



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek
Poslijediplomski sveučilišni studij Analitička kemija

Karlo Jambrošić

Pregled analitičkih tehnika u epidemiologiji temeljenoj na analizi otpadnih voda

Identification of biomarkers in wastewater-based epidemiology: Main approaches and analytical methods (Y. Picó i D. Barceló, Trends in Analytical Chemistry 145 (2021) 116465)

Kemijski seminar I

Zagreb, ožujak 2023.

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Biomarkeri i obilježja pristupa identifikacije biomarkera	2
3. Uzorkovanje.....	4
4. Priprema uzorka i ekstrakcija analita	6
4.1. Filtracija	6
4.2. Centrifugiranje	7
4.3. Ekstrakcija na čvrstoj fazi	7
4.4. Ekstrakcija tekuće-tekuće	9
5. Instrumentna analiza	11
5.1. Tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa	11
5.2. Plinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa.....	14
5.3. Ostale metode detekcije	14
6. Zaključak	16
7. Literatura.....	17

1. Uvod

Epidemiologija temeljena na analizi otpadnih voda (engl. *Wastewater-based epidemiology, WBE*) razmjerno je nov i brzorastući pristup za procjenu životnog stila, prehrambenih navika, izloženosti kemikalijama i patogenima te zdravstvenog stanja populacije na temelju analize specifičnih biomarkera koji, nakon izlučivanja iz ljudskog tijela, dospijevaju u komunalnu otpadnu vodu. Koncentracija biomarkera u otpadnim vodama normalizira se prema protoku i broju stanovnika, a dobivene informacije nude alternativni uvid u javnozdravstvene probleme i opće zdravlje promatrane populacije. WBE je inovativan način praćenja potrošnje droga i drugih tvari, odnosno izloženosti okolišnim zagađivačima u stvarnom vremenu, čime se omogućuje lakše razvijanje i implementacija strategija za suzbijanje konzumacije droga, a potencijalno i uvid u neke druge javnozdravstvene probleme.

Koncept WBE razvijen je početkom 2000-ih, prvobitno kao alat za procjenu potrošnje droga promatrane populacije¹. Uz droge, razvijene su metode koje uključuju praćenje legalnih tvari, poput nikotina, alkohola, kofeina i farmaceutskih spojeva, okolišnih zagađivača i bioloških markera, poput virusa, čime se WBE u novije vrijeme potvrdila kao jako koristan i popularan alat za praćenje epidemiološke situacije tijekom pandemije uzorkovane novim koronavirusom SARS-CoV-2²⁻⁴.

Epidemiologija, kao znanost koja se bavi čimbenicima koji utječu na zdravlje i bolest pojedinaca i društava, podatke tradicionalno prikuplja pomoću anketa i/ili upitnika koje ispunjuju sami ispitanici⁵, kao i primjenom metoda koje uključuju analizu bioloških uzoraka pojedinaca (biomonitoring). Nedostatak tradicionalnog pristupa je kompiliranje i vrijeme obrade podataka, pristranost ispunjavanja i česte konfabulacije ako pitanja traže informacije koje mogu sezati dalje u prošlost. S druge strane, studije koje uključuju analizu bioloških tekućina organizacijski su složene, skupe, zahtijevaju etička odobrenja te često ne omogućuju praćenje vremenskih i prostornih trendova. Upravo zbog toga, otpadne vode pružaju neinvazivan, anoniman i objektivan uvid u epidemiologiju populacije u stvarnom vremenu te imaju visok potencijal za značajno poboljšanje našeg razumijevanja javnozdravstvenih problema i brže reagiranje u slučaju emergentnih opasnosti po zdravlje.

U nastavku seminarskog rada bit će detaljnije opisani analitički postupci te instrumentne analize koje se najčešće primjenjuju u WBE.

2. Biomarkeri i obilježja pristupa identifikacije biomarkera

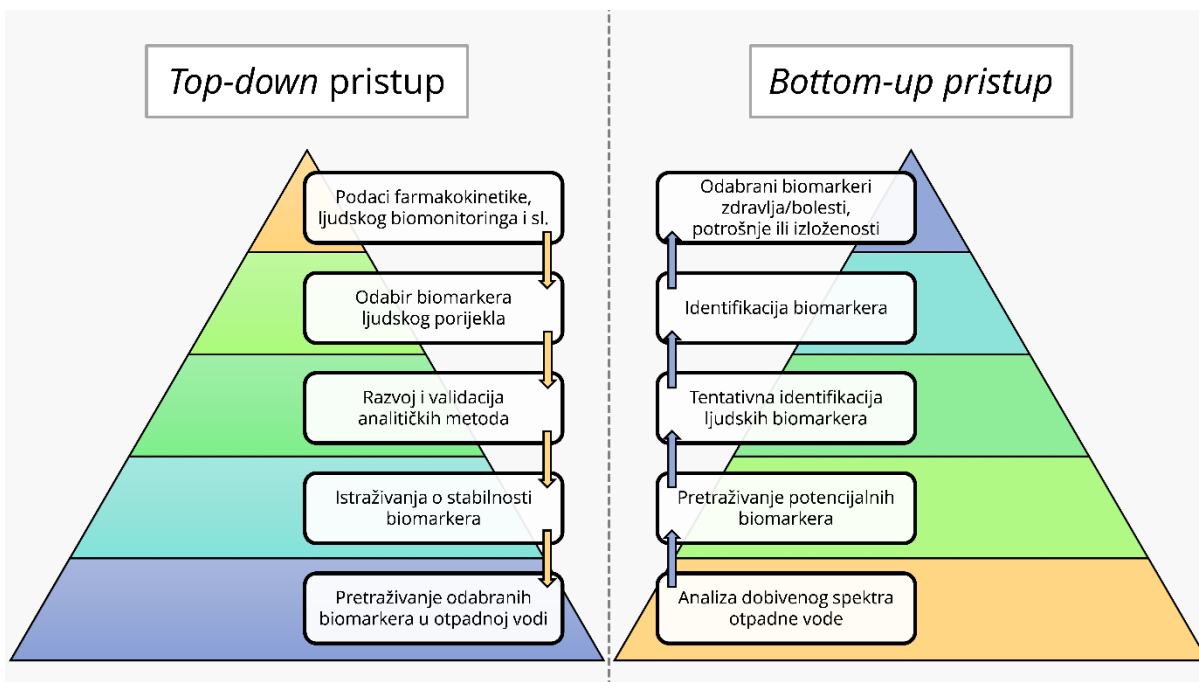
Biomarkeri su kemijske ili biološke tvari koje se mogu koristiti za određivanje prisutnosti ili količine neke tvari ili stanja u tijelu pojedinca. U otpadnim vodama, ljudski biomarkeri mogu pružiti informacije o uporabi droga i drugih tvari, izloženosti okolišnim toksinima i prevalenciji zaraznih i drugih bolesti u populaciji. Najčešće određivani ljudski biomarkeri u otpadnim vodama uključuju droge i njihove metabolite, poput kokaina, heroina i marihuane, kao i farmaceutske proizvode te proizvode za osobnu njegu⁶.

Odabir odgovarajućih biomarkera je ključan korak u WBE. Biomarkeri se moraju pažljivo odabrati kako bi se osigurala točnost te moraju biti dovoljno osjetljivi za otkrivanje promjena u populaciji koja se proučava. Uz to, biomarkeri trebaju biti detektibilni u otpadnim vodama i imati nisku varijabilnost između pojedinaca, kako bi se minimizirale pogreške u analizi podataka. Poželjno je da je ljudski urin njihov primaran izvor i da su koncentracije biomarkera na razini mikrograma po litri uzorka influenta kako bi bili detektibilni i u razrjeđenom uzorku otpadne vode⁷.

Biomarker bi trebao biti specifičan za tvar od interesa i ne reagirati s drugim tvarima koje se mogu pojaviti u uzorku otpadnih voda. Biomarker bi također trebao imati visoku selektivnost, što znači da bi se trebao proizvoditi samo u odgovoru na ciljnu tvar, a ne na druge tvari ili čimbenike. Pritom metaboliti u većini slučajeva imaju prednost kod odabira potencijalnih biomarkera za WBE u odnosu na roditeljske spojeve, koji mogu imati druge izvore u otpadnoj vodi (osim ljudskog metabolizma). Upravo zbog toga se provode istraživanja farmakokinetike biomarkera. Budući da su istraživanja, odnosno podaci o farmakokinetici spojeva vrlo zahtjevni za dobivanje (zbog vremenskih ograničenja i etičkih pitanja), češće se koriste prethodno dobiveni farmakokinetički podaci. Ako oni nisu dostupni, upotrebljavaju se alternativni pristupi dobivanja željenih farmakokinetičkih podataka, koji uključuju *in-vitro* istraživanja pomoću jetrenih enzima i *in-silico* modeliranje koje se provodi računalnim programskim podrškama⁷.

Drugi važan kriterij je stabilnost biomarkera u otpadnim vodama. Biomarker bi trebao ostati stabilan, odnosno nerazgradiv tijekom vremenskog razdoblja od izlučivanja iz ljudskog tijela do njegove analize, što uključuje stabilnost u kanalizacijskom sustavu, kao i tijekom prikupljanja i pohrane uzoraka.

Postoji nekoliko pristupa za identifikaciju biomarkera, a dva najčešće korištena pristupa, analogno identifikaciji proteina, su *top-down* i *bottom-up* (Slika 1.).



Slika 1. Usporedba *Top-down* i *Bottom-up* pristupa

Top-down pristup zahtijeva proučavanje ljudskog metabolizma, identifikaciju tvari izlučenih urinom, odabir onih koje se izlučuju u dovoljno visokom postotku, razvoj analitičke metode koja može detektirati te tvari, proučavanje stabilnosti, a zatim njihovo određivanje u otpadnoj vodi. Ovim pristupom razvijene su razne metode za određivanje koncentracija droga^{8–20}, opioida^{21–23}, novih psihoaktivnih supstanci^{10,24–26}, proizvoda za osobnu njegu¹², farmaceutika^{12,13,27–32}, nikotina^{33–39}, kofeina^{38,39}, alkohola^{36,37,40,41}, umjetnih zaslađivača^{42,43}, pesticida^{28,44,45} te zdravstvenih biomarkera za giht⁴⁶, dijabetes⁴⁷, stres^{48–50} itd. *Top-down* je češće korišten pristup, budući da ciljano istražuje očekivane metabolite, što omogućuje lakše planiranje i analizu.

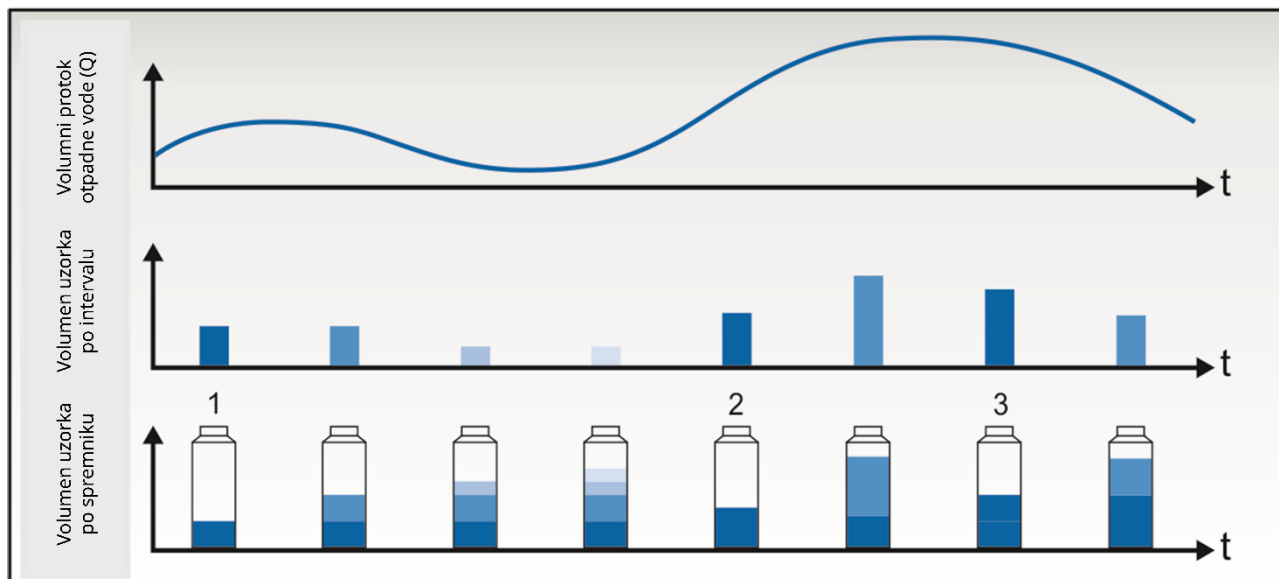
Bottom-up pristup temelji se na neizravnoj analizi cijelog uzorka otpadne vode u kojemu se identificiraju spojevi ljudskog porijekla i istražuju potencijalni biomarkeri prema odgovarajućim kriterijima. Ovim pristupom mogu se identificirati i transformacijski produkti biomarkera, kao i ostali spojevi. Glavni nedostatak *bottom-up* pristupa je zahtjevnost identificiranja spojeva zbog visoke složenosti matrice otpadne vode. Otpadna voda sadrži visok postotak organske tvari te razne metaboličke i razgradne spojeve čije porijeklo nije isključivo čovjek. Usprkos tome, *bottom-up* pristup nudi širu sliku, odnosno uvid u sadržaj otpadne vode, putem čega se mogu prikupiti vrlo vrijedne informacije. Ovim pristupom razvijene su metode za određivanje bisfenola A⁵¹, novih psihoaktivnih supstanci i njihovih transformacijskih produkata^{52–54}, droga¹⁸, markera raka⁵⁵ itd.

3. Uzorkovanje

Epidemiologija temeljena na analizi otpadnih voda bazira se na određivanju koncentracije biomarkera u otpadnoj vodi, kako bismo pouzdano odredili razinu izloženosti tvarima od interesa za praćenu populaciju. Radi reprezentativnosti, pozornost se posebno posvećuje vremenu i uvjetima uzorkovanja otpadne vode. Preporuča se izbjegavanje uzorkovanja nakon razdoblja obilnih padalina, kako bi se umanjio utjecaj razrjeđenja matrice uzorka, što utječe na detekciju i kvantitativno određivanje ciljanih biomarkera u otpadnoj vodi. S druge strane, koncentracije određenih spojeva mogu se i povećati nakon razdoblja padalina, kao što je slučaj kod nikotina. Smatra se da je uzrok porasta koncentracije nikotina ispiranje s gradskih površina koje, između ostaloga, sadrže ostatke cigareta i opuške, što posljedično povećava vrijednosti koncentracija nikotina i nekih drugih organskih tvari u otpadnoj vodi⁵⁶. Budući da se uzorkovanje najčešće provodi na uređajima za obradu otpadne vode, izbjegavaju se događaji poput remonta postrojenja, državni blagdani, festivali i sl., jer mogu dati iskrivljenu sliku promatrane populacije, osim ako je cilj istraživanja specifično usmjeren na praćenje potrošnje, odnosno konzumacije određenih tvari tijekom posebnih događaja, poput tradicijskih manifestacija i festivala⁵⁷.

Najčešća tehnika uzorkovanja otpadne vode je trenutno uzimanje određenog volumena u određenom vremenu. Trenutni uzorak sadrži koncentracije biomarkera otpadne vode u specifičnom vremenu, što može dati nepouzdanu podatke o koncentracijskom profilu. Iz tog razloga, višestruko uzorkovanje se provodi u definiranim vremenskim razmacima pomoću uzorkivača (engl. *autosampler*) pri istim uvjetima (mjesto uzorkovanja, volumen, skladištenje, materijal posude, itd.), a tako prikupljene pojedinačne uzorke kasnije objedinimo u tzv. kompozitni uzorak. Za dobivanje vremenskih trendova, najčešće se prikupljaju 24-satni kompozitni uzorci, uobičajeno kroz više uzastopnih dana (npr. tjedan).

Uzorkovanje proporcionalno protoku otpadne vode pokazalo se kao najpouzdanija tehnika uzorkovanja za osiguravanje točnijeg određivanja razina biomarkera u otpadnoj vodi⁵⁸ (Slika 2.). Također, zbog poteškoća u procjeni veličine populacija, moderni alati, poput nadgledanja aktivnosti na mobilnim uređajima, potencijalno mogu poslužiti za praćenje dinamike stanovništva, odnosno normiranje koncentracija biomarkera⁵⁹.



Slika 2. Shematski prikaz uzorkovanja proporcionalno protoku otpadne vode

Međutim, nedostatak kompozitnog uzorkovanja je nemogućnost praćenja kratkoročnih skokova u koncentracijama određenih biomarkera, koji se mogu dogoditi izvan vremenskog okvira uzorkovanja. Stoga se u novije vrijeme razvijaju i primjenjuju alternativne tehnike, poput pasivnih uzorkivača, koji mogu prevladati ograničenja niskih koncentracija pojedinih biomarkera u otpadnoj vodi, mogućih promjena u protoku te zahtjeva za energijom^{60,61,12}. Pasivni uzorkivači sastoje se od sorpcijskog materijala na bazi polimera koji mogu adsorbirati analite u tragovima tijekom razdoblja dugotrajnog uzorkovanja. Nedostatak pasivnog uzorkivača su teškoće s *in-situ* kalibracijom, slaba robusnost, podložnost pojačanom rastu nepoželjnih bioloških tvari i mogućnost začepjenja membrane uslijed adsorpcije partikulata, što posljedično smanjuje stvarnu vrijednost koncentracije⁶⁰.

McKay i suradnici sličnim su pristupom razvili, kalibrirali i validirali mikroporozne polietilenske cijevi (engl. *Microporous polyethylene tube, MPT*) s multi-modalnim sorbensom (Strata-X u agarozu), s naglaskom na analizu legalnih i ilegalnih droga¹². Ovisno o pristupu i cilju istraživanja, razvijene su razne varijacije pasivnih uzorkivača, s naglaskom na ispitivanje različitih sorbensa ovisno o afinitetu promatranih analita, odnosno zbog smanjenja mogućih interferencija koje sa sobom nosi složena matrica otpadne vode⁶².

Odabir tehnike uzorkovanja ovisi i o istraživačkim ciljevima i raspoloživim resursima za studiju. Učestalost i tip uzorkovanja može se razlikovati ovisno o populaciji, farmakokinetici (metabolički i transformacijski putevi) te specifičnostima kanalizacijskog sustava (složenost matrice)⁶³.

4. Priprema uzorka i ekstrakcija analita

Način skladištenja i pripreme uzorka za daljnju obradu ovisi o stabilnosti ciljanog analita i složenosti matrice otpadne vode. Pravilna pohrana i priprema uzoraka može značajno utjecati na točnost i pouzdanost rezultata. Općenito, uzorci se trebaju pohranjivati na hladnom mjestu kako bi se minimizirao rast mikroorganizama, oksidacija i drugi kemijski procesi. Idealno, trebaju se obraditi što je prije moguće nakon prikupljanja, kako bi se minimizirali gubici ciljanih spojeva ili moguće promjene u sastavu tijekom skladištenja. U nekim se slučajevima neposredno nakon uzorkovanja dodaju reagensi koji povećavaju stabilnost analita tijekom pohrane. Primjerice, u nekim se metodama uzorci zakiseljavaju, čime se smanjuje rast mikroorganizama.⁶⁴

Kod pripreme uzoraka za analizu mogu se primijeniti različite tehnike, koje mogu uključivati filtraciju, centrifugiranje, ekstrakciju na čvrstoj fazi i druge. Izbor metode pripreme ovisi o fizikalno-kemijskim svojstvima spojeva od interesa i osjetljivosti i selektivnosti analitičke tehnike.

4.1. Filtracija

Filtracija je jedna od najčešće primijenjenih tehnika pripreme uzorka u analitičkoj kemiji. U obradi uzorka filtracija se često koristi za uklanjanje velikih čestica i ostataka koji mogu ometati analitička mjerenja, a time se ujedno i štite analitički instrumenti u daljnim postupcima. Kod epidemiologije temeljene na analizi otpadnih voda, filtracija se obično provodi pomoću filtarskih papira ili membrana¹⁹, a izbor papira ili membrane ovisi o vrsti uzorka i veličini čestica koje se žele ukloniti. Filtracijska brzina može se povećati primjenom vakuumskih pumpi, što omogućuje brže i učinkovitije uklanjanje kapljevine iz uzorka. Međutim, važno je paziti na moguće gubitke analita tijekom filtracije uslijed adsorpcije na filtrirane partikulate ili same filter papire, kao i na kontaminaciju uzorka primjenom neodgovarajućih materijala.

U praksi se za uklanjanje krupnijih čestica kod predobrade uzorka otpadne vode često koriste filtri od staklenih vlakana (engl. *Glass-fibre, GF*), budući da uglavnom ne uzrokuju značajne gubitke ciljanih analita⁶⁵, ali ponekad se, ovisno o metodi, upotrebljavaju i filtri od drugih materijala.⁶⁶

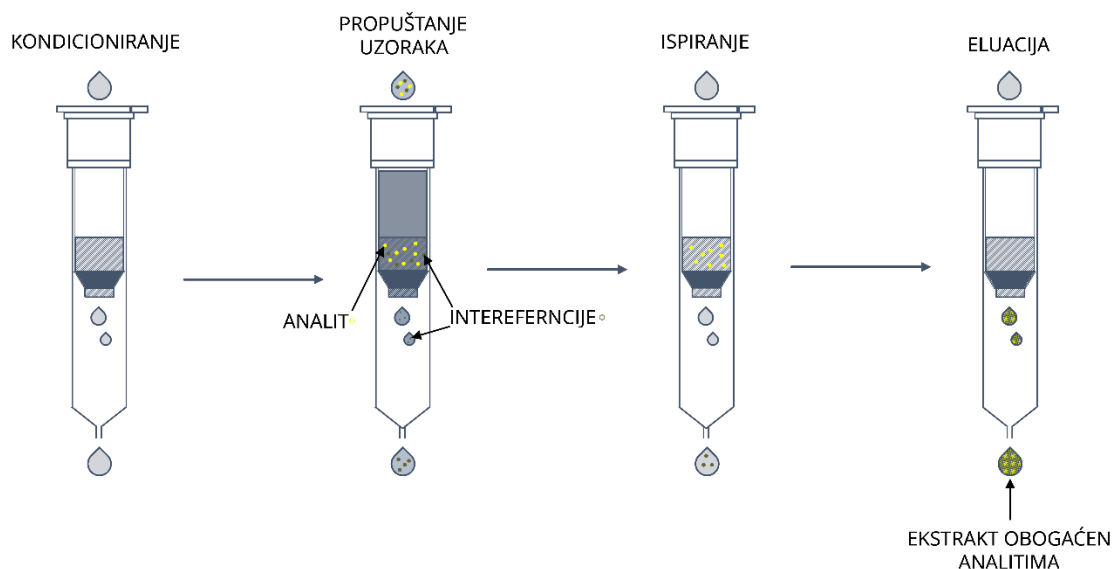
Također se često koriste i filtri manjih dimenzija i veličine pora 0,22 μm ^{33–37,40–42,46} i 0,45 μm ³² od raznih materijala, kao što su GHP (hidrofilni polipropilen) i regenerirana celuloza, za filtraciju završnog ekstrakta prije instrumentne analize.

4.2. Centrifugiranje

Centrifugiranje omogućuje odvajanje čestica i čvrstih tvari od kapljevite faze, čime se olakšava daljnja analitička obrada. Centrifugiranje se obično provodi u brzim rotacijskim uređajima, gdje se uzorak postavlja u centrifugalnu cijev i rotira pri velikim brzinama. Izbor brzine rotacije ovisi o gustoći čestica koje se žele odvojiti od kapljevite faze te je važno paziti na moguće gubitke ili kontaminaciju tijekom centrifugiranja. Kao predobrada za daljnju analizu otpadne vode, najčešća primjena centrifugiranja je kod analize biomarkera alkohola i određenih pesticida, gdje je brzina centrifuge 3500 okretaja u minuti^{17,36,40,41,44}. Nakon centrifugiranja uzorci se najčešće filtriraju i izravno injektiraju na instrument, što je u ovim slučajevima spregnuti sustav tekućinske kromatografije i spektrometrije masa. Za razliku od filtracije, centrifugiranje omogućuje jasno odvajanje dviju faza bez potrebe prolaska uzorka kroz medij poput filtarskog papira ili membrane, čime se umanjuje mogućnost kontaminacije i adsorpcije.

4.3. Ekstrakcija na čvrstoj fazi

Ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *Solid-phase extraction, SPE*) je metoda ekstrakcije analita temeljena na njihovoj adsorpciji na materijale čvrste faze (najčešće u kolonici) i naknadnoj desorpciji otapalima (Slika 3.)



Slika 3. Shematski prikaz ekstrakcije na čvrstoj fazi

Postupak uključuje propuštanje uzorka kroz materijal čvrste faze koji zadržava analit, zatim sušenje kolonice i eluiranje analita prikladnim otapalom, najčešće čistim metanolom^{8-12,18,20,21,23,27,29,30,37,37-39,44,45,50,67-69} ili metanolom s dodatkom amonijaka^{12,15,25,28,70}, odnosno mravlje kiseline^{22,24,47,71} radi bolje elucije. Osim metanola, u literaturi se spominje korištenje smjesa diklormetana, 2-propanola i amonijaka u određenim omjerima za eluciju nekih farmaceutika³², ilegalnih droga¹⁶ te novih psihoaktivnih supstanci²⁶.

Određeni uzorci otpadne vode korigiraju se na nisku pH vrijednost (2 do 5) prije ekstrakcije na čvrstoj fazi kako bi se poboljšala učinkovitost ekstrakcije određenih skupina analita^{8-10,13,18,23,24,27,28,34,36,48,49,68-70,70,72}. Zakiseljavanje pomaže u protoniranju kiselih funkcionalnih skupina na ciljanim analitima, što pospešuje njihovo vezanje na sorbens i čini ih topljivijima u organskom otapalu koje se koristi za SPE. Osim toga, može protonirati moguće ometajuće vrste koje se mogu koeluirati s ciljanim analitima, smanjujući njihovu topljivost u organskoj fazi i poboljšavajući specifičnost ekstrakcije. Mnogi biomarkeri, poput farmaceutika, disruptora endokrinog sustava i proizvoda za osobnu njegu, sadrže karboksilne kiseline, sulfonske kiseline ili fenolne skupine, koje su kiselog karaktera. Navedene kiselinske skupine mogu biti deprotonirane pri bazičnim uvjetima, što smanjuje njihovu topljivost u organskom otapalu koje se koristi za SPE. Iz tog razloga, zakiseljavanje uzorka prije SPE može poboljšati učinkovitost ekstrakcije ovih biomarkera i poboljšati osjetljivost analize.

Osim zakiseljavanja, kod određenih uzoraka upotrebljava se enzim beta-glukuronidaza, koja hidrolizira glukuronidne konjugate određenih skupina analita, poput lijekova i njihovih metabolita, u slobodne oblike^{33,73}. Glukuronidacija je uobičajeni put metabolizma faze II u jetri, gdje se glukuronska kiselina veže s funkcionalnom skupinom na matičnom spoju kako bi se povećala njegova topljivost u vodenoj fazi i olakšalo izlučivanje iz tijela putem urina. Glukuronidi su često polarniji i manje topljivi u organskim otapalima koja se koriste za SPE u usporedbi sa svojim odgovarajućim slobodnim oblicima, što smanjuje analitičke povrate. Dodavanjem beta-glukuronidaze u uzorak prije ekstrakcije, glukuronidni konjugati se mogu hidrolizirati natrag u svoje slobodne oblike, koji su obično topljiviji u organskom otapalu i mogu se učinkovitije eluirati. Ovaj korak hidrolize može poboljšati analitički povrat i osjetljivost analize za neke lijekove i njihove metabolite u uzorcima otpadnih voda.

Također, EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina) se može dodati uzorku otpadne vode prije postupka ekstrakcije na čvrstoj fazi kako bi se spriječila interferencija metalnih kationa. Uzorci otpadne vode mogu sadržavati visoke koncentracije metalnih kationa, koji mogu vezati neke analite

u kelatne komplekse.⁷⁴ To može dovesti do lošeg analitičkog povrata i netočnih rezultata. EDTA je kelirajući agens koji može stvarati komplekse s metalnim kationima, čime se oni uklanjaju iz matrice uzorka te sprječava ometanje SPE procesa^{29,31}. To je posebno važno kada se analiziraju spojevi prisutni u tragovima, kao što je slučaj kod okolišnih uzoraka, gdje čak i male količine metalnih kationa mogu značajno utjecati na dobivene koncentracije promatranih analita.

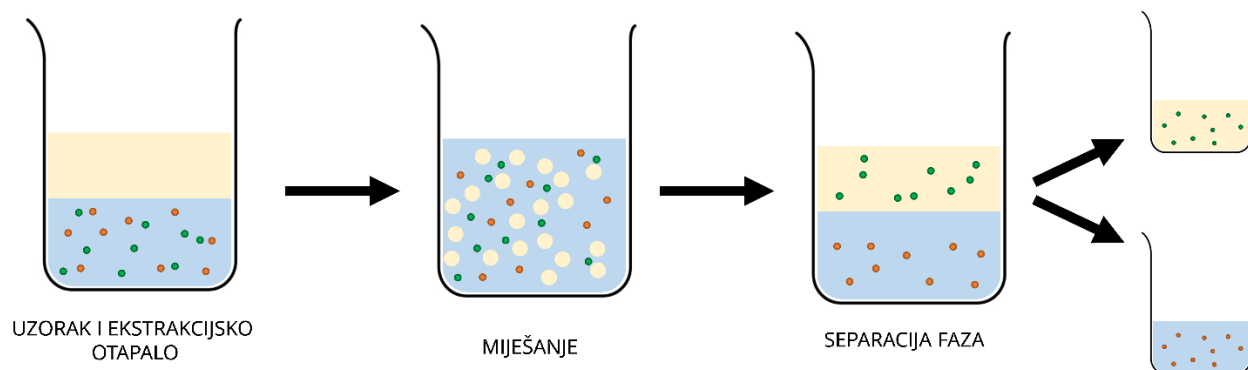
Za pročišćavanje i koncentriranje uzoraka SPE postupkom, uobičajeno se koriste kolonice punjene reverzno-faznim polimernim sorbensom, kao što je Oasis HLB (engl. *Hydrophilic-lipophilic balance*)^{10,11,13,20,22,24,27,30–32,34–38,44,45,50,68,69}. Ovaj polimerni sorbens karakterizira uravnoteženi odnos hidrofilnih i lipofilnih interakcija, što ga čini prikladnim za širok spektar spojeva uz zadovoljavajuće analitičke povrate. Uz kolonice Oasis HLB, koriste se i kolonice Oasis MCX^{9,13,15,20,23,24,28,70}, čije punjenje sadrži funkcionalne skupine s kationskim izmjenjivačem.

Osim HLB i MCX, u literaturi se spominje i korištenje kolonica Strata-X^{15,47}, Tecan Cerex Trace-B¹⁶, Cleanert PCX²⁵, UCT XRADH 506,²⁶ Cleanert PEP2^{27,39} te razne varijacije postojećih sorbena, gdje se u praksi miješa više tipova sorbena za dobivanje optimalnih analitičkih povrata i uspješniju ekstrakciju, poput afinitetnog sorbena za biomarker oksidativnog stresa 8-isoprostan⁷³. Također, prethodno spomenuti pasivni uzorkivači sadrže prilagođene sorbense kojima su postignuti zadovoljavajući rezultati, poput Strata-X u agarozu¹² te tankoslojni pasivni uzorkivač sa sorbensima HLB, XAD 18 te XDA-1⁷⁵.

4.4. Ekstrakcija tekuće-tekuće

Ekstrakcija tekuće-tekuće (engl. *Liquid-liquid extraction, LLE*) jedna je od primjenjenih tehnika u epidemiologiji temeljenoj na analizi otpadnih voda. Ova tehnika omogućuje uklanjanje analita iz uzorka vode i njihovu koncentraciju u organskom otapalu (Slika 4.). Pri provođenju LLE, odabir odgovarajućeg otapala i omjera otapala i vode ključni su čimbenici učinkovitosti ekstrakcije. U uzorke se dodaje određeni volumen organskog otapala ili smjese otapala u nekoliko ciklusa, a najčešće korištena otapala su aceton, acetonitril i metanol, s ili bez dodatka kiseline. Nakon ekstrakcije, organsko otapalo odvaja se od vodene faze, a zatim se otapalo otparava kako bi se dobila koncentrirana otopina analita. Međutim, važno je uzeti u obzir da različiti analiti mogu imati različitu topljivost u otapalima, pa stoga odabir odgovarajućeg otapala za ekstrakciju ovisi o specifičnosti analita koji se želi izolirati. Pravilna primjena LLE, uz optimizaciju uvjeta ekstrakcije i ekstrakcijskih parametara, može biti ključna za dobivanje točnih i pouzdanih rezultata. Iako rjeđe

korištena od SPE, zbog veće potrošnje otapala, LLE je našla primjenu u ekstrakciji metabolita katekolamina pomoću etil acetata uz dodatak natrijevog klorida⁷².



Slika 4. Shematski prikaz ekstrakcije tekuće-tekuće

5. Instrumentna analiza

Uzorci otpadne vode, čija predobrada uključuje prethodno opisane metode, sadrže često vrlo niske koncentracije promatranih spojeva unutar složene matrice uzorka te se za njihovu kvalitativnu i kvantitativnu analizu uglavnom upotrebljavaju visokoosjetljivi i visokoselektivni spregnuti sustavi kromatografije i spektrometrije masa. Podaci dobiveni instrumentnom analizom obrađuju se računalnim programima dostupnima na instrumentu. Kromatografske tehnike koje se koriste u WBE uglavnom uključuju tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (engl. *High performance liquid chromatography, HPLC*), tekućinsku kromatografiju ultra-visoke djelotvornosti (engl. *Ultra-high performance liquid chromatography, UHPLC*) te plinsku kromatografiju (engl. *Gas chromatography, GC*).

5.1. Tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa

Tekućinska kromatografija u kombinaciji sa spektrometrijom masa (LC-MS) smatra se vodećom metodom u instrumentnoj analizi okolišnih uzoraka. Metabolizirani spojevi koje izlučujemo urinom su obično polarniji od njihovih izvornih spojeva, što LC-MS čini vrlo pogodnom instrumentnom tehnikom za analizu otpadne vode. Prednosti analize LC-MS sustavom uključuju kratko vrijeme analize, fleksibilnost metode i sposobnost istodobne analize velikog broja spojeva uz visoku selektivnost i osjetljivost.

U WBE, LC-MS analizi često prethodi korak pročišćavanja i ukoncentriravanja pomoću SPE zbog razmjerno niske koncentracije većine biomarkera u otpadnoj vodi. Pojedine biomarkere, koje nalazimo u višim koncentracijama u otpadnoj vodi, poput etil sulfata^{36,37,40,41} (biomarker za potrošnju etilnog alkohola), možemo injektirati izravno, uz prethodnu mehaničku obradu (filtracija, centrifugiranje, itd.) kako ne bi došlo do oštećenja i/ili začepljenja sustava.

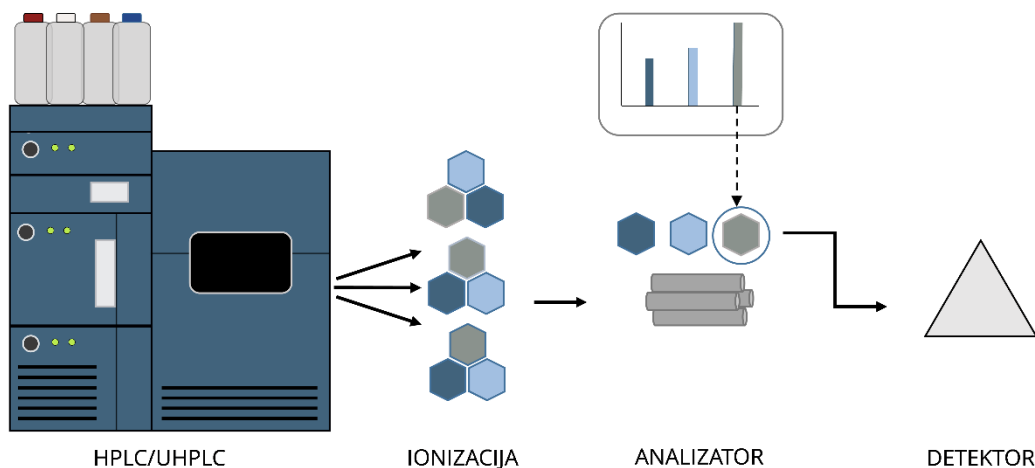
Popularni odabir LC sustava za instrumentnu analizu otpadne vode uključuje tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (HPLC)^{8,12-14,16-18,20-22,24-30,32,33,33-36,36,37,37,38,40-46,48-50,67,70-73} ili tekućinsku kromatografiju ultravisoke djelotvornosti (UHPLC)^{10,11}. UHPLC kolone imaju manji promjer punila u usporedbi s HPLC kolonama, što povećava kromatografsku razlučivost i značajno skraćuje vrijeme analize. Kod analize ciljanih spojeva u WBE primjenjuje se kromatografija obrnutih faza, gdje nepokretna faza sadrži modificirane nepolarne C18 lance na površini punila^{11,16,20,24,27-32,34,35,44,50,70,73}, a pokretna faza je kombinacija ultračiste vode i organskog otapala,

s ili bez dodatka kiseline, soli ili pufera. Osim C18, korištene su i druge modifikacije površine punila poput bifenilne skupine^{10,12,16,26,36,48,49,67,71}, pentafluorfenilpropila (PFPP)³⁷ itd.

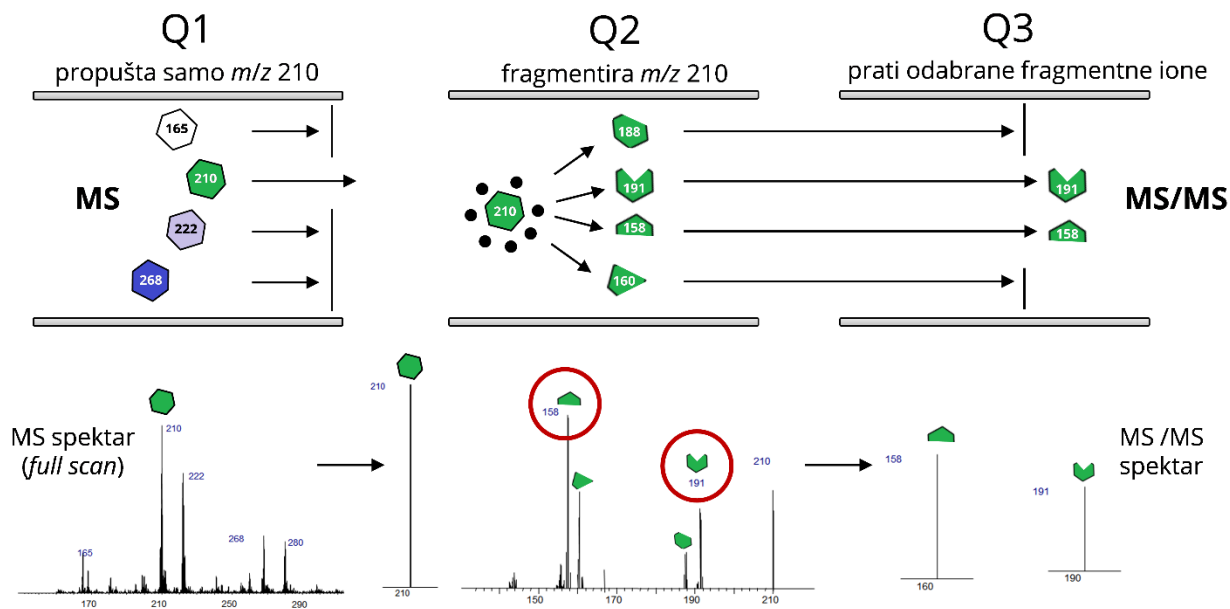
U situacijama gdje rezultati reverznofazne kromatografije nisu zadovoljavajući, svoju primjenu pronašla je kromatografija hidrofilnih interakcija (engl. *Hydrophilic interaction chromatography, HILIC*), metoda koja omogućuje bolje zadržavanje polarnih i nabijenih spojeva. HILIC je korisna tehnika za razdvajanje vrlo polarnih spojeva poput alkaloida.²⁵

Nakon provedenog razdvajanja u tekućinskom kromatografu, analiti su otopljeni u velikom volumenu otapala, što nije prikladno za spektrometriju masa, koja se provodi u uvjetima visokog vakuuma. Ionizacija elektroraspršenjem (engl. *Electrospray ionization, ESI*) najčešće je korištena metoda „meke“ ionizacije u LC-MS sustavima, koja se koristi za prevođenje analita u plinsku fazu i ionizaciju polarnih nehlapljivih organskih molekula. Većina biomarkera otpadnih voda je bazičnog, odnosno neutralnog karaktera, što omogućava laku detekciju u pozitivnom polaritetu ionizacije. Također, ne smije se zanemariti da se određeni spojevi poput metabolita stresa, ftalata, pojedinih farmaceutika i biomarkera alkohola određuju u negativnom polaritetu ionizacije^{12,27,30,31,36,37,40,41,49,50,67,73}.

Kada su analiti pretvoreni u ionski oblik, ulaze u MS sustav gdje se dodatno razdvajaju i fragmentiraju u analizatoru masa (Slika 5.). Kod WBE, najčešći analizator masa je trostruki kvadrupol (QQQ)^{11,16,20,24,27–32,34,35,44,50,70,73}, koji se često koristi u tandemnoj spektrometriji u MRM (engl. *Multi-reaction monitoring*) načinu rada (Slika 6.), što omogućuje selektivnu analizu odabranih tranzicija specifičnih za analiziranu komponentu, uz visoku osjetljivost i selektivnost.



Slika 5. Shematski prikaz LC-MS sustava



Slika 6. Shematski prikaz MRM načina rada

Osim QqQ, koriste se i drugi analizatori, poput ionske stupice spregnute s kvadrupolom (engl. *Quadrupole-linear Ion Trap-Mass Spectrometry, QTRAP*)^{12,14,27,28,30,31,38,46,48,49} te analizatora s vremenom preleta spregnutog s kvadrupolom (engl. *Quadrupole Time-of-Flight, QToF*)^{51,55,76}.

QTRAP tehnologija temelji se na istom principu kao trostruki kvadrupol, gdje je treći kvadrupol konfiguriran kao linearna ionska stupica (engl. *Linear ion trap, LIT*), kako bi se poboljšala kvalitativna funkcija snimanja. Dodatkom LIT-a omogućuje se istovremeno snimanje cijelog zadanog raspona masa (tzv. *Full scan*) i točno traženih tranzicija kako je postavljeno u MS metodi.

QToF se primjenjuje kod kvalitativne analize uzorka otpadne vode jer omogućuje visoku masenu rezoluciju i preciznost mase u cijelom rasponu. Na taj način dobiva se šira slika, s mogućnošću detekcije i identifikacije nepoznatih i/ili neočekivanih spojeva, tj. opsežnija analiza složene matrice uzorka otpadne vode, što je poželjno posebice kod *bottom-up* pristupa identifikacije biomarkera.

Primjena LC-MS tehnika za kvantitativnu analizu može biti ograničena promjenama intenziteta signala u uzorcima otpadne vode zbog složene matrice, što otežava kvantitativno određivanje putem vanjskih (eksternih) kalibracijskih krivulja. Stoga se često koristi metoda dodatka unutarnjeg (internog) standarda, koji bi trebao biti izotopno obilježeni analog, zbog sličnih fizikalno-kemijskih svojstava i ponašanja, a koji bi trebalo dodati u uzorak na početku pripreme kako bi se kompenzirali svi potencijalni gubici tijekom pripreme uzorka, kao i utjecaji matrice⁷⁷. Ako takav standard nije dostupan, odabire se spoj sličnih fizikalno-kemijskih svojstava, pri čemu je bitno da se taj spoj ne nalazi u originalnom uzorku.

5.2. Plinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa

Plinska kromatografija temelji se na istom principu kao i tekućinska kromatografija. Komponente otpadne vode odvajaju se na temelju njihovih afiniteta prema zadržavanju na nepokretnoj fazi. Pokretna faza je inertni plin nosač u koji se ubrizgava uzorak. Nepokretna faza je punilo kolone čije su čestice često prekrivene mikroskopskim slojem viskozne tekućine. Najčešće odabrana kolona za određivanje biomarkera u uzorcima otpadne vode je HP-1 kolona, koja sadrži punilo od dimetilpolisiloksana^{9,39,47}. Za ionizaciju se koristi snažna tehnika ionizacije elektronskim udarom (engl. *Electron impact, EI*), koja daje stabilne odzive.

Upotreba plinske kromatografije spregnute sa spektrometrom masa u analizi otpadne vode manje je popularna metoda u odnosu na LC-MS zbog toga što većina spojeva od interesa nisu termički stabilni, odnosno hlapivi. Stoga, GC-MS analizi najčešće prethodi derivatizacija spojeva, čime se kemijskim postupkom mijenjaju svojstva, odnosno struktura analita za bolje razdvajanje i povećanje osjetljivosti metode⁷⁸. Prema literaturi, derivatizacijski agensi koji su pronašli primjenu u WBE kod analize metamfetamina i metformina (biomarker dijabetesa) su trifluoroocetna kiselina (TFA)⁹ i *N*-metil-bis(trifluoroacetamid) (MBTFA)^{39,47}. TFA se uobičajeno koristi za derivatizaciju karboksilnih kiselina, alkohola, amina i tiola, dok se MBTFA koristi za derivatizaciju primarnih i sekundarnih amina te tiola⁷⁸. Prednost GC metode je manji volumen injektiranja u odnosu na LC, što posljedično smanjuje potrošnju uzorka i utjecaj opterećene matrice otpadne vode. Osim toga, derivatizacija doprinosi selektivnosti i osjetljivosti metode⁴⁷.

5.3. Ostale metode detekcije

U literaturi se spominje korištenje raznih tipova biosenzora, koji su se pokazali kao koristan alat u WBE^{8,79,80}. Različite izvedbe biosenzora su u fazi istraživanja radi određivanja koncentracije teških metala, organskih onečišćujućih tvari, farmaceutika, biomolekula, peptida, proteina, virusa, gena antibiotske rezistencije, itd.⁸⁰

Papirnati mikrofluidički senzori predstavljaju inovativnu tehnologiju za manipulaciju malim volumenima uzoraka i detekciju različitih vrsta analita. Prednost takve tehnologije je smanjenje potrebnih količina uzoraka, kemijskih reagensa, kao i redukcija potrebne infrastrukture prilikom medicinske dijagnostike. Analogno medicinskoj dijagnostici, aptasenzori su biosenzori koji koriste aptamere kao prepoznavajuće elemente za kemijsko vezanje. Aptameri su molekule kratkih

jednolančanih nukleinskih kiselina (oligonukleotidi, odnosno peptidi) koje imaju visok afinitet za specifičnu tvar⁸⁰.

Također, razvijena je kolorimetrijska metoda temeljena na neagregirajućim nanočesticama plemenitih metala (AuNPs – nanočestice zlata i Au@Ag-čestice zlata i srebra) za određivanje koncentracije droga¹⁹.

6. Zaključak

WBE je nov i obećavajući alat za procjenu zdravlja i ponašanja stanovništva na temelju analize specifičnih biomarkera u otpadnim vodama. Ovom metodologijom omogućuje se brzo i neinvazivno prikupljanje podataka o potrošnji droga, lijekova, prehrani, bolestima i drugim aspektima života stanovništva na određenom području. WBE također može služiti kao rano upozorenje za izbijanje zaraznih bolesti ili kemijskog onečišćenja okoliša. Koncentracija biomarkera u otpadnim vodama normalizira se prema protoku i broju stanovnika, kako bi se dobila procjena potrošnje ili opterećenja po glavi stanovnika. Prednosti u odnosu na tradicionalne epidemiološke metode, poput anketa i/ili kliničkih studija, su manji troškovi, kraće vrijeme obuhvata rezultata, manja vjerojatnost pogreške zbog pristranosti ispitanika i odabranog uzorka populacije.

Za analizu biomarkera u otpadnim vodama uglavnom su korištene dvije glavne analitičke metode: SPE i HPLC-MS/MS. SPE omogućuje koncentriranje i pročišćavanje biomarkera iz uzoraka otpadnih voda, dok je HPLC-MS/MS metoda koja omogućuje razdvajanje, identifikaciju i kvantitativno određivanje ciljanih biomarkera.

Međutim, WBE također ima neke izazove i ograničenja, poput složenosti uzorkovanja i analize otpadnih voda, utjecaja raznih čimbenika na sudbinu i ponašanje biomarkera u kanalizacijskom sustavu, nedostatka standardiziranih protokola i smjernica za provedbu WBE studija te etičkih i regulatornih pitanja vezanih uz privatnost i informiranost stanovništva. Unatoč tim izazovima, WBE ima veliki potencijal za budući razvoj i primjenu u različitim područjima javnog zdravstva, okoliša i društvenih znanosti.

7. Literatura

- (1) *Pharmaceuticals and Care Products in the Environment: Scientific and Regulatory Issues*; Daughton, C. G., Jones-Lepp, T. L., Eds.; ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC, 2001; Vol. 791. <https://doi.org/10.1021/bk-2001-0791>.
- (2) Li, Q.; Lee, B. E.; Gao, T.; Qiu, Y.; Ellehoj, E.; Yu, J.; Diggle, M.; Tipples, G.; Maal-Bared, R.; Hinshaw, D.; Sikora, C.; Ashbolt, N. J.; Talbot, J.; Hrudehy, S. E.; Pang, X. Number of COVID-19 Cases Required in a Population to Detect SARS-CoV-2 RNA in Wastewater in the Province of Alberta, Canada: Sensitivity Assessment. *J. Environ. Sci.* **2023**, *125*, 843–850. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2022.04.047>.
- (3) Perez-Zabaleta, M.; Archer, A.; Khatami, K.; Jafferli, M. H.; Nandy, P.; Atasoy, M.; Birgersson, M.; Williams, C.; Cetecioglu, Z. Long-Term SARS-CoV-2 Surveillance in the Wastewater of Stockholm: What Lessons Can Be Learned from the Swedish Perspective? *Sci. Total Environ.* **2023**, *858*, 160023. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.160023>.
- (4) Zhang, X.; Zhang, L.; Wang, Y.; Zhang, M.; Zhou, J.; Liu, X.; Wang, Y.; Qu, C.; Han, W.; Hou, M.; Deng, F.; Luo, Y.; Mao, Y.; Gu, W.; Dong, Z.; Pan, Y.; Zhang, D.; Tang, S.; Zhang, L. Detection of the SARS-CoV-2 Delta Variant in the Transboundary Rivers of Yunnan, China. *ACS EST Water* **2022**, *2* (12), 2367–2377. <https://doi.org/10.1021/acsestwater.2c00224>.
- (5) Safdar, N.; Abbo, L. M.; Knobloch, M. J.; Seo, S. K. Research Methods in Healthcare Epidemiology: Survey and Qualitative Research. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **2016**, *37* (11), 1272–1277. <https://doi.org/10.1017/ice.2016.171>.
- (6) Choi, P. M.; Li, J.; Gao, J.; O'Brien, J. W.; Thomas, K. V.; Thai, P. K.; Jiang, G.; Mueller, J. F. Considerations for Assessing Stability of Wastewater-Based Epidemiology Biomarkers Using Biofilm-Free and Sewer Reactor Tests. *Sci. Total Environ.* **2020**, *709*, 136228. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136228>.
- (7) Gracia-Lor, E.; Castiglioni, S.; Bade, R.; Been, F.; Castrignanò, E.; Covaci, A.; González-Mariño, I.; Hapeshi, E.; Kasprzyk-Hordern, B.; Kinyua, J.; Lai, F. Y.; Letzel, T.; Lopardo, L.; Meyer, M. R.; O'Brien, J.; Ramin, P.; Rousis, N. I.; Rydevik, A.; Ryu, Y.; Santos, M. M.; Senta, I.; Thomaidis, N. S.; Veloutsou, S.; Yang, Z.; Zuccato, E.; Bijlsma, L. Measuring Biomarkers in Wastewater as a New Source of Epidemiological Information: Current State and Future Perspectives. *Environ. Int.* **2017**, *99*, 131–150. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.12.016>.
- (8) Mao, K.; Yang, Z.; Zhang, H.; Li, X.; Cooper, J. M. Paper-Based Nanosensors to Evaluate Community-Wide Illicit Drug Use for Wastewater-Based Epidemiology. *Water Res.* **2021**, *189*, 116559. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116559>.
- (9) Shao, X.-T.; Liu, Y.-S.; Tan, D.-Q.; Wang, Z.; Zheng, X.-Y.; Wang, D.-G. Methamphetamine Use in Typical Chinese Cities Evaluated by Wastewater-Based Epidemiology. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2020**, *27* (8), 8157–8165. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-07504-w>.
- (10) Montgomery, A. B.; O'Rourke, C. E.; Subedi, B. Basketball and Drugs: Wastewater-Based Epidemiological Estimation of Discharged Drugs during Basketball Games in Kentucky. *Sci. Total Environ.* **2021**, *752*, 141712. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141712>.
- (11) Ferreira Aldo Pacheco. Illicit Drugs in Wastewater Treatment Plants Utilization of Wastewater-Based Epidemiology in a Brazilian Regional City. *World J. Adv. Res. Rev.* **2020**, *6* (1), 006–018. <https://doi.org/10.30574/wjarr.2020.6.1.0069>.
- (12) McKay, S.; Tschärke, B.; Hawker, D.; Thompson, K.; O'Brien, J.; Mueller, J. F.; Kaserzon, S. Calibration and Validation of a Microporous Polyethylene Passive Sampler for Quantitative Estimation of Illicit Drug and Pharmaceutical and Personal Care Product (PPCP) Concentrations in Wastewater Influent. *Sci. Total Environ.* **2020**, *704*, 135891. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135891>.
- (13) Kim, K. Y.; Oh, J.-E. Evaluation of Pharmaceutical Abuse and Illicit Drug Use in South Korea by Wastewater-Based Epidemiology. *J. Hazard. Mater.* **2020**, *396*, 122622. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122622>.
- (14) Mastroianni, N.; López-García, E.; Postigo, C.; Barceló, D.; López de Alda, M. Five-Year Monitoring of

- 19 Illicit and Legal Substances of Abuse at the Inlet of a Wastewater Treatment Plant in Barcelona (NE Spain) and Estimation of Drug Consumption Patterns and Trends. *Sci. Total Environ.* **2017**, *609*, 916–926. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.126>.
- (15) Bijlsma, L.; Picó, Y.; Andreu, V.; Celma, A.; Estévez-Danta, A.; González-Mariño, I.; Hernández, F.; López de Alda, M.; López-García, E.; Marcé, R. M.; Miró, M.; Montes, R.; Pérez de San Román-Landa, U.; Pitarch, E.; Pocurull, E.; Postigo, C.; Prieto, A.; Rico, A.; Rodil, R.; Valcárcel, Y.; Ventura, M.; Quintana, J. B. The Embodiment of Wastewater Data for the Estimation of Illicit Drug Consumption in Spain. *Sci. Total Environ.* **2021**, *772*, 144794. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144794>.
- (16) Lemas, D. J.; Loop, M. S.; Duong, M.; Schleffer, A.; Collins, C.; Bowden, J. A.; Du, X.; Patel, K.; Ciesielski, A. L.; Ridge, Z.; Wagner, J.; Subedi, B.; Delcher, C. Estimating Drug Consumption during a College Sporting Event from Wastewater Using Liquid Chromatography Mass Spectrometry. *Sci. Total Environ.* **2021**, *764*, 143963. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143963>.
- (17) Daglioglu, N.; Guzel, E. Y.; Atasoy, A.; Gören, İ. E. Comparison of Community Illicit Drug Use in 11 Cities of Turkey through Wastewater-Based Epidemiology. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2021**, *28* (12), 15076–15089. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11404-9>.
- (18) Boogaerts, T.; Jurgelaitiene, L.; Dumitrascu, C.; Kasprzyk-Hordern, B.; Kannan, A.; Been, F.; Emke, E.; de Voogt, P.; Covaci, A.; van Nuijs, A. L. N. Application of Wastewater-Based Epidemiology to Investigate Stimulant Drug, Alcohol and Tobacco Use in Lithuanian Communities. *Sci. Total Environ.* **2021**, *777*, 145914. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145914>.
- (19) Mao, K.; Ma, J.; Li, X.; Yang, Z. Rapid Duplexed Detection of Illicit Drugs in Wastewater Using Gold Nanoparticle Conjugated Aptamer Sensors. *Sci. Total Environ.* **2019**, *688*, 771–779. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.325>.
- (20) Castiglioni, S.; Salgueiro-González, N.; Bijlsma, L.; Celma, A.; Gracia-Lor, E.; Beldean-Galea, M. S.; Mackulák, T.; Emke, E.; Heath, E.; Kasprzyk-Hordern, B.; Petkovic, A.; Poretti, F.; Rangelov, J.; Santos, M. M.; Sremački, M.; Styszko, K.; Hernández, F.; Zuccato, E. New Psychoactive Substances in Several European Populations Assessed by Wastewater-Based Epidemiology. *Water Res.* **2021**, *195*, 116983. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.116983>.
- (21) Duvall, C.; Hayes, B. D.; Erickson, T. B.; Chai, P. R.; Matus, M. Mapping Community Opioid Exposure Through Wastewater-Based Epidemiology as a Means to Engage Pharmacies in Harm Reduction Efforts. *Prev. Chronic. Dis.* **2020**, *17*, 200053. <https://doi.org/10.5888/pcd17.200053>.
- (22) Boogaerts, T.; Quireyns, M.; Covaci, A.; De Loof, H.; van Nuijs, A. L. N. Analytical Method for the Simultaneous Determination of a Broad Range of Opioids in Influent Wastewater: Optimization, Validation and Applicability to Monitor Consumption Patterns. *Talanta* **2021**, *232*, 122443. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122443>.
- (23) Cruz-Cruz, C.; Yargeau, V.; Vidaña-Perez, D.; Schilman, A.; Pineda, M. A.; Lobato, M.; Hernández-Avila, M.; Villatoro, J. A.; Barrientos-Gutierrez, T. Opioids, Stimulants, and Depressant Drugs in Fifteen Mexican Cities: A Wastewater-Based Epidemiological Study. *Int. J. Drug Policy* **2021**, *88*, 103027. <https://doi.org/10.1016/j.drugpo.2020.103027>.
- (24) Christophoridis, C.; Veloutsou, S.; Mitsika, E.; Zacharis, C. K.; Christia, C.; Raikos, N.; Fytianos, K. Determination of Illicit Drugs and Psychoactive Pharmaceuticals in Wastewater from the Area of Thessaloniki (Greece) Using LC–MS/MS: Estimation of Drug Consumption. *Environ. Monit. Assess.* **2021**, *193* (5), 249. <https://doi.org/10.1007/s10661-021-09035-9>.
- (25) Huang, H.; Wang, T.; Han, S.; Bai, Y.; Li, X. Occurrence of Areca Alkaloids in Wastewater of Major Chinese Cities. *Sci. Total Environ.* **2021**, *783*, 146961. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146961>.
- (26) Bade, R.; White, J. M.; Gerber, C. How the Recreational Stimulant Market Has Changed: Case Study in Adelaide, Australia 2016–2019. *Sci. Total Environ.* **2021**, *757*, 143728. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143728>.
- (27) Zhang, Y.; Duan, L.; Wang, B.; Liu, C. S.; Jia, Y.; Zhai, N.; Blaney, L.; Yu, G. Efficient Multiresidue Determination Method for 168 Pharmaceuticals and Metabolites: Optimization and Application to Raw Wastewater, Wastewater Effluent, and Surface Water in Beijing, China. *Environ. Pollut.* **2020**, *261*, 114113. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114113>.

- (28) Riva, F.; Castiglioni, S.; Pacciani, C.; Zuccato, E. Testing Urban Wastewater to Assess Compliance with Prescription Data through Wastewater-Based Epidemiology: First Case Study in Italy. *Sci. Total Environ.* **2020**, *739*, 139741. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139741>.
- (29) Zhang, Y.; Duan, L.; Wang, B.; Du, Y.; Cagnetta, G.; Huang, J.; Blaney, L.; Yu, G. Wastewater-Based Epidemiology in Beijing, China: Prevalence of Antibiotic Use in Flu Season and Association of Pharmaceuticals and Personal Care Products with Socioeconomic Characteristics. *Environ. Int.* **2019**, *125*, 152–160. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.01.061>.
- (30) Yan, J.; Lin, W.; Gao, Z.; Ren, Y. Use of Selected NSAIDs in Guangzhou and Other Cities in the World as Identified by Wastewater Analysis. *Chemosphere* **2021**, *279*, 130529. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130529>.
- (31) Escolà Casas, M.; Schröter, N. S.; Zammit, I.; Castaño-Trias, M.; Rodríguez-Mozaz, S.; Gago-Ferrero, P.; Corominas, L. Showcasing the Potential of Wastewater-Based Epidemiology to Track Pharmaceuticals Consumption in Cities: Comparison against Prescription Data Collected at Fine Spatial Resolution. *Environ. Int.* **2021**, *150*, 106404. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106404>.
- (32) Lei, H.-J.; Yang, B.; Ye, P.; Yang, Y.-Y.; Zhao, J.-L.; Liu, Y.-S.; Xie, L.; Ying, G.-G. Occurrence, Fate and Mass Loading of Benzodiazepines and Their Transformation Products in Eleven Wastewater Treatment Plants in Guangdong Province, China. *Sci. Total Environ.* **2021**, *755*, 142648. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142648>.
- (33) Montes, R.; Rodil, R.; Rico, A.; Cela, R.; González-Mariño, I.; Hernández, F.; Bijlsma, L.; Celma, A.; Picó, Y.; Andreu, V.; de Alda, M. L.; López-García, E.; Postigo, C.; Pocurull, E.; Marcé, R. M.; Rosende, M.; Olivares, M.; Valcárcel, Y.; Quintana, J. B. First Nation-Wide Estimation of Tobacco Consumption in Spain Using Wastewater-Based Epidemiology. *Sci. Total Environ.* **2020**, *741*, 140384. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140384>.
- (34) Zheng, Q.; Eaglesham, G.; Tschärke, B. J.; O'Brien, J. W.; Li, J.; Thompson, J.; Shimko, K. M.; Reeks, T.; Gerber, C.; Thomas, K. V.; Thai, P. K. Determination of Anabasine, Anatabine, and Nicotine Biomarkers in Wastewater by Enhanced Direct Injection LC-MS/MS and Evaluation of Their in-Sewer Stability. *Sci. Total Environ.* **2020**, *743*, 140551. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140551>.
- (35) Zheng, Q.; Gartner, C.; Tschärke, B. J.; O'Brien, J. W.; Gao, J.; Ahmed, F.; Thomas, K. V.; Mueller, J. F.; Thai, P. K. Long-Term Trends in Tobacco Use Assessed by Wastewater-Based Epidemiology and Its Relationship with Consumption of Nicotine Containing Products. *Environ. Int.* **2020**, *145*, 106088. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106088>.
- (36) Gao, J.; Zheng, Q.; Lai, F. Y.; Gartner, C.; Du, P.; Ren, Y.; Li, X.; Wang, D.; Mueller, J. F.; Thai, P. K. Using Wastewater-Based Epidemiology to Estimate Consumption of Alcohol and Nicotine in Major Cities of China in 2014 and 2016. *Environ. Int.* **2020**, *136*, 105492. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105492>.
- (37) Yavuz Guzel, E.; Atasoy, A.; Gören, İ. E.; Daglioglu, N. Estimation of Alcohol and Nicotine Consumption in 11 Cities of Turkey Using Wastewater-based Epidemiology. *Drug Test. Anal.* **2021**, *13* (4), 853–861. <https://doi.org/10.1002/dta.2979>.
- (38) Gracia-Lor, E.; Rousis, N. I.; Zuccato, E.; Castiglioni, S. Monitoring Caffeine and Nicotine Use in a Nationwide Study in Italy Using Wastewater-Based Epidemiology. *Sci. Total Environ.* **2020**, *747*, 141331. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141331>.
- (39) Shao, X.-T.; Cong, Z.-X.; Liu, S.-Y.; Wang, Z.; Zheng, X.-Y.; Wang, D.-G. Spatial Analysis of Metformin Use Compared with Nicotine and Caffeine Consumption through Wastewater-Based Epidemiology in China. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2021**, *208*, 111623. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111623>.
- (40) Daglioglu, N.; Atasoy, A.; Asadi, A.; Guzel, E. Y.; Dengiz, H. Estimating Alcohol Consumption by Using Wastewater-Based Epidemiology in Adana Province, Turkey. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2020**, *27* (25), 31884–31891. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09056-w>.
- (41) Salgueiro-González, N.; Rousis, N. I.; Gracia-Lor, E.; Borsotti, A.; Zuccato, E.; Castiglioni, S. First Comprehensive Study of Alcohol Consumption in Italy Using Wastewater-Based Epidemiology. *Sci. Total Environ.* **2021**, *776*, 145863. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145863>.

- (42) Li, D.; O'Brien, J. W.; Tschärke, B. J.; Choi, P. M.; Ahmed, F.; Thompson, J.; Mueller, J. F.; Sun, H.; Thomas, K. V. Trends in Artificial Sweetener Consumption: A 7-Year Wastewater-Based Epidemiology Study in Queensland, Australia. *Sci. Total Environ.* **2021**, *754*, 142438. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142438>.
- (43) 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.* **2020**, *184*, 116124. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116124>.
- (44) Rousis, N. I.; Gracia-Lor, E.; Reid, M. J.; Baz-Lomba, J. A.; Ryu, Y.; Zuccato, E.; Thomas, K. V.; Castiglioni, S. Assessment of Human Exposure to Selected Pesticides in Norway by Wastewater Analysis. *Sci. Total Environ.* **2020**, *723*, 138132. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138132>.
- (45) Devault, D. A.; Karolak, S.; Lévi, Y.; Rousis, N. I.; Zuccato, E.; Castiglioni, S. Exposure of an Urban Population to Pesticides Assessed by Wastewater-Based Epidemiology in a Caribbean Island. *Sci. Total Environ.* **2018**, *644*, 129–136. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.250>.
- (46) Ahmed, F.; Tschärke, B.; O'Brien, J. W.; Zheng, Q.; Thompson, J.; Mueller, J. F.; Thomas, K. V. Wastewater-Based Prevalence Trends of Gout in an Australian Community over a Period of 8 Years. *Sci. Total Environ.* **2021**, *759*, 143460. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143460>.
- (47) Xiao, Y.; Shao, X.-T.; Tan, D.-Q.; Yan, J.-H.; Pei, W.; Wang, Z.; Yang, M.; Wang, D.-G. Assessing the Trend of Diabetes Mellitus by Analyzing Metformin as a Biomarker in Wastewater. *Sci. Total Environ.* **2019**, *688*, 281–287. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.117>.
- (48) Choi, P. M.; Bowes, D. A.; O'Brien, J. W.; Li, J.; Halden, R. U.; Jiang, G.; Thomas, K. V.; Mueller, J. F. Do Food and Stress Biomarkers Work for Wastewater-Based Epidemiology? A Critical Evaluation. *Sci. Total Environ.* **2020**, *736*, 139654. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139654>.
- (49) O'Brien, J. W.; Choi, P. M.; Li, J.; Thai, P. K.; Jiang, G.; Tschärke, B. J.; Mueller, J. F.; Thomas, K. V. Evaluating the Stability of Three Oxidative Stress Biomarkers under Sewer Conditions and Potential Impact for Use in Wastewater-Based Epidemiology. *Water Res.* **2019**, *166*, 115068. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115068>.
- (50) Sims, N.; Rice, J.; Kasprzyk-Hordern, B. An Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Method for Oxidative Stress Biomarker Analysis in Wastewater. *Anal. Bioanal. Chem.* **2019**, *411* (11), 2261–2271. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-01667-8>.
- (51) Lopardo, L.; Petrie, B.; Proctor, K.; Youdan, J.; Barden, R.; Kasprzyk-Hordern, B. Estimation of Community-Wide Exposure to Bisphenol A via Water Fingerprinting. *Environ. Int.* **2019**, *125*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.12.048>.
- (52) Kinyua, J.; Psoma, A. K.; Rousis, N. I.; Nika, M.-C.; Covaci, A.; van Nuijs, A. L. N.; Thomaidis, N. S. Investigation of Biotransformation Products of P-Methoxymethylamphetamine and Dihydromephedrone in Wastewater by High-Resolution Mass Spectrometry. *Metabolites* **2021**, *11* (2), 66. <https://doi.org/10.3390/metabo11020066>.
- (53) Diamanti, K.; Aalizadeh, R.; Alygizakis, N.; Galani, A.; Mardal, M.; Thomaidis, N. S. Wide-Scope Target and Suspect Screening Methodologies to Investigate the Occurrence of New Psychoactive Substances in Influent Wastewater from Athens. *Sci. Total Environ.* **2019**, *685*, 1058–1065. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.173>.
- (54) Andrés-Costa, M. J.; Andreu, V.; Picó, Y. Analysis of Psychoactive Substances in Water by Information Dependent Acquisition on a Hybrid Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometer. *J. Chromatogr. A* **2016**, *1461*, 98–106. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.07.062>.
- (55) Ferrando-Climent, L.; Reid, M. J.; Rodriguez-Mozaz, S.; Barceló, D.; Thomas, K. V. Identification of Markers of Cancer in Urban Sewage through the Use of a Suspect Screening Approach. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2016**, *129*, 571–580. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.08.001>.
- (56) Senta, I.; Gracia-Lor, E.; Borsotti, A.; Zuccato, E.; Castiglioni, S. Wastewater Analysis to Monitor Use of Caffeine and Nicotine and Evaluation of Their Metabolites as Biomarkers for Population Size Assessment. *Water Res.* **2015**, *74*, 23–33. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.02.002>.
- (57) Bade, R.; White, J. M.; Chen, J.; Baz-Lomba, J. A.; Been, F.; Bijlsma, L.; Burgard, D. A.; Castiglioni, S.; Salgueiro-Gonzalez, N.; Celma, A.; Chappell, A.; Emke, E.; Steenbeek, R.; Wang, D.; Zuccato, E.;

- Gerber, C. International Snapshot of New Psychoactive Substance Use: Case Study of Eight Countries over the 2019/2020 New Year Period. *Water Res.* **2021**, *193*, 116891. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.116891>.
- (58) Ort, C.; Lawrence, M. G.; Reungoat, J.; Mueller, J. F. Sampling for PPCPs in Wastewater Systems: Comparison of Different Sampling Modes and Optimization Strategies. *Environ. Sci. Technol.* **2010**, *44* (16), 6289–6296. <https://doi.org/10.1021/es100778d>.
- (59) Thomas, K. V.; Amador, A.; Baz-Lomba, J. A.; Reid, M. Use of Mobile Device Data To Better Estimate Dynamic Population Size for Wastewater-Based Epidemiology. *Environ. Sci. Technol.* **2017**, *51* (19), 11363–11370. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b02538>.
- (60) Bishop, N.; Jones-Lepp, T.; Margetts, M.; Sykes, J.; Alvarez, D.; Keil, D. E. Wastewater-Based Epidemiology Pilot Study to Examine Drug Use in the Western United States. *Sci. Total Environ.* **2020**, *745*, 140697. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140697>.
- (61) Baz-Lomba, J. A.; Harman, C.; Reid, M.; Thomas, K. V. Passive Sampling of Wastewater as a Tool for the Long-Term Monitoring of Community Exposure: Illicit and Prescription Drug Trends as a Proof of Concept. *Water Res.* **2017**, *121*, 221–230. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.05.041>.
- (62) Godlewska, K.; Stepnowski, P.; Paszkiewicz, M. Pollutant Analysis Using Passive Samplers: Principles, Sorbents, Calibration and Applications. A Review. *Environ. Chem. Lett.* **2021**, *19* (1), 465–520. <https://doi.org/10.1007/s10311-020-01079-6>.
- (63) Castiglioni, S.; Bijlsma, L.; Covaci, A.; Emke, E.; Hernández, F.; Reid, M.; Ort, C.; Thomas, K. V.; van Nuijs, A. L. N.; de Voogt, P.; Zuccato, E. Evaluation of Uncertainties Associated with the Determination of Community Drug Use through the Measurement of Sewage Drug Biomarkers. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, *47* (3), 1452–1460. <https://doi.org/10.1021/es302722f>.
- (64) Prieto Riquelme, M. V.; Garner, E.; Gupta, S.; Metch, J.; Zhu, N.; Blair, M. F.; Arango-Argoty, G.; Maile-Moskowitz, A.; Li, A.; Flach, C.-F.; Aga, D. S.; Nambi, I. M.; Larsson, D. G. J.; Bürgmann, H.; Zhang, T.; Pruden, A.; Vikesland, P. J. Demonstrating a Comprehensive Wastewater-Based Surveillance Approach That Differentiates Globally Sourced Resistomes. *Environ. Sci. Technol.* **2022**, *56* (21), 14982–14993. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c08673>.
- (65) Chen, C.; Kostakis, C.; Irvine, R. J.; Felgate, P. D.; White, J. M. Evaluation of Pre-Analysis Loss of Dependent Drugs in Wastewater: Stability and Binding Assessments: Evaluation of Pre-Analysis Loss of Dependent Drugs in Wastewater. *Drug Test. Anal.* **2013**, *5* (8), 716–721. <https://doi.org/10.1002/dta.1428>.
- (66) González-Mariño, I.; Rodil, R.; Barrio, I.; Cela, R.; Quintana, J. B. Wastewater-Based Epidemiology as a New Tool for Estimating Population Exposure to Phthalate Plasticizers. *Environ. Sci. Technol.* **2017**, *51* (7), 3902–3910. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b05612>.
- (67) Been, F.; Bastiaansen, M.; Lai, F. Y.; Libousi, K.; Thomaidis, N. S.; Benaglia, L.; Esseiva, P.; Delémont, O.; van Nuijs, A. L. N.; Covaci, A. Mining the Chemical Information on Urban Wastewater: Monitoring Human Exposure to Phosphorus Flame Retardants and Plasticizers. *Environ. Sci. Technol.* **2018**, *52* (12), 6996–7005. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b01279>.
- (68) Gracia-Lor, E.; Zuccato, E.; Hernández, F.; Castiglioni, S. Wastewater-Based Epidemiology for Tracking Human Exposure to Mycotoxins. *J. Hazard. Mater.* **2020**, *382*, 121108. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121108>.
- (69) González-Mariño, I.; Ares, L.; Montes, R.; Rodil, R.; Cela, R.; López-García, E.; Postigo, C.; López de Alda, M.; Pocurull, E.; Marcé, R. M.; Bijlsma, L.; Hernández, F.; Picó, Y.; Andreu, V.; Rico, A.; Valcárcel, Y.; Miró, M.; Etxebarría, N.; Quintana, J. B. Assessing Population Exposure to Phthalate Plasticizers in Thirteen Spanish Cities through the Analysis of Wastewater. *J. Hazard. Mater.* **2021**, *401*, 123272. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123272>.
- (70) Hou, C.; Hua, Z.; Xu, P.; Xu, H.; Wang, Y.; Liao, J.; Di, B. Estimating the Prevalence of Hepatitis B by Wastewater-Based Epidemiology in 19 Cities in China. *Sci. Total Environ.* **2020**, *740*, 139696. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139696>.
- (71) Estévez-Danta, A.; Rodil, R.; Pérez-Castaño, B.; Cela, R.; Quintana, J. B.; González-Mariño, I. Comprehensive Determination of Phthalate, Terephthalate and Di-Iso-Nonyl Cyclohexane-1,2-

- Dicarboxylate Metabolites in Wastewater by Solid-Phase Extraction and Ultra(High)-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Talanta* **2021**, *224*, 121912. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121912>.
- (72) Pandopulos, A. J.; Bade, R.; Tschärke, B. J.; O'Brien, J. W.; Simpson, B. S.; White, J. M.; Gerber, C. Application of Catecholamine Metabolites as Endogenous Population Biomarkers for Wastewater-Based Epidemiology. *Sci. Total Environ.* **2021**, *763*, 142992. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142992>.
- (73) Ryu, Y.; Gracia-Lor, E.; Bade, R.; Baz-Lomba, J. A.; Bramness, J. G.; Castiglioni, S.; Castrignanò, E.; Causanilles, A.; Covaci, A.; de Voogt, P.; Hernandez, F.; Kasprzyk-Hordern, B.; Kinyua, J.; McCall, A.-K.; Ort, C.; Plósz, B. G.; Ramin, P.; Rousis, N. I.; Reid, M. J.; Thomas, K. V. Increased Levels of the Oxidative Stress Biomarker 8-Iso-Prostaglandin F_{2a} in Wastewater Associated with Tobacco Use. *Sci. Rep.* **2016**, *6* (1), 39055. <https://doi.org/10.1038/srep39055>.
- (74) Lindsey, M. E.; Meyer, M.; Thurman, E. M. Analysis of Trace Levels of Sulfonamide and Tetracycline Antimicrobials in Groundwater and Surface Water Using Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2001**, *73* (19), 4640–4646. <https://doi.org/10.1021/ac010514w>.
- (75) Liu, X.; Zhang, R.; Cheng, H.; Khorram, M. S.; Zhao, S.; Tham, T. T.; Tran, T. M.; Minh, T. B.; Jiang, B.; Jin, B.; Zhang, G. Field Evaluation of Diffusive Gradients in Thin-Film Passive Samplers for Wastewater-Based Epidemiology. *Sci. Total Environ.* **2021**, *773*, 145480. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145480>.
- (76) Kasprzyk-Hordern, B.; Proctor, K.; Jagadeesan, K.; Lopardo, L.; O'Daly, K. J.; Standerwick, R.; Barden, R. Estimation of Community-Wide Multi-Chemical Exposure via Water-Based Chemical Mining: Key Research Gaps Drawn from a Comprehensive Multi-Biomarker Multi-City Dataset. *Environ. Int.* **2021**, *147*, 106331. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106331>.
- (77) Arrivault, S.; Guenther, M.; Fry, S. C.; Fuenfgeld, M. M. F. F.; Veyel, D.; Mettler-Altmann, T.; Stitt, M.; Lunn, J. E. Synthesis and Use of Stable-Isotope-Labeled Internal Standards for Quantification of Phosphorylated Metabolites by LC-MS/MS. *Anal. Chem.* **2015**, *87* (13), 6896–6904. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b01387>.
- (78) C. Moldoveanu, S.; David, V. Derivatization Methods in GC and GC/MS. In *Gas Chromatography - Derivatization, Sample Preparation, Application*; Kusch, P., Ed.; IntechOpen, 2019. <https://doi.org/10.5772/intechopen.81954>.
- (79) Mao, K.; Zhang, H.; Pan, Y.; Zhang, K.; Cao, H.; Li, X.; Yang, Z. Nanomaterial-Based Aptamer Sensors for Analysis of Illicit Drugs and Evaluation of Drugs Consumption for Wastewater-Based Epidemiology. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2020**, *130*, 115975. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.115975>.
- (80) Mao, K.; Zhang, H.; Pan, Y.; Yang, Z. Biosensors for Wastewater-Based Epidemiology for Monitoring Public Health. *Water Res.* **2021**, *191*, 116787. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116787>.