“ под руководством проф. др Миле Лаушевић. Област научно-истраживачког рада Елеоноре Гвоздић се односи на развој и примену метода за одређивање трагова емергентних загађујућих материја у води и речним седиментима. Члан је Српског хемијског друштва.

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора: Елеонора Гвоздић

Број индекса: 4031/2015

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Развој и примена HPLC–MS/MS методе за испитивање присуства вештачких  
заслађивача као индикатора комуналног загађења воде и седимената

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора:

У Београду, 1.9.2023.

  
\_\_\_\_\_

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Елеонора Гвоздић

Број индекса: 4031/2015

Студијски програм: Инжењерство заштите животне средине

Наслов рада: Развој и примена HPLC–MS/MS методе за испитивање присуства  
вештачких заслађивача као индикатора комуналног загађења воде и седимената

Ментор: проф. др Светлана Грујић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора:

У Београду, 1.9.2023.

  
\_\_\_\_\_

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Развој и примена HPLC–MS/MS методе за испитивање присуства вештачких заслађивача као индикатора комуналног загађења воде и седимената

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе 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 прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.  
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора:

У Београду, 1.9.2023.



1. **Ауторство.** Дозвољава се умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољава се умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољава се умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољава се умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољава се умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољава се умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.

ОЦЕНА ИЗВЕШТАЈА О ПРОВЕРИ ОРИГИНАЛНОСТИ  
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и налаза у извештају из програма „iThenticate“ којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације Елеоноре Гвоздић под називом „Развој и примена HPLC–MS/MS методе за испитивање присуства вештачких заслађивача као индикатора комуналног загађења воде и седимената“, констатујем да индекс сличности текста износи сумарно 12%, при чему он потиче из 128 различитих извора, у оквиру којих је највећи степен појединачног подударања 2% из једног извора, док су остали 1% из 3 извора, а < 1% из 124 извора.

Највећа подударност, од 2%, је последица претходно публикованих резултата докторандових истраживања који су проистекли из њене дисертације, највећим делом у експерименталном делу, попут назива уређаја и колоне коришћених за хроматографско раздвајање, као и екстракцију анализата. Подударности од 1% и < 1% су последица цитата, назива метода и њихових скраћеница, имена аутора и других библиографских података о коришћеној литератури (нпр. „Scheurer“, „et al. 2009“), употребе стручних термина типичних за област у коју спада дисертација, описа делова методолошких протокола за које су јасно наведене референце, као и јединица за концентрацију анализата ( $\text{ng L}^{-1}$ ), што је у складу са чланом 9. Правилника.

На основу свега изнетог, а у складу са чланом 8. став 2. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду, изјављујем да извештај указује на оригиналност докторске дисертације, па се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

30. октобар 2023. год.

Ментор:



.....  
Др Светлана Грујић, ванредни професор,  
Универзитет у Београду,  
Технолошко-металуршки факултет