



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Kemijski odsjek

Tin Županović

Doktorski studij Kemije – smjer Analitička kemija

**Analitičke metode za određivanje antidepresiva,
antipsihotika, benzodiazepina i njihovih
metabolita u epidemiologiji otpadnih voda**

Kemijski seminar I

Prema radu M. Laimou-Geraniou, D. Heath, E. Heath, *Trends Environ. Anal.*

Chem. **37** (2023) e00192

Zagreb, 2025. godina.

Sadržaj

| | |
|---|------------|
| SAŽETAK..... | III |
| § 1. UVOD..... | 1 |
| § 2. ANALIZA UZORAKA..... | 2 |
| 2.1. Uzorkovanje..... | 2 |
| 2.2. Čuvanje uzoraka | 4 |
| 2.3. Priprema uzoraka za analizu | 5 |
| 2.4. Instrumentna analiza | 7 |
| 2.4.1. Kromatografsko odjeljivanje..... | 8 |
| 2.4.2. Odvajanje enantiomera..... | 9 |
| 2.4.3. Spektrometrija masa | 9 |
| 2.5. Stabilnost..... | 12 |
| § 3. ZAKLJUČAK | 13 |
| § 4. LITERATURNI IZVORI..... | 14 |

SAŽETAK

Epidemiologija otpadnih voda je relativno novi pristup dobivanja informacija o navikama populacije (stil života, konzumacija farmaceutika i ilegalnih droga...) koji se temelji na proučavanju ciljanih biomarkera i procjenu količine istih u otpadnoj vodi. Navedeni pristup daje uvid u širu sliku navika populacije pošto se koristi kao komplementarna metoda klasičnim metodama prikupljanja podataka (upitnici, ankete, intervjui, prodajne statistike...). Jedna od metoda koja uvelike doprinosi porastu popularnosti epidemiologije otpadnih voda je vezani sustav tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti i tandemne spektrometrije masa, koji posjeduje dovoljno niske granice detekcije i kvantifikacije čime omogućava potrebnu preciznost i istinitost za analizu organskih spojeva u tragovima.

§ 1. UVOD

Porast mentalnih poremećaja, uključujući depresiju, anksioznost, bipolarni poremećaj, shizofreniju i ostale psihoze, stvara probleme u zdravstvu, društvu i ekonomiji. Navedeni porast za sobom povlači i porast upotrebe različitih farmaceutika poput antidepresiva, anksiolitika i antipsihotika. Benzodiazepini su farmaceutici koji se propisuju u situacijama u kojima je potrebno umanjiti učinke stresa, napadaja panike, problema spavanja te kod pacijenata koje se želi rehabilitirati od korištenja ilegalnih droga. Jedan od problema navedenih lijekova su nuspojave u vidu ovisnosti, nesvjestica i opasnosti od nesreća. Zbog svoje prirode benzodiazepini pripadaju skupini lijekova koji se mogu zlorabiti. Europski centar za monitoring droga i ovisnosti o drogama (EMCDDA) izvještava da je uporaba benzodiazepina u rekreacijske svrhe, u situacijama seksualnih napada kao i za pojačavanje efekta ostalih ilegalnih droga u porastu. Iako ne pripadaju skupini benzodiazepina, uz njih se svrstavaju zolpidem i metilfenidat jer djeluju na zajednički receptor u mozgu. Zolpidem je farmaceutik koji se propisuje kod problema sa nesanicom zbog sličnih učinaka na organizam kao bromazepam, lorazepam i midazolam. Metilfenidat je stimulans koji se koristi u tretmanu narkolepsije i poremećaja pažnje s aktivnošću (ADHD) i posjeduje suprotni učinak za razliku od mnogih benzodiazepina. Ostali efekti konzumacije metilfenidata uključuju halucinacije, amneziju i efekte slične efektima kod konzumacije kokaina. Podatci o potrošnji psihoaktivnih tvari najčešće se dobivaju korištenjem klasičnih socioepidemioloških metoda poput anketa, analizom bolničkih zapisa ili promatranjem prodajnih podataka farmaceutika. Klasične metode mogu biti nepristrane, etički upitne te zahtijevaju mnogo vremena za prikupljanje i obradu podataka. Iz navedenih razloga epidemiologija otpadnih voda (engl. *wastewater based epidemiology*, WBE) je postala popularna alternativa klasičnim metodama dobivanja podataka zbog mogućnost pružanja objektivnih i anonimnih podataka o potrošnji legalnih i ilegalnih droga proučavajući uzorke otpadne vode. WBE pristup je cjenovno efikasan, neinvazivan i omogućava praćenje koncentracije analita u skoro stvarnom vremenu što ga čini idealnim za praćenje i procjenu uporabe duhana, alkohola, opioda, umjetnih zaslađivača, proizvoda za osobnu njegu, novih psihoaktivnih tvari i farmaceutika.^{1,2}

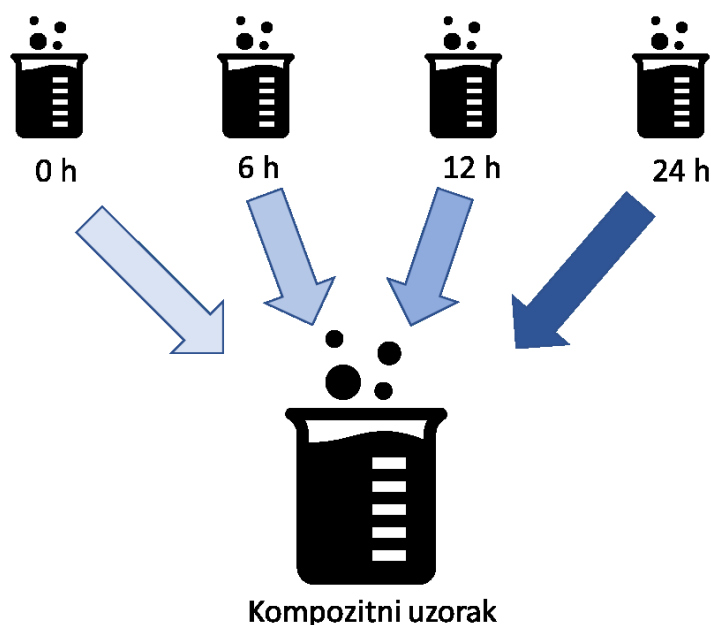
§ 2. ANALIZA UZORAKA

2.1. Uzorkovanje

Uzorkovanje je najvažniji korak u analizi uzoraka jer pogrešno uzorkovanje najčešće rezultira krivim rezultatima, stoga je važno naći optimalan način uzorkovanja da bi se ta greška smanjila. Preporučljivo je da se uzorkovanje obavlja za vrijeme perioda bez kiše jer oborinske vode razrjeđuju otpadnu vodu iz primarnih izvora te potencijalno povlači za sobom probleme preniske koncentracije biomarkera za određivanje kao i pogrešne procjene uporabe jer je nepoznato koliko puta su oborinske vode razrijedile stvarni uzorak. Za rutinske analize i praćenje koncentracija analita uzorkovanje bi se trebao izbjegavati za vrijeme posebnih događaja (proslave, koncerti i slično) jer navedeni događaji mogu promijeniti stvarne rezultate. No, uzorkovanje se može provoditi i u takvim uvjetima ako je korelacija događaja i potrošnja psihoaktivnih supstanci predmet istraživanja, primjerice praćenje potrošnje psihoaktivnih tvari za vrijeme velikog glazbenog festivala u Splitu³, no dobiveni rezultati se ne smiju koristiti u procjeni korištenja supstanci među zahvaćenom populacijom. Također je moguće uzorkovanje na samim kanalizacijskim odvodima specifičnih lokacija koje se istražuju, primjerice bolnica, sportskih dvorana, škola, fakulteta, itd. Pažnju treba pridodati i sanitarnim čvorovima koji se koriste na lokaciji, primjerice ako se procjenjuje konzumacija droge tokom glazbenog festivala, a na prostorima gdje se festival održava se nalaze mobilni sanitarni čvorovi, potrebno je obaviti uzorkovanje istih da se dobije ispravna slika potrošnje jer prateći koncentraciju analita samo u otpadnoj vodi uzorkovanoj na pročišćivaču vode dobivaju se pogrešni rezultati analize.¹

Postoje različite tehnike za prikupljanje otpadne vode. Najjednostavnija od njih je sakupljanje površinskog sloja otpadne vode grabljenjem vode u spremnik. Ta metoda nije pouzdana jer se obuhvaća samo onaj sloj koji je zagrabljen te se uzima samo trenutni uzorak iz kojeg se ne smije vršiti procjena navika populacije jer ne posjeduje ikakvu varijaciju u koncentraciji. Sakupljanje kompozitnog uzorka (slika 1.) je važan korak u epidemiologiji otpadnih voda jer se na taj način dobiva uzorak koji je reprezentativan za promatranu skupinu ljudi. Najčešće se prikupljaju 24-satni kompozitni uzorci za procjenu potrošnje promatranih spojeva primjerice preko radnog tjedna i preko vikenda, no postoje i slučajevi kada su prikupljeni kompozitni uzorci u trajanju

od 12 odnosno 72 sata. Kompozitni uzorci su najčešće prikupljeni uz pomoć uzorkivača (eng. *Autosampler*) koji najčešće radi u jednom od tri načina: prvi način je da uzima uzorke jednakog volumena u varirajućim vremenskim intervalima (uzorkovanje proporcionalno volumenu), drugi način je uzimanje uzorka u konstantnim vremenskim intervalima (uzorkovanje proporcionalno vremenu) i treći način je variranje volumena uzorkovanja proporcionalno protoku otpadne vode u konstantnim vremenskim intervalima (uzorkovanje proporcionalno protoku). Uzorkovanje proporcionalno protoku vode je najbolje je za manje populacije, no smatra se i najboljim od navedenih načina te je primjenjeno u velikom broju istraživanja, uzorkovanje proporcionalno volumenu primjenjivo je za kratke intervale uzorkovanja dok je uzorkovanje proporcionalno vremenu prikladno za male varijacije u protoku ili koncentraciji zagađivala. Drugačiji pristup uzorkovanju se može ostvariti kroz upotrebu pasivnih uzorkivača, takozvanih polarnih organskih integrativnih uzorkivača (POCIS). Upotrebom POCIS-a mogu se otkloniti ograničenja aktivnih uzorkivača, primjerice zahvaćanje niskih razina zagađenja, potreba napajanja,... Pasivni uzorkivači se najčešće sastoje od sorbensa na polimernoj bazi te su najčešće postavljeni na željeno mjesto uzorkovanja kroz duže vremensko razdoblje da bi se što bolje sakupili spojevi koji se u otpadnoj vodi nalaze u tragovima. Istraživanja su pokazala da efikasnost pasivnih uzorkivača opada s porastom kompleksnosti otpadne vode jer je jedno od ograničenja pasivnih uzorkivača mogućnost začepjenja membrane te time i samo smanjenje koncentracija analita u uzorku. McKay i suradnici su na temelju navedenih principa razvili, kalibrirali i validirali metodu za pasivno uzorkovanje koja koristi mikroporoznu polietilensku cijev ispunjenu višefunkcijskim sorbensom (Strata-X u agarozu) s ciljem određivanja i kvantificiranja legalnih i ilegalnih droga u uzorku otpadne vode s pročišćivača⁴. Pasivni uzorkivači pogodni su za uzorkovanje kada se ne koristi automatski uzorkivač jer omogućuju *in situ* obogaćivanje uzorka čime se dobiva povećana osjetljivost. Novi i alternativni način uzorkovanja predstavlja kombinaciju aktivnog i pasivnog uzorkovanja. Amato i suradnici su razvili uređaj koji istovremeno prati širok raspon zagađivala pomoću difuzijske ćelije, dok uređaj aktivno prati protok otpadne vode⁵. Pomoću dobivenih podataka određena je koncentracija karbamazepina u vodi koja se poklapala sa klasičnim metodama pasivnih uzorkivača, no bila je viša od koncentracija dobivenih uz uzorkovanje grabljenjem.¹



Slika 1. Sakupljanje kompozitnog uzorka temelji se na sakupljanju trenutnih uzoraka koji se zatim miješaju u jedan kompozitni uzorak

2.2. Čuvanje uzoraka

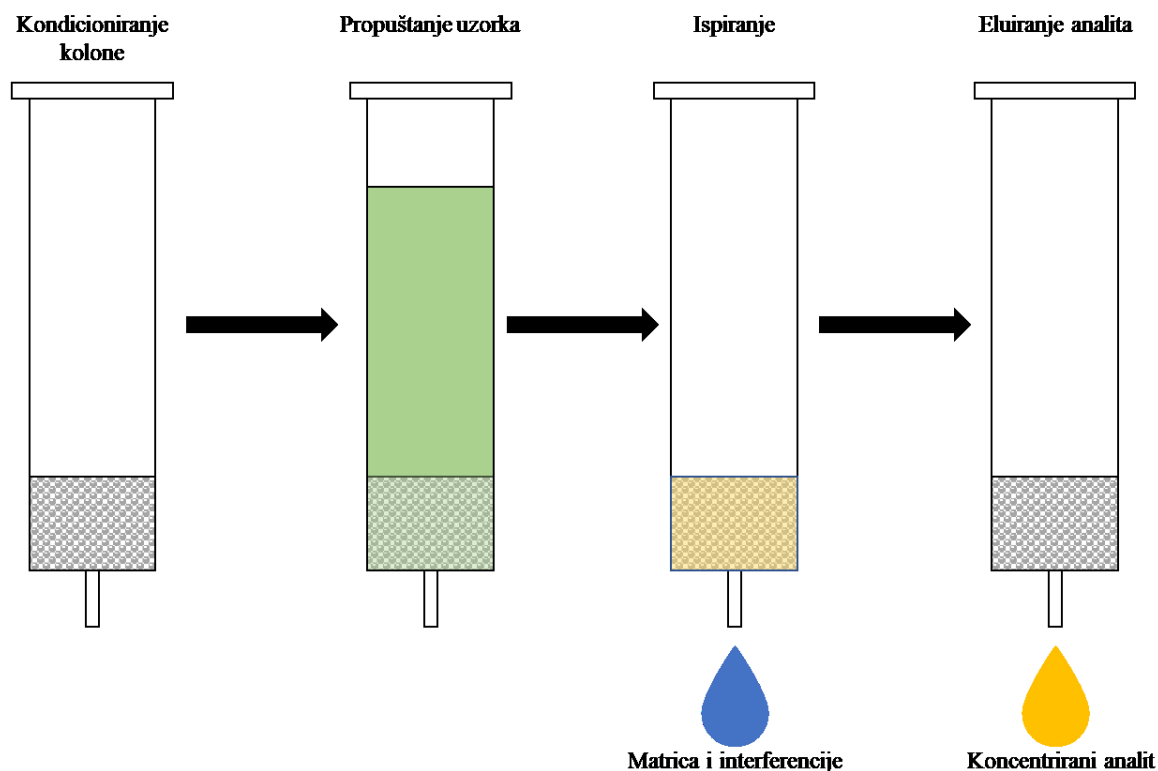
Ispravno čuvanje uzoraka je vrlo važan korak u ispravnoj analizi uzoraka jer najčešće analiza na mjestu uzorkovanja nije moguća. Čuvanje uzoraka određeno je skupom pravila, a razlikuje se obzirom na vrstu matrice te stabilnosti promatranog analita. Kako je stabilnost farmaceutika u otpadnoj vodi neistražena, potrebno je što opaznije pristupiti čuvanju uzoraka. Uzorci se trebaju pažljivo zapakirati te se trebaju što prije prevesti do laboratorija gdje se odmah vrši analiza ili se uzorci hlade na određenoj temperaturi kako bi im se očuvao prvotni sastav. Najčešće temperature na kojima se drže uzorci su 4°C te -20°C , ovisno o vremenu koje će proteći između uzorkovanja i analize uzoraka. Za slučaj dugoročnog čuvanja uzoraka najčešće se uzorci čuvaju na temperaturi od -80°C . Bakterije, koje su pristune u otpadnoj vodi, mogu utjecati na stabilnost i brzinu degradacije analita, stoga se pH vrijednost uzoraka podešava da iznosi 2-3 jedinice kako bi se spriječila bakterijska aktivnost i zadržala stabilnost analita u uzorku. Kao konzervans u analizi benzodiazepina se može koristiti natrijev metabisulfit da bi se očuvao sastava prvotnog uzorka. Ekstrakcijom na čvrstoj fazi unutar 24 h od uzorkovanja te zamrzavanjem SPE kolona postiglo se očuvanje analita do same analize bez ikakvih gubitaka zbog metode čuvanja⁶.

2.3. Priprema uzoraka za analizu

Priprema uzoraka za analizu je slična standardnim analitičkim procedurama za određivanje organskih spojeva u uzorku. Uzorak se najčešće filtrira i ekstrahira prije daljnje analize. Moguće je provesti zakiseljavanje uzorka prije ekstrakcije, ovisno o fizikalno-kemijskim svojstvima analita kao i o vrsti SPE kolone koja se koristi. Zbog niskih koncentracija analita i kompleksne matrice mogu se pojaviti problemi prilikom analiziranja uzoraka otpadne vode. Prvi korak najčešće predstavlja filtracija uz sniženi tlak preko filtera koji su najčešće stakleni iako postoje istraživanja u kojima se koriste i filteri poput najlonskih membrana, polivinildifluoridnih membrana, filteri celuloznih estera i PTFE filtera. Prilikom filtracije potrebno je pripaziti na hidrofobnu prirodu analita pošto se dio takvih analita može izgubiti tijekom filtracije. Pokazano je da stakleni filtri i hidrofilni najlonski filtri najmanje adsorbiraju analite (u analizi benzodiazepina i antidepresiva) te su odabrani kao najbolji filtri. Dodatak internih standarda u uzorak otpadne vode prije same filtracije može kompenzirati gubitke filtriranjem i tako pomoći u ostvarivanju što boljih rezultata.

Direktno ubrizgavanje uzorka nakon filtracije je pristup koji ovisi o matrici uzorka, koncentraciji biomarkera koji se promatra i o njegovom zadržavanju na sorbensu⁷. Biomarkeri legalnih droga uključujući alkohol (etil-sulfat) i duhanske proizvode (kotlinin) su često analizirani direktnim ubrizgavanjem jer je njihova koncentracija u uzorcima otpadne vode povećana u odnosu na ostale biomarkere zbog povećane konzumacije alkohola i duhanskih proizvoda. Prije pripreme u uzorak se dodaje izotopno obilježen interni standard (ILIS) da bi se postigla korekcija gubitaka u odzivu ili pojačao odziv analita.

Ekstrakcija na čvrstoj fazi (SPE) temelji se na ukoncentriravanju uzorka prije analize zbog povećanja osjetljivost i odziva analita (slika 2.). Različite kolone za ekstrakciju uz mnoštvo različitih eluenta pružaju širok izbor ekstrakcijskih uvjeta što ih čini primjenjivima u široj upotrebi. Biomarkeri u tragovima mogu biti ukoncentrirani uz eliminiranje interferencija što čini SPE tehnikom koja je uvelike prihvaćena u epidemiologiji otpadnih voda. Postoje razne kolone za SPE, a neke od njih su kolone obrnutih faza (RP), kolone obrnutih faza punjene polimerom (HLB) te kolone obrnutih faza punjene polimerom s kationskim (MCX) i anionskim (MAX) izmjenjivačem. Ovisno o sorbensu i fizikalno-kemijskim svojstvima analita potrebno je prilagoditi pH uzorka.



Slika 2. Shema ekstrakcije na čvrstoj fazi uporabom kolona za ekstrakciju

U epidemiologiji otpadnih voda najčešće se primjenjuje multirezidualna analiza u svrhu određivanja više različitih tvari u jednoj analitičkoj metodi. Hidrofilni polimerni sorbensi velikog kapaciteta kao što su Oasis HLB i Strata X korišteni su u ekstrakciji antidepresiva, antipsihotika i benzodiazepina. Oasis HLB kolone su naišle na široku primjenu u ekstrakciji polarnih i nepolarnih spojeva sa kiselim, bazičnim i neutralnim svojstvima. HLB kolone posjeduju univerzalni sorbens obrnutih faza koji je građen od specifičnog omjera dva monomera, hidrofilnog N-vinilpirolidona i lipofilnog N-divinilbenzena uz neutralni dio koji poboljšava retenciju polarnih analita. Strata X kolone posjeduju punilo koje ostvaruje π - π interakcije, dipol-dipol interakcije i hidrofobne interakcije da bi zadržalo analite vezano za sorbens. Kao eluens se najčešće koristi metanol, dok je u ekstrakciji mikropolutanta iz okoliša uspješno upotrebljen etanol koji se smatra zelenim otapalom zbog znatno manje toksičnosti u odnosu na metanol. Polimerni sorbensi sa ionskim izmjenjivačem, poput Oasis MCX, su također korišteni u epidemiologiji otpadnih voda zbog svoje mogućnosti da povećaju specifičnost, selektivnost i osjetljivost analita. Oasis MCX kolone su temeljene na Oasis HLB punilu koje je modificirano da sadrži sulfonske skupine koje mogu tvoriti kationsko izmjenjivačke interakcije sa farmaceuticima koji posjeduju bazična svojstva te tako vežu

željene analite, a propuštaju moguće interferencije. Uzorak se nanosi na kolonu u kiselim uvjetima (pH = 2-3) zbog ostvarivanja ionskih interakcija, dok se eluiranje provodi u lužnatim uvjetima, najčešće sa metanolnom otopinom amonijaka⁸. Ovisno o tipu analita, obe vrste kolona se uspješno mogu koristiti u ekstrakciji analita na čvrstoj fazi jer pokrivaju širok raspon fizikalno-kemijskih svojstava analita te omogućavaju uspješnu ekstrakciju. U literaturi se navodi i uporaba UCT CleanScreen XCEL II⁹ i Chromabond HR-X kolona. UCT CleanScreen XCEL II kolone smanjuju vrijeme pripreme uzoraka jer ih nije potrebno kondicionirati, a volumeni uzorka i otapala su minimalizirani. Sferična struktura hidrofobnog polistiren-divinilbenzen kopolimera Chromabond HR-X kolone posjeduje homogenu površinu i optimiziranu strukturu pora koja omogućava dobar povrat analita.

Ekstrakcija na čvrstoj fazi se uglavnom provodi zasebno, kao dio pripreme uzoraka za analizu. No ekstrakcija na čvrstoj fazi može biti uključena u dio vezanog sustava (engl. *Online SPE*), primjerice SPE-UHPLC-MS/MS sustava. Online SPE smanjuje vrijeme laboratorijskog rada, pojednostavljuje pripravu uzoraka i povećava ponovljivost, a istovremeno smanjuje rizik od gubitka analita zbog isparavanja. Relativno mali volumen uzorka (1 – 5 mL) propušta se preko C18 ili HLB kolone te rezultira koncentriranim uzorkom različitih psihoaktivnih farmaceutika. Iako posjeduje mnoge prednosti, mane poput ograničene prenosivosti, cijene opreme i većeg utjecaja matrice ograničavaju online SPE da zamijeni klasičnu ekstrakciju na čvrstoj fazi.¹

2.4. Instrumentna analiza

Najčešća tehnika za separaciju i odrađivanje analita koja se koristi u epidemiologiji otpadnih voda je kombinacija kromatografije (plinska ili tekućinska) i spektrometrije masa. Navedeni sustav pruža visoku osjetljivost i dobro odjeljivanje analita koji su potrebni za kvantitativnu i kvalitativnu analizu psihoaktivnih tvari u uzorcima otpadne vode. Plinska kromatografija se pokazala dobrom za odjeljivanje fluoksetina, norfluoksetina, paroksetina i sertralina. Navedeni spojevi su bili derivatizirani da bi im se povećala hlapljivost te je uspješno provedena analiza¹⁰. Tekućinska kromatografija je prevladala plinsku kromatografiju u određivanju psihoaktivnih tvari u uzorcima otpadne vode zbog mogućnosti analize termolabilnih, nehlapljivih tvari širokog raspona polariteta.

2.4.1. Kromatografsko odjeljivanje

Dobro kromatografsko odjeljivanje je osnova za potrebnu selektivnost i osjetljivost koja je potrebna da bi analiza i praćenje koncentracije psihoaktivnih supstanci bila uspješno provedena. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) je vrsta tekućinske kromatografije čiju nepokretnu fazu sačinjavaju sitne čestice punila. HPLC je vitalna tehnika tekućinske kromatografije zbog brzine, odjeljivanja i osjetljivosti zahvaljujući kojoj se postiže odlično odjeljivanje sastojaka smjese. Smanjujući veličinu čestice punila povećava se razdjeljenje uzoraka kao i osjetljivost metode, no zbog veličine čestica potrebni su puno veći tlakovi (više od 1000 bara) da bi takva kromatografija bila moguća. U navedenom slučaju govorimo o tekućinskoj kromatografiji ultra visoke djelotvornosti (engl. *Ultra High Performance Liquid Chromatography*, UHPLC).¹¹ Srž UHPLC instrumenta čini kolona, na kojoj se odvija separacija analita. Variranjem svojstava kolone moguće je postići različito odvajanje različitih skupina analita. UHPLC kolone su kraće i posjeduju manji promjer u odnosu na HPLC kolone, što ih čini efektivnijima i osjetljivijima za detekciju spojeva. U tekućinskoj kromatografiji ultra visoke djelotvornosti koriste kolone sa različitim tipom punila, a neki od njih su etilenom premošten hibrid (BEH), hibrid nabijene površine (CSH) i silika velike jakosti (HSS). BEH kolone posjeduju polarne skupine premoštene etilenom vezane na alkilne, fenilne ili amidne skupine što im omogućava poboljšanu efektivnost i širi raspon pH vrijednosti (1 – 12 pH jedinica). CSH kolone dizajnirane su s ciljem poboljšanja kromatografskog signala za bazične spojeve pomoću slabog površinskog naboja na česticama punila. HSS kolone služe za separaciju malih polarnih molekula topljivih u vodi tehnikom obrnutih faza. Upotrebom različitih kolona postiže se odvajanje različitih skupina analita što znatno utječe na selektivnost kromatografije.¹² U epidemiologiji otpadnih voda UHPLC i HPLC su jednako raširene u upotrebi za analizu farmaceutika u otpadnoj vodi, iako odabir UHPLC-a ispred HPLC-a ima više prednosti, od kojih su bitnije kraće vrijeme analize i bolja separacija ciljanih spojeva.

Pokretne faze koje se koriste u kromatografiji su najčešće dvofazni sustavi sastavljeni od vode i polarne organske faze, primjerice metanola i/ili acetonitrila. Lako hlapljive soli, poput amonijeva acetata ili amonijeva formijata, mogu biti dodane u vodenu fazu da bi se poboljšao oblik kromatografskog signala. Ako se analiza odvija u pozitivnom modu ionizacije, u vodenu fazu se najčešće dodaje mravlja ili octena kiselina da bi se pospješila ionizacija. Najčešće

korištena mobilna faza u pozitivnom modu ionizacije je smjesa voda – metanol i smjesa acetonitril – vodena otopina mravlje, odnosno octene kiseline. Kolone koje se učestalo koriste u analizama psihoaktivnih tvari u uzorcima otpadne vode su kolone za kromatografiju obrnutih faza koje su punjene različitim nepokretnim fazama, primjerice C18 ili bifenil. U literaturi je navedena upotreba C18 kolone s polarnim skupinama za analizu benzodiazepina s ciljem povećanja zadržavanja analita na koloni te ostvarivanja boljeg razlučivanja.¹

2.4.2. *Odvajanje enantiomera*

Psihoaktivni spojevi su organske molekule, stoga postoji mogućnost postojanja kiralnih centara unutar molekule. Enantiomeri nekog spoja mogu različito utjecati na organizam, ovisno radi li se o *R*- enantiomeru ili *S*- enantiomeru. Kiralna analiza može predstavljati važan izvor informacija jer može dati podatke o porijeklu farmaceutskog ostatka, primjerice radi li se o konzumaciji tvari i izlučivanju metabolita u otpadne vode ili direktnom otpuštanju tvari u odvod pošto je stereokemija molekula izlučena iz organizma određena stereoselektivnošću metabolizma. Također se mogu saznati različiti sintetski putevi neke molekule, kao i razlikovati legalne psihoaktivne tvari od ilegalnih psihoaktivnih tvari. U literaturi su opisana dva načina kiralne analize otpadnih voda: LC-MS analiza upotrebom kiralne kromatografske kolone i GC-MS analiza nakon derivatizacije kiralnim agensom. Kiralne LC-MS metode najčešće se koriste kao komplementarne metode klasičnim LC-MS metodama pri određivanju ilegalnih droga.¹

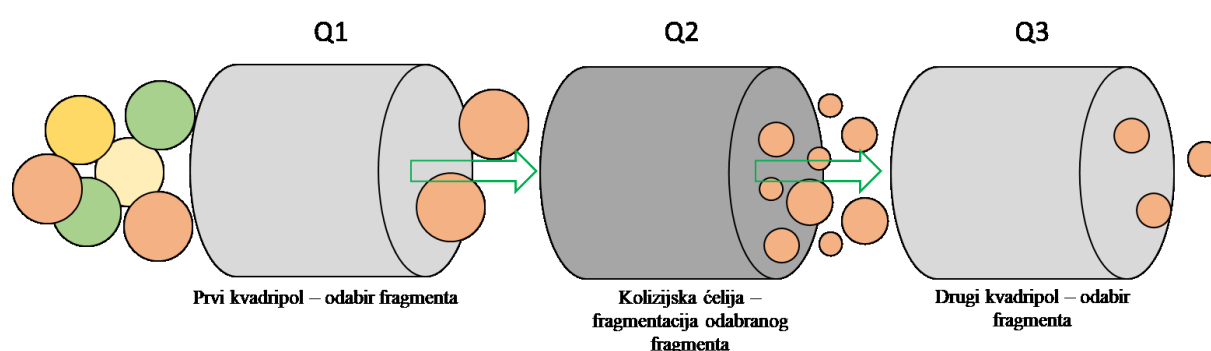
2.4.3. *Spektrometrija masa*

Spektrometrija masa (MS) je analitička tehnika koja pruža mnoge informacije o analitu, poput elementnog sastava tvari, struktura organskih i anorganskih spojeva, kvantitativnog i kvalitativnog sastava tvari, strukture i sastava čvrstih površina te izotopni omjer atoma u uzorcima. Da bi se uopće analit mogao analizirati spektrometrijom masa potrebno ga je prevesti u molekulski ion, po čijem omjeru mase i naboja se detektiraju molekulski fragmenti. Nastajanje molekulskog iona izazvano je uz uporabu različitih ionskih izvora. Ionski izvori se mogu podijeliti na nekoliko načina. Prva podjela je na izvore u plinovitoj fazi i na desorpcijske izvore. Izvori u plinovitoj fazi prevode analit u ion na način da se analit prvo otpari u plinovitu fazu, a zatim se ionizira. U navedene izvore spadaju ionizacija sudarom elektrona (EI), kemijska ionizacija (CI), kemijska ionizacija pri atmosferskom tlaku (APCI) i ionizacija električnim

poljem (FI). Desorpcijski izvori prevode analite iz čvrste ili tekuće faze u direktno plinovitu fazu, što je pogodno za nehlapive i termički nestabilne spojeve. Među navedene izvore ubrajamo desorpciju električnim poljem (FD), ionizaciju elektroraspršenjem (ESI), desorpciju i ionizaciju potpomognutu matricom (MALDI), desorpciju plazmom (PD), bombardiranje brzim atomima (FAB), ionizaciju termoraspršenjem (TS) i spektrometriju masa sekundarnih iona (SIMS). Ionski izvori se također dijele na tvrde i meke izvore (engl. *hard sources* i *soft sources*). Tvrđi izvori prenose veću energiju na molekule analita čime dolazi do pucanja veza i nastajanja više vrsta molekulskih fragmenata. Spektri analita analiziranih uz neki od tvrdih izvora pokazuju veliku fragmentaciju te mnoštvo fragmenata početne molekule. Meki izvori ne prenose dovoljno energije molekuli da izazove značajnu fragmentaciju, stoga spektri analita koji su analizirani uz neki od mekih izvora imaju izraženi signal molekulskog iona uz par manjih signala. Ionizacijom nastaje smjesa molekulskih iona i njihovih fragmenata čije sastojke je potrebno razdvojiti pomoću detektora masa. Različiti detektori masa pružaju različite mogućnosti, od cjelovitog spektra analita do praćenja željenih tranzicija iona. Među poznatijim detektorima su kvadripol (Q), analizator vremena leta (TOF), ionska stupica i ionsko-ciklotronska rezonancija.¹¹

U istraživanjima epidemiologije otpadnih voda za određivanje antidepresiva, antipsihotika, benzodiazepina i njihovih metabolita najčešće se koristi ionizacija elektroraspršenjem u pozitivnom načinu rada. ESI je poznata po osjetljivosti na utjecaje matrice koji mogu pojačati i prigušiti signale ionizacije analita. Velik broj metoda uključuje izotopno obilježene, najčešće deuterirane, unutarnje standarde kako bi se izvršila kompenzacija za utjecaj matrice, koristeći ih za internu kalibraciju pošto je očekivano da će deuterirani analog nekog spoja pokazati slično ponašanje tijekom ionizacije kao i sam spoj. Spektrometri masa koji se koriste uključuju spektrometre niske rezolucije, primjerice spektrometar s trostrukim kvadripolom (QqQ) i spektrometar s kvadripolom i ionskom stupicom (QTRAP) i one visoke rezolucije, primjerice QTRAP-Orbitrap, kvadripol Orbitrap i QqTOF. Analizator masa koji se najčešće koristi zbog svoje pouzdanosti pri određivanju i kvantificiranju psihoaktivnih farmaceutika, kao i zbog dobre osjetljivosti u niskim koncentracijama je trostruki kvadripol, iako literatura navodi i upotrebu QTRAP analizatora. Ciljane LC-MS/MS ili UHPLC-MS/MS metode koje koriste QqQ ili QTRAP najčešće prikupljaju podatke u načinu praćenja odabrane reakcije (engl. *Selected Reaction Monitoring*, SRM) ili ako promatraju više specifičnih reakcija onda rade u načinu

praćenju više reakcija (engl. *Multiple Reaction Monitoring*, MRM). SRM se temelji na odabiru željenog fragmenta iz smjese dobivene fragmentacijom te daljnjom fragmentacijom odabranog fragmenta kako bi se dobile tranzicije specifične za određeni spoj (slika 3.). Praćenjem specifičnih tranzicija moguće je istovremeno odrediti koncentracije željenih spojeva u uzorku ne narušavajući kvalitetu analize. Praćenje specifičnih tranzicija ograničeno je brzinom skeniranja detektora, stoga je osmišljeno dinamičkom praćenje višestrukih reakcija (dMRM) u kojem se svakoj tvari dodijelio vremenski interval u kojem se detektor vrši skeniranje kako bi pronašao željenu tranziciju spoja.



Slika 3. Prikaz praćenja odabrane reakcije (SRM)

U literaturi su također korišteni spektrometri masa visoke rezolucije (HRMS), primarno QTOF-MS i LTQ Orbitrap, za određivanje i praćenje psihoaktivnih farmaceutika te su postignute granice kvantifikacije od 0,1 do 50 ng dm⁻³. Iako se HRMS instrumenti mogu koristiti za kvantitativnu analizu uzoraka otpadne vode, njihova osjetljivost je manja u odnosu na spektrometre masa niske rezolucije. Uobičajeni pristup u epidemiologiji otpadnih voda je ciljano analiza biomarkera, gdje se pomoću poznatih tranzicija detektira i kvantificira koncentracija analita u uzorku. Drugi način analize je ne ciljano analiza, gdje se u uzorku pokušavaju pronaći novi biomarkeri i metaboliti te u takvim analizama HRMS instrumenti su nezaobilazni. Kombinacijom kvantitativnog određivanja i kvalitativnog pretraživanja uzorka mogu se dobiti informacije koje su važne u daljnjem razvijanju i razumijevanju epidemiologije otpadnih voda.¹

2.5. Stabilnost

Stabilnost biomarkera je važna stavka u analizi otpadnih voda te postoji mogućnost da određeni biomarkeri degradiraju tijekom sakupljanja kompozitnog uzorka ili tijekom skladištenja prikupljenih uzoraka. Postoji mnogo različitih istraživanja koja su odredila stabilnost biomarkera ilegalnih droga u kanalizaciji, no stabilnost benzodiazepina i antidepresiva u uzorku i u kanalizaciji još uvijek nije potpuno istražena. Stabilnost farmaceutika u otpadnoj vodi uvelike ovisi o kompleksnosti matrice, mikroorganizmima, biodegradaciji, temperaturi, pH vrijednosti, utjecaju suspendirane tvari i vremenu koje je farmaceutik proveo u kanalizacijskim uvjetima. Prema stabilnosti biomarkeri se mogu podijeliti na stabilne (<20% se degradira), srednje stabilne (20–60% se degradira) i slabo stabilne (>60% se degradira). Biomarkeri niske i srednje stabilnosti bi trebali biti zamijenjeni stabilnijim biomarkerima ili isključeni iz analitičke metode. Skladištenje uzorka na niskim temperaturama (-20°C, -80°C) i korištenje konzervansa minimizira transformaciju biomarkera, iako konzervansi tek mogu biti dodani prilikom uzorkovanja. Veći problem čini stabilnost biomarkera u kanalizaciji zbog postojanja biofilma koji može adsorbirati neki od analita te tako potencijalno analiza može rezultirati neistinitom koncentracijom promatranog analita u otpadnoj vodi.¹

§ 3. ZAKLJUČAK

Otpadna voda je riznica podataka koji opisuju zdravstvene i životne navike populacije. Iako je epidemiologija otpadnih voda relativno nov pristup, pokazano je da pruža točne, neovisne i aktualne komplementarne podatke o potrošnji ksenobiotika u ovisnosti o mjestu i vremenu analize. Razvijene su mnoge metode za istovremeno određivanje koncentracije različitih klasa farmaceutika u uzorcima otpadne vode. No metode ne mogu razaznati količinu i učestalost konzumacije, radi li se o primjerice jednom korisniku koji konzumira veću dozu farmaceutika ili se radi o više manjih konzumenata, što predstavlja neko od ograničenja same metode. Zahvaljujući napretku instrumentacije moguće je odrediti koncentracije psihoaktivnih tvari i njihovim metabolita u tragovima, što uvelike pomaže razvijanju i razumijevanju epidemiologije otpadnih voda. WBE u kombinaciji s drugim izvorima podataka postaje vjerodostojan izvor informacija koji može ukazati na životne navike populacije.¹

§ 4. LITERATURNI IZVORI

- 1) M. Laimou-Geraniou, D. Heath, E. Heath, *Trends Environ. Anal. Chem.* **37** (2023) e00192
- 2) I. Racamonde, R. Rodil, J. B. Quintana, E. Villaverde-de-Sáa, R. Cela, *J. Chromatogr. A* **1352** (2014) 69–79
- 3) I. Senta, I. Krizman-Matasić, P. Kostanjevečki, I. Gonzales-Mariño, R. Rodil, J. B. Quintana, I. Mikac, S. Terzić, M. Ahel, *Sci. Total Environ.* **892** (2023) 164547
- 4) S. McKay, B. Tschärke, D. Hawker, K. Thompson, J. O'Brien, J. F. Mueller, S. Kaserzon, *Sci. Total Environ.* **704** (2020) 135891
- 5) E. D. Amato, A. Covaci, R. M. Town, J. Hereijgers, B. Bellekens, V. Giacometti, T. Breugelmans, M. Weyn, F. Dardenne, L. Bervoets, R. Blust, *Chemosphere* **209** (2018) 363–372
- 6) J. Rice, A. M. Kannan, E. Castrignanò, K. Jagadeesan, B. Kasprzyk-Hordern, *Sci. Total Environ.* **735** (2020) 139433
- 7) A. Causanilles, E. Emke, P. de Voogt, *Sci. Total Environ.* **565** (2016) 140–147
- 8) I. Senta, I. Krizman, M. Ahel, S. Terzić, *J. Chromatogr. A* **1425** (2015) 204–212
- 9) R. Bade, M. Ghetia, J. M. White, C. Gerber, *Anal. Methods* **12** (2020) 3637–3644
- 10) R. Gonçalves, C. Ribeiro, S. Cravo, S. C. Cunha, J. A. Pereira, J. O. Fernandes, C. Afonso, M. E. Tiritan, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **1125** (2019) 121731
- 11) D. A. Skoog, F. J. Holler, T. A. Nieman, *Principles of Instrumental Analysis*, 5th Edition, Brooks Cole, 1997.
- 12) R. H. Rathod, S. R. Chaudhari, A. S. Patil, A. A. Shirkhedkar, *Future Journal of Pharmaceutical Sciences* **5** (2019) a. n. 6