 **PROJEKT N1-0143**

**Novi pristopi za oceno uporabe psihoaktivnih zdravilnih učinkovin in prepovedanih drog z analizo odpadnih vod / Novel approaches for the estimation of the use of psychoactive pharmaceuticals and illicit drugs by wastewater analysis**

**1.Poročilo o realizaciji predloženega programa dela na raziskovalnem projektu za obdobje vmesnega poročila (v kolikor gre za mednarodni projekt, prikažite prispevek tujega partnerja)**

Delovni sklopi (WP) in realizacija dela je navedena spodaj:

**WP1: Razviti in validirati analizne postopke za določitev biomarkerjev prepovedanih drog in psihoaktivnih zdravilnih učinkovin v odpadnih vodah**

Naloga 1.1: Identifikacija biomarkerjev

Na osnovi uporabe v Sloveniji in Belgiji ter razpoložljive opreme v obeh laboratorijh smo analizne metode razdelili v več segmentov:

1. IJS+UA:
* Psihoaktivne snovi (PS): amitriptilin, amfetamin, benzoilekgonin, bupropion, bupropion-oh, citalopram, kodein, dihidrokodein, EDDP, hidromorfone, mCPP, MDMA, melitracen, metadon, metamfetamin, mirtazapin, moklobemid, morfin, norcitalopram, normirtazapin, nortilidin, o-DMV, ODT, DMV, oksikodon, tilidin, tramadol, trazodon in venlafaksin.
1. IJS, PS snovi pomembne za Slovenijo:
* Benzodiazepini: alprazolam/α-hidroksi-alprazolam, bromazepam/bromazepam-3-OH, klonazepam/7-amino-klonazepam, diazepam/nordiazepam, temazepam, oksaazepam, lorazepam.
* Z-droge: zolpidem/zolpidem fenil-4-karboksilna kislina.
* Antipsihotiki: aripiprazol/ dehidro aripiprazol, klozapin/norklozapin, olanzapin/ desmetilolanzapin, kvetiapin/ norkvetiapin, risperidon, paliperidon, haloperidol.
* Antidepresivi: amitriptilin/ nortriptilin, bupropion/hidroksibupropion, escitalopram/ norcitalopram, venlafaksine/ O-desmetilvenlafaksine, karbamazepin/ 10,11-epoksi karbamazepin, trazodon/ m-klorofenilpiperazin (mCPP), mirtazapin/ normirtazapin, Sertraline, fluoksetin, duloksetin, paroksetin.
1. UA, PS pomembne za Belgijo:
* Benzodiazepini: alprazolam, bromazepam, klonazepam, klonazolam, kloniprazepam, klotiazepam, diazepam, flunitrazepam, lorazepam, midazolam, nitrazepam, nordiazepam, oksazepam, temazepam, tetrazepam, zolpidem, zopiklon)
* Antipsihotiki: amisulprid, bromperidol, klozapin, flupentiksol, haloperidol, olanzapin, paliperidon, kvetiapin, risperidon, sulpirid, zuklopentiksol.

Naloga 1.2: Razvoj in validacija analizne metode

Na IJS smo opravili pregled literature glede obstoječih analiznih metod (LAIMOU-GERANIOU *et al.*, 2023, glej točko 6).

Na UA in IJS razvijamo analizne metode za izbrane PS in prepovedane droge:

1. IJS+UA: optimizirali, validirali in uporabili smo analizno metodo na osnovi 96-well elucijskega protokola za določitev vsebnosti izbranih psihoaktivnih substanc v neprečiščenih odpadnih vodah. Validacija je bila uspešna za 28 starševskih spojin in metabolitiov antidepresivov, opioidov in drog, ki se zlorabljajo. Delo je objavljeno v soavtorstvu UA in IJS (BOOGAERTS *et al*., 2022: glej točko 6).
2. IJS:
* za Slovenijo pomembne biomarkerje (glej Nalogo 1.1) smo izvedli optimizacijo na LC-MS (MS in LC parametre). Trenutno poteka optimizacija ekstrakcijskih pogojev, ki bo zaključena konec meseca. Sledi validacija ter ekstrakcija realnih vzorcev odpadne vode. S to metodo bomo ocenili pojavnost izbranih spojin v vtokih čistilnih naprav (ČN) slovenskih mest v različnih letih (2019, 2020, 2021 in 2022) in letnih časih (pomlad, poletje, zima). Ovrednotili bomo tudi učinek epidemije koronavirusne bolezni na uporabo teh spojin. Z isto metodo bomo določili tudi učnkovitost čiščenja slovenskih ČN z različnimi tehnologijami čiščenja odpadnih vod.
* razvili in objavili smo analizno metodo za enantiomerno profiliranje kiralnih drog (VEROVŠEK *et al.*, 2022: glej točko 6), ki jo bomo uporabili za bolj natančno napovedovanje uporabe psihoaktivnih drog (npr. citalopram, venlaflaksin in fluoksetin).
1. UA: na UA trenutno razvijajo analizno metodo za določitev izbranih benzodiazepinov in antipsihotikov. Validirana analizna metoda bo uporabljena na realnih odpadnih vodah obeh držav.

Naloga 1.3: Preučevanje stabilnosti biomarkerjev v odpadni vodi

Ocena stabilnosti izbranih biomarkerjev bo potekala na IJS takoj, ko bo validacija analizne metode za določitev izbranih biomarkerjev v odpadni vodi zaključena (Naloga 1.2).

**WP2: Razvoj aktivno-pasivnih vzorčevalnih strategij za biomarkerje prepovedanih drog in psihoaktivnih zdravilnih učinkovin v odpadnih vodah**

Naloga 2.1 Optimizacija aktivno-pasivnega vzorčenja (APS) v odpadni vodi

Učinkovitost APS za predkoncentriranju psihoaktivnih spojin je bila ovrednotena z laboratorijskimi poskusi izvedenimi v pitni vodi, spajkani s tarčnimi spojinami in odpadni vodi (vtok in iztok). Tudi v površinski vodi smo izvedli serijo poskusov uporabe APS za oceno delovanja sorbentnih gelov. Rezultati so bili predstavljeni na dveh konferencah: SETAC 2022 in IAP 2022 (glej točko 8).

Naloga 2.2 Primerjava 24-urnega in APS vzorčenja odpadnih vod

Ta naloga bo izvedena, ko bo zaključena Naloga 2.1, vendar ne pozneje kot junija 2023.

Naloga 2.3 Karakterizacija sorpcijske dinamike biomarkerjev

V okviru tega delovnega sklopa smo karakterizirali sorpcijsko kinetiko izbranih psihoaktivnih spojin v sorbentnih gelih HLB in MCX na osnovi agaroze in polimerov. Ocenjeni so bili učinki različnih pH in slanosti vodnih vzorcev na sorpcijsko kinetiko in difuzijski koeficient tarčnih spojin. Rezultati bodo strnjeni v v publikacijo (ANIEST et al., v pripravi: glej točko 8).

**WP3: Uporaba aktivnega in pasivnega vzorčenja za oceno uporabe in uspešnosti čiščenja ČN za prepovedane droge in psihoaktivne snovi**

Naloga 3.1. Vzorčenje na ČN (M7-M27)

Vzorčenja opravljamo večplastno:

* Za oceno časovnih in geografskih trendov uporabe drog sodelujemo v mednarodnem SCORE monitoringu vsako leto marca, z vzorčenjem vtokov odpadnih vod slovenskih mest (v letu 2022 smo sodelovali že s sedmimi mesti).
* Za oceno vpliva letnih časov smo opravili v letih 2019/20 še pomladno, poletno in zimsko vzorčenje vtokov na ČN.
* Za oceno uspešnosti čiščenja ČN z različnimi konfiguracijami pa smo vzorčili vtoke in iztoke iz ČN (2019/20 pomladi, poleti in pozimi ter pomladi 2021 in 2022).

Naloga 3.2.Pridobiti časovno prostorske podatke o uporabi psihoaktivnih in opioidnih zdravilnih učinkovin

Rezultate delimo v dve skupini:

1. za prepovedane in dovoljene droge vsako leto marca podajamo rezultate v okviru mednarodnega SCORE monitoringa. Poleg tega smo za določitev vpliva letnega časa na uporabo drog, vzorčili vtoke na ČN tudi poleti 2019 in pozimi 2020 in 2021. Rezultati so zbrani v strokovnih člankih (glej točko 8).
2. Za določitev uporabe novih psihoaktivnih snovi smo z metodo objavljeno v BOOGARTES et al. 2022 (glej točko 6) analizirali vzorce vzorčene poleti 2019, pozimi in pomladi 2020 ter pozimi in pomladi 2021 na vtokih šestih ČN z različno konfiguracijo (Ljubljana, Domžale-Kamnik, Maribor, Koper, Novo mesto, Velenje). Trenutno poteka evaluacija podatkov, rezultate pa bomo zbrali v članku (LAIMOU-GERANIOU et al., 2023: glej točko 8).

Naloga 3.3. Učinkovitost čiščenja na ČN

Rezultate delimo v dve skupini:

1. za prepovedane in dovoljene droge smo uspešnosti čiščenja ČN različnih konfiguracij ocenili za vzorce vzorčene pomladi, poleti 2019 ter pozimi 2020. Rezultati so zbrani v članku: VEROVŠEK *et al.*, 2023: glej točko 8).
2. za določitev uporabe psihoaktivne zdravstvene učinkovine smo vzorčili vtoke (in iztoke) večjih slovenskih ČN poleti 2019, pomladi in pozimi v letih 2020 in 2021 ter pomladi 2022. Vzorce bomo analizirali in uspešnost čiščenja bo ovrednotena predvidoma v aprilu 2023 (glej Naloga 1.2).

Naloga 3.4. Nove psihoaktivne snovi

1. Z raziskovalci španske univerze (prof. dr. Lubertus Bjilsma, University Jaume I, Castellon, SP) smo določali NPS v vzorcih odpadnih vod slovenskih izobraževalnih institucij in pokazali prisotnost sintetičnih katinonov, kar je v skladu z obstoječimi epidemiološkimi študijami (VEROVŠEK *et al.*, v pripravi: glej točka 8)
2. Z raziskovalci avstralske univerze (prof. dr. Richard Bade, Quensland University, Queensland, AU) in UA smo preučevali prisotnost NPS med božično-novoletnimi prazniki v vzorcih odpadnih vod, kjer smo sodelovali z enotedenskimi vzorci vtokov ČN štirih slovenskih mest (Ljubljana, Maribor, Kranj in Novo mesto). Rezultati so pokazali prisotnost mitraginina, eutilona, 2F-deskloroketamina in 3-MMC. Rezultati so zbrani v BADE *et al.*, poslano v objavo: glej točka 8).

**2.Ocena stopnje realizacije programa dela na raziskovalnem projektu in zastavljenih raziskovalnih ciljev za obdobje od 1.1.2020 do 31.12.2023**

Spodaj so navedeni zastavljeni cilji (mejniki, M) projektne naloge po delovnih sklopih:

WP1:

M1 (mesec 1): Seznam biorakerjev antidepresivov, antipsihotikov, benzodiazepinov, z-drog in opioidov

Mejnik je dosežen, seznam pa bomo tekom projektne naloge dopolnjevali.

M2 (mesec 9): Validacija analiznih metod za določitev antidepresivov, antipsihotikov, benzodiazepinov, z-drog in opioidov je bila predvidena za 8. mesec in je bila izpolnjena za izbrane spojine (razvita metoda za biomarkerje drog razvita na UA, v teku na IJS), nadaljujemo pa z razvojem/optimizacijo novih analiznih metod tako na UA kot IJS (glej točka 3, Naloga 1.2).

M3 (mesec 9): Ocena stabilnosti biomarkerjev v odpadni vodi bo izveden z zamikom. Vzrok temu je nedostopnost laboratorijev v času epidemije koronavirusne bolezni ter zaporedne večkratne okvare LC-MS QTrap instrumenta na IJS. Težave so sedaj odpravljene, poleg tega pa smo decembra 2022 na IJS instalirali nov LC-MS/MS (Orbitrap), ki bo omogočil bolj tekoče instrumentalne analize. Pričakujemo, da bodo naloge povezane s stabilnostjo zaključene pred poletjem 2023.

WP2:

M4 (mesec 12): Predkoncentriranje izbranih biomarkerjev z APS je bilo uspešno opravljeno.

M5 (mesec 15): Aplikacija APS v odpadnih vodah v Sloveniji in Belgiji:

APS smo preverili za delovanje v odpadnih vodah, aplikacija v realnem okolju pa je načrtovana za pomlad 2023. Vzrok zamika je podobno kot pri Mejniku 3 zaostanek zaradi nedostopnosti laboratorijev med epidemija koronavirusne bolezni ter okvare instrumenta.

M6 (mesec 15): Določanje sorpcije izbranih biomarkerjev na modelne sorbente je bilo preučeno.

WP3:

M7 (mesec 27): Vzorčenje na ČN opravljeno.

M8 (mesec 33): Pridobitev časovno-geografskih trendov uporabe psihoaktivnih in opioidnih zdravilnih učinkovin – naloga je delno opravljena: za dovoljene in prepovedane droge je ta del zaključen, za izbrane psihoaktivne subtsance pa je v teku.

M9 (mesec 42): Korelacija med uporabo prepovedanih drog in zdravilnih učinkovin je v teku.

M10 (mesec 45): Ocenjena učinkovitost čiščenja na izbranih ČN z različno konfiguracijo – za dovoljene in prepovedane droge je ta mejnik končan, za psihoaktivne substance pa je v teku.

M11 (mesec 48): Identifikacija NPS na slovenskem in belgijskem trgu –ta naloga je izpolnjena (ena publikacija v recenziji, ena v pripravi), četudi je izjemno zahtevna in predvidena za zadnje leto projektne naloge. Nalogo bomo še izpopolnili, saj smo na iJS dobili nov visokoločljivostni LC-MS Orbitrap, ki to omogoča.

Iz zapisanega je razvidno, da je prišlo do zamenjave vrstnega reda izvajanja nalog :

-      razvoj nekaterih analiznih metod (WP1: M3) in s tem povezanih mejnikov (WP2: M5 in WP3: M8) še poteka, četudi je bil predviden njihov zaključek pred 4. letom trajanja projekta,

-      po drugi strani pa so bile naloge iz 4. leta projekta izvedene predčasno (WP3: M10, M11),

kljub temu se obseg dela se ni spremenil.

**3.Spremembe programa dela raziskovalnega projekta oziroma spremembe sestave projektne skupine za obdobje vmesnega poročila**

Kot smo zgoraj podrobno navedli (točka 4), je prišlo do zamenjave vrstnega reda izvajanja nalog zaradi epidemije koronavirusne bolezni in okvare instrumenta na IJS. Četudi se je časovnica poteka nalog spremenila:

* razvoj nekaterih analiznih metod (WP1: M3) in s tem povezanih mejnikov (WP2: M5 in WP3: M8) še poteka, četudi je bil predviden njihov zaključek pred 4. letom trajanja projekta,
* po drugi strani pa so bile naloge iz 4. leta projekta izvedene predčasno (WP3: M10, M11).

ocenjujemo na osnovi težavnost predčasno izvedenih nalog (WP3) in publikacij, ki so nastale v času trajanja projekta (glej točko 6 in 8), da smo celokupno ne samo dosegli začrtane cilje, temveč jih presegli. Sestava projektne skpine se ni bistveno spremenila.

**4.Najpomembnejši dosežki projektne skupine na raziskovalnem področju za obdobje vmesnega poročila**

1. BOOGAERTS et al. Optimization, validation and application of a high-throughput 96-well elution protocol for the quantification of psychoactive substances in influent wastewater. Drug testing and analysis [COBISS.SI-ID [128207875](https://plus.cobiss.net/cobiss/si/sl/bib/128207875)]
2. VEROVŠEK et al: Removal of residues of psychoactive substances during wastewater treatment, their occurrence in receiving river waters and environmental risk assessment [COBISS.SI-ID [136155651](https://plus.cobiss.net/cobiss/si/sl/bib/136155651)],
3. Laimou-Geraniou et al: Analytical methods for the determination of antidepressants, antipsychotics, benzodiazepines and their metabolites through wastewater-based epidemiology [COBISS.SI-ID [135637507](https://plus.cobiss.net/cobiss/si/sl/bib/135637507)], [[JCR](https://plus.si.cobiss.net/opac7/jcr?c=sc=2214-1588+and+PY=2021&r1=true&lang=sl), [SNIP](https://plus.si.cobiss.net/opac7/snip?c=sc=2214-1588+and+PY=2021&r1=true&lang=sl)]
4. VEROVŠEK et al: Enantiomeric profiling of amphetamines in wastewater using chiral derivatisation with gas chromatographic-tandem mass spectrometric detection [COBISS.SI-ID [106116355](https://plus.cobiss.net/cobiss/si/sl/bib/106116355)]
5. KOVAČIČ et al: Degradation of bisphenol A and S in wastewater during cold atmospheric pressure plasma treatment. Science of the total environment [COBISS.SI-ID [116993795](https://plus.cobiss.net/cobiss/si/sl/bib/116993795)]??? [106290691](https://plus.cobiss.net/cobiss/si/sl/bib/106290691)
6. VEROVŠEKet al: Investigation of drugs of abuse in educational institutions using wastewater analysis [COBISS.SI-ID [78501891](https://plus.cobiss.net/cobiss/si/sl/bib/78501891)]
7. VEROVŠEK et al: Occurrence, fate and determination of tobacco (nicotine) and alcohol (ethanol) residues in waste- and environmental waters [COBISS.SI-ID [106253315](https://plus.cobiss.net/cobiss/si/sl/bib/106253315)]
8. VEROVŠEK et al: Site- and event-specific wastewater-based epidemiology : current status and future perspectives [COBISS.SI-ID [31196419](https://plus.cobiss.net/cobiss/si/sl/bib/31196419)],
9. KOVAČIČ et al: Kinetics and biotransformation products of bisphenol F and S during aerobic degradation with activated sludge. Journal of hazardous materials [COBISS.SI-ID [29781507](https://plus.cobiss.net/cobiss/si/sl/bib/29781507)]
10. VEROVŠEK et al: Data in brief : drug use data for slovenian educational institutions using wastewater analysis [COBISS.SI-ID [86403331](https://plus.cobiss.net/cobiss/si/sl/bib/86403331)]

**5.Drugi pomembni rezultati projektne skupine za obdobje vmesnega poročila**

OBJAVLJENI ČLANKI, v katerih je razvoj metod, ki bodo uporabljene v N1-0143:

1. ŠKUFCA *et al*.: Removal and fate of 18 bisphenols in lab-scale algal bioreactors [COBISS.SI-ID [74097923](https://plus.cobiss.net/cobiss/si/sl/bib/74097923)]
2. ŠKUFCA *et al*.: Determination of 18 bisphenols in aqueous and biomass phase of high rate algal ponds: development, validation and applicatio. [COBISS.SI-ID [48987395](https://plus.cobiss.net/cobiss/si/sl/bib/48987395)]
3. ŽENER *et al*.: Removal of 18 bisphenols co-present in aqueous media by effectively immobilized titania photocatalyst [COBISS.SI-ID [87911683](https://plus.cobiss.net/cobiss/si/sl/bib/87911683)]
4. PROSENC *et al*.: Microalgae-based removal of contaminants of emerging concern: mechanisms in Chlorella vulgaris and mixed algal-bacterial cultures [COBISS.SI-ID [66314499](https://plus.cobiss.net/cobiss/si/sl/bib/66314499)]
5. ŠKUFCA *et al*.: Phycoremediation of municipal wastewater: removal of nutrients and contaminants of emerging concern. Science of the total environment [COBISS.SI-ID [58688003](https://plus.cobiss.net/cobiss/si/sl/bib/58688003)]

ČLANKI V PRIPRAVI:

1. BADE *et al*.: Global surveillance of new psychoactive substances (poslano v objavo v Water Research X, December 2022).
2. QUIREYNS *et al.:* Optimisation and validation of benzodiazepines in influent wastewater (v pripravi).
3. LAIMOU-GERANIOU *et al*.: Application of a 96-well elution protocol for the analysis of antidepressants, opioids, and drugs of abuse (or psychoactive drugs/pharmaceuticals) in Slovenian wastewater (poslano v objavo, februar 2023).
4. ANIES *et al*.: Sorption kinetics of psychoactive compounds on active-passive sampling (APS) sorbent gels (v pripravi)
5. VEROVŠEK *et al*.:Screening for antidepressants, antipsychotics, benzodiazepines, and new psychoactive drugs in wastewater from educational institutions (poslano v objavo v Addiction, februar, 2023)

STROKOVNI ČLANKI

1. VEROVŠEK *et al*.: Results of the wastewater analysis from Slovenian education institutions. *Report on the drug situation ... of the Republic of Slovenia*. 2021, str. 57-58, ilustr. ISSN 1855-8003 [COBISS.SI-ID [96458755](https://plus.cobiss.net/cobiss/si/sl/bib/96458755)]
2. VEROVŠEK *et al*.: Wastewater-based assessment of drug use in Slovenia. *Report on the drug situation ... of the Republic of Slovenia*. 2201, str. 65-71, ilustr. ISSN 1855-8003. [COBISS.SI-ID [96458499](https://plus.cobiss.net/cobiss/si/sl/bib/96458499)]
3. HEATH and VEROVŠEK. Razširjenost dovoljenih in prepovedanih drog : rezultati analize odpadnih vod slovenskih izobraževalnih institucij. *Ventil : revija za fluidno tehniko in avtomatizacijo*. [Tiskana izd.]. dec. 2021, letn. 27, št. 6, str. 374-376, ilustr., zvd. ISSN 1318-7279. [COBISS.SI-ID [92435971](https://plus.cobiss.net/cobiss/si/sl/bib/92435971)]
4. VEROVŠEK *et al*.: Additional sources of information. *Report on the drug situation ... of the Republic of Slovenia*. [English CD-ROM ed.]. 2020, str. 64-69. ISSN 1855-8003. [COBISS.SI-ID [63278851](https://plus.cobiss.net/cobiss/si/sl/bib/63278851)]

KONFERENČNI PRISPEVKI

1. SETAC, 15-19.05.2022, Copenhagen, Denmark+online: Anies *et al*: Development of active-passive sampling (APS) strategies for wastewater analysis of psychoactive compounds
2. IAP: Interfaces Against Pollution Conference 2022, 18-21.09.20222, Antwerp, Belgium: Anies *et al*: Sorption kinetics of psychoactive compounds on HLB- and MCX-based sorbent gels
3. Verovšek et al [COBISS.SI-ID [115043075](https://plus.cobiss.net/cobiss/si/sl/bib/115043075)]
4. Verovšek et al. [COBISS.SI-ID [101158403](https://plus.cobiss.net/cobiss/si/sl/bib/101158403)]
5. LAIMOU-GERANIOU et al. [COBISS.SI-ID [101152259](https://plus.cobiss.net/cobiss/si/sl/bib/101152259)]
6. LAIMOU-GERANIOU et al. [COBISS.SI-ID [123298307](https://plus.cobiss.net/cobiss/si/sl/bib/123298307)]
7. LAIMOU-GERANIOU et al. [COBISS.SI-ID [104578819](https://plus.cobiss.net/cobiss/si/sl/bib/104578819)]

Poročilo pripravila

Prof. dr. Ester Heath Ljubljana, 12.1.2023