

# Otpadne vode kao pokazatelji potrošnje ilegalnih supstanci

---

**Prebanda, Lorena**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2024**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:969487>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-20**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE**  
**SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ**

Lorena Prebanda

**ZAVRŠNI RAD**

Zagreb, lipanj 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
POVJERENSTVO ZA ZAVRŠNE ISPITE

Kandidatkinja                     **Lorena Prebanda**                    

Predala je izrađen završni rad dana:           25. lipnja 2024.          

Povjerenstvo u sastavu:

dr. sc. Lidija Furač, viša predavačica, Sveučilište u Zagrebu Fakultet  
kemijskog inženjerstva i tehnologije

doc. dr. sc. Matija Cvetnić, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog  
inženjerstva i tehnologije

dr. sc. Kristina Tolić Čop, viši asistent, Sveučilište u Zagrebu Fakultet  
kemijskog inženjerstva i tehnologije

mr. sc. Marinko Markić, viši predavač, Sveučilište u Zagrebu Fakultet  
kemijskog inženjerstva i tehnologije (zamjena)

povoljno je ocijenilo završni rad i odobrilo obranu završnog rada pred  
povjerenstvom u istom sastavu.

Završni ispit održat će se dana:           28. lipnja 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ  
STUDIJ KEMIJSKO INŽENJERSTVO

Lorena Prebanda

**ZAVRŠNI RAD**

Otpadne vode kao pokazatelji potrošnje ilegalnih supstanci

Voditeljica rada: v. pred. dr. sc. Lidija Furač

Članovi ispitnog povjerenstva:

1. dr. sc. Lidija Furač, v. pred.
2. doc. dr. sc. Matija Cvetnić
3. dr. sc. Kristina Tolić Čop, viši asistent

Zagreb, lipanj 2024.

*Zahvaljujem se svojoj mentorici dr. sc. Lidiji Furač na strpljenju, predloženoj temi i svim konstruktivnim savjetima te uloženom trudu. Hvala mojim najbližima na beskrajnoj vjeri i podršci. Bez vas, puno toga ne bi bilo moguće.*

## **SAŽETAK**

U radu je dan pregled metoda analize otpadnih voda u svrhu procjene potrošnje ilegalnih supstanci. Metoda, poznata kao epidemiologija temeljena na otpadnim vodama (WBE), omogućuje procjenu količine konzumiranih ilegalnih supstanci u zajednici putem analize metabolita prisutnih u otpadnim vodama. Metoda analize otpadnih voda u svrhu mjerenja količine ilegalnih supstanci obuhvaća uzorkovanje sirove otpadne vode iz različitih gradova svijeta i uporabu naprednih analitičkih tehnika, poput tekućinske kromatografije sa spektrometrijom masa i ekstrakcije na čvrstoj fazi, za identifikaciju i kvantifikaciju ilegalnih supstanci. U radu su prikazani nedostaci, prednosti i prijedlozi za preciznije provođenje analize otpadnih voda. Metoda analize otpadnih voda nudi objektivan i nepristran način prikupljanja podataka, što je ključno za praćenje promjena u novim obrascima potrošnje.

**Ključne riječi:** otpadne vode, ilegalne supstance, metaboliti, epidemiologija temeljena na otpadnim vodama, analitičke tehnike, ekstrakcija na čvrstoj fazi, tekućinska kromatografija sa spektrometrijom masa

## ABSTRACT

### *Wastewater as indicators of consumption of illegal substances*

The paper provides an overview of methods for wastewater analysis aimed at assessing the consumption of illegal substances. The method, known as wastewater-based epidemiology (WBE), enables the estimation of the amount of illegal substances consumed in a community through the analysis of metabolites present in wastewater. The wastewater analysis method for measuring the amount of illegal substances includes sampling raw wastewater from various cities worldwide and using advanced analytical techniques, such as liquid chromatography-mass spectrometry and solid-phase extraction, to identify and quantify illegal substances. The paper presents the disadvantages, advantages, and suggestions for more precise implementation of wastewater analysis. The wastewater analysis method offers an objective and unbiased way of collecting data, which is crucial for monitoring changes in new consumption patterns.

Keywords: wastewater, illegal substances, metabolites, wastewater-based epidemiology, analytical techniques, solid-phase extraction, liquid chromatography in tandem with mass spectrometry

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	2
<b>2.1. Povijesni pregled razvoja metode</b> .....	2
<b>2.2. Vrste i djelovanje detektiranih ilegalnih supstanci u otpadnim vodama</b> .....	3
<b>2.3.1. Benzoilekgonin</b> .....	9
<b>2.3.2. 11-nor-delta-9-tetrahidrokanabinol-9-karboksilna kiselina</b> .....	9
<b>2.3.3. 4-hidroksi-amfetamin</b> .....	10
<b>2.3.5. 4-hidroksi-3-metoksi-amfetamin (HMMA)</b> .....	11
<b>2.4. Analiza otpadnih voda na količinu potrošnje ilegalnih supstanci</b> .....	12
<b>2.4.1. Problemi i nedostaci metode analize otpadnih voda na potrošnju ilegalnih supstanci</b> .....	13
<b>3. REZULTATI ANALIZA OTPADNIH VODA NA POTROŠNJU ILEGALNIH SUPSTANCI U EUROPSKIM GRADOVIMA I GRADU ZAGREBU</b> .....	23
<b>3.1. Istraživanja za 2023. godinu i usporedba trendova u odnosu na 2022. godinu</b> .....	24
<b>3.1.1. Kanabis</b> .....	24
<b>3.1.2. Kokain</b> .....	27
<b>3.1.4. Amfetamin</b> .....	33
<b>3.1.5. Metamfetamin</b> .....	36
<b>4. ZAKLJUČAK</b> .....	39
<b>5. POPIS KRATICA</b> .....	40
<b>6. POPIS LITERATURE</b> .....	41



# 1. UVOD

Epidemiologija temeljena na analizi otpadnih voda (engl. *Wastewater-Based Epidemiology*, WBE) moderna je znanstvena disciplina korisna u praćenju podataka u stvarnom vremenu. Analiza otpadnih voda omogućuje znanstvenicima procjenu količine konzumacije ilegalnih supstanci u zajednici, a procjena se temelji na mjerenjima metabolita izlučenih u urinu [1]. Europska mreža SCORE (engl. *Sewage analysis CORE group – Europe*) u suradnji s Europskim centrom za praćenje droga i ovisnosti o drogama (engl. *European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction*, EMCDDA) provodi testiranja otpadnih voda na godišnjoj bazi od 2011. godine [1].

Otpadne vode kao izvor informacija o potrošnji ilegalnih supstanci predstavljaju objektivni i nepristran način prikupljanja podataka koji omogućuje identifikaciju vrsta konzumiranih ilegalnih supstanci, procjenu njihove rasprostranjenosti među populacijom određenog područja te praćenje sezonskih i geografskih varijacija u potrošnji. Osim toga, ova metoda omogućuje praćenje pojava novih ilegalnih supstanci ili promjena u obrascima njihove potrošnje, što je ključno za razumijevanje dinamike problema zlouporabe i prilagođavanje strategija prevencije i suzbijanja. Rezultati dobiveni pomoću analize otpadnih voda korisni su u primjeni mjera za suzbijanje štetnih posljedica [2].

Cilj analize otpadnih voda na prisutnost ilegalnih supstanci može uključivati nekoliko aspekata, a cjelokupna svrha istraživanja jest doprinos razumijevanju i smanjenju problema zlouporabe istih kroz analizu otpadnih voda kao indikatora potrošnje ilegalnih supstanci.

Uz sve veću globalnu zabrinutost zbog rastućeg problema zlouporabe ilegalnih supstanci i njihovih štetnih posljedica po zdravlje pojedinaca i društvo u cjelini, analiza otpadnih voda postaje ne samo koristan alat za istraživanje, već i snažan instrument za informiranje i vođenje politika u području javnog zdravstva te borbe protiv konzumacije ilegalnih supstanci. S obzirom na sve veću sofisticiranost metoda analize i interpretacije podataka, može se očekivati da će korištenje otpadnih voda kao indikatora potrošnje ilegalnih supstanci nastaviti rasti i unaprjeđivati se u godinama koje slijede.

U ovom radu dan je pregled analitičkih metoda koje se upotrebljavaju za analizu otpadnih voda, na temelju koje se dobivaju podatci za procjenu potrošnje ilegalnih supstanci na istraživanim geografskim područjima te prijedlozi za precizniju kvantifikaciju.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Povijesni pregled razvoja metode

Otpadne vode koriste se tradicionalno za praćenje onečišćenja okoliša, osobito farmaceutika (lijekovi, herbicidi, pesticidi). Zadnjih dvadeset godina razvijen je novi koncept za procjenu potrošnje ilegalnih supstanci. Analiza otpadnih voda koja se provodi u svrhu indiciranja potrošnje ilegalnih supstanci relativno je suvremena metoda koja se brzo razvija i ima veliki potencijal. Popularna je ponajprije radi svoje efikasnosti i praktičnosti.

Konvencionalne metode koje su bile korištene za praćenje populacije u ovisnosti o ilegalnim supstancama temeljene su na podacima o broju liječenih ovisnika, zapljenama te nacionalnim upitnicima o navikama potrošnje ilegalnih supstanci [3]. Podatci u anketama podlijegali su subjektivnosti iz različitih osobnih razloga te nisu bili pouzdani u odnosu na WBE čija je velika prednost njena objektivnost. Dobiveni rezultati su izravno usporedivi sa stopom potrošnje psihoaktivnih tvari na geografskim područjima različitih veličina.

Metodama analize otpadnih voda moguće je detektirati i kvantificirati ilegalne supstance i njihove metabolite u tragovima. U otpadnim vodama je teže detektirati metabolite opojnih sredstava zbog vrlo malih količina metabolita u velikom razrjeđenju i zato je bilo potrebno razviti osjetljivu metodu, koja će moći prepoznati ilegalne supstance i njihove metabolite u tragovima. Prvi pokušaji praćenja ilegalnih supstanci u otpadnim vodama datiraju iz 2004. godine, kad se po prvi puta proučavala pojava amfetamina u tretiranoj otpadnoj vodi u Sjedinjenim Američkim Državama. Prva istraživanja uglavnom su bila fokusirana na velike urbane centre gdje je konzumacija opojnih sredstava bila viša i gdje su postojali sustavi za obradu otpadnih voda.

Razvojem tehnologije spektrometrije masa i drugih analitičkih tehnika, poput tekućinske kromatografije visokih (HPLC) i ultravisokih djelotvornosti (UPLC), omogućeno je preciznije detektiranje i kvantificiranje ilegalnih supstanci te njihovih metabolita u otpadnim vodama. Ove tehnike postale su sve dostupnije i pristupačnije, što potiče daljnji razvitak u ovom području.

Otkrivanje ilegalnih supstanci u otpadnim vodama postalo je korisno, kako u javnom zdravstvu radi nacionalne politike prevencije konzumacije supstanci koje izazivaju ovisnosti, tako i u kriminologiji. Sa aspekta kriminologije, praćenje ilegalnih supstanci je vrlo važno

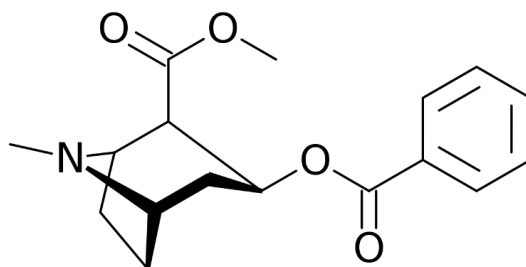
kako bi se na vrijeme mogli suzbiti kriminalni činovi distribucije i preprodaje ilegalnih supstanci te na taj način, pravovremenim intervencijama, pospješiti sigurnost stanovnika. Korisno je i za daljnje strategije rehabilitacije ovisnika.

Povećani interes za analizom otpadnih voda u svrhu praćenja konzumacije ilegalnih supstanci potaknuo je suradnju među znanstvenicima, javnim zdravstvenim agencijama i pravosudnim tijelima, budući da su rezultati istraživanja problem koji obuhvaća više područja. Suradnja je ključna za razvoj standardiziranih metoda analize i interpretaciju dobivenih rezultata. Metoda je suvremenog karaktera i očekuje se da će u godinama što slijede biti još naprednija. Ona nudi dragocjene podatke koji koriste zaštiti i sigurnosti društva te prevenciji ovisnosti.

## 2.2. Vrste i djelovanje detektiranih ilegalnih supstanci u otpadnim vodama

Uzorci otpadnih voda testiraju se na nekoliko najčešće konzumiranih ilegalnih supstanci: kokain, kanabis, amfetamin, metamfetamin, ecstasy (MDMA) i heroin.

**Kokain** je psihoaktivna tvar u obliku bijelog praha, koja je ujedno lokalni anestetik i simpatikomimetik, što znači da u organizmu djeluje tako da oponaša fiziološke prenositelje podražaja (adrenalin, noradrenalin, dopamin) u simpatičkom (autonomnom) živčanom sustavu (Slika 1.) [4, 5]. Kokain je alkaloid koji se obično priprema iz listova biljke *Erythroxylum coca* (Slika 2.), ali danas postoje i umjetni putevi sinteze kokaina. Izaziva učinak sličan amfetaminu – smanjuje apetit i potrebu za spavanjem, povećava fizičku aktivnost i euforiju. Kokain je uz amfetamin, najpopularnija ilegalna supstanca [6]. Uzima se intranazalno.



Slika 1. Molekularna struktura kokaina [7]



**Slika 2.** *Erythroxylum coca* [8]

**Kanabis**, poznat i pod imenom marihuana, dobiva se sušenjem lišća i stabljike indijske konoplje, *Cannabis sativa L.* (Slika 3.). Pripravci indijske konoplje mogu se pojaviti u obliku pločica dobivenih od smole koja se stvara na cvjetnim vrhovima i naziva se hašiš te u obliku ulja koje je ekstrakt otopine kanabisa, hašišovo ulje. Glavni psihoaktivni sastojak marihuane je delta-9-tetrahidrokanabinol (THC). Prilikom konzumacije kanabisa, THC ubrzano difundira kroz pluća u krvotok te prelazi u mozak i ostale organe u tijelu. THC djeluje na kanabinoidne receptore, to su specifične molekule u moždanim stanicama i dio su komunikacijskog sustava koji se naziva endokanabinoidni sustav te ima ključnu ulogu u razvoju mozga [9]. U organizmu postoji anandamid, taj spoj sudjeluje u tjelesnom endokanabinoidnom sustavu tako što se veže na kanabinoidne receptore, iste one receptore na koje djeluje psihoaktivni spoj THC u kanabisu. Izaziva izmijenjenu percepciju, poremećenu koordinaciju i pamćenje, probleme s učenjem, razmišljanjem i rješavanjem problema. Kanabis se konzumira pušenjem u smjesi s duhanom i gotovo sva njegova konzumacija je nezakonitog podrijetla (Slika 4.).



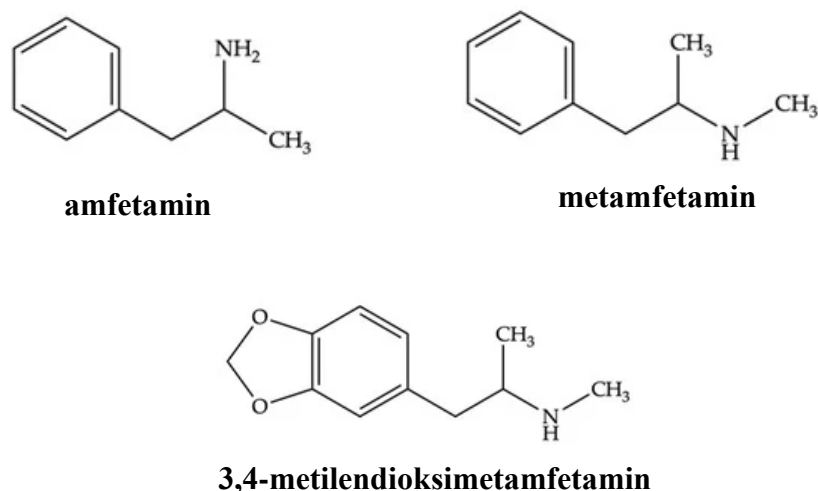
**Slika 3.** Indijska konoplja [10]



**Slika 4.** Kanabis za konzumaciju [11]

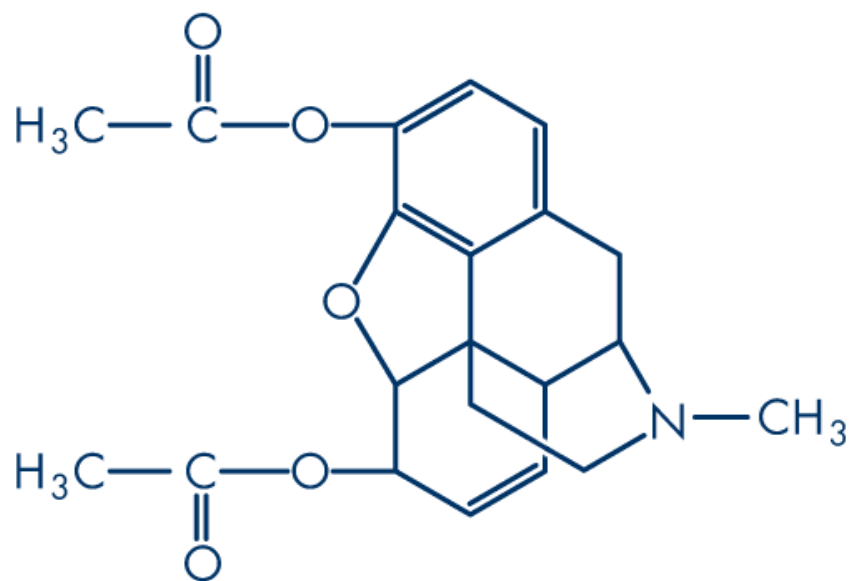
**Amfetamin** se obično nalazi u obliku bijelog praha koji na središnji živčani sustav djeluje kao stimulans. Usko je povezan s metamfetaminom (Slika 5.). Amfetamin podiže krvni tlak i uzrokuje tahikardiju, nakon čega slijede osjećaj povećanog samopouzdanja, društvenosti i energije. Smanjuju se apetit i umor što dovodi do nesanice [12]. Amfetamin je manje snažan od metamfetamina, ali nekontroliranim unošenjem njihove učinke teško je razlikovati. Metamfetamin izaziva jaku ovisnost, a kemijski je sličan amfetaminu. Učinci konzumacije su veliki porast razine dopamina u mozgu. Ove supstance najčešće se konzumiraju pušenjem, intranazalno, putem injekcije (češće kod metamfetamina), gutanjem. Pušenje i ubrizgavanje su najbrži putevi do intenzivne euforije koju izazivaju ove dvije vrlo slične psihoaktivne tvari.

**Ecstasy** ili MDMA (3,4-metilendioksimetamfetamin) je sintetička psihoaktivna tvar koja dijeli sličnosti s amfetaminom (Slika 5.). Stvara osjećaj euforije, suosjećajnosti i hiperaktivnosti te iskrivljuje percepciju vremena. MDMA djeluje na povećanu aktivnost triju neurotransmitera – dopamina, serotonina i noradrenalina [13]. Povećana suosjećajnost i želja za socijalizacijom su izravno ili neizravno uzrokovani oslobađanjem velike količine serotonina, koji je zaslužan za dobro raspoloženje. Uslijed prevelikog oslobađanja serotonina, hormona sreće, dolazi do poremećaja lučenja i trošenja ove važne kemikalije u mozgu i posljedično nastaju negativni efekti, poput depresije, zbunjenosti, problema sa spavanjem, anksioznosti i želje za opetovanim uzimanjem psihoaktivne tvari. Ecstasy ili MDMA se konzumira najčešće oralnim unošenjem kapsula ili tableta. Popularni naziv koji se često koristi u žargonu jest Molly, nadimak dolazi od riječi „molekularno“ te se odnosi na čisti kristalni prah u obliku MDMA-a koji se prodaje u kapsulama.



**Slika 5.** Molekularne strukture amfetamina, metamfetamina i MDMA [14]

**Heroin** je opojno sredstvo sintetizirano iz morfina, tvari koja se pojavljuje u prirodi te ekstrahira iz sjemenki mahuna azijske opijatske biljke maka. Proces proizvodnje heroina iz morfina uključuje nekoliko koraka sinteze i rafiniranja, uključujući ekstrakciju morfina iz opijuma, konverziju morfina u diacetylmorfin (heroin), čija je struktura prikazana na slici 6., i na kraju čišćenje dobivenog proizvoda. Heroin se najčešće nalazi u obliku praha bijele ili smeđe boje te kao crna ljepljiva smola, poznata pod nazivom „crni katran heroin“ [15]. Heroin se u mozgu sintetizira u morfin, koji povezuje nastale molekule morfina na opioidne receptore. Opioidni receptori smješteni su u mnogim dijelovima tijela i mozga, posebno u onim dijelovima koji su zaslužni za percepciju boli i nagrada. Preciznije, opioidni receptori su smješteni u moždanom deblu koje kontrolira automatske procese nužne za funkciju organizma, poput krvnog tlaka, disanja i uzbuđenja. Upravo zbog prethodno navedenih učinaka, predoziranje heroinom može rezultirati prestankom disanja, što dovodi do smrtnog ishoda. Heroin se unosi u tijelo pušenjem, ubrizgavanjem ili inhaliranjem.



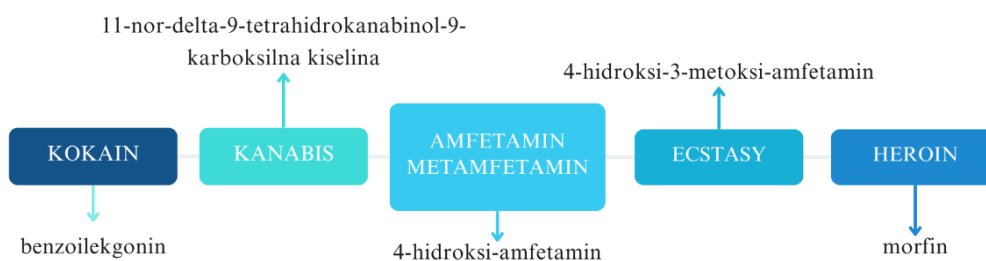
**Slika 6.** Diacetylmorfin – glavni psihoaktivni sastojak heroina [16]



### 2.3. Ilegalne supstance i njihovi metaboliti

Konsumaciju ilegalnih supstanci lako je detektirati pomoću metabolita koji se stvaraju u jetri i izlučuju urinom, fekalijama ili znojem, talože u kosi i noktima te zadržavaju u krvi. Analiza opioida u izlučevinama pokazuje kratkotrajnu izloženost, dok analiza noktiju i kose pokazuje dugotrajnu - radi se o mjesecima, pa čak i godinama.

Analiza izlučevina daje kvalitativnu sliku o potrošnji narkotika, a analiza noktiju i kose kvantitativnu informaciju o jačini i trajanju [17]. Detekcija ilegalnih supstanci u organizmu ovisi o biološkoj raspoloživosti, koja opisuje količinu ili stopu aktivnog sastojka supstance koja dopijeva u krvotok i postaje dostupna tijelu za izvršavanje bioloških efekata. Prikaz najznačajnijih metabolita ilegalnih supstanci nalazi se na slici 7.



**Slika 7.** Prikaz metabolita ilegalnih supstanci

01	KOKAIN	2-4 dana
02	KANABIS	3 do >30 dana (ovisno u učestalosti konzumacije)
03	AMFETAMIN METAMFETAMIN	2 dana
04	ECSTASY (MDMA)	1-3 dana za jednokratnu upotrebu 4-7 dana za kronične ovisnike
05	HEROIN	2-4 dana

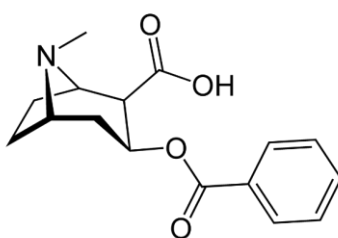
**Slika 8.** Vremenski period u kojem je moguće detektirati metabolite ilegalnih supstanci u urinu [18]



### 2.3.1. Benzoilekgonin

Benzoilekgonin je glavni metabolit kokaina (Slika 9.). Biološki poluživot benzoilekgonina procijenjen je na 7.5 sati [20]. Ovisno o načinu konzumacije, mijenja se biološki poluživot kokaina te se kreće između 16 i 90 minuta [19]. Intranazalnom konzumacijom kokaina, bioraspoloživost je tri puta manja nego kod intravenskog uzimanja [20]. Izlučivanje metabolita kokaina, najčešće benzoilekgonina, vrši se putem urina.

Samo se 1-9% kokaina izlučuje nepromijenjeno i moguće ga je otkriti samo nekoliko sati nakon uzimanja [21]. Identificirano je još desetak metabolita kokaina u urinu, ali u vrlo niskim koncentracijama [22]. Benzoilekgonin se najčešće testira u uzorcima otpadnih voda, čijom analizom dobivamo podatke o potrošnji kokaina. Iz otpadnih voda moguće je izolirati benzoilekgonin unutar 2-4 dana (Slika 8.) [21]. Za analitičku detekciju benzoilekgonina u otpadnim vodama, kao i ostalih najznačajnijih navedenih metabolita, rabi se tekućinska kromatografija sa spektrometrijom masa (LC-MS/MS).



**Slika 9.** Molekularna struktura benzoilekgonina [23]

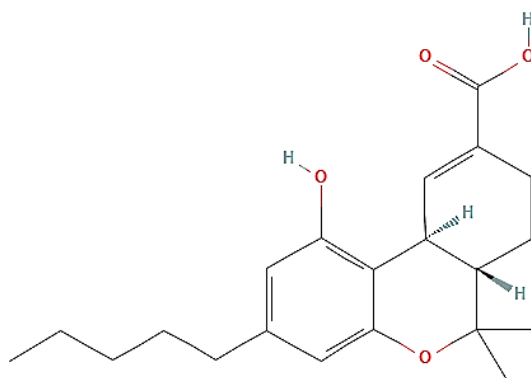
### 2.3.2. 11-nor-delta-9-tetrahidrokanabinol-9-karboksilna kiselina

11-nor-delta-9-tetrahidrokanabinol-9-karboksilna kiselina, čija je struktura prikazana na slici 10., smatra se glavnim metabolitom koji se izlučuje urinom u obliku glukuronida. Glukuronid je spoj koji nastaje vezanjem glukuronske kiseline za neki drugi spoj putem procesa poznatog pod nazivom glukuronidacija. Glukuronska kiselina se prirodno nalazi u organizmu i značajna je u procesu detoksikacije. Glukuronidacija je proces u kojemu se glukuronska kiselina vezuje s različitim supstancama koje dopijuju u organizam, a nisu izvor energije, kako

bi se olakšala njihova eliminacija iz tijela. Glukuronidacija se vrši u jetri, luči se u žuči, a eliminira iz organizma putem urina u kojemu se nalaze glukuronidi [24].

Tri dana nakon pušenja marihuane, oko 50% inhaliranog THC-a (delta-9-tetrahidrokanabinola) izlučuje se u obliku metabolita, a ostala polovica se raspodjeljuje u organizmu. Metaboliti THC-a izlučuju se većim dijelom putem fekalija (oko 65%) i manjim dijelom urinom (oko 25%).

Zbog pohranjivanja THC u masnom tkivu i kontinuiranim otpuštanjem u krvotok, moguće je i nakon prestanka uzimanja marihuane detektirati korištenje ove ilegalne supstance u urinu. Kod kroničnih konzumenata marihuane, procijenjeno zadržavanje metabolita u tijelu nakon učestale konzumacije iznosi više od 30 dana (Slika 8.). Biološki poluživot THC-a procijenjen je na 20 sati [25].



**Slika 10.** Molekularna struktura 11-nor-delta-9-tetrahidrokanabinol-9-karboksilne kiseline [26]

### 2.3.3. 4-hidroksi-amfetamin

4-hidroksi-amfetamin nastaje hidroksiliranjem amfetamina. Hidroksiliranje je naziv za proces kojim se spoju dodaje hidroksilna (-OH) skupina. Hidroksiliranje amfetamina događa se u jetri kroz proces metabolizma. Specifični enzimi iz citokromske superfamilije kataliziraju hidroksilaciju amfetamina u jetri, odnosno dodaju hidroksilnu skupinu na amfetaminsku molekulu, nakon čega nastaje već spomenuti, vrlo važan metabolit, 4-hidroksi-amfetamin [20]. Najveći dio doze amfetamina nepromijenjen se izluči urinom. Metamfetamin se djelomično demetilira u amfetamin, a najvećim dijelom se također luči urinom u

nepromijenjenom obliku, što znači da se u uzorcima otpadnih voda prepoznaje kao metamfetamin, kemijske formule  $C_{10}H_{15}N$ . Količina amfetamina i metamfetamina izlučena urinom ovisi o pH urina zato što su oni bazni spojevi, koji imaju pH veći od 7 [5].

Svaka jedinica porasta ili smanjenja pH utječe na porast ili smanjenje poluživota metamfetamina u plazmi za 7 sati. Zbog ovoga se postotak doze izlučene u osnovnom obliku kreće u alkalnom urinu oko 2%, a u kiselom do 76% [27]. Metabolite amfetamina moguće je detektirati unutar 48 sati (Slika 8.).

### **2.3.5. 4-hidroksi-3-metoksi-amfetamin (HMMA)**

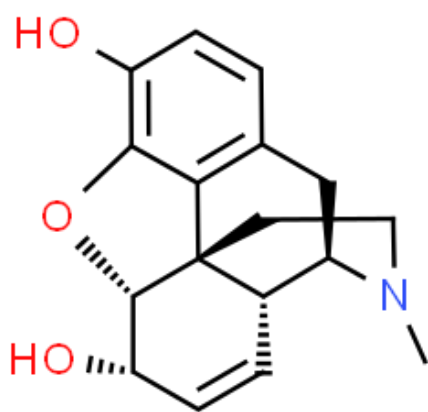
3,4-metilendioksimetamfetamin (MDMA) konvertira se u 3,4-metilendioksiamfetamin (MDA) nakon N-demetilacije pod katalitičkim utjecajem specifičnih enzima iz citokromske superfamilije, koji su spomenuti kod hidroksiliranja amfetamina. MDA je aktivni metabolit MDMA koji zadržava efekte ove ilegalne supstance. MDMA i MDA zatim podliježu metaboličkim reakcijama O-demetilacije, pri čemu nastaju odgovarajući 3,4-dihidroksi derivati, koji se pod utjecajem katehol-orto-metiltransferaza (COMT) zatim konvertiraju u 4-hidroksi-3-metoksi-amfetamin. COMT je enzim koji je ključan u stvaranju neurotransmitera poput dopamina, noradrenalina i adrenalina. Nalazi se u različitim tkivima u organizmu, a posebno je značajan u mozgu, gdje kontrolira razinu dopamina. Kontrola razine dopamina važna je u regulaciji raspoloženja, pažnje i percepcije boli. Metabolit MDMA se izlučuje urinom, u obliku glukuronida i sulfata [28, 29]. Ovisno o unesenoj dozi, HMMA je moguće izolirati iz uzorka unutar 1-3 dana, a za kronične konzumente čak 4-7 dana zbog nakupljanja supstance u organizmu (Slika 8.).

### **2.3.5. 6-monoacetilmorfin**

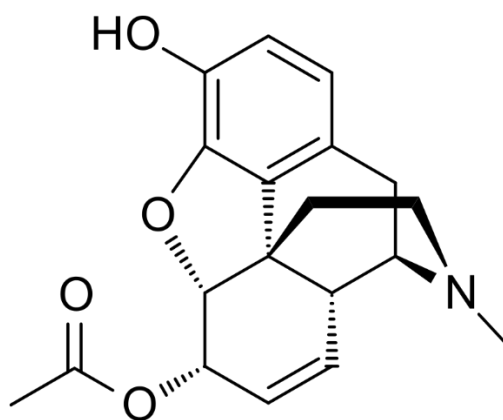
Morfin je primarni aktivni metabolit heroina (diacetilmorfina), prikazan na slici 11. Nakon što se heroin injektira u organizam, brzo se metabolizira u morfin, koji je odgovoran za efekte euforije i ekstaze. Morfin, prikazan na slici 11., psihoaktivni je alkaloid koji djeluje na iste receptore u tijelu kao i heroin. Diacetilmorfin (heroin) u organizmu se deacetilira prvo u 6-acetilmorfin, a zatim u morfin [30]. Biološki poluživot heroina u plazmi je 2 do 3 minute, pa ga je praktički nemoguće naći u organizmu [31]. Jedini metabolit koji se nalazi u urinu

samo 2-8 sati nakon konzumacije jest 6-monoacetilmorfin, prikazan na slici 12., koji se vrlo brzo metabolizira u morfin.

Morfin se može detektirati u razdoblju 2-4 dana u urinu nakon uzimanja heroina [21]. Prema tome, morfin je glavni metabolit heroina koji se određuje u urinu i gotovo je nemoguće bez prisutnosti 6-monoacetilmorfina odrediti radi li se o uzimanju heroina, kodeina ili morfina. Heroin često sadrži acetilkodein koji se metabolizira u kodein. U uzorcima je moguće detektirati morfin do 48 sati jer morfin ima duži biološki poluživot od heroina (Slika 8.).



Slika 11. Morfin [32]



Slika 12. 6-monoacetilmorfin [33]

#### 2.4. Analiza otpadnih voda na količinu potrošnje ilegalnih supstanci

Analiza otpadnih voda uvelike ovisi o masenom protoku detektirane tvari. Maseni protok u kontekstu otpadnih voda odnosi se na količinu određene ilegalne supstance koja se detektira u otpadnoj vodi u određenom vremenskom periodu. Maseni protok može se izraziti kao volumen tvari koji prolazi kroz sustav (npr. u litrama) u jednom danu ili satu te se koristi za opisivanje koncentracije detektirane ilegalne supstance u otpadnim vodama [34]. Određivanjem masenog protoka moguće je dobiti podatke o sveukupnoj konzumaciji ilegalnih supstanci u zajednici. Ovaj pristup posebno je prikladan za praćenje potrošnje ilegalnih supstanci u stvarnom vremenu [35]. Omogućava prepoznavanje promjenjivih trendova u potrošnji na temelju kojih se identificiraju problemi i stvara politika prevencije.

U svrhu praćenja koncentracije ilegalnih tvari preporučljivo je uzorkovati tzv. sirovu otpadnu vodu koja ulazi u postrojenje za obradu otpadnih voda zato što nije obrađena i u njoj se nalazi urin koji sadrži spomenute metabolite ilegalnih supstanci.

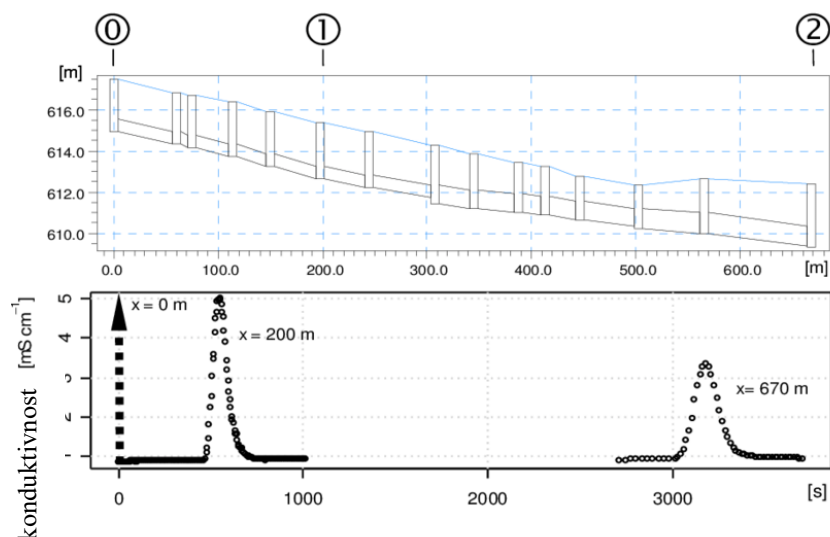
Uzorci se mogu automatski i kontinuirano uzimati iz otpadne vode pomoću uređaja za automatsko uzorkovanje te se na temelju dobivenih podataka može pouzdano odrediti kolika je stopa konzumacije određenih ilegalnih supstanci u zajednici.

Otpadne vode u kanalizacijskim sustavima podložne su fizičkim promjenama, koje ne mijenjaju strukturu molekula te kemijskim i biološkim promjenama, koje mijenjaju svojstva i strukturu molekula. Vrlo je važno uočiti promjene kako bi rezultati analize otpadnih voda na količine ilegalnih supstanci bili što precizniji. U daljnjem tekstu opisani su glavni problemi i nedostaci analize otpadnih voda u svrhu kvantificiranja potrošnje ilegalnih supstanci.

#### **2.4.1. Problemi i nedostaci metode analize otpadnih voda na potrošnju ilegalnih supstanci**

Veliki problem za određivanje potrošnje ilegalnih supstanci analizom otpadnih voda predstavlja razrjeđenje. Rezultati dobiveni istraživanjem koje su proveli Weiss i suradnici 2006. godine, pokazali su da uzorci dobiveni iz otpadnih voda mogu dati netočne rezultate uslijed vremenskih nepogoda poput obilnih kiša, koje će slijevanjem u kanalizaciju uzrokovati veliku razrijeđenost otpadne vode i samim time će biti teže detektirati metabolite ilegalnih supstanci u uzetim uzorcima. Obilne kiše najčešće uzrokuju izlivanje vode iz kanalizacije, budući da sustavi za odvodnju budu preopterećeni i na taj način se gube potencijalni uzorci. Preporučuje se uzorkovanje otpadnih voda za vrijeme suhog vremena kako bi se izbjegli potencijalni gubitci [36].

Također, mjesto uzimanja uzoraka u kanalizacijskim sustavima predstavlja važan faktor za dobivanje reprezentativnih uzoraka. U istraživanjima pomoću komponente za praćenje koje su proveli Rieckermann i suradnici 2005. godine te Huisman i suradnici 2000. godine je uočeno da je za procjenu ilegalnih supstanci u kanalizacijskim sustavima preporučljivo uzimati uzorke na određenoj udaljenosti od izvora, u tzv. dalekom polju (engl. *far field*), gdje je utjecaj impulsa procesa ispuštanja na miješanje tvari zanemariv. Transport u dalekom polju dominira advekcijom, disperzijom i procesima transformacije, poput razgradnje.



**Slika 13.** (Gornji dio) Longitudinalni profil dijela kanalizacije (0 – ubrizgavanje komponente za praćenje, 1 – prva kontrolna točka, 2 – druga kontrolna točka); (Donji dio) Krivulje komponente za praćenje na mjestima ubrizgavanja i kontrolnih točaka [37]

Gornja slika 13. prikazuje učinak advekcije (transport tvari zajedno s glavnim tokom vode u kanalizacijskom sustavu) i disperzije (razvučenost zbog trodimenzionalnog, nejednolikog polja brzine). Rezultati su dobiveni ubrizgavanjem komponente za praćenje na tri različita mjesta u kanalizacijskom sustavu. Može se uočiti da advekcija prenosi komponentu za praćenje od točke 1 do točke 2 u otprilike 2 800 sekundi. Krivulja pomoćne komponente se razvlači i vršna koncentracija se značajno smanjuje na kontrolnoj točki 2. Prikazani donji graf na slici 13. koristan je za razumijevanje dinamike transporta ilegalnih supstanci i njihovih metabolita u kanalizacijskim sustavima, posebno zbog spomenute advekcije i disperzije. Za većinu kanalizacijskih sustava, transport se smatra jednodimenzionalnim jer su koncentracije otopljenih supstanci dobro izmiješane bočno i vertikalno u otpadnim vodama [37]. Dugotrajno miješanje u kanalizacijskim sustavima obično se modelira disperzijskim koeficijentom koji ovisi o raspodjeli brzine [38].

Analiza uzoraka može biti otežana i zbog unošenja kemijskih reagensa visoke koncentracije, što za primjer daje čišćenje sanitarnih čvorova ili kuhinja te otpuštanje kemikalija u odvođe [39]. U radu, Heberer je 2002. godine izvijestio da otpadne vode mogu sadržavati i tragove raznih lijekova, budući da svaki lijek koji se unosi u organizam ima svoj metabolički put i na kraju završava u urinu. Heberer (2002.) je također iznio da bi trebali biti dostupni podatci o kliničkoj upotrebi lijekova.

Dostupnost tih podataka uvelike bi otklonila pogrešne interpretacije rezultata. Jedan od primjera zašto je posebno važno imati dostupne podatke o kliničkoj upotrebi lijekova jest zbog metabolita heroina, morfina, koji je u čestoj upotrebi u medicini te kao takav nije ilegalna supstanca kao heroin. Dodatno, molekule metabolita ne mogu se akumulirati u vodi, što značajno otežava točnu procjenu količine potrošnje narkotika [40]. Nedostatak metode je taj što će krajnji rezultat analize otpadnih voda biti podcijenjen, drugim riječima, kvantificirat će se manja količina metabolita u uzorcima koja se na kraju mora korigirati pomoću faktora korekcije pri izračunu. Točnost analize utvrđuje se kalibracijskim pravcima. Linearnost i preciznost evaluiraju se korištenjem deionizirane vode.

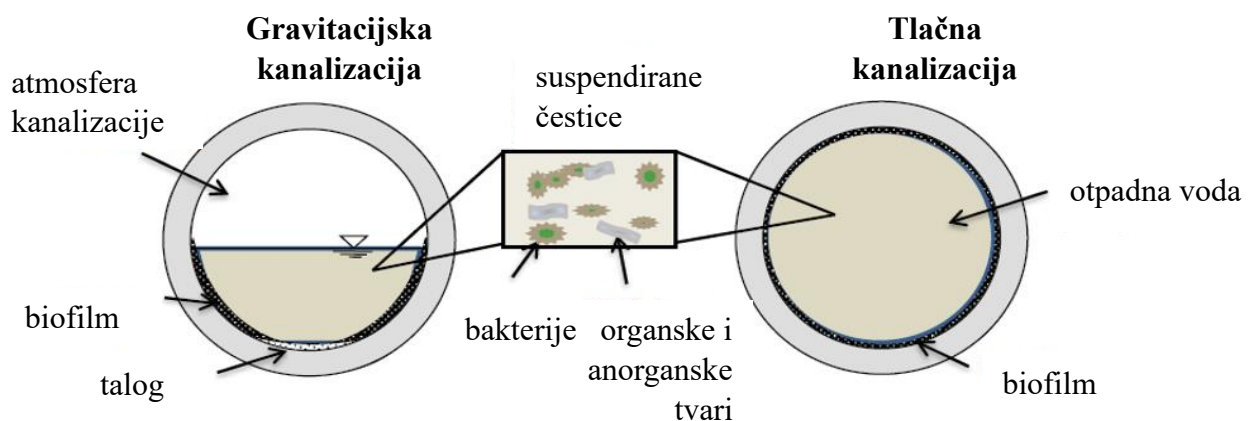
Problem također predstavlja i nepredvidivo ponašanje metabolita u otpadnim vodama, koji su opisali Siegrist i Joss 2012. godine [41]. Uočeno je da dio metabolita može biti potpuno razgrađen prije nego što uopće dospije do sustava za obradu otpadnih voda, uslijed povišene temperature koja može degradirati molekule osjetljive na temperaturu. Siegrist i Joss (2012.) navode da su ilegalne supstance podložne i biotransformaciji uslijed aerobnih i anaerobnih uvjeta, pri čemu pokazuju afinitet prema bakterijskim enzimima i djeluju kao nerastući supstrati. Iz tih razloga, bila su potrebna eksperimentalna istraživanja na temelju kojih je određena kemijska i biološka stabilnost molekula metabolita. Još nije otkriveno koje bakterije su odgovorne za biotransformaciju ilegalnih supstanci [41]. Hvitved-Jacobsen i suradnici (2013.) navode da se mikrobna zajednica u postrojenjima za obradu otpadnih voda uvelike razlikuje od one u kanalizacijskim sustavima. Pod uvjetima koji vladaju u kanalizacijskim sustavima, brzorastuće heterotrofne bakterije nadmašuju sporije rastuće organizme, kao što su nitrifikacijske bakterije [42]. Thai i suradnici u svome istraživanju iz 2014. godine implicirali su na to da je biofilm važan parametar koji treba uzeti u obzir, budući da su istraživali stabilnost metabolita ilegalnih supstanci u biofilmu kanalizacijskog sustava [43].

U radu iz 2017. godine Causanilles i suradnici iznijeli su da je glavni analitički izazov u analizi otpadnih voda bio razvoj višekomponentnih metoda koje uključuju analite različitih kemijskih svojstava, poput bazičnosti i kiselosti te hidrofилности i lipofilnosti. Aktivni spoj kanabisa, THC, i njegov karboksilni kiselinski metabolit, 11-nor-delta-9-tetrahidrokanabinol-9-karboksilna kiselina, THC-COOH, posebno su izazovni zbog svojih kiselih i lipofilnih svojstava [44]. Istraživanja su pokazala da je stabilnost kokaina i njegovih metabolita vrlo mala. Hidroliza kokaina ovisna je o pH, a zakiseljavanjem uzorka moguće je očuvati koncentracije kokaina na niskim i visokim temperaturama. Transformacije kokaina se također

moгу spriječiti korištenjem konzervansa poput natrijeva metabisulfita,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ , i natrijeva azida,  $\text{NaN}_3$ , kako navode Chen i suradnici u radu iz 2013. godine [45]. Koncentracije kokaina u nefiltriranim uzorcima su veće. Također, kokain je stabilan do 24 sata ako se čuva u Milli-Q vodi (voda visoke čistoće), što su dokazali Östman i suradnici u radu iz 2014. godine [46]. Nasuprot maloj stabilnosti i osjetljivosti kokaina, njegov metabolit benzoilekgonin, pokazao se kao izuzetno stabilna komponenta u raznim ispitanim uvjetima.

Amfetamin i metamfetamin su vrlo stabilni u nefiltriranim uzorcima pri neutralnom pH i  $4^\circ\text{C}$  ili  $20^\circ\text{C}$  i takvi se mogu čuvati 24 sata. Istraživanja koja su proveli Warner i Norman 2000. godine su pokazala da se koncentracija amfetamina u uzorcima mijenja s promjenom temperature i tako je otkriveno da na višim temperaturama koncentracija amfetamina raste [47]. Pri sobnoj temperaturi porast koncentracije iznosi čak 73%. MDMA pokazuje vrlo veliku stabilnost u uvjetima koji su opisani za amfetamin i metamfetamin. Sve tri ilegalne supstance su stabilne pri zamrzavanju na  $-20^\circ\text{C}$  i na taj način se mogu sačuvati na duže vrijeme. Za amfetamin i metamfetamin to je do 123 dana, a za MDMA do 21 dan [44]. Heroin je vrlo nestabilan u svim uvjetima jer se brzo pretvara u 6-monoacetilmorfin te još nije pronađen pouzdan metabolit heroina za mjerenja.

Dizajn i način rada kanalizacijskog sustava utječu na prevladavajuće probleme i ograničavajuće faktore, poput pH, koncentracije kisika, temperature, brzine protoka i taloga. Na slici 13. je prikaz gravitacijske kanalizacije, u koju se otpadne vode kreću prirodno pomoću gravitacije prema nižoj točki kanalizacije i tlačna kanalizacija u koju se otpadne vode transportiraju tlačnim pumpama.



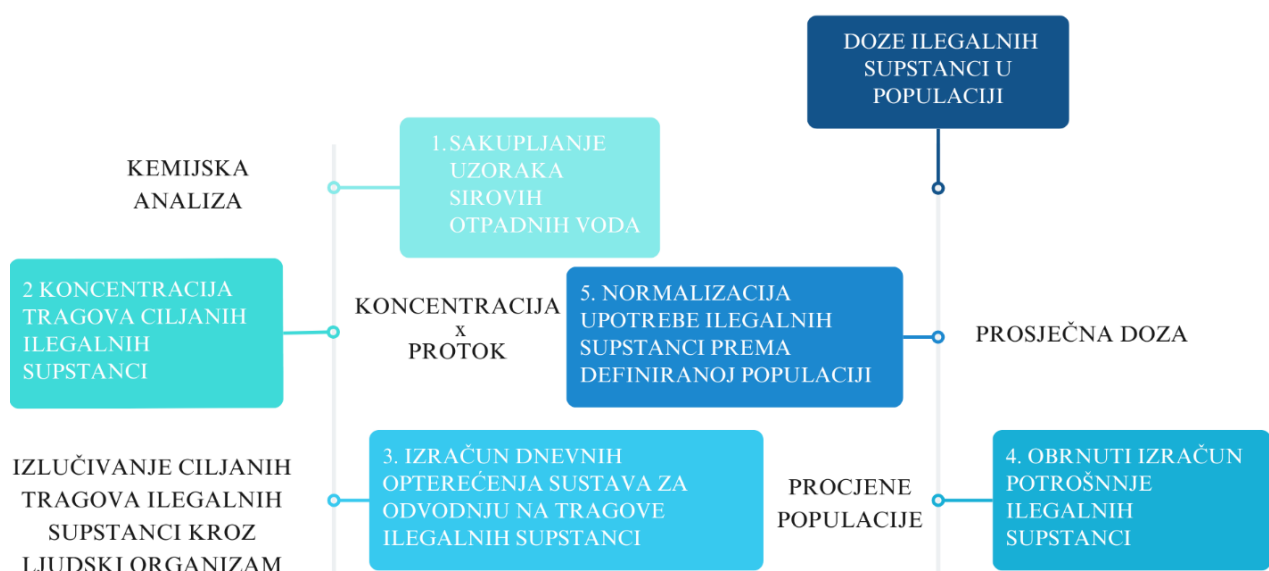
**Slika 14.** Poprečni presjeci gravitacijskih i tlačnih kanalizacija [48]



Eksperimenti stabilnosti metabolita ilegalnih supstanci u kanalizacijskim sustavima trebali bi uzeti u obzir sve opisane poteškoće navedene u gornjem tekstu, koje se događaju u pojedinim odjeljcima kanalizacije. Prvo što treba uzeti u obzir jest tzv. masna tekućina (engl. *bulk liquid*), to je tekućina koja sadrži suspendirane čestice, bakterije te organske i anorganske tvari. Drugo, biofilm koji raste na zidovima kanalizacije, vidljivo na slici 13. Treće, talog i četvrto atmosferu gravitacijske kanalizacije [48]. Većina istraživanja stabilnosti temeljila se na promatranju masne tekućine. Do danas nije provedeno istraživanje koje bi uključivalo utjecaj kanalizacijskih taloga ili atmosfere kanalizacije na transformaciju metabolita ilegalnih supstanci. Samo jedno istraživanje uključilo je biofilm s kanalizacijskih zidova (Thai i suradnici, 2014. godina).

## 2.4.2. Postupak određivanja metabolita i zaostalih ilegalnih supstanci u otpadnim vodama

Metoda analize otpadnih voda sastoji se od nekoliko uzastopnih koraka koji omogućuju identificiranje i kvantificiranje ciljanih metaboličkih tragova ilegalnih supstanci u sirovim otpadnim vodama te izračun količine ilegalnih supstanci koje se nalaze u otpadnim vodama [49].



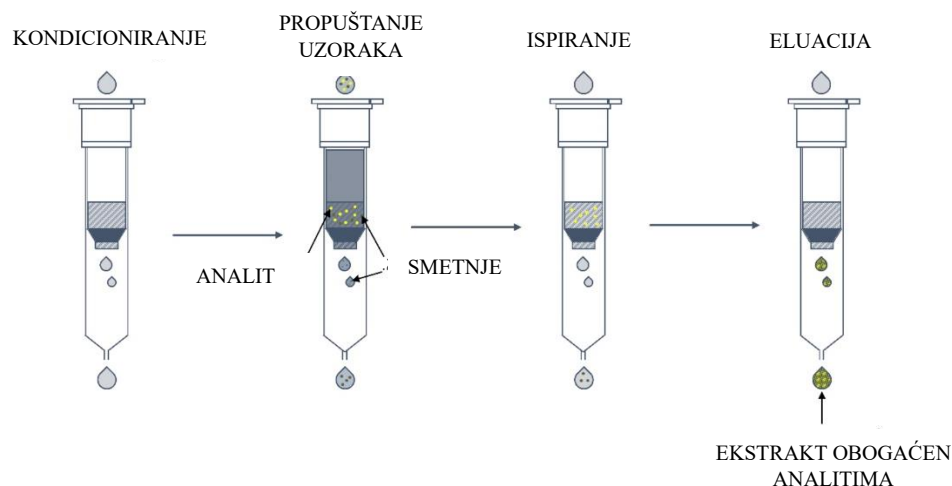
**Slika 15.** Glavni uzastopni koraci pristupa metodi analize otpadnih voda i potrebni podatci

Na gornjoj slici 15. prikazani su glavni uzastopni koraci pristupa metodi analize otpadnih voda u svrhu identificiranja i kvantificiranja ilegalnih supstanci i njihovih metabolita (numerirano 1. – 5.) i podataka potrebnih za svaki korak (pored svake obojene numerirane kućice) koji će biti detaljnije opisani u narednom tekstu.

Prvi korak kojim se pristupa metodi analize otpadnih voda na količinu ilegalnih supstanci jest uzorkovanje sirovih otpadnih voda, slika 15. Nužno je uzeti reprezentativan uzorak jer je u cilju dobiti pouzdane rezultate mjerenja koji će koristiti u epidemiologiji otpadnih voda (WBE) [50]. Reprezentativan uzorak uzima se na točki ulaza u postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda i trebao bi sadržavati cjelokupnu količinu dnevno ispuštene ciljane ilegalne supstance u zajednici. Uzorci se uzimaju kontinuirano 24 sata te se prikupljaju u posudama od polietilena visoke gustoće. Pohranjuju se na  $-20^{\circ}\text{C}$  kako bi se sačuvali do početka analize [51]. Prikupljeni uzorci trebaju proporcionalno odgovarati protoku ili volumenu kako bi se izbjeglo neprecizno vaganje uzorka [52]. Zbog mogućih kratkoročnih fluktuacija, preporuča se uzimanje uzoraka u intervalima od 5-10 minuta.

Uzorke je preporučljivo profiltrirati kako bi se spriječio rast mikroorganizama i začepljenje prilikom postupka ekstrakcije na čvrstoj fazi, ali treba računati i na gubitak određenog dijela metabolita ilegalnih supstanci jer su filtri načinjeni od vrlo malih promjera pora. Najbolji filtri koji uzrokuju najmanje gubitaka analita su filtri od staklenih vlakana (engl. *glass-fibre*, GF). Zbog mogućih gubitaka prilikom filtracije, Castiglioni i suradnici u radu iz 2013. godine preporučuju dodavanje unutarnjih standarda obogaćenih atomima specifičnog izotopa, koji se može precizno detektirati analitičkim metodama poput kromatografije i spektrometrije masa [53].

Najčešće korišteni analitički postupak za analizu ilegalnih supstanci i njihovih metabolita u otpadnim vodama temelji se na ekstrakciji na čvrstoj fazi (engl. *solid-phase extraction*, SPE), nakon čega slijedi analiza tekućinskom kromatografijom u kombinaciji sa spektrometrijom masa (engl. *liquid chromatography – mass spectrometry*, LC-MS/MS).



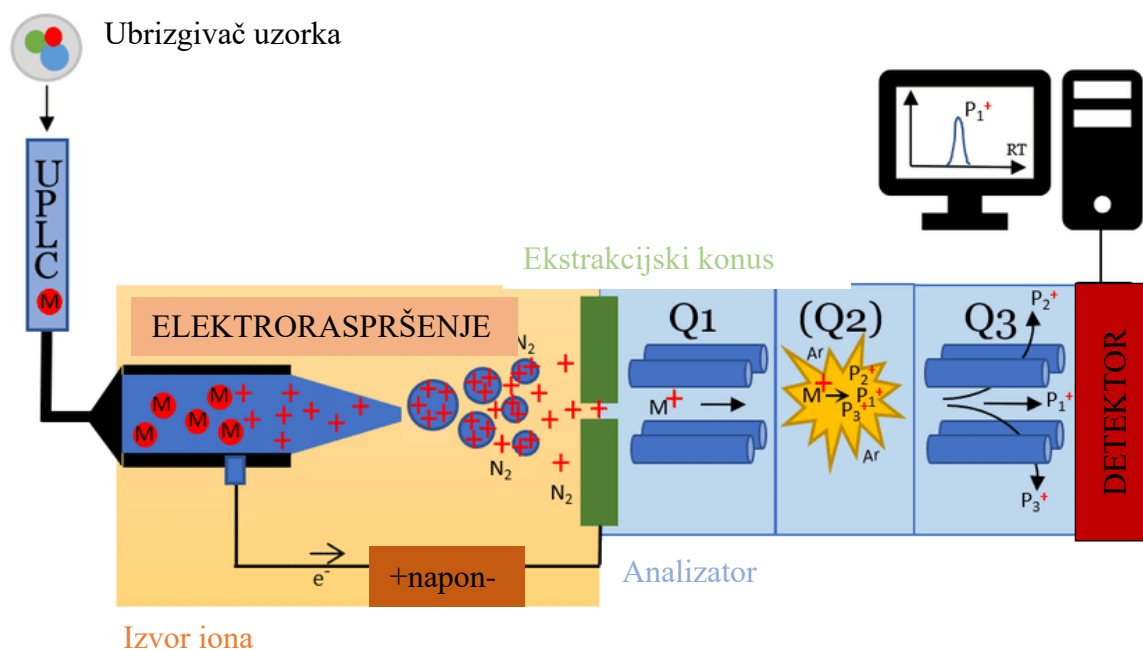
**Slika 16.** Prikaz ekstrakcije na čvrstoj fazi [54]

Ekstrakcija na čvrstoj fazi (SPE) prikazana na slici 16. definira se kao metoda ekstrakcije analita koja se temelji na procesu adsorpcije na materijale čvrste faze u koloni te naknadnoj desorpciji pomoću otapala [54]. Uzorak se propušta kroz čvrstu fazu koja zadržava analit, zatim slijedi sušenje kolone i eluiranje analita otapalom. Uzorci otpadnih voda korigiraju se na nižu pH vrijednost prije ekstrakcije na čvrstoj fazi. Razlog tome jest poboljšanje učinkovitosti ekstrakcije određenih skupina promatranih molekula i osjetljivosti analize. Zakiseljavanje pomaže pri protoniranju kiselih funkcionalnih skupina na promatranim metabolitima. Ovaj postupak omogućuje lakše vezivanje molekula na sorbens i na taj način ih čini bolje topljivima u organskom otapalu koje se primjenjuje za ekstrakciju na čvrstoj fazi. Tekućinska kromatografija u kombinaciji sa spektrometrijom masa (LC-MS/MS) najčešće je korištena instrumentalna analiza u epidemiologiji otpadnih voda.

Laboratoriji koji rade kemijsku analizu uzoraka uglavnom koriste analitičke metode koje su im dostupne i zbog toga rezultati mogu biti podložni pristranosti, unatoč pravilnoj primjeni validiranih postupaka, što otežava usporedbu rezultata. Procjena potrošnje ilegalnih supstanci zahtijeva precizno i osjetljivo kvantificiranje ostataka metabolita ili nepromijenjenih supstanci. Zakiseljavanje uzorka prije SPE može poboljšati osjetljivost i učinkovitost analize. Niska hlapljivost i srednja do visoka polarnost molekula metabolita čini tekućinsku kromatografiju sa spektrometrijom masa (LC-MS/MS) najboljim odabirom tehnike za analizu. Prednosti koje ima ova instrumentalna analiza jesu kratko vrijeme analiziranja te sposobnost detekcije velikog broja različitih spojeva koju prati visoka selektivnost i

osjetljivost. Pouzdani podatci daju temelj za kasnije izračune potrošnje ilegalnih supstanci. SPE često prethodi tekućinskoj kromatografiji sa spektrometrijom masa zbog pročišćavanja i ugušćivanja uzorka. Koncentracije ilegalnih supstanci u otpadnim vodama obično su oko tisuću puta manje nego u biološkim tekućinama ljudskog organizma, pa je ugušćivanje važno jer uzorci sadrže niske koncentracije metabolita.

Nakon provedene analize tekućinskom kromatografijom, slijedi ionizacija i fragmentacija molekula pomoću elektroraspršenja. Analiti prevedeni u ionski oblik ulaze u MS sustav, gdje se dodatno fragmentiraju i zatim detektiraju praćenjem specifičnih omjera masa ( $m/z$ ) za svaki spoj [55]. Na slici 17. prikazan je postupak analize tekućinskom kromatografijom sa spektrometrijom masa. Uzorak se ubrizgava u kolonu za tekućinsku kromatografiju ultravisoke djelotvornosti (UPLC) radi razdvajanja, a odvojeni metaboliti detektiraju se pomoću pozitivne ionizacije elektroraspršenja. U ekstrakcijski konus ulaze isključivo ioni analita s jednim dodatnim  $H^+$  ionom, koji dalje idu u MS/MS analizator. MS/MS podrazumijeva dva kvadrupolna masena analizatora ( $Q_1$  i  $Q_3$ ) s kolizijskom ćelijom ( $Q_2$ ) visokog tlaka argonskog plina, koja fragmentira, ovisno o energiji sudara, ion analita ( $M^+$ ) u nekoliko produktivnih iona ( $P^+$ ), od kojih samo jedan doseže detektor [56]. Detekcija rezultira kromatogramima iz kojih je moguće odrediti količinu specifičnog analita.

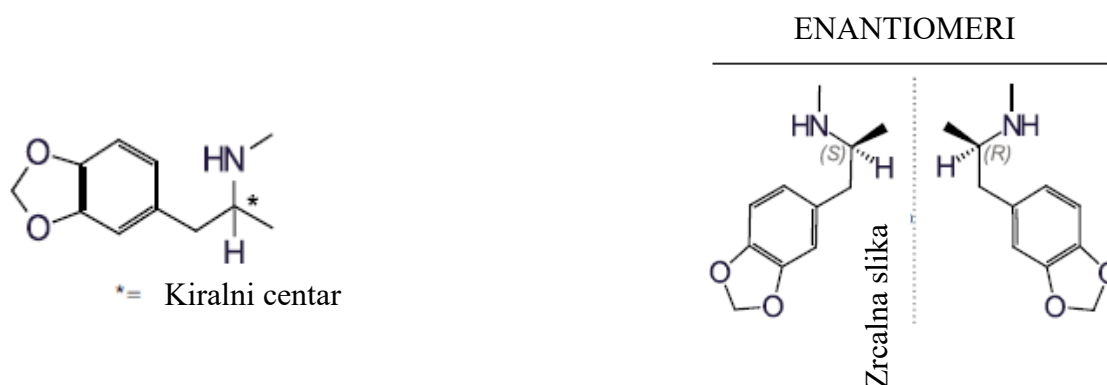


**Slika 17.** Prikaz tekućinskog kromatografa sa spektrometrijom masa (LC-MS/MS) [56]

Sljedeći korak u analizi otpadnih voda predstavlja izračun dnevnih opterećenja sustava za odvodnju na tragove ilegalnih supstanci, slika 15. Moguća je pojava abnormalno velikih opterećenja uslijed nepravilnog odlaganja ilegalnih supstanci od strane ilegalnih proizvodnih postrojenja i upravo oni su razlog nepouzdanosti epidemiološke procjene potrošnje ilegalnih supstanci. Jedno od potencijalnih rješenja ovog problema krije se u enantiomernom profiliranju ilegalnih supstanci pomoću kiralne kromatografije u kombinaciji sa spektrometrijom masa (engl. *chiral LC-MS/MS*) [57].

Kako kiralne molekule imaju barem jedan kiralni centar, one pokazuju optičku aktivnost. U slučaju prisutnosti jednog kiralnog centra, kiralna molekula će postojati kao dva enantiomera koji se ne mogu preklopiti. Kemijska sinteza spojeva s jednim asimetričnim centrom obično vodi do nastajanja jednakih količina odgovarajućih enantiomera (racemične smjese). U ljudskom organizmu dolazi do promjene enantiomernih omjera, budući da postoje razlike u brzinama metaboličke konverzije različitih enantiomera. Primjerice, S(+)-amfetamin se preferencijalno metabolizira u odnosu na R(-)-amfetamin, što dovodi do obogaćenja R(-) enantiomera u urinu [57]. Oznaka S (lat. *sinister*) označava konfiguraciju molekule oko kiralnog centra koja prema prioritetima supstituenata slijedi obrnuti smjer kazaljke na satu, a R (lat. *rectus*) označava smjer kazaljke na satu.

Enantiomerni omjer može biti i pod utjecajem mikrobne aktivnosti prilikom transporta otpadnih voda u slivnom području, što rezultira obogaćivanjem vode R(-) enantiomerima amfetamina i MDMA [57]. Na slici 18. prikazani su kiralni centar molekule MDMA te R i S enantiomeri.



**Slika 18.** Kiralni centar molekule MDMA (lijevo); R i S enantiomeri molekule MDMA (desno) [57]

Obrnuti izračun (engl. *back-calculation*) potrošnje ilegalnih supstanci prvo zahtjeva izračun dnevnih opterećenja ciljanih ostataka metabolita (g/dan) množenjem koncentracija izmjerenih ciljanih ostataka metabolita (ng/L) s dnevnim protocima otpadnih voda (m<sup>3</sup>/dan). Sljedeći korak uključuje procjenu ukupne potrošnje ilegalnih supstanci primjenom specifičnog korekcijskog faktora koji uzima u obzir prosječnu stopu izlučivanja određenog ostatka supstance i omjer molekulske mase roditeljske droge (engl. *parent drug*) i njenog metabolita [58]. Za obrnuti izračun, važno je uzeti u obzir što više faktora koji mogu utjecati na stvarnu količinu metabolita u uzorcima, koji su opisani u prethodnom poglavlju. Na taj način moguće je izbjeći pogreške u rezultatima.

Zatim slijedi normalizacija potrošnje dijeljenjem dobivenih dnevnih opterećenja s brojem ljudi, kako bi se olakšala usporedba među gradovima (mg/dan/1000 stanovnika). Zadnji korak uključuje pretpostavljanje prosječne doze kako bi se dobila vrijednost u dozama po danu na 1000 stanovnika [59]. Izračun se provodi prema [48]:

$$\text{potrošnja supstanci} = \frac{Q \times C_i \times m_i}{P \times e_i \times p_i}$$

Gdje je: Q – volumen otpadnih voda,  $c_i$  – koncentracija ilegalnih supstanci,  $m_i$  – omjer molekulske mase roditeljske droge i njenog metabolita, P – populacija za normalizaciju,  $e_i$  – specifična farmakokinetička stopa izlučivanja ilegalne supstance (prosjek ili distribucija urinarne ekskrecije),  $p_i$  – čistoća ilegalne supstance.

Svim navedenim i opisanim postupcima dolazi se do cilja: kvantificiranje potrošenih doza ilegalnih supstanci u populaciji.

### **3. REZULTATI ANALIZA OTPADNIH VODA NA POTROŠNJU ILEGALNIH SUPSTANCI U EUROPSKIM GRADOVIMA I GRADU ZAGREBU**

Istraživanje provedeno u 88 gradova i 24 države Europske unije i Turske, pokazalo je da su se količine različitih stimulativnih supstanci otkrivenih u otpadnim vodama 2023. godine značajno razlikovale s obzirom na lokaciju provedenih istraživanja. Sve istraživane ilegalne supstance pronađene su u gotovo svakom gradu koji je bio podvrgnut istraživanju. Ovim istraživanjem su po prvi puta podatci dobiveni u europskim gradovima uspoređeni s podacima izvan Europe [60].

Istraživanje se provodilo prikupljanjem sirove otpadne vode kontinuirano 24 sata tijekom jednog tjedna, između ožujka i svibnja 2023. godine. Na taj način prikupljeni su potrebni uzorci u većini analiziranih gradova. Uzorci sirove otpadne vode obrađeni su u svrhu pronalaženja metabolita ciljanih ilegalnih supstanci, koji su navedeni i opisani u poglavlju 2.3. U ovome istraživanju nisu prikazani podatci o potrošnji heroina, budući da je metabolit heroina, 6-monoacilmorfin, nestabilan u otpadnim vodama. Kao posljedica, jedina alternativa uključuje proučavanje morfina, ali mjerenja morfina mogu dati netočne podatke budući da se morfin izlučuje i kao rezultat terapijske upotrebe, što ne ukazuje direktno na potrošnju heroina [61].

Sedamnaest zemalja koje su sudjelovale u istraživanju praćenja konzumacije ilegalnih supstanci analizom otpadnih voda uključivale su uzorkovanje na dvije ili više lokacije (Austrija, Belgija, Cipar, Češka, Njemačka, Estonija, Finska, Italija, Litva, Luksemburg, Nizozemska, Portugal, Španjolska, Slovačka, Slovenija, Švedska i Turska). Istraživanja su istaknula razlike u potrošnji ilegalnih supstanci između gradova unutar iste države, koje se mogu objasniti različitim socijalnim i demografskim karakteristikama ispitivanih gradova, što se odnosi na lokaciju sveučilišta, izraženijeg noćnog života i dobnu skupinu unutar grada [60].

Analizom otpadnih voda također su otkrivene varijacije u tjednim obrascima uporabe ilegalnih supstanci. Više od tri četvrtine gradova pokazalo je veće količine amfetamina, benzoilekgonina i MDMA u otpadnim vodama za vrijeme vikenda (od petka do ponedjeljka) nego tijekom radnih dana u tjednu, dok su konzumacija kanabisa i metamfetamina ravnomjernije raspodijeljene tijekom cijelog tjedna. Od 2011. godine, godišnje se provodi

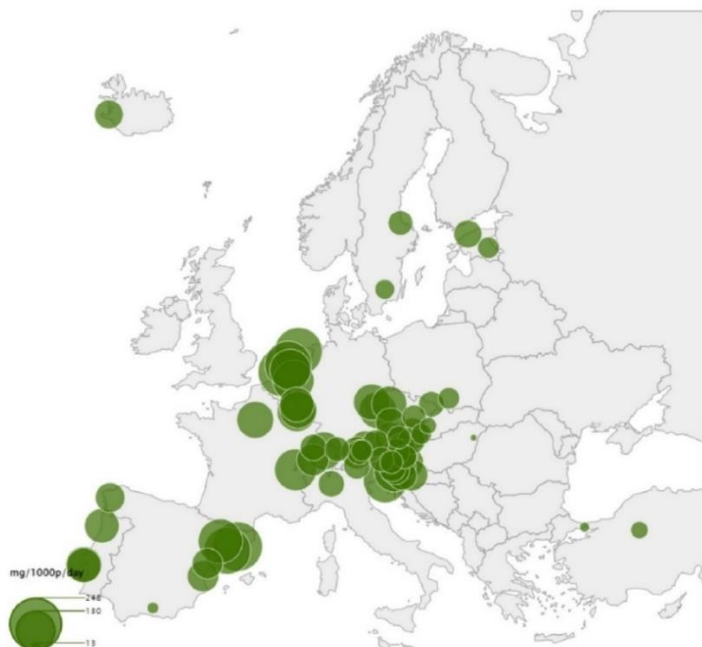
najmanje pet godišnjih kampanja analize otpadnih voda što omogućuje praćenje vremenskih trendova potrošnje ilegalnih supstanci.

### 3.1. Istraživanja za 2023. godinu i usporedba trendova u odnosu na 2022. godinu

U nastavku će biti prikazana analiza otpadnih voda provedena 2023. godine na kanabis, kokain, MDMA, amfetamin i metamfetamin te prikaz promjena u tjednim analizama metabolita u određenim europskim gradovima u odnosu na 2022. godinu. Rezultati su prikazani u miligramima po 1000 stanovnika po danu.

#### 3.1.1. Kanabis

Kanabis se pokazao kao najčešće korištena ilegalna supstanca u Europi, s procijenjenih 22.6 milijuna korisnika u prethodnoj godini. Prosječna dob konzumenata kreće se između 15 i 64 godina, a nacionalna istraživanja sugeriraju da broj od 22.6 milijuna korisnika obuhvaća oko 8% odraslih osoba u Europi [60]. Geografska distribucija otkrivenih metabolita po dnevnom prosjeku prikazana je na slici 19.

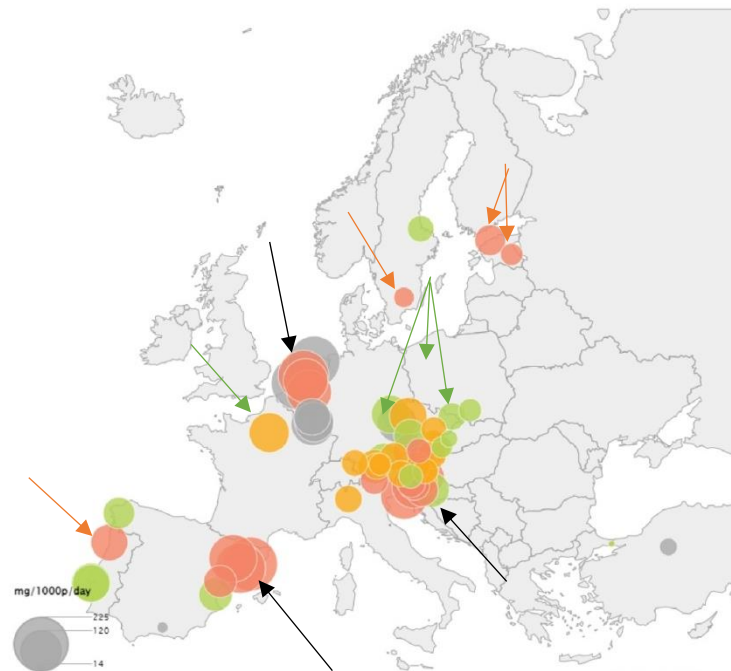


**Slika 19.** Relativna geografska distribucija metabolita kanabisa otkrivena u europskim gradovima u 2023. godini – prikaz dnevnog prosjeka [60]



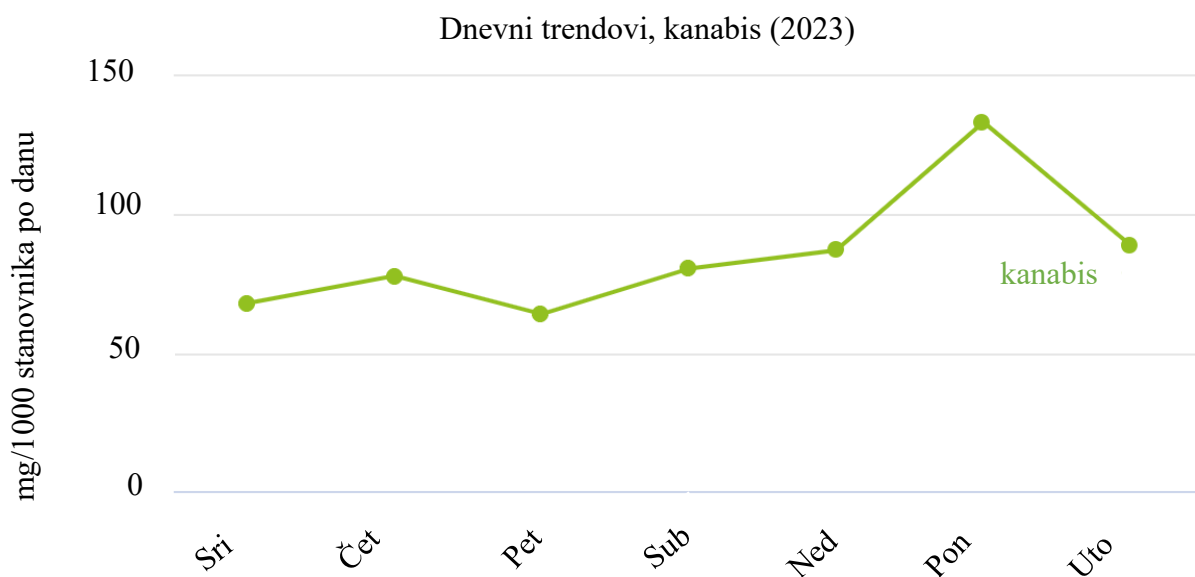
Detektirane količine najvažnijeg metabolita kanabisa, THC-COOH, ukazuju na činjenicu da je uporaba kanabisa u 2023. godini bila najviša u zapadnim i južnim europskim gradovima, posebice u gradovima Češke, Španjolske, Nizozemske i Slovenije.

U prethodnoj godini zabilježeni su različiti trendovi povećanja i smanjenja, pri čemu je 20 od 51 istraživanih gradova izvijestilo o porastu količina THC-COOH u uzorcima otpadnih voda, a njih 15 zabilježilo pad.



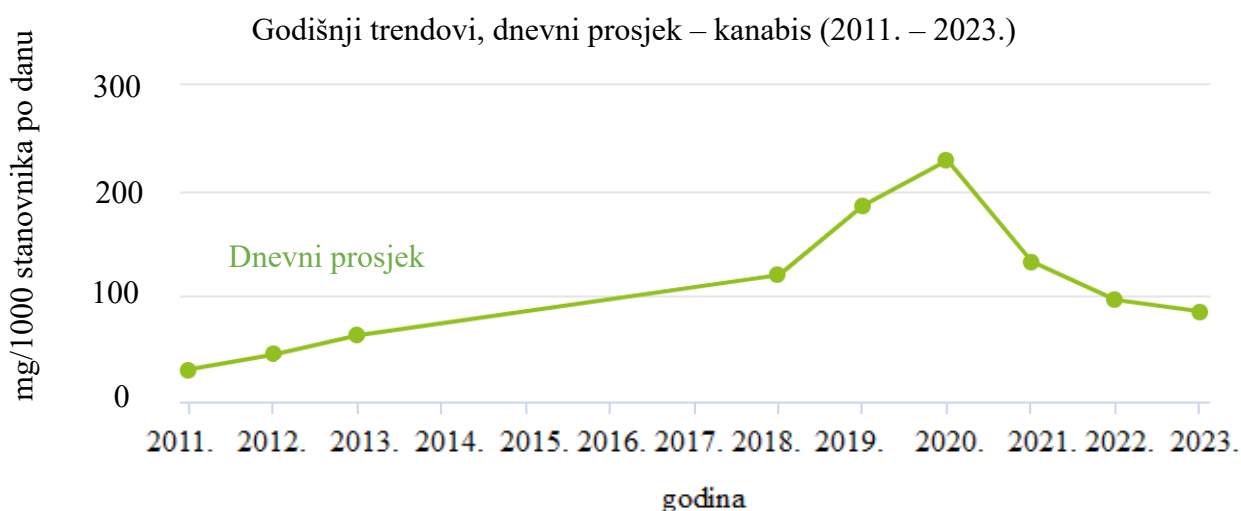
**Slika 20.** Promjene u prosječnim tjednim metabolitima kanabisa dobivenih analizom otpadnih voda u odabranim europskim gradovima za razdoblje između 2022. i 2023. godine [60] (crvena boja – povećanje metabolita, zelena boja – smanjenje, žuta boja – stabilna situacija)

Crvenom bojom je označeno povećanje metabolita kanabisa, zelenom smanjenje u 2023. godini, a žutom bojom stabilan broj metabolita u odnosu na 2022. godinu, drugim riječima, brojke se i u 2022. i u 2023. godini nalaze oko iste vrijednosti te nema povećanja niti smanjenja. Najveći porast opterećenja uočava se u gradovima Belgije, Nizozemske, Španjolske i Slovenije, što je na slici 20. označeno crnim strelicama. Manje poraste bilježe gradovi Portugala, Švedske i Estonije, označeno narančastom strelicom na slici 20. Stagnirajuće količine nalaze se u gradovima Italije, Francuske, Austrije, Češke i Njemačke, označeno na slici 20. zelenom strelicom.



**Slika 21.** Dnevni trendovi potrošnje kanabisa za 2023. godinu u Gradu Zagrebu [60]

Promatrajući tjedne razine potrošnje kanabisa u Gradu Zagrebu, najviša razina metabolita kanabisa u 2023. godini može se uočiti ponedjeljkom (133.46 mg/1000 stanovnika po danu), nakon čega slijedi utorak (88.92 mg/1000 stanovnika po danu).



**Slika 22.** Godišnji trendovi potrošnje kanabisa u razdoblju od 2011. do 2023. godine u Gradu Zagrebu [60]

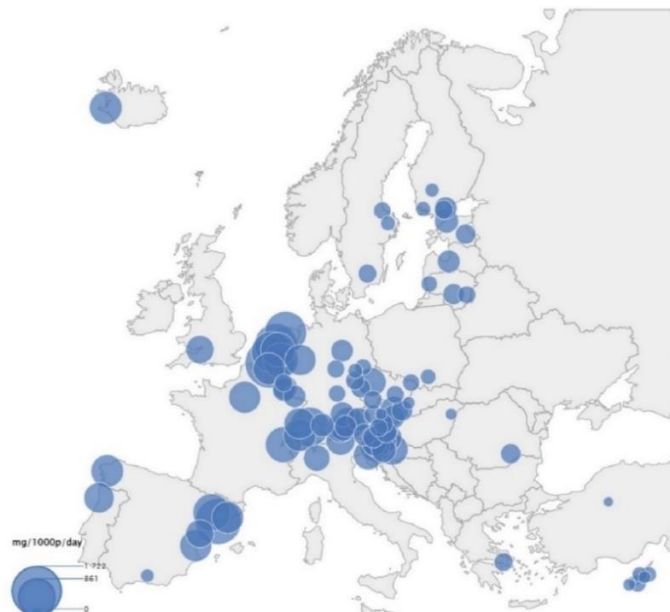
Područje Grada Zagreba pratio je uzlazni trend konzumacije kanabisa s kulminacijom 2020. godine (228.93 mg/1000 stanovnika po danu), od 2021. godine bilježi se pad koji se nastavlja u 2022. (96.34 mg/1000 stanovnika po danu) i 2023. godini (85.68 mg/1000 stanovnika po danu).

U 2022. godini petkom je uočena najviša razina metabolita kanabisa (131.07 mg/1000 stanovnika po danu), a zatim slijedi utorak (113.84 mg/1000 stanovnika po danu). Unazad četiri godine istraživanja, može se primijetiti značajna količina detektiranih metabolita kanabisa utorkom.

U 2022. godini Zagreb je bio na 16. mjestu od 20 gradova s najvećim zabilježenim razinama urinarnih metabolita kanabisa [60]. U 2023. godini se više ne nalazi u prvih 20 mjesta. U 2020. godini je bio na drugom mjestu, nakon čega je uslijedila 2021. godina kad se nalazio na visokom trećem mjestu.

### 3.1.2. Kokain

Relativno stabilna slika potrošnje kokaina u Europi dobivena je analizama između 2011. i 2015. godine. Međutim, 2016. godina označila je prekretnicu koja je donijela povećanja konzumacije kokaina u većini promatranih gradova i raste svake naredne godine od tada. Podatci dobiveni 2023. godine otkrili su daljnje poraste ostataka kokaina u većini istraživanih gradova u usporedbi s 2022. godinom, pri čemu je 49 od 72 grada izvijestilo o porastu, 13 gradova nije izvijestilo o promjeni, a 10 gradova je izvijestilo o smanjenju. Prikaz dnevnog prosjeka nalazi se na slici 23.

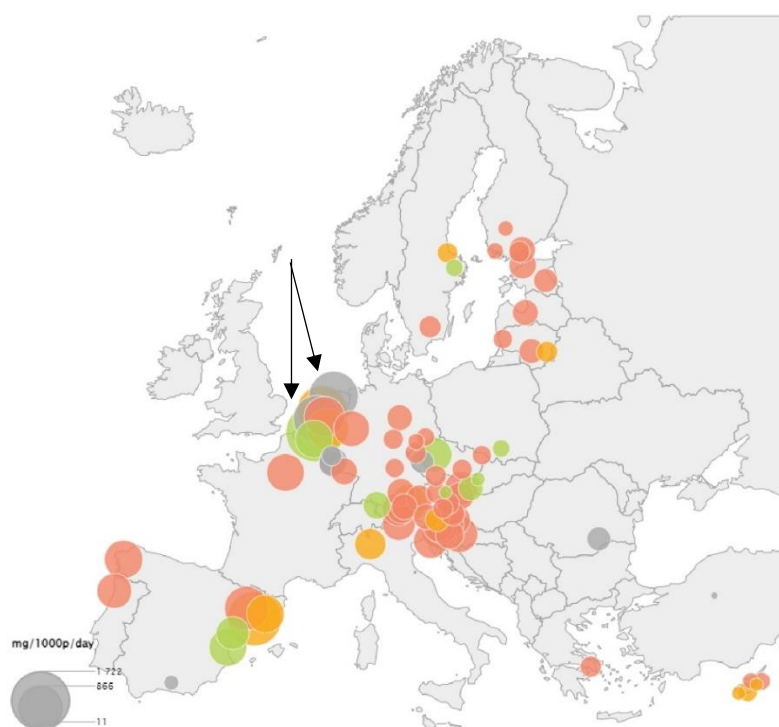


**Slika 23.** Relativna geografska distribucija metabolita kokaina otkrivena u europskim gradovima u 2023. godini – prikaz dnevnog prosjeka [60]

Količine metabolita kokaina, benzoilekgonina, detektirane u otpadnim vodama ukazuju na to da potrošnja kokaina ostaje najviša u južnim i zapadnim europskim gradovima, posebno u gradovima Belgije, Nizozemske i Španjolske.

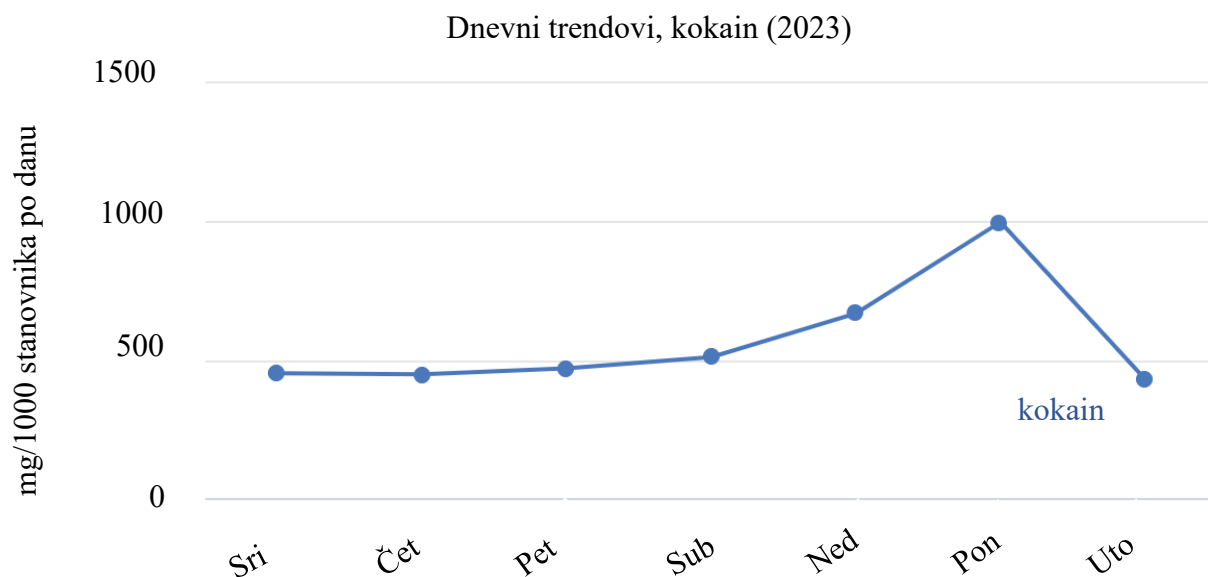
Niske razine su pronađene u većini istočnih gradova Europe, ali u usporedbi s prijašnjim godinama, pokazuju znakove porasta. Švicarska je pokazala slične obrasce uporabe ilegalnih supstanci kao i gradovi s najvišim opterećenjem [60].

Na području Grada Zagreba zabilježen je porast prosječne razine urinarnih metabolita kokaina u otpadnim vodama tijekom 2023. godine (567.95 mg/1000 stanovnika po danu). Tijekom 2022. godine uočen je pad razine urinarnih metabolita kokaina (401.19 mg/1000 stanovnika po danu).



**Slika 24.** Promjene u prosječnim tjednim metabolitima kokaina dobivenih analizom otpadnih voda u odabranim europskim gradovima za razdoblje između 2022. i 2023. godine [60]

Crvenom bojom ponovno je označeno povećanje, zelenom smanjenje, a žuto označava da nema uočene promjene. Istraživanja za 2023. godinu su pokazala najviše opterećenje konzumacijom crack kokaina u Antwerpenu (Belgija) i Amsterdamu (Nizozemska). Ta područja prikazana su na karti kao veliki krugovi obojeni sivom bojom i označena su strelicama na slici 24.



**Slika 25.** Dnevni trendovi potrošnje kokaina za 2023. godinu u Gradu Zagrebu [60]

Promatrajući dnevnu potrošnju kokaina u Gradu Zagrebu, može se uočiti da je u 2023. godini najveća potrošnja kokaina bila ponedjeljkom (998.31 mg/1000 stanovnika). U 2022. godini dan najveće potrošnje bio je petak s izmjerenim količinama od 773.52 mg/1000 stanovnika po danu, pa zatim slijede subote u 2021. i 2020. godini, s izmjerenih 745.92 mg/1000 stanovnika po danu te 637.92 mg/1000 stanovnika po danu.



**Slika 26.** Godišnji trendovi potrošnje kokaina u razdoblju od 2011. do 2023. godine u Gradu Zagrebu [60]

Od 2011. potrošnja kokaina u Gradu Zagrebu raste uzlazno. Veliki skok u potrošnji dogodio se 2019. godine kada je izmjerena količina metabolita kokaina iznosila 395.55 mg/1000 stanovnika po danu, a samo godinu dana prije, 2018. godine, taj broj iznosio je 234.54 mg/1000 stanovnika po danu. Nastavlja se uzlazni trend do 2022. godine, kad količina naglo pada na 401.19 mg/1000 stanovnika po danu. Godine 2023. počinje ponovno rasti te je zabilježena količina ostataka metabolita kokaina iznosila 567.95 mg/1000 stanovnika po danu.

Tijekom 2022. i 2023. godine Zagreb se nije našao na listi 20 najvećih potrošača, za razliku od 2021. godine kada se našao na 11. mjestu i 2020. na 8. mjestu.

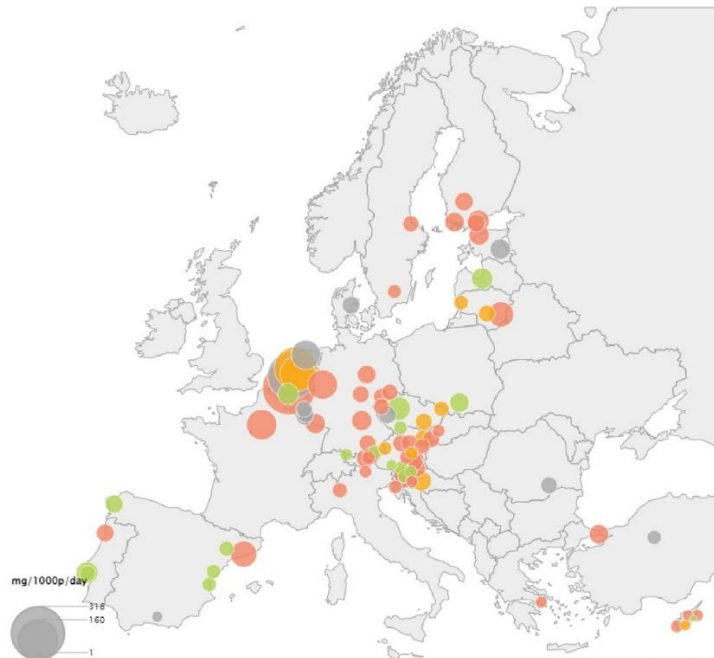
### 3.1.3. MDMA

Općenita istraživanja stanovništva u mnogim zemljama pokazala su da je konzumacija MDMA opadala od vrhunaca dosegnutih početkom 2000-ih godina do sredine 2000-ih godina. Međutim, u posljednjih nekoliko godina potrošnja MDMA ostala je bez jasnih trendova. Visoka stopa konzumacije može odražavati da MDMA više nije ilegalna supstanca koja je ograničena na područje zabavnih noćnih klubova, već da je sada i u upotrebi šireg spektra mladih ljudi koji posjećuju barove i kućne zabave. Na slici 27. nalazi se prikaz dnevnog prosjeka detektiranih metabolita MDMA.



**Slika 27.** Relativna geografska distribucija metabolita MDMA otkrivena u europskim gradovima u 2023. godini – prikaz dnevnog prosjeka [60]

Najveće opterećenje MDMA detektirano je u otpadnim vodama gradova u Belgiji, Francuskoj, Njemačkoj, Španjolskoj i Nizozemskoj. Još samo Švicarska pokazuje slična opterećenja kao i gradovi u Europi najvećim opterećenjima, dok ostale lokacije pokazuju niske razine konzumacije MDMA.

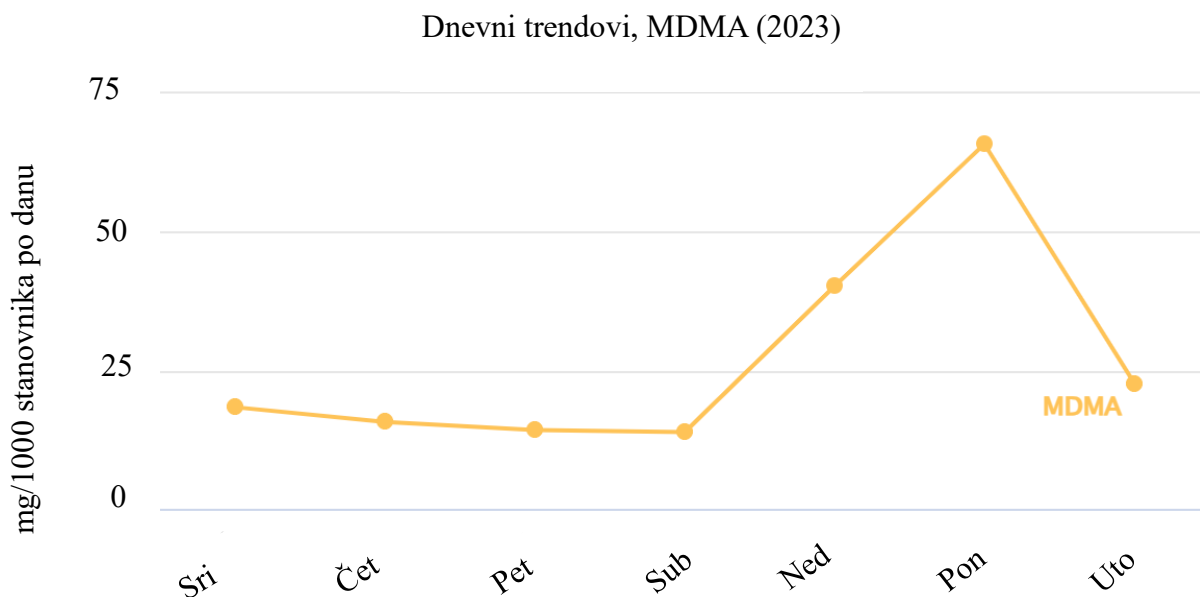


**Slika 28.** Promjene u prosječnim tjednim metabolitima MDMA dobivenih analizom otpadnih voda u odabranim europskim gradovima za razdoblje između 2022. i 2023. godine [60]

Promatrajući dugoročne trendove u analizi otpadnih voda, u većini slučajeva došlo je do povećanja opterećenja između 2011. i 2016. godine, nakon čega su ona nastavila fluktuirati. U 2020. godini, vjerojatno zbog činjenice da je u većini zemalja noćni život bio onemogućen tijekom dužeg razdoblja zbog pandemije COVID-19 virusom, gotovo polovica gradova uključenih u kampanju (njih 24 od 49) izvijestila je o smanjenju, dok je 18 izvijestilo o povećanju konzumacije MDMA.

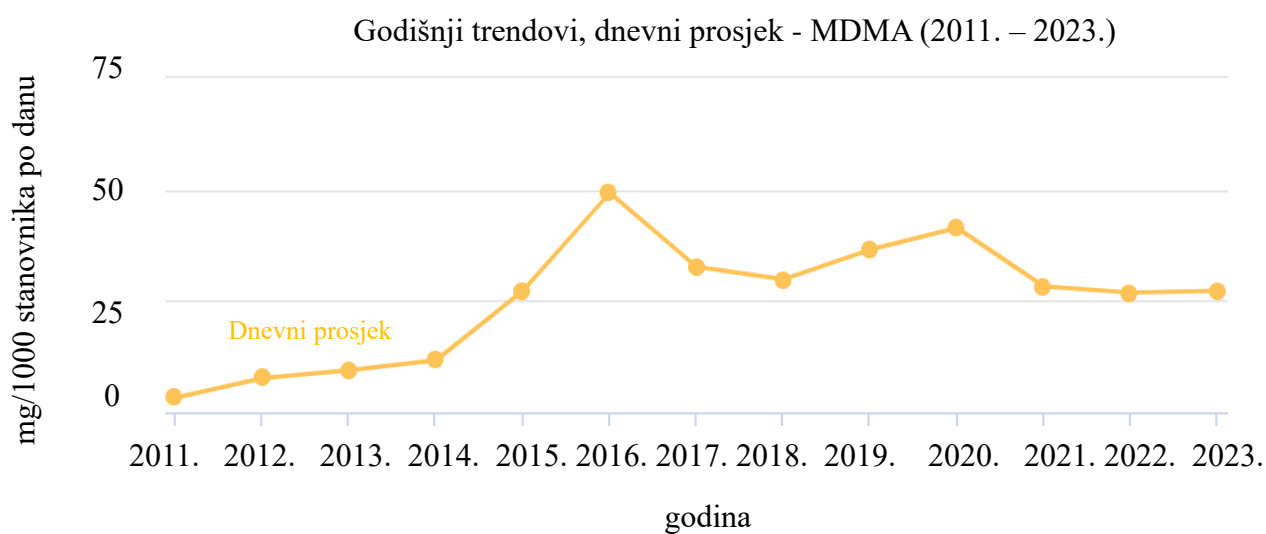
U 2021. godini, 38 od 58 gradova izvijestilo je smanjenje. U 2022. godini, 28 od 62 grada izvijestila su o povećanju, a 27 o smanjenju. Od 69 gradova koji imaju podatke o zaostacima metabolita MDMA u otpadnim vodama za 2022. i 2023. godinu, 42 su izvijestila o povećanju (većinom gradovi sjeverne Europe), 11 stabilnu situaciju, a 16 smanjenje (većinom gradovi južne i srednje Europe). Od 9 gradova s podacima u rasponu od 2011. do 2023. godine, svi su pokazali veća opterećenja MDMA 2023. godine nego 2011. godine [60]. Kao što je i slučaj s konzumacijom kokaina, više od tri četvrtine gradova pokazalo je veća opterećenja MDMA

u otpadnim vodama za vrijeme vikenda (od petka do ponedjeljka) nego tijekom radnih dana u tjednu, što ukazuje na uporabu MDMA u rekreativnim okruženjima.



**Slika 29.** Dnevni trendovi potrošnje MDMA za 2023. godinu u Gradu Zagrebu [60]

U 2023. godini u Gradu Zagrebu najveća uočena količina metabolita MDMA u tjednu iznosi 65.68 mg/1000 stanovnika po danu i to ponedjeljkom. U 2022. godini najveća zabilježena količina metabolita MDMA iznosila je 65.18 mg/1000 stanovnika po danu petkom, 2021. godine 51.31 mg/1000 stanovnika po danu nedjeljom te 2020. godine 70.46 mg/1000 stanovnika po danu također nedjeljom.



**Slika 30.** Godišnji trendovi potrošnje MDMA u razdoblju od 2011. do 2023. godine u Gradu Zagrebu [60]

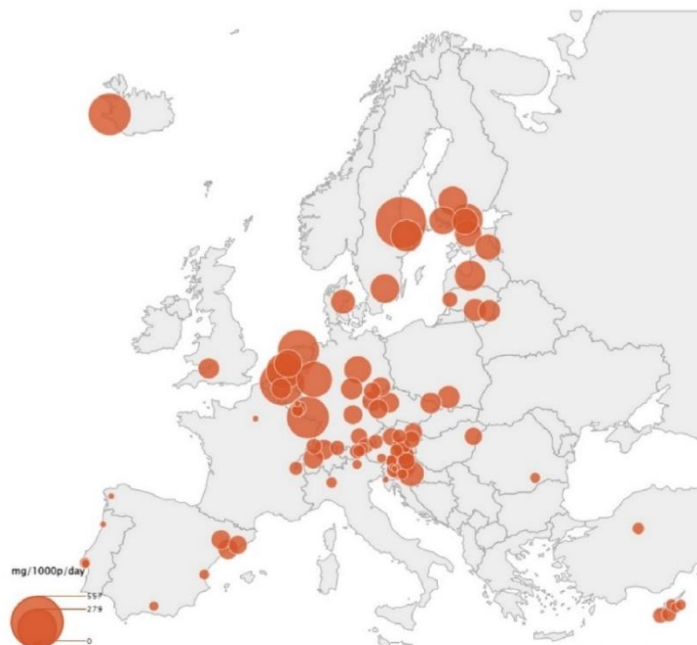


Uočljivo je da količine metabolita MDMA pronađene u otpadnim vodama variraju u promatranom razdoblju. Najveća zabilježena količina 2016. godine iznosi 49.22 mg/1000 stanovnika po danu, kad počinje opadati kroz 2017. (32.62 mg/1000 stanovnika po danu) i 2018. godinu (29.83 mg/1000 stanovnika po danu). Kroz 2019. i 2020. godinu zabilježen je lagani porast i tada su količine iznosile 36.5 mg/1000 stanovnika po danu te 41.38 mg/1000 stanovnika po danu. Od 2021. do 2023. bilježi se ponovno lagani pad, s prosjekom od 27.46 mg/1000 stanovnika po danu kroz razdoblje ove tri godine.

U 2020. godini Zagreb je bio na 9. mjestu od 20 gradova s najvećim količinama detektiranih metabolita MDMA, 2021. na 14. mjestu, 2022. na 17. mjestu, a 2023. godine se ne nalazi među prvih 20 najvećih potrošača MDMA.

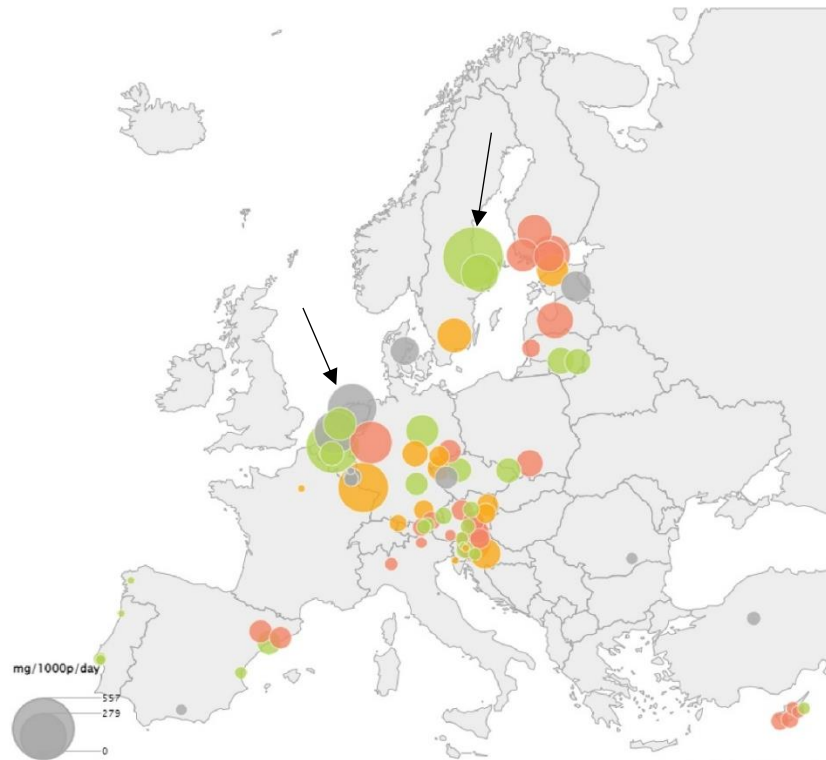
### 3.1.4. Amfetamin

Amfetamin i metamfetamin, dvije blisko povezane stimulativne tvari, obje se konzumiraju u Europi, ali amfetamin je mnogo češće korišten. Količine amfetamina značajno su varirale među lokacijama istraživanja, a najviše stope zabilježene su u gradovima na istoku i sjeveru Europe. Prikaz dnevnog prosjeka nalazi se na slici 31.



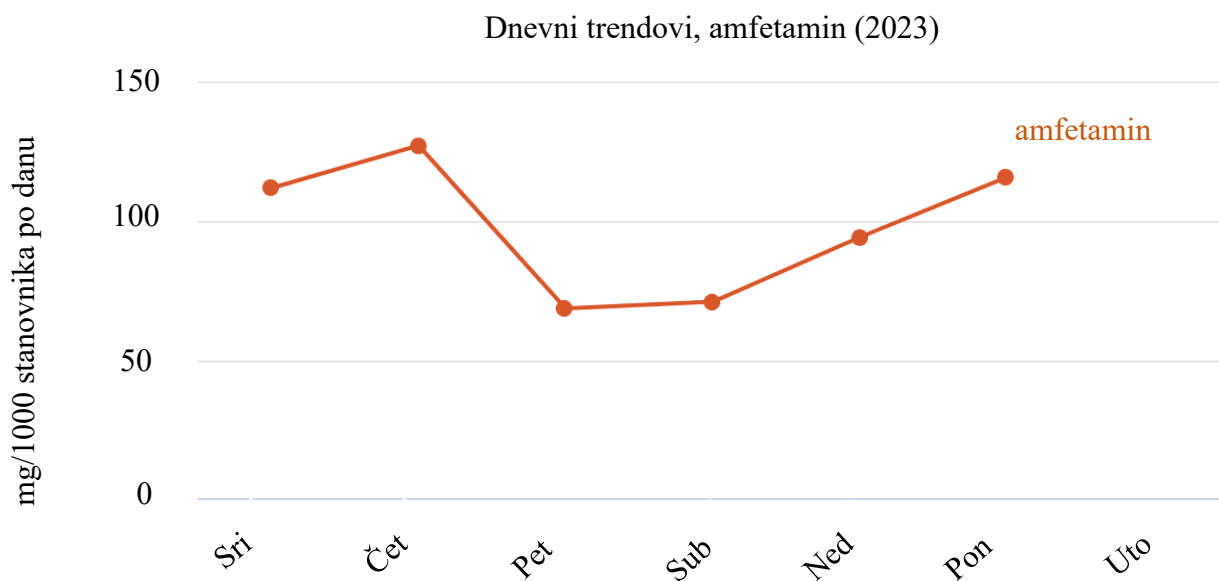
**Slika 31.** Relativna geografska distribucija metabolita MDMA otkrivena u europskim gradovima u 2023. godini – prikaz dnevnog prosjeka [60]

Najveće razine amfetamina pronađene su u Švedskoj, Belgiji, Njemačkoj, Nizozemskoj i Finskoj. Na jugu Europe pronađene su znatno manje količine amfetamina, iako u usporedbi s podacima prijašnjih godina, vidljivi su neki znakovi porasta.



**Slika 32.** Promjene u prosječnim tjednim metabolitima amfetamina dobivenih analizom otpadnih voda u odabranim europskim gradovima za razdoblje između 2022. i 2023. godine [60]

Od 65 gradova koji posjeduju podatke o ostacima metabolita amfetamina u otpadnim vodama za 2022. i 2023. godinu, njih 26 prijavilo je porast, 13 stabilnu situaciju, a 26 smanjenje. Uočeno je značajno smanjenje količine detektiranih urinarnih metabolita amfetamina u gradovima Švedske i Nizozemske, označeno crnom strelicom na slici 32.



**Slika 33.** Dnevni trendovi potrošnje amfetamina za 2023. godinu u Gradu Zagrebu [60]

Promatrajući pronađene količine urinarnih metabolita amfetamina, za 2023. godinu može se zaključiti da je četvrtkom konzumacija bila najveća i iznosi 127.53 mg/1000 stanovnika po danu te ga slijedi ponedjeljak sa 116.12 mg/1000 stanovnika po danu. U godini 2022. to je bio petak s izmjerenom količinom od 156.14 mg/1000 stanovnika po danu te ga s malim razlikama nastavljaju pratiti nedjelja sa 110.94 mg/1000 stanovnika po danu, subota sa 105.15 mg/1000 stanovnika po danu i ponedjeljak sa 104.08 mg/1000 stanovnika po danu.



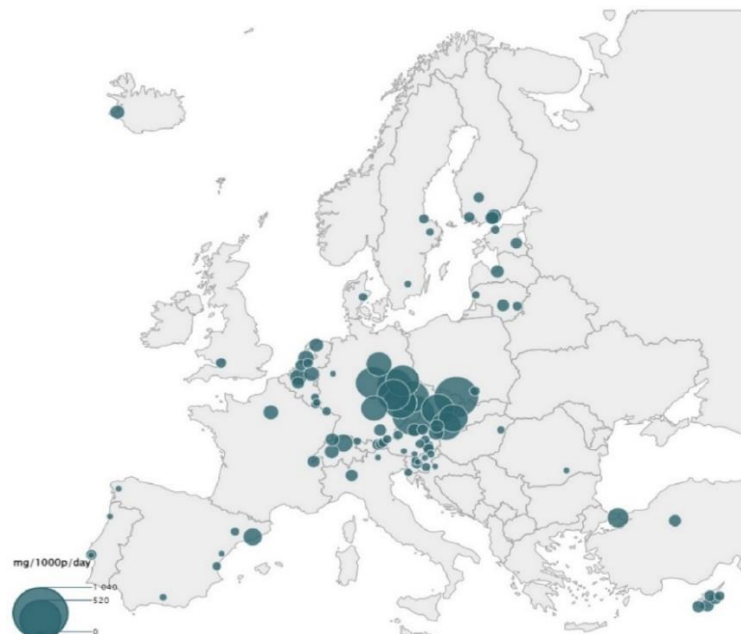
**Slika 34.** Godišnji trendovi potrošnje amfetamina u razdoblju od 2011. do 2023. godine u Gradu Zagrebu [60]

Dnevni prosjek godišnje potrošnje amfetamina u Gradu Zagrebu u razdoblju od 2011. – 2019. vidljivo je stabilan, s uočenim manjim promjenama. Stabilno stanje drastično se mijenja 2020. godine, kad je količina urinarnih metabolita amfetamina iznosila vrtoglavih 1013.84 mg/1000 stanovnika po danu, s obzirom da je 2019. godine ta količina iznosila 145.67 mg/1000 stanovnika po danu. U razdoblju od 2021. – 2023. godine stanje se stabilizira te u 2023. iznosi 98.29 mg/1000 stanovnika po danu.

Jednako kao i u 2022. godini, 2023. godine Zagreb se ne nalazi među 20 gradova s najvećom količinom izlučenih urinarnih metabolita amfetamina, s obzirom da se 2021. godine nalazio na 13. mjestu, a 2020. godine na prvome mjestu.

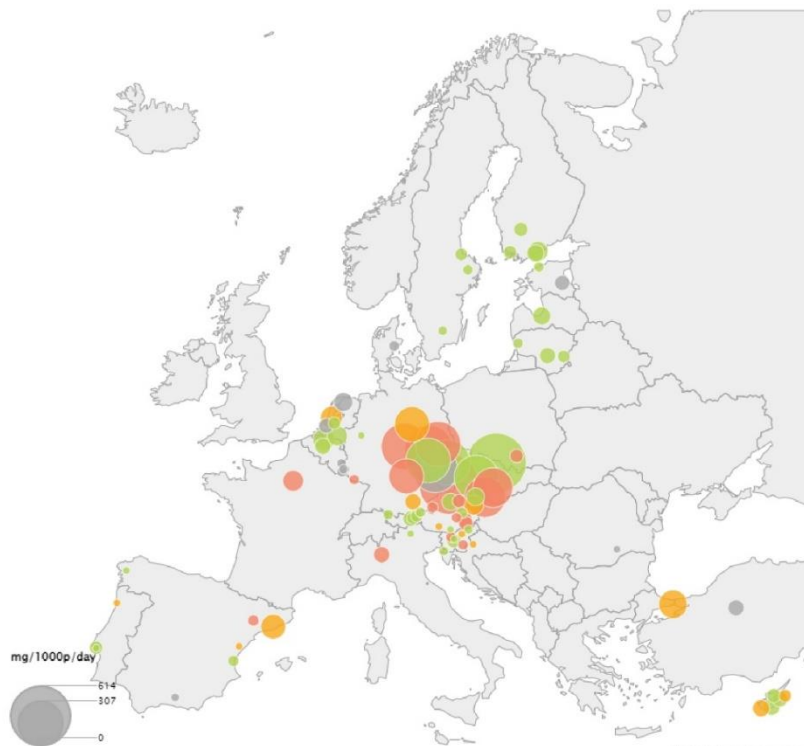
### 3.1.5. Metamfetamin

Upotreba metamfetamina općenito je niska i povijesno koncentrirana u Češkoj i Slovačkoj. Novim istraživanjima ukazana je prisutnost uporabe metamfetamina u Belgiji, Cipru, istočnoj Njemačkoj, Španjolskoj, Nizozemskoj, Turskoj te u nekoliko sjevernih europskih zemalja – Danskoj, Finskoj, Litvi i Norveškoj [60]. Prikaz dnevnog prosjeka nalazi se na slici 35.



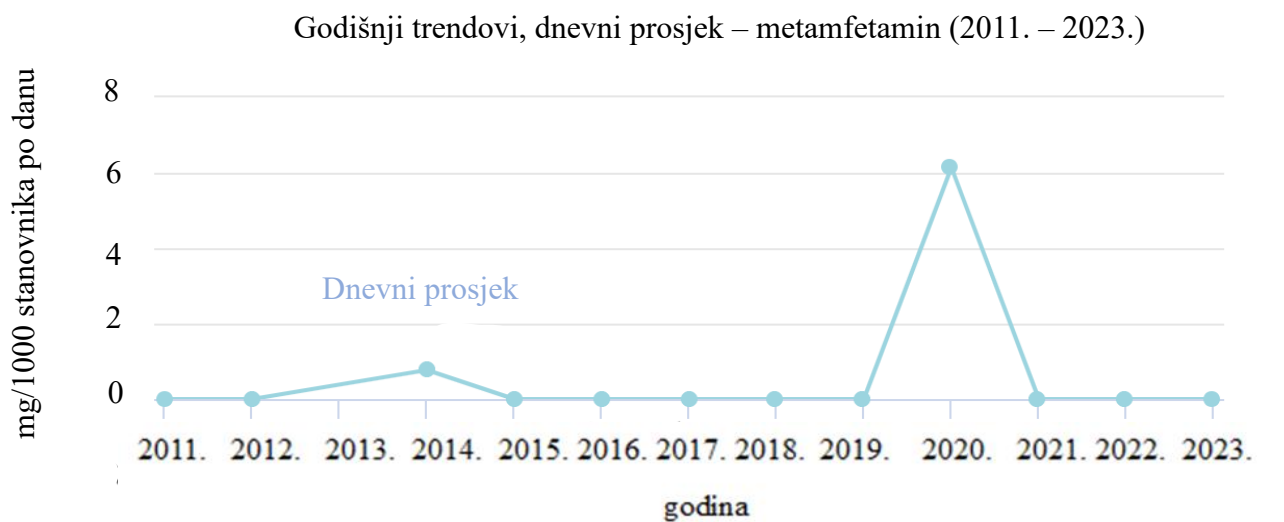
**Slika 35.** Relativna geografska distribucija metabolita metamfetamina otkrivena u europskim gradovima u 2023. godini – prikaz dnevnog prosjeka [60]

Zapažene koncentracije metabolita metamfetamina u istraživanjima prethodnih godina bile su vrlo niske do zanemarive, međutim nova istraživanja pokazala su porast u središnjim europskim gradovima. Od 67 gradova koji imaju podatke o ostacima metabolita metamfetamina u otpadnim vodama za 2022. i 2023. godinu, njih 15 prijavilo je porast, 13 stabilnu situaciju, a 39 smanjenje [60]. Dva grada s najvećim opterećenjem nalaze se u Češkoj, nakon čega slijede gradovi u Turskoj, Njemačkoj i Slovačkoj.



**Slika 36.** Promjene u prosječnim tjednim metabolitima metamfetamina dobivenih analizom otpadnih voda u odabranim europskim gradovima za razdoblje između 2022. i 2023. godine [60]

U 2023. godini upotreba metamfetamina pokazala se ravnomjernije raspoređenom tijekom cijelog tjedna nego što je uočeno prethodnih godina, što vjerojatno odražava povezanost konzumacije metamfetamina skupine korisnika visokog rizika s redovitijom konzumacijom.



**Slika 37.** Godišnji trendovi potrošnje metamfetamina u razdoblju od 2011. do 2023. godine u Gradu Zagrebu [60]

Za Grad Zagreb ne postoje podatci o tjednoj konzumaciji metamfetamina kao što je to slučaj s prethodno navedenim ilegalnim supstancama, a razlog tome jest općenito mala konzumacija metamfetamina u Zagrebu.

Metamfetamin je prvi puta detektiran u otpadnim vodama 2014. godine i njegova količina iznosila je 0.77 mg/1000 stanovnika po danu. U razdoblju od 2015. do 2019. godine nisu detektirane količine urinarnih metabolita metamfetamina, 2020. godine zabilježena je najveća količina i ona je iznosila 6.14 mg/1000 stanovnika po danu. U razdoblju od 2021. do 2023. godine ponovno dolazi do stagnacije te nisu pronađeni metaboliti metamfetamina u otpadnim vodama.

Niti jednu godinu za koju su zabilježeni podatci o urinarnim metabolitima metamfetamina, Grad Zagreb se nije nalazio među prvih 20 gradova prema potrošnji.

## 4. ZAKLJUČAK

U ovom radu dan je pregled svih važnih metabolita i analitičkih tehnika koje služe u detekciji ilegalnih supstanci, pregled najvažnijih koraka obrade otpadnih voda kojima je cilj dobivanje podataka o potrošnji te podatci o potrošnji ilegalnih supstanci u državama Europe i Gradu Zagrebu.

Provedena istraživanja su pokazala da je analiza otpadnih voda inovativna i vrijedna metoda za praćenje potrošnje ilegalnih supstanci u zajednici. Korištenjem naprednih analitičkih tehnika, poput tekućinske kromatografije u kombinaciji sa spektrometrijom masa i ekstrakcije na čvrstoj fazi, moguće je precizno identificirati i kvantificirati zaostale metabolite ilegalnih supstanci. Metodologija uzorkovanja omogućuje dobivanje reprezentativnih uzoraka koji daju podatke o dnevnoj potrošnji ilegalnih supstanci. Opisani su nedostaci i problemi metode analize otpadnih voda te potencijalna rješenja.

Istraživanjem su zabilježene najveće razine urinarnih metabolita kokaina u gradovima zapadne i južne Europe, dok je porast uočen i u istočnoj Europi. U 2023. godini u Gradu Zagrebu zabilježen je porast metabolita kokaina, nakon pada u 2022. godini. Najveće količine metabolita kanabisa pronađene su ponovno u zapadnoj i južnoj Europi, a u Gradu Zagrebu razine u 2023. godini nastavile su padati. Najveće količine amfetamina prijavljene su u gradovima sjeverne i istočne Europe. Prosječna razina urinarnih metabolita amfetamina u Zagrebu u 2023. godini iznosi 98.29 mg/1000 stanovnika po danu. U gradovima Belgije, Njemačke, Španjolske, Francuske i Nizozemske pronađene su najveće količine metabolita MDMA, dok prosječna razina metabolita u Zagrebu iznosi 27.27 mg/1000 stanovnika po danu. Metamfetamin je u najvećim količinama pronađen u Češkoj, Slovačkoj i nekoliko drugih europskih zemalja. Za Grad Zagreb nema dostupnih podataka za 2023. godinu, ali se može pohvaliti malim razinama metabolita metamfetamina kroz istraživanja prethodnih godina.

Unatoč brojnim izazovima, razvijene metode, kalibracija, korekcijski faktori i poznavanje utjecaja fizičkih, kemijskih i bioloških faktora omogućuju pouzdanu procjenu potrošnje. Daljnji razvoj i standardizacija metode te povećana suradnja između više znanstvenih disciplina ključni su za unaprjeđenje metode. Očekuje se da će u budućnosti analiza otpadnih voda imati sve važniju ulogu te da će svi nedostaci i izazovi pronaći put do rješenja.

## 5. POPIS KRATICA

COMT – katehol-orto-metil-transferaza

EMCDDA – engl. *European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction*, Europski centar za praćenje droga i ovisnosti o drogama

GF – engl. *glass-fibre*, staklena vlakna

HMMA – 4-hidroksi-3-metoksi-amfetamin

HPLC – engl. *High-performance liquid chromatography*, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

LC-MS/MS – engl. *Liquid chromatography – mass spectrometry*, tekućinska kromatografija sa spektrometrijom masa

MDA – 3,4-metiledioksiamfetamin

MDMA – 3,4-metilendioksimetamfetamin

m<sup>3</sup>/dan – metar kubni po danu

ng/L – nanogram po litri

SCORE – engl. *Sewage analysis CORE group – Europe*

SPE – engl. *solid-phase extraction*, ekstrakcija na čvrstoj fazi

THC – delta-9-tetrahidrokanabinol

THC-COOH – 11-nor-delta-9-tetrahidrokanabinol-9-karboksilna kiselina

UPLC – engl. *Ultra-performance liquid chromatography*, tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti



## 6. POPIS LITERATURE

- [1] <https://www.hzjz.hr/aktualnosti/analiza-otpadnih-voda-otkriva-navike-uporabe-droga-u-gradovima-u-europi-u-2022-godini/> (pristup 14. ožujka 2024.)
- [2] <https://www.hzjz.hr/aktualnosti/emcdda-objavio-je-novu-analizu-otpadnih-voda-za-procenu-potrosnje-glavnih-tipova-droga/> (pristup 14. ožujka 2024.)
- [3] <https://www.irb.hr/Novosti/Analizom-otpadnih-voda-do-podataka-o-potrosnji-ilegalnih-droga-u-Europi> (pristup 14. ožujka 2024.)
- [4] Braithwaite, R.A., Jarvie, D.R., Minty, P.S.B., Simpson, D., Widdop, B., Screening for drugs of abuse, I: Opiates, amphetamines and cocaine, *Annals of Clinical Biochemistry*, **32**(1995) 123-153.
- [5] [https://medicinski.lzmk.hr/clanak/simpatikomimetici\\_](https://medicinski.lzmk.hr/clanak/simpatikomimetici_) (pristup 26. travnja 2024.)
- [6] [https://drogeiovisnosti.gov.hr/o-uredu/djelokrug/ovisnosti-i-vezane-teme/droge-i-ovisnost/vrste-droga/kokain/1009\\_](https://drogeiovisnosti.gov.hr/o-uredu/djelokrug/ovisnosti-i-vezane-teme/droge-i-ovisnost/vrste-droga/kokain/1009_) (pristup 26. travnja 2024.)
- [7] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/446220#section=Structures> (pristup 30. travnja 2024.)
- [8] <https://entheology.com/plants/erthroxylum-coca-coca-bush/> (pristup 26. travnja 2024.)
- [9] [https://drogeiovisnosti.gov.hr/djelokrug/ovisnosti-i-vezane-teme/droge-i-ovisnost/vrste-droga/marihuana-kanabis/1013\\_](https://drogeiovisnosti.gov.hr/djelokrug/ovisnosti-i-vezane-teme/droge-i-ovisnost/vrste-droga/marihuana-kanabis/1013_) (pristup 26. travnja 2024.)
- [10] <https://vutropedija.com/zivotni-ciklus-rasta-biljke/> (pristup 30. travnja 2024.)
- [11] [https://qliniqa.hr/novosti/kanabis-kao-lijek-dobrobiti-i-nuspojave-za-koje-mozda-niste-znali\\_](https://qliniqa.hr/novosti/kanabis-kao-lijek-dobrobiti-i-nuspojave-za-koje-mozda-niste-znali_) (pristup 30. travnja 2024.)
- [12] <https://drogeiovisnosti.gov.hr/djelokrug/ovisnosti-i-vezane-teme/droge-i-ovisnost/vrste-droga/amfetamini/1019> (pristup 30. travnja 2024.)
- [13] [https://drogeiovisnosti.gov.hr/o-uredu/djelokrug/ovisnosti-i-vezane-teme/droge-i-ovisnost/vrste-droga/ecstasy-mdma/107\\_](https://drogeiovisnosti.gov.hr/o-uredu/djelokrug/ovisnosti-i-vezane-teme/droge-i-ovisnost/vrste-droga/ecstasy-mdma/107_) (pristup 30. travnja 2024.)

- [14] Kerry, G.L.; Ross, K.E.; Wright, J.L.; Walker, G.S., A Review of Methods Used to Detect Methamphetamine from Indoor Air and Textiles in Confined Spaces. *Toxics*, **10**(2022) 710. <https://doi.org/10.3390/toxics10110710>
- [15] <https://drogeiovisnosti.gov.hr/o-uredu/djelokrug/ovisnosti-i-vezane-teme/droge-i-ovisnost/vrste-droga/heroin/1010> (pristup 30. travnja 2024.)
- [16] [https://www.emcdda.europa.eu/publications/drug-profiles/heroin\\_en](https://www.emcdda.europa.eu/publications/drug-profiles/heroin_en) (pristup 30. travnja 2024.)
- [17] Baumgartner, W.A., Hill, V.A., Bland, W.H., Hair analysis for drugs of abuse, *Journal of Forensic Sciences*, **34**(1989) 1433-1453.
- [18] Moeller, K.E., Lee, K.C., Kissack, J.C., Urine drug screening: practical guide for clinicians. *Mayo Clinic Proceedings*, **83**(2008) 66-76. <https://doi.org/10.4065/83.1.66>
- [19] Wilkinson, P., Van Dyke, C., Jatlow, P., Barash, P., Byck, R., Intranasal and oral cocaine kinetics, *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, **27**(1980) 386-394.
- [20] Kwong, T. C., Chamberlain, R. T., Frederick, D. L., Kapur, B., Sunshine, I., Critical issues in urinalysis of abused substances: Report of the substance abuse testing committee, *Clinical Chemistry*, **34**(1988) 605-632.
- [21] Ambre, J., The urinary excretion of cocaine and metabolites in humans: a kinetic analysis of published data, *Journal of Analytical Toxicology*, **9**(1985) 241-245.
- [22] Zhang, J. Y., & Foltz, J. R., Cocaine metabolism in man: Identification of four previously unreported cocaine metabolites in human urine, *Journal of Analytical Toxicology*, **14**(1990) 241-245.
- [23] [https://www.genome.jp/dbget-bin/www\\_bget?cpd:C10847](https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?cpd:C10847) (pristup 2. svibnja 2024.)
- [24] Yang, G., Ge, S., Singh, R., Basu, S., Shatzer, K., Zen, M. i sur., Glucuronidation: driving factors and their impact on glucuronide disposition, *Drug Metabolism Reviews*, **49**(2017) 105–138. [doi.org/10.1080/03602532.2017.1293682](https://doi.org/10.1080/03602532.2017.1293682)
- [25] United Nations (UN), Recommended methods for the determination and assay of heroin, cannabinoids, cocaine, amphetamine, metamphetamine and ring-substituted amphetamine derivatives, *International Drug Control Programme, New York* (1995), 46.

- [26] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/44814488> (pristup 02. svibnja 2024.)
- [27] Beckett, A.H., Rowland, M., Urinary excretion kinetics of amphetamine in man, *Journal of Pharmacy Pharmacology*, **17**(1965) 628–638.
- [28] Kalant, H., The pharmacology and toxicology of “ecstasy” (MDMA) and related drugs, *Canadian Medical Association Journal*, **165**(2001) 917-928.
- [29] Denić, K., Rusić, B., Đorđević, S., Krstić, N., Rančić, D., Kilibarda, V., Vukčević Perković N., Jović-Stošić, J., Trovanje amfetaminima: postoji li specifična toksična koncentracija? Prikaz dva slučaja intoksikacije amfetaminom i „ecstasy“-ijem, *Medical Data Review*, **4**(2012) 329-334.
- [30] Inturrisi, C.E., Max, M.B., Foley, K.M, Schultz, M., Shin, S.V., Houde, R.W., The pharmacokinetics of heroin in patients with chronic pain, *New England Journal of Medicine*, **310**(1984) 1213-1217.
- [31] Cone, E.J., Darwin, W.D. Rapid assay of cocaine, opiates and metabolites by gas chromatography – mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, **580**(1992) 43-61.
- [32] <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.4450907.html> (pristup 2. svibnja 2024.)
- [33] <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.4575434.html> (pristup 23. svibnja 2024.)
- [34] Castiglioni, S., Zuccato, E., Crisci, E., i sur., Identification and measurement of illicit drugs and their metabolites in urban wastewaters by liquid chromatography tandem mass spectrometry (HPLC-MS-MS), *Analytical Chemistry*, **78**(2006) 8421–8429.
- [35] Zuccato, E., Chiabrando, C., Castiglioni, S., Bagnati, R., Fanelli, R., Estimating community drug abuse by wastewater analysis. *Environmental Health Perspectives*, **116**(2008) 1027-1032. doi.org/10.1289/ehp.11022
- [36] Weiss, G., Brombach, H. and Wöhrle, C., Monitoring of combined sewer overflow tanks: results of 500 years of measurement records. *Water Practice and Technology*, (2006). doi: 10.2166/wpt.2006.011.
- [37] Rieckermann, J., Neumann, M., Ort, C., i sur., Dispersion coefficients of sewers from tracer experiments. *Water Science and Technology* **52**(2005) 123–133.

- [38] Huisman, J.L., Burckhardt, S., Larsen, T.A., i sur., Propagation of waves and dissolved compounds in sewer. *Journal of Environmental Engineering-ASCE* **126**(2000) 12–20.
- [39] Heberer, T., Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data, *Toxicology Letters*, **131**(2002) 5–17.
- [40] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, Assessing illicit drugs in wastewater: Potential and limitations of a new monitoring approach, *EMCDDA Insights Series*, **9**(2008) 16-25.
- [41] Siegrist, H., Joss, A., Review on the fate of organic micropollutants in wastewater treatment and water reuse with membranes. *Water Science and Technology*, **66**(2012) 1369-1376. doi:10.2166/wst.2012.285
- [42] Hvitved-Jacobsen, T., Vollertsen, J., & Nielsen, A.H., Sewer Processes: Microbial and Chemical Process Engineering of Sewer Networks. *CRC Press*, **2**(2013). doi.org/10.1201/b14666
- [43] Thai, P.K., Jiang, G., Gernjak, W., Yuan, Z., Lai, F.Y., Mueller, J.F., Effects of sewer conditions on the degradation of selected illicit drug residues in wastewater. *Water Research*. **48**(2014) 538–547. doi:10.1016/j.watres.2013.10.019
- [44] Causanilles A., Baz-Lomba J.A., Burgard D.A. i sur., Improving wastewater-based epidemiology to estimate cannabis use: focus on the initial aspects of the analytical procedure. *Analytica Chimica Acta*, **988**(2017) 27-33.
- [45] 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. *Drug Testing and Analysis*, **5**(2013) 716–721. doi:10.1002/dta.1428
- [46] Östman, M., Fick, J., Näsström, E., Lindberg, R.H., A snapshot of illicit drug use in Sweden acquired through sewage water analysis. *Science of the Total Environment*, **472**(2014) 862–871.
- [47] Warner, A., Norman, A.B., Mechanisma of cocaine Hydrolysis and metabolism in vitro and in vivo: a clarification. *Therapeutic Drug Monitoring*, **22**(2000) 266–270.

- [48] McCall, A.-K., Bade, R., Kinyua, J., Lai, F.Y., Thai, P.K., Covaci, A., Bijlsma, L., van Nuijs, A.L.N., Ort, C., Critical review on the stability of illicit drugs in sewers and wastewater samples, *Water Research*, (2015) 2-32.
- [49] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, Assessing illicit drugs in wastewater: advances in wastewater-based drug epidemiology, *Publications Office of the European Union, Luxembourg* **22**(2016) 7.
- [50] Ort, C., Lawrence, M. G., Reungoat, J. and Mueller, J. F., Sampling for PPCPs in wastewater systems: comparison of different sampling modes and optimization strategies, *Environmental Science and Technology*, **44**(2010) 6289–6296.
- [51] Van Nuijs, A. L., Gheorghe, A., Jorens, P. G., Maudens, K., Neels, H. and Covaci, A., Optimization, validation, and the application of liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of new drugs of abuse in wastewater, *Drug Testing and Analysis*, (2013) 1-3.
- [52] C. Postigo, M.J. Lopez de Alda, D. Barcelo., Analysis of drugs of abuse and their human metabolites in water by LC-MS/MS: A non-intrusive tool for drug abuse estimation at the community level. *Trends in Analytical Chemistry*, **11**(2008) 1053.
- [53] Castiglioni, S., Bijlsma, L., Covaci, A., Emke, E., Hernandez, F., Reid, M., i sur., Evaluation of uncertainties associated with the determination of community drug use through the measurement of sewage drug biomarkers, *Environmental Science and Technology*, **47**(2013) 1452–1460.
- [54] Jambrošić, Karlo. *Pregled analitičkih tehnika u epidemiologiji temeljenoj na analizi otpadnih voda*, Kemijski seminar I, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2023.
- [55] Van Nuijs, A. L., Gheorghe, A., Jorens, P. G., Maudens, K., Neels, H. and Covaci, A., Optimization, validation, and the application of liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of new drugs of abuse in wastewater, *Drug Testing and Analysis*, **6**(2014) 861–867. doi: 10.1016/j.watres.2015.10.040.

[56] Zimdahl Kahlin, Anna. *Pharmacogenetic studies of thiopurine methyltransferase genotype-phenotype concordance and effect of methotrexate on thiopurine metabolism*, Department of Biomedical and Clinical Sciences Faculty of Medicine and Health Sciences Linköping University, Sweden, Linköping 2020.

[57] Emke, E., Evans, S., Kasprzyk-Hordern, B. and de Voogt, P., Enantiomer profiling of high loads of amphetamine and MDMA in communal sewage: a Dutch perspective', *Science of the Total Environment*, **487**(2014) 666–672.

[58] Baker, D. R., Kasprzyk-Hordern, B., Critical evaluation of methodology commonly used in sample collection, storage and preparation for the analysis of pharmaceuticals and illicit drugs in surface water and wastewater by solid phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, **1218**(2011) 8036–8059.

[59] Zuccato, E., Chiabrando, C., Castiglioni, S., Bagnati, R., Fanelli, R., Estimating community drug abuse by wastewater analysis, *Environmental Health Perspectives* **116**(2008) 1027–1032.

[60] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, Wastewater analysis and drugs — a European multi-city study, (2024) 2–20.

Dostupno na: [https://www.emcdda.europa.eu/publications/html/pods/waste-water-analysis\\_en](https://www.emcdda.europa.eu/publications/html/pods/waste-water-analysis_en)

[61] Been, F., Benaglia, L., Lucia, S., i sur., Data triangulation in the context of opioids monitoring via wastewater analyses, *Drug and Alcohol Dependence*, **151**(2015) 203–210.