

VEŠTAČKI ZASLAĐIVAČI U PODZEMNOJ VODI KAO INDIKATORI KOMUNALNOG ZAGAĐENJA

ARTIFICIAL SWEETENERS IN GROUNDWATER AS INDICATORS OF MUNICIPAL POLLUTION

Eleonora GVOZDIĆ^{1*}, Ivana MATIĆ BUJAGIĆ², Tatjana ĐURKIĆ³, Svetlana GRUJIĆ³

¹ Inovacioni centar Tehnološko-metalurškog fakulteta u Beogradu, Beograd, Srbija

² Katedra za inženjerstvo zaštite životne sredine i zaštite na radu, Odsek Beogradska politehnika, Akademija tehničkih strukovnih studija Beograd, Beograd, Srbija

³ Tehnološko-metalurški fakultet Univerziteta u Beogradu, Srbija

<https://doi.org/10.24094/ptk.021.34.1.55>

Velika primena veštačkih zaslađivača kao aditiva u hrani, piću, lekovima i sredstvima za oralnu higijenu je dovela do akumuliranja ovih supstanci u akvatičnim ekosistemima širom sveta. Pošto je većina njih metabolički inertna i nepotpuno se uklanja u postrojenjima za prečišćavanje otpadnih voda, komunalne otpadne vode predstavljaju glavni izvor ovih jedinjenja u životnoj sredini. Njihovo ponašanje i uticaj na živi svet je uglavnom nepoznat, pa su svrstani u visoko prioritetne emergentne zagađujuće materije. Neki od njih, poput acesulfama i sukraloze, su veoma postojani u vodenoj sredini, pa se mogu koristiti kao markeri zagađenja komunalnim otpadnim vodama. U ovom radu je praćeno prisustvo najčešće korišćenih zaslađivača u Republici Srbiji (acesulfama, saharina, ciklamata, sukraloze i aspartama) u podzemnoj vodi iz dva beogradska reni bunara, kao i u reci Savi, radi procene uticaja netretiranih komunalnih otpadnih voda na vodoizvorišta, pomoću metode tečne hromatografije sa tandem masenom spektrometrijom.

Ključne reči: veštački zaslađivači; komunalne otpadne vode; tečna hromatografija–tandem masena spektrometrija

The widespread use of artificial sweeteners as additives in food, beverages, medicines and oral care products has led to the accumulation of these substances in aquatic ecosystems around the world. Since most of them are metabolically inert and are incompletely eliminated in wastewater treatment plants, municipal wastewater is the main source of these compounds in the environment. Due to the limited knowledge of their environmental fate and ecotoxicity, artificial sweeteners are recognized as high-priority emerging contaminants. Some of them, such as acesulfame and sucralose, are very persistent in the aquatic environment, so they can be used as chemical markers of municipal wastewater pollution. In this paper, the presence of the most commonly used sweeteners in the Republic of Serbia (acesulfame, saccharin, cyclamate, sucralose and aspartame) was investigated in groundwater from two Belgrade Ranney wells, as well as in the Sava River, in order to assess the impact of untreated municipal wastewater on water sources, using liquid chromatography–tandem mass spectrometry.

Key words: artificial sweeteners; municipal wastewater; liquid chromatography–tandem mass spectrometry

1 Uvod

Osamdesetih godina prošlog veka počela je široka primena veštačkih zaslađivača u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji kao jeftinih zamena za šećer i poboljšivača ukusa prehrambenih proizvoda. Zbog izuzetno male kalorijske vrednosti, zaslađivači su česti sastojci dijetetskih proizvoda. Većina ovih sintetičkih supstanci je metabolički stabilna, pa se izlučuju

* Corresponding author, e-mail: egvozdic@tmf.bg.ac.rs

uglavnom u nepromenjenom obliku [1]. Primena veštačkih zaslađivača u Republici Srbiji je usaglašena sa direktivama Evropske unije i uređena Pravilnikom o prehranbenim aditivima [2].

Veštački zaslađivači spadaju u emergentne zagađujuće materije koje se često detektuju u životnoj sredini, ali nisu uključene u redovne monitoring programe, a čije ponašanje i ekotoksikološki efekti još uvek nisu poznati [3]. Prisustvo ovih jedinjenja je potvrđeno u vodenim ekosistemima širom sveta [3–5], a posebno je zabrinjavajuće da su neki od njih, poput acesulfama i sukraloze, detektovani u podzemnim vodama [4–6] i vodi za piće [5]. Tretirane i netretirane otpadne vode iz domaćinstava predstavljaju glavni put dospevanja ovih supstanci u životnu sredinu, jer u postrojenjima za prečišćavanje otpadnih voda prolaze tretman uglavnom nepromenjene (acesulfam i sukraloza). S druge strane, neki zaslađivači, poput saharina, ciklamata i aspartama, uklanjaju se u velikom procentu u procesu prečišćavanja (više od 90%) [4,7]. Dodatni izvori zagađenja veštačkim zaslađivačima su otpadne vode iz prehrambene industrije, kao i sa životinjskih farmi zbog upotrebe veštačkih zaslađivača u stočnoj hrani, ali i procedne vode sa deponija [4,8].

Glavni problem ispuštanja netretiranih komunalnih otpadnih voda u vodotokove je zagađenje patogenim mikrobima (bakterijama i virusima) koje može ugroziti kvalitet podzemnih voda, a time i vodosnabdevanje. Naime, u reni bunarima izgrađenim u priobalju reke akumulira se voda iz akvifera, pa može doći do prenosa zagađujućih materija iz rečne vode u podzemnu, koja se dalje odvodi do postrojenja za prečišćavanje i proizvodnju pijaće vode. Tradicionalno korišćeni bakterijski markeri za identifikaciju zagađenja komunalnim otpadnim vodama imaju nedostatke, kao što su nepouzdanost analize u termalno i hemijski zagađenoj vodi i/ili konzerviranim uzorcima, kao i pružanje ograničenih informacija o trenutnom zagađenju [9]. Alternativni indikatori komunalnog zagađenja su metaboliti lekova, steroli, supstance koje se nalaze u proizvodima za ličnu higijenu, kao i prehrambeni aditivi u koje spadaju i veštački zaslađivači. Mnogi od njih su veoma stabilni i postojani u metaboličkim procesima, procesima prečišćavanja otpadnih voda, kao i u životnoj sredini [10].

Cilj ovog rada je praćenje prisustva najčešće korišćenih zaslađivača u Republici Srbiji (acesulfama, saharina, ciklamata, sukraloze i aspartama) u podzemnoj vodi iz dva reni bunara izgrađenih u priobalju reke Save, kao i u samoj reci, radi procene uticaja komunalnog zagađenja na beogradsko vodoizvorište. S obzirom na to da se veštački zaslađivači u uzorcima iz životne sredine nalaze u veoma niskim koncentracijama, tečna hromatografija sa tandem masenom spektrometrijom (eng. liquid chromatography–tandem mass spectrometry, LC–MS/MS) je instrumentalna metoda neophodna za određivanje tragova ovih jedinjenja u vodi, zbog izuzetne osetljivosti i selektivnosti.

2 Eksperimentalni deo

2.1 Standardi zaslađivača i reagensi

Standardne supstance visoke čistoće ($\geq 98\%$) pet veštačkih zaslađivača (acesulfam, saharin, ciklamat, sukraloza, aspartam) su kupljene od proizvođača Sigma-Aldrich (Sent Luis, SAD). Metanol HPLC čistoće je nabavljen od proizvođača J. T. Baker (Glivice, Poljska), dok je amonijum-acetat dobijen od proizvođača Fisher Chemical (Lafboro, Velika Britanija). Za podešavanje pH vrednosti uzoraka vode korišćena je koncentrovana sirćetna kiselina.

2.2 Priprema uzoraka vode

Uzorci podzemne vode iz dva reni bunara izgrađenih u priobalju reke Save (RB 1 i RB 2), kao i uzorci površinske vode iz same reke (SAVA 1 i SAVA 2), sakupljeni su u plastične boce od 1 L i čuvani u zamrzivaču bez dodatka konzervansa. Pre ekstrakcije uzorci su odmrznuti i profiltrirani kroz filtere od staklenih vlakana veličine 1–3 μm (Vatman, Dassel, Nemačka). Za izolovanje i koncentrovanje veštačkih zaslađivača korišćena je metoda ekstrakcije na čvrstoj fazi (eng. solid-phase extraction, SPE) uz upotrebu Oasis HLB kertridža kao adsorbensa. Na adsorbens je nanošeno 50 mL uzorka podzemne ili površinske vode kojoj je prethodno podešena pH vrednost na 3,0. Zaslađivači su eluirani sa pakovanja SPE kolone sa 10 mL metanola. Dobijeni ekstrakti su uparavani i rekonstituisani metanolom do zapremine 1 mL. Pre analize, dobijeni ekstrakti su filtrirani kroz 0,45 μm poli(vinilden-fluorid) filtere, proizvođača Roth (Karlsruhe, Nemačka).

2.3 LC–MS/MS analiza

LC–MS/MS analiza pet veštačkih zaslađivača je izvršena na Dionex UltiMate® 3000 HPLC sistemu u sprezi sa LTQ XL linearnim jonskim trapom kao masenim spektrometrom, proizvođača Thermo Fisher Scientific (Voltam, SAD). Kao jonizaciona tehnika korišćena je elektrosprej jonizacija u negativnom režimu rada. Za hromatografsko razdvajanje korišćena je reverzno-fazna kolona: Luna C8 (3,0 mm × 150 mm × 3 μm), proizvođača Phenomenex (Torans, SAD). Mobilna faza se sastojala od 84% vode (A), 15% metanola (B) i 1% rastvora amonijum-acetata (C) pri konstantnom protoku od 0,33 mL min⁻¹. Gradijent se menjao na sledeći način: 0 min, A 84%, B 15%, C 1%; 8 min, A 84%, B 15%, C 1%; 13 min, A 34%, B 65%, C 1%; 15 min, B 100%; 20 min, B 100%. Nakon toga, početni uslovi su ponovo uspostavljeni i držani tokom 10 min.

Kao prekursor joni za sve veštačke zaslađivače odabrani su deprotonovani molekuli, osim u slučaju sukraloze gde je odabran adukt sa hlorom ([M+Cl]⁻). Uz optimizaciju koliziona energije, izvršena je fragmentacija prekursor jona pri čemu su dobijeni stabilni fragmentni joni koji su korišćeni za kvantifikaciju analita. Pored reakcije fragmentacije za kvantitativno određivanje, odabrana je i reakcija fragmentacije za potvrdu prisustva analita (tabela 1).

Tabela 1. Maseno-spektrometrijski parametri za analizu odabranih veštačkih zaslađivača

	Segment (min)	Prekursor jon (m/z)	Reakcija kvantifikacije (m/z)	Koliziona energija (%)	Reakcija potvrde (m/z)
Acesulfam	I (0–10)	162 [M–H] ⁻	162→82	27	162→102
Saharin		182 [M–H] ⁻	182→106	37	182→62
Ciklamat	I i II (0–18)	178 [M–H] ⁻	178→80	36	178→96
Sukraloza	II (10–18)	433 [M+Cl] ⁻	433→397	14	433→395
Aspartam		293 [M–H] ⁻	293→261	29	293→200

3 Rezultati i diskusija

LC–MS/MS analizom uzoraka površinske vode iz reke Save potvrđeno je prisustvo četiri od pet ispitivanih zaslađivača, i to acesulfama, saharina, ciklamata i sukraloze (tabela 2). U akvatičnoj sredini, acesulfam i sukraloza se smatraju perzistentnim zagađujućim materijama, dok saharin, ciklamat i aspartam podležu brznoj degradaciji [3,4]. Zbog toga se prisustvo veštačkih zaslađivača saharina i ciklamata, u visokim koncentracijama (35,2 ng L⁻¹ i 65,9 ng L⁻¹) u uzorku SAVA 1, smatra pokazateljem nedavnog zagađenja reke Save komunalnim otpadnim vodama. Primenom četiri detektovana zaslađivača kao indikatora komunalnog zagađenja omogućeno je razlikovanje nedavnih uticaja otpadnih voda na vodeni ekosistem od starijih, koji se identifikuju prisustvom samo acesulfama i sukraloze [11,12]. Rezultati dobijeni za uzorak SAVA 2 ukazuju na ranije zagađenje reke na mestu uzorkovanja, jer saharin i ciklamat nisu detektovani.

Tabela 2. Koncentracije detektovanih veštačkih zaslađivača u površinskoj i podzemnoj vodi (ng L⁻¹)

	Acesulfam	Saharin	Ciklamat	Sukraloza	Aspartam
<i>Površinska voda</i>					
SAVA 1	18,9	35,2	65,9	20,0	–
SAVA 2	63,1	–	–	27,6	–
<i>Podzemna voda</i>					
RB 1	17,8	–	–	12,4	–
RB 2	–	–	–	–	–

U podzemnoj vodi iz dva beogradska reni bunara potvrđeno je prisustvo dva perzistentna veštačka zaslađivača, acesulfama i sukraloze, u koncentracijama nižim od onih za rečnu vodu ($17,8 \text{ ng L}^{-1}$ i $12,4 \text{ ng L}^{-1}$). Ove dve supstance se detektuju sa većom učestalošću u podzemnim vodama od drugih zaslađivača koji su specifični za komunalne otpadne vode [4–6]. Na osnovu pregleda dostupne literature može se zaključiti da su najviše koncentracije acesulfama i sukraloze u podzemnim vodama detektovane u područjima gde postoji značajna infiltracija rečne vode koja prima otpadnu vodu iz postrojenja za prečišćavanje ili netretiranu komunalnu otpadnu vodu [4–6,11]. Kontinualno zagađenje reke Save, dokazano prisustvom indikatora ranijeg i nedavnog komunalnog zagađenja, mora imati značajan uticaj na kvalitet podzemnih voda. Budući da se akvifer najvećim delom prihranjuje iz reke, zagađujuće materije se transportuju kroz propusne slojeve do reni bunara izgrađenih u priobalju reke i detektuju u nižim koncentracijama. S obzirom na to da se na reci Savi nalazi veliki broj ispusta komunalnih, ali i industrijskih otpadnih voda, kao i da Beograd nema postrojenje za prečišćavanje otpadnih voda, jasno je da postoji visok uticaj komunalnog zagađenja na beogradsko vodoizvorište i potencijalno na ispravnost vode za piće, što je potvrđeno prisustvom specifičnih markera u podzemnoj vodi reni bunara.

4 Zaključak

U cilju zaštite životne sredine i vodenog ekosistema, kao i očuvanja ljudskog zdravlja, neophodno je definisati specifične markere zagađenja komunalnim otpadnim vodama, tj. indikatore komunalnog zagađenja, radi efikasne kontrole kvaliteta vode. Zbog velike stabilnosti i nepotpunog uklanjanja u postrojenjima za prečišćavanje otpadnih voda, veštački zaslađivači acesulfam i sukraloza predstavljaju pogodne markere za praćenje zagađenja i procenu uticaja komunalnih otpadnih voda na vodoizvorišta. Prisustvo acesulfama i sukraloze u analiziranim uzorcima podzemne vode reni bunara ukazuje na kontaminaciju i značajan uticaj komunalnog zagađenja na beogradsko vodoizvorište. Kontinualno ispuštanje netretiranih otpadnih voda u reka Savu, dokazano prisustvom saharina i ciklamata kao indikatora nedavnog komunalnog zagađenja, dovodi do kontaminacije podzemnih voda i predstavlja potencijalnu opasnost za vodosnabdevanje i kvalitet pijaće vode.

Zahvalnica

Izradu ovog rada je finansiralo Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (br. ugovora: 451-03-9/2021-14/200287 i 451-03-9/2021-14/200135).

Skraćenice

LC–MS/MS - tečna hromatografija–tandem masena spektrometrija (eng. liquid chromatography–tandem mass spectrometry)

SPE - ekstrakcija na čvrstoj fazi (eng. solid-phase extraction)

5 Literatura

- [1] **Carocho, M., P. Morales, I. C. F. R. Ferreira**, Sweeteners as food additives in the XXI century: A review of what is known, and what is to come, *Food and Chemical Toxicology*, 107 (2017), pp. 302–317.
- [2] Pravilnik o prehrambenim aditivima, „*Službeni glasnik RS*“, br. 53/2018.
- [3] **Luo, J., Q. Zhang, M. Cao, L. Wu, J. Cao, F. Fang, C. Li, Z. Xue, Q. Feng**, Ecotoxicity and environmental fates of newly recognized contaminants-artificial sweeteners: A review, *Science of the Total Environment*, 653 (2019), pp. 1149–1160.
- [4] **Buerge, I. J., H.-R. Buser, M. Kahle, M. D. Müller, T. Poiger**, Ubiquitous occurrence of the artificial sweetener acesulfame in the aquatic environment: An ideal chemical marker of domestic wastewater in groundwater, *Environmental Science and Technology*, 43 (2009), pp. 4381–4385.
- [5] **Ens, W., F. Senner, B. Gygax, G. Schlotterbeck**, 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, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406 (2014), pp. 2789–2798.
- [6] **Spoelstra, J., N. D. Senger, S. L. Schiff**, Artificial sweeteners reveal septic system effluent in rural groundwater, *Journal of Environmental Quality*, 46 (2017), pp. 1434–1443.
- [7] **Subedi, B., K. Kannan**, Fate of artificial sweeteners in wastewater treatment plants in New York State, USA, *Environmental Science and Technology*, 48 (2014), pp. 13668–13674.
- [8] **Roy, J. W., D. R. Van Stempvoort, G. Bickerton**, Artificial sweeteners as potential tracers of municipal landfill leachate, *Environmental Pollution*, 184 (2014), pp. 89–93.
- [9] **Benfenati, E., E. Cools, E. Fattore, R. Fanelli**, A GC-MS method for the analysis of fecal and plant sterols in sediment samples, *Chemosphere*, 29 (1994), pp. 1393–1405.
- [10] **Harwood, J. J.**, Molecular markers for identifying municipal, domestic and agricultural sources of organic matter in natural waters, *Chemosphere*, 95 (2014), pp. 3–8.
- [11] **Tran, N. H., J. Hu, J. Li, S. L. Ong**, Suitability of artificial sweeteners as indicators of raw wastewater contamination in surface water and groundwater, *Water Research*, 48 (2014), pp. 433–456.
- [12] **Zirlewagen, J., T. Licha, F. Schiperski, K. Nödler, T. Scheytt**, Use of two artificial sweeteners, cyclamate and acesulfame, to identify and quantify wastewater contributions in a karst spring, *Science of the Total Environment*, 547 (2016), pp. 356–365.

