

KONČNO POROČILO PROJEKTA N1-0143: Novi pristopi za oceno uporabe psihoaktivnih zdravilnih učinkovin in prepovedanih drog z analizo odpadnih vod

1. Povzetek

Namen predlaganega projekta je razviti inovativne postopke vzorčenja in analiznih metod za oceno uporabe/zlorabe prepovedanih drog in psihoaktivnih substanc kot so antidepresivi, antipsihotiki in benzodiazepini v splošni populaciji. Analiza človeških produktov izločanja v odpadnih vodah nudi edinstvene možnosti o pridobivanju podatkov o uporabi teh snovi. Glavni cilj naloge je bil validirati inovativno aktivno-pasivno vzorčenje (APS) ter določiti strategije odkrivanja biomarkerjev prepovedanih drog in psihoaktivnih zdravilnih učinkovin, katerih porabo v določenih skupnostih je potrebno dolgoročno spremljati. Hipoteza, ki smo jo preverili, je bila, ali bo APS zagotovilo primernejšo strategijo vzorčenja v primerjavi z vsakodnevnim 24-urnim kompozitnim vzorčenjem. V okviru projektne naloge smo najprej razvili analizne metode za določanje biomarkerjev psihoaktivnih zdravil in prepovedanih drog v odpadnih vodah. Nato smo razvili APS strategije za ciljne analite v vtokih in iztokih odpadnih vod ter preučili prednosti oz. omejitve APS vzorčenja v realnih pogojih. Rezultate smo primerjali s konvencionalnim 24-urnim kompozitnim vzorčenjem. V okviru projekta smo izvedli vzorčenja vtokov in iztokov odpadnih vod s čistilnih naprav različnih slovenskih in belgijskih mest. Glavni namen projekta so bili, da kot prvi ocenimo uporabo psihoaktivnih učinkovin v izbranih slovenskih in belgijskih mestih in uspešnost odstranjevanja izbranih spojin iz odpadnih vod izbranih čistilnih naprav ter preučimo uporabnost APS za uspešno identifikacijo novih psihoaktivnih snovi.

Skupno smo objavili 20 znanstvenih in eno strokovno publikacijo na temo predložene projektne naloge, 5 člankov je v recenziji oz. pripravi, sodelovali pa smo tudi s prispevki na 12 znanstvenih mednarodnih konferencah (glej Točko 3). Vse zastavljene naloge smo v celoti izpolnili.

2. Poročilo o uresničitvi predloženega programa dela oziroma ciljev na raziskovalnem projektu

Cilj 1: Validacija analiznih metod za določanje biomarkerjev psihoaktivnih spojin (PS) v odpadni vodi

Naloga 1.1: Identifikacija biomarkerjev

Na osnovi preglednih člankov [1-3], podatkov o predpisovanju/prodaji psihoaktivnih spojin (PS) smo izbrali relevantne antidepresive, benzodiazepine, antipsihotike in opioide ter ustrezne biomarkerje.

Naloga 1.2. Razvoj in validacija analiznih metod

Razvili in validirali smo metode (LC-MS/MS) za določanje antidepresivov, opioidov, benzodiazepinov, z-zdravil [4-6, K1-K4] ter antipsihotikov [a] v neprečiščeni odpadni vodi. Poleg klasičnih smo za procesiranje vzorca majhnega volumna razvili "high throughput" ekstrakcijo [7, 8], preučili stabilnosti biomarkerjev v odpadni vodi (naloga 1.3) ter ocenili uporabo PS (naloga 3.2). Dodatno smo razvili GC-MS/MS metodo za ugotavljanje aplikativnosti aktivno pasivnih vzorčevalnikov (APS, naloga 2.2.) pri

določanju trendov uporabe PS [b]. Za dolgoročno spremljanje časovno-prostorskih trendov uporabe PS (naloga 3.2), oceno učinkovitosti odstranjevanja izbranih PS med čiščenjem odpadnih vod ter razširjenosti PS v površinskih vodah (naloga 3.3) smo razvili in validirali LC-MS/MS metodo za analizo neprečiščene in prečiščene odpadne ter površinske vode [c].

Naloga 1.3. Preučevanje stabilnosti izbranih biomarkerjev v odpadni vodi

Dostopne podatke o stabilnosti biomarkerjev PS smo zbrali v preglednem članku [3], ki je bil osnova študije stabilnosti izbranih antidepresivov, opioidov [4, 5] in antipsihotikov. Večina slednjih je v kanalizacijskem sistemu (4 in 20 °C) stabilnih do 10 ur, med shranjevanju vzorcev (-20 °C) pa do 3 mesece [a].

Cilj 2: APS strategije za določitev biomarkerjev prepovedanih drog in PS v odpadnih vodah

Naloga 2.1. Optimizacija APS

Za optimizacijo strategij aktivno-pasivnega vzorčenja (APS) z geli smo izbrali dva polimerna sorbenta: HLB in MCX ter različna vezivna sredstva. APS gele smo za izbrane PS karakterizirali pod laboratorijskimi pogoji. Določili smo K_{sw} (koeficient razporeditve sorbent-voda), k_x (konstanta akumulacije), D (difuzijski koeficient) in opravili kinetične eksperimente, ki so pokazali, da je kinetike sorpcije odvisna od speciacije in hidrofobnosti PS [K5, K6, b].

Naloga 2.2. Primerjava 24-h kompozitnih vzorcev in APS vzorčevalniov

Z namenom določitve akumulacijskega profila izbranih spojin smo poleti 2023 APS izpostavili (1, 3, 5, 7 in 14 dni) iztoku treh belgijskih ČN ter vzporedno opravili še pasivno (POCIS in o-DGT) in aktivno (24-urne kompozitno) vzorčenje. Koncentracije tarčnih PS v vzorcih pridobljenih z APS, pasivnim ter aktivnim vzorčenjem so dobro korelirale, zato smo jeseni 2023 poskus ponovili na Centralni čistilni napravi Ljubljana, kjer smo dodatno vzorčili še vtok. Izkazalo se je, da APS trenutne konfiguracije zaradi kompozicije neprečiščene odpadne vode ni primeren za vzorčenje vtokov (mašenje membran, okvara črpalk), zato smo predlagali nadgradnjo APS, t.j., vgradnja dvojnih membran in močnejše črpalke, ki poteka na Univerzi v Antwerpnu. Koncentracije PS v iztokih pa so dobro korelirale med vzorci pridobljenimi z APS, pasivnim in aktivnim vzorčenjem [b].

Naloga 2.3. Karakterizacija sorpcije biomarkerjev ob prisotnosti mikrodelcev iz odpadne vode

Za interpretacijo APS rezultatov je nujno poznavanje vpliva suspendiranih delcev (SPM) na sorpcijo PS. V laboratoriju smo APS gele izpostavili vodi z dodanimi SPM, ki smo jo pridobili iz neprečiščene odpadne vode s filtracijo in pokazali, da SPM lahko delujejo kot vektorji prenosa PS v gel [K5, K6, b].

Cilj 3: Aplikacija 24-urnega kompozitnega vzorčenja in APS za oceno kratkoročne in dolgoročne uporabe prepovedanih drog in PS

Naloga 3.1. Izvedba vzorčenja

V treh sezonah (pomlad, poletje 2019 in zima 2020) smo vzorčili vtoke in iztoke (24-urni kompozitni vzorci) ter pripadajoče sprejemne površinske vode (trenutni vzorci) šestih slovenskih ČN različnih konfiguracij in določili učinkovitost odstranjevanja dovoljenih in prepovedanih drog ter njihovo razširjenost v vodnem okolju [9]. V letu 2022 smo vzorčenje ponovili na sedmih ČN in ocenili učinkovitost odstranjevanja izbranih PS [c]. Učinkovitost odstranjevanja PS na podlagi APS vzorčenja (jesen 2023) zaradi težav z vzorčenjem vtokov nismo uspeli ovrednotiti (glej nalogo 2.1.).

Naloga 3.2. Zdravstvena ocena populacije na osnovi WBE

a) Ocena prostorskih in časovnih trendov

Ocenili smo prostorsko-časovne trende uporabe PS v Belgiji in Sloveniji ter obravnavali vpliv pandemije COVID-19 [4, 6-8, 10, 11, K1-K3, K7-K10].

b) Ujemanje WBE in socio-epidemiološkimi podatkov o uporabi PS

Preučili smo omejitve WBE postopka in možne izboljšave vrednotenja uporabe PS [12, S1], na podlagi česar smo razvili dve analizni metodi za razlikovanje med odvrženo in uporabljeno drogo. Z enantiomernim profiliranjem biomarkerjev amfetaminov (kiralna derivatizacija, GC-MS/MS) smo neobičajno visoke vsebnosti MDMA v odpadni vodi Ljubljane določene spomladi 2020 povezali z neuporabljeno drogo, odvrženo v kanalizacijo [13]. Čeprav je tovrstna precenitev uporabe PS mogoča, pomembnih razlik med uporabi antidepressivov ocenjeno preko analize odpadnih vod ter zabeležene letne predpisane/prodaje količine nismo zaznali [7]. Nadaljnjo, smo kot prvi z GC-C-IRMS analizo določili razmerje stabilnih izotopov ogljika v morfinu, ki smo ga iz odpadne vode izolirali z ekstrakcijo in preparativno («flash») kromatografijo in primerjali sestavo z ulično drogo ter zdravili [d]. Četudi smo IRMS metodo sprva načrtovali uporabiti za razlikovanje med uporabljeno in odvrženo drogo, so se razsikave izkazale primerne za določanje geografskega porekla droge.

Naloga 3.3. Učinkovitost čiščenja ČN

Preučili smo stopnjo odstranitve ostankov dovoljenih in nedovoljenih drog tekom čiščenja odpadnih vod, njihovo pojavnost v površinskih vodah in ocenili tveganje za okoljske organizme [2]. Učinkovitost odstranjevanja drog je bila odvisna od tehnologije čiščenja, prisotnost nekaterih ostankov drog v sprejemnih rekah pa je lahko škodljiva za vodne organizme. Rezultati kažejo slabše odstranjevanje antidepressivov na slovenskih ČN [c].

Naloga 3.4. Nove psihoaktivne snovi (NPS)

Raziskave razvoja netarčnih analiz [14, 15] so osnova za identifikacijo novih psihoaktivnih snovi (NPS) v okviru tega projekta. NPS so bili prisotne v odpadnih vodah slovenskih izobraževalnih ustanov različnih stopenj (osnovne, srednje šole in visokošolski zavodi) [16, 17], pet NPS pa smo določili in semi-kvantificirali tudi v sedmih slovenskih mestih [e, K11, K12]. Dodatno smo bili raziskovalci Univerze v Antwerpnu in IJS udeleženi v treh mednarodnih raziskavah spremljanja pojavnosti NPS v vtokih čistilnih naprav [18-20], v katerih smo z razvojem novih protokolov za analizo netarčnih spojin in podajanjem rezultatov pripomogli k boljšemu poznavanju uporabe NPS na globalni ravni.

OBJAVLJENI ZNANSTVENI ČLANKI

- [1] Verovšek et al., Trends in Environmental Analytical Chemistry, 28 (2020), e00105. [COBISS.SI-ID 31196419]
- [2] Verovšek et al., Trends in Environmental Analytical Chemistry, 34 (2022), e00164. [COBISS.SI-ID 106253315]
- [3] Laimou-Geraniou et al., Trends in Environmental Analytical Chemistry, 37 (2023), e00192. [COBISS.SI-ID 135637507]
- [4] Boogaerts et al., Talanta, 200 (2019), 340-349.
- [5] Boogaerts et al., Talanta, 232 (2021), 122443.
- [6] Boogaerts et al., Environment International, 170 (2022), 107559.
- [7] Laimou-Geraniou et al., Science of the total environment - STOTEN, 903 (2023), 166586. [COBISS.SI-ID 162438915]
- [8] Boogaerts et al., Drug testing and analysis, 15 (023), 240-246. doi:10.1002/dta.3392
- [9] Verovšek et al., STOTEN, 866 (2023), 161257. [COBISS.SI-ID 136155651]
- [10] Boogaerts et al., STOTEN, 876 (2023), 162342. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162342>
- [11] Boogaerts et al., International Journal of Drug Policy, 104 (2022), 103679. <https://doi.org/10.1016/j.drugpo.2022.103679>
- [12] Quireyns et al., WIREs Forensic Science, 5 (2023), e1469. <https://doi.org/10.1002/wfs2.1469>.
- [13] Verovšek et al., STOTEN, 835 (2022), 155594. [COBISS.SI-ID 106116355]
- [14] Kovačič et al., J. Haz. Materials, 404 Part A (2021), 124079. [COBISS.SI-ID 29781507]
- [15] Kovačič et al., STOTEN, 837 (2022), 155707. [COBISS.SI-ID 106290691]
- [16] Verovšek et al., STOTEN, 799 (2021), 150013. [COBISS.SI-ID 78501891]

- [17] Verovšek et al., *Env. Research*, 237 (2023) 117061. [COBISS.SI-ID 163300611]
- [18] Bade et al., *Water Research X*, 19 (2023) 100179. [COBISS.SI-ID 149227779]
- [19] Bade et al., *J. Haz. Materials*, 469 (2024), 133955. [COBISS.SI-ID 187970051]
- [20] Salgueiro-gonzales et al., *Water Research*, 27/254 (2024), 121390. [COBISS.SI-ID 187374851]

OBJAVLJENI STROKOVNI ČLANKI

[S1] Quireyns et al., , Maarten, Tim Boogaerts, Natan Van Wichelen, Adrian Covaci, and Alexander L. N. van Nuijs. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction: https://www.emcdda.europa.eu/drugs-library/estimating-size-drug-markets-selected-european-cities-using-wastewater-derived-data-drug-and-drug-metabolite-residues_en, September 27, 2023.

PUBLIKACIJE V PRIPRAVI

- [a] Laimou-Geraniou et al., (In-sample) Stability of selected antipsychotics in influent wastewater, pripravljeno za oddajo v STOTEN, maj, 2024.
- [b] Jun Anies et al., In-situ application of the active-passive sampling device for wastewater analysis of psychoactive compounds, pripravljeno za oddajo v Environmental Resercah, junij, 2024
- [c] Laimou-Geraniou et al., Spatiotemporal study of psychoactive pharmaceuticals in Slovenia, their removal during wastewater treatment, and their occurrence in receiving river waters, pripravljeno za oddajo v STOTEN (maj, 2024)
- [d] Verovšek et al., Combining a Stable Isotope Analysis with a Wastewater-Based Epidemiological Approach to Complement Illicit Drug Profiling, pripravljeno za oddajo v Environmental Science & Technology, maj, 2024
- [e] Laimou-Geraniou et al., Target and suspect screening to investigate spatiotemporal trends of new psychoactive substances in Slovenia through influent wastewater analysis, pripravljeno za oddajo v Addiction, maj, 2024

KONFERENČNI PRISPEVKI

- [K1] Laimou-Geraniou et al. (oral presentation), Chem2Change, Environmental Chemistry towards Global Change, 2nd Online ACE Seminar on Chemistry and the Environment Led by Early-Career Scientists, online, 2022. [COBISS.SI-ID 101152259]
- [K2] Laimou-Geraniou et al. (oral p.), Slovenian Chemical Days, 28th Annual Meeting of the Slovenian Chemical Society, Portorož, Slovenia, 2022. [COBISS.SI-ID 123298307]
- [K3] Laimou-Geraniou et al. (oral p.), 13th Jožef Stefan International Postgraduate School Students' Conference and 15th Young Researchers' Day of Chemistry, material science, biochemistry and environment, online, 2021. [COBISS.SI-ID 104578819]
- [K4] Quireyns et al. (oral p.), Testing the Waters 5, Brisbane, Australia, 2022.

[K5] Anies et al. (poster), Society of Environmental Toxicology and Chemistry Conference, Copenhagen, Denmark, 2022.

[K6] Anies et al. (poster), Interfaces Against Pollution Conference, Antwerp, Belgium, 2022.

[K7] Quireyans et al. (invited spiker), The International Association of Forensic Toxicologists, Rome, Italy, 2023.

[K8] Quireyans et al. (poster), The International Association of Forensic Toxicologists, Rome, Italy, 2023.

[K9] Quireyans et al. (oral p.), Testing The Waters 6, Oxford, United Kingdom, 2023.

[K10] Quireyans et al. (invited spiker), CEPOL/ECMDA internal training to diverse audience; Budapest, Hungary, 2023.

[K11] Laimou-Geraniou et al. (oral p.), Monitoring the Use of New Psychoactive Substances in Slovenia Using Wastewater Analysis, Spectromed, Hammamet, Tunisia, 21-25 April 2024.

[K12] Laimou-Geraniou et al. (oral p.), Qualitative and quantitative spatiotemporal analysis of new psychoactive substances in Slovenia through the analysis of influent wastewater, SETAC Europe 34th Annual Meeting, Seville, Spain, 5-9 May 2024.

3. Ocena stopnje uresničitve programa dela raziskovalnega projekta in zastavljenih ciljev

Projektna naloga je imela tri cilje:

Cilj 1: Validacija analiznih metod za določanje biomarkerjev psihoaktivnih spojin (PS) v odpadni vodi

V okviru tega cilja smo imeli tri naloge in sicer: identifikacijo biomarkerjev (naloga 1.1), razvoj in validacijo analiznih metod (naloga 1.2) ter preučevanje stabilnosti izbranih biomarkerjev v odpadni vodi (naloga 1.3). Izpolnili smo vse zastavljene naloge (za podrobnosti glej točko 3) in skupno objavili 8 člankov [1-8] in rezultate predstavili na 4 konferencah [K1-K4]. Trije članki so v pripravi [a-c].

Cilj 2: APS strategije za določitev biomarkerjev prepovedanih drog in PS v odpadnih vodah

V okviru tega cilja smo imeli sledeče naloge: optimizacija APS (naloga 2.1), primerjava 24-h kompozitnih vzorcev in APS vzorčevalnikov (naloga 2.2) ter karakterizacija sorpcije biomarkerjev ob prisotnosti mikrodelcev iz odpadne vode (naloga 2.3). Tudi v okviru tega cilja zastavljene naloge smo popolnoma izpolnili, rezultati pa so bili predstavljeni na dveh konferencah [K5, K6] ter bodo povzeti v članku, ki je v pripravi [b].

Cilj 3: Aplikacija 24-urnega kompozitnega vzorčenja in APS za oceno kratkoročne in dolgoročne uporabe prepovedanih drog in PS

V okviru tretjega cilja smo imeli sledeče naloge: izvedbo vzorčenja (naloga 3.1.), zdravstveno oceno populacije na osnovi WBE (naloga 3.2.), kjer smo preučevali

prostorske in časovne trende uporabe PS ter ujemanje med podatki WBE in dostopnimi socio-epidemiološkimi podatki. Ovrednotili smo okoljski vpliv uporabe prepovedanih drog in PS (naloga 3.3.) ter ocenili uporabo novih psihoaktivnih snovi (naloga 3.4). Zastavljene naloge smo poponoma izpolnili in objavili v 17 znanstvenih publikacijah [2, 4, 6-20], 3 pa so v pripravi [c-e]. Prav tako smo rezultate predstavili v eni strokovni publikaciji [S1] ter na 7 konferencah [K1-K3, K7-K10], dodatno pa bodo predstavljeni še na 2 (2024 [K11, K12]).

ZAKLJUČKI: V okviru projektne naloge smo ne le izpolnili vse zastavljene cilje, temveč jih tudi presegli. To je razvidno iz objavljenih publikacij (20 člankov), 5 pa jih je poslanih v objavo oz. so v zaključni fazi priprave. Vsi članki so objavljeni v mednarodnih revijah z izjemno visokim faktorjem vpliva, kjer bi izpostavila sledeče revije (vse A"): Journal of Hazardous Materials, Water Reserach, STOTEN, Environment International in Talanta. Rezultate projektne dela smo objavili tudi v obliki strokovnega članka ter predstavili na številnih mednarodnih znanstvenih konferencah (10 konferenčnih prispevkov in 2 pripravljena za ustno predstavitev na konferencah v aprilu in maju 2024). **Ocenjujemo, da smo izpolnili vse v projektni nalogi zastavljene cilje.**

Poročilo pripravila

Prof dr Ester Heath

Ljubljana, 8.4.2024